



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la trombina sobre las vías de señalización que
activan a ERK en la glía de Müller humana**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SERGIO DE JESÚS JAIME RODRÍGUEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ**

CD.MX. 2023



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Jaime
Rodríguez
Sergio de Jesús
777 251 27 52
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
412063736

2. Datos del tutor

Dra.
Ana María
López
Colomé

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Tatiana
Fiordelisio
Coll

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Sigifredo
Pedraza
Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Aliesha Araceli
González
Arenas

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Irene
Lee
Rivera

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la trombina sobre las vías de señalización que
activan a ERK en la glía de Müller humana
43 pp
2023

Dedicatoria (naturalmente)

LA GAUDIÈRE

A aquellos que en el andar tejieron sueños conmigo,
entrelazando sus ecos en los míos,
forjando memorias que fulguran
en los rincones más oscuros de mi ser.

A la luz de estrellas antiguas, mis abuelos,
guardianes de mi ser, sembraron en mí la esencia
de lo eterno, un legado de amor que florece
en el silencio

ÍNDICE

I. PREFACIO	Pág. IV
II. AGRADECIMIENTOS	Pág. V
III. RESUMEN	Pág. VI
IV. ABSTRACT	Pág. VI
V. ABREVIATURAS	Pág. VII
1 INTRODUCCIÓN	Pág. 1
1.1 El sistema visual de los vertebrados	Pág. 1
1.2 Organización de la retina de los vertebrados	Pág. 2
1.3 Glía de Müller y su participación en enfermedades proliferativas de la retina	Pág. 3
1.4 Tipos de Glía.....	Pág. 3
1.5 Glía de Müller	Pág. 4
1.6 Vitreorretinopatía proliferativa.....	Pág. 6
1.7 El papel de la trombina en enfermedades proliferativas de la retina	Pág. 8
1.8 Receptores activados por proteasas (PARs)	Pág. 10
1.9 Transducción de señales derivadas de la activación de PARs	Pág. 11
1.9.1 Proteínas G	Pág. 11
1.9.2 Señalización por Gαi	Pág. 12
1.9.3 Señalización por Gα12/13	Pág. 12
1.9.4 Señalización mediado por Gαq	Pág. 13
1.9.5 Señales mediadas por las subunidades β - γ	Pág. 14
1.9.6 Cinasas Activadas por mitógenos (MAPK) y las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2). Vía de señalización MAPK/ERK	Pág. 14
2. JUSTIFICACIÓN	Pág. 15
3. HIPÓTESIS.....	Pág. 15
4. OBJETIVO	Pág. 15

5. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 16
5.1 Reactivos.....	Pág. 16
5.2 Cultivo de Glía de Müller.....	Pág. 16
5.3 Protocolos de estimulación o inhibición farmacológica.....	Pág. 17
5.4 Inmunodetección de proteínas (Western Blot).....	Pág. 17
5.5 Análisis estadístico.....	Pág. 18
6. RESULTADOS	Pág. 19
6.1 Vías de señalización activadas por la glía de Müller MIO-M1.....	Pág. 19
6.2 Vía de las MAP cinasas	Pág. 19
6.3 La trombina activa vías de señalización involucradas en la activación de ERK1/2 ...	Pág. 20
6.4 Activación de la vía de Gi.....	Pág. 21
6.5 Activación de la vía de G12/13.....	Pág. 22
6.6 Activación de la vía de Gq.....	Pág. 22
6.7 Activación de la vía de G β y γ.....	Pág. 23
7. DISCUSIÓN.....	Pág. 24
8. CONCLUSION.....	Pág. 27
9. REFERENCIAS	Pág. 28

I. PREFACIO

Distinguido lector,

Ya lo dijo Cervantes pero de forma refinada. Con la más sincera humildad, te presento esta obra, fruto de lo que entiendo. Mi deseo ferviente era que emanara belleza, gallardía y discreción en su máxima expresión. Sin embargo, como reza el adagio de la naturaleza, cada ser engendra a su semejanza. Así, mi ingenio, limitado y poco cultivado, solo podía dar vida a una creación imperfecta, singular en su concepción y ajena a cualquier otra imaginación.

Es común que un padre, cegado por el amor, no perciba los defectos de su hijo, confundiéndolos con virtudes. Sin embargo, en mi papel de padrastro de esta obra, me abstengo de seguir tal corriente, evitando implorarte, querido lector, que ignores las faltas que en ella encuentres. Tú, dueño de tu juicio y señor de tu voluntad, estás en plena libertad de expresar tu parecer, sin miedo a represalias por tus palabras, sean estas de crítica o alabanza.

Habría preferido entregarte este trabajo en su forma más pura, sin adornos ni preámbulos. Pero confieso que la redacción de este prefacio ha sido más necesidad que deseo y un desafío mayor incluso que la propia obra. Varias veces intenté escribir esta obra, dudando siempre de qué decir. En uno de esos momentos de indecisión, un amigo perspicaz y entendido irrumpió, y al conocer la causa de mi dilema, me instó a reflexionar sobre la naturaleza y el propósito de mi esfuerzo.

Esta obra, entonces, es una exploración de la belleza y la imperfección, del asombro y la limitación. Inspirándome en las reflexiones de Helen Keller sobre el valor del sentido de la vista y su incompreensión por parte de quienes lo poseen, así como en las observaciones de Charles Darwin sobre la selección natural y la perfección relativa en la naturaleza, he intentado trazar un paralelismo entre estas ideas y la creación científica. Darwin, al examinar la complejidad y las imperfecciones del ojo humano, nos recuerda que incluso las obras más maravillosas de la naturaleza tienen sus falencias.

Por tanto, estimado lector, te invito a embarcarte en este viaje a través de las páginas que siguen, con la mente abierta y el espíritu crítico, recordando siempre que la perfección es un ideal inalcanzable, en la fisiología del cuerpo, en la de esta obra y en la de esta vida, pero en cada imperfección reside una singular belleza.

Con el más profundo respeto, Sergio D. Jaime.

II. AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis se ha llevado a cabo en el departamento de Neuropatología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este trabajo ha tenido el privilegio de ser guiado por la Doctora Ana María López Colomé.

En términos de financiación, este proyecto ha contado con el apoyo de donativos asignados a la Doctora López Colomé, tanto por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 254333), como por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN-200220 así como al PAPIIT, proyecto IN-201223.

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Ana María López Colomé, cuya mentoría excepcional ha sido una luz rectora en mi travesía académica. Su rigor científico y compromiso con la excelencia no solo han sido cruciales para mi crecimiento técnico y profesional, sino también han impartido lecciones vitales en la perseverancia y el rigor intelectual. Bajo su tutela, me he embarcado en un viaje de autodescubrimiento y aprendizaje que ha sido fundamental en mi formación, reafirmando mis deseos académicos.

Mi gratitud se extiende igualmente a los sinodales: Dra. Tatiana Fiordelisio Coll, Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez, Dra. Irene Lee Rivera, y la Dra. Aliesha Araceli González Arenas, quienes no solo han dedicado tiempo y esfuerzo en revisar mi trabajo, sino que también me han orientado a lo largo de este proceso.

Un agradecimiento especial dirigido a la Q.F.B. Edith López Hernández y a la Dra. Irene Lee Rivera, por su invaluable apoyo técnico y orientación, Irene, siempre agradeceré tu fe inquebrantable. Al Dr. Ismael Hernández Lucas, Liliana y Esteban, a Perogui, les debo el despertar de mi pasión por el conocimiento, son la chispa que encendió la mecha.

A mi familia: a mis padres, mis hermanas, mis tíos, por ser la combinación de virtudes y defectos que han forjado mi ser. A Ilse, Gerardo, Tania, Valeria, Bertha, Chucho, Demian, por acogerme en la vasta urbe.

Mi reconocimiento a la organización Illuminati de la Facultad de Ciencias de la UNAM (Alejandro, Ricardo, Eugenio) por dejarme ñoñar con ustedes, y a los integrantes del laboratorio AL-304, quienes han sido como una segunda familia.

Finalmente, agradezco a la Ceci, Maricarmen, el Sr. presidente, Angel y al club de tesis, al Dr. Oscar Rico, al Dr. Cesar Hernández García y a la Psicóloga Rubí Quiroz.

De manera especial a Jessica, por ser la melodía perfecta en este viaje, por ser la mirada que despierta dopamina y alegrías, confianza y oxitocina en mi vida.

III. RESUMEN

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP), comúnmente derivada de traumas oculares severos o como complicación del desprendimiento regmatógeno de la retina, es una grave complicación caracterizada por la proliferación celular y la formación de membranas fibrosas en la retina, que puede resultar en recurrencias del desprendimiento y pérdida de visión. En este estudio, nos propusimos investigar el papel de la trombina, una enzima conocida principalmente por su función en la coagulación sanguínea, esta vez en la patogénesis de la PVR, preguntándonos específicamente: "¿Cómo la trombina afecta la patogénesis de la PVR y a través de cuáles vías de señalización celular en las células de glía de Müller?" Utilizando cultivos de estas células, esenciales para el mantenimiento de la homeostasis retiniana y la respuesta al daño, descubrimos que la trombina activa la vía MAPK/ERK de manera no convencional, mediante la proteína quinasa C zeta (PKC- ζ), y sin la participación de Ras ni Raf. Este mecanismo alternativo de señalización celular se revela como crucial, no solo para comprender la función normal de la retina, sino también para elucidar los procesos patogénicos subyacentes a enfermedades proliferativas como la VRP. Nuestros hallazgos abren nuevas vías para el desarrollo de terapias dirigidas que modifiquen específicamente esta señalización en la retina, ofreciendo nuevas esperanzas para el tratamiento de la PVR y la prevención de la pérdida de visión asociada a esta y otras enfermedades oculares proliferativas.

IV. ABSTRACT

Proliferative vitreoretinopathy (PVR), commonly stemming from severe ocular traumas or as a complication of rhegmatogenous retinal detachment, is a serious complication characterized by cellular proliferation and the formation of fibrous membranes on the retina, which can result in recurrences of detachment and vision loss. In this study, we aimed to investigate the role of thrombin, an enzyme primarily known for its function in blood coagulation, this time in the pathogenesis of PVR, specifically questioning: "How does thrombin affect the pathogenesis of PVR and through which cellular signaling pathways in Müller glia cells?" Using cultures of these cells, essential for the maintenance of retinal homeostasis and the response to damage, we discovered that thrombin activates the MAPK/ERK pathway in a non-conventional manner, through protein kinase C zeta (PKC- ζ), and without the involvement of Ras or Raf. This alternative cellular signaling mechanism is revealed as crucial, not only for understanding the normal function of the retina but also for elucidating the pathogenic processes underlying proliferative diseases like PVR. Our findings open new avenues for the development of targeted therapies that specifically modify this signaling in the retina, offering new hope for the treatment of PVR and the prevention of vision loss associated with this and other proliferative ocular diseases.

V. ABREVIATURAS

AMPc - Monofosfato de Adenosina Cíclico	MHC - Complejo Mayor de Histocompatibilidad
APC - Células Presentadoras de Antígenos	MLCK - Cinasa de la Cadena Ligera de la Miosina
BSA - Albumina de Suero Bovino	NG2 - Antígeno Nerve/Glial 2
CD1 - Ciclina D1	PARs - Receptores Activados por Proteasas
DAG - Diacilglicerol	PDGF-BB - Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas subunidad B
DMEM - Medio Dulbecco Libre de Suero	PI3K - Fosfatidilinositol-3-Cinasa
DNA - Ácido Desoxirribonucleico	PKA - Proteína Cinasa A
DRR - Desprendimiento Regmatógeno de la Retina	PKC - Proteína Cinasa C
EDTA - Ácido Etilendiaminotetraacético	PKC- ζ - Proteína Cinasa C-Zeta
ERK - Cinasa Regulada por Señales Extracelulares	PLC- β - Fosfolipasa C- β
ES - Espacio Subretinal	PPACK - D-fenilalanil-L-prolil-L-arginil-clorometilcetona
EPR - Epitelio Pigmentado de la Retina	PVDF - Difluoruro Polivinildieno
GAP - Proteína Activadora de la GTPasa	Raf - Cinasa Raf
GDP - Guanosín Difosfato	Ras - Proteína GTPasa Ras
GEF - Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina	SFB - Suero Fetal Bovino
GFAP - Proteína Ácida Fibrilar de la Glía	SDS - Dodecilsulfato de Sodio
GPCRs - Receptores Acoplados a Proteínas G	SNC - Sistema Nervioso Central
GTP - Guanosín Trifosfato	SNP - Sistema Nervioso Periférico
IP3 - Trifosfato de Inositol	TBS-T - Solución Tamponada con Sal de Tris y Tween20
LIMK - Cinasa LIM	VEGF - Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
MAPK - Cinasa Activada por Mitógenos	VRP - Vitreorretinopatía Proliferativa
MEK - Cinasa de ERK/MAPK	

1. INTRODUCCIÓN

El sistema visual de los vertebrados.

El sistema visual es esencial para la sobrevivencia de la mayor parte de los vertebrados, dado que es la fuente primaria de información en la mayoría de las especies animales, incluyendo al ser humano (Fernald, 2007).

La visión abarca la detección de los estímulos luminosos, la sensibilidad al contraste, la discriminación de textura, color, profundidad y movimiento. La visión requiere tanto de un fenómeno físico que involucra la refracción de la luz como el procesamiento neuronal de los estímulos visuales por la retina y el cerebro (Forrester et al., 2016).

