

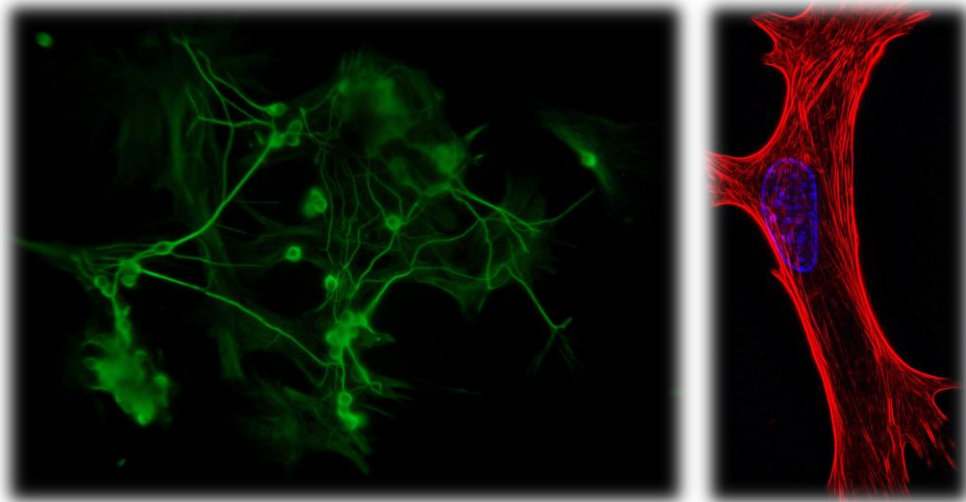


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Tesis Doctoral en Bioquímica

Yanel Andrea Volonté



“Rol de las células gliales de Müller
en la preservación de la supervivencia y funcionalidad
de los fotorreceptores de retina”

Bahía Blanca

Argentina

2018

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Enrique Politi

Investigador Principal - CONICET
Profesor Asociado - Biología Celular
Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional del Sur

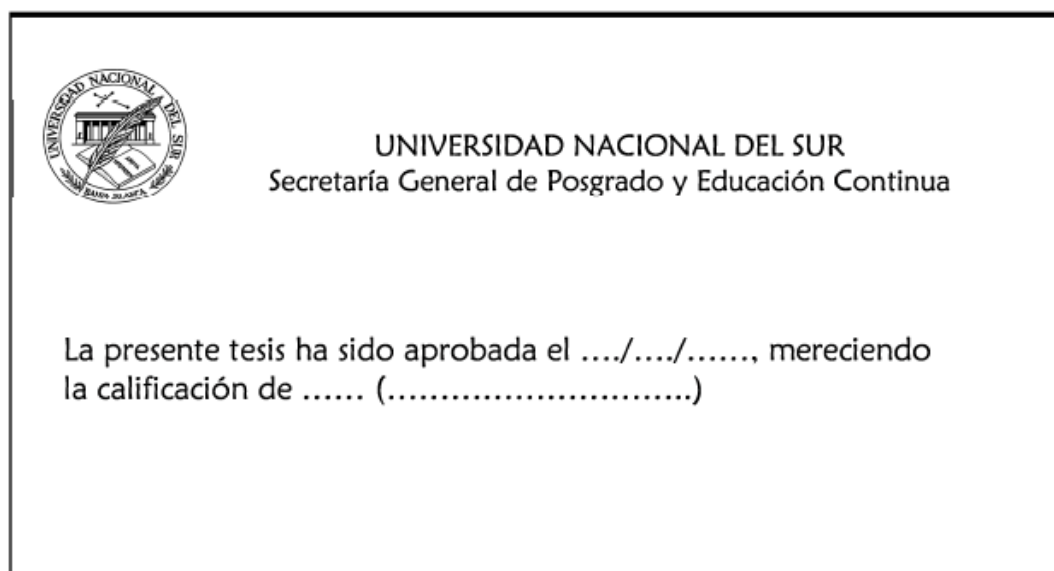
CO-DIRECTOR DE TESIS

Dra. Olga Lorena German

Investigadora Adjunta - CONICET
Profesora Adjunta – Virología Clínica
Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional del Sur

PREFACIO

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para acceder al grado académico de Doctora en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otras Universidades. Aquí se presentan los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del CONICET y de la Universidad Nacional del Sur (UNS). Estos ensayos se realizaron durante el período comprendido entre abril de 2012 y 2017, bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Politi y la co-dirección de la Dra. Olga Lorena German.



Febrero-2018

Bioq. Yanel Andrea Volonté

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

... a mis padres, Miriam y Guillermo.

... a mi amor, Fito.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, el Dr. Luis Politi y la Dra. Lorena German, por lo que aprendí de ellos y por todo el tiempo dedicado a la corrección de resúmenes, posters y la tesis. También a la Dra. Nora Rotstein por su predisposición y por aportar siempre sus críticas y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

Quiero agradecer especialmente a Lore, por confiar en mí para seguir trabajando juntas y por toda la ayuda que siempre me brindó e hizo posible que hoy llegara hasta aquí.

Al Dr. Andrés Garelli por compartir siempre su mirada crítica sobre la ciencia y la realidad. Por confiar en mí, por darme la oportunidad de ser parte de su trabajo.

A mis compañeros del laboratorio: Marce, Marcos y Facu, por los buenos y divertidísimos momentos que pasamos, por las eternas charlas grupales de autoayuda, por estar siempre para dar una mano.

A Vicky, Dani, Pablo, San y Santi, amigos que el paso por este laboratorio me brindó. Gracias por su sinceridad y por la buena onda desde el primer momento.

A Edgard, por los mates, las charlas, por engordarnos para navidad, por ser un gran compañero de trabajo, capaz de sacarte una sonrisa aún en los peores días.

A Bea por enseñarme a trabajar con cultivo celular, por la ayuda de siempre y por su paciencia.

A la Dra. Victoria Ayala por enseñarme y ayudarme a hacer tantas pcrs y por todos los momentos compartidos.

A la Dra. Samanta Zanetti por todos sus consejos y su invaluable ayuda en citometría de flujo.

A todo el equipo de las cátedras de Biología Celular y Bioanalítica II, porque hacen que el trabajo en docencia sea más que agradable, por todas las reuniones, cenas y mates compartidos.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), por el espacio brindado para llevar a cabo esta tesis y a todos sus integrantes que de alguna manera u otra fueron parte de este camino.

A la UNS y CONICET por haberme formado académicamente.

A los organismos que brindaron financiamiento al laboratorio de Neurobiología y que permitieron el desarrollo de este trabajo de tesis, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Sur (UNS).

A mi familia: mi papá, mi mamá y mis hermanos Caro y Mati, por estar siempre, por darme la posibilidad de llegar hasta acá, de hacer lo que me gusta, por su paciencia y comprensión, por alegrarse siempre de cada logro alcanzado. A mi abuela Olga por su cariño, su paciencia y por todos sus rezos. Y por sobre todo a mi compañero de vida, mi amor, el que estuvo siempre, desde el primer momento. Por su paciencia, sus consejos y su cariño. A todos ellos, gracias por mostrarme las cosas verdaderamente importantes de la vida.

Finalmente, a todos los que no nombre pero que fueron parte de este camino y me ayudaron a transitarlo.

RESUMEN

Candidato: Yanel Andrea Volonté

Director: Dr. Luis Enrique Politi

Co-director: Dra. Olga Lorena German

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca-Argentina-CONICET

La Retinitis Pigmentaria (RP) y la Degeneración Macular Asociada a la Edad (AMD) son enfermedades neurodegenerativas de la retina que se caracterizan por la pérdida progresiva e irreversible de las neuronas fotorreceptoras (FR). Ambas enfermedades son incurables, conducen a la pérdida de visión y no cuentan con tratamientos efectivos. Una estrategia para lograr desarrollar una terapia más adecuada para estas enfermedades es la utilización de células madre que puedan restaurar los tejidos dañados. Sin embargo, regenerar la retina requiere resolver varios problemas poco explorados: uno de ellos es la escasa actividad regenerativa de las células gliales de Müller (CGM) de la retina que, si bien han sido propuestas como células madre, poseen una efectividad muy limitada en mamíferos y son ineficientes para recuperar los FR perdidos. Otro problema es la respuesta reactiva de las CGM, la cual ocurre luego de daños en la retina y genera una inflamación crónica local que afecta la supervivencia de las neuronas regeneradas. Al respecto, recientemente se ha propuesto que los receptores X para retinoideos (RXR) son moduladores de la respuesta inflamatoria que protegerían a las neuronas durante las enfermedades neurodegenerativas del SNC. Sin embargo, aún se conoce muy poco sobre su rol en la retina.

El estudio de estas enfermedades enfrenta dificultades éticas y prácticas, por lo que el uso de ratones *rd1*, un modelo animal de RP que presenta una mutación específica que causa la muerte por apoptosis de los FR, resulta extremadamente útil para investigar las causas de la escasa capacidad regenerativa de la retina. Con este objetivo utilizamos retinas enteras y cultivos primarios neuronales y de CGM de ratones control y *rd1*. También investigamos y comparamos la actividad proliferativa de las CGM y la expresión de diversos marcadores de células madre, así como la expresión de los RXR y su efecto

sobre la supervivencia neuronal y reactividad glial ante el tratamiento con un agonista sintético de estos receptores.

Los resultados indicaron una disminución de los marcadores de célula madre de las CGM *rd1*. Notablemente, la expresión de uno de ellos, *Nestina*, pudo ser revertida al co-cultivar las CGM *rd1* con neuronas control (*wt*), lo que sugiere una alteración en la comunicación neuro-glial. Además, el agonista sintético de los RXR, PA024, retrasó la muerte de los FR y disminuyó la reactividad glial en cultivos de retinas *rd1*.

En resumen, en esta tesis presentamos evidencia de que en las retinas *rd1* existe una alteración en la comunicación neuro-glial que afectaría el potencial regenerativo y dispararía una respuesta reactiva en las CGM. Asimismo, hallamos que la reactividad de las CGM y la muerte de los FR en las retinas *rd1* pudo ser disminuida mediante la utilización de un agonista de los RXR.

Estos resultados sugieren que el potencial regenerativo de las CGM dependería de su interacción con neuronas sanas; que durante los procesos neurodegenerativos de la retina este diálogo neuro-glial estaría afectado; y que los RXR regularían, en parte, los procesos inflamatorios y la supervivencia neuronal en la retina. Estos hallazgos podrían ser de utilidad para el desarrollo de una terapia efectiva de reemplazo celular.

SUMMARY**Ph. D. candidate:** Yanel Andrea Volonté**Director:** Ph. D. Luis Enrique Politi**Co-director:** Ph. D. Olga Lorena German

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, Argentina, UNS-CONICET

Retinitis Pigmentosa (RP) and Age-related Macular Degeneration (AMD) are neurodegenerative diseases of the retina which are characterized by the progressive and irreversible loss of photoreceptor neurons (PRs). Both diseases are incurable, lead to loss of vision and lack effective treatment. A strategy to develop an adequate therapy involves the use of stem cells that are able to restore damaged tissue. However, retina regeneration requires solving many unexplored issues. One of them is poor regenerative activity of Müller glial cells (MGC) of the retina. Although these cells have been postulated as stem cells, they have limited effectiveness in mammals and are inefficient to recover lost PRs. Another issue is the reactive response of MGC, which occurs after damage to the retina and causes local chronic inflammation that affects the survival of regenerated neurons. In that regard, it has recently been claimed that retinoid X receptors (RXR) are inflammatory response modulators that could protect the neurons from neurodegenerative diseases of the central nervous system. However, little is known about the role they play in the retina.

Research into these diseases faces many ethical and practical challenges. Therefore, using *rd1* mice, an animal model of RP with a very specific mutation which causes death by apoptosis of PRs, is extremely useful to study the causes of poor regenerative capacity of the retina. For this purpose, we have used whole retinas and primary neural and MGC cultures from control and *rd1* mice. We have also studied and compared the proliferative activity of MGC and the expression of several stem cell markers, as well as the expression of RXR and their effect on neuronal survival and glial reactivity upon treatment with a synthetic agonist.

Results showed decreased *rd1* MGC stem cell markers. Remarkably, the expression of one of these, *Nestin*, could be reverted by co-culturing of *rd1* MGC with control neurons (*wt*), which suggests an alteration in neuroglial

communication. Furthermore, using the RXR synthetic agonist PA024 delayed death of PRs and decreased glial reactivity in *rd1* retina cultures.

In sum, throughout this thesis we have presented evidence that in *rd1* retinas there is an alteration in neuroglial communication which could affect the regenerative potential and trigger a reactive response of MGC. Additionally, we found that MGC reactivity and death of PRs in *rd1* retinas could be reduced by means of a RXR agonist.

These results suggest that regenerative potential of MGC could depend on their interaction with healthy neurons, that neuroglial communication could be affected when neurodegenerative processes of the retina take place, and that RXR could partially regulate inflammatory processes and neuronal survival in the retina. These findings could prove useful for the development of an effective cellular replacement therapy.

ÍNDICE

<i>PREFACIO</i>	03
<i>DEDICATORIA</i>	04
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	05
<i>RESUMEN</i>	07
<i>SUMMARY</i>	09
<i>INDICE</i>	11
<i>ABREVIATURAS</i>	15
<i>INTRODUCCIÓN</i>	16
La Retina: Modelo del desarrollo del sistema nervioso	18
Proceso de formación de la retina y nacimiento de los distintos tipos celulares en roedores	22
Las células gliales de Müller en la retina	24
Rol de los receptores X para retinoideos en enfermedades neurodegenerativas de la retina	29
<i>OBJETIVOS Generales y Específicos</i>	33
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	34
Animales	35
Materiales empleados	35
Cultivos primarios de retina	37
Cultivos mixtos neuro-gliales de retina	37
Cultivos neuronales puros de retina	38
Cultivos gliales puros de retina	38
Co-cultivos neuro-gliales	39
Identificación de los tipos neuronales y gliales en los cultivos	41
Ensayos generales de inmunocitoquímica	42
Evaluación de la supervivencia celular	42
Evaluación de la proliferación mediante la incorporación y detección del nucleótido BrdU	43
Tratamiento con agonista del receptor RXR	44
Extracción de retinas enteras	44
Cortes histológicos	45
Ensayos generales de inmunohistoquímicas	45
Detección de ARNm	46
Aislamiento de ARNm	46

Reacción de transcripción reversa	46
PCR cuantitativa	46
Citometría de flujo	47
Microscopia	48
Análisis de imágenes	48
Análisis estadístico	49
Tabla 1. Anticuerpos primarios	50
Tabla 2. Anticuerpos secundarios	50
Tabla 3. Primers	51
RESULTADOS	52
CAPITULO I	53
Los cultivos primarios de retinas <i>rd1</i> reprodujeron un patrón de muerte de los FRs semejante al ocurrido en las retinas <i>rd1</i> in vivo	54
Los cultivos primarios mixtos neuro-gliales de retinas <i>rd1</i> mostraron un mayor número de neuronas por célula glial.....	58
Las CGM <i>rd1</i> mostraron una capacidad proliferativa reducida.....	60
Expresión de N-CADHERINA en las CGM <i>wt</i> y <i>rd1</i>	62
Las CGM <i>rd1</i> mostraron alteraciones nucleares.....	64
Las CGM <i>rd1</i> en cultivo mostraron una disminución en la expresión de marcadores de multipotencialidad.....	66
Los marcadores de multipotencialidad disminuyeron su expresión en las retinas <i>rd1</i> in vivo.....	68
Efecto de la interacción con neuronas en la expresión de NESTINA.....	74
CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO I	78
DISCUSIÓN Capítulo I	80
Respuesta de las CGM frente a la degeneración de los FRs	82
CAPITULO II	88
La expresión de GFAP aumentó en las retinas y cultivos primarios mixtos neuro-gliales <i>rd1</i>	89
Alteraciones en la expresión del receptor RXR α en retinas <i>rd1</i> y de las isoformas α , β y γ en cultivos mixtos neuro-gliales <i>rd1</i>	92

Efecto protector del agonista sintético de los RXR, PA024	95
<i>CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO II</i>	99
<i>DISCUSIÓN Capítulo II</i>	100
Rol de los RXR en las enfermedades neurodegenerativas de la retina	101
Efectos del agonista sintético de los RXR, PA024, en los cultivos mixtos neuro-gliales	103
<i>CONCLUSIONES GENERALES</i>	105
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	106
<i>PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS</i>	117

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADH: Ácido DocosaHexaenoico

BAX: *Bcl-2-Associated X protein*

BrdU: 5'-Bromo-2'-deoxyUridina

CG: Capa de células Ganglionares

CGM: Célula Glial de Müller

CNE: Capa Nuclear Externa

CNI: Capa Nuclear Interna

CPE: Capa Plexiforme externa

CPI: Capa Plexiforme Interna

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

FR/s: Fotorreceptor/es

GFAP: Proteína ácida fibrillar glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GS: Glutamina Sintasa

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

PBS: Buffer Fosfato Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PF: Paraformaldehído

PN: Postnatal

rd1: retinal degeneration 1

RP: Retinitis Pigmentaria

RXR: Receptor X de Retinoideos (*Retinoid X Receptor*)

SFB: Suero Fetal Bovino

SNC: Sistema Nervioso Central

SOX2: *Sex determining region Y-box 2*

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling assay*

wt. wild type

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC) conducen a la pérdida de funciones neurológicas específicas en forma progresiva e irreversible y se caracterizan por la muerte de un tipo neuronal determinado en forma selectiva. Como ejemplos de estas patologías podemos mencionar la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, y en la retina, la Retinitis Pigmentaria (RP) y la Degeneración Macular Asociada a la Edad (AMD). Estas últimas afectan principalmente la capa de neuronas fotorreceptoras y conducen a la pérdida gradual de la visión hasta ocasionar ceguera; ambas enfermedades son de alta prevalencia y su incidencia afecta a diferentes grupos etarios. Además, las mismas no son curables y sus tratamientos, cuando existen, son poco efectivos. En los últimos años se han desarrollado importantes herramientas de diagnóstico y tratamientos para las mismas, no obstante, aún no se han dilucidado los mecanismos a través de los cuales actuar para detener o evitar completamente su avance. Por otro lado, si bien tienen orígenes muy diversos, entre los cuales se destacan mutaciones genéticas y/o factores ambientales desencadenantes, como son el estrés oxidativo, la agregación de proteínas y la inflamación (Farrar, Kenna, and Humphries 2002; Shen et al. 2005), todas culminan con la muerte de los FRs por apoptosis (Comitato et al. 2014; Dunaief et al. 2002; Marigo 2007; Portera-Cailliau et al. 1994).

Dentro de las estrategias actuales para tratarlas o eventualmente curarlas, se encuentran por un lado las orientadas a interferir con los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de muerte celular, y por otro las orientadas a reemplazar las neuronas eliminadas a través de la utilización de células madre (Lindvall and Kokaia 2010; Marchetti et al. 2010; Reh 2016). Si bien en los mamíferos la capacidad de regeneración se encuentra limitada, existen células en la retina, como las células gliales de Müller (CGM) o células del margen ciliar, que cuentan con este potencial pero que frente a una enfermedad neurodegenerativa como la RP no logran restaurar la población neuronal eliminada o lo hacen a un ritmo muy lento e insuficiente para restablecer la visión. A partir de esto surge el interrogante, aún poco explorado, de si estas células, propuestas como células madre, en el contexto de un proceso neurodegenerativo presentan características diferentes de aquellas que podemos encontrar en una retina sana.

El estudio de estas enfermedades en humanos presenta diversas limitaciones éticas y prácticas. Afortunadamente existen numerosos modelos

animales de las enfermedades neurodegenerativas de la retina que posibilitan evaluar terapias para el tratamiento de las mismas (Chang et al. 2002). Uno de los animales más usados como modelo de estas enfermedades es el ratón *rd1* (*retinal degeneration 1*), el cual fue utilizado en este trabajo de tesis.

Estos animales presentan una mutación en la GMP cíclico fosfodiesterasa beta (*Ped6β*), que normalmente forma un heterotetrámero con una subunidad PED6α y dos PED6γ. La mutación en la subunidad beta no permite que catalicen la conversión de GMPc a 5´GMP por lo que se acumula GMPc en las células. Esto último conduce a un aumento del calcio y sodio intracelular evitando que ocurra la fototransducción y culminando, al igual que en su contraparte humana, en una pérdida selectiva e irreversible de los FRs por apoptosis. Este modelo cuenta con la ventaja de que la degeneración es muy rápida, ya que el pico de muerte comienza a los 10 días de vida del animal y en el término de un mes pierden completamente la capa de la retina que corresponde a estas neuronas (Farber, Flannery, and Bowes-Rickman 1994; Kalloniatis et al. 2015). Por el contrario, en los animales *wt*, a este tiempo, la retina se halla completamente desarrollada (LaVail and Sidman 1974). Todas estas características hacen de este animal un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos de neurodegeneración de la retina y para la investigación de terapias que permitan retrasar o evitar este proceso.

La retina: modelo del desarrollo del sistema nervioso

La retina constituye una capa de tejido neural que se halla en la zona posterior del ojo. Este tejido presenta una citoarquitectura laminar compuesta por células gliales y seis tipos neuronales principales. La diversidad de tipos celulares proviene de un progenitor común que es capaz de generarlos en respuesta a diversos estímulos, intrínsecos y extrínsecos. Debido a su relativa simplicidad, accesibilidad y a que los distintos tipos celulares están organizados formando un tejido altamente estructurado, la retina ha sido ampliamente utilizada como modelo de estudio del desarrollo del SNC, y es por ello la estructura neural más estudiada y adecuada para este trabajo de tesis.

Los seis tipos neuronales de la retina de vertebrados son: los fotorreceptores (conos y bastones) y las neuronas bipolares, ganglionares, horizontales y

amacrinas. Las células fotorreceptoras convierten la información luminosa en señales químicas y eléctricas que son enviadas a las interneuronas bipolares de la retina interna. A su vez, éstas transmiten las señales desde la retina externa hacia la retina interna, transmisión que es modulada por las neuronas horizontales. En la retina interna, las neuronas bipolares establecen contactos con las células ganglionares y con las interneuronas amacrinas. Estas últimas modulan las señales provenientes tanto de las neuronas bipolares como de las células ganglionares. La información luego es transmitida desde la retina hacia el cerebro a través del nervio óptico, constituido por los axones de las células ganglionares.

Además de los tipos neuronales antes mencionados, otro tipo celular que compone la retina corresponde a las células gliales, de las cuales existen diversos tipos, de orígenes embrionarios diferentes. Las CGM, que constituyen el tipo glial mayoritario, se extienden a través de todo el espesor de la retina y son responsables de proveer soporte estructural y funcional a las neuronas de este tejido (Bringmann et al. 2006; de Melo Reis *et al.* 2008). Otro tipo de célula glial lo constituyen los astrocitos, de diferente origen embrionario, que se encargan de recubrir los vasos sanguíneos en las capas fibrosas y el nervio óptico (Stone and Dreher 1987; Watanabe and Raff 1988); y la microglia (Chen, Yang, and Kijlstra 2002), originaria de la línea hematopoyética monocítica, responsable de la fagocitosis en todas las capas de la retina.

Las células de la retina adquieren una organización en láminas o capas donde se ubican los cuerpos celulares o las conexiones neurales. Existen tres capas de núcleos o cuerpos celulares (Capas Nucleares): la correspondiente a los FRs, denominada Capa Nuclear Externa (CNE), la que corresponde a neuronas bipolares, amacrinas, horizontales y cuerpos de las CGM, denominada Capa Nuclear Interna (CNI), y la capa de las Células Ganglionares (CG). Además, existen otras dos capas de conexiones que constituyen la Capa Plexiforme Externa (CPE) y la Capa Plexiforme Interna (CPI).

En el exterior de la retina se ubica una capa de células epiteliales, el Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR), y desde esta capa hacia el interior encontramos los segmentos externos e internos de los FRs, y luego las distintas capas nucleares y de conexiones mencionadas (Hoon et al. 2014; Sernagor et al. 2006; Wallace 2011) (**Fig. 1**).

La retina, en comparación con otros tejidos neurales, presenta una organización más sencilla, mejor caracterizada y experimentalmente más accesible. Esto, sumado al hecho de que es no-esencial para la vida permite la manipulación de genes del desarrollo que no podría hacerse en otras regiones del cerebro ya que serían letales. Por todo ello, la retina, es considerada un poderoso modelo para estudiar los mecanismos que regulan los procesos del desarrollo del SNC, así como también el comportamiento, frente a un daño o enfermedad, de los distintos tipos celulares que la conforman.

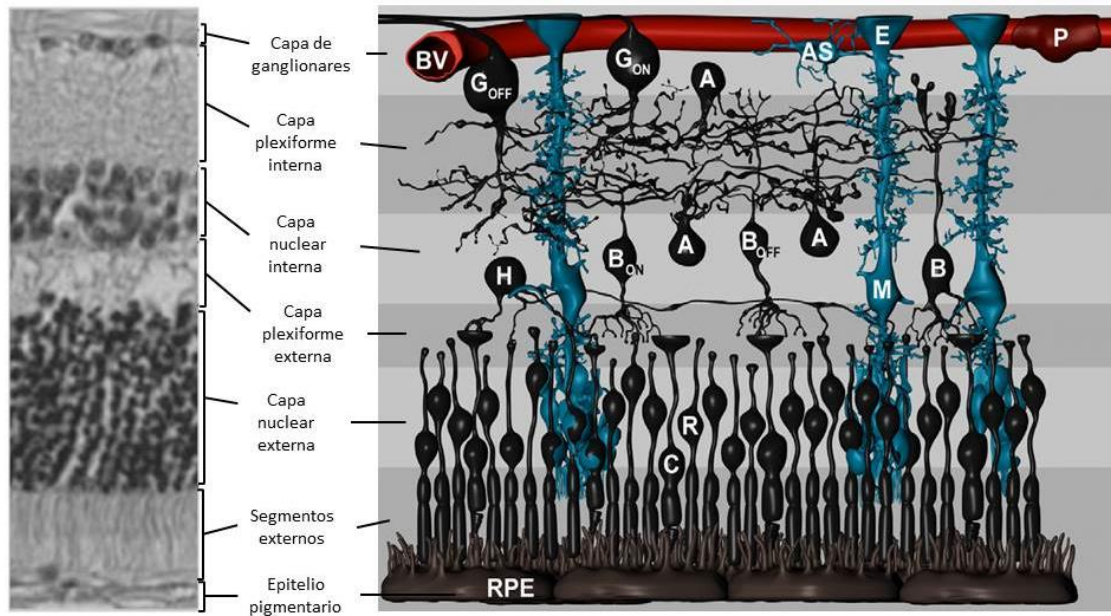


Figura 1. Estructura de la retina adulta de vertebrados. En la fotomicrografía y en el esquema se observan los distintos tipos neuronales: ganglionares (G), amacrinas (A), bipolares (B), horizontales (H), conos (C) y bastones (R), y las distintas capas que se pueden distinguir en una retina adulta: Capa de células ganglionares (CCG), Capa plexiforme interna (CPI), Capa nuclear interna (CNI), Capa plexiforme externa (CPE), Segmentos Externos de fotorreceptores (SE) y el Epitelio Pigmentario de la retina (RPE). Otras referencias: vaso sanguíneo (BV), astrocito (AS), pericito (P), pie final de las CGM (E). Modificado de Bringmann et al. 2009.

Proceso de formación de la retina y nacimiento de los distintos tipos celulares en roedores

Las primeras células postmitóticas en aparecer, luego de la proliferación de un grupo de progenitores celulares del neuroepitelio retinal durante la embriogénesis, son las células ganglionares las cuales son seguidas por la aparición de los conos, células horizontales y células amacrinas. Los bastones, células bipolares y las células gliales de Müller se desarrollan en una segunda etapa posnatal (PN). La fase proliferativa del desarrollo retinal en ratones culmina aproximadamente al día PN7 y es seguida por un período de formación de sinapsis y remodelación, muerte celular y maduración morfológica de los FRs hasta el día PN21 (**Fig. 2**).

Durante su desarrollo, los progenitores, pasan por una serie de estados de competencia que determinarán el subconjunto de tipos celulares a los cuales darán origen, a esto se lo conoce con el nombre de “Modelo de Competencia” (Livesey and Cepko 2001). Estos estados por los cuales pasan las células progenitoras están determinados por factores internos o intrínsecos que establecen el destino celular y por señales extrínsecas o ambientales que pueden variar durante el desarrollo. El conjunto de estos factores permite la aparición de los distintos tipos celulares diferenciados a partir de un conjunto restringido de progenitores. Además diversos factores tróficos, neurotransmisores y la actividad eléctrica influyen en la supervivencia de las células retinianas (Linden and Reese 2006).

