



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**“ESTUDIO DEL P53 Y VÍAS DE MUERTE CELULAR EN UN  
MODELO MURINO DE DESPRENDIMIENTO DE RETINA:  
IMPLICACIONES PARA EL RESCATE DE  
FOTORRECEPTORES.”**

**LUCÍA GONZÁLEZ BUENDÍA**

RESIDENTE DE OFTALMOLOGÍA HCUV

TUTELADO POR:

**PROF. PASTOR JIMENO**

**DRA. SANABRIA RUIZ-COLMENARES**

VALLADOLID, AGOSTO 2013

*“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos”*

*(Antoine de Saint-Exupéry)*

## ÍNDICE:

1. RESUMEN .....	4
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	5
3. ESTADO ACTUAL DEL TEMA	
• DESPRENDIMIENTO DE RETINA .....	6
• REMODELACIÓN RETINIANA .....	9
• PROCESOS DE MUERTE CELULAR TRAS EL DESPRENDIMIENTO DE RETINA .....	12
• EL PAPEL DEL P53 EN LA RETINA .....	20
• MODELOS EXPERIMENTALES DE DESPRENDIMIENTO DE RETINA.....	23
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	25
5. OBJETIVOS .....	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	26
7. RESULTADOS .....	31
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	42
9. DISCUSIÓN .....	43
10. CONCLUSIONES .....	48
11. AGRADECIMIENTOS .....	49
12. FINANCIACIÓN .....	50
13. BIBLIOGRAFÍA .....	51

## ESTUDIO DEL P53 Y VÍAS DE MUERTE CELULAR EN UN MODELO MURINO DE DESPRENDIMIENTO DE RETINA: IMPLICACIONES PARA EL RESCATE DE FOTORRECEPTORES

### RESUMEN

**OBJETIVO:** Investigar la relación entre la proteína p53 y los procesos de muerte celular y remodelación que afectan a los fotorreceptores tras un desprendimiento de retina (DR).

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se empleó un modelo experimental de DR, realizado mediante la inyección de ácido hialurónico en el espacio subretiniano, en ratones transgénicos deficientes en p53 (p53-KO) y wild-type (WT). Se realizó el estudio morfológico de las muestras obtenidas a los 3 días del DR teñidas con hematoxilina-eosina (HE), y se emplearon biomarcadores específicos de muerte celular y remodelamiento retiniano para su posterior examen mediante inmunofluorescencia (IF).

**RESULTADOS:** En ambos grupos, p53-KO y WT, se observaron cambios degenerativos en los fotorreceptores y la retina interna tras el DR. Además, se evidenció un aumento del número de células positivas para RIPK1, un marcador de necroptosis, en ambos grupos. No se consiguió analizar la apoptosis mediante IF con el anticuerpo anti-caspasa 3 activa.

**CONCLUSIONES:** Estos hallazgos ponen de manifiesto la presencia de procesos de remodelación retiniana en los ratones p53-KO similares a los del grupo WT, y un aumento del número de células RIPK1 positivas en ambos grupos tras el DR. Son necesarios estudios posteriores que permitan analizar

los procesos de apoptosis, y cuantificar las diferencias en cuanto a los procesos de muerte celular que ocurren tras el DR en ratones p53-KO y WT.

## JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En muchas patologías retinianas, los avances en los tratamientos oftalmológicos están consiguiendo un éxito relativo en cuanto al control de la enfermedad y el daño estructural, pero no ocurre lo mismo frente a la recuperación de la función visual. Esto sucede en patologías tales como el DR, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), el edema macular diabético, o el edema macular secundario a una obstrucción venosa retiniana, entre otros. Estas patologías afectan principalmente a personas de edad avanzada, en las que el DR es también especialmente frecuente y durante los últimos años, se ha demostrado un incremento en su prevalencia debido, entre otras causas, al envejecimiento de la población y al aumento en el número de intervenciones de cataratas, ya que ambos son claros factores de riesgo<sup>1</sup>.

Al producirse el DR, las capas más externas de la retina pierden el contacto con el EPR y la comunicación con la coroides, encargados del soporte metabólico y nutricio de los fotorreceptores. Esto desencadena una serie de fenómenos a nivel molecular y celular que resultan en una remodelación de la retina desprendida<sup>2</sup>. Entre estos cambios, se incluye la muerte de los fotorreceptores, fundamentalmente por isquemia, y parece ser el origen de la pérdida de función visual tras el DR<sup>3,4</sup>.