El sistema visual incluye los componentes ópticos del segmento anterior del ojo: la córnea, humor acuoso, y lente; y el segmento posterior, incluyendo el cuerpo vítreo, la retina, y el nervio óptico. Por último, el sistema visual incluye las vías que transmiten las señales neuronales a la corteza visual, y varios núcleos adicionales del cerebro. Cada uno de estos componentes es crítico en la recepción, transmisión, y la interpretación de la información visual. El segmento anterior del ojo recibe de manera física la señal luminosa que, a su vez, activa la señalización química en la retina, mismo que se transmite

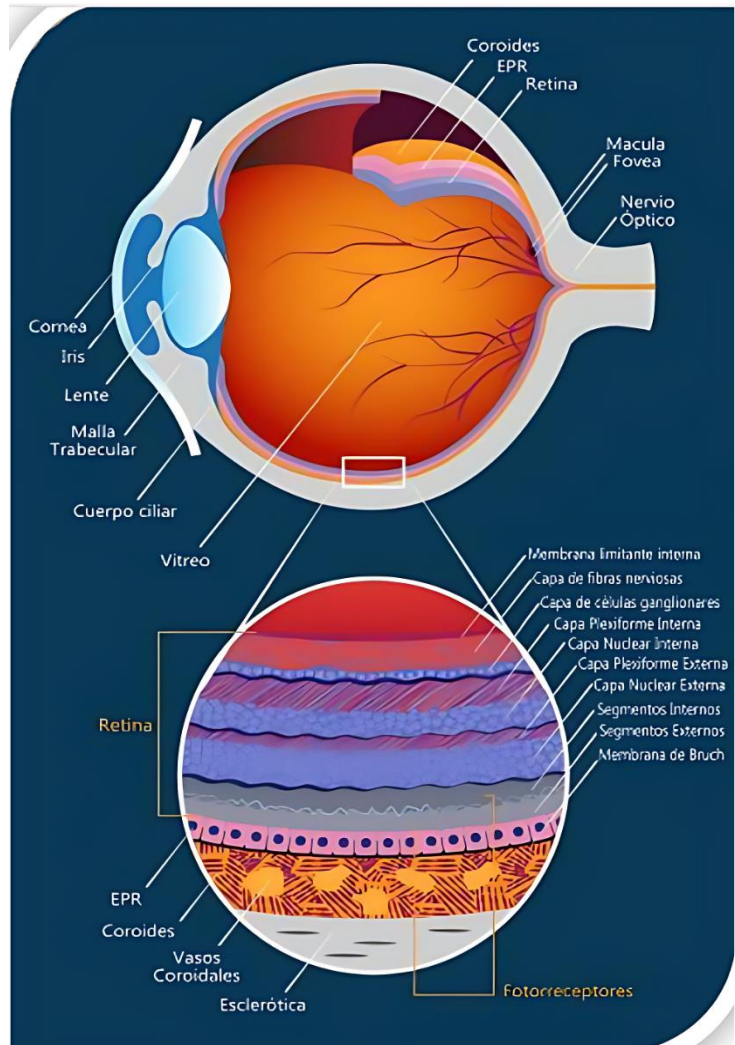


Figura 1 | Anatomía del ojo humano adulto con énfasis en la retina. Adaptada y traducida de "Human Eye Anatomy infographic," por LifeMap Sciences, Inc., n.d., LifeMap Discovery.

al cerebro a través del nervio óptico para procesar la información posteriormente en el sistema nervioso central (Hejtmancik & Nickerson, 2015).

El ojo es el principal órgano del sistema visual y está altamente especializado para detectar radiación luminosa. La estructura básica del ojo se conforma de 3 capas o túnicas: 1) la capa fibrosa corneoescleral; 2) el tracto uveal compuesto por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris; 3) y la capa neural o retina. Ésta última está formada por neuronas fotosensibles, conos y bastones que detectan la luz a distinta longitud de onda (Forrester et al., 2016). Las estructuras de la retina en correspondencia con la anatomía del ojo están ilustradas en la Figura 1.

Organización de la retina de los vertebrados

Todos los vertebrados tienen la misma estructura básica de la retina, tejido neural estratificado de 0.25 mm de grosor conformada por cinco tipos de neuronas y de un tipo particular de células gliales, que atraviesan todo el espesor de la retina: la glía de Müller. Estas células se organizan en tres capas nucleares formadas desde la parte más externa a la interna por fotorreceptores, que captan la luz que proviene del segmento anterior del ojo; interneuronas horizontales, que se encuentran en la capa plexiforme externa; amacrinas y bipolares, que se ubican en la capa plexiforme interna y la capa nuclear interna respectivamente; y células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico, que transmite las señales al sistema nervioso central.

Las capas nucleares están separadas por dos capas sinápticas: la plexiforme externa y la interna (Dowling, 2009). Además de las capas nucleares y plexiformes, en la parte más externa de la retina, en contacto con los

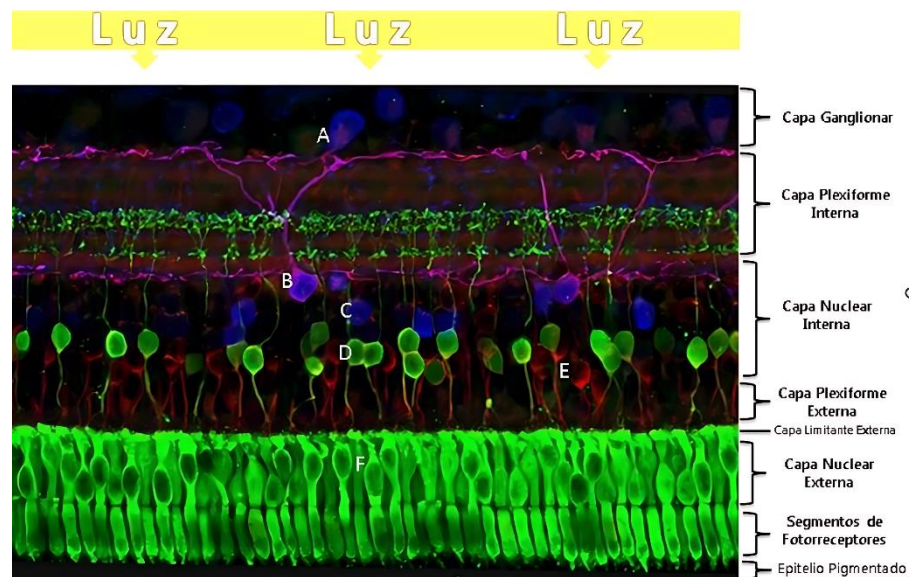


Figura 2 | Estructura celular de la retina. A) Células ganglionares; B) Células amacrinas; C) Células horizontales; D) Células bipolares; E) Glía de Müller; F) Fotorreceptores. Modificada de Li, (2016).

fotorreceptores, se localiza la coroides. De mejor manera ilustro las capas retinianas en la Figura 2. En conjunto, estas estructuras forman una barrera funcional que impide el paso de solutos hacia la retina: la barrera hematorretiniana, formada por una monocapa de células del epitelio pigmentado de la retina y otra de células ricas en colágena llamada membrana de Bruch. Esta barrera transporta nutrientes y desechos, así como señales químicas de la retina, y separa físicamente a la retina del endotelio vascular (Grossniklaus et al., 2015)

Glía de Müller y su participación en enfermedades proliferativas de la retina.

Tipos de Glía.

El término glía, que significa “pegamento”, hace referencia a la función de sostén y soporte de las neuronas desempeñada por estas células (Kettenmann & Verkhratsky, 2008). Aunque no se puede determinar un número exacto, las estimaciones sugieren que las células neuronales y gliales están presentes en proporciones aproximadamente similares en los seres humanos (Verkhratsky & Butt, 2013). Sin embargo, el estudio sobre la diversidad funcional de las células gliales es relativamente reciente y no tan extenso en comparación con el de las células neuronales (Ndubaku & de Bellard, 2008). Las células gliales desempeñan diversas funciones: tienen un papel clave en la regulación de la liberación de neurotransmisores, mantienen la homeostasis del sistema nervioso, guían la migración de neuronas en etapas tempranas del desarrollo, facilitan la conducción de la transmisión sináptica y responden al daño del sistema nervioso, entre otras (Ndubaku & de Bellard, 2008).

La glía se clasifica en: macroglía si es de origen ectodérmico, de la cresta y tubo neural, y microglía si es de origen mesodérmico (Verkhratsky & Butt, 2007), que forma un filtro inmune en el sistema nervioso central (SNC) (Kettenmann & Verkhratsky, 2011). Las células microgliales son fagocitos mononucleares especializados en el SNC, cuya función esencial como células presentadoras de antígenos (APC) implica la fagocitosis y degradación de microbios, células muertas y agregados proteicos (Schettters et al., 2018). Estas células utilizan su maquinaria lisosomal para procesar antígenos y presentarlos a través de moléculas coestimuladoras y MHC clase II, que son esenciales para la activación de linfocitos T CD4, tanto de memoria como vírgenes, subrayando su importancia en las respuestas

inmunitarias ante daños neuronales, como se ve en la esclerosis múltiple y otras enfermedades neurodegenerativas (Distéfano-Gagné et al., 2023; Tran et al., 1998; Wolf et al., 2018). Además, colaboran con los astrocitos en la poda sináptica neuronal y la eliminación de células apoptóticas (Haimon et al., 2022). Si bien existe un solo tipo de microglía, hay varios tipos de células macrogliales, las cuales se localizan tanto en el SNC como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP). Las que se encuentran en el SNC son: astrocitos, que suelen interactuar con vasos sanguíneos, detectan actividad neuronal y regulan redes neuronales; oligodendrocitos encargados de mielinizar y aislar los axones de neuronas y regular la velocidad de conducción del potencial de acción a través de ellos (Kettenmann & Verkhratsky, 2011); las células ependimales que se encuentran en los plexos coroides del cerebro, transporta sustancias y mantiene la estabilidad de la barrera hemato-cefalorraquídea (Reuss, 2010); las células de glía “Nerve/Glial antigen 2”, o glía NG2, pueden funcionar como células troncales multipotentes generando principalmente oligodendrocitos, aunque se ha reportado que también pueden generar neuronas y astrocitos en determinadas condiciones (Viganò & Dimou, 2016). Por último, pero no menos importante se encuentra la glía radial, el primer tipo de glía que se diferencia a partir de las células neuroepiteliales progenitoras durante el desarrollo. A través de un proceso de maduración, las células de glía radial se transforman en astrocitos, oligodendrocitos y neuronas, pero permanecen como glía radial en dos zonas: en el cerebelo como glía de Bergmann y en la retina como glía de Müller (Verkhratsky & Butt, 2007). Mientras tanto en el SNP se encuentran las células de Schwann que tienen funciones bastante similares a los oligodendrocitos; la glía entérica que se encuentra en la barrera intestinal con funciones muy similares a los astrocitos pero en el sistema nervioso entérico (Coelho-Aguiar et al., 2015); la glía olfatoria envolvente que se encuentra en el tracto olfatorio y tiene como función principal regular las vías de señalización entre neuronas olfatorias y guiar la formación de redes y conexiones entre axones (Gladwin & Choi, 2015); y la glía satélite que se encuentra en los ganglios sensoriales rodeando cuerpos celulares de neuronas determinando el crecimiento de neuritas (Reuss, 2010).

Glía de Müller.

En la retina existen tres tipos de glía, la microglía y los astrocitos que funcionan en conjunto con células ganglionares, predominan en la membrana limitante interna, pero en mucho mayor porcentaje se encuentra la glía de Müller (Bringmann et al., 2003). El predominio de la glía de Müller

en la retina humana es tal que hay aproximadamente entre 8 y 10 millones de células arregladas

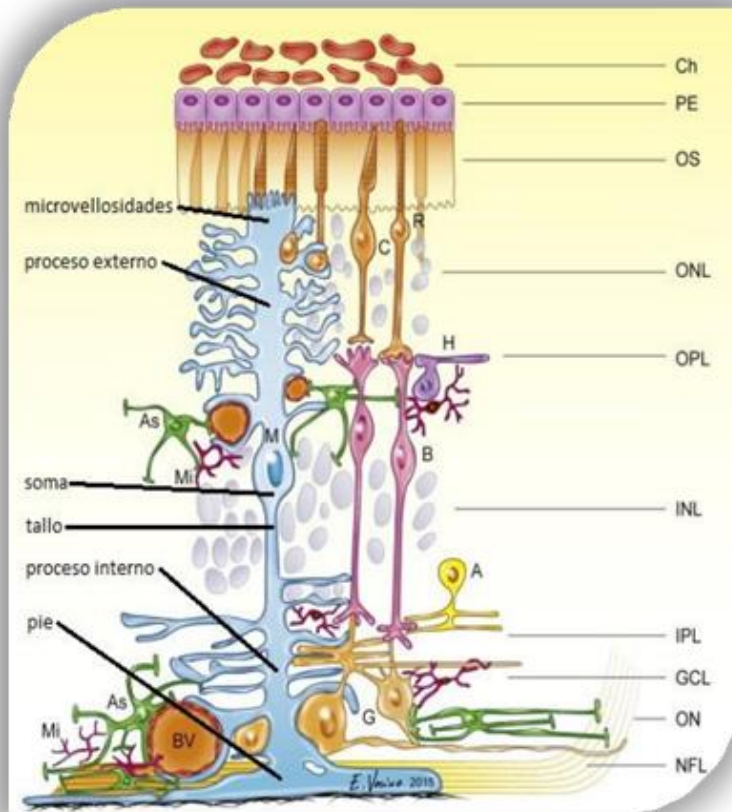


Figura 3 | GLÍA DE MÜLLER: estructura e interacciones. Vasos sanguíneos (BV), células amacrinas (A), astrocitos (AS), células bipolares (B), conos (C), células ganglionares (G), células horizontales (H), células de glía de Müller (M), microglía (Mi), bastones (R), conos (C). También tome en cuenta la ubicación de las diferentes capas de la retina (desde las capas más internas hasta las externas: nervio óptico (ON), capa de fibras nerviosas (NFL), capa de células ganglionares (GCL), capa plexiforme interna (IPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear externa (ONL), capa del segmento externo (OS), epitelio pigmentado (PE), coroides (Ch). Modificada de Vecino et al., (2016)

uniformemente. Las células de Müller son células de morfología fibrosa y extensión bipolar, forman núcleos columnares que atraviesan todas las capas de la retina e interactúan prácticamente con todas las células de esta. Cada núcleo columnar contiene por cada célula de glía de Müller aproximadamente un cono, diez bastones, de cuatro a seis células de la capa nuclear interna, y de 0.3 a 2.5 células ganglionares (Reichenbach & Bringmann, 2012), con tantas interacciones, la glía de Müller es necesaria para la integridad de la retina. Estas interacciones las podemos observar en la Figura 3.