Durante el desarrollo de la retina, muchas de las células generadas sufren un proceso de muerte celular programada altamente controlado que permite establecer el tamaño de la población celular del tejido, eliminando las células que se encuentren en exceso. Este proceso ocurre en 2 fases, una fase temprana que acompaña la neurogénesis, migración celular y diferenciación; y una fase tardía, que ocurre una vez que las conexiones neuronales son establecidas y las sinapsis formadas, eliminando aquellas defectuosas (Vecino, Hernández, and García 2004).

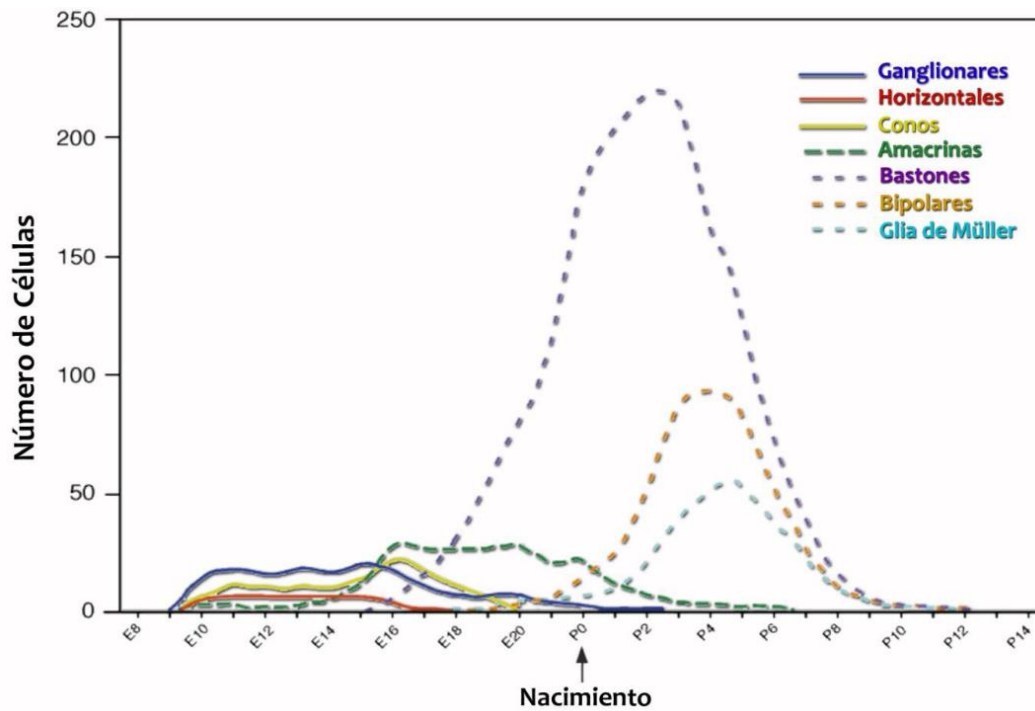


Figura 2. Nacimiento de los distintos tipos celulares de la retina. En el gráfico se muestra la secuencia del nacimiento de los distintos tipos celulares que componen la retina. Se observa que las células ganglionares, horizontales, conos y amacrinas nacen mayoritariamente durante el período embrionario, mientras que los bastones, bipolares y la glia de Müller lo hacen después del nacimiento. Modificado de Rapaport et al. 2004.

Las células gliales de Müller en la retina

Las células gliales dentro del SNC cumplen un importante rol en el mantenimiento de la homeostasis, participan en la angiogénesis y son responsables de la inmunidad del SNC y de la neuroprotección. Como se mencionó anteriormente, en la retina de los vertebrados se pueden encontrar 3 tipos de células gliales: Astrocitos, Microglía y el tipo glial predominante en la retina, las CGM (Vecino et al. 2016). Estas últimas representan alrededor del 90% de las células gliales de la retina y ejercen sus funciones de mantenimiento adaptándose a los requerimientos de las neuronas vecinas. En sus extremos puede distinguirse la extensión de dos procesos diferentes: en la región de la membrana limitante externa, las CGM, extienden apicalmente microvellosidades entre los segmentos externos de los FRs, mientras que en la membrana limitante interna sobre la superficie con el cuerpo vítreo y la neuroretina se forma el llamado pie final (“*end-foot*”). A través de las capas nucleares extienden procesos lamelares que envuelven los cuerpos celulares de las neuronas. Los cuerpos celulares que contienen los núcleos de las CGM se ubican en la CNI (García and Vecino 2003; Vecino et al. 2016). Debido a esta disposición es que puede considerarse cada CGM como el corazón de una “microunidad” columnar de neuronas retinianas (Reichenbach and Robinson 1995). Esta posición estratégica permite a las CGM constituir un enlace funcional y anatómico con las neuronas que requiere de la interacción constante entre ambos tipos celulares y permite el intercambio de moléculas con los vasos sanguíneos, el cuerpo vítreo y el espacio subretinal (Bringmann et al. 2006). Este íntimo contacto entre ambos tipos celulares permite que, por ejemplo, neurotransmisores liberados por las neuronas puedan promover en las células gliales la liberación de glutamato, ATP u otras sustancias neuroactivas que podrían actuar estimulando directamente a neuronas post-sinápticas (Reichenbach and Bringmann 2013).

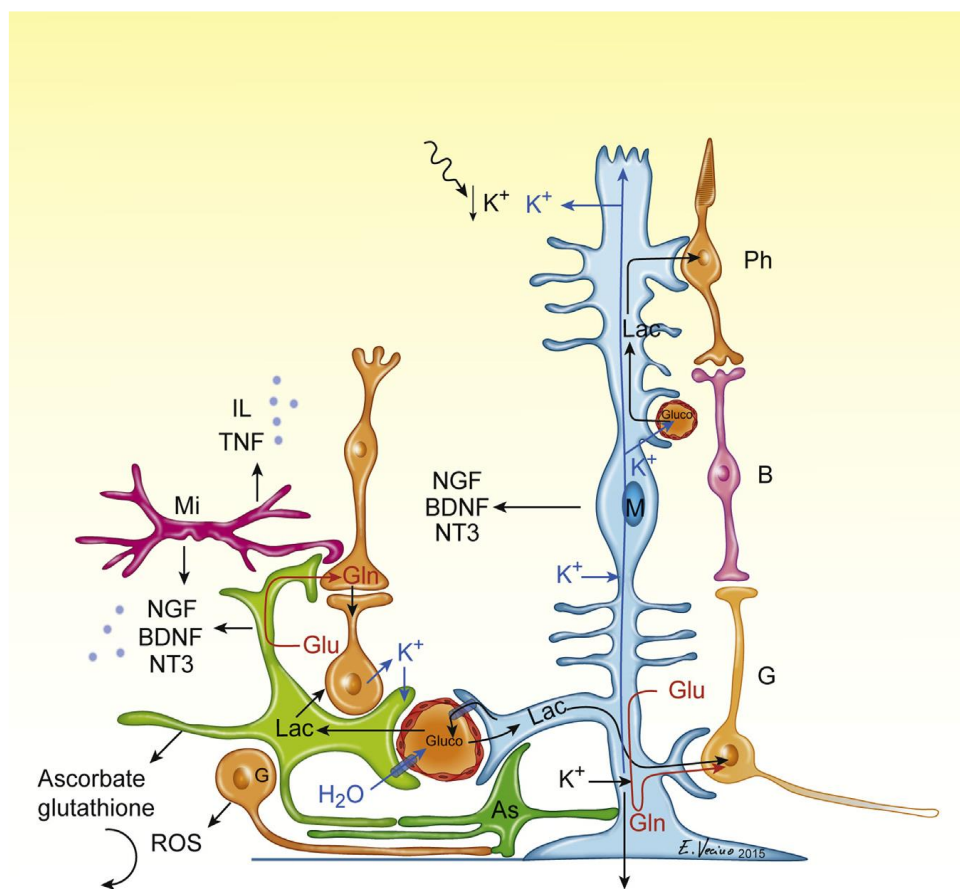


Figura 3. Interacción de las células gliales de Müller con las neuronas fotorreceptoras. En el esquema se muestra la participación de las CGM en el metabolismo de la glucosa, en la conversión de glutamato (Glu) a glutamina (Gln), en la secreción de factores tróficos e interleuquinas y en la homeostasis del K^+ y H_2O . As: astrocitos, B: células bipolares, G: células ganglionares, M: células gliales de Müller, Mi: microglia, Ph: fotorreceptoras. Vecino et al. 2016

Las CGM son muy resistentes a diversos daños como la hipoxia, isquemia e hipoglucemia y dentro de sus funciones más relevantes podemos mencionar que participan de la organización celular durante el desarrollo de la retina favoreciendo el establecimiento de los circuitos neuronales y mantienen la sinapsis a través del reciclado de neurotransmisores, como GABA y glutamato, evitando su acumulación y efecto neurotóxico. Además, son responsables del mantenimiento de la homeostasis del agua y del K⁺ y actúan en la defensa frente a radicales libres y en la detoxificación de restos celulares mediante su fagocitosis. Todas estas funciones son parte del efecto neuroprotector de estas células gliales (Bringmann et al. 2006) (**Fig. 3**). Además, junto a las células ganglionares, la microglía y los astrocitos, las CGM son las principales células involucradas en los mecanismos de defensa de la retina necesarios para mantener el inmunoprivilegio en este tejido, sumado a la multitud de mecanismos que operan en el ojo para evitar que sustancias extrañas provoquen algún tipo de inflamación.

Bajo condiciones patológicas de la retina, las CGM, pueden activarse o reactivarse, esta reacción se la conoce con el nombre de gliosis y forma parte de la compleja respuesta retiniana frente a un estímulo patológico, respuesta que también implica la activación microglial y alteraciones en la vasculatura entre otros (Harada et al. 2002). El proceso gliótico es una respuesta no específica frente al daño, implica alteraciones en las CGM que provocan la pérdida de la normal interacción glía-neurona y, en general, se caracteriza por una alta proliferación de las CGM y cambios morfológicos con alteraciones en la expresión de distintos filamentos intermedios, siendo característico un incremento en la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) (Hernández et al. 2010; Roesch et al. 2012; Vecino et al. 2016). Una respuesta gliótica temprana frente a un daño tiene un efecto beneficioso para las neuronas ya que se liberan factores neurotróficos a la vez que evita la propagación del daño. Por el contrario, cuando este proceso se encuentra avanzado tiene efectos negativos para las neuronas ya que las CGM no pueden cumplir con sus funciones habituales de mantenimiento, se tornan incapaces de remover el exceso de neurotransmisores y de mantener la homeostasis de agua e iones, por lo que se favorece la muerte neuronal y el establecimiento de un microambiente perjudicial para procesos como la regeneración (Bringmann et al. 2006, 2009; García and Vecino 2003; Vecino et al. 2016). Además, el proceso gliótico desarrollado por las CGM participa activamente

en el establecimiento de un estado de inflamación crónica que recientemente se ha visto involucrado en la iniciación y/o progreso de patologías neurodegenerativas (Amor et al. 2010; Griffin 2006; Yoshida et al. 2013).

Como consecuencia de la activación glial se produce el reclutamiento de la microglia hacia la retina y tanto esta como las CGM secretan citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (de Kozak et al. 1994, 1997; Tezel and Wax 2000; Zeng et al. 2005) y la proteína quimioattractante de los monocitos 1 (MCP-1). Estos factores promueven la infiltración por células del sistema inmune provocando un mayor daño al tejido e inflamación crónica, contribuyendo así a la alteración del microambiente en la retina.

En adición a las funciones de las CGM ya mencionadas se suman investigaciones, desde hace poco más de una década, que proponen a las CGM como células madre dentro de la retina (Das et al. 2006; Fischer and Reh 2001, 2003). En respuesta a una injuria las CGM pueden desdiferenciarse, proliferar y generar progenitores neuronales que migren a la zona dañada y se diferencien en el tipo celular perdido (Abrahan et al. 2009; Giannelli et al. 2011; Jayaram et al. 2014; Sanges et al. 2016; Wan and Goldman 2016).

Los programas regenerativos se encuentran altamente conservados en vertebrados de sangre fría, mientras que en los de sangre caliente son más restringidos y el fenotipo neuronal se asocia solo a la expresión de algunos marcadores neuronales y a la expresión de neurofilamentos (Fischer and Reh 2001, 2003; Ooto et al. 2004). Si bien se han identificado diversos marcadores en las CGM que indicarían un fenotipo regenerador (Abrahan et al. 2009; Roesch et al. 2008; Vecino et al. 2016), en la retina de mamíferos esta capacidad se encuentra restringida. Dentro de estos marcadores se pueden mencionar: la expresión de *Nestina*, filamento intermedio utilizado como marcador de células madre multipotenciales neuroectodérmicas (Lendahl, Zimmerman, & McKay, 1990; Park et al. 2010), *Vimentina* (Boraas et al. 2016) también filamento intermedio y el factor de transcripción nuclear *Sox2* (Surzenko et al. 2013). Alteraciones en algunos de estos marcadores, como en la proliferación de las células madre, se han visto asociadas a procesos neurodegenerativos (Ferri et al. 2004; Valamanesh et al. 2013) por lo que decidimos incluirlos en el presente estudio.

Un factor importante que interviene en el mantenimiento de la capacidad proliferativa es la lámina nuclear, cuya integridad y estabilidad proveen soporte

estructural al núcleo y contribuyen a la organización del ADN. La lámina nuclear se compone de 3 tipos de filamentos diferentes denominados: lamina A, lamina B y lamina C, los cuales conforman una red que se extiende bajo la envoltura nuclear contribuyendo a la morfología del núcleo. Dada su asociación con la organización estructural de la cromatina (Chojnowski et al. 2015), también investigamos si alteraciones en la lámina nuclear de las CGM afectaban la reproducción celular de las mismas.

En la actualidad, es ampliamente reconocido el potencial uso de las CGM para generar neuronas perdidas a partir de cultivos primarios de las mismas o de líneas celulares (Bringmann et al. 2009; Limb et al. 2002; Meyer et al. 2006; Monnin et al. 2007). Experiencias iniciales con células madre embrionarias demuestran la dificultad para lograr que se diferencien como FRs y evitar el desarrollo tumoral (MacLaren and Pearson 2007; Wang et al. 2010). El trasplante de progenitores multipotentes, limitados en su potencialidad a ser células de retina o progenitores indiferenciados de FRs, en modelos animales ha sido más promisorio, permitiendo la integración de nuevos FRs a la retina adulta o en degeneración, y mejorando la función visual (Jayaram et al. 2014; MacLaren et al. 2006; Tang et al. 2017). Sin embargo un problema a resolver es la supervivencia a largo plazo de estas células ya que la respuesta inmunológica e inflamatoria podría provocar su desaparición (Wallace 2011; West et al. 2010). En nuestro laboratorio se demostró que, en cultivos primarios de rata, la interacción de las CGM con células progenitoras hace que estas últimas mantengan la expresión de marcadores de células madre (Simón et al. 2012) por lo que la comunicación o “diálogo” entre ambos tipos celulares parecería ser la clave para el mantenimiento del potencial regenerativo.

En su conjunto estos antecedentes permiten formular la hipótesis de que la degeneración progresiva de los FRs en el ratón *rd1* afecta el “diálogo” entre neuronas y CGM alterando la potencialidad regenerativa de estas últimas.

Rol de los receptores X para retinoideos en enfermedades neurodegenerativas de la retina

Anteriormente mencionamos que uno de los enfoques terapéuticos para las enfermedades neurodegenerativas es el de lograr la disminución de la muerte neuronal. Esto podría llevarse a cabo utilizando factores tróficos, regulando sus vías de señalización o actuando sobre la población de CGM reactivas, modulando los mediadores del proceso inflamatorio con la consecuente promoción de la supervivencia neuronal (MacLaren et al. 2006; MacLaren and Pearson 2007; Moshiri et al. 2004).

Dentro de las vías de señalización objeto de blancos terapéuticos podemos mencionar a aquellas que involucran a los receptores nucleares. En los últimos años se ha comenzado a explorar el rol de estos receptores, en particular de los receptores X para retinoideos (RXR), en enfermedades neurodegenerativas del SNC, ya que estos receptores poseen efectos pleiotrópicos que podrían promover la supervivencia neuronal regulando directa o indirectamente el proceso inflamatorio.

Los RXR pertenecen a la superfamilia de receptores esteroidales/tiroideos, que se encuentran involucrados en numerosos procesos celulares, como la proliferación celular y el metabolismo lipídico, son esenciales para el normal desarrollo del ojo (Mori et al. 2001). Estos receptores actúan como factores de transcripción que se unen a elementos respuesta del ADN luego de formar homo o heterodímeros con otros miembros de esta misma familia, mediando el efecto biológico de varias hormonas, vitaminas y drogas. Esta complejidad, junto con la existencia de tres subtipos de RXR (α , β y γ), explican sus efectos pleiotrópicos (Mori et al. 2004) (**Fig. 4**).

En modelos de la enfermedad de Parkinson, ligandos de los RXR rescatan a las neuronas dopaminérgicas de la degeneración causada tanto por la 6-OH dopamina como por hipoxia. También es factible esperar un rol de los RXR en la homeostasis ocular; ratones *knockouts* para combinaciones de los receptores retinoideos muestran una elevada anormalidad ocular (Grondona et al. 1996; Kastner et al. 1997).

Además, la retina está altamente enriquecida en lípidos, en particular ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) de la familia n-3 y entre éstos, el ácido docosahexaenoico (ADH). Este ácido graso es el más abundante en la retina y en los FRs (Fliesler and Anderson 1983), y es un ligando para los RXR como se demostró en cerebro de ratón (de Urquiza et al. 2000). Un adecuado nivel de ADH es esencial para el normal mantenimiento de la estructura y función de la retina ya que múltiples estudios han mostrado la reducción de los niveles de ADH en la sangre de pacientes con RP (Hoffman and Birch 1995; Seddon, Cote, and Rosner 2003) y también en la retina y en los segmentos externos de los FRs en modelos animales de dicha patología.

Nuestro laboratorio ha propuesto al ADH como un factor trófico de los FRs; al respecto se demostró que promueve la supervivencia de los FRs frente al daño oxidativo y su diferenciación (N P Rotstein et al. 1996, 1997; N P Rotstein, Politi, and Aveldaño 1998; Nora P Rotstein et al. 2003), se ha establecido también que la activación de los RXR es esencial para el efecto protector del ADH en los FRs y que agonistas sintéticos de los RXR mimetizan dicho efecto protector (German et al. 2013). Ésta es la primera evidencia que agonistas de los RXR, distintos del ADH, protegerían a los FRs en cultivo del daño oxidativo. Este hallazgo es de gran interés desde el ángulo terapéutico y farmacológico ya que debido a la alta susceptibilidad a la peroxidación del ADH sería de suma relevancia poder recurrir a agentes más estables que mimetizaran el efecto protector de este ácido graso. Asimismo, también adquiere importancia el estudio de la expresión y la localización de los RXR en las enfermedades neurodegenerativas ya que en ensayos clínicos donde pacientes humanos recibieron ADH, solo un subgrupo respondió positivamente a dicha suplementación (Berson *et al.* 2004a; Berson *et al.* 2004b). Por lo cual además de la posible generación de productos de oxidación tóxicos del ADH, la falta de respuesta positiva en un grupo de estos pacientes podría deberse a una expresión o una localización alterada de los RXR.

Estos receptores podrían tener también un rol relevante en el enfoque inmunomodulador para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. El tratamiento con bexaroteno, agonista sintético de los RXR ha mostrado la disminución de la inflamación y la eliminación del péptido β amiloide por las células microgliales en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer (Cramer et al. 2012). Por su parte, en un modelo murino de esclerosis múltiple el 9-cis ácido

retinoico (AR) (ligando endógeno de los RXR) mostró poseer un efecto anti-inflamatorio sobre la microglía. Finalmente, una combinación de 9-cis AR y agonistas de otros receptores nucleares, como los PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), inhiben la expresión de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IL-1 β , TNF α e IL-6 (Xu et al. 2005).

La participación de los RXR en el mantenimiento de la funcionalidad y de la capacidad inmunomoduladora de las CGM de la retina es poco conocida. La activación de los PPAR gamma, mediante un ligando específico, disminuye la activación de las CGM y la expresión de la proteína GFAP en un modelo de corte del nervio óptico de rata (Zhu et al. 2013). Dado que los PPAR forman heterodímeros obligados con los RXR, la activación de éstos últimos también podría modular la expresión de la proteína GFAP.

A partir de lo expuesto, nos planteamos como siguiente hipótesis que la activación de los RXR ya sea en las neuronas fotorreceptoras, en las CGM o en ambas podría retrasar la muerte neuronal, disminuir la reactividad glial y generar un microambiente que favorezca una posible terapia con células madre.

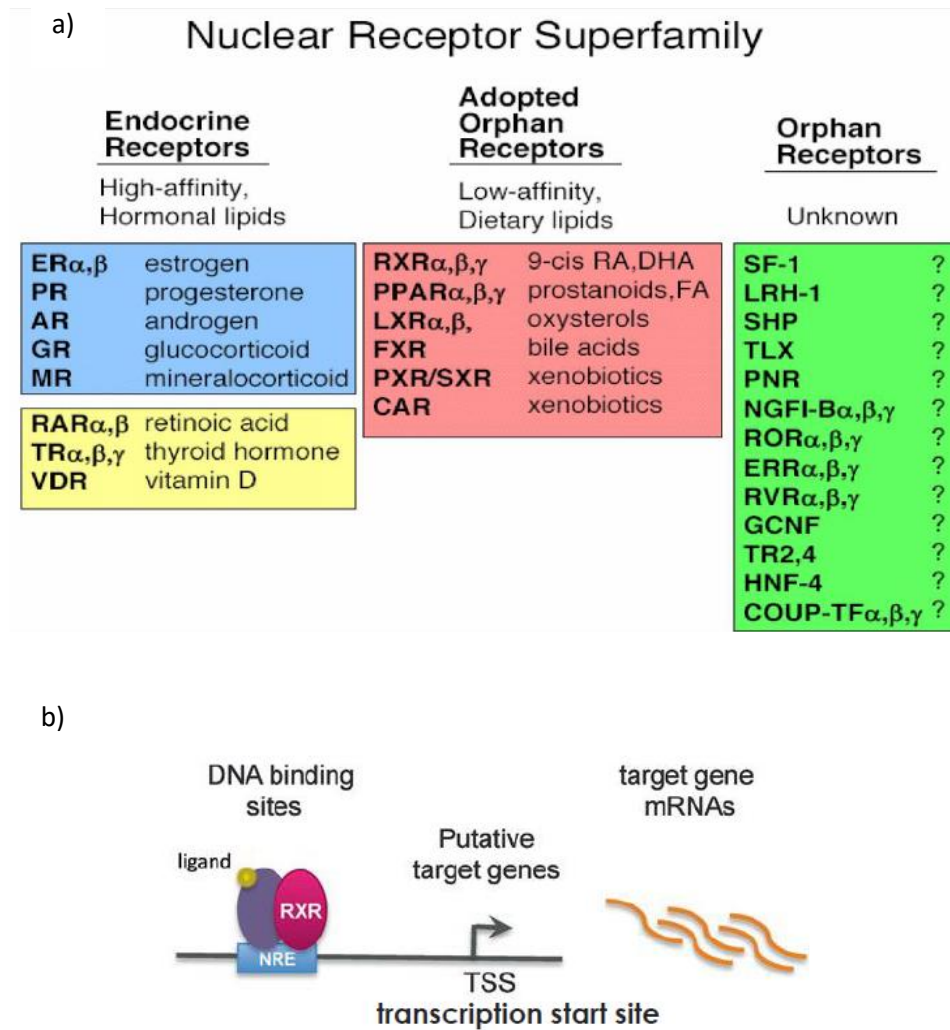


Figura 4. Receptores X para retinoideos (RXR). En a) se muestran los distintos tipos de receptores nucleares y sus ligandos. En el esquema b) se muestra el mecanismo de acción de los RXR. *Modificado de Gilardi and Desvergne, 2014.*

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes hasta aquí mencionados, los **objetivos generales** de la presente tesis fueron:

1. Determinar si existen alteraciones en el potencial regenerativo de las células gliales de Müller de ratones *rd1*, portadores de una neurodegeneración retiniana.
2. Evaluar si el uso de un agonista sintético de los receptores nucleares RXR permite disminuir la muerte de neuronas fotorreceptoras y la reactividad glial.

Para ello nos propusimos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar si la degeneración neuronal en cultivos primarios de retinas de ratones *rd1* sigue un patrón similar a lo que ocurre en la retina *in vivo* de estos mismos animales.
2. Investigar, tanto en cultivo como *in vivo*, si existen alteraciones en marcadores de multipotencialidad de las CGM de ratones *rd1* comparando su expresión con la de CGM de ratones normales.
3. Investigar si existen alteraciones en la comunicación neuro-glial en cultivos de retinas de ratones *rd1* y establecer sus posibles efectos sobre el potencial regenerativo de las CGM.
4. Determinar si en las retinas y en cultivos primarios de retina de ratones *rd1*, aumenta la expresión del filamento intermedio GFAP.
5. Investigar si existen modificaciones en la expresión y localización de los receptores RXR en retinas de ratones *rd1*.
6. Investigar si el agonista sintético de los RXR, PA024, previene la muerte de los FRs y reduce la reactividad glial, en cultivos primarios de retinas *rd1*.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

ANIMALES

Para llevar a cabo este trabajo de tesis se utilizaron ratones control de la cepa C57BL/6J (*wt*), adquiridos en el bioterio de la Universidad de La Plata y ratones C57BL/6J-*Pde6b*^{rd1-2J}/J (*rd1*), comprados en Jackson Laboratory (Maine, EE. UU.). Los ratones fueron criados en el bioterio del INIBIBB. Todos los procedimientos concernientes a la manipulación de animales se realizaron de acuerdo con las normas internacionales vigentes y con aprobación del protocolo de trabajo por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de la Universidad Nacional del Sur (053/2015, 058/2015, 059/2015, 060/2015).

MATERIALES EMPLEADOS

Las cápsulas plásticas para cultivo celular de 35 y 60 mm y las pipetas plásticas de cultivo graduadas de 10 y 2 ml fueron compradas en Greiner Bio-One (GBO).

El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido en Laboratorios Natocor. El medio de cultivo Dulbecco modified Eagle`s (DMEM), el buffer *Hank`s Balanced Salt Solution* (HBSS), la enzima colagenasa tipo II, el glicógeno y los *random primers* pertenecen a la firma GIBCO y se compraron en Invitrogen Argentina.

En la empresa Sigma-Aldrich Argentina se adquirieron la poli-L-ornitina, tripsina, inhibidor de tripsina, transferrina, hidrocortisona, putrescina, insulina, CDP-colina, CDP-etanolamina, gentamicina, la sonda 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y paraformaldehído (PF).

Los anticuerpos primarios monoclonales anti-NESTINA (clon Rat-401), anti-VIMENTINA (clon 40E-C) y anti-Bromo-deoxi-uridina (BrdU, clon G3G4) fueron comprados en Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB perteneciente a la universidad de Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242). En la empresa ABCAM se adquirieron también los siguientes anticuerpos: anti-CRALBP, anti-GS, anti-SOX2 y anti-NESTINA. El anticuerpo monoclonal anti-GFAP fue adquirido en Cell-signaling. El anticuerpo monoclonal RXR α y su correspondiente péptido bloqueante y el anticuerpo anti-N-CADHERINA corresponden a la empresa Santa Cruz. El anticuerpo para reconocer el factor de

transcripción nuclear CRX fue donado por la Dra. Cheryl M. Craft (University of Southern California) y el anticuerpo anti-Rho4D2 por el Dr. R. Molday (University of British Columbia). Los anticuerpos secundarios conjugados con Cy2 y Cy3 especie anti-ratón y anti-conejo fueron comprados en Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). En la tabla 1 se encuentran las especificaciones para cada anticuerpo primario y en la tabla 2 para los anticuerpos secundarios.

La sonda CellTracker® fue adquirida en Thermo Fisher Cientific y la sonda TO-PRO™-3 Iodide, la enzima terminal deoxynucleotidyl transferasa (Tdt), el nucleótido recombinante 5-bromo-2-deoxyuridine-5-triphosphate (BrdUTP) y el buffer para la enzima TdT fueron comprados en Molecular Probes (Eugene, OR).