El tratamiento del DR consiste en la reaplicación quirúrgica de la retina. La cirugía presenta una tasa de éxito anatómico de más de un 90%<sup>5</sup>, pero los resultados funcionales no se corresponden con los anatómicos. La recuperación incompleta de la visión tras una adecuada reaplicación quirúrgica de la retina ha sido motivo de debate durante décadas<sup>6</sup> y, hasta la fecha, no se ha encontrado ningún tratamiento efectivo que consiga restaurar la función visual de los pacientes.

Por tanto, las modificaciones celulares que se producen en el tejido retiniano tras un DR, pueden afectar potencialmente la recuperación de la función visual tras una adecuada reaplicación anatómica<sup>7</sup>. Así, la identificación y control de los mecanismos implicados en la muerte celular y la remodelación retiniana tras un la separación de la retina neural del EPR, presente en múltiples patologías de elevada prevalencia<sup>3,8-10</sup>, resultan cruciales para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar los resultados funcionales de los pacientes<sup>3,4</sup>.

Como paso previo, resulta necesaria la utilización de modelos experimentales capaces de reproducir las respuestas moleculares, celulares y tisulares de manera semejante a lo que acontece en el ser humano tras el DR.

## ESTADO ACTUAL DEL TEMA

### **DESPRENDIMIENTO DE RETINA**

El DR, entendido como la separación entre la retina neural, incluyendo los fotorreceptores, y el EPR, es una de las principales causas de pérdida de

visión<sup>3</sup>. Esta separación física entre los fotorreceptores y el EPR puede observarse también en otras patologías, tales como la DMAE<sup>10</sup> y la retinopatía diabética<sup>8</sup> entre otras.

El DR se clasifica en primario o regmatógeno, que es la forma más frecuente, y en secundario (traccional o exudativo) que se origina a partir de otras patologías retinianas.

El DR regmatógeno se caracteriza por la presencia de una rotura en la retina que se mantiene abierta por una tracción vitreoretiniana, que permite la acumulación de líquido bajo la retina neurosensorial que lo separa del EPR<sup>11</sup>.

El DR traccional se produce en patologías como la retinopatía diabética proliferante o un traumatismo penetrante del segmento posterior. La contracción progresiva de membranas fibrovasculares en áreas de adherencia vitreoretiniana provocan el DR<sup>3</sup>.

El DR exudativo puede producirse en varias enfermedades vasculares, inflamatorias o neoplásicas, y se caracteriza por la acumulación de líquido subretiniano en ausencia de rotura o tracción de la retina<sup>3</sup>.

La incidencia del DR regmatógeno está fuertemente relacionada con la edad, miopía, y degeneraciones vitreoretinianas. Se estima que la incidencia anual de esta patología es de 10.5/ 100,000 habitantes y va en aumento<sup>1</sup>.

El tratamiento del DR consiste en la reaplicación quirúrgica de la retina, y contempla la retinopexia neumática, el cerclaje escleral y la vitrectomía vía pars plana. La mayoría de estudios no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los resultados de

estas técnicas<sup>12,13</sup>, aunque la tendencia actual es hacia la utilización más frecuente de la vitrectomía pars plana<sup>5</sup>.

La recuperación funcional de los pacientes tras la cirugía de DR depende de factores pre y postoperatorios<sup>6</sup>. Los peores resultados funcionales se han atribuido a la afectación macular, extensión y altura (distancia entre EPR y retina neural) del DR, cirugía de DR previa, tiempo de evolución del DR y edad avanzada del paciente<sup>5,6</sup>.

En muchos casos, las causas de los pobres resultados funcionales son alteraciones retinianas macroscópicamente identificables: las membranas epirretinianas (6%), el edema macular cistoide (17%) o los agujeros maculares (2%)<sup>14</sup>. Sin embargo, en muchos casos no se observa ninguna alteración oftalmoscópica o biomicroscópica que justifique la pérdida de visión.

Recientes estudios realizados con equipos de tomografía de coherencia óptica (OCT), han permitido encontrar causas microscópicas, como la presencia de líquido subfoveolar no visible por oftalmoscopia u angiografía fluoresceínica<sup>15-17</sup>, o modificaciones celulares (disrupción de la línea de los elipsoides), observadas en las capas externas de la retina que se correlacionan con un peor resultado funcional<sup>14,18</sup>. Estas modificaciones condicionan la pérdida de visión e incluyen los procesos de remodelación retiniana y la muerte de fotorreceptores.