La glía de Müller desempeña numerosas funciones en la retina: son el núcleo de columnas funcionales; pueden guiar o dispersar la luz actuando como fibra óptica; contribuyen a reciclar fotopigmentos

en los conos; regulan la función sináptica mediante la recepción de neurotransmisores como glutamato o GABA; producen precursores de neurotransmisores como glutamina, remueven el dióxido de carbono, son el soporte nutricional y antioxidante de los fotorreceptores, regulan el pH, regulan el flujo y claridad y volumen del espacio extracelular, responden al estrés mecánico, son mediadores del acoplamiento neurovascular (Reichenbach & Bringmann, 2012). Adicionalmente, se ha reportado que pueden funcionar como células troncales regenerando fotorreceptores después de lesiones en la retina (Goldman,

2014) del pez cebra [*Danio rerio*] (Wan & Goldman, 2016), pollo [*Gallus gallus domesticus*] y en ratón [*Mus musculus*] (Wilken & Reh, 2016).

Las células gliales reaccionan ante prácticamente cualquier alteración sobre las neuronas y el microambiente con el que interaccionan ya sea de manera funcional o disfuncional. El término de **glía reactiva** se refiere a la respuesta que tienen las células de glía ante estos cambios. Tales cambios comúnmente se traducen en estas células como hipertrofia, acumulación de filamentos intermedios en el citoplasma, proliferación de la glía, metabolismo intenso y re-expresión de características de la glía inmadura. La reacción glial es un equivalente a la cicatrización de heridas en otras partes del organismo, sin embargo, en el SNC el acceso a otras células extrínsecas que complementan la correcta reparación del tejido está restringido por la impermeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) (Kálmán, 2003).

La naturaleza primordial de las células de Müller y su arquitectura con respecto a las demás células en la retina la hacen reaccionar de maneras muy distintas, ya sea de manera protectora o detrimental, (Bringmann et al., 2003), sin embargo, es en esto en lo que radica su importancia.

Vitreorretinopatía proliferativa

En la retina madura, la glía de Müller tiene un papel fundamental en mantener la integridad de las redes entre las células retinales y, junto con las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR), en mantener la homeostasis sanguínea. Sin embargo, también responde ante alteraciones patológicas como el daño fótico, trauma retinal, isquemia, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, gliosis, retinopatía diabética y desprendimiento de la retina, entre otras. Estas alteraciones implican cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos de las células de Müller y pueden variar de acuerdo con el tipo de estímulo o la intensidad de este (Reichenbach & Bringmann, 2010). Como efecto de tales lesiones en la retina, la glía de Müller reacciona en un intento de reconstruir o preservar la función visual (Garweg, 2010). Estas lesiones inducen la secreción de factores de crecimiento, factores proinflamatorios o citocinas que promueven la reactividad de las células de Müller, las cuales generan como respuesta básica la proliferación y contracción de las células de glía (Eastlake et al., 2016; Reichenbach & Bringmann, 2010).

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) es un síndrome clínico del ojo que se caracteriza por la proliferación de células en la superficie retinal y hacia la cavidad del vítreo, formando membranas

epirretinianas contráctiles (perirretinales y/o subretinales) las cuales pueden generar rupturas y desprendimiento recurrente de la retina (Khan et al., 2015). Se han identificado a varios tipos celulares con roles clave en la fisiopatogenia de la VRP: células del EPR, fibroblastos, miofibroblastos y macrófagos (Jusufbegovic et al., 2015; Kanski, 2009). Durante largo tiempo, se sostuvo predominantemente que las células del EPR eran las principales responsables en la inducción de la VRP. No obstante, investigaciones recientes han revelado que la glía de Müller no solo contribuye, sino que desempeña un rol crucial en la fisiopatogenia de esta condición (Eastlake et al., 2016; Morescalchi et al., 2013; Velez et al., 2012).

La VRP se origina generalmente como consecuencia de traumatismos oculares graves como son la isquemia crónica, cirugías intraoculares que frecuentan destrucción tisular para la restauración de la función visual, pero principalmente como una complicación del desprendimiento regmatógeno de la retina (DRR), con un porcentaje de ocurrencia del 10% de todas las reparaciones por desprendimiento de la retina, algo que es considerado como fracaso quirúrgico. (Garweg, 2010; Khan et al., 2015). La VRP supone un 75% de los fracasos primarios tras la cirugía del DRR, es también causante de ceguera principalmente en casos donde hay DRR secundario recurrente (Spirnet al., 2010). Las respuestas celulares causantes de la VRP suelen ser inespecíficas y no difieren clínicamente de forma significativa de la que resulta como complicación de otras patologías intraoculares (Garweg, 2010). Los factores de riesgo clásicos de la VRP están asociados a casos en los que aumenta la permeabilidad vascular como ocurre en la uveítis, en los desgarros de retina, en el desprendimientocoroideo postoperatorio, cirugías previas, crioterapia o desprendimientos extensos.

Es común que en estos casos se rompa la barrera hematoocular (BHO), o vasos sanguíneos del sistema de vasculatura central de la retina y ocasione una hemorragia vítrea o coroidea (Hollyfield & Clinic, 2010; Spirn et al., 2010), exponiendo macrófagos, linfocitos y células polimorfonucleares, también factores de crecimiento, citosinas inflamatorias y TROMBINA a zonas donde usualmente no tienen acceso, en este caso patológico específico, al espacio subretinal (ES) entre los fotorreceptores de la retina y el EPR de la retina previamente desprendida (Morescalchi et al., 2013; Velez et al., 2012). Las células del EPR que cubren a la coroides, y la glía de Müller al perder su integridad estructural y al entrar en contacto con tales factores, se dispersan y promueven la proliferación en otros sitios (Morescalchi et al., 2013). La glía de Müller también puede ser agente causal de la ruptura de la BHO por actividad de citosinas proinflamatorias, especies reactivas de nitrógeno y factores de crecimiento vasoactivos como es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

El papel de la trombina en enfermedades proliferativas de la retina

La trombina es una proteasa de serina que pertenece a la familia de la quimotripsina S1, familia que incluye a varias enzimas involucradas en procesos digestivos, de fertilización, desarrollo embrionario, muerte celular, fibrinólisis e inmunidad celular, entre otros. Está compuesta por dos cadenas polipeptídicas A y B de 36 y 259 residuos respectivamente, unidas covalentemente por puentes disulfuro entre los residuos C1 y C122 (Di Cera, 2009; Maragoudakis & Tsopanoglou, 2009).

La trombina es bien conocida por su papel al final de la cascada enzimática que promueve la coagulación sanguínea, ya que esta proteasa se encarga de convertir el fibrinógeno en un coágulo insoluble de monómeros de fibrina que se adhiere a las plaquetas en la herida. La trombina se origina a partir de su forma inactiva: la protrombina, la cual es producida por el hígado, viaja por el torrente sanguíneo, y es convertida a trombina por medio de la tromboplastina y Ca^{+} como cofactor, ambos segregados por las plaquetas (Buzala et al., 2017; Maragoudakis & Tsopanoglou, 2009). Sin embargo, irónicamente también está involucrada en procesos anticoagulantes como la fibrinólisis, en retroalimentación negativa: cuando la trombosmodulina que se encuentra en el endotelio se une a la trombina, suprime la actividad de catálisis del fibrinógeno o los Receptores Activados por Proteasas (mejor conocidos como PAR por sus siglas en inglés), pero aumenta la especificidad de la enzima hacia la proteína C (PC), la cual inactiva a los factores de coagulación Va y VIIIa, estos son cofactores de las proteínas Xa y IXa, necesarias para continuar la cascada de coagulación y generar más trombina (Maragoudakis & Tsopanoglou, 2009).

Además del papel central de la trombina en la coagulación, también participa en otros eventos fisiológicos y patológicos (Hindley & Kolch, 2002). Está directamente involucrada en el desarrollo vascular, inflamación, quimiotaxis, migración, proliferación celular, angiogénesis, principalmente en procesos de cicatrización de heridas y reparación de tejidos (Narayanan, 1999). Debido a que los procesos en los que se ve comprometida la trombina son básicos para el mantenimiento y formación de nuevos tejidos, ésta puede relacionarse incluso con la formación de tumores y promoción del cáncer (García-López et al., 2010; Nierodzik & Karpatkin, 2006; Tsopanoglou et al., 2004; Wojtukiewicz et al., 2016). Curiosamente la trombina tiene también un papel importante en el cerebro, a pesar de que la cantidad de protrombina generada en el cerebro es de solamente el 1% comparado con lo que se puede producir en

el hígado (Maragoudakis & Tsopanoglou, 2009). En el cerebro se involucra en el desarrollo, retracción de neuritas (Narayanan, 1999), protege de daño cerebrovascular e isquemia, induce cambios morfológicos y puede inducir apoptosis o actuar como crioprotector en el hipocampo (Wang, H. & Reiser, 2003).

Dentro de los efectos inducidos por la trombina en el cerebro, se ha observado el impacto particular para la glía de Müller, donde puede ocurrir el aumento de Ca^{2+} intracelular, la inhibición del potencial causado por K^+ (Puro & Stuenkel, 1995), además de la liberación de ATP y la proliferación de la glía de Müller (Puro et al., 1990). A pesar de que se intuye el efecto que pueda tener la trombina a nivel tisular, no existen estudios de sus efectos sobre las vías de señalización que puedan promover en estas células, las cuáles, en tales condiciones puede afectar al desarrollo de la VRP.

Actualmente la gran mayoría de los estudios sobre el papel de la trombina en la VRP se concentran en las células del EPR, en los que se observa la activación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), proteína promotora de la proliferación (Palma-Nicolas et al., 2008); así como un aumento mediado por el factor de transcripción AP-1 en la expresión del gen *ccnd1* responsable de codificar la ciclina D1 (CD1), igualmente importante en la promoción de la proliferación celular (Lee-Rivera et al., 2015). También se ha visto la producción de otros factores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas subunidad B (PDGF-BB) que funciona como factor profibrótico, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) importante en la angiogénesis y las interleucinas proinflamatorias CCL2, IL-8, IL-6, IL-12 (Bastiaans et al., 2014).

Pese a que se reconoce la intervención del EPR en la VRP, es muy importante determinar también cuál es el rol de la glía de Müller en la patogénesis de este padecimiento.