Para realizar la extracción de ARNm se utilizó el reactivo Quickzol de Kalium technologies (Embiotec), la enzima transcriptasa reversa para la reacción de obtención de ADNc M-MLV se adquirió en Promega al igual que el inhibidor de ribonucleasas. Los nucleótidos utilizados son de la empresa Thermo Scientific y los *primers* utilizados para la reacción de qRT-PCR fueron adquiridos en la empresa Sigma-Aldrich. En la tabla 3 se encuentra el detalle de los *primers* utilizados.

El agonista sintético no comercial de los receptores RXR, PA024, fue donado por el Dr. Hiroyuki Kagechika de Tokyo Medical and Dental University, Japon.

Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC y el resto de los reactivos fue de grado analítico. El agua utilizada tanto para la preparación de los medios y buffers de cultivo como para biología molecular fue agua ultrapura Roux-Ocefa S.A.

CULTIVOS PRIMARIOS DE RETINA

Todos los cultivos presentados en esta tesis fueron realizados a partir de ratones *wt* y *rd1* de día PN 2 y 3 según se especifique.

1. Cultivos mixtos neuro-gliales de retina

La obtención de este tipo de cultivo, compuesto por CGM y neuronas de retina, en su mayoría FRs (>95%), se realizó a partir de ratones PN2, realizando pequeñas modificaciones a protocolos ya establecidos (Politi et al. 1996). En este caso, las retinas fueron disecadas separándolas del epitelio pigmentario y tejido conectivo y eliminando el humor vítreo, a continuación, se disgregaron primero de forma enzimática con tripsina (250 µl de tripsina 0,25% en 6 ml de HBSS, 8 minutos) y luego mecánicamente hasta obtener una suspensión celular en la cual, luego de sembrar en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % SFB, se observó la presencia de pequeños grumos (5-30 células/grumo). Estos grumos están compuestos por células progenitoras de retina y por neuronas en distintos niveles de diferenciación. Cabe destacar que las CGM derivan de progenitores tardíos, los cuales tras finalizar la mitosis originan tanto FRs como CGM (Turner and Cepko 1987). Luego de 2-3 días en cultivo, las CGM comienzan a extenderse por debajo de los grumos, formando una monocapa sobre la cual se ubican y desarrollan las neuronas (principalmente FRs y en segundo lugar neuronas amacrinas). Los cultivos fueron incubados a 36°C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO₂ con un recambio del medio de cultivo cada 3-4 días hasta la finalización del experimento. Los cultivos fueron tratados para realizar extracción de ARNm, fijados con PF 4% en PBS para realizar tinciones mediante técnicas de inmunocitoquímica o tratados para ser analizados por citometría de flujo. Para el estudio de los cultivos se eligieron los días 6 y 11. Si tenemos en cuenta los 2 días PN del ratón, los días 6 y 11 de cultivo se corresponden con los días 8 y 13 del desarrollo, momentos coincidentes con el inicio y el pico de la degeneración *in vivo*, respectivamente.

2. Cultivos neuronales puros de retina

Los cultivos neuronales se realizaron a partir de ratones PN2, *wt* y *rd1*, siguiendo protocolos descritos en nuestro laboratorio (Politi et al. 1996; Rotstein et al. 1996; Rotstein et al. 1997). Como primer paso las retinas fueron disecadas, separándolas del epitelio pigmentario y tejido conectivo y eliminando el humor vítreo. Luego se disociaron enzimáticamente incubándolas con una solución de tripsina (250 μ l de tripsina 0,25% en 6 ml de buffer HBSS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}) por 8 minutos a 36°C. A continuación, se retiró la solución de tripsina y se incubaron las retinas con 0,5 ml de solución de inhibidor de tripsina (0,25%) durante 2 minutos más. Finalmente, las células fueron lavadas y disociadas mecánicamente hasta obtener una suspensión celular homogénea en un medio químicamente definido. Las células fueron sembradas en cápsulas plásticas de 35 mm pre-tratadas, secuencialmente, con poli-ornitina (0,1 mg/ml) y medio condicionado de Schwannoma (Adler 1982). Los cultivos fueron incubados a 36°C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO_2 , y tratados para realizar extracción de ARNm y fijados con PF 4% en PBS para realizar tinciones mediante técnicas de inmunocitoquímica o utilizados para realizar co-cultivos neuro-gliales.

3. Cultivos gliales puros de retina

Los cultivos puros de CGM se obtuvieron siguiendo protocolos previamente establecidos (Hicks and Courtois 1990). Brevemente, se enuclearon ratones PN3 y los ojos se dejaron durante toda la noche en medio DMEM. Al día siguiente se trataron con una solución de tripsina (1 mg/ml) y colagenasa tipo II (2 mg/ml) por 10 minutos, tras lo cual se disecaron las retinas y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 mm³. A continuación los fragmentos de retina se sembraron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB y luego de 72 hs, estos se lavaron para remover los pequeños trozos de tejido adheridos a la cápsula. Los cultivos fueron incubados a 36°C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO_2 y el medio de cultivo fue rutinariamente reemplazado cada 3-4 días, previo lavado suave con el buffer HBSS. En estas condiciones se obtuvieron cultivos altamente purificados en CGM (contenido de CGM superior al 90%) que alcanzaron confluencia al cabo de 12-15 días. Los cultivos fueron tratados para

realizar extracción de ARNm, fijados con PF 4% en PBS para realizar tinciones mediante técnicas de inmunocitoquímica o utilizados para realizar co-cultivos neuro-gliales.

4. Co-cultivos neuro-gliales

Para la realización de los co-cultivos neuro-gliales se utilizaron cultivos neuronales de 3 días de desarrollo mantenidos hasta ese momento en el medio neuronal químicamente definido. Sobre estos cultivos neuronales se sembraron CGM obtenidas de cultivos gliales puros y se mantuvieron ambos tipos celulares en co-cultivo por 24 hs con medio DMEM suplementado con 10% de SFB en una atmósfera humidificada a 36 °C y con 5% de CO₂. Previo al agregado de las células gliales sobre los cultivos neuronales, se incubaron estos últimos con la sonda CellTracker® con el objetivo de poder marcar y diferenciar las neuronas provenientes del cultivo neuronal puro de aquellas que, eventualmente, pudieran provenir de cultivos gliales puros, que como se mencionó anteriormente, tienen un grado de purificación en CGM superior al 90%. Los co-cultivos fueron tratados para realizar extracción de ARNm o fijados con PF 4% en PBS para realizar tinciones mediante técnicas de inmunocitoquímica.

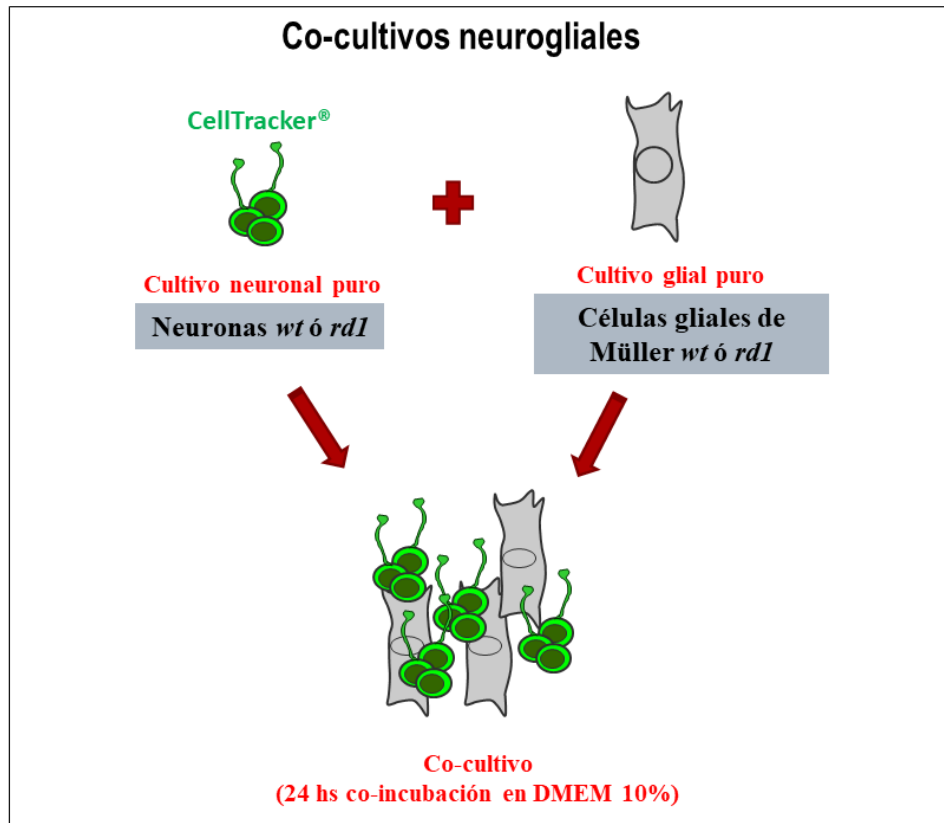


Figura 5. Co-cultivos neuro-gliales. Los cultivos neuronales puros fueron marcados con la sonda CellTracker®, co-cultivados con células gliales y mantenidas en contacto por 24 horas.

IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS NEURONALES Y GLIALES EN LOS CULTIVOS

En los cultivos neuronales y cultivos mixtos neuro-gliales se desarrollan mayoritariamente dos tipos neuronales, los FRs y las neuronas amacrin as. Ambos tipos celulares representaron más del 98% de las células en cultivo y fueron identificados mediante diversas técnicas de microscopía e inmunocitoquímica. Los FRs en cultivo presentaron un cuerpo celular redondeado y pequeño (5-10 μm), usualmente más oscuro (observando por microscopía de contraste de fase) que el de las neuronas amacrin as, con una única neurita, la cual usualmente mostró la presencia de una “esférula” sináptica en su extremo. En ocasiones presentaron el cilio conector (<20% de los FRs) en el extremo opuesto, y un escaso número también desarrolló un “proceso apical” (<10% de los FRs), que constituye un esbozo del segmento externo característico de los FRs maduros *in vivo*. Pudieron ser identificados mediante la marcación del factor de transcripción CRX, que en la retina marca selectivamente a los FRs luego de que sus progenitores abandonan el ciclo celular y por la proteína visual OPSINA, identificada con el anticuerpo Rho4D2, la cual se distribuye difusamente en el cuerpo celular y, en caso de presentar proceso apical se concentra también en esa estructura (De Genaro et al. 2013).

Por su parte, las neuronas amacrin as fueron más grandes (5-20 μm) que los FRs y mostraron múltiples neuritas en lugar de un único axón. Presentaron mayor heterogeneidad morfológica y expresaron la proteína SINTAXINA, reconocida por el anticuerpo HPC-1.

Las CGM fueron identificadas por su morfología plana e irregular por microscopía de fase, mostrando una variación de tamaño de entre 20 y 200 μm ; y por la expresión de marcadores característicos, entre ellos GLUTAMINA SINTASA (GS), CELULAR RETINALDEHYDE BINDING PROTEIN (CRALBP), GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN (GFAP) y VIMENTINA (VIM).

ENSAYOS GENERALES DE INMUNOCITOQUÍMICA

Los cultivos fueron fijados con PF al 4% en PBS, a temperatura ambiente durante 60 minutos, seguidos de una permeabilización con Tritón X-100 (0,1% en PBS) durante 10 minutos. Previo a la incubación con anticuerpos, las células fueron incubadas por 30 minutos con buffer Tris-NaCl con 0,1% Tween-20 (TNT) y 2% de leche descremada para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. A continuación, las células fueron incubadas con anticuerpos específicos dirigidos a diferentes proteínas o con sondas fluorescentes para marcar el ADN. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-conejo y anti-ratón, conjugados con fluoróforos verdes o rojos (Cy2 y Cy3 respectivamente). En todos los casos se realizaron controles de la técnica omitiendo el agregado de anticuerpos primarios, para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo secundario; y se utilizaron controles positivos y negativos de células que expresen o no la proteína a estudiar. Finalmente, los cultivos fueron analizados por microscopía de contraste de fase o fluorescencia.

EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

La supervivencia celular se evaluó a través de 3 parámetros:

1. Identificación de células apoptóticas analizando la integridad de los núcleos con la sonda nuclear DAPI, la cual se intercala con las bases nitrogenadas del ADN. Para ello, las células fueron fijadas con PF 4%, se permeabilizaron con 0,1% de Tritón X-100 en PBS, se lavaron con PBS e incubaron con DAPI 1 ug/ul durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las neuronas se consideraron apoptóticas cuando presentaron núcleos fragmentados, condensados o picnóticos.
2. Ensayo de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-end labeling assay*). Este ensayo permite detectar la fragmentación del ADN que ocurre durante el proceso apoptótico. Para la observación de fragmentación internucleosomal por la técnica de TUNEL, los cultivos fueron fijados con PF 4% durante 15 minutos a 4°C y almacenados en etanol 70% durante un mínimo de 72 hs y un máximo de 15 días a -20°C. Luego del período de fijación con etanol, las

células fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con PBS a temperatura ambiente y a continuación pre-incubadas con el buffer de la enzima TdT 1X por 15 minutos y luego con la mezcla de reacción, conteniendo el nucleótido trifosfato (BrdUTP 0,05 mM) y la enzima (TdT 0,3 U/ml) en su buffer correspondiente, durante 1 h a 37 °C en atmósfera humidificada. La reacción fue detenida con un “*stop buffer*” (NaCl 300 mM, citrato de sodio 30 mM, pH 7,4) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los controles negativos fueron realizados omitiendo la enzima TdT. La incorporación de BrdU al ADN fue determinada mediante inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal específico, de acuerdo con las técnicas estándar de inmunocitoquímica y realizando los controles correspondientes.

3. Expresión del ARNm de la proteína pro-apoptótica BAX (Bcl-2-associated X protein) (Comitato et al. 2014). La proteína BAX heterodimeriza con la proteína BCL-2 y funcionan como activadores de la apoptosis, por lo que la relación entre ambas es determinante para la supervivencia o muerte de la célula. Para evaluar la expresión de BAX, los cultivos fueron tratados para realizar la extracción del ARNm y luego por qRT-PCR se determinó su expresión (ver Detección de ARNm).

EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN MEDIANTE LA INCORPORACIÓN Y DETECCIÓN DEL NUCLEÓTIDO BrdU

Para evaluar la proliferación de las CGM, los cultivos fueron sometidos a un pulso de Bromo-deoxi-Uridina (BrdU), análogo de la Timidina, que se incorpora al ADN en la fase S del ciclo celular, sirviendo como marcador de células en proliferación. Las células fueron expuestas a BrdU 30 µM (concentración final en el cultivo) durante 24 horas previas a la fijación. Luego de la fijación con PF 4% las células fueron tratadas con HCl 2N durante 30 minutos para desnaturalizar el ADN y, a continuación, se neutralizó con borato de sodio 0,1 M. La incorporación de BrdU se determinó por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos monoclonales y realizando los controles correspondientes.

TRATAMIENTO CON EL AGONISTA DEL RECEPTOR RXR, PA024

El tratamiento con el agonista sintético, PA024, de los cultivos primarios mixtos neuro-gliales se realizó a los días 3, 5 y 8 de cultivo a una concentración de 0,1 μ M, esta concentración surge de la realización previa de una curva con concentraciones crecientes del agonista vs. los niveles de muerte celular evaluados con la sonda DAPI, siendo la concentración seleccionada la menor a la cual se observó una disminución significativa de la muerte celular respecto del control (control: 44.5 ± 6.4 %; 0.1 μ M: 30.6 ± 1.1 %). Los cultivos fueron mantenidos durante los experimentos en DMEM 10% SFB. Previo a cada agregado de agonista, se realizó un cambio de medio. Como controles del experimento se utilizaron condiciones sólo con agregado del medio DMEM 10% SFB y, por otro lado, con agregado de dimetilsulfóxido (DMSO), vehículo del PA024. Los cultivos tratados de esta manera fueron fijados con PF 4% para realizar tinciones mediante técnicas de inmunocitoquímica o tratados para realizar extracción de ARNm.

EXTRACCIÓN DE RETINAS ENTERAS

Los niveles de ARNm de distintas proteínas, en retinas enteras, se evaluaron a distintos días posnatales: PN0, PN2, PN4, PN8, PN10, PN20, PN40 y adulto (3 meses). Para esto se enuclearon los ojos de 3 animales C57BL6J y 3 animales *rd1* por cada día PN estudiado. Se disecaron las retinas separándolas del epitelio pigmentado y se realizó la extracción de ARNm de las mismas, de ambos ojos, de cada animal por separado. Luego se procesaron para cuantificar los niveles de ARNm (ver Detección de ARNm) y se promediaron los valores de 3 individuos para cada día PN.

CORTES HISTOLÓGICOS

Para analizar los cortes, se enuclearon los ojos de ratones C57BL6J y *rd1*, se fijaron en PF 2% a 4°C por 3 hs, se lavaron con PBS y se sumergieron en una solución de sacarosa 30% en PBS durante una noche. Pasado este tiempo se sumergieron en OCT formando los bloques que se congelaron primero a -20 °C y luego a -80 °C. Los cortes se realizaron con un crióstato Leica CM1860 y se adhirieron a portaobjetos recubiertos con aminopropil-trietoxi-silano (silanizados).

ENSAYOS GENERALES DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes de retina de 10 µm se montaron sobre portaobjetos silanizados y se conservaron a -20 °C hasta el momento de su uso, para lo cual, luego de dejarlos secar al aire, se fijaron con PF 2% durante 15 minutos. A continuación, se realizaron lavados con PBS, luego se permeabilizaron con tritón 0,1% en PBS durante 15 minutos con posteriores lavados con PBS. Por último, se realizó un bloqueo con BSA 1% durante 1 hora 30 minutos y se incubó con el anticuerpo primario y secundario acoplado a fluoróforo, consecutivamente por 1 hora cada uno. Los lavados, luego de cada incubación con anticuerpos, se hicieron con PBST 0,1%, 2 de 10 minutos y un último lavado con PBS de 5 minutos. Finalmente se incubó con la sonda fluorescente DAPI 3 µg/ml y TO-PRO™-3 Iodide 1µM, durante 10 minutos, para la marcación de los núcleos celulares. Los controles para las reacciones inmunohistoquímicas se realizaron omitiendo el anticuerpo secundario. Para la tinción de reconocimiento del RXRα se realizó el control de la inmunomarcación tratando los cortes con el péptido bloqueante correspondiente.

DETECCIÓN DE ARNm

1. Aislamiento de ARNm

Para estudiar la expresión de distintos genes el primer paso fue extraer el ARNm de muestras de cultivos primarios y de retina entera con el reactivo de extracción Quick-zol de Kalium Technologies (Embiotec) en hielo siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua ultrapura autoclavada y solventes calidad HPLC. La integridad del ARNm fue verificada en gel de agarosa al 0.8% y su concentración fue medida por absorbancia a 260 nm.

2. Reacción de transcripción reversa

Para realizar la reacción de transcripción reversa (RT) del ARNm previamente extraído, se partió de 1 µg de ARNm para obtener una concentración de 40 ng/ul de ADNc. Para la reacción se utilizaron *random primers*, dNTPs, RNAsin y la enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3. PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Para la detección de los productos de amplificación se utilizó un intercalante, SyBr-Green®, que emite fluorescencia sólo cuando está unido al ADN de doble cadena. Los niveles de fluorescencia son detectados en cada ciclo durante la elongación de los productos, de manera que al final de la reacción tenemos una representación del incremento de fluorescencia por ciclo de PCR. Para cada reacción de PCR cuantitativa, se utilizó 8,4 µl del producto de RT, en un volumen final de 20 µl, con el kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX de BIOLINE.

Previo a realizar la reacción de qRT-PCR se evaluó la eficiencia de los *primers* realizando curvas estándar y se consideró aceptable un rango de eficiencia de entre 80-120%.

Para controlar que las muestras no tengan contaminación con ADN genómico, al realizar la qRT-PCR, se preparó un tubo de cada muestra con ARNm

(RT -) y para controlar la formación de dímeros de *primers* se adicionó un tubo con agua (NTC). En ambos casos se adicionó la enzima y los *primers*.

Las condiciones de la PCR utilizadas fueron las siguientes: 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 20 segundos, apareamiento y extensión a 60 °C por 30 segundos y un paso de extensión final a 95 °C por 30 segundos.

Como gen normalizador se utilizó el factor 2 de elongación eucariótico (*Eef2*). La cuantificación de ARNm se realizó utilizando el método Cq (*quantification cycle method*) (Bustin et al. 2009). Los experimentos de qRT-PCR se repitieron 3 veces realizando cada muestra por triplicado. El listado de los *primers* utilizados se encuentra en la tabla 3.

La reacción se llevó a cabo en el equipo Rotor Gene 6000 y el análisis de los datos se realizó con el programa del mismo equipo, Rotor-Gene 1.7.87.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Las CGM de cultivos mixtos se analizaron por citometría de flujo. Para ello se levantaron las células cultivadas en cápsulas plásticas de 60 mm, previamente se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con HBSS a temperatura ambiente para luego agregar 200 µl tripsina 0,25% por cápsula, la cual se dejó actuar por 60 segundos y luego fue diluida con 800 µl de HBSS. A continuación, con golpes suaves se favoreció el desprendimiento de las células que fueron disociadas mecánicamente con micropipeta hasta obtener una suspensión celular uniforme y homogénea, carente de grumos, y recolectadas en un tubo falcón de 50 ml con PBS+10% SFB frío para inactivar la tripsina. Como paso siguiente, esta suspensión celular se filtró a través de una malla de nylon Nitex de 32 µm de poro, para eliminar grumos de tamaño mayor que puedan afectar al análisis y tapar los conductos del equipo de citometría. El filtrado se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos y se resuspendió en PBS+BSA 0,5%. Luego de un lavado extra, las células se fijaron y permeabilizaron con la solución A y solución B del kit Dako Intrastain. La tinción con anticuerpos primarios y secundarios se realizó en PBS+BSA 0,5%. Como controles se utilizaron células sin marcación y células solo incubadas con el anticuerpo secundario. Se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) y la cuantificación de la suspensión celular se realizó con el programa

FlowJo. Para cada muestra se analizó un mínimo de 10.000 eventos procesados por el citómetro.

MICROSCOPIA

Una vez realizadas las tinciones e inmunomarcaciones, las células fueron analizadas por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600, acoplado a un condensador para contraste de fase de campo claro y a un equipo de Epi-Fluorescencia (Y-FL). Las imágenes fueron tomadas con una cámara AmScope MU1403.

También se utilizó un microscopio confocal de barrido laser (*Laser Scanning Confocal microscope*, LSCM) leica DMIRE Sp2 con objetivo de 63X de inmersión en agua. Las fotografías fueron obtenidas utilizando una cámara acoplada al microscopio.

ANÁLISIS DE IMÁGENES

El análisis de las imágenes se realizó con el programa Fiji-Image J (Schindelin et al. 2012). Se trabajó con imágenes en 8-bit del canal correspondiente a la fluorescencia de interés. Luego se definió manualmente una región de interés, ROI (*region of interest*) y se midió la intensidad de fluorescencia. El mismo procedimiento se realizó seleccionando una región de interés que correspondiera a espacios sin marcación, es decir, que correspondieran al fondo de la imagen. El promedio de este valor de fondo de cada imagen se restó al valor de intensidad de fluorescencia de la región con marcación de interés teniendo en cuenta el área de la región seleccionada. El resultado del cálculo anterior se encuentra expresado como CTCF (corrected total cell fluorescence):

$$CTCF = \text{Densidad Integrada} - (\text{área ROI} \times \text{media de la fluorescencia del fondo})$$

Para evaluar el número de células gliales por área y el espesor de las proyecciones de las CGM se utilizaron herramientas de este mismo programa.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados muestran el porcentaje de al menos 3 experimentos independientes (\pm desvío estándar), a menos que se indique lo contrario. En cada experimento cada condición fue realizada por triplicado. Para los análisis de inmunocitoquímica se analizaron un total de 10 campos por réplica. Para el análisis de ARNm en retina entera se promediaron los valores de 3 individuos por cada día postnatal estudiado. Para todas las muestras analizadas por qRTPCR el ensayo se realizó por triplicado.

Para el análisis de imágenes se tomaron entre 3-4 imágenes por corte de retina provenientes de entre 3-5 ejemplares diferentes que luego fueron promediados.

La significancia estadística se evaluó mediante el test de Student t o test ANOVA según se especifique, considerando significativo un valor $p < 0,05$. Para realizar los gráficos y el análisis estadístico correspondiente se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

Las imágenes mostradas de cultivo celular o corte histológico son representativas de cada resultado.

Tabla 1. *Anticuerpos primarios*

Antígeno	Anticuerpo	Origen	Fuente	Nº Catálogo	Uso	Dilución
BrdU	anti-BrdU	ratón	DSHB	G3G4	ICQ	1:100
CRALBP	anti-CRALBP	ratón	Gene Tex	gtx15051	ICQ	1:100
CRX	Anti-CRX	conejo	Cedido por la Dra. Cheryl M. Craft	University of Southern California	ICQ	1:100
GFAP	anti-GFAP	ratón	Cell Signaling	3670	ICQ/IHQ	1:200/1:500
GLUTAMINA SINTASA	anti-GS	conejo	ABCAM	ab49873	ICQ/IHQ	1:100/1:500
LAMINA A	anti-lamina A	ratón	ABCAM	ab8980	ICQ	1:100
N-CADHERINA	anti-N-CADHERINA	ratón	Santa Cruz	sc-271386	ICQ	1:50
NESTINA	anti-NES	ratón	DSHB	Rat 401	ICQ	1:100
NESTINA	anti-NES	ratón	ABCAM	ab11306	IHQ/CF	1:400/1:100
OPSINA	Anti-Rho4D2	ratón	Cedido por el Dr. RS Molday	University of British Columbia, Canada	IHQ	1:50
RXRα	anti-RXR α	conejo	Santa Cruz	sc553	ICQ/IHQ	1:100
SOX-2	anti-SOX2	conejo	ABCAM	ab97959	ICQ/IHQ	1:200/1:500

ICQ: Inmunocitoquímica / IHQ: Inmunohistoquímica / CF: Citometría de flujo

Tabla 2. *Anticuerpos secundarios*

Antígeno	Anticuerpo	Origen	Fluoróforo	Fuente Nº Catálogo	Uso	Dilución
Inmunoglobulina de ratón	anti-ratón	cabra	Cy2	Jackson ImmunoResearch 115-225-003	ICQ/IHQ /CF	1:200/1:400 /1:200
Inmunoglobulina de ratón	anti-ratón	cabra	Cy3	Jackson ImmunoResearch 115-165-003	ICQ/IHQ	1:200/1:400
Inmunoglobulina de conejo	anti-conejo	cabra	Cy2	Jackson ImmunoResearch 111-225-144	ICQ/IHQ /CF	1:200/1:400 /1:200
Inmunoglobulina de conejo	anti-conejo	cabra	Cy3	Jackson ImmunoResearch 111-165-144	ICQ/IHQ	1:200/1:400

Tabla 3. *Primers*

Target	Forward	Reverse
<i>m-Bax</i>	5'TACTCCCGTCCTACCTCAGC 3'	5'CGCGGGTACTAAATGAACGC 3'
<i>m-Eef2</i>	5'GACTCTGAGAATCCGTCGCC 3'	5'CACACAAGGGAGTCGGTCAG 3'
<i>m-Gfap</i>	5'CACGAACGAGTCCCTAGAGC 3'	5'ATGGTGATGCGGTTTTCTTC 3'
<i>m-Nes</i>	5'CCCTTAGTCTGGAAGTGGCTAC 3'	5'GTGCTGGTCCTCTGGTATCC 3'
<i>m-RXRα</i>	5'GACAGTGGCTTGCCTGGTAT 3'	5'CCAAATCAGAGGGCACCCAT 3'
<i>m-RXRβ</i>	5'TCCTTCTCCCATCGGTCCAT 3'	5'TTTGTGGGGTGGGGTGAAAA 3'
<i>m-RXRγ</i>	5'AACTTGGCCTGGGTGAAACA 3'	5'GAGCACGCTGGCTCATCTAT 3'
<i>m-Sox2</i>	5'TGGATAACTGTTTCAGCCACCAA 3'	5'GGCGCAGTATCTCATCTGCT 3'
<i>m-Vim</i>	5'ATGCTTCTCTGGCACGTCTT 3'	5'AGCCACGCTTTCATACTGCT 3'

Bax: Bcl-2-associated X protein, *Eef2*: eukaryotic translation elongation factor 2, *Gfap*: glial fibrillary acidic protein, *Nes*: nestina, *RXR*: retinoid x receptor, *Sox2*: SRY (sex determining region Y)-box 2, *Vim*: vimentin

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Los cultivos primarios de retinas *rd1* reprodujeron un patrón de muerte de los FRs semejante al ocurrido en las retinas *rd1 in vivo*

Para determinar si las CGM de retinas de ratones *rd1* presentaban diferencias en su potencial regenerativo respecto de las de ratones control (*wt*) utilizamos cultivos mixtos neuro-gliales de retinas de ambos tipos de ratones, en los que establecimos sus patrones de desarrollo, diferenciación y muerte, y los comparamos con sus contrapartes *in vivo*.