## **REMODELACIÓN RETINIANA**

La remodelación retiniana es un fenómeno que acontece en toda degeneración retiniana; es un proceso reactivo, no pasivo, que ocurre a nivel molecular, celular y tisular, que afecta a todas las células de la retina, que se produce tras una noxa de cualquier naturaleza<sup>19,20</sup>.

Tras un DR, la hipoxia producida en las células retinianas condiciona la aparición de una serie de cambios que serán los responsables de la pérdida de agudeza visual, alteración de la visión en color, disminución de la sensibilidad al contraste y metamorfopsias que experimentan estos pacientes<sup>6,21</sup>. A continuación se detallan los cambios más relevantes que sufren los diferentes tipos celulares.

En el EPR se han observado cambios morfológicos en la superficie apical, que normalmente contacta con los fotorreceptores. Estos cambios son diversos y varían en función de la especie estudiada<sup>2</sup>, pero básicamente consisten en la desaparición de los procesos apicales y su sustitución, horas tras el DR, por una franja de formaciones similares a microvellosidades<sup>22,23</sup>. Existen diferencias en cuanto a las modificaciones que sufren las células que contactan con conos y bastones. A pesar de la reapiación anatómica de la retina tras el DR, la superficie del EPR no recupera su morfología normal, y esto afecta particularmente a las áreas que contactan con los conos<sup>2,24</sup>. En algunos casos, además, el EPR prolifera y migra al espacio subretiniano, e incluso a la cavidad vítrea a través de una rotura retiniana, pudiendo dar lugar a la formación de membranas celulares<sup>2</sup>.

Tras separarse del EPR y de la coroides, los fotorreceptores sufren remodelaciones encaminadas a lograr su supervivencia,<sup>25</sup> aunque en muchos casos culminan en la muerte celular. El segmento externo (OS, del inglés *outer segment*) de los fotorreceptores afectados por el DR degenera y se acorta. En el caso de los bastones, la principal opsina, indispensable para el proceso de fototransducción que normalmente se localiza los discos membranosos que forman el OS, la rodopsina, se redistribuye y pasa a encontrarse en la membrana plasmática próxima al segmento interno (IS, del inglés *inner segment*). En los conos se produce también una redistribución de las opsinas, pero se conoce menos acerca de los cambios que ocurren tras el DR, en parte por la dificultad de marcaje de sus productos metabólicos tras el DR<sup>24</sup>. La degeneración de los OS ocurre en todas las degeneraciones retinianas, ya sean de base genética, producidas en el contexto de una enfermedad, o consecuencia de un traumatismo<sup>26</sup>.

El IS de los fotorreceptores también se ve afectado y se observa una disminución del número de mitocondrias y una desorganización de las organelas normalmente agrupadas en el elipsoide (mitocondrias) y mioide (retículo endoplasmático, aparato de Golgi)<sup>2</sup>.

La respuesta estructural en IS y OS de los fotorreceptores parece ser común para conos y bastones. Sin embargo, las modificaciones de los terminales sinápticos son distintas para ambos tipos de fotorreceptores. En los bastones, se observa una retracción del terminal sináptico a las 24 horas tras el DR, encontrándose muchos de ellos cerca de la capa nuclear externa (ONL, del inglés *outer nuclear layer*). Por el contrario, el terminal sináptico de

los conos permanece en la plexiforme externa, pero se producen cambios a nivel del pedículo, perdiendo éste un número variable de invaginaciones sinápticas<sup>2</sup>.

Las neuronas de segundo orden, que conectan los fotorreceptores lateralmente (células horizontales) y verticalmente (bipolares) también experimentan fenómenos de remodelación<sup>27</sup>, similares a los de las neuronas de tercer orden, las células ganglionares, alargando sus dendritas<sup>24</sup>.