Receptores activados por proteasas (PARs)

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) representan una amplia familia de proteínas

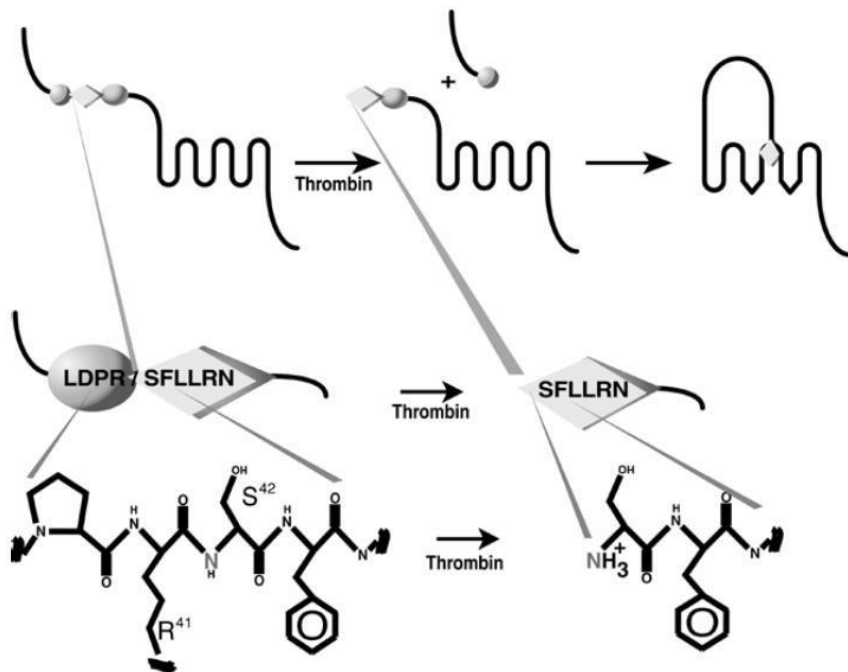


Figura 4 | Detalles de activación de PAR1. La trombina, se une a los aminoácidos receptores (las esferas) del exodominio amino terminal de los PARs, interactuando con el centro activo de la trombina. Después de la unión, la trombina escinde el receptor entre la arginina R41 y la serina S42 para mostrar un nuevo amino terminal, la secuencia S42FLLRN (diamante). Una vez desenmascarado, S42FLLRN sirve como un ligando que se une al dominio heptahelicoidal para efectuar la señalización transmembranal y la activación de la proteína G. Es importante destacar que el proceso es el mismo para los otros PARs, sin embargo, difieren las secuencias de aminoácidos. Figura tomada de Coughlin, et al. (2010).

transmembranales, y son de los blancos más estudiados para el diseño de fármacos. Una gran parte de las señales activadas por la trombina ocurren por medio de los receptores activados por proteasas (PARs) los cuáles son parte de una familia de GPCRs. Los PARs tienen la estructura básica de los GPCRs: 7 dominios de hélice transmembranales, con el amino terminal exoplásmico y el carboxilotermino citoplásmico, además de señalar a través de proteínas G. En los PARs, la unión del ligando provoca un cambio conformacional en el receptor que activa a ciertas vías de señalización, aquí, el receptor actúa por sí mismo como factor de

intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) sobre las proteínas G heterotriméricas (Lodish et al., 2013; Munk et al., 2016) A excepción de otros grupos de GPCRs, los PARs son ligandos de sí mismos, de tal manera que necesitan de una proteasa para cortar el extremo amino, exponiendo un nuevo dominio que se unirá intramolecularmente al cuerpo del receptor (Coughlin, 2010).

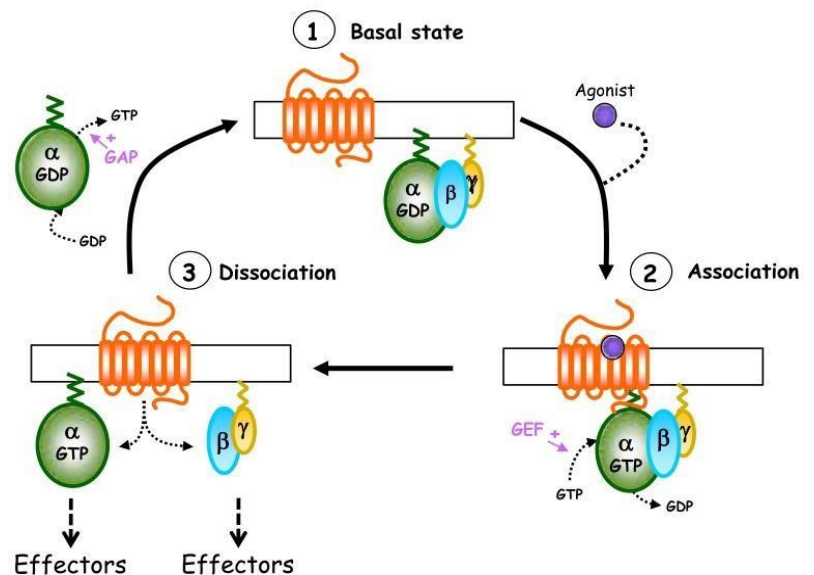
Se ha identificado cuatro PARs, denominados del 1 al 4: PAR₁, PAR₃ y PAR₄, son activados principalmente por trombina, y PAR₂ es activado también por tripsina, triptasa, y otras proteasas de serina. PAR₁ se considera el prototipo de esta familia; es el más estudiado y se le atribuyen la mayor parte de los efectos de la trombina, debido a que la afinidad del PAR₄ por la trombina es de 100 a 1000 veces

menor que la del PAR₁, ya que el PAR₃ carece de la región intracelular que permite la señalización (Coughlin, 2010). En la Figura 4 está ejemplificado el proceso de activación de PAR₁ como modelo de activación de los PARs.

Transducción de señales derivadas de la activación de los PARs

Proteínas G

Las proteínas G transmiten y reciben información de acuerdo con su estado conformacional desde proteínas receptoras GPCR hacia proteínas efectoras (como observamos en la Figura 5), y las vías de señalización que de éstas se derivan, desencadenan procesos celulares específicos, como son la proliferación, migración, apoptosis, inflamación y neurotransmisión, entre otros (Lappano & Maggiolini, 2012). Se ha demostrado que la activación proteolítica de los PARs en la membrana tiene como



consecuencia la activación de las proteínas $G\alpha_i$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$ (Coughlin, 2010)

Las superfamilias de proteínas G tienen un dominio G de 20 kD que se une a nucleótidos de guanina como guanosin trifosfato (GTP) o guanosín

difosfato (GDP). La conformación de estos complejos difiere según el tipo de nucleótido unido al dominio G, localizado en la subunidad α . Existen dos tipos de proteínas G: heterotriméricas ancladas a

Figura 5 | Detalles de activación de las proteínas G. La trombina promueve la activación de los PARs, que a su vez se asocian con proteínas G heterotriméricas. Los PARs funcionan como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), para promover la formación del estado de proteína Ga con GTP activo. La función de señalización de las proteínas G está regulada negativamente por proteínas con actividad GAP, que convierte al GTP en GDP y desactiva a la proteína Ga. El complejo G $\beta\gamma$ realiza sus propias funciones de señalización, no solo en rutas asociadas con GPCR activado sino también en rutas que son independientes de GPCR. Tomada de Denis et al. (2012)

la membrana y formadas por tres subunidades α , β , γ ; y las monoméricas que se localizan en el citosol. Al convertirse el GTP en GDP,

por la acción de la proteína activadora de la GTPasa (GAP), las subunidades $\beta\gamma$ se unen a la subunidad α . La activación inducida por la hidrólisis de GTP induce la disociación de las subunidades y permite la señalización río abajo de α y $\beta\gamma$ de manera independiente. Los PARs señalan directamente hacia proteínas G heterotriméricas $G_{\alpha_q/11}$, $G_{12/13}$ y G_i , activando múltiples vías de señalización (Chakravorty & Assmann, 2018; Coughlin, 2010).

Señalización por G_i

Se ha demostrado que la trombina activa la señalización mediada por la subunidad G_{α_i} , involucrada en la inhibición de la adenilil ciclasa (Klages et al., 1999; Wang, H. et al., 2002). Las proteínas G de la subfamilia G_i tienen un efecto inhibitor sobre la adenilil ciclasa (G_i por “inhibitoria”). La inactivación de la adenilil ciclasa dependiente de G_i se traduce en la disminución de la concentración intracelular del AMPc y la inhibición consecuente de la proteína cinasa A (PKA) (Rebecchi & Pentylala, 2000).

Señalización por $G_{12/13}$

La activación de $G_{\alpha_{12/13}}$ está implicada en los cambios morfológicos relacionados con la reorganización del citoesqueleto de actina. Este proceso depende de la GTPasa Rho, que también puede ser activada por una elevación de calcio mediada por G_q y por la inducción de G_i (Klages et al., 1999; Seasholtz et al., 1999). Sin embargo, en fibroblastos, la expresión constitutiva de G_{12} y G_{13} (pero no de G_i o G_q) es suficiente para inducir la formación de fibras de estrés de actina y el ensamble de adhesiones (Buhl et al., 1995). (Thatcher, 2010)

Los trabajos previos realizados por nuestro laboratorio en este campo han demostrado que en células de la retina, la estimulación con trombina conduce a la hidrólisis de GTP por Rho, y la activación subsecuente de la cinasa de Rho (ROCK), de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), y de la cinasa LIM (LIMK) que media la despolimerización de actina (Ruiz-Loredo et al., 2011). ROCK también

activa a p140mDia, relacionada con el ensamblaje de filamentos de actina y modula ala profilina, que impide la polimerización (Watanabe et al., 1997). Esta vía de señalización está involucrada, asimismo, en los cambios de permeabilidad endotelial inducidos por trombina (Bogatcheva et al., 2002). Los cambios en la morfología celular y las propiedades de adhesión inducidos por la activación de $G_{12/13}$ juegan un papel importante en las alteraciones que se presentan en las células del EPR que conducen a la VRP.

Señalización mediada por G_q

G_q está vinculada con la activación de la fosfolipasa C- β (PLC- β), y la producción consecuente de los segundos mensajeros trifosfato de inositol (IP₃), que promueve la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, y diacilglicerol (DAG), que activa a la proteína cinasa C (PKC) (Coughlin, 2010; Macfarlane et al., 2001). Podemos observar la vía canónica de activación de las PKC en la Figura 6. Tanto la activación de la

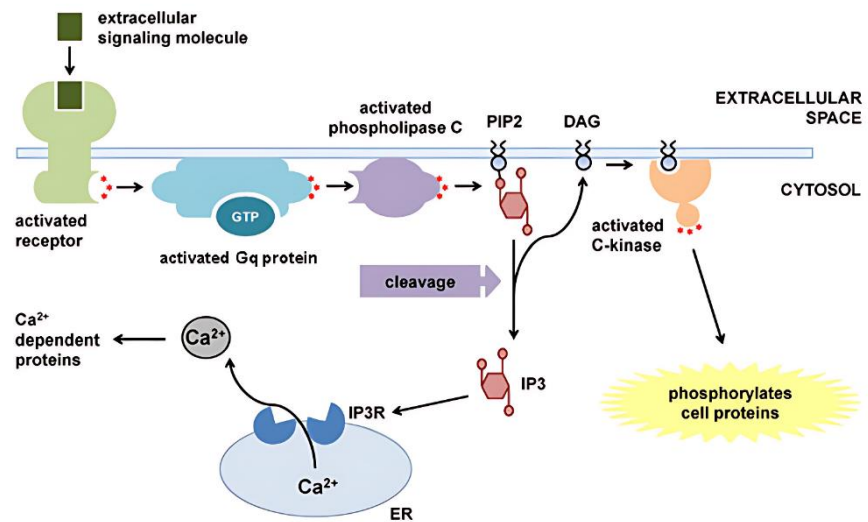


Figura 6 | Vía de señalización de PKC. La activación del receptor conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC), que escinde el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en IP₃ y diacilglicerol (DAG). El IP₃ estimula la liberación de calcio del retículo endoplásmico, y el calcio controla la actividad de numerosos objetivos río abajo. Canónicamente, uno de los principales objetivos es la proteína quinasa C (PKC). El calcio permite que PKC se una con DAG y, de ese modo, se active. Luego, la PKC fosforila a otros sustratos río abajo. Modificada de Egorova & Bezprozvanny, 2018

PKC como la movilización de Ca^{2+} intracelular inducido por la trombina promueve la proliferación celular en astrocitos (Wang, H. et al., 2002) y células del EPR (Palma-Nicolas et al., 2008).

Señales mediadas por las subunidades β - γ

Las subunidades β y γ de las proteínas G triméricas intervienen en la señalización derivada de la activación de PAR₁ por la trombina, particularmente mediante la activación de la vía de la PI3K, cuyo bloqueo por la wortmannina tiene profundos efectos sobre la proliferación y la activación de ERK en astrocitos y en células del EPR (Palma-Nicolás et al., 2010). Además, en general, la cascada de señales mejor caracterizada que regula el proceso de proliferación es la de la GTPasa monomérica Ras, que a su vez activa a las cinasas de serina/treonina Raf, MEK y ERK1/2 (Wang, H. et al., 2002)

Cinasas Activadas por mitógenos (MAPK) y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2). Vía de señalización MAPK/ERK.

La activación de receptores específicos en la membrana inicia una cascada de señalización que activa a la MAP cinasa ERK “regulada por señales extracelulares”. La señalización de esta vía puede inducir la transcripción del DNA en el núcleo, y la expresión de proteínas específicas (Sun et al., 2015). El mitógeno extracelular se une al receptor en la membrana e induce el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa Ras y la subsecuente activación de la cinasa Raf, cuya fosforilación activa a MEK. MEK fosforila y activa a la cinasa activada por mitógenos (MAPK). Tanto Raf como ERK son cinasas de serina/treonina, mientras que MEK es una cinasa de serina/treonina/tirosina. En la Figura 7 está ilustrada la vía canónica de MAPK/ERK, esta cascada de señalización permite la amplificación y la regulación de las señales de la membrana (Roskoski, 2012).