Para ello evaluamos la pérdida de FRs de la CNE en las retinas *rd1* y luego investigamos si en los cultivos ocurría un proceso neurodegenerativo similar al observado *in vivo*. El análisis de cortes histológicos de retinas PN 9 de ratones *rd1*, cuando aún no comenzó la muerte masiva de FRs, no mostró cambios significativos en la capa de FRs respecto de las retinas *wt* (**Fig. 6 a-d**). Por su parte, los cortes PN 14 de retinas *rd1*, en coincidencia con el pico de muerte neuronal, mostraron una disminución notable de la CNE respecto de la observada en retinas *wt* (**Fig. 6 e-h**). Por último, mientras los cortes de retinas PN 30 de ratones *wt* conservaron la CNE intacta, en las retinas *rd1* se observó una degeneración completa de la misma (**Fig. 6 i-l**).

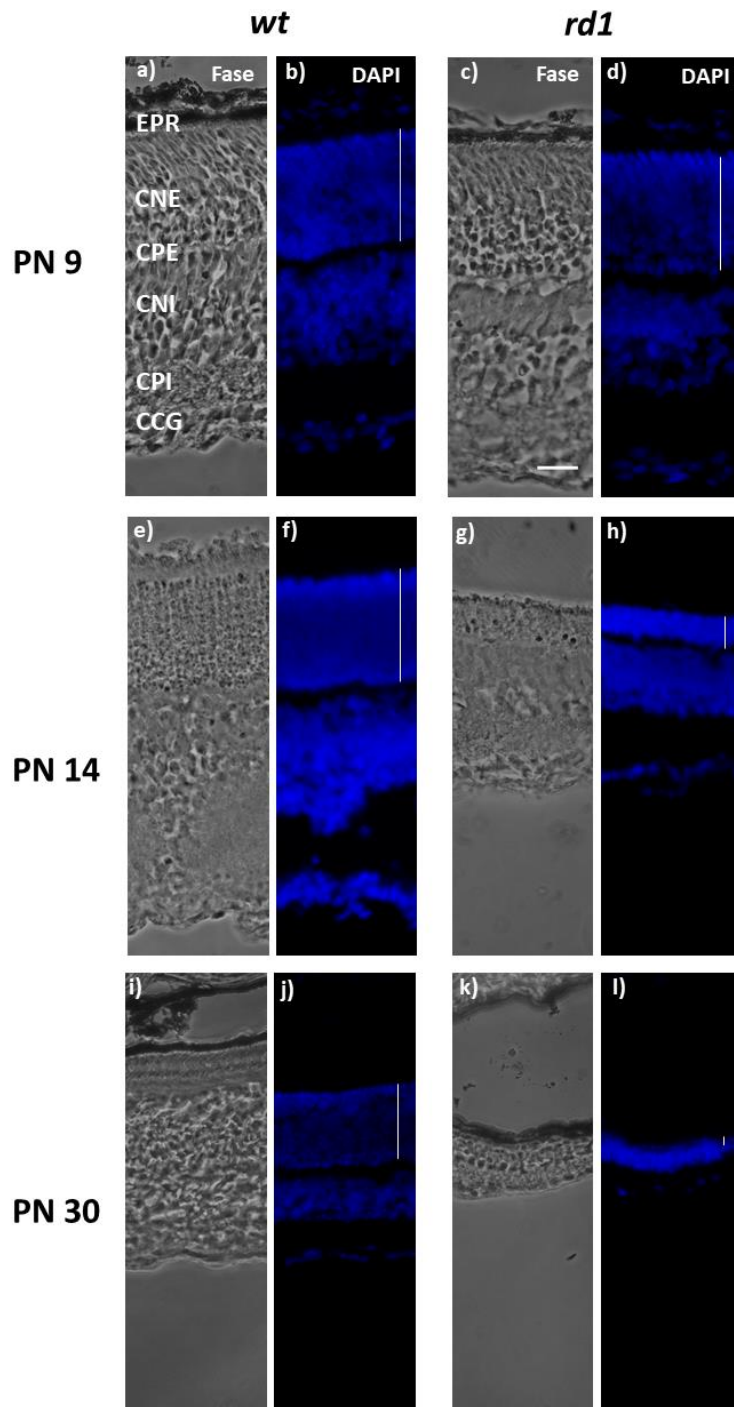


Figura 6. Disminución, durante el desarrollo, de la capa de FRs en cortes de retina de ratones *rd1*. Fotomicrografías de fase y fluorescencia de cortes de retinas *wt* de días PN9 (a, b), PN14 (e, f) y PN 30 (i, j); y *rd1* de días PN9 (c, d), PN14 (g, h) y PN 30 (k, l). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear DAPI. La barra vertical blanca en las imágenes de fluorescencia muestra la disminución de la capa de FRs en la retina *rd1*. La escala representa 40 μ m.

Una vez convalidado el modelo de degeneración retiniana, realizamos cultivos primarios mixtos neuro-gliales de retina de ratones *wt* y *rd1*, con el objetivo de evaluar la muerte neuronal por apoptosis. Primeramente, determinamos en estos cultivos, el número de neuronas fotorreceptoras presentes a través de la marcación del factor de transcripción temprano CRX. Los resultados mostraron que, a los 6 y 11 días, en los cultivos de retinas *wt*, el $96 \pm 29\%$ y el $94 \pm 18.5\%$ respectivamente correspondían a FRs. Mientras que, en los cultivos *rd1*, analizados a los mismos días, estos valores fueron de $94.5 \pm 37\%$ y $96 \pm 20\%$, respectivamente (no mostrado, $n=3$). A continuación, analizamos la fragmentación nuclear, mediante la marcación del núcleo con la sonda DAPI, a 6 y 11 días en cultivo; y la muerte por apoptosis mediante la técnica de TUNEL a 11 días, un tiempo equivalente a 13 días *in vivo*. La comparación de la apoptosis determinada por el grado de fragmentación nuclear reveló que a 6 días en cultivo el porcentaje de neuronas con núcleos fragmentados fue de aproximadamente un 20% en ambos tipos de cultivos ($20.8 \pm 2.8\%$ *wt* y $20.6 \pm 10\%$ *rd1*) mientras que, a los 11 días, en los cultivos de retinas de ratones *rd1* este valor alcanzó un $32.5 \pm 1.7\%$, cifra significativamente mayor que el $18 \pm 3\%$ observado en los cultivos de retinas *wt* al mismo día (**Fig. 7 g**). Por su parte, el análisis mediante la técnica de TUNEL (**Fig. 7 a-f**) mostró un mayor porcentaje de neuronas TUNEL (+) en los cultivos de 11 días de retinas *rd1* ($23.9 \pm 5.4\%$) que en los de retinas *wt* ($7.5 \pm 3.8\%$) (**Fig. 7 h**). En concordancia con estos resultados, mientras que la expresión del ARNm de la proteína BAX en cultivos mixtos neuro-gliales de retinas *wt* de 6 y 11 días no mostró cambios significativos, en los cultivos de retinas *rd1* mostró, a ambos días, un aumento significativo de 3.5 y 1.5 veces respectivamente, con respecto a los niveles de los cultivos de retinas *wt* a 6 días. (**Fig. 7 i**). En cuanto a la viabilidad de las CGM cabe destacar que, tanto en cultivos mixtos *wt* como *rd1*, no se encontraron núcleos fragmentados ni TUNEL (+).

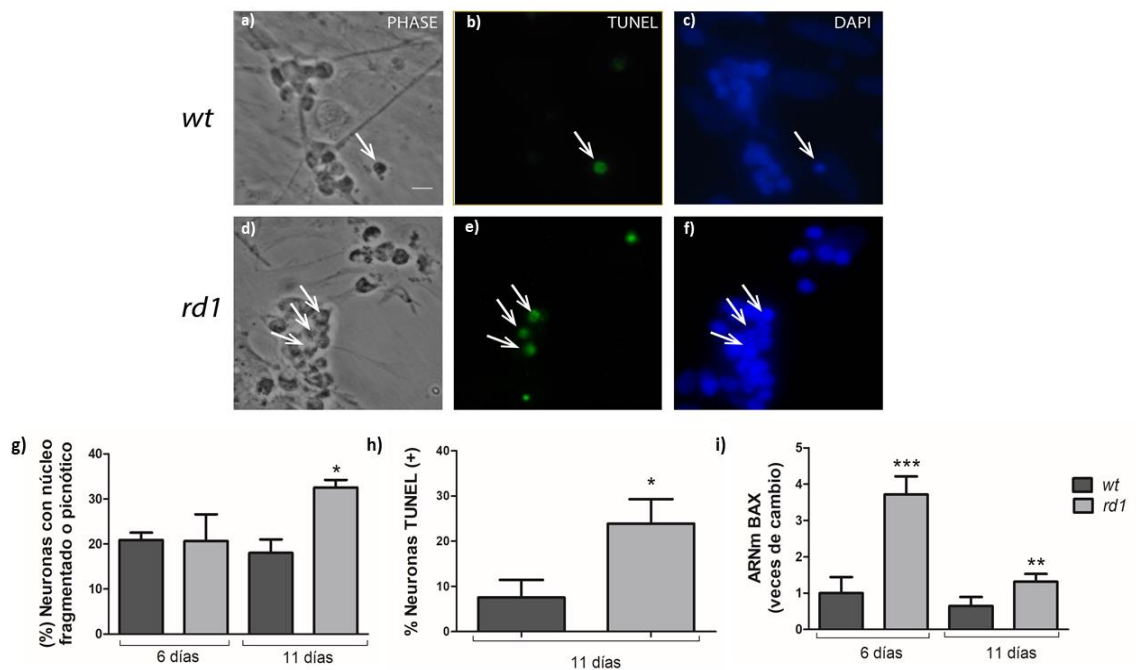


Figura 7. Muerte por apoptosis de neuronas en cultivos mixtos neuro-gliales. Las fotomicrografías de fase (a, d) y fluorescencia (b, c, e, f) de cultivos mixtos neuro-gliales wt (a-c) y rd1 (d-f) de 11 días muestran la presencia de neuronas apoptóticas (flechas finas) detectadas mediante la técnica de TUNEL (b, e). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear DAPI (c, f). A 6 días de cultivo, el porcentaje de FRs fragmentados y/o picnóticos fue similar en cultivos wt y rd1, mientras que a 11 días fue mayor en cultivos rd1 (g). El porcentaje de neuronas TUNEL (+) fue mayor en los cultivos rd1, también a 11 días (h). El nivel del ARNm de Bax fue mayor en los cultivos rd1 a 6 días y 11 días respecto de los cultivos wt (i). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres experimentos separados (n=3). El análisis estadístico se hizo por test de student (h) y ANOVA seguido de test de tukey (g, i). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La escala representa 5 μ m.

Los cultivos primarios mixtos neuro-gliales de retinas *rd1* mostraron un mayor número de neuronas por célula glial

Luego de sembrados, los cultivos primarios mixtos neuro-gliales provenientes tanto de retinas de ratones *wt* como *rd1*, formaron grumos (5-30 células/grumo) compuestos por células progenitoras de retina y neuronas en distintos niveles de diferenciación, confirmando resultados previos de nuestro laboratorio (Insua et al. 2008; Simón et al. 2012). Al cabo de 2-3 días, las CGM comenzaron a extenderse por debajo de los grumos, formando una monocapa sobre la cual se ubicaron y desarrollaron las neuronas. En este período inicial, no observamos diferencias significativas entre los cultivos *wt* y *rd1*. Sin embargo, a los 6 días, los cultivos de retinas *rd1* mostraron poseer un mayor número de neuronas adheridas a la superficie de las CGM que los de retinas *wt* (**Fig. 8 a-d**). Mientras que, en los cultivos de retinas *wt*, este valor fue de 2 neuronas por CGM, en los cultivos de retinas *rd1* hallamos 6 neuronas por CGM (**Fig. 8 e**). Luego de 11 días en cultivo estas diferencias se redujeron y no se observaron diferencias significativas en el número de neuronas por CGM.

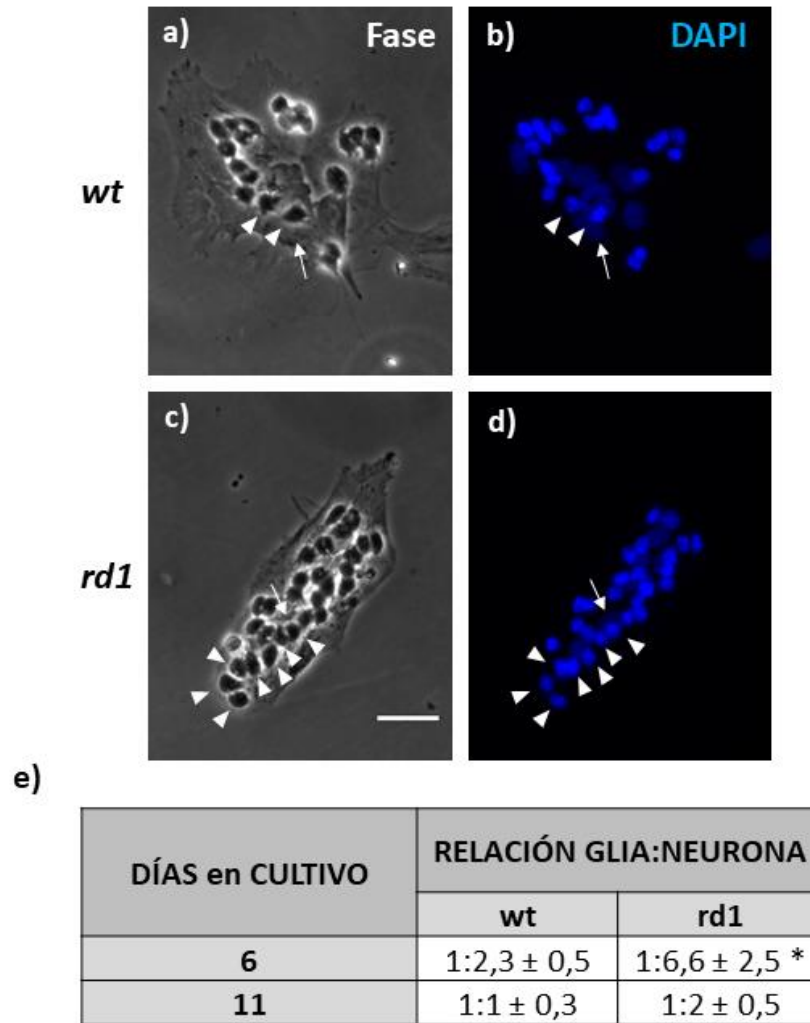


Figura 8. Sobrecarga con neuronas de las CGM. Las fotomicrografías de fase (a, c) y fluorescencia (b, d) de cultivos mixtos neuro-gliales wt (a, b) y rd1 (c, d) de 6 días muestran la presencia de neuronas (cabeza de flecha) sobre las CGM (flecha fina). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear DAPI (b, d). El número de neuronas por cada CGM se muestra en la tabla (e). El análisis estadístico se hizo por test de student, * $p < 0.05$. La escala representa 30 μm .

Las CGM *rd1* mostraron una capacidad proliferativa reducida

Una posible explicación para la diferencia observada en el número de neuronas por CGM entre ambos tipos de cultivos, podría ser que la proliferación de las células gliales *rd1* ocurra a un ritmo menor que su contraparte *wt*, de modo que cada CGM *rd1* albergaría un número mayor de neuronas que las CGM *wt*. Por este motivo y dado que la actividad proliferativa es una característica distintiva de las células madre, evaluamos este parámetro en las CGM de cultivos mixtos neurogliales de retinas *wt* y *rd1*. Para ello analizamos, en ambos tipos de cultivos, la incorporación del nucleótido BrdU por parte de las CGM.

Si bien las CGM de ambos cultivos, *wt* y *rd1*, incorporaron el nucleótido BrDU (**Fig. 9 a-h**), luego de 6 días el número de CGM que proliferaron fue de un $79.1 \pm 8.5\%$ en los cultivos mixtos *wt*, mientras que en los cultivos mixtos *rd1* este valor fue de un $55.1 \pm 6.3\%$. A los 11 días, las CGM *rd1* que proliferaron en los cultivos mixtos fueron un $5.2 \pm 1.7\%$, valor significativamente menor que el $37.4 \pm 5.4\%$ obtenido para las CGM *wt* (**Fig. 9 i**).

En correspondencia con estos datos, a 6 días en cultivo, el número de CGM por cápsula (de 35 mm de diámetro) fue de 32375 ± 7249 CGM en los cultivos mixtos *wt*, mientras que en los cultivos *rd1* este valor fue de 16720 ± 1747 CGM, (**Tabla 4**).

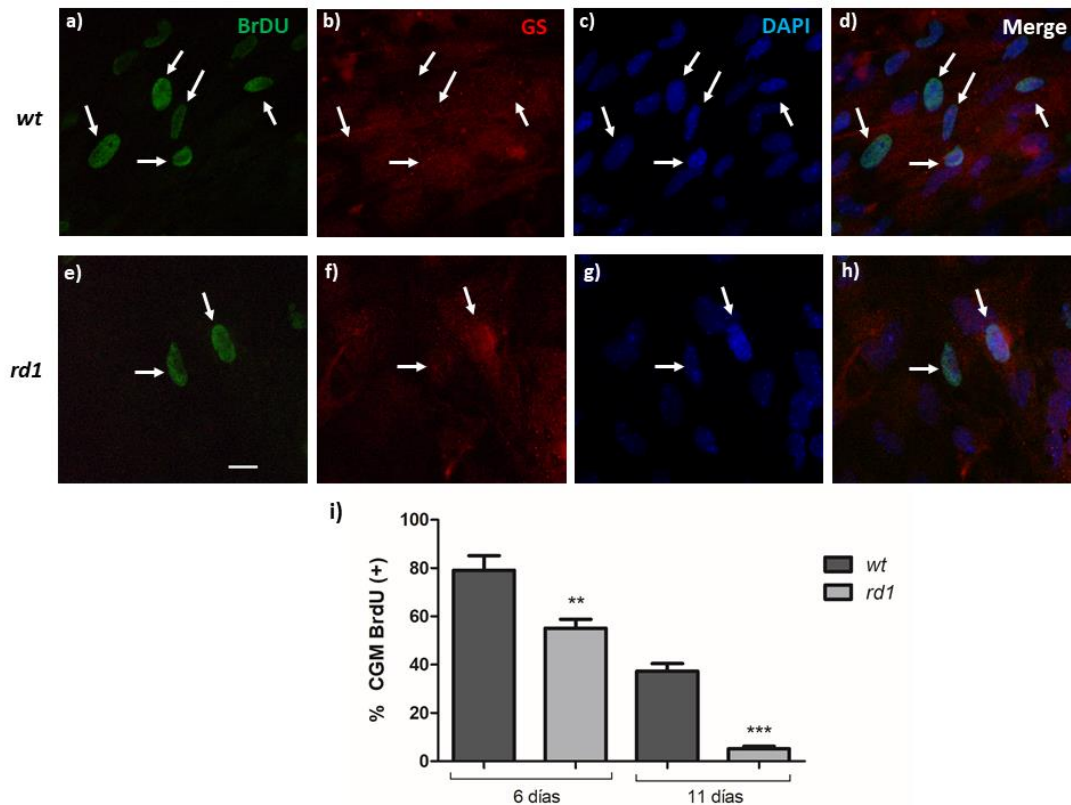


Figura 9. Proliferación de las CGM en cultivos mixtos neuro-gliales. Las fotomicrografías de fluorescencia de cultivos mixtos neuro-gliales wt (a-d) y rd1 (e-h) de 11 días muestran la incorporación del nucleótido BrdU por parte de las CGM (a, e) (flechas). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear DAPI (c, g) y las CGM con Glutamina Sintasa (GS) (b, f). Merge (d, h). Nótese que, tanto a 6 como 11 días, la incorporación de BrdU fue menor en los cultivos rd1 (i). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres experimentos separados ($n=3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de tukey. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. La escala representa $30 \mu\text{m}$.

DÍAS en CULTIVO	CGM/cápsula	
	wt	rd1
6	32375 \pm 7249	16720 \pm 1747
11	104110 \pm 15110	95297 \pm 14693

Tabla 4. Análisis comparativo del número de CGM en cultivos mixtos neuro-gliales wt y rd1 por cápsula de 35 mm de diámetro (área: $961\,000\,000 \mu\text{m}^2$) a 6 y 11 días de cultivo.

Expresión de N-CADHERINA en las CGM *rd1* y *wt*

Otra posible causa de las diferencias observadas en el número de FRs adheridos a las CGM en los cultivos mixtos *wt* y *rd1*, podría deberse a modificaciones en la expresión de moléculas de adhesión de las células gliales, tales como la N-CADHERINA. Para evaluar esta posibilidad comparamos, por técnicas inmunocitoquímicas, la expresión de esta molécula de adhesión en cultivos mixtos neuro-gliales *wt* y *rd1* de 6 días (**Fig. 10 a-h**).

Los niveles de fluorescencia fueron levemente mayores en los cultivos mixtos *rd1* en comparación con los cultivos *wt*, sin embargo, la debilidad de la tinción no permitió determinar cuantitativamente de forma fehaciente la diferencia observada.

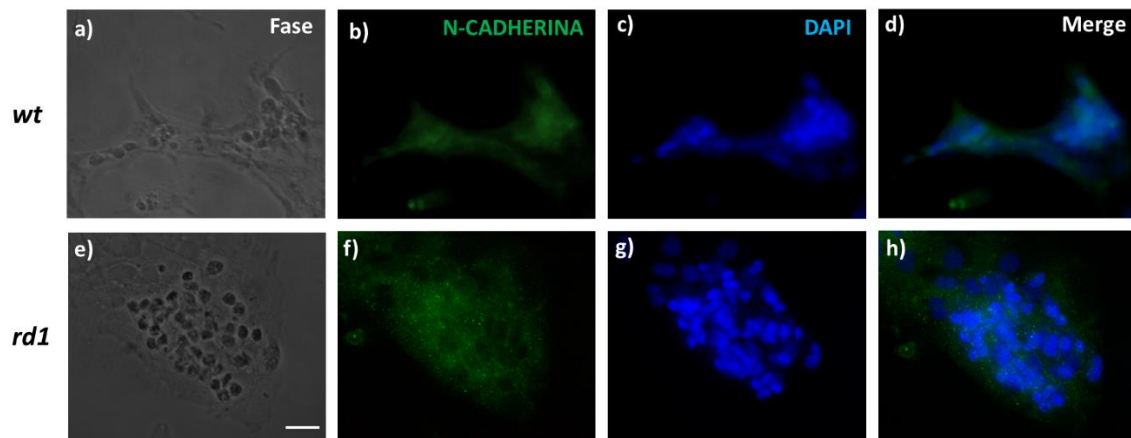


Figura 10. Expresión de N-CADHERINA en cultivos mixtos neuro-gliales. Fotomicrografías de fase (a, e) y de fluorescencia (b-d, f-h) de cultivos mixtos neuro-gliales wt (a-d) y rd1 (e-h) de 6 días muestran la expresión de la molécula de adhesión N-CADHERINA (b, f). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear DAPI (c, g). Merge (d, h). La escala representa 40 μ m.

Las CGM *rd1* mostraron alteraciones nucleares

Considerando que la integridad del núcleo es crucial para preservar la organización del ADN, y que sus anomalías estructurales pueden afectar la continuidad del mismo, alterando la progresión de la división celular, analizamos y comparamos la morfología nuclear en CGM de retinas de ratones *wt* y *rd1*, utilizando un anticuerpo que reconoce uno de los componentes de la lámina nuclear. Esta última determina la morfología nuclear y se une a regiones específicas de la cromatina contribuyendo a su organización y por ende al mantenimiento de la división celular.

Los resultados mostraron que los núcleos de las CGM *wt* eran mayoritariamente ovals o esféricos, mientras que los de las CGM *rd1* adoptaban un mayor número de morfologías irregulares (**Fig. 11 a-h**). El análisis cuantitativo reveló que, al día 6, el porcentaje de núcleos con morfologías anormales de las CGM en los cultivos *wt* fue de $1.6 \pm 1.4\%$ mientras que en los cultivos *rd1* este porcentaje alcanzó un $12.5 \pm 0.1\%$. A los 11 días, estos valores se incrementaron a un $6.25 \pm 2.4\%$ y $15.6 \pm 0.5\%$ en los cultivos mixtos *wt* y *rd1*, respectivamente (**Fig. 11 i**).

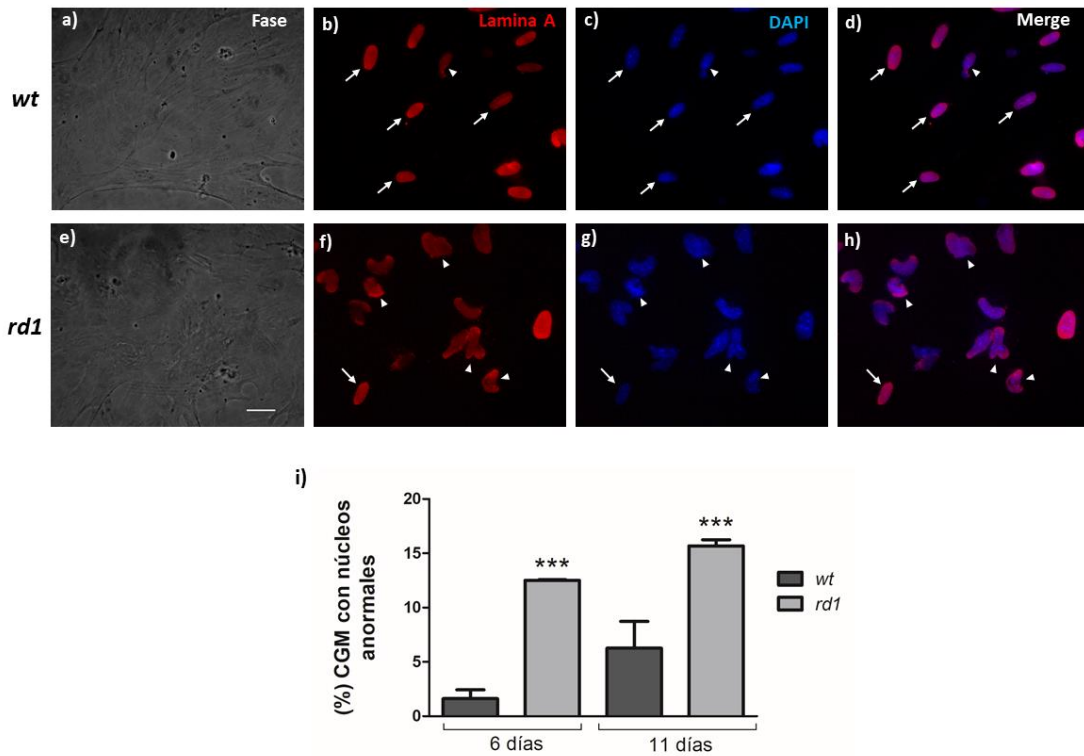


Figura 11. Alteraciones morfológicas en núcleos de CGM rd1. Las fotomicrografías de fase (a, e) y fluorescencia (b-d y f-h) de cultivos mixtos neuro-gliales wt (a-d) y rd1 (e-h) de 11 días muestran núcleos con morfología oval y redondeada (flechas finas) y núcleos con irregularidades en su forma y tamaño (cabezas de flecha). Los núcleos fueron inmunomarcados con el anticuerpo anti-LAMINA A (b, f) y con la sonda nuclear DAPI (c, g). El porcentaje de CGM con núcleos anormales fue mayor para las CGM rd1 a 6 y 11 días en cultivo (i). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres experimentos separados ($n=3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de tukey. *** $p<0.001$. La escala representa 40 μ m.

Las CGM *rd1* en cultivo mostraron una disminución en la expresión de marcadores de multipotencialidad

Teniendo en cuenta que NESTINA es una de las principales proteínas involucradas en los procesos regenerativos llevados a cabo por las células madre, evaluamos y comparamos su expresión en las CGM *wt* y *rd1*.

Al analizar la expresión de esta proteína en las CGM por citometría de flujo, a partir de cultivos mixtos neuro-gliales, observamos que el número de células gliales que expresaron NESTINA fue similar en ambos tipos de cultivos (**Fig. 12 a-i**), sin embargo, al cabo de 11 días, la intensidad de expresión de este filamento intermedio, medida en unidades arbitrarias como intensidad de fluorescencia media (IFM), fue mayor en las CGM de los cultivos *wt*, alcanzando un valor de 309.5 ± 45 unidades, mientras que para las CGM de cultivos *rd1* este valor fue significativamente menor, alcanzando 181.2 ± 19.3 unidades (**Fig. 12 j, k**). Cuando analizamos los niveles de ARNm de NESTINA en estos mismos cultivos, si bien no se detectaron cambios significativos a 6 días, en concordancia con el resultado anterior a los 11 días, en los cultivos mixtos *wt*, la expresión de *Nestina* fue mayor que en los cultivos *rd1* (**Fig. 12 l**).

La disminución en la expresión de este filamento intermedio nos llevó a investigar si la expresión de *Vimentina*, otro filamento intermedio marcador de células madre podría estar alterada. Para ello estudiamos su expresión en ambos tipos de cultivos mixtos neuro-gliales. Los resultados mostraron una disminución en la expresión de *Vimentina* en cultivos mixtos neuro-gliales *rd1* tanto a 6 como a 11 días, respecto de los niveles en cultivos *wt* (**Fig. 12 m**).

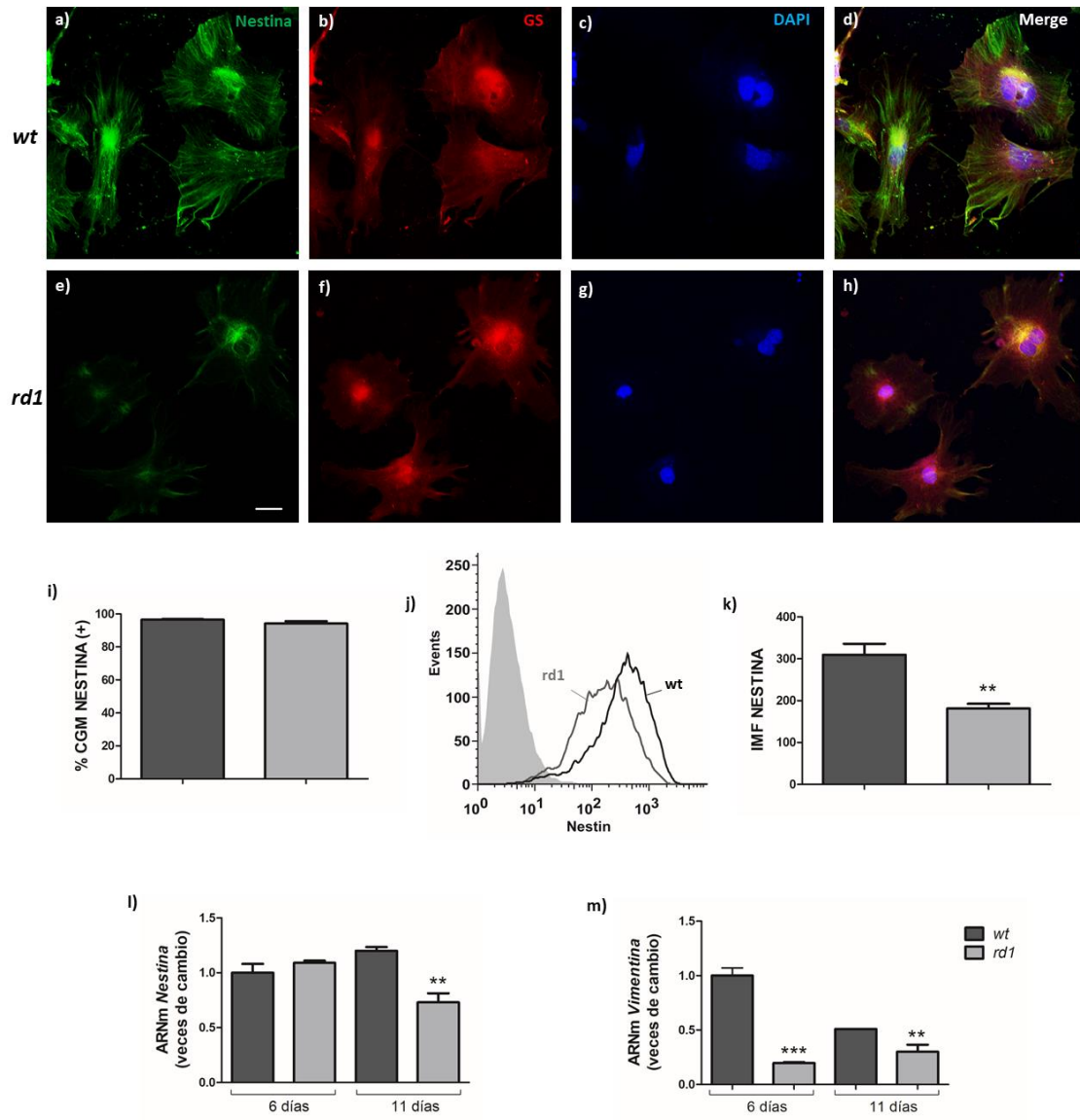


Figura 12. Expresión del filamento intermedio NESTINA en CGM. Las fotomicrografías de fluorescencia de cultivos mixtos neuro-gliales wt (a-d) y rd1 (e-h) de 11 días muestran la marcación de filamentos de NESTINA en las CGM (a, e). Las CGM fueron marcadas con GLUTAMINA SINTASA (GS) (b, f) y los núcleos con la sonda nuclear TOPRO (c, g). Merge (d, h). El número de células que expresan NESTINA, analizado por citometría de flujo, no evidenció diferencias significativas entre ambos cultivos (i). El histograma resultante muestra una diferencia en la intensidad de expresión de NESTINA (j), siendo mayor para las CGM wt (k). El nivel de ARNm de Nestina en cultivos mixtos neuro-gliales fue menor en los cultivos rd1 a 11 días comparado con los cultivos wt (l). El nivel de ARNm de Vimentina fue significativamente menor tanto a 6 como a 11 días en los cultivos rd1 respecto de los cultivos wt (m). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres experimentos separados (n=3). El análisis estadístico se hizo por test de student (i, k) y ANOVA seguido de test de tukey (l, m). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. La escala representa 40 μ m.

Los marcadores de multipotencialidad disminuyeron su expresión en las retinas *rd1 in vivo*

Se ha determinado que a partir del día PN 0, cuando comienza la segunda fase de la retinogénesis, aumenta la expresión de marcadores de células progenitoras, como NESTINA, filamento intermedio determinante para la transición de células progenitoras, en estado proliferativo, a células neuronales post-mitóticas (Zimmerman et al. 1994) y crucial para organizar los procesos regenerativos.

Dada la enorme eliminación de neuronas FRs que ocurre en los ratones *rd1* decidimos estudiar su expresión en retinas de ratones *wt* y *rd1*, así como la de *Sox2*, otro marcador de células madre, desde el desarrollo temprano de la retina hasta la adultez. Como era de esperar, en el período abarcado entre PN 0 y PN 8 durante el cual se completa el proceso de retinogénesis, en las retinas *wt* y *rd1*, encontramos un aumento inicial de la expresión de *Nestina* que luego disminuyó a partir del día PN 8. Notablemente, en este mismo período, en los ratones *rd1* los niveles de expresión de *Nestina* fueron menores respecto de su contraparte *wt*. Así, mientras que en las retinas *wt*, los aumentos de expresión (medida como veces de aumento respecto del nivel a PN 0) a los días PN 2, 4 y 8, fueron de 4.1, 6.3 y 1.9 veces respectivamente, en las retinas *rd1* fueron de sólo 1.7, 4.2 y 0.4 veces (**Fig. 13 a**).

Con respecto a *Sox2* observamos que, en ambos tipos de ratones, hubo un incremento en los primeros días PN, pero al igual que lo ocurrido con *Nestina*, observamos una disminución significativa de este mensajero en los primeros días PN en las retinas de ratones *rd1* respecto de las de ratones *wt*. Hacia el día PN 2, *Sox2*, disminuyó de 4.35 veces en retinas *wt* a 2.5 en las *rd1*, y hacia el día PN 4, de 2.5 veces en retinas *wt* a 0.8 veces en las retinas *rd1* (**Fig. 13 b**). Además, tanto para *Nestina* como para *Sox2* no observamos, como ocurre en otros modelos de neurodegeneración (Hippert et al. 2015; Luna et al. 2010; Xue et al. 2006), que existiera una re-expresión luego del pico de muerte de los FRs en las retinas de ratones *rd1*.

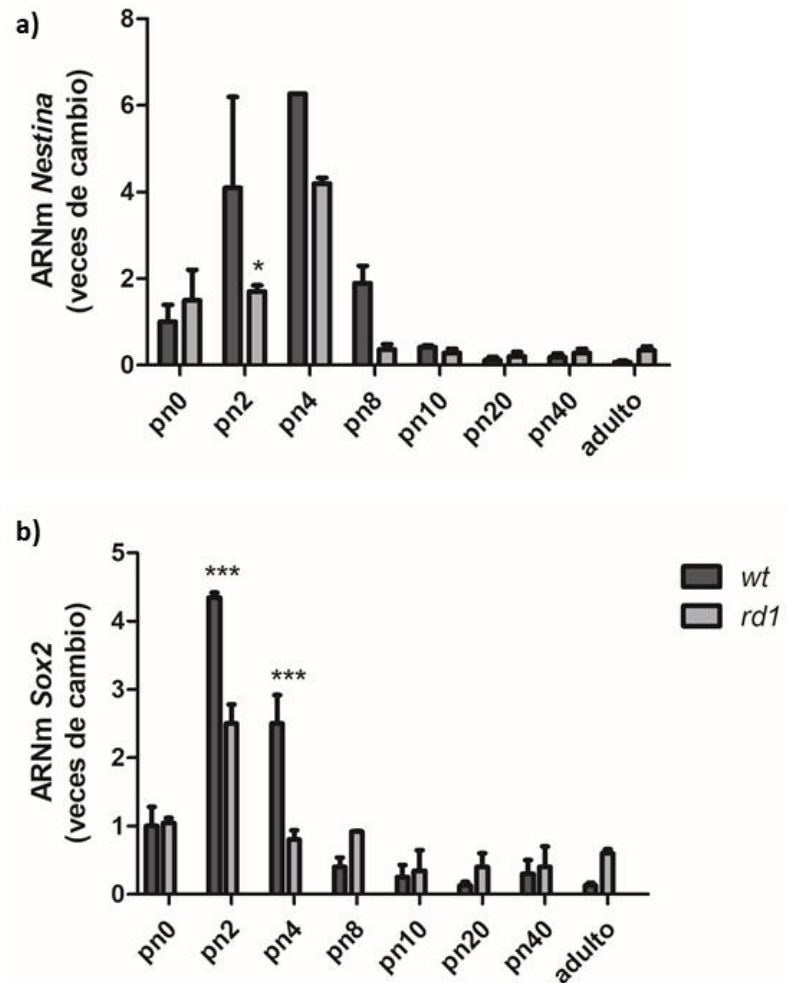


Figura 13. Niveles de ARNm de marcadores de células madre en retinas enteras de ratones wt y rd1. La expresión del ARNm de Nestina a días PN 0, 2, 4, 8, 10, 20, 40 y adulto de retinas de ratones wt y rd1 se expresa como veces de cambio en relación a la expresión de Nestina a día PN0 en retina wt (a). La expresión del ARNm de Sox2, medida a los mismos días y expresado de la misma forma que para Nestina, se muestra en (b). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres ratones a cada día PN estudiado. El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

La disminución en la expresión de *Nestina* en las CGM en cultivo y en las retinas de ratones *rd1*, durante los primeros días PN, nos llevó a investigar si durante el pico de la neurodegeneración, en cortes histológicos de retinas, también se encontraba alguna alteración en esta proteína.

Cuando comparamos la morfología de las CGM en cortes de día PN 14, de retinas *wt* y *rd1*, observamos que la marcación de NESTINA en las CGM *wt* abarcó todas las capas celulares, mientras que en las CGM *rd1* esta marca se observó principalmente desde la CNi hasta la capa de células ganglionares (**Fig. 14 a-h**). Además, el análisis comparativo de las proyecciones de las CGM NESTINA (+) en un área equivalente en superficie y posición en los cortes de retinas *wt* y *rd1*, reveló que el número de proyecciones de CGM en las retinas *rd1* fue menor que en las retinas *wt* (**Fig. 14 i**). También analizamos el espesor de las proyecciones de las CGM y notamos que en las retinas *rd1* estaban basalmente más engrosadas que las correspondientes *wt* (**Fig. 14 j**).

Finalmente, en concordancia con los resultados obtenidos en cultivo, el análisis de la intensidad de fluorescencia luego de la inmunomarcación con el anticuerpo anti-NESTINA, mostró una menor intensidad de fluorescencia en las retinas *rd1* en comparación con las retinas *wt* (**Fig. 14 k**). En su conjunto, estos resultados, indican una menor expresión de NESTINA en las retinas *rd1*.

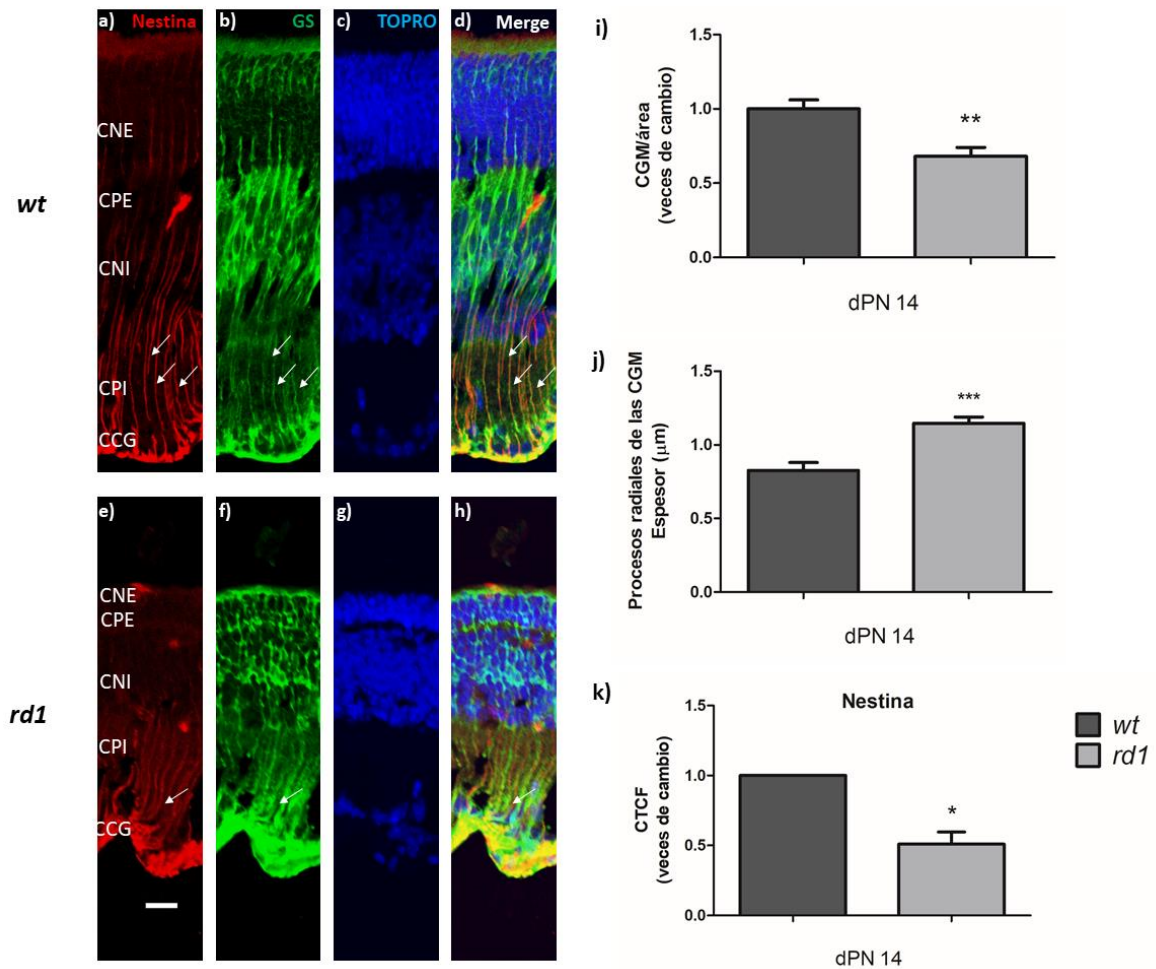


Figura 14. Patrón de expresión del filamento intermedio NESTINA en cortes histológicos de retinas de ratones wt y rd1. Las fotomicrografías de fluorescencia muestran las proyecciones de las CGM wt (a-d) y rd1 (e-h) a través de la marcación de NESTINA (a, e) y GLUTAMINA SINTASA (GS) (b, f) a día PN 14. Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear TOPRO (c, g). Merge (d, h). Al comparar una misma área, se observa que el número de CGM NESTINA (+) en las retinas rd1 es menor al número de CGM en las retinas wt (i). Las CGM rd1 se extienden hacia la capa ganglionar y se observan engrosadas en comparación con las CGM wt (j) (flechas finas en a, b, d, e, f, h). La intensidad de fluorescencia para la marcación de NESTINA es menor en las retinas rd1 respecto de las retinas wt (k). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres ratones al día PN estudiado. El análisis estadístico se hizo por test de student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$. La escala representa 20 μ m.

Con respecto a SOX2, el análisis de este factor de transcripción en cortes de retinas, *wt* y *rd1*, al día PN 14, mostró una disminución del número de núcleos SOX2 positivos en las retinas *rd1* (**Fig. 15 a-g**), en particular, en la capa de células ganglionares (**Fig. 15 h**). Por su parte, las diferencias en el número de células SOX2 positivas en la CNV no fueron significativas (no mostrado).

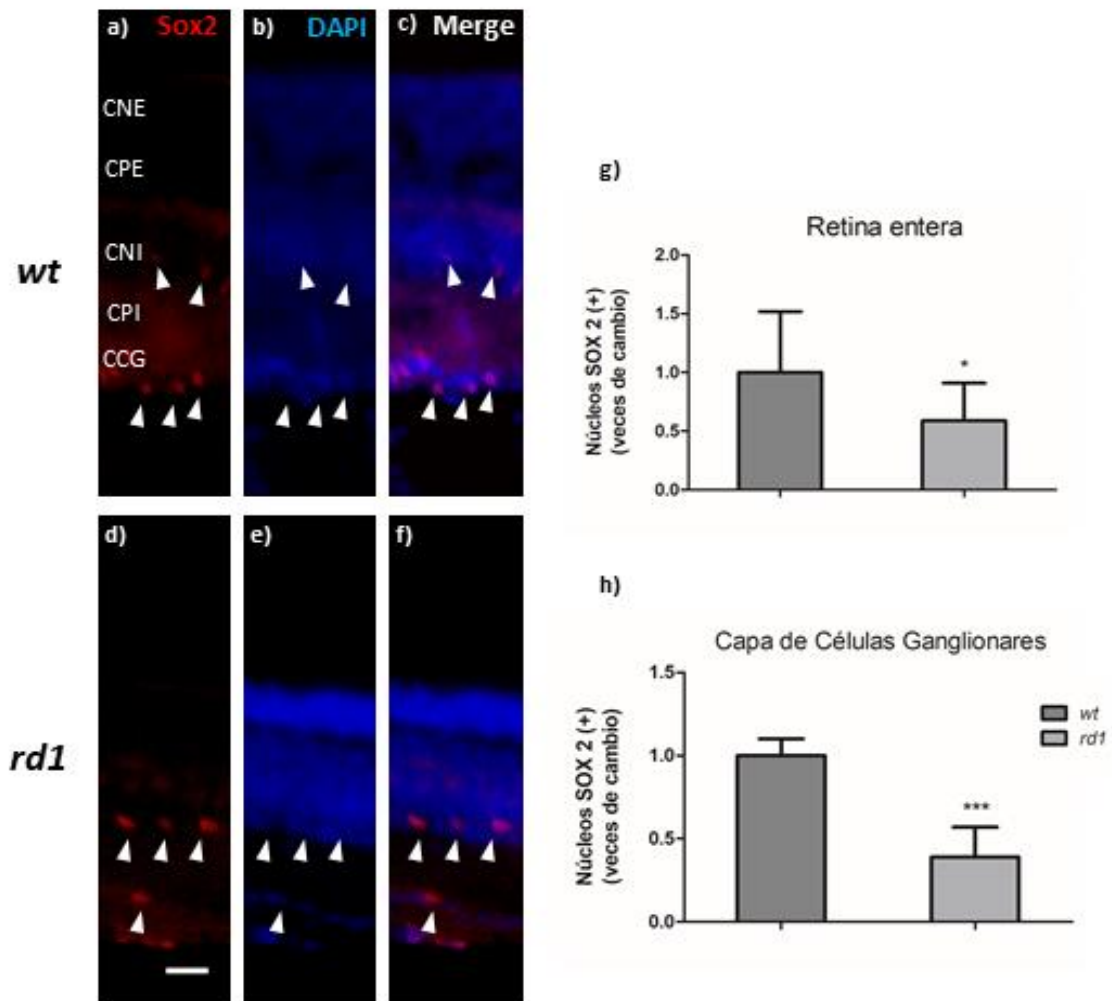


Figura 15. Expresión de SOX2 en cortes histológicos de retinas de ratones wt y rd1. Las fotomicrografías de fluorescencia muestran la marcación de SOX2 en cortes de retina de ratones wt (a) y rd1 (d) de día PN14 (cabezas de flecha). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear DAPI (b, e). Merge (c, f). Obsérvese la disminución en el número de núcleos positivos para SOX2 en los cortes de retina de ratones rd1 (g). El número de células SOX2 positivas se encuentra específicamente disminuido en la CG (h). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres ratones al día PN estudiado. El análisis estadístico se hizo por test de student. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. La escala representa 30 μ m.

Efecto de la interacción con neuronas en la expresión de NESTINA

Los resultados expuestos hasta aquí indican que las CGM *rd1* presentan alteraciones estructurales y en la expresión de distintos marcadores de células madre que podrían afectar los procesos de regeneración durante el transcurso de la degeneración de las neuronas fotorreceptoras, ya sea impidiéndolo o disminuyéndolo.

Respecto del modelo *rd1*, utilizado en este trabajo de tesis, se sabe que la causa principal de la degeneración se debe a la mutación en la enzima PED6 β que afecta a los FRs, por lo que surge el interrogante de cuál sería la causa de las alteraciones observadas en las CGM *rd1*. Nuestra hipótesis es que una posible causa de este déficit podría deberse a alteraciones en el diálogo neuro-glial; más precisamente, que las alteraciones en los FRs afectarían la funcionalidad de las CGM. Los resultados mencionados anteriormente indican alteraciones en las CGM *rd1* previas al inicio de la muerte masiva de FRs.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se demostró que al sembrar CGM en cultivos mixtos con neuronas de retina, la interacción entre neuronas y CGM preservaba en estas últimas la expresión de marcadores de células madre (Insua et al. 2008); y que, a su vez, las CGM inducían la expresión de estos marcadores en progenitores indiferenciados de retina (Simón et al. 2012). La notable influencia que se ejercen mutuamente las neuronas y las CGM, preservando características de multipotencialidad, nos llevó a postular que las modificaciones observadas en las CGM *rd1* sugerirían que el "diálogo" neuro-glial necesario para el desarrollo de la retina estaría alterado, afectando tanto el ciclo celular como la expresión de los distintos marcadores de multipotencialidad estudiados.

Si nuestra hipótesis es correcta, entonces, la exposición de CGM provenientes de ratones *rd1* a neuronas sanas, provenientes de ratones *wt*, debería estimular la expresión de marcadores de multipotencialidad en las CGM *rd1*. Para evaluar esta posibilidad analizamos la expresión de *Nestina* en las CGM *rd1* en co-cultivo con neuronas *wt* y viceversa, en las CGM *wt* en co-cultivo con neuronas *rd1*.

Para ello obtuvimos cultivos puros neuronales y puros de CGM a partir de retinas de ratones *wt* y *rd1*. Luego de 3 días en cultivo, las neuronas (*wt* o *rd1*)

fueron co-cultivadas con CGM (*wt* o *rd1*) por 24 hs. Las neuronas de los cultivos neuronales puros, en cada experimento, fueron marcadas con la sonda CellTracker® para su posterior identificación (**Fig. 5**). Pasado el período de co-incubación analizamos la expresión de *Nestina*.

Los resultados mostraron que el co-cultivo de CGM *wt* con neuronas *rd1* provocó una disminución en la expresión de NESTINA, observada tanto por inmunocitoquímica (**Fig. 16 e-h, i**) como por qRTPCR (**Fig. 16 j**), respecto a los niveles obtenidos al co-cultivar CGM *wt* con neuronas *wt* (**Fig. 16 a-d, i, j**).

Por el contrario, el contacto de CGM *rd1* en co-cultivo con neuronas *wt* (**Fig. 17 e-h**) estimuló la expresión de *Nestina* (**Fig. 17 i, j**) respecto de cuando las CGM *rd1* fueron incubadas con neuronas *rd1* (**Fig. 17 a-d, i, j**).

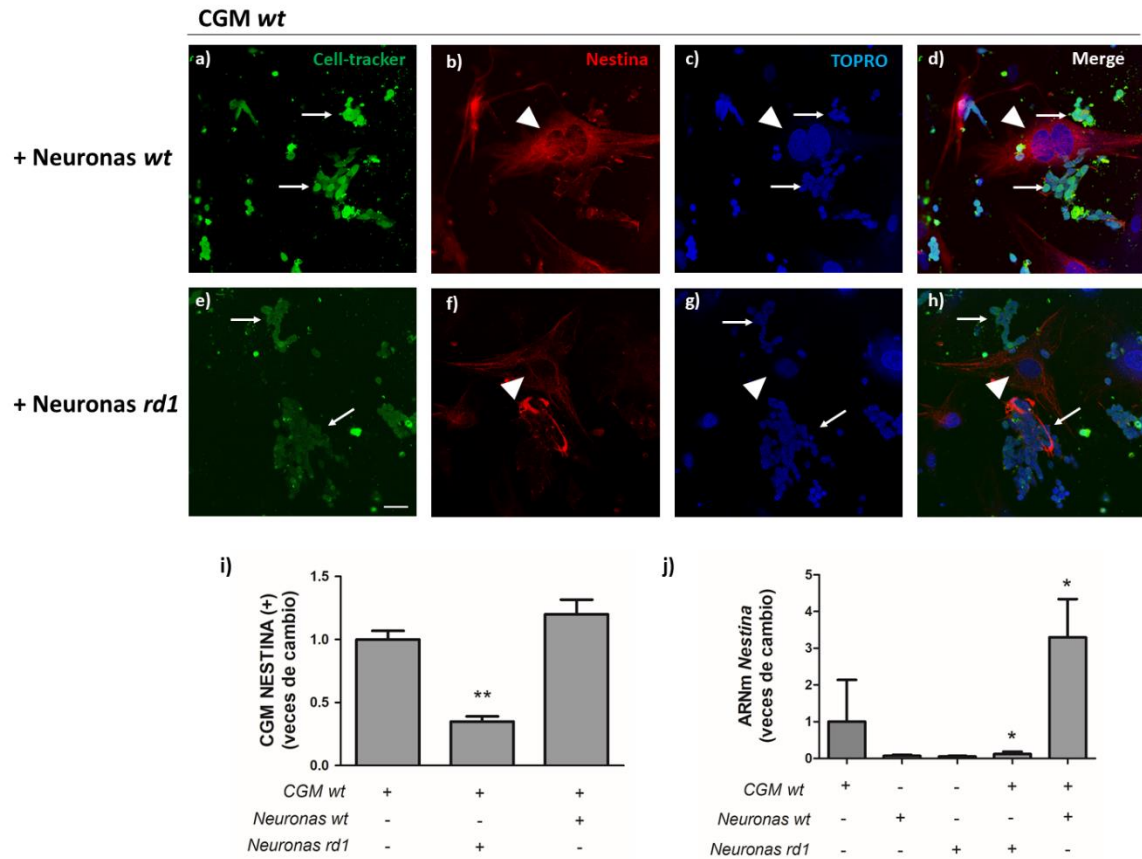


Figura 16. Las neuronas rd1 disminuyeron la expresión de Nestina en las CGM wt. Las fotomicrografías de fluorescencia de co-cultivos neuro-gliales de CGM wt con neuronas wt (a-d) y CGM wt con neuronas rd1 (e-h) muestran en verde las neuronas marcadas con la sonda CellTracker® (flechas finas) (a, e) y en rojo los filamentos de NESTINA en las CGM (cabeza de flecha) (b, f). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear TOPRO (c, g). Merge (d, h). La proporción de CGM wt que expresan NESTINA cuando están en contacto con neuronas rd1 es significativamente menor que cuando están en contacto con neuronas wt (i), lo mismo ocurre con el nivel de ARNm de Nestina (j). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres experimentos separados (n=3). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de tukey. *p<0.05, ** p<0.01. La escala representa 40 μ m.