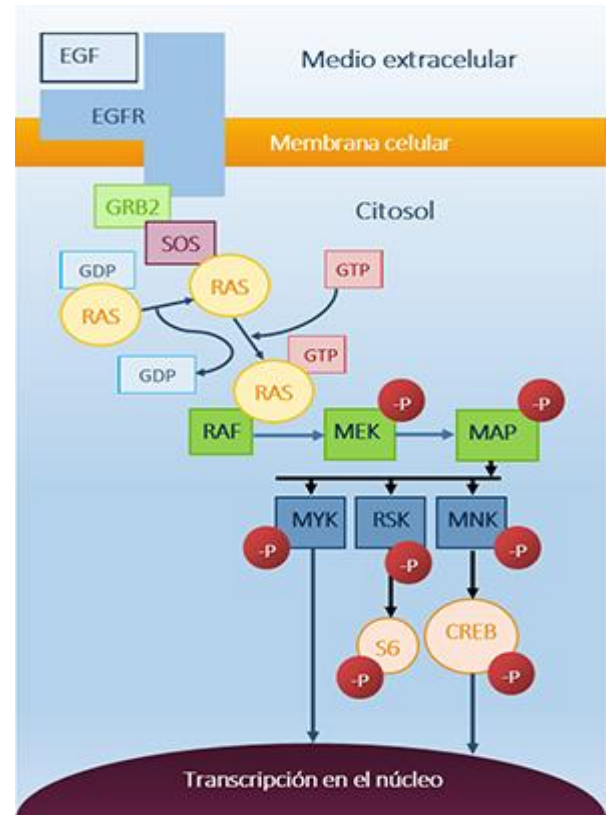


Figura 7 | Vía canónica de señalización de MAPK. La activación de la GTPasa RAS por el receptor, en nuestro caso los PARs, que promueven una cascada de señalización río abajo hacia RAF-MEK- ERK generalmente regulando la activación de factores de transcripción como C-fos, C-myc, CREB, etc. Tomado de Vázquez García (n.d.).

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de reconocer que la trombina contenida en el suero interactúa directamente con las células de Müller debido a la alteración de la barrera hematorretiniana, existen lagunas significativas en nuestra comprensión de cómo esta interacción afecta la proliferación celular. Por lo tanto, este estudio se centra en explorar el impacto de la trombina en la activación de vías de señalización específicas asociadas con la proliferación de las células de Müller en la retina humana. Un aspecto central de nuestra investigación es identificar y definir los mecanismos moleculares subyacentes que participan en este proceso, lo cual hasta ahora ha permanecido relativamente inexplorado.

3. HIPÓTESIS

La trombina es una proteasa de serina/treonina que, además de su función en el proceso de coagulación, activa vías de señalización intracelular que inducen la desdiferenciación y la proliferación de las células de glía de Müller de la retina.

4. OBJETIVO

El objetivo de este estudio es dilucidar el mecanismo molecular por el cual la trombina induce la activación de ERK1/2 en las células MIO-M1 de la glía de Müller de la retina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado cultivo celular. Los reactivos para cultivo celular utilizados fueron suero fetal bovino (SFB), tripsina al 0.1%, EDTA, azul de tripano, y medio Dulbecco libre de suero (DMEM); de Invitrogen. Los reactivos para los ensayos de estimulación o inhibición farmacológica fueron los siguientes: la trombina, la hirudina, la manumicina A, el Ro- 32-0432, el pseudosustrato de PKC- ζ , el Y27632 y el inhibidor de Raf fueron obtenidos de Calbiochem/EMD Millipore (Billerica, MA, EUA); la D-fenilalanil-L-prolil-L-arginil- clorometilcetona (PPACK) fue obtenida de Enzo Life Sciences (Nueva York, NY, EUA) lawortmannina, fue de Sigma (St. Louis, MO); el U0126, el LY294002 fueron obtenidos de Tocris (Ellisville, MO); y la albumina de suero bovino (BSA) se obtuvo de Equitech-Bio Inc. (Kerrville, TX). Para todos los experimentos se utilizó como medio estándar DMEM. Para la preparación de buffer de lisis usamos Tris-HCl, NaCl, EDTA, Triton X-100, CHAPS, NP40, BSA, β -glicerofosfato, pirofosfato de sodio, e inhibidores de proteasas (SIGMA). SDS, glicerol, azul de bromofenol y Tris-HCl para buffer Laemmli. Para la inmunodetección de proteínas se utilizó poliacrilamida (SDS/PAGE), sustrato quimioluminiscente Immobilon Western AP; los anticuerpos primarios fueron obtenidos de EMD Millipore y sus respectivos anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano, anti-conejo contra actina o anti-ratón contra anti p-ERK y anti ERK total son de Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA.

Cultivo de Glía de Müller

Las células de la línea celular MIO-M1 fueron una donación de G. A. Limb (Instituto de Oftalmología del Moorfields Eye Hospital, Londres, Reino Unido). Las células se cultivaron hasta alcanzar confluencia en DMEM que contenía suero fetal bovino (SFB) al 10%, siguiendo las especificaciones descritas anteriormente (Limb, Salt, Munro, Moss, & Khaw, 2002). Para todos los ensayos, se privó a los cultivos de suero durante 24 horas antes de realizar los experimentos. La viabilidad de las células MIO-M1 se evaluó mediante exclusión de azul de tripano, tanto en presencia de SFB al 10% como en su ausencia, durante períodos que variaron desde 24 horas hasta 8 días. Para ello, después de disociar las células con tripsina al 0,1% (EDTA Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), se añadió azul de tripano al

0,08% a las células en medio esencial mínimo de Dulbecco libre de suero (DMEM). Posteriormente, las células vivas y las teñidas con tripano se contaron mediante microscopía óptica en una cámara de Neubauer, y la viabilidad se expresó como el porcentaje de células vivas en relación con el número total de células.

Protocolos de estimulación o inhibición farmacológica

Todos los experimentos se realizaron como cultivos semi-confluentes (80% de confluencia) en placas de 6 pozos con células MIO-M1. 24 horas antes de comenzar con el tratamiento correspondiente, el medio de crecimiento se reemplazó por DMEM libre de suero, para evitar la intervención de los diversos factores de crecimiento y citocinas contenidas en éste. Los cultivos sincronizados se estimularon con trombina (2 U/ml) durante el periodo de tiempo indicado. Para los ensayos, se añadieron inhibidores al medio desde 30 minutos antes de la estimulación con trombina por 30 minutos. Se utilizaron inhibidores a las siguientes concentraciones: hirudina, 4 U/ml; PPACK, 500 nM; Toxina pertussis, 100 ng/ml; Wortmanina, 100 nM; Manumicina A, 20 µM; Ro32-4032, 10 µM; Pseudo-sustrato de PKC-ζ, 25 µM; inhibidor de la cinasa de Rho (ROCK) Y27632, 5 y 10 µM. Se ha demostrado previamente que estas concentraciones no son tóxicas.

Inmunodetección de proteínas (Western Blot)

Para la inmunodetección de todas las proteínas, las células tratadas se lisaron en buffer de lisis que contenía 50 mM de Tris-HCl a pH 7.4, 150 mM de NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% de SDS, 1% de Triton X-100, 1 % de CHAPS, 0.5% de NP40, 0.1% de BSA, 40 mM de β-glicerofosfato, 10mM de pirofosfato de sodio, y 10% de un cóctel de inhibidores de proteasas (SIGMA). La proteína total de los lisados se cuantificó usando el método de Bradford. Se utilizaron 10 µg de proteína total para el análisis de inmunodetección de proteínas. Los lisados fueron solubilizados en buffer Laemmli (0.75 mM de Tris-HCl a pH 8.8, 5% de SDS, 20% de glicerol y 0.01% de azul de 36 bromofenol), hervidos durante 3 minutos, separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE, 7.5%), y se transfirieron a membranas difluoruro polivinildieno (PVDF, Amersham Biosciences). Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente

con una solución de leche al 5% ó leche 5% + BSA 2% en TBS-T (20 mM de Tris- HCl a pH 7.5, 500 mM de NaCl y 0.1 % de Tween20). Posteriormente, lasmembranas se incubaron con su respectivo anticuerpo primario, según la proteína a analizar: por una hora a temperatura ambiente en una solución de leche 5% en TBS-T que contenía el anticuerpoprimario anti-actina (1:50,000), ó toda la noche a 4 °C en una solución de BSA 5% con el anticuerpoprimario anti-P-ERK (1:8,000), ó leche 5% + BSA 2% en TBS-T con el anticuerpo primario anti- ERK total (1:8,000). Al terminar el periodo de incubación con el respectivo anticuerpo primario, lasmembranas se lavaron 5 veces con TBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a la peroxidasa de rábano en una soluciónde leche 5% para anti-actina a una dilución del anticuerpo 1:50,000 ó BSA 5% en TBS-T para P- ERK y ERK total a una dilución 1:16,000. Posteriormente, las membranas se lavaron 5 veces con TBS-T y se procesó su revelado con el sustrato quimioluminiscente Immobilon Western AP (Millipore). La señal se visualizó mediante placas de rayos X Kodak® y se digitalizaron las imágenes mediante el sistema Alfa Digi-Doc (Alpho-Innotech; San Leandro, CA). El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa FIJI/ImageJ (Schindelin et al., 2012) y los datos se normalizaron utilizando los valores de células no estimuladas (control).

Análisis estadístico

Los datos utilizados para el análisis estadístico son representativos de 3 experimentos independientes. La significancia con respecto al control negativo se determinó con el programa GraphPad Prism V8.0 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA), mediante una prueba de t de Student no pareada (valor de P: dos colas, intervalo de confianza: 95%): * si $p < 0.05$, ** si $p < 0.01$, *** si $p < 0.001$, **** si $p < 0.0001$. La significancia con respecto a las células estimuladas con Trombina (2U/ml) se determinó mediante una prueba de t de Student no pareada (valor de P: dos colas, intervalo de confianza: 95%): # si $p < 0.05$, ## si $p < 0.01$, ### si $p < 0.001$, #### si $p < 0.0001$. La significancia con respecto a algún inhibidor farmacológico (2U/ml) se determinó mediante una prueba de t de Student no pareada (valor de P: dos colas, intervalo de confianza: 95%): @ si $p < 0.05$, @@ si $p < 0.01$, @@@ si $p < 0.001$, @@@@ si $p < 0.0001$. Si no existe diferencia significativa se muestra en gráficas como “ns”.

6. RESULTADOS

Vías de señalización activadas por la trombina en las células de glía de Müller MIO-M1.

La vía de señalización de las MAP cinasas desempeña un papel crucial en la regulación de procesos fundamentales en las células de mamífero, tales como la proliferación y la migración celular. Estos procesos son características prominentes en el desarrollo de enfermedades fibroproliferativas en la retina, como la gliosis y la vitreoretinopatía proliferativa (VRP). Para explorar el papel de la trombina en la patogénesis de estas condiciones, se examinó su efecto en la activación (fosforilación) de las cinasas activadas por mitógenos (ERK) en células MIO-M1 estimuladas con concentraciones crecientes de trombina. Los resultados, tal como se presentan en la Figura 8a, muestran que la trombina induce un aumento en la fosforilación de ERK de manera dosis-dependiente. Esta observación sugiere que la activación de ERK por la trombina podría estar facilitando procesos celulares asociados con la respuesta fibroproliferativa en la retina. La especificidad de la respuesta a la trombina se confirmó mediante el uso de inhibidores específicos de la trombina, la Hirudina y el PPACK, los cuales efectivamente anularon la

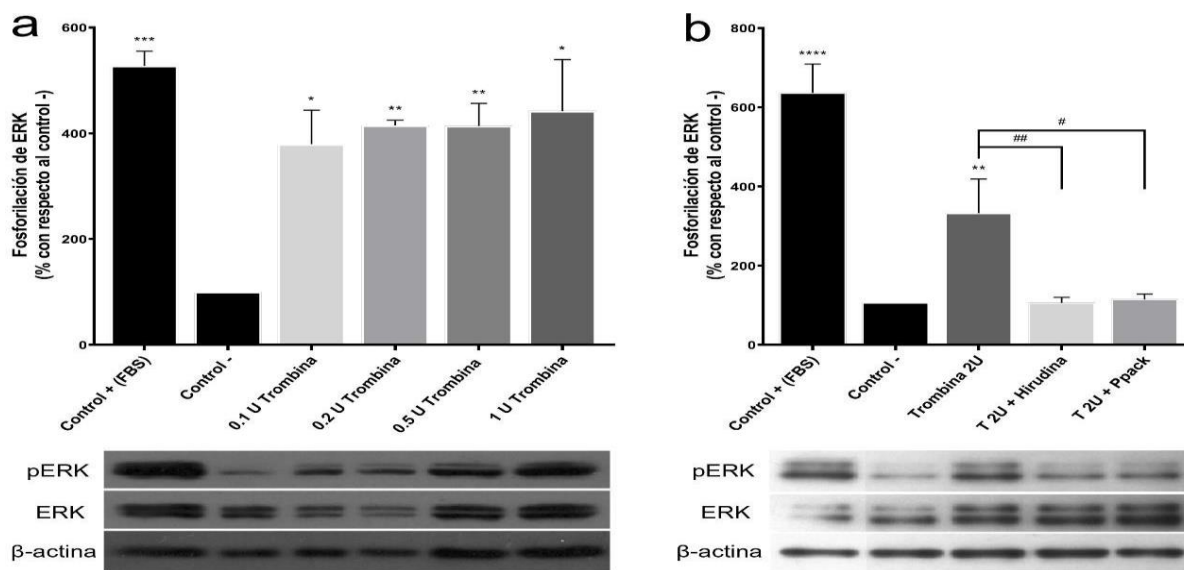


Figura 8 | La activación de ERK es específica de la Trombina y dependiente de la dosis.

a) Activación de ERK1/2 (pThr202/Tyr204) en células MIO-M1 tras 30 min con trombina (varias dosis, U/mL). b) La especificidad de activación se probó con inhibidores de trombina: trombina (2U/mL) solo, con hirudina (4U/mL), y PPACK (100 nM). Las células no estimuladas (Ctl-) se consideraron 100%, y el suero fetal bovino (FBS 10%) como Ctl+. Se presentan Western Blots representativos. Los datos, en % respecto al Ctl- (media \pm SEM; n=3), se analizaron con prueba t: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; para trombina: #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001, ####p < 0.0001.

fosforilación de ERK inducida por trombina, como se demuestra en la Figura 8b. Este hallazgo refuerza la noción de que la trombina actúa como un modulador significativo de las vías de señalización que contribuyen a la patología retiniana, destacando su relevancia en la mediación de eventos clave en el desarrollo de condiciones fibroproliferativas como la VRP.