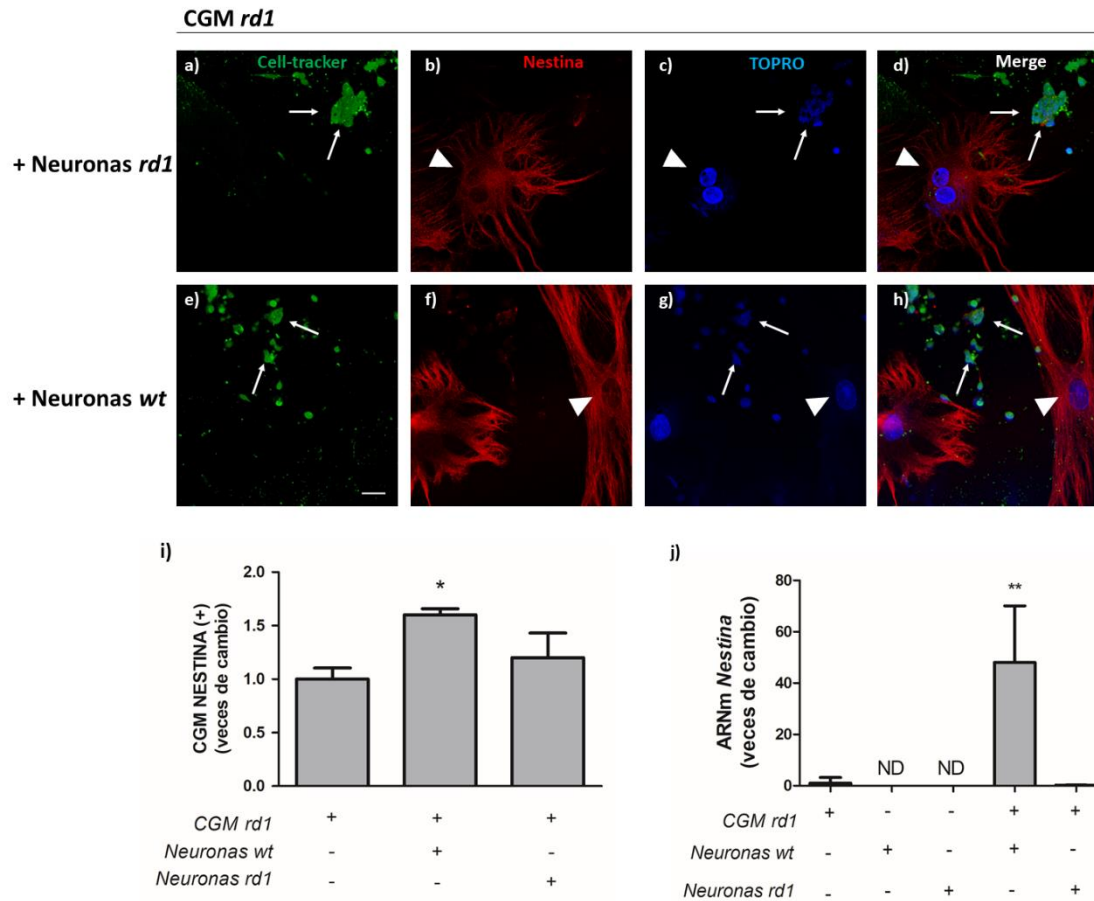


Figura 17. Las neuronas wt aumentaron la expresión de NESTINA en las CGM rd1. Las fotomicrografías de fluorescencia de co-cultivos neuro-gliales de CGM rd1 con neuronas rd1 (a-d) y CGM rd1 con neuronas wt (e-h) muestran en verde las neuronas marcadas con la sonda CellTracker® (flechas finas) (a, e) y en rojo los filamentos de NESTINA en las CGM (cabeza de flecha) (b, f). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear TOPRO (c, g). Merge (d, h). La proporción de CGM rd1 que expresan NESTINA cuando están en contacto con neuronas wt es significativamente mayor que cuando están en contacto con neuronas rd1 (i), lo mismo ocurre con el nivel de ARNm de Nestina (j). ND: no detectable. Los resultados representan el promedio \pm sd de tres experimentos separados (n=3). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. La escala representa 40 μ m.

Conclusiones del capítulo I

En este capítulo estudiamos las posibles alteraciones en la expresión de distintos marcadores de células madre en las CGM de retinas de ratones *rd1* y concluimos que:

- Fue posible reproducir en cultivo el proceso de muerte de las neuronas FRs portadoras de la mutación que caracteriza a nuestro modelo de RP, tal como ocurre *in vivo*.
- Las CGM *rd1* soportaron un número mayor de neuronas en cultivo que las correspondientes *wt*. Esto se correspondió con una menor proliferación de las CGM *rd1* en comparación con las CGM *wt*, tanto en el período previo al inicio de la degeneración como en el comprendido dentro del pico de muerte de los FRs y con una expresión ligeramente mayor de N-CADHERINA en las CGM *rd1*.
- Los núcleos de las CGM *rd1* mostraron irregularidades en su morfología, lo cual fue acompañado por cambios en la distribución de la lamina A en la envoltura nuclear.
- La expresión del filamento intermedio, *Nestina*, marcador de células madre, fue menor en las CGM *rd1* y se estimuló cuando estas últimas fueron co-cultivadas con neuronas *wt*. Por el contrario, el contacto de CGM *wt* con neuronas *rd1* provocó una disminución en la expresión de *Nestina*.
- El estudio *in vivo* mediante cortes histológicos de retinas de ratones *wt* y *rd1* reveló alteraciones estructurales en las CGM *rd1* que expresan NESTINA, como también una disminución en la expresión de este filamento intermedio, tanto a nivel proteico en el momento del pico de muerte de los FRs como de su ARNm en los primeros días PN de los ratones *rd1*.
- La expresión del factor de transcripción nuclear *Sox2* mostró una disminución en el número de células que lo expresan en la capa de células ganglionares, y en los niveles de ARNm en los primeros días de vida de los ratones *rd1*.

En general estos resultados sugieren que en los ratones *rd1*, así como en la RP, estaría alterado el diálogo normal entre las neuronas y las células gliales generando una disminución en la capacidad regenerativa de las CGM.

DISCUSIÓN

Capítulo I

Dentro de la retina, las CGM han sido propuestas como células con capacidad de regenerar distintas poblaciones neuronales perdidas luego de un daño (Das et al. 2006; Fischer and Reh 2001, 2003; Reh and Fischer 2001). La hipótesis planteada al inicio de este trabajo de tesis fue si la degeneración progresiva de los FRs, en el modelo animal *rd1* de RP, afectaría la comunicación entre neuronas y células gliales, alterando la potencialidad regenerativa de estas últimas. El conjunto de resultados mostrados indicó que las CGM en las retinas de ratones *rd1*, bajo nuestras condiciones de trabajo y en comparación con CGM de ratones normales, poseen disminuidos los parámetros estudiados, característicos de células madre, como lo son la proliferación, la expresión del filamento intermedio *Nestina* y del factor de transcripción nuclear *Sox2*, tanto *in vivo* como en cultivo primario. Además, el contacto de estas CGM con neuronas sanas estimuló la expresión de *Nestina*.

Poder repoblar la retina mediante la movilización de células madre endógenas o mediante la inyección de células progenitoras de retina, es un área que aún requiere de una mayor comprensión, encontrando entre sus principales obstáculos, la limitada capacidad regenerativa que presentan los mamíferos. Una importante cuestión a tener en cuenta en el campo de los tratamientos con células madre es la fuente para la obtención de estas células y su incorporación al tejido receptor. Para ello es necesario conocer en detalle la biología de estas células para poder direccionarlas en el tipo celular deseado y lograr una integración exitosa en el tejido de destino. En la retina se han propuesto tres fuentes principales de células madre: el epitelio pigmentado de la retina a través de su transdiferenciación, las células del margen ciliar y las CGM (Yu et al. 2014), estas últimas son una de las más estudiadas y caracterizadas. Al respecto, se ha visto que diversos tipos de daños a la retina inducen su proliferación y desdiferenciación, tanto *in vivo* (Das et al. 2006) como en cultivo (Abraham et al. 2009). El poder estudiarlas en cultivo primario nos brinda una herramienta muy valiosa, ya que podemos analizar efectos de compuestos o factores aislados, los cuales son difíciles de controlar debido a las interacciones que ocurren en los tejidos u órganos enteros. Nuestro trabajo muestra que es posible analizar, en cultivo primario de retina, el proceso neurodegenerativo que ocurre en el ratón *rd1* y la interacción de los 2 tipos celulares principales estudiados, neuronas y células gliales, así como también la manipulación de los

cultivos puros de cada una de estas células, para evaluar el comportamiento de las CGM al ser expuestas a neuronas sanas o con la mutación.

Respuesta de las CGM frente a la degeneración de los FRs

Durante un daño en la retina, las CGM responden mediante un proceso característico llamada gliosis. Este puede ser inducido por degeneración de la retina, por un daño mecánico, inflamación o por el envejecimiento. Los cambios que sufrirán estas CGM durante la respuesta al daño van a depender principalmente de la duración del mismo más que de su severidad (Hippert et al. 2015). Así es que se pueden distinguir, como características comunes, cambios reactivos que involucran hipertrofia y aumento de la proteína GFAP y dependiendo entonces de la duración del daño, si habrá aumento de la proliferación o no, clasificando la respuesta gliótica en proliferativa y no proliferativa (Bringmann et al. 2000; Landiev et al. 2006).

En esta tesis analizamos la actividad proliferativa de las CGM de cultivos primarios de retina, tanto *wt* como *rd1*, y nuestros resultados mostraron una menor tasa de proliferación para las CGM *rd1*. Este resultado, por un lado, apoya a la hipótesis de que las CGM *rd1* presentan una capacidad regenerativa disminuida y por otro sugiere que la respuesta de estas células, frente a esta neurodegeneración, no sería de tipo proliferativa, al menos, en el período estudiado. Las alteraciones nucleares que se observaron podrían tener relación con la disminuida capacidad para dividirse de estas células, aunque establecer este aspecto requeriría de un estudio mayor. Es de destacar que la capacidad proliferativa significativamente disminuida que se observó a los 6 días de cultivo en las CGM *rd1* contribuiría a explicar porque la relación entre el número de células gliales y neuronas se encontró aumentada en los cultivos mixtos neuro-gliales *rd1*. En otras palabras, dado que las CGM no proliferaron al ritmo que lo hacen las CGM *wt*, se favoreció que hubiese un mayor número de neuronas distribuidas sobre la superficie de un menor número de CGM *rd1*. Con relación a esto, hipotetizamos que un parámetro que podría incidir en el número de neuronas adheridas a las CGM era la molécula de adhesión celular N-CADHERINA. Esta pertenece a la familia de las cadherinas, moléculas dependientes de calcio implicadas en la migración de los progenitores retinales a través de los procesos radiales de las CGM (Nagashima et al. 2013,

Raymond et al. 2006). A través de su dominio citoplasmático juega un rol importante en la activación de vías de señalización que involucran a β -catenina y Wnt, ambas relacionadas con procesos regenerativos; y vías de supervivencia como PI3K/Akt (Ando et al. 2011). Cuando investigamos su expresión, a días tempranos, hallamos que fue mayor en los cultivos mixtos *rd1* que en los cultivos *wt*. Sin embargo, estos datos no fueron concluyentes, por lo que su expresión aún requiere de un estudio mayor.

Otra hipótesis que podría explicar el mayor número de neuronas por CGM, si bien menos probable pero que no puede dejarse de lado, es que exista un mayor número de progenitores a día PN 2 en las retinas *rd1* o que estos presenten mayor proliferación y entonces al extenderse las CGM en nuestros cultivos lo hagan con un mayor número de neuronas desarrollando en su superficie.

Otro marcador de células madre que mostró disminuida su expresión fue el filamento intermedio *Nestina*. El citoesqueleto de las células eucariotas está compuesto por tres tipos de estructuras filamentosas: los microfilamentos de actina, microtúbulos y los filamentos intermedios. NESTINA es un miembro de estos filamentos intermedios y desde su identificación es aceptada como marcador de células madre neuronales durante el desarrollo embrionario, como también en el cerebro adulto (Lendahl et al., 1990). Durante el desarrollo, las células progenitoras neurales mantienen una proliferación activa con elevada expresión de NESTINA, cuando cesan la división y comienzan a diferenciarse, la expresión de *Nestina* disminuye por regulación negativa, mientras que otros filamentos intermedios comienzan a aumentar (Wiese et al. 2004). Las evidencias muestran que, a diferencia de otros filamentos intermedios, NESTINA no puede polimerizar por sí misma y debe copolimerizar con otros filamentos del citoesqueleto. Se ha visto también que se despolimeriza durante la mitosis y vuelve a ser reincorporada a la red de filamentos intermedios en la fase G1 (Chou et al. 2003). Esto nos llevó a pensar que tendría un rol importante en coordinar cambios en la red de filamentos intermedios en células en división activa, aunque esto no está claro todavía. Por su parte, Park et al. (2010), mostraron que NESTINA es importante para la supervivencia y renovación de las células madre neuronales durante el desarrollo embrionario, y que esta función no requiere de su incorporación en el citoesqueleto o interacción con otros filamentos intermedios. En un modelo de retinitis pigmentosa de rata donde la mutación responsable se ubica en células del EPR se observó una

alteración en la expresión de *Nestina*, encontrándose disminuida en la retina de estos animales a partir de la primera semana de vida (Valamanesh et al. 2013). Nuestros resultados mostraron que las CGM de retinas de ratones *rd1* poseen menos expresión de NESTINA tanto a nivel de ARNm como de proteína, pero no se observan cambios a nivel de la disposición de estos filamentos en el citoesqueleto de las células en cultivo, lo que sugiere que la disminución observada afectaría el potencial regenerativo de las células gliales. Por otro lado, también observamos una disminución en la expresión de *Vimentina*, otro marcador de células madre (Boraas et al. 2016).

El análisis de NESTINA en cortes histológicos de retina confirmó la disminución observada en cultivo, así como la existencia de alteraciones morfológicas de las CGM y de expresión del factor de transcripción nuclear *Sox2* necesario para mantener la identidad de célula madre de las CGM y que también está involucrado en procesos de crecimiento glial y de adhesión necesarios para que estas células puedan mantener la citoarquitectura de la retina (Bachleda et al., 2016; Surzenko et al. 2013). Por otro lado, resulta sugestiva la idea de que la disminución de los filamentos intermedios en las CGM *rd1* podría relacionarse con las alteraciones nucleares observadas, pero es un aspecto que aún requiere ser esclarecido.

Como se mencionó antes, en este trabajo de tesis mostramos la disminución de NESTINA en las CGM en un modelo de neurodegeneración de la retina. En principio, este resultado estaría en oposición con numerosos trabajos que muestran, como característica de la reactividad glial, aumento en la expresión de distintos filamentos intermedios (Hippert et al. 2015; Luna et al. 2010). Las características de la reactividad glial, tanto a nivel molecular como celular, son enfermedad dependiente y esto es lo que hace a esta respuesta glial una reacción compleja. Por ejemplo, ante una infección o ciertos escenarios inflamatorios, la respuesta glial es generalizada e inespecífica e involucra hipertrofia, regulación positiva de filamentos intermedios, aumento de la proliferación, pérdida de funciones, regulación negativa de glutamina sintasa (excepto en la retinopatía diabética donde no se modifica la expresión de esta última) (Mizutani et al., 1998), remodelación de la vasculatura y el tejido retiniano (Vecino et al. 2016). Los daños realizados en la retina en estos modelos son agudos, de rápida evolución, pero existen pocas evidencias sobre lo que ocurre cuando el daño es más lento y

progresivo como en el caso de una enfermedad neurodegenerativa. En un trabajo previo, Hippert *et al.* (2015), analizaron la respuesta de las CGM en 4 modelos animales de neurodegeneración de la retina y concluyeron que las diferentes causas genéticas de estas enfermedades provocan una respuesta diferente de las CGM y que la magnitud de la respuesta glial no está directamente correlacionada con la magnitud del daño. Es importante mencionar también que no todas las CGM en la retina presentan el mismo fenotipo, en los últimos años han surgido diversos trabajos que ponen en evidencia la presencia de heterogeneidad o subpoblaciones dentro de las CGM totales en la retina. Se ha visto que la expresión de ciertos marcadores puede estar limitada solo a un grupo de estas células gliales y que no todas van a responder de la misma manera frente a un daño. En retinas de pollo se observó que frente a un daño inducido con NMDA se vuelven proliferativas solo aquellas CGM que sean GFAP negativas (Hauck *et al.*, 2014). También se han visto diferencias en la expresión de *Nestina* luego de un daño en retinas adultas, indicando que el potencial regenerativo estaría limitado solo a una subpoblación de estas células gliales (Luna *et al.* 2010).

En su trabajo, Roesch *et al.* (2012) comparan la expresión de diversos genes en CGM individuales de ratones modelo de RP y ratones normales y encuentran una gran variabilidad en la expresión de los mismos entre las CGM de un mismo ratón, ya sean normales o mutantes. Dado que dentro de las CGM de la retina existe una gran diversidad de fenotipos, algunas de ellas podrían responder de forma reactiva, mientras que otras que presentan marcadores de indiferenciación, permitirían generar nuevos progenitores de retina que reemplacen las neuronas perdidas. La heterogeneidad presentada por las CGM podría reflejar interacciones neurona-glía específicas según el tipo de daño inducido en la retina, por lo que no sería posible definir una respuesta generalizada para las CGM en el ratón *Pde6b^{rd1/rd1}*. En futuras investigaciones deberíamos poder definir si la población de CGM que presenta disminuido su potencial regenerativo es la misma que se muestra reactiva, o si se trata de poblaciones diferentes que podrían ser manipuladas de forma independiente y así favorecer un ambiente propicio para la regeneración.

Una pregunta que surge luego de analizar nuestros resultados es ¿por qué en el modelo animal *rd1*, donde la mutación en la enzima PDE6B es exclusiva de los FRs, las CGM presentan alteraciones en su potencial regenerativo? Los

cambios observados en las CGM durante el pico de la neurodegeneración podrían ser explicados por la muerte masiva de los FRs, pero nuestros resultados mostraron diferencias significativas entre las CGM *wt* y *rd1* a días tempranos en cultivo donde aún no ha comenzado la muerte masiva de los FRs. Estos resultados son: la expresión de *Bax*, la proliferación, alteraciones en la morfología nuclear, la expresión de *Nestina* y *Sox2*; y posiblemente los niveles de N-CADHERINA. Además, observamos que el co-cultivar CGM de ratones *wt* con neuronas de ratones *rd1* de sólo 3 días en cultivo fue suficiente para provocar en las primeras una disminución en la expresión de *Nestina*.

Estos resultados generan muchos interrogantes acerca de cuáles son los cambios tempranos que están sufriendo los FRs y que pueden ser detectados por las CGM para provocar en ellas los cambios observados y cuál o cuáles son las moléculas involucradas en este diálogo neuro-glial. Dilucidar estos aspectos nos permitiría poder manipular estas células y aportar estrategias que puedan favorecer a las terapias de reemplazo celular. El rol de la PED6 β se encuentra bien caracterizado en retinas maduras, pero se ha visto que su expresión en la retina es también temprana, incluso durante el desarrollo embrionario. En su trabajo Bibb *et al.* (2001), muestran expresión de *Pde6b* en embriones de 12 días, mientras que *Pde6a* y *Pde6g* comienzan su expresión a día PN 1 y otras proteínas de la fototransducción, como OPSINA, no lo hacen hasta el día PN 5. El rol de la PDE6B en estos estadios tempranos aún no ha sido caracterizado (Assaf *et al.*, 2015). Por otro lado, dentro de los posibles candidatos a participar en este diálogo neuro-glial se encuentran neurotransmisores como el glutamato y el ácido γ -aminobutírico (GABA). El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante en la retina, comienza su expresión a día PN 3 (Nivison-Smith *et al.* 2014) y es continuamente liberado en la retina externa por los FRs, liberación que es inhibida por luz. Se ha demostrado que este neurotransmisor induce la expresión de marcadores de progenitores celulares en CGM de retinas adultas murinas, tanto *in vivo* como en cultivo (Takeda *et al.* 2008), que promueve la proliferación de progenitores derivados de las CGM (Ramírez and Lamas 2009) y que puede estimular la desdiferenciación de las CGM a través de modificaciones genéticas y epigenéticas en cultivos primarios obtenidos de retinas de ratas (Reyes-Aguirre *et al.* 2013). Como se mencionó anteriormente el glutamato es captado por las CGM (Bringmann *et al.* 2006, 2009), lo cual regula su actividad y por ende el diálogo neuro-glial. En

este contexto, si la liberación de glutamato se reduce a consecuencia de la muerte de los FRs, entonces se afectaría la actividad normal de las CGM y con ello su capacidad regenerativa.

Por su parte, se ha reportado que el neurotransmisor GABA estaría involucrado en la regulación del mantenimiento del estado de células madre en células de tipo glial en el hipocampo de ratones (Song et al. 2012); y en zebrafish, la inhibición de los receptores para GABA, mostró una estimulación de la regeneración por parte de las CGM (Rao et al., 2017). Por todo esto, el rol de estos neurotransmisores en la comunicación neuro-glial en retinas de ratones *rd1* requiere ser establecido.

En conclusión, el conjunto de resultados indica que en nuestro modelo de neurodegeneración se encuentra alterada la comunicación entre las neuronas y las células gliales, provocando cambios estructurales y en el potencial regenerativo de las CGM. Por ello, la posibilidad de investigar una terapia de reemplazo celular en el ratón *rd1*, debería contemplar el uso de CGM de ratones sanos y/o el desarrollo de estrategias que permitan recuperar la capacidad regenerativa de las CGM de ratones *rd1*.

CAPÍTULO II

La expresión de GFAP aumentó en las retinas y cultivos primarios mixtos neuro-gliales *rd1*

Los resultados descritos en el capítulo anterior mostraron alteraciones en el potencial regenerativo de las CGM en las retinas *rd1* que sugieren la existencia de un desequilibrio en las células gliales de la retina. Este desequilibrio conduciría al establecimiento de un ambiente pro-inflamatorio, propio de los procesos glióticos que ocurren frente a los daños en la retina y que dificultan la regeneración.

Dado que GFAP es un reconocido marcador de reactividad en las células gliales, investigamos si éste modificaba su expresión en las retinas de ratones *rd1*, así como también en los cultivos primarios mixtos neuro-gliales de retinas *rd1* luego de comparar con su contraparte *wt*.

El análisis de cortes de retinas *rd1* PN 14 mostró un mayor número de CGM que expresan este filamento intermedio, en comparación con cortes de retinas *wt* del mismo día PN (**Fig. 18 a, h**). El estudio de los niveles de ARNm de GFAP en retinas enteras *wt* y *rd1*, desde el desarrollo temprano de las mismas hasta la adultez, mostró un aumento significativo a partir del día PN 20 en las retinas *rd1*, coincidiendo con un avanzado grado de degeneración de los FRs (**Fig. 18 i**). Si bien no mostraron significancia estadística, también observamos aumentos en la expresión de *Gfap* en las retinas *rd1* a partir del día PN 4, cuando aún no ha comenzado masivamente la muerte neuronal.

A continuación, estudiamos el porcentaje de CGM positivas para la marcación de GFAP en cultivos mixtos neuro-gliales de 11 días. El número fue significativamente mayor en los cultivos de retinas *rd1*, que en los correspondientes *wt* (**Fig. 19 a, e**). Aumentando de un $2.8 \pm 0.4\%$ de CGM GFAP positivas en los cultivos *wt* a un $19.6 \pm 4.0\%$ en los cultivos *rd1* (**Fig. 19 i**). Tanto las células positivas para la marcación de GFAP como las negativas, expresaron el receptor RXR α (**Fig. 19 b, f**). Cuando analizamos la expresión de *Gfap*, a 6 días de cultivo, observamos un aumento significativo de dicha expresión en los cultivos mixtos de retinas *rd1*, siendo este 4.2 veces mayor que en los cultivos *wt*. Sin embargo, luego de 11 días no encontramos diferencias significativas entre ambos cultivos, *wt* y *rd1* (**Fig. 19 j**).

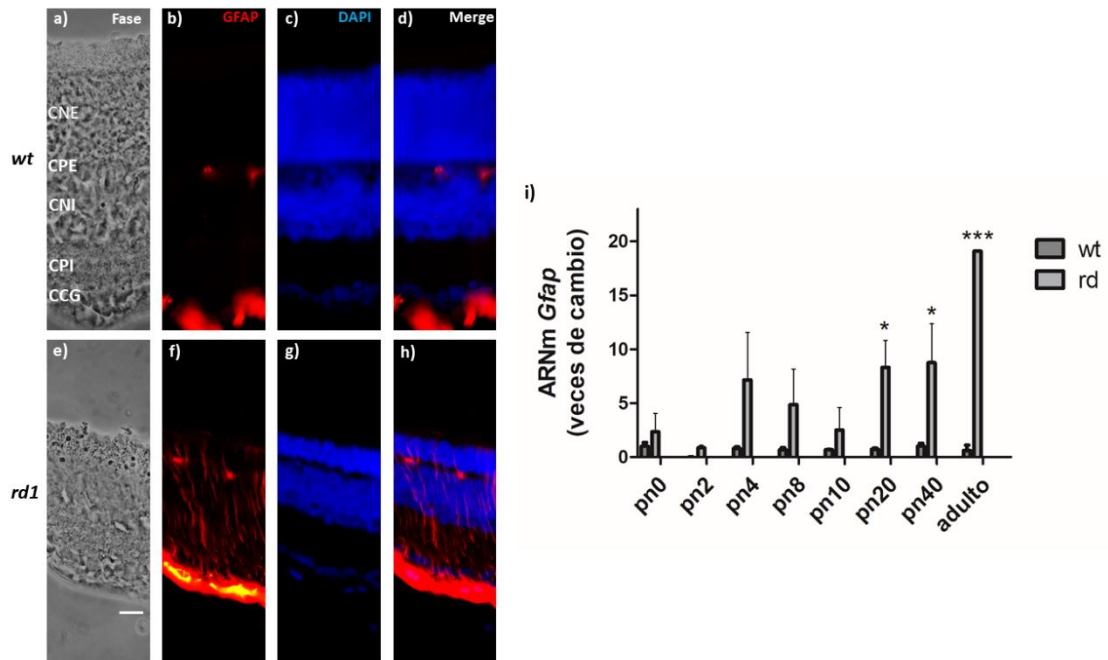


Figura 18. Expresión de GFAP en retinas de ratones wt y rd1. Las fotomicrografías de fase (a, e) y de fluorescencia (b, c, d, f, g, h) muestran la expresión de GFAP (b, f) en cortes de retina de ratones wt (a-d) y rd1 (e-h) a día PN14. Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear DAPI (c, g). Merge (d, h). La expresión de Gfap a días PN 0, 2, 4, 8, 10, 20, 40 y adulto de retinas wt y rd1 fue expresada como veces de cambio en relación a la expresión de Gfap a día PNO en retina wt. La expresión en retinas rd1 a partir de PN 20 fue significativamente mayor (i). Los resultados representan el promedio \pm sd de tres ratones al día PN estudiado. El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de tukey. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. La escala representa $40 \mu\text{m}$.

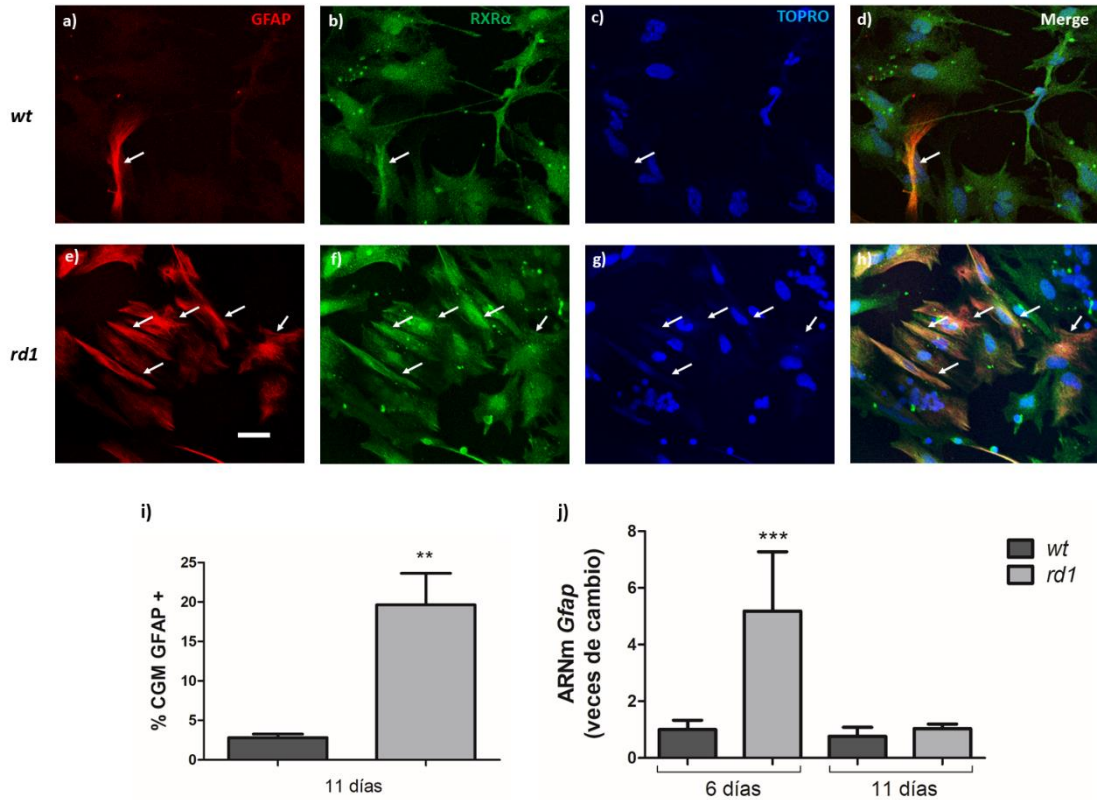


Figura 19. Expresión de GFAP en cultivos mixtos de retinas de ratones wt y rd1. Las fotomicrografías de fluorescencia (a-h) muestran la expresión de GFAP (a, e) en CGM de cultivos mixtos de 11 días de retinas de ratones wt (a-d) y rd1 (e-h) (flechas). En verde se muestra la marcación de los receptores RXR α (b, f). Los núcleos fueron marcados con la sonda nuclear TOPRO (c, g). Merge (d, h). En i) se muestra el aumento en el porcentaje de CGM GFAP positivas a 11 días en cultivos rd1 y en j) el aumento significativo de expresión de Gfap a 6 días en cultivo. Los resultados representan el promedio \pm sd de tres experimentos separados (n=3). El análisis estadístico se hizo por test de student (i) y ANOVA seguido de test de tukey (j). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. la escala representa 40 μ m

Alteraciones en la expresión del receptor RXR α en retinas *rd1* y de las isoformas α , β y γ en cultivos mixtos neuro-gliales *rd1*

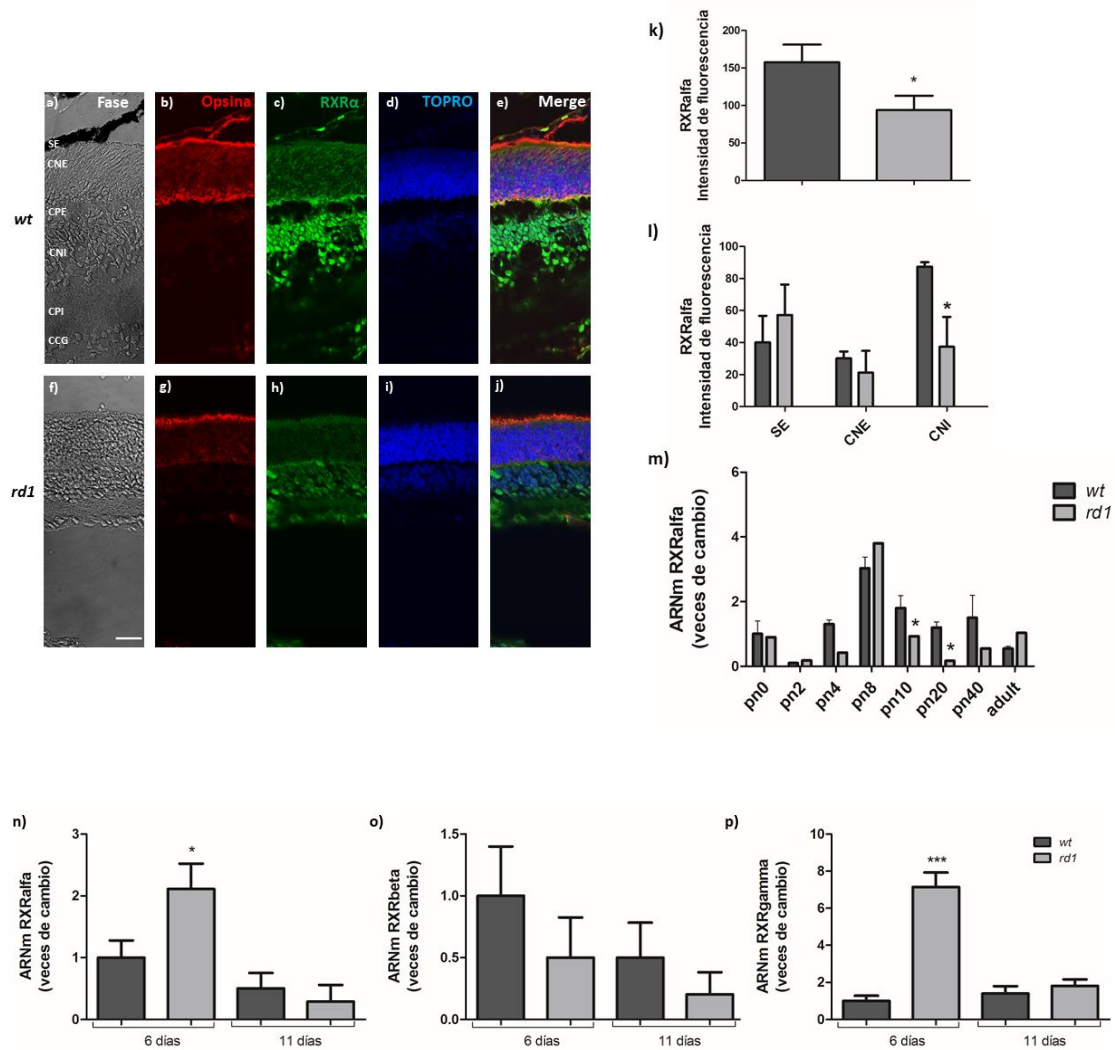
Recientemente, los receptores X para retinoideos (RXR) han sido involucrados en procesos de neuroinflamación que ocurren durante el desarrollo de diferentes patologías neurodegenerativas. Previamente en nuestro laboratorio se demostró que un ligando endógeno de los RXR, el ADH, y agonistas sintéticos promueven la supervivencia de los FRs en cultivos neuronales de retina de rata, mediante la activación de estos receptores (German et al. 2006). Para evaluar el posible rol de los mismos en los procesos de neuroinflamación y los efectos benéficos de su activación en el modelo *rd1* comenzamos por analizar, en cortes histológicos de retina, la expresión de la isoforma alfa, la cual en cerebro tiene como ligando endógeno al ADH.

El análisis de cortes de retinas de ratones *wt* y *rd1* a día PN 9, mostró que los RXR α se localizan tanto en células de la CNI como de la CNE, la cual a este día PN aún no se ve afectada por la muerte masiva de los FRs. A este tiempo del desarrollo no detectamos marcación en la capa de células ganglionares (**Fig. 20 a-j**). El análisis de la intensidad de fluorescencia, en el total de las capas de las retinas en los cortes, reveló una disminución significativa en las retinas *rd1* (**Fig. 20 k**). A su vez, el análisis de esta marcación del RXR α en la CNE, CNI y SE, evidenció una disminución significativa sólo en la CNI de retinas *rd1*, respecto de las retinas *wt* (**Fig. 20 l**).

A continuación, evaluamos a distintos días PN el nivel de ARNm de este receptor en retinas enteras de ambos ratones, *wt* y *rd1*, y encontramos que a partir del día PN 10, cuando se ha iniciado la degeneración, la expresión de los RXR α fue significativamente menor en las retinas *rd1* respecto de las retinas *wt*. A su vez, en los días previos al inicio de la muerte de los FRs observamos que no hubo cambios significativos en la expresión del RXR α y que solamente hacia el día PN 8 se evidenció un aumento en su expresión en las retinas *rd1* al compararla con retinas *wt* (**Fig. 20 m**) aunque no resultó significativo.

El análisis de la expresión de las 3 isoformas de este receptor en los cultivos mixtos neuro-gliales, tanto *wt* como *rd1*, mostró que a 6 días de cultivo las isoformas α y γ estaban significativamente aumentadas en los cultivos de retinas *rd1*, pero no

así la isoforma β . A medida que progresaron los cultivos, ya a los 11 días los niveles de expresión de todas las isoformas disminuyeron y no observamos diferencias significativas entre los cultivos de retinas *wt* y *rd1* (**Fig. 20 n-p**).



Efecto protector del agonista sintético de los RXR, PA024

En nuestro laboratorio se demostró que dos agonistas de los RXR, HX630 y PA024, mimetizan el efecto protector del ADH en modelos de degeneración de FRs en cultivos primarios de retinas de rata, siendo el PA024 el más efectivo (German et al. 2013). El ADH posee alta susceptibilidad a la peroxidación por lo que la utilización de agentes más estables que mimeticen su efecto protector sin ser sensibles a la peroxidación podría ser una herramienta útil para tratar enfermedades neurodegenerativas de la retina. Es por esto que, a continuación, tratamos cultivos mixtos neuro-gliales de retinas *rd1* con el agonista de los RXR, PA024 (0,1 μ M), para determinar si prevenía la muerte de los FRs, y luego de 11 días evaluamos el número de FRs apoptóticos mediante la técnica de TUNEL. Los resultados mostraron que el número de FRs apoptóticos TUNEL (+) disminuyó significativamente luego del tratamiento (**Fig. 21 a-j**) y el análisis de la expresión de *Bax* a 6 días mostró una disminución significativa en comparación con los niveles de ARNm hallados en las condiciones control y DMSO (**Fig. 21 k**). A 11 días, la expresión de *Bax* no evidenció cambios significativos (no mostrado).

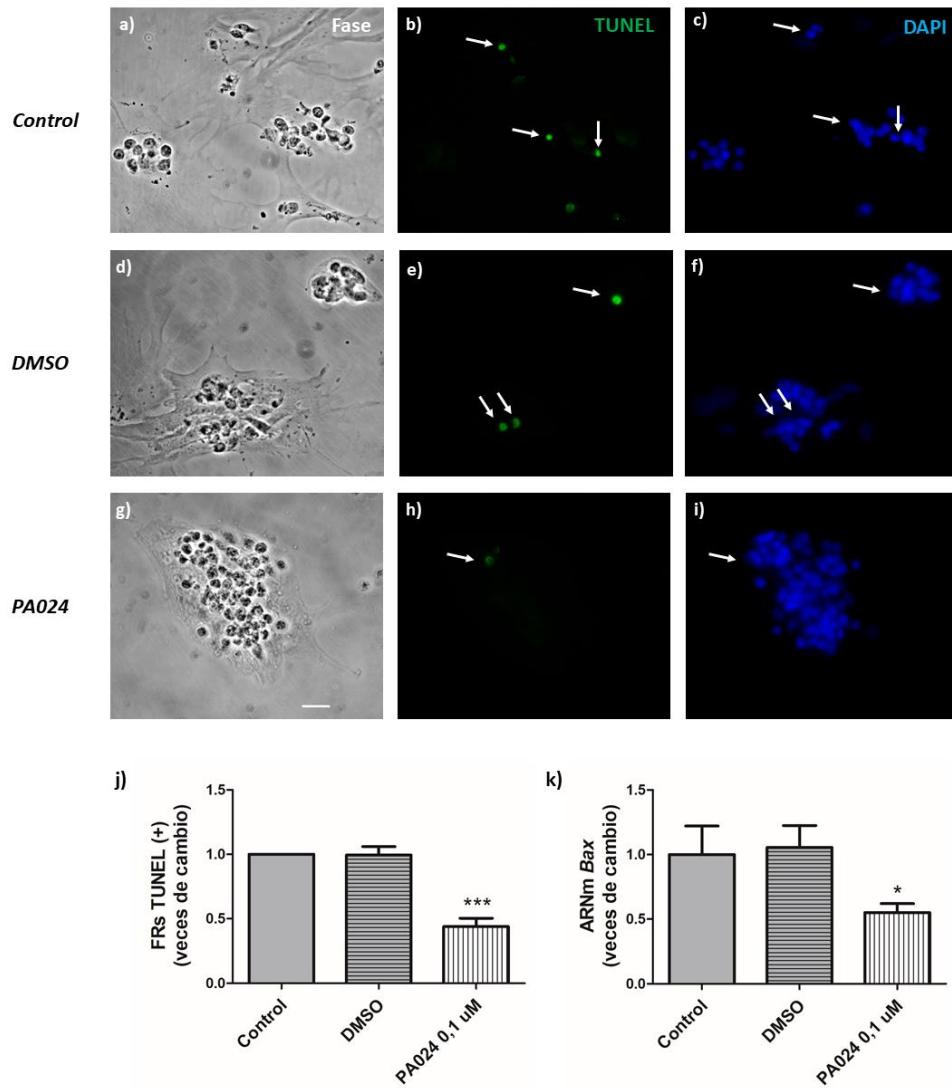


Figura 21. Efecto del tratamiento con el agonista PA024 sobre la supervivencia de FRs en cultivos mixtos neuro-gliales de retinas de ratones rd1. Las fotomicrografías de fase (a, d, g) y fluorescencia (b,c,e,f,h,i) de cultivos mixtos neuro-gliales rd1 de 11 días, muestran la presencia de neuronas apoptóticas detectadas mediante la técnica de TUNEL luego del tratamiento con el agonista PA024 0.1 μ M (h) comparando con condiciones control (b, e). En j) se muestra la disminución en el número de neuronas TUNEL (+) a 11 días en los cultivos rd1 tratados con el agonista y en k) la disminución de la expresión de Bax a 6 días en cultivo, respecto de las condiciones control. Los resultados representan el promedio \pm sd de cinco experimentos separados ($n=5$) para j) y el promedio \pm sd de tres experimentos separados ($n=3$) para k). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de tukey. * $p<0.05$, *** $p<0.001$. La escala representa 40 μ m.

Posteriormente investigamos si el PA024 podría disminuir la expresión de GFAP en las CGM en cultivos mixtos neuro-gliales. Efectivamente, el análisis de los cultivos de 11 días tratados con PA024 mostró una disminución en el número de CGM GFAP positivas (**Fig. 22 a-m**). El análisis de la expresión de *Gfap* no mostró diferencias significativas para el número de réplicas analizadas mediante el test estadístico ANOVA. No obstante, luego de contrastar los valores de la condición del agregado del agonista con la de su vehículo mediante el test de Student sugirió que el agonista podría estar disminuyendo el aumento de expresión previamente descrito a 6 días en los cultivos mixtos *rd1* (**Fig. 22 n**).

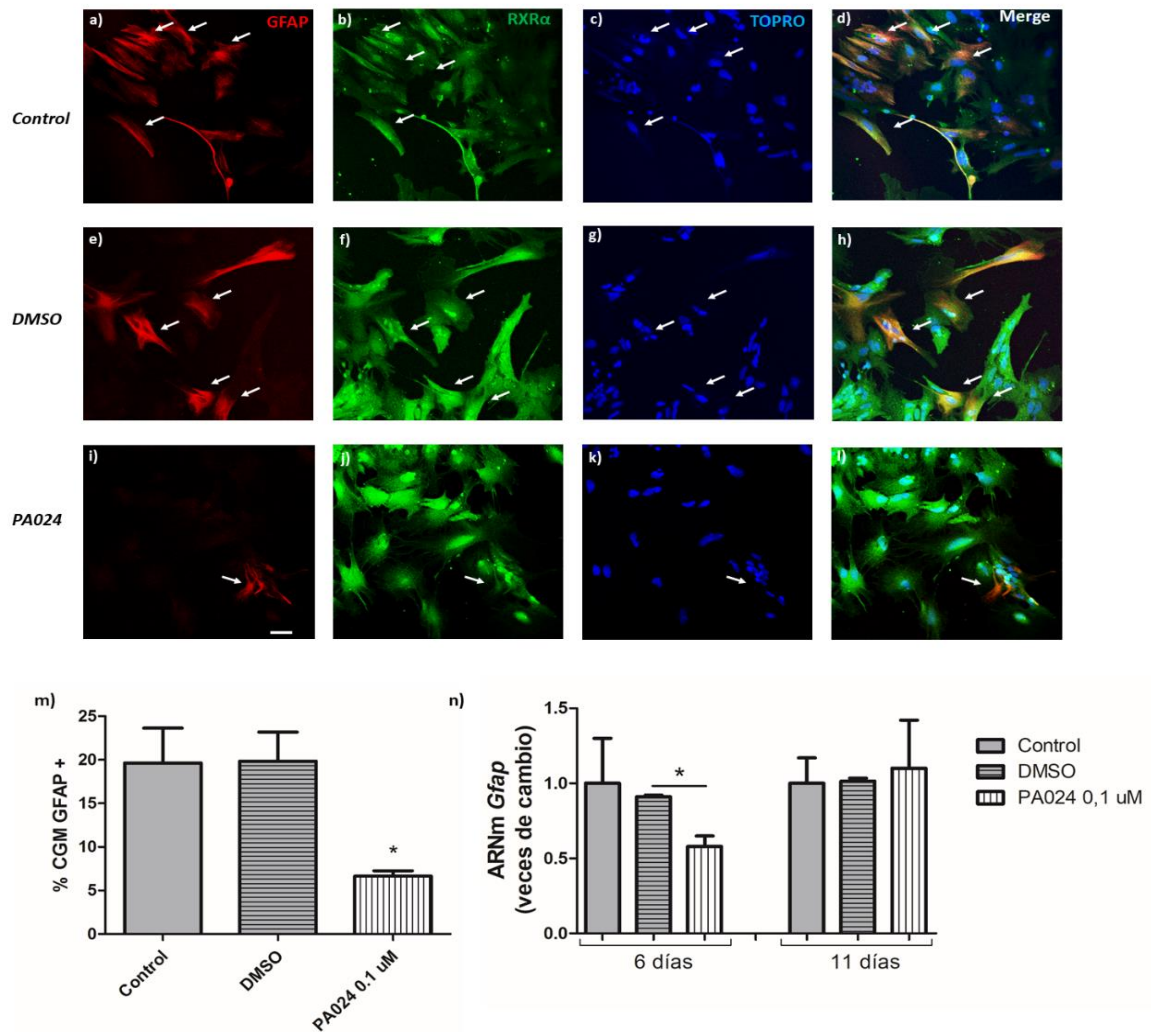


Figura 22. Efecto del tratamiento con el agonista PA024 sobre la expresión de GFAP en cultivos mixtos neuro-gliales de retinas de ratones wt y rd1. Las fotomicrografías de fluorescencia de cultivos mixtos neuro-gliales rd1 de 11 días muestran la presencia de CGM GFAP positivas (a, e, i) luego del tratamiento con el agonista PA024 (i-l), en condiciones control (a-d) y suplementados con el vehículo del PA024 (e-h). En m) se muestra el porcentaje de CGM GFAP (+) en los cultivos rd1 luego del tratamiento con PA024. En n) se muestra la expresión de Gfap luego del tratamiento con PA024 de cultivos mixtos rd1 a 6 y 11 días. Los resultados representan el promedio \pm sd de tres experimentos separados ($n=3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de tukey. A 6 días, la diferencia en los niveles de Gfap entre la condición con DMSO y PA024 0,1 μ M corresponde al análisis por test de student. * $p < 0.05$. La escala representa 20 μ m.

Conclusiones del capítulo II

En este capítulo estudiamos la expresión de la isoforma alfa en retina entera y las tres isoformas de los RXR en cultivos mixtos formados por neuronas, principalmente FRs y CGM; y un posible efecto protector y anti-inflamatorio del uso de un agonista sintético de estos receptores, PA024.

Luego de analizar los resultados mostrados concluimos que:

- La expresión de GFAP en retinas *rd1* aumentó desde días PN tempranos, así como también el número de CGM reactivas en cultivos mixtos neuro-gliales de retinas de ratones *rd1* respecto de su contraparte *wt*.
- La localización y expresión de la isoforma alfa de los RXR mostró alteraciones en las retinas *rd1*, respecto de las retinas *wt*. Su expresión disminuyó a partir del día PN9, particularmente en la CNI.
- La expresión de las isoformas alfa y gamma estuvo significativamente aumentada en cultivos mixtos neuro-gliales de 6 días de retinas *rd1*, pero no la de la isoforma beta.
- El tratamiento con el agonista sintético de los RXR, PA024, disminuyó la muerte de los FRs en cultivo y los niveles del ARNm de la proteína proapoptótica BAX, así como también el número de CGM reactivas.

Como conclusión general estos resultados sugieren que el tratamiento con este agonista sintético podría ser de utilidad para prevenir la muerte de los FRs y generar un ambiente anti-inflamatorio en retinas afectadas por RP.

DISCUSIÓN

Capítulo II

La reactividad glial y la hipertrofia de las CGM son características que pueden encontrarse luego de un daño en la retina, ya sea este agudo o crónico. En relación a esto, nuestro primer objetivo fue evaluar la expresión de GFAP como marcador de reactividad glial, ya reportado *in vivo* en retinas de ratones con neurodegeneración (Roesch et al. 2012). Los resultados mostraron una expresión temprana de este filamento intermedio, la cual fue en aumento desde días previos al pico de muerte de los FRs haciéndose significativo, dicho aumento en la expresión, a partir del pico de muerte de los FRs. En los cultivos primarios mixtos neuro-gliales de retinas *rd1* también hubo un aumento del número de CGM reactivas y en concordancia con lo observado *in vivo*, un aumento de la expresión de *Gfap* a días tempranos en cultivo.

Por otro lado, dado los antecedentes mencionados previamente, otro de nuestros objetivos fue investigar si el agonista sintético de los RXR, PA024, podría tener efectos benéficos disminuyendo la reactividad glial y aumentando la supervivencia de FRs en cultivos de retinas *rd1*. Los resultados mostraron que el uso de este agonista sintético disminuyó el número de CGM reactivas, la expresión temprana de la proteína pro-apoptótica BAX, así como también la muerte por apoptosis de los FRs en los cultivos mixtos *rd1*.

Rol de los RXR en las enfermedades neurodegenerativas de la retina

Previamente en nuestro laboratorio se determinó que la expresión de este tipo de receptores en las neuronas de retina de rata en cultivo tiene una localización intracelular que depende del tipo neuronal (German et al. 2013). Además, se ha demostrado que ratones *knockouts* para combinaciones de los receptores retinoideos (distintas isoformas del RXR con distintas isoformas del receptor del ácido retinoico) manifiestan una elevada anomalía ocular (Mendelsohn et al. 1994).

La participación de los RXR en el mantenimiento de la funcionalidad y de la capacidad inmunomoduladora de las células gliales de Müller es poco conocida. En este contexto, se ha demostrado la existencia de alteraciones funcionales y morfológicas en la retina neural en ratones donde se había inactivado

exclusivamente la isoforma α de los RXR, específicamente en las células del EPR (Mori et al. 2001) y evidencias más recientes sugieren que distintos subtipos de receptores nucleares controlan la activación de la microglía, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Además, en macrófagos el estado de activación en sí mismo influencia el patrón de expresión de algunos receptores nucleares y su acción (Barish et al. 2005).

Nuestros resultados mostraron que la isoforma alfa se expresó en la retina de los ratones, tanto *wt* como *rd1*, en neuronas y células gliales y que disminuyó su expresión a partir del pico de muerte de los FRs en retinas de ratones *rd1*. El análisis de la marcación de este receptor en las distintas capas de la retina mostró que la disminución observada ocurría en la CNI, donde coexisten distintos tipos neuronales junto con los cuerpos celulares de las CGM. Por su parte, en los cultivos mixtos neuro-gliales de retinas *rd1* observamos que previo al pico de muerte neuronal, aumentó el nivel de ARNm de las isoformas alfa y gamma, correspondiéndose el aumento observado para la isoforma alfa en cultivos de 6 días con el aumento observado *in vivo* a PN 8. A 11 días en cultivo observamos que, tanto las CGM como las neuronas, mostraron poseer la isoforma alfa de los RXR y que no hubo una disminución de la expresión de esta isoforma en los cultivos mixtos *rd1* respecto de los cultivos *wt*.

El aumento observado en los niveles del ARNm de la isoforma gamma en los cultivos de 6 días podría deberse a la adquisición de un fenotipo particular, aún no determinado, en las CGM en la retina. Esta isoforma posee un patrón de expresión en el ojo más restringido que las isoformas alfa y beta, encontrándose principalmente en los FRs del tipo conos en la retina adulta (Mori et al. 2001). Por otra parte en trabajos recientes se ha demostrado la participación del RXRgamma en la diferenciación de los oligodendrocitos, un tipo específico de células gliales, induciendo la remielinización de axones en modelos de desmielinización focal (Huang et al. 2011). Esta diferenciación también se ha observado en muestras de pacientes con Esclerosis Múltiple (Hanafy and Sloane 2011). Investigaciones futuras permitirán determinar si esta isoforma se encuentra involucrada en la adquisición de un determinado fenotipo por parte de las CGM.

Efecto protector del agonista sintético de los RXR, PA024, en cultivos mixtos neuro-gliales *rd1*

El tratamiento de cultivos mixtos neuro-gliales de retinas de ratones *rd1* con el agonista PA024 desde días tempranos y con agregados repetidos en el tiempo en cultivo, mostró una disminución en el número de FRs apoptóticos a 11 días, con una reducción previa de los niveles de expresión de la proteína pro-apoptótica BAX. Estos resultados junto al análisis de la expresión de la isoforma alfa, la cual mostró un aumento temprano de su expresión, indicarían que el agonista podría estar actuando a través de la misma.

En concordancia con nuestros resultados, existen investigaciones que muestran los efectos benéficos de la activación de los RXR en modelos de neurodegeneración, tanto por acción directa de la activación de los RXR en las neuronas afectadas o indirectamente por la activación de los RXR en las células con capacidad inmunomoduladora. En un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer se ha mostrado que el tratamiento con bexaroteno, otro agonista de los RXR, disminuye la inflamación y promueve la eliminación del péptido b-amiloide por las células microgliales (Cramer et al. 2012). El uso de este agonista en bajas dosis también rescata neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de Parkinson (McFarland et al. 2013). Por su parte, el 9-cis ácido retinoico (AR) (ligando endógeno de los RXR) posee un efecto anti-inflamatorio sobre la microglia en un modelo murino de esclerosis múltiple. Mientras que una combinación de 9-cis AR y agonistas de otros receptores nucleares, como los PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), inhiben la expresión de citoquinas pro-inflamatorias incluyendo IL-1 β , TNF α e IL-6 (Xu et al. 2005).