La trombina activa vías de señalización involucradas en la activación de ERK1/2.

El producto del proto-oncogene Ras recicla entre su forma unida a GDP (inactiva), y la unida a GTP (activa). Esta interacción está controlada por los intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), que inducen el intercambio de la forma -GDP a la forma -GTP. El proceso se revierte por la actividad de las proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs). Una vez unido a GTP, Ras recluta proteínas efectoras

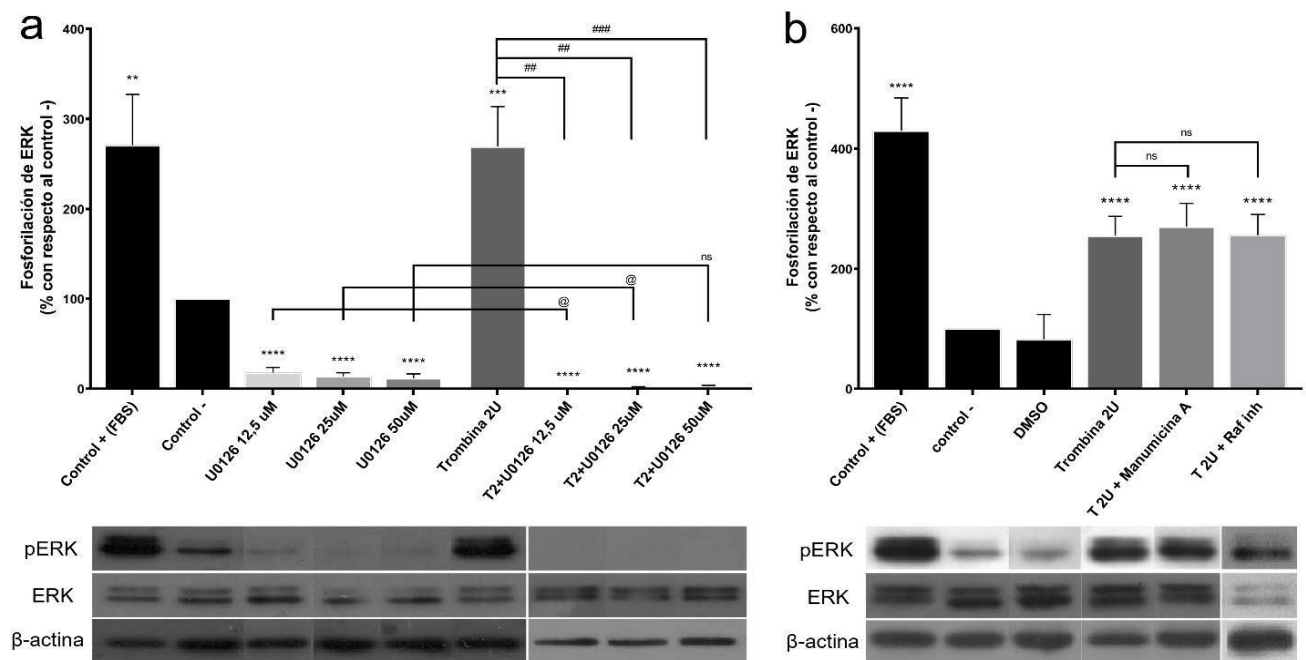


Figura 9 | La activación de ERK es dependiente de MEK e independiente de Ras y Raf. a) La inhibición de MEK con U0126 (12.5 a 50 μ M) especifica la fosforilación de ERK1/2 por trombina vía MEK. b) La inhibición de Ras (20 mM Manumicina A) y Raf no afecta la activación de ERK por trombina. Se utilizó el valor de 100% para células no estimuladas (Ctl-) y para suero fetal bovino (FBS 10%) como Ctl+. Se muestran Western Blots representativos. Se cultivaron 100,000 células MIO-M1/ml hasta el 80% de confluencia, privadas de suero por 24h antes de la estimulación con trombina tras 30 min de preincubación con inhibidores. Los análisis por Western Blot revelaron variaciones porcentuales respecto al control no estimulado (media \pm SEM; n=3). La significancia se evaluó mediante prueba t: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; para control con trombina: # $p < 0.05$, etc.; para control con inhibidor farmacológico: @ $p < 0.05$, etc. Sin diferencias significativas se indicó con "ns".

entre las que se cuenta la cinasa Raf, así como la subunidad catalítica p110 de la PI3 cinasa, así como factores que inducen la localización de Ras en la membrana plasmática y la iniciación de cascadas de señalización que promueven la proliferación y la supervivencia celular. Se analizó el efecto de la trombina sobre la actividad de las cinasas involucradas en la activación de la vía de señalización canónica de ERK: Ras-Raf-MEK-ERK. Como se muestra en la Figura 9b los resultados demuestran que la inhibición farmacológica de Ras con Manumicina A y Raf no altera la fosforilación de ERK inducida por trombina. Sin embargo, la inhibición de MEK1/2 con U0126 sí resulta en la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 como se ve en la Figura 9a.

Activación de la vía de G_i

La fosforilación de ERK se relaciona con la activación de diversas cadenas de señalización. Para identificar las vías involucradas en la activación de ERK inducida por la trombina en las células MIOM1 de EPR, se examinó el efecto del bloqueo de la proteína G_i utilizando toxina pertussis. Esta toxina cataliza la ribosilación de ADP de la subunidad α de G_i, impidiendo su interacción con el receptor acoplado en la membrana celular. Puesto que la subunidad G_{oi} permanece en su estado inactivo, unida a GDP, es incapaz de inhibir la adenilil ciclasa, manteniendo así elevados niveles de adenilil ciclasa y AMPc. Los resultados demuestran que el incremento en la fosforilación de ERK inducido por la trombina no se modifica en presencia de la toxina pertussis, lo que demuestra que el efecto no depende de la activación de G_i.

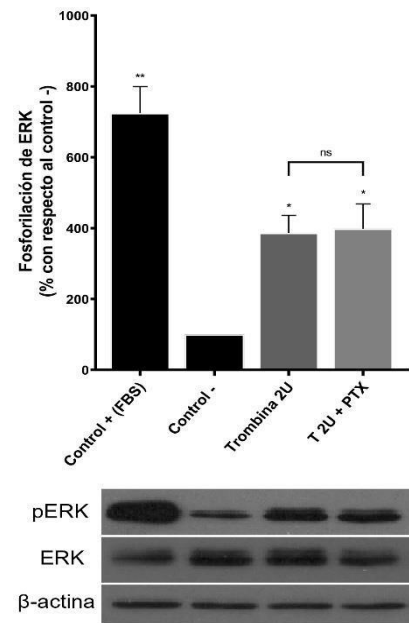
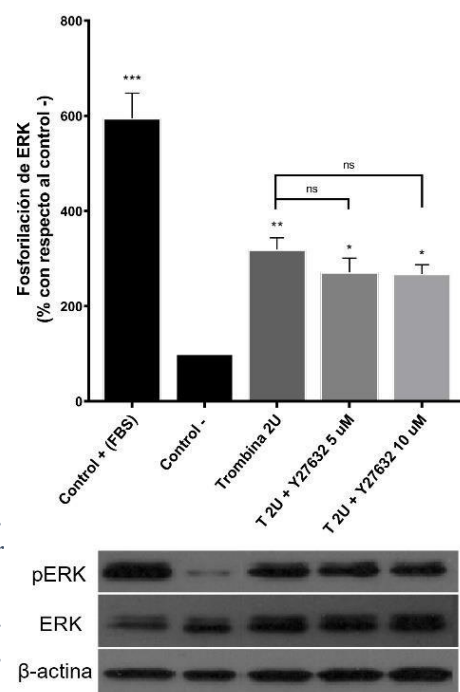


Figura 10 | La activación de ERK es independiente de la adenilil ciclasa. FBS (10%) como Ctl+; células no estimuladas como Ctl-; PTX (100ng/mL); trombina (2U/mL); combinación PTX (100ng/mL)+trombina (2U/mL). Datos en % vs. Ctl- (media \pm SEM; n=3). Significancia por prueba t: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001; "ns" indica no significativo.

Activación de la vía de G_{12/13}.

Para identificar el papel de la vía de G_{12/13} en la activación de ERK inducida por la trombina en las células MIOM1 utilizamos el inhibidor de la cinasa de Rho Y27632. Como se muestra en la figura esta vía no está involucrada en la activación de ERK1/2 por trombina. Inhibición de Rho quinasa. Y5, inhibidor de ROCK Y27632, 5 mM; Y10, Y27632, 10 mM.

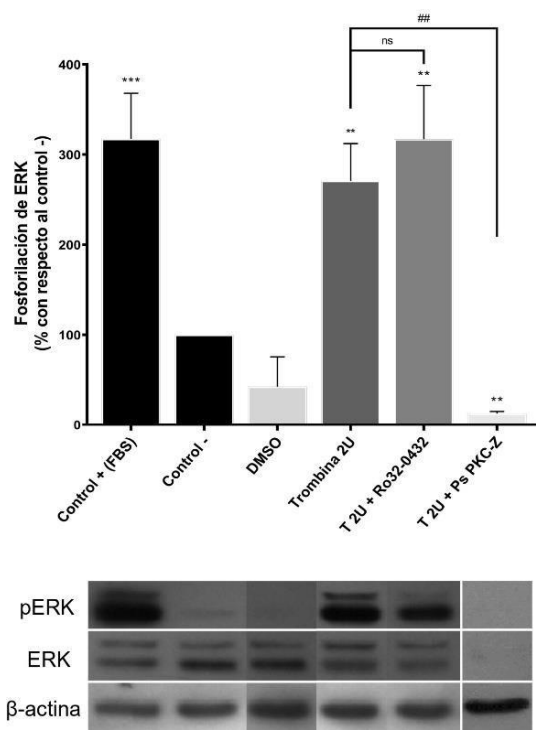
Figura 11 | La activación de ERK es independiente de la cinasa de Rho. FBS al 10% como Ctl+; no estimuladas como Ctl-; Y27632 (inhibidor ROCK) a 10uM; trombina 2U/mL; combinaciones de Y27632 (5uM, 10uM) con trombina (2U/mL). Datos en % vs. Ctl- (media ± SEM; n=3). Significancia por t-test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; "ns" para no significativo. ”.



Activación de la vía de G_q.

La señalización de la vía de G_q involucra la activación de las isoformas de la PKC. Es por esto que para evaluar la activación de esta vía utilizamos Ro32-0432, inhibidor de las isoformas convencionales de la PKC, y el pseudo-sustrato inhibidor de la PKC-ζ. Como se observa en la Figura 12, Ro32-0432 no tiene un efecto, lo que descarta la activación de la vía de G_q. Por otra parte, el pseudo-sustrato inhibidor de la PKC-ζ abate completamente la fosforilación de ERK1/2, lo que lo identifica como un activador de esta vía.

Figura 12 | La activación de ERK es independiente de las isoformas convencionales de la PKC, pero dependiente de PKC-ζ. FBS (10%) y DMSO (0.01%) usados como controles positivo y de excipiente, respectivamente. Células no estimuladas como control negativo. Se evaluó la activación de PKC usando Ro32-0432 (10mM) para isoformas convencionales y PsPKC-ζ (25mM) para PKC-ζ, con y sin estimulación por trombina (2U/mL). La significancia se determinó mediante prueba t, indicada como: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; ns indica no significativo.



Activación de la vía de β y γ

Las subunidades β y γ de las proteínas G triméricas activan principalmente a la PI3K; es por esto que para evaluar el efecto de esta vía utilizamos la wortmannina y LY294002. Como se observa en la Figura 13, estos compuestos no tienen un efecto sobre la activación de ERK1/2, lo que descarta la activación por esta vía.

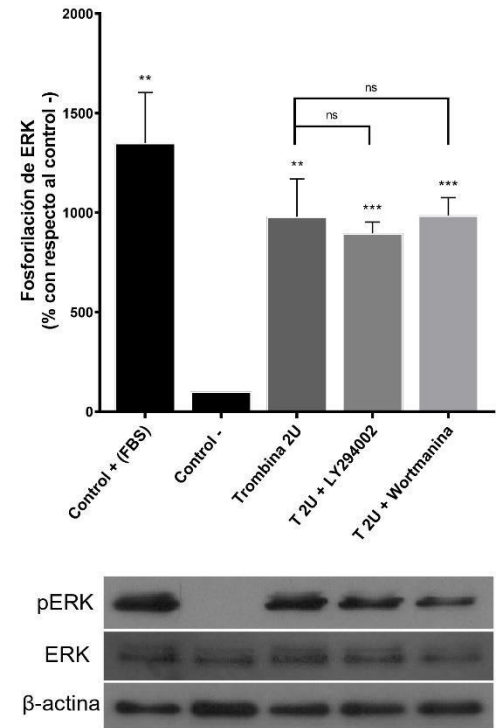


Figura 13 | La activación de ERK es independiente de la PI3K. FBS, suero fetal bovino 10% como Ctl+; células no estimuladas como Ctl-; trombina (2U/mL); inhibidor de PI3K, LY294002(10mM)+trombina (2U/mL); inhibidor de PI3K, wortmanina (100 mM) +trombina (2U/mL). Significancia determinada por prueba t independiente: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Sin diferencias significativas: "ns".

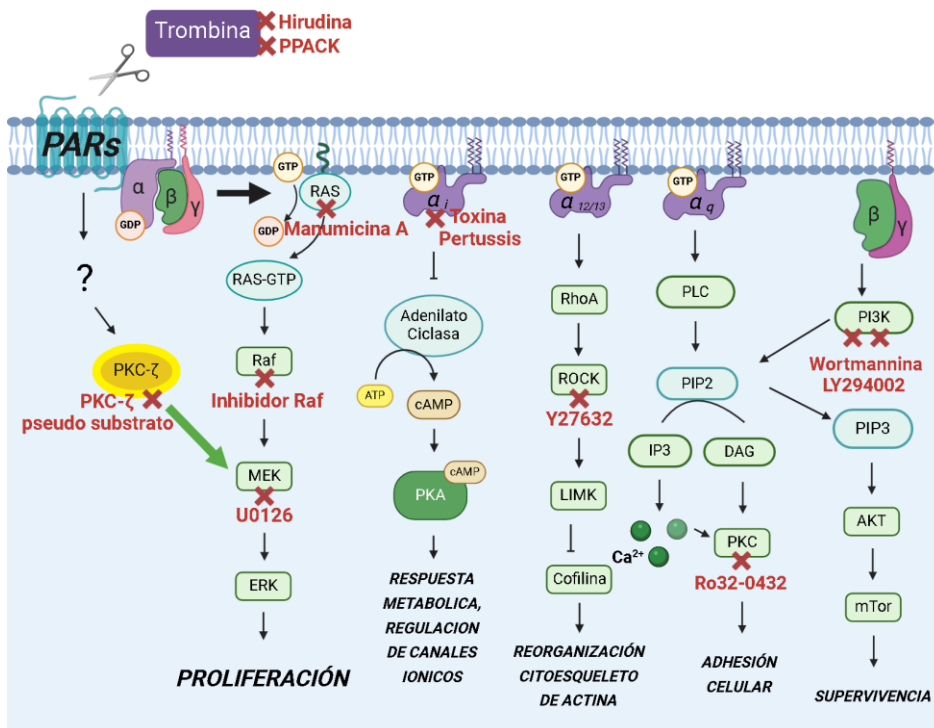


Figura 14 | Mapeo detallado de las cascadas de señalización analizadas en esta tesis: Trombina con el receptor PAR activa múltiples vías de señalización a través de proteínas G. Se resalta la importancia de PKC- ζ en la activación de la cascada de las MAP quinasas (ERK 1/2) mediante una flecha verde que indica cómo su inhibición o la de MEK bloquea la activación de ERK. Esto sugiere que PKC- ζ es crucial en esta ruta. La figura también muestra marcas de inhibición (cruces rojas) sobre los componentes de las vías, revelando los efectos de inhibidores específicos y ayudando a entender la compleja red de señalización y los componentes clave en la activación de ERK.

7. DISCUSIÓN

Los padecimientos proliferativos que generan ceguera son una causa importante del fracaso de las cirugías para reparar el desprendimiento de retina. La patogénesis de estos padecimientos que incluyen la VRP, involucra a distintos tipos celulares de la retina. De manera importante, el EPR, así como a las células de glía de Müller juegan un papel importante en el desarrollo de estos padecimientos que provocan la pérdida total o parcial de la función visual.

Las células de Müller son el principal tipo de glía en la retina de los vertebrados y juegan un papel determinante en su mantenimiento y homeostasis. En condiciones patológicas, se ha descrito la “activación” de las células de Müller como consecuencia de diversas alteraciones de la retina como trauma, desprendimiento, isquemia o uveítis. Esta reacción denominada “gliosis” se caracteriza por la promoción de la proliferación de la glía, acompañada de respuestas generalizadas como el incremento de la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), así como la activación de vías específicas de señalización intracelular, entre las que se cuenta la activación de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK/ERK) (Nakazawa et al., 2007). Finalmente, la hipertrofia de las células de Müller hacia la superficie de la retina desprendida y su continua proliferación contribuye, junto con las células transformadas del EPR, a la formación de membranas celulares sobre ambas superficies de la retina, cuya contracción provoca el re-desprendimiento de esta, y el desarrollo de patologías proliferativas que inducen ceguera (Eastlake et al., 2016).

La VRP representa un desafío significativo en la oftalmología, particularmente debido a su capacidad para inducir ceguera tras el fallo de cirugías de reparación de desprendimiento de retina. La complejidad de esta enfermedad radica en su multifactorialidad, involucrando una diversidad de células retinianas, incluyendo el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y las células de glía de Müller. En esta tesis profundizamos en la comprensión de los mecanismos patogénicos de la VRP, con un enfoque particular en el papel de la trombina y su influencia sobre la activación de las células de Müller, elemento crítico aún subestudiado en la literatura existente

En condiciones patológicas, la alteración de la barrera hematorretiniana expone a la retina a numerosos factores contenidos en el suero sanguíneo entre los que se cuentan neurotransmisores, factores de transcripción, factores de crecimiento, moduladores, y de manera predominante, la trombina. La trombina es una proteasa de serina/treonina que juega un papel esencial en el proceso de coagulación

sanguínea. Además de su función en la coagulación, la trombina promueve la proliferación celular a través de la activación proteolítica de los “receptores activados por proteasa” (PARs), acoplados a proteínas G. La activación de PAR1, el prototipo de esta familia induce la disminución del nivel de AMPc mediado por la proteína G_i , el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular mediado por la proteína G_q , y la activación de la GTPasa monomérica Rho, mediada por las proteínas $G_{12/13}$ (Coughlin, 2000; Ossovskaya & Bunnett, 2004).

En estudios previos se ha demostrado que las células del EPR son el componente celular mayoritario de las membranas epirretinales contráctiles, y responden *in vitro* a la estimulación por trombina. En el EPR, la activación de PAR1 induce la proliferación celular a través de la activación de la vía de señalización de ERK1/2. Si bien los mecanismos moleculares de acción de la trombina en las células de glía de Müller son similares a los descritos en los astrocitos del SNC, las vías de señalización involucradas en la activación de estas se desconocen en gran medida. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la trombina sobre la activación de la vía de señalización formada por la vía canónica de Ras-Raf-MEK-ERK en las células de Müller como consecuencia de la activación de los PARs inducida por Trombina.

La señalización a través de las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPKs) son cruciales en el proceso de proliferación celular. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que la trombina incrementa significativamente la fosforilación de ERK1/2 a partir de los 5 minutos incluso hasta 4 horas de exposición (datos no mostrados). Este efecto también se observa en los resultados con concentraciones bajas de trombina, en el rango de 0.1 a 2 unidades por mL. Cabe destacar que, en el cuerpo humano, tras una lesión, la trombina se produce a consecuencia de la cascada de coagulación a partir de la protrombina y se mantiene en niveles basales bajos hasta que se produce una herida. Para este estudio, seleccionamos 2 unidades de trombina, en línea con experimentos sobre EPR en nuestro laboratorio, estándar comúnmente aceptado en investigaciones de coagulación y exposición a la trombina. El análisis de las vías de señalización intracelular activadas por la estimulación de los PARs demostró que la inhibición de la adenilil ciclasa o el bloqueo de la vía de la cinasa de Rho/ROCK no modificó la fosforilación de ERK inducida por 2Ude trombina. Este resultado descarta la participación de estas vías en el efecto de la trombina.

La vía de señalización canónica por MEK/ERK requiere la activación de la GTPasa monomérica Ras y la subsecuente activación de la cinasa de serina/treonina Raf-1 que, a su vez, activa a MEK- ERK1/2

(Chang & Karin, 2001; Cargnello & Roux, 2011). En congruencia con nuestros estudios previos en células del epitelio pigmentado de la retina (Palma-Nicolás et al., 2010), los resultados del presente estudio demuestran que el incremento de la fosforilación de ERK inducido por trombina en células de Müller de la retina humana (MIOM1) no se inhibe por la manumicina, que impide el anclaje a la membrana y la activación de Ras. Al respecto, en contraste con la fosforilación no-canónica de ERK1/2 que es independiente de Ras y dependiente de las isoformas clásicas- y -nuevas de la PKC en células del EPR y del epitelio intestinal, nuestros resultados demuestran que la activación de ERK inducida por trombina en las células de Müller no requiere la actividad de las isoformas c/n de la PKC, y depende de la activación de la PKC atípica PKC- ζ . Dado que la vía $G\beta\gamma$ /PI3K activa a la PKC- ζ , se examinó el efecto de la inhibición de la PI3K sobre la fosforilación de ERK inducida por la trombina. A diferencia de los resultados obtenidos en células del EPR (Parrales, A. et al. 2010), en las que la fosforilación de ERK requiere la actividad de PI3K/PKC- ζ , la fosforilación de ERK1/2 por la trombina en la glía de Müller no requiere la actividad de la PI3K. Como un mecanismo alternativo, la activación de MEK/ERK podría estar mediada por la activación de Raf por la PKC- ζ . Sin embargo, esta vía se descartó también ya que la inhibición de Raf no tiene un efecto sobre la activación de ERK1/2.

Es primordial reconocer que, aunque nuestros hallazgos proporcionan una base sólida sobre el papel crucial de la trombina en la activación de las células de Müller, debemos admitir las limitaciones inherentes al alcance de nuestro estudio. La complejidad en la patogénesis de la VRP subraya una red intrincada de interacciones entre diversos factores y tipos celulares, lo cual pone de manifiesto la importancia de adoptar enfoques experimentales más amplios. Esto incluye la aplicación de técnicas que superen los límites del western blot, tanto in vitro como in vivo, con el fin de desentrañar con mayor precisión las interacciones celulares y moleculares implicadas. Así, es imprescindible que futuras investigaciones se enfoquen en esclarecer estas vías de señalización alternativas activadas por la trombina, así como su influencia en el desarrollo de membranas epirretinianas contráctiles, un factor determinante en la evolución hacia la ceguera en pacientes con VRP. En un giro sorprendente y contrario a nuestras expectativas iniciales, hemos observado que la fosforilación de ERK1/2, inducida por la trombina, no se ve comprometida por la inhibición de las vías de señalización tradicionalmente asociadas con este proceso como la vía de PI3K, según se discute en nuestra investigación. En cambio, hemos descubierto que esta fosforilación se modula a través de una ruta alternativa no convencional, específicamente por PKC- ζ . Este hallazgo subraya la complejidad de los mecanismos de señalización involucrados.

A través de nuestro estudio, hemos demostrado que la trombina, conocida por su papel crucial en la coagulación sanguínea, ejerce una influencia significativa en la proliferación celular mediante la activación de los receptores activados por proteasa (PARs). La importancia de este mecanismo se evidencia en la activación de la vía de señalización de ERK1/2 en células de Müller, lo que sugiere un vínculo específico a través de la PKC- ζ entre la trombina y la patogénesis de la VRP.

8. CONCLUSION

Este estudio ha demostrado que la trombina juega un papel crucial en la activación de la vía de señalización ERK1/2 en las células de glía de Müller, mediante un mecanismo alternativo que involucra la activación de PKC- ζ , desmarcándose de las vías tradicionales asociadas con este proceso. A diferencia de lo observado en otras células retinianas, como las del EPR, donde la fosforilación de ERK1/2 depende de la activación de PI3K, nuestros hallazgos indican que en las células de Müller, la trombina induce la activación de ERK1/2 a través de un camino distintivo y no convencional. Este descubrimiento subraya la complejidad de los mecanismos de señalización celular y su especificidad dependiendo del contexto celular y patológico.

Además, los resultados obtenidos enfatizan la importancia de la trombina en procesos celulares críticos que contribuyen a la patogénesis de enfermedades proliferativas retinianas, como la VRP. La identificación de PKC- ζ como un mediador clave en la respuesta de las células de Müller a la trombina abre nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias dirigidas, que podrían mitigar o prevenir la progresión de patologías retinianas asociadas a la proliferación y migración celular anormal.

El conocimiento adquirido a través de este estudio contribuye significativamente a nuestra comprensión de la biología celular retiniana y sus implicaciones en la salud visual. Destaca la necesidad de continuar explorando las vías de señalización alternativas y sus roles en distintos contextos patológicos, con el objetivo de identificar dianas terapéuticas potenciales. La elucidación de estos mecanismos no solo profundiza nuestro entendimiento de las enfermedades retinianas, sino que también pavimentamos el camino hacia intervenciones clínicas más efectivas. En conclusión, este estudio resalta la capacidad de la trombina para activar ERK1/2 en las células de glía de Müller a través de PKC- ζ , un mecanismo importante para la patogénesis de la VRP, ofreciendo un nuevo enfoque para la investigación y tratamiento de enfermedades retinianas proliferativas.