La utilización de cultivos mixtos neuro-gliales nos permite mantener la supervivencia de los FRs en cultivo hasta que comienza la degeneración propia por la mutación en el gen que codifica para la *PDE6B*. Sin embargo, no nos permite determinar si el efecto provocado por el agonista utilizado se debe a la activación de los RXR en las neuronas, en las CGM o en ambas y es aquí donde surgen dos posibles hipótesis: Una de ellas nos haría suponer que la activación de los RXR en

las neuronas modularía la comunicación neuro-glial promoviendo la disminución de GFAP en las CGM. La segunda hipótesis implicaría un efecto directo sobre las CGM, disminuyendo su reactividad y posiblemente favoreciendo la supervivencia neuronal mediante, por ejemplo, la liberación de factores tróficos y/o la estimulación de los progenitores de retina a diferenciarse en nuevos FRs. Sin embargo, no se puede descartar un efecto directo de los agonistas en la supervivencia de los FRs activando vías de supervivencia tal como se demostró en distintos modelos de muerte de los FRs de rata en cultivo (German et al. 2013).

En conclusión, además del rol establecido de los RXR en procesos inflamatorios de enfermedades neurodegenerativas, nuestros resultados mostraron que la utilización de un agonista sintético de estos receptores previene la muerte de las neuronas FRs y disminuye la reactividad glial en el modelo animal de neurodegeneración retiniana utilizado en esta tesis. Por ello sería de gran interés en investigaciones futuras, desde el ángulo terapéutico y farmacológico, profundizar el estudio de la vía de acción de los RXR tanto en las neuronas como en las CGM en la retina.

Conclusiones generales

El conjunto de resultados presentados en este trabajo de Tesis, utilizando como modelo animal de estudio el ratón *rd1*, nos permitió analizar por primera vez en forma comparativa el comportamiento de las CGM de retinas *wt* y *rd1*.

El análisis de estos resultados nos permitió arribar a 2 conclusiones generales: En primer lugar, las CGM *rd1* mostraron disminuida su capacidad proliferativa y de diversos marcadores de células madre, tales como NESTINA, SOX2 y VIMENTINA, cambios que fueron acompañados de alteraciones nucleares. Además, el hecho de que las CGM modificaran la expresión de su filamento intermedio NESTINA, según fueran co-cultivadas con neuronas *wt* o *rd1*, sugiere que la comunicación o “diálogo” entre ambos tipos celulares es fundamental para mantener las propiedades características de células madre en las CGM y que este “diálogo” estaría alterado en el modelo *rd1*.

También demostramos que los receptores RXR poseen un rol relevante en la supervivencia de los FRs, cuyas alteraciones influirían en la degeneración de los FRs *rd1*. En este contexto, fue muy importante el hallazgo de que el tratamiento con el agonista sintético PA024 disminuyó la muerte de las neuronas FRs además de provocar una disminución de la reactividad de las CGM observada en cultivo.

Por último, más allá de que los resultados presentados en esta tesis podrían aportar datos relevantes en el esclarecimiento de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen los procesos de degeneración retiniana, nuestros hallazgos tendrían relevancia médica dada la posible implicancia terapéutica de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahan, C. E., Insua, M. F., Politi, L. E., German, O. L., & Rotstein, N. P. (2009). Oxidative stress promotes proliferation and dedifferentiation of retina glial cells in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, *87*(4), 964–977. <https://doi.org/10.1002/jnr.21903>
- Adler, R. (1982). Regulation of neurite growth in purified retina neuronal cultures: effects of PNPf, a substratum-bound, neurite-promoting factor. *Journal of Neuroscience Research*, *8*(2–3), 165–77. <https://doi.org/10.1002/jnr.490080207>
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., & van der Valk, P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, *129*(2), 154–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03225.x>
- Ando, K., Uemura, K., Kuzuya, A., Maesako, M., Asada-Utsugi, M., Kubota, M., ... Kinoshita, A. (2011). N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(9), 7619–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158477>
- Assaf, F., Zhang, J., & Ogilvie, J. M. (n.d.). Phosphodiesterase 6 β Expression In Developing Mouse Retina. *Impulse (Columbia, S.C.)*, 2015. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26877830>
- Bachleda, A. R., Pevny, L. H., & Weiss, E. R. (2016). Sox2-Deficient Müller glia disrupt the structural and functional maturation of the mammalian retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *57*(3), 1488–1499. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17994>
- Barish, G. D., Downes, M., Alaynick, W. A., Yu, R. T., Ocampo, C. B., Bookout, A. L., ... Evans, R. M. (2005). A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *19*(10), 2466–77. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0529>
- Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. A., Weigel-DiFranco, C., Moser, A., Brockhurst, R. J., ... Schaefer, E. J. (2004a). Clinical trial of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, *122*(9), 1297–305. <https://doi.org/10.1001/archophth.122.9.1297>
- Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. a, Weigel-DiFranco, C., Moser, A., Brockhurst, R. J., ... Schaefer, E. J. (2004b). Further evaluation of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment: subgroup analyses. *Archives of Ophthalmology*, *122*(9), 1306–14. <https://doi.org/10.1001/archophth.122.9.1306>
- Bibb, L. C., Holt, J. K., Tarttelin, E. E., Hodges, M. D., Gregory-Evans, K., Rutherford, a, ... Gregory-Evans, C. Y. (2001). Temporal and spatial expression patterns of the CRX transcription factor and its downstream targets. Critical differences during human and mouse eye development. *Human Molecular Genetics*, *10*(15), 1571–1579. <https://doi.org/doi:10.1093/hmg/10.15.1571>
- Boraas, L. C., Guidry, J. B., Pineda, E. T., & Ahsan, T. (2016). Cytoskeletal Expression and Remodeling in Pluripotent Stem Cells. *PLOS ONE*, *11*(1), e0145084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145084>
- Bringmann, A., Francke, M., Pannicke, T., Biedermann, B., Kodal, H., Faude, F., ... Reichenbach, A. (2000). Role of glial K(+) channels in ontogeny and gliosis: a hypothesis based upon studies on Müller cells. *Glia*, *29*(1), 35–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594921>
- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Landiev, I., Grosche, J., ... Reichenbach, A. (2009). Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochemistry International*, *54*(3–4), 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.10.014>

- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S., ... Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(4), 397–424. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.05.003>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chang, B., Hawes, N. L., Hurd, R. E., Davisson, M. T., Nusinowitz, S., & Heckenlively, J. R. (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*, 42(4), 517–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11853768>
- Chen, L., Yang, P., & Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocular Immunology and Inflammation*, 10(1), 27–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461701>
- Chojnowski, A., Ong, P. F., & Dreesen, O. (2015). Nuclear lamina remodelling and its implications for human disease. *Cell and Tissue Research*, 360(3), 621–631. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2069-4>
- Chou, Y.-H., Khuon, S., Herrmann, H., & Goldman, R. D. (2003). Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Molecular Biology of the Cell*, 14(4), 1468–78. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-08-0545>
- Comitato, A., Sanges, D., Rossi, A., Humphries, M. M., & Marigo, V. (2014). Activation of Bax in three models of retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(6), 3555–3562. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-13917>
- Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., ... Landreth, G. E. (2012). ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science*, 335(6075), 1503–1506. <https://doi.org/10.1126/science.1217697>
- Das, A. V., Mallya, K. B., Zhao, X., Ahmad, F., Bhattacharya, S., Thoreson, W. B., ... Ahmad, I. (2006). Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Developmental Biology*, 299(1), 283–302. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.029>
- De Genaro, P., Simón, M. V., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2013). Retinoic acid promotes apoptosis and differentiation in photoreceptors by activating the P38 MAP kinase pathway. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(5), 3143–56. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11049>
- De Kozak, Y., Cotinet, A., Goureau, O., Hicks, D., & Thillaye-Goldenberg, B. (1997). Tumor necrosis factor and nitric oxide production by resident retinal glial cells from rats presenting hereditary retinal degeneration. *Ocular Immunology and Inflammation*, 5(2), 85–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234372>
- De Kozak, Y., Naud, M. C., Bellot, J., Faure, J. P., & Hicks, D. (1994). Differential tumor necrosis factor expression by resident retinal cells from experimental uveitis-susceptible and -resistant rat strains. *Journal of Neuroimmunology*, 55(1), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7962479>
- De Melo Reis, R. A., Ventura, A. L. M., Schitine, C. S., de Mello, M. C. F., & de Mello, F. G. (2008).

- Müller glia as an active compartment modulating nervous activity in the vertebrate retina: neurotransmitters and trophic factors. *Neurochemical Research*, 33(8), 1466–74. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9604-1>
- De Urquiza, A. M., Liu, S., Sjöberg, M., Zetterström, R. H., Griffiths, W., Sjövall, J., & Perlmann, T. (2000). Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5499), 2140–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118147>
- Dunaief, J. L., Dentchev, T., Ying, G.-S., & Milam, A. H. (2002). The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 120(11), 1435–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427055>
- Farber, D. B., Flannery, J. G., & Bowes-Rickman, C. (1994). The rd mouse story: Seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 13(1), 31–64. [https://doi.org/10.1016/1350-9462\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/1350-9462(94)90004-3)
- Farrar, G. J., Kenna, P. F., & Humphries, P. (2002). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *The EMBO Journal*, 21(5), 857–864. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.857>
- Ferri, A. L. M., Cavallaro, M., Braida, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., ... Nicolis, S. K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15), 3805–3819. <https://doi.org/10.1242/dev.01204>
- Fischer, A. J., & Reh, T. A. (2001). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature Neuroscience*, 4(3), 247–252. <https://doi.org/10.1038/85090>
- Fischer, A. J., & Reh, T. A. (2003). Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia*, 43(1), 70–76. <https://doi.org/10.1002/glia.10218>
- Fliesler, S. J., & Anderson, R. E. (1983). Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Progress in Lipid Research*, 22(2), 79–131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6348799>
- García, M., & Vecino, E. (2003). Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histology and Histopathology*, 18(4), 1205–1218.
- German, O. L., Insua, M. F., Gentili, C., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2006). Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *Journal of Neurochemistry*, 98(5), 1507–1520. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04061.x>
- German, O. L., Monaco, S., Agnolazza, D. L., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2013). Retinoid X receptor activation is essential for docosahexaenoic acid protection of retina photoreceptors. *Journal of Lipid Research*, 54(8), 2236–2246. <https://doi.org/10.1194/jlr.M039040>
- Giannelli, S. G., Demontis, G. C., Pertile, G., Rama, P., & Broccoli, V. (2011). Adult human Müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 29(2), 344–56. <https://doi.org/10.1002/stem.579>
- Griffin, W. S. T. (2006). Inflammation and neurodegenerative diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 470S–474S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16470015>
- Grondona, J. M., Kastner, P., Gansmuller, A., Décimo, D., Chambon, P., & Mark, M. (1996). Retinal dysplasia and degeneration in RARbeta2/RARgamma2 compound mutant mice. *Development (Cambridge, England)*, 122(7), 2173–88. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681798>

- Hanafy, K. A., & Sloane, J. A. (2011). Regulation of remyelination in multiple sclerosis. *FEBS Letters*, 585(23), 3821–8. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.048>
- Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., ... Wada, K. (2002). Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), 9228–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417648>
- Hauck, S. M., von Toerne, C., & Ueffing, M. (2014). The Neuroprotective Potential of Retinal Müller Glial Cells (pp. 381–387). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8_48
- Hernández, M., Pearce-Kelling, S. E., Rodriguez, F. D., Aguirre, G. D., & Vecino, E. (2010). Altered expression of retinal molecular markers in the canine RPE65 model of Leber congenital amaurosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(12), 6793–802. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5213>
- Hicks, D., & Courtois, Y. (1990). The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Experimental Eye Research*, 51(2), 119–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2387332>
- Hippert, C., Graca, A. B., Barber, A. C., West, E. L., Smith, A. J., Ali, R. R., & Pearson, R. A. (2015). Müller Glia Activation in Response to Inherited Retinal Degeneration Is Highly Varied and Disease-Specific. *PLOS ONE*, 10(3), e0120415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120415>
- Hoffman, D. R., & Birch, D. G. (1995). Docosahexaenoic acid in red blood cells of patients with X-linked retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36(6), 1009–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7730010>
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., & Wong, R. O. L. (2014). Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 42, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003>
- Huang, J. K., Jarjour, A. A., Oumesmar, B. N., Kerninon, C., Williams, A., Krezel, W., ... Franklin, R. J. M. (2011). Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nature Neuroscience*, 14(1), 45–53. <https://doi.org/10.1038/nn.2702>
- Iandiev, I., Biedermann, B., Bringmann, A., Reichel, M. B., Reichenbach, A., & Pannicke, T. (2006). Atypical gliosis in Müller cells of the slowly degenerating rds mutant mouse retina. *Experimental Eye Research*, 82(3), 449–57. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.07.018>
- Inman, D. M., & Horner, P. J. (2007). Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia*, 55(9), 942–953. <https://doi.org/10.1002/glia.20516>
- Insua, M. F., Simón, M. V., Garelli, A., de los Santos, B., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2008). Trophic factors and neuronal interactions regulate the cell cycle and Pax6 expression in Müller stem cells. *Journal of Neuroscience Research*, 86(7), 1459–1471. <https://doi.org/10.1002/jnr.21606>
- Jayaram, H., Jones, M. F., Eastlake, K., Cottrill, P. B., Becker, S., Wiseman, J., ... Limb, G. A. (2014). Transplantation of photoreceptors derived from human Müller glia restore rod function in the P23H rat. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(3), 323–33. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0112>
- Kalloniatis, M., Nivison-Smith, L., Chua, J., Acosta, M. L., & Fletcher, E. L. (2015). Using the rd1 mouse to understand functional and anatomical retinal remodeling and treatment implications in

- retinitis pigmentosa: A review. *Experimental Eye Research*, 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.10.019>
- Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupé, V., Grondona, J. M., & Chambon, P. (1997). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development (Cambridge, England)*, 124(2), 313–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9053308>
- LaVail, M. M., & Sidman, R. L. (1974). C57BL-6J mice with inherited retinal degeneration. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 91(5), 394–400. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4595403>
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., & McKay, R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60(4), 585–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1689217>
- Limb, G. A., Salt, T. E., Munro, P. M. G., Moss, S. E., & Khaw, P. T. (2002). In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(3), 864–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867609>
- Linden, R., & Reese, B. E. (2006). Programmed cell death. In E. Sernagor, S. Eglén, B. Harris, & R. Wong (Eds.), *Retinal Development* (pp. 208–241). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541629.013>
- Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2010). Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *The Journal of Clinical Investigation*, 120(1), 29–40. <https://doi.org/10.1172/JCI40543>
- Livesey, F. J., & Cepko, C. L. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(February), 109–118. <https://doi.org/10.1038/35053522>
- Luna, G., Lewis, G. P., Banna, C. D., Skalli, O., & Fisher, S. K. (2010). Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Molecular Vision*, 16(June), 2511–2523. <https://doi.org/269> [pii]
- MacLaren, R. E., & Pearson, R. A. (2007). Stem cell therapy and the retina. *Eye*, 21(10), 1352–1359. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6702842>
- MacLaren, R. E., Pearson, R. A., MacNeil, A., Douglas, R. H., Salt, T. E., Akimoto, M., ... Ali, R. R. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*, 444(7116), 203–207. <https://doi.org/10.1038/nature05161>
- Marchetti, V., Krohne, T. U., Friedlander, D. F., & Friedlander, M. (2010). Stemming vision loss with stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 120(9), 3012–3021. <https://doi.org/10.1172/JCI42951>
- Marigo, V. (2007). Programmed Cell Death in Retinal Degeneration: Targeting Apoptosis in Photoreceptors as Potential Therapy for Retinal Degeneration. *Cell Cycle*, 6(6), 652–655. <https://doi.org/10.4161/cc.6.6.4029>
- McFarland, K., Spalding, T. A., Hubbard, D., Ma, J.-N., Olsson, R., & Burstein, E. S. (2013). Low dose bexarotene treatment rescues dopamine neurons and restores behavioral function in models of Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(11), 1430–8. <https://doi.org/10.1021/cn400100f>

- Mendelsohn, C., Lohnes, D., Décimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P., & Mark, M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development (Cambridge, England)*, *120*(10), 2749–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7607068>
- Meyer, J. S., Katz, M. L., Maruniak, J. A., & Kirk, M. D. (2006). Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *24*(2), 274–83. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0059>
- Mizutani, M., Gerhardinger, C., & Lorenzi, M. (1998). Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*, *47*(3), 445–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519752>
- Monnin, J., Morand-Villeneuve, N., Michel, G., Hicks, D., & Versaux-Botteri, C. (2007). Production of neurospheres from mammalian Müller cells in culture. *Neuroscience Letters*, *421*(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.04.073>
- Mori, M., Ghyselinck, N. B., Chambon, P., & Mark, M. (2001). Systematic immunolocalization of retinoid receptors in developing and adult mouse eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *42*(6), 1312–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328745>
- Mori, M., Metzger, D., Picaud, S., Hindelang, C., Simonutti, M., Sahel, J., ... Mark, M. (2004). Retinal dystrophy resulting from ablation of RXR alpha in the mouse retinal pigment epithelium. *The American Journal of Pathology*, *164*(2), 701–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742273>
- Moshiri, A., Close, J., & Reh, T. A. (2004). Retinal stem cells and regeneration. *The International Journal of Developmental Biology*, *48*(8–9), 1003–14. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041870am>
- Nagashima, M., Barthel, L. K., & Raymond, P. A. (2013). A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. *Development (Cambridge, England)*, *140*(22), 4510–21. <https://doi.org/10.1242/dev.090738>
- Nivison-Smith, L., Chua, J., Tan, S. S., & Kalloniatis, M. (2014). Amino acid signatures in the developing mouse retina. *Int J Dev Neurosci*, *33*, 62–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.12.005>
- Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y., & Takahashi, M. (2004). Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(37), 13654–13659. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402129101>
- Park, D., Xiang, A. P., Mao, F. F., Zhang, L., Di, C.-G., Liu, X.-M., ... Lahn, B. T. (2010). Nestin Is Required for the Proper Self-Renewal of Neural Stem Cells. *STEM CELLS*, *28*(12), 2162–2171. <https://doi.org/10.1002/stem.541>
- Politi, L. E., Bouzat, C., de los Santos, E. B., & Barrantes, F. J. (1996). Heterologous retinal cultured neurons and cell adhesion molecules induce clustering of acetylcholine receptors and polynucleation in mouse muscle BC3H-1 clonal cell line. *Journal of Neuroscience Research*, *43*(6), 639–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960315\)43:6<639::AID-JNR1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960315)43:6<639::AID-JNR1>3.0.CO;2-F)
- Portera-Cailliau, C., Sung, C. H., Nathans, J., & Adler, R. (1994). Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America*, 91(3), 974–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8302876>
- Ramírez, M., & Lamas, M. (2009). NMDA receptor mediates proliferation and CREB phosphorylation in postnatal Müller glia-derived retinal progenitors. *Molecular Vision*, 15, 713–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365572>
- Rao, M. B., Didiano, D., & Patton, J. G. (2017). Neurotransmitter-Regulated Regeneration in the Zebrafish Retina. *Stem Cell Reports*, 8(4), 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.007>
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L., & Perkowski, J. J. (2006). BMC Developmental Biology Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Developmental Biology*, 6(6). <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-36>
- Reh, T. A. (2016). Photoreceptor transplantation in late stage retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(5), ORSFG1-ORSFG7. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17659>
- Reh, T. A., & Fischer, A. J. (2001). Stem cells in the vertebrate retina. *Brain, Behavior and Evolution*, 58(5), 296–305. <https://doi.org/57571>
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2013). New functions of Müller cells. *Glia*, 61(5), 651–678. <https://doi.org/10.1002/glia.22477>
- Reichenbach, A., & Robinson, S. R. (1995). Phylogenetic constraints on retinal organisation and development. *Progress in Retinal and Eye Research*, 15(1), 139–171. [https://doi.org/10.1016/1350-9462\(95\)00008-9](https://doi.org/10.1016/1350-9462(95)00008-9)
- Reyes-Aguirre, L. I., Ferraro, S., Quintero, H., Sánchez-Serrano, S. L., Gómez-Montalvo, A., & Lamas, M. (2013). Glutamate-induced epigenetic and morphological changes allow rat Müller cell dedifferentiation but not further acquisition of a photoreceptor phenotype. *Neuroscience*, 254, 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.048>
- Roesch, K., Jadhav, A. P., Trimarchi, J. M., Stadler, M. B., Roska, B., Sun, B. B., & Cepko, C. L. (2008). The transcriptome of retinal Müller glial cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 509(2), 225–238. <https://doi.org/10.1002/cne.21730>
- Roesch, K., Stadler, M. B., & Cepko, C. L. (2012). Gene expression changes within Müller glial cells in retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 18, 1197–214. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365136/>
- Rotstein, N. P., Aveldaño, M. I., Barrantes, F. J., & Politi, L. E. (1996). Docosahexaenoic acid is required for the survival of rat retinal photoreceptors in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 66(5), 1851–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8780010>
- Rotstein, N. P., Aveldaño, M. I., Barrantes, F. J., Roccamo, A. M., & Politi, L. E. (1997). Apoptosis of retinal photoreceptors during development in vitro: protective effect of docosahexaenoic acid. *Journal of Neurochemistry*, 69(2), 504–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231708>
- Rotstein, N. P., Politi, L. E., & Aveldaño, M. I. (1998). Docosahexaenoic acid promotes differentiation of developing photoreceptors in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(13), 2750–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9856786>
- Rotstein, N. P., Politi, L. E., German, O. L., & Girotti, R. (2003). Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Investigative*

- Ophthalmology & Visual Science*, 44(5), 2252–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12714668>
- Sanges, D., Simonte, G., Di Vicino, U., Romo, N., Pinilla, I., Nicolás, M., & Cosma, M. P. (2016). Reprogramming Müller glia via in vivo cell fusion regenerates murine photoreceptors. *Journal of Clinical Investigation*, 126(8), 3104–3116. <https://doi.org/10.1172/JCI85193>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Seddon, J. M., Cote, J., & Rosner, B. (2003). Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 121(12), 1728–37. <https://doi.org/10.1001/archophth.121.12.1728>
- Sernagor, E., Eglén, S., Harris, B., & Wong, R. (Eds.). (2006). *Retinal Development*. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541629>
- Shen, J., Yang, X., Dong, A., Petters, R. M., Peng, Y.-W., Wong, F., & Campochiaro, P. A. (2005). Oxidative damage is a potential cause of cone cell death in retinitis pigmentosa. *Journal of Cellular Physiology*, 203(3), 457–464. <https://doi.org/10.1002/jcp.20346>
- Simón, M. V., De Genaro, P., Abrahan, C. E., de los Santos, B., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2012). Müller glial cells induce stem cell properties in retinal progenitors in vitro and promote their further differentiation into photoreceptors. *Journal of Neuroscience Research*, 90(2), 407–421. <https://doi.org/10.1002/jnr.22747>
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M. A., Sun, G. J., Hsu, D., Gu, Y., ... Song, H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*, 489(7414), 150–154. <https://doi.org/10.1038/nature11306>
- Stone, J., & Dreher, Z. (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 255(1), 35–49. <https://doi.org/10.1002/cne.902550104>
- Surzenko, N., Crawl, T., Bachleda, A., Langer, L., & Pevny, L. (2013). SOX2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Muller glia. *Development (Cambridge, England)*, 140(7), 1445–56. <https://doi.org/10.1242/dev.071878>
- Takeda, M., Takamiya, A., Jiao, J., Cho, K.-S., Trevino, S. G., Matsuda, T., & Chen, D. F. (2008). α -Amino adipate Induces Progenitor Cell Properties of Müller Glia in Adult Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(3), 1142. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0434>
- Tang, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, D., Shen, B., Luo, M., & Gu, P. (2017). Progress of stem/progenitor cell-based therapy for retinal degeneration. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1183-y>
- Tezel, G., & Wax, M. B. (2000). Increased production of tumor necrosis factor- α by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(23), 8693–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102475>
- Turner, D. L., & Cepko, C. L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*, 328(6126), 131–136. <https://doi.org/10.1038/328131a0>

- Valamanesh, F., Monnin, J., Morand-Villeneuve, N., Michel, G., Zaher, M., Miloudi, S., ... Versaux-Botteri, C. (2013). Nestin expression in the retina of rats with inherited retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, *110*, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.01.013>
- Vecino, E., Hernández, M., & García, M. (2004). Cell death in the developing vertebrate retina. *International Journal of Developmental Biology*, *48*(8–9), 965–974. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041891ev>
- 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*(June), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>
- Wallace, V. A. (2011). Concise Review: Making a Retina-From the Building Blocks to Clinical Applications. *Stem Cells*, *29*(3), 412–417. <https://doi.org/10.1002/stem.602>
- Wan, Jin, and Daniel Goldman. 2016. “Retina Regeneration in Zebrafish.” *Current Opinion in Genetics and Development* *40*(Figure 1): 41–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2016.05.009>.
- Wang, N.-K., Tosi, J., Kasanuki, J. M., Chou, C. L., Kong, J., Parmalee, N., ... Tsang, S. H. (2010). Transplantation of Reprogrammed Embryonic Stem Cells Improves Visual Function in a Mouse Model for Retinitis Pigmentosa. *Transplantation*, *89*(8), 911–919. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181d45a61>
- Watanabe, T., & Raff, M. C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature*, *332*(6167), 834–837. <https://doi.org/10.1038/332834a0>
- West, E. L., Pearson, R. A., Barker, S. E., Luhmann, U. F. O., Maclaren, R. E., Barber, A. C., ... Ali, R. R. (2010). Long-Term Survival of Photoreceptors Transplanted into the Adult Murine Neural Retina Requires Immune Modulation. *STEM CELLS*, *28*(11), 1997–2007. <https://doi.org/10.1002/stem.520>
- Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Blyszczuk, P., Tarasov, K. V, Tarasova, Y., ... Wobus, A. M. (2004). Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *61*(19–20), 2510–22. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4144-6>
- Xu, J., Storer, P. D., Chavis, J. A., Racke, M. K., & Drew, P. D. (2005). Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. *Journal of Neuroscience Research*, *81*(3), 403–11. <https://doi.org/10.1002/jnr.20518>
- Xue, L. P., Lu, J., Cao, Q., Hu, S., Ding, P., & Ling, E.-A. (2006). Müller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina. *Neuroscience*, *139*(2), 723–732. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.032>
- Yoshida, N., Ikeda, Y., Notomi, S., Ishikawa, K., Murakami, Y., Hisatomi, T., ... Ishibashi, T. (2013). Laboratory Evidence of Sustained Chronic Inflammatory Reaction in Retinitis Pigmentosa. *Ophthalmology*, *120*(1), e5–e12. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.07.008>
- Yu, H., Vu, T. H. K., Cho, K. S., Guo, C., & Chen, D. F. (2014). Mobilizing endogenous stem cells for retinal repair. *Translational Research*, *163*(4), 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.011>
- Zeng, H. Y., Zhu, X. A., Zhang, C., Yang, L. P., Wu, L. M., & Tso, M. O. M. (2005). Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *46*(8), 2992–2999. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0118>

- Zhu, J., Zhang, J., Ji, M., Gu, H., Xu, Y., Chen, C., & Hu, N. (2013). The role of peroxisome proliferator-activated receptor and effects of its agonist, pioglitazone, on a rat model of optic nerve crush: PPAR γ in retinal neuroprotection. *PloS One*, 8(7), e68935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068935>
- Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., ... McMahon, A. (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron*, 12(1), 11–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8292356>

PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

Garelli A, Heredia F, Casimiro AP, Macedo A, Nunes C, Garcez M, Mantas Dias A, **Volonté YA**, Uhlmann T, Caparros E, Koyama T & Gontijo A. *Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing*. Nat Commun. 2015; 6:8732. doi:10.1038/ncomms9732.

Ayala-Peña VB, Pilotti F, **Volonté YA**, Rotstein NP, Politi LE, German OL. *Protective effects of retinoid x receptors on retina pigment epithelium cells*. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2016; 1863(6):1134-1145. doi: 10.1016/j.bbamcr.

Quimey Jaskolowski #; **Yanel A. Volonté #**; Marcos J. Dibo; Olga L. German; Beatriz De los santos; Tamara B. Soto; Victoria B. Ayala-Peña; Nora P. Rotstein and Luis E. Politi. *Anatoxin-a induced degenerative changes in retinal neurons in vitro*. Toxicological Sciences – Enviado el 14 de diciembre de 2017

Yanel A. Volonté, Olga L. German, Marcos J. Dibo, Victoria B. Ayala-Peña, Andrés Garelli, Samanta Zanetti, M. Victoria Simón, Nora P. Rotstein and Luis E. Politi. *Defective crosstalk between neurons and Müller stem cells impairs regenerative capacity in the rd retina*. (2018) – En preparación.