9. REFERENCIAS

1. 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., & Dik, W. A. (2014). The role of thrombin in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(7), 4659–4666. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14818>
2. Bogatcheva, N. V., Garcia, J. G., & Verin, A. D. (2002). Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry. Biokhimiia*, 67(1), 75–84. <https://doi.org/10.1023/A:1013904231324>
3. Bringmann, A., Francke, M., & Reichenbach, A. (2003). Müller cells in retinopathies. *Advances in Molecular and Cell Biology*, 31, 1117–1132. [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(03\)31051-3](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(03)31051-3)
4. Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., & Johnson, G. L. (1995). $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 24631–24634. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24631>
5. Buzala, M., Słomka, A., Janicki, B., Ponczek, M. B., & Żekanowska, E. (2017). Review: The mechanism of blood coagulation, its disorders and measurement in poultry. *Livestock Science*, 195(November 2016), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.11.009>
6. Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-Activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/membr.00031-10>
7. Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410, 37–40. <https://doi.org/10.1038/35065000>
8. Chakravorty, D., & Assmann, S. M. (2018). G protein subunit phosphorylation as a regulatory mechanism in heterotrimeric G protein signaling in mammals, yeast, and plants. [Article]. *Biochemistry*, 3331–3357.
9. Coelho-Aguiar, J. de M., Bon-Frauches, A. C., Gomes, A. L. T., Veríssimo, C. P., Aguiar, D. P., Matias, D., Thomasi, B. B. de M., Gomes, A. S., Brito, G. A. de C., & Moura-Neto, V. (2015). The enteric glia: Identity and functions. *Glia*, 63(6), 921–935. <https://doi.org/10.1002/glia.22795>
10. Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407, 258–264.

11. Coughlin, S. R. (2010). Protease-activated receptors. In *Handbook of Cell Signaling*, 2/e (Second Ed., Vol. 1, pp. 171–175). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00026-7>
12. Denis, C., Sauliere, A., Galandrin, S., Senard, J.-M., & Gales, C. (2012). Probing heterotrimeric G protein activation: Applications to biased ligands. *Current Pharmaceutical Design*, 18(2). <https://dx.doi.org/10.2174/138161212799040466>
13. Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB Life*, 61(5), 510–515. <https://doi.org/10.1002/iub.186>
14. Distéfano-Gagné, F., Bitarafan, S., Lacroix, S., et al. (2023). Roles and regulation of microglia activity in multiple sclerosis: insights from animal models. *Nature Reviews Neuroscience*, 24, 397–415. <https://doi.org/10.1038/s41583-023-00709-6>
15. Dowling, J. E. (2009). *Retina: An Overview*. 159–169.
16. Eastlake, K., Banerjee, P. J., Angbohang, A., Charteris, D. G., Khaw, P. T., & Limb, G. A. (2016). Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia*, 64(4), 495–506. <https://doi.org/10.1002/glia.22942>
17. Egorova, P. A., & Bezprozvanny, I. (2018). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders. *FEBS Journal*, 285(19), 3547–3565. <https://doi.org/10.1111/febs.14366>
18. Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenamin, P. G., Roberts, F., & Pearlman, E. (2016). *The Eye: Basic Science in Practice*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
19. García-López, M. T., Gutiérrez-Rodríguez, M., & Herranz, R. (2010). Thrombin-activated receptors: promising targets for cancer therapy? *Current Medicinal Chemistry*, 17(2), 109–128. <https://doi.org/10.2174/092986710790112639>
20. Garweg, J. G. (2010). Viterorretinopatía proliferativa. In S. Boyd, R. Cortez, & N. Sabates (Eds.), *Enfermedades y cirugía vitreorretiniana* (1ra ed., pp. 413–440). Jaypee - Highlights Medical Publishers Inc.
21. Gladwin, K., & Choi, D. (2015). Olfactory ensheathing cells: Part I - Current concepts and experimental laboratory models. *World Neurosurgery*, 83(1), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2013.03.010>
22. Goldman, D. (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(7), 431–442. <https://doi.org/10.1038/nrn3723>
23. Grossniklaus, H. E., Geisert, E. E., & Nickerson, J. M. (2015). Introduction to the retina. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 134). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.001>

24. Haimon, Z., Frumer, G. R., Kim, J. S. et al. (2022). Cognate microglia–T cell interactions shape the functional regulatory T cell pool in experimental autoimmune encephalomyelitis pathology. *Nat Immunol*, 23, 1749–1762. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01360-6>
25. Hejtmancik, J. F., & Nickerson, J. M. (2015). Overview of the visual system. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 134). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.05.006>
26. Hindley, A., & Kolch, W. (2002). Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 8), 1575–1581. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950876>
27. Hollyfield, J. G., & Clinic, C. (2010). Developmental anatomy of the retinal and choroidal vasculature, 9–15.
28. Human Eye Anatomy infographic - LifeMap Discovery. (n.d.). Retrieved March 29, 2020, from <https://discovery.lifemapsc.com/library/images/human-eye-anatomy>
29. Jusufbegovic, D., Tamiya, S., & Kaplan, H. J. (2015). Risk factors and prevention of proliferative vitreoretinopathy. *Expert Review of Ophthalmology*, 10(5), 431–440. <https://doi.org/10.1586/17469899.2015.1090875>
30. Kálmán, M. (2003). Glial reaction and reactive glia. In *Advances in Molecular and Cell Biology* (Vol. 31). [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(03\)31035-5](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(03)31035-5)
31. Kanski, J. J. (2009). *Oftalmología Clínica* (6a ed.). Elsevier.
32. Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends in Neurosciences*, 31(12), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.003>
33. Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2011). Neuroglia, der lebende Nervenkitz. *Fortschritte Der Neurologie Psychiatrie*, 79(10), 588–597. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1281704>
34. Khan, M. A., Brady, C. J., & Kaiser, R. S. (2015). Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: An update. *Retina*, 35(2), 165–175. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000447>
35. Klages, B., Brandt, U., Simon, M. I., Schultz, G., & Offermanns, S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *Journal of Cell Biology*, 144(4), 745–754. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.745>
36. Lappano, R., & Maggiolini, M. (2012). GPCRs and cancer. *Nature Publishing Group*, 351–362. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.183>

37. Lee-Rivera, I., López, E., Parrales, A., Alvarez-Arce, A., & López-Colomé, A. M. (2015). Thrombin promotes the expression of Ccnd1 gene in RPE cells through the activation of converging signaling pathways. *Experimental Eye Research*, 139, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.08.001>
38. Li, W. (2016). The eye uses many layers of nerve cells to convert light into sight. Retrieved from https://www.nigms.nih.gov/education/life-magnified/Pages/9_bottom_eye_nerve_cell.aspx
39. Limb GA, Salt TE, Munro PM, Moss SE, Khaw PT. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43: 864–869.
40. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Amon, A., & Scott, M. P. (2013). *Molecular Cell Biology* (7th ed.). W. H. Freeman and Company.
41. Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., & Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacological Reviews*, 53(2), 245–282.
42. Maragoudakis, M. E., & Tsopanoglou, N. E. (2009). Thrombin: Physiology and disease. In *Thrombin: Physiology and Disease*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-09637-7>
43. Morescalchi, F., Duse, S., Gambicorti, E., Romano, M. R., Costagliola, C., & Semeraro, F. (2013). Proliferative vitreoretinopathy after eye injuries: An overexpression of growth factors and cytokines leading to a retinal keloid. *Mediators of Inflammation*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/269787>
44. Munk, C., Isberg, V., Mordalski, S., Harpsøe, K., Rataj, K., Hauser, A. S., Kolb, P., Bojarski, A. J., Vriend, G., & Gloriam, D. E. (2016). GPCRdb: The G protein-coupled receptor database – an introduction. *British Journal of Pharmacology*, 16, 2195–2207. <https://doi.org/10.1111/bph.13509>
45. Nakazawa, T., Takeda, M., Lewis, G. P., Cho, K.-S., Jiao, J., Wilhelmsson, U., Fisher, S. K., Pekny, M., Chen, D. F., & Miller, J. W. (2007). Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(6), 2760–2768. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1398>
46. Narayanan, S. (1999). Multifunctional roles of thrombin. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 29(4), 275–280.
47. Ndubaku, U., & de Bellard, M. E. (2008). Glial cells: Old cells with new twists. *Acta Histochemica*, 110(3), 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.10.003>
48. Nierodzik, M. L., & Karparkin, S. (2006). Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*, 10(5), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.002>

49. Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W. (2004). Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease. *Physiological Reviews*, 84, 579–621.
50. Palma-Nicolás, J. P., López, E., & López-Colomé, A. M. (2008). PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation. *Bioscience Reports*, 28, 307–317. <https://doi.org/10.1042/BSR20080083>
51. Palma-Nicolás, J. P., López, E., & 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. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(4), 948–959. <https://doi.org/10.1002/jcb.22608>
52. Parrales, A., Palma-Nicolas, J. P., Lopez, E., & Lopez-Colome, A. M. (2010). Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting cFos-mediated cyclin D1 expression. *Journal of Cellular Physiology*, 222, 302–312.
53. Puro, D. G., Mano, T., Chan, C. C., Fukuda, M., & Shimada, H. (1990). Thrombin stimulates the proliferation of human retinal glial cells. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 228(2), 169–173. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2186973>
54. Puro, D. G., & Stuenkel, E. L. (1995). Thrombin-induced inhibition of potassium currents in human retinal glial (Müller) cells. *The Journal of Physiology*, 485(Pt 2), 337–348. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020733>
55. Rebecchi, M. J., & Pentylala, S. N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological Reviews*, 80(4), 1291–1335.
56. Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2010). Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1672-3>
57. Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2012). Cell biology of the Müller cell. In *Retina* (5th ed., Vol. 1D, pp. 415–432). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00017-5>
58. Reuss, B. M. (2010). Glial growth factors. In *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 819–825). <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01006-8>
59. Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
60. Ruiz-Loredo, A. Y., López, E., & López-Colomé, A. M. (2011). Thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE through Rho/ROCK-mediated MLC phosphorylation. *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), 414–423. <https://doi.org/10.1002/jcp.22347>

61. Schettters, S. T., Gomez-Nicola, D., Garcia-Vallejo, J. J., & Van Kooyk, Y. (2018). Neuroinflammation: Microglia and T cells get ready to Tango. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01905>
62. Seasholtz, T. M., Majumdar, M., & Brown, J. H. (1999). Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Molecular Pharmacology*, 55(6), 949–956. <https://doi.org/10.1124/mol.55.6.949>
63. Spirn, M. J., Regillo, C., & Lewis, H. (2010). Manejo Quirúrgico de la Vitreorretinopatía Proliferativa. In S. Boyd, R. Cortez, & N. Sabates (Eds.), *Enfermedades y cirugía vitreorretiniana* (1st ed., pp. 559–570). Jaypee - Highlights Medical Publishers Inc.
64. Sun, Y., Liu, W., Liu, T., Feng, X., Yang, N., & Zhou, H. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence, and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 9893(May), 1–5. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>
65. Thatcher, J. D. (2010). The Inositol Trisphosphate (IP3) Signal Transduction Pathway. *Science Signaling*, 3(119). <https://doi.org/10.1126/scisignal.3119tr3>
66. Tran, C. T., Wolz, P., Egensperger, R., Kösel, S., Imai, Y., Bise, K., Kohsaka, S., Mehraein, P., & Graeber, M. B. (1998). Differential expression of MHC class II molecules by microglia and neoplastic astroglia: relevance for the escape of astrocytoma cells from immune surveillance. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 24(4), 293–301. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.1998.00120.x>
67. Tsopanoglou, N. E., & Maragoudakis, M. E. (2004). Role of Thrombin in Angiogenesis and Tumor Progression. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 30(1), 63–69. <https://doi.org/10.1055/s-2004-822971>
68. Vázquez García, C. (n.d.). TFG/Parte3. Proteopedia. Retrieved September 16, 2022, from https://proteopedia.org/wiki/index.php/User:Carlos_V%C3%A1zquez_Garc%C3%ADa/TFG/Parte3
69. Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>
70. Velez, G., Weingarden, A. R., Tucker, B. A., Lei, H., Kazlauskas, A., & Young, M. J. (2012). Retinal pigment epithelium and müller progenitor cell interaction increase müller progenitor cell expression of PDGFR α and ability to induce proliferative vitreoretinopathy in a rabbit model. *Stem Cells International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/106486>
71. Verkhatsky, A., & Butt, A. (2007). *Glial Neurobiology: A Textbook*. John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470517796>

72. Verkhratsky, A., & Butt, A. M. (2013). Neuroglia: Definition, Classification, Evolution, Numbers, Development. *Glial Physiology and Pathophysiology*, 73–104.
73. Viganò, F., & Dimou, L. (2016). The heterogeneous nature of NG2-glia. *Brain Research*, 1638, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.012>
74. Wan, J., & Goldman, D. (2016). Retina regeneration in zebrafish. *Current Opinion in Genetics and Development*, 40(Figure 1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.05.009>
75. Wang, H., & Reiser, G. (2003). Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors. *Biological Chemistry*, 384(2), 193–202.
76. Wang, H., Ubl, J. J., Stricker, R., & Reiser, G. (2002). Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 283(5), 1351–1364. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00001.2002>
77. Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M., & Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO Journal*, 16(11), 3044–3056. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.3044>
78. Wilken, M. S., & Reh, T. A. (2016). Retinal regeneration in birds and mice. *Current Opinion in Genetics and Development*, 40, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.05.028>
79. Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., & Honn, K. V. (2016). Thrombin - Unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(2), 213–233. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9626-0>
80. Wolf, Y., Shemer, A., Levy-Efrati, L., Gross, M., Kim, J.-S., Engel, A., David, E., Chappell-Maor, L., Grozovski, J., Rotkopf, R., Biton, I., Eilam-Altstadter, R., & Jung, S. (2018). Microglial MHC class II is dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone-induced demyelination. *European Journal of Immunology*, 48, 1308–1318. <https://doi.org/10.1002/eji.201847540>