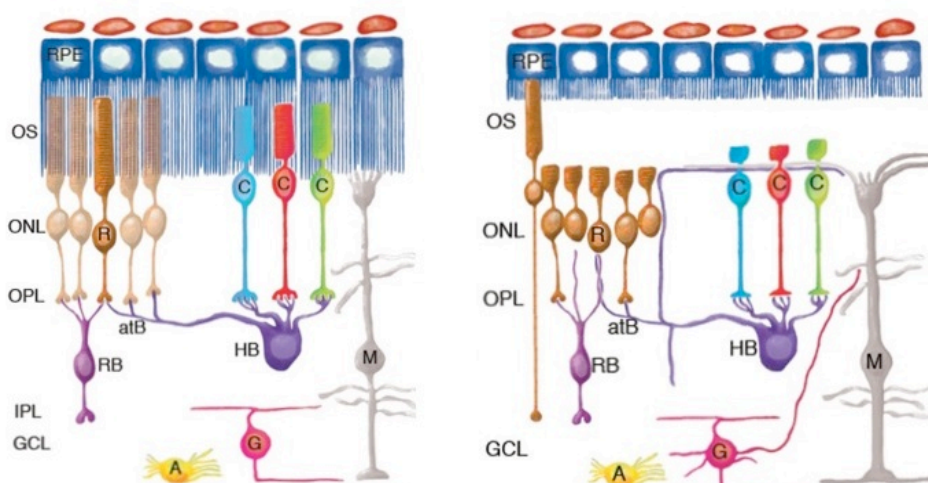


Fig. 1: Imagen en la que se compara la estructura de una retina normal (izqda.) con una retina que ha sufrido remodelamiento tras un DR (dcha.), con los cambios previamente descritos. RPE: epitelio pigmentario de la retina. OS: segmento externo del fotorreceptor. ONL: capa nuclear externa. OPL: capa plexiforme externa. IPL: capa plexiforma interna. GCL: capa de células ganglionares. R: bastón. C: cono. RB: célula bipolar del bastón. HB: célula horizontal de tipo B. atB: axón terminal. A: célula amacrina. G: célula ganglionar. M: célula de Müller. (Imagen obtenida de Fisher et. al, 2005).

Las células no neuronales de la retina también experimentan cambios tras el DR: las células gliales (Müller, astrocitos y microglía) y las células de los vasos retinianos (células endoteliales y pericitos) proliferan para tratar de garantizar la supervivencia de la retina<sup>28,29</sup>. De especial importancia son las modificaciones que sufren las células de Müller. Estas células inician una gliosis reactiva; se vuelven hipertróficas e hiperplásicas, y sus procesos se extienden al espacio subretiniano<sup>29,30</sup>.

### **PROCESOS DE MUERTE CELULAR TRAS EL DR**

Se han descrito dos vías principales de muerte celular tras el DR: la apoptosis y la necrosis<sup>3</sup>. Aunque existen otros procesos de muerte celular que cada vez están cobrando más importancia como mecanismos de pérdida de fotorreceptores tras el DR<sup>31</sup>.

La *apoptosis* es un proceso de muerte celular programada que se caracteriza por la ausencia de una respuesta inflamatoria y por ser un mecanismo complejo, no del todo conocido, en el que intervienen multitud de mediadores para su regulación. Clásicamente se diferencian dos vías de activación de la apoptosis: la *intrínseca o mitocondrial*, y la vía *extrínseca*<sup>3</sup>. En estas vías intervienen las caspasas, que son las principales proteasas implicadas en la inducción, ejecución y propagación de la apoptosis. Las caspasas se pueden clasificar en: iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y efectoras (3, 6 y 7). De este modo las primeras activarían a las segundas, y éstas a su vez desencadenarían el proceso de muerte celular<sup>3</sup>.

La *vía intrínseca* se desencadena por reacciones de estrés intracelular (daños en el ADN, hipoxia, radiación UV, determinadas hormonas, etc.) que dan lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial. Esta permeabilización puede producirse por la apertura de los poros MPTP (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*) o por la formación de canales específicos en la membrana mitocondrial externa (MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation*)<sup>32</sup>. De esta manera, se produce la liberación de factores proapoptóticos desde el espacio intermembranoso al citosol, entre los que destaca el citocromo c, que induce la maduración proteolítica de la caspasa 9, que a su vez es capaz de activar a las caspasas efectoras. La liberación de citocromo c de la mitocondria al citosol también está regulada por la familia de proteínas Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*)<sup>3</sup>. Los miembros de esta familia pueden tener efectos opuestos: bien efectos anti-apoptóticos, como Bcl-2 y Bcl-xL, que protegen a la célula de la apoptosis, o bien efectos pro-apoptóticos, como Bax (*Bcl-2-Associated X protein*) o Bak (*Bcl-2 homologous Antagonist/Killer*)<sup>33</sup>.

La *vía extrínseca* se activa cuando interactúan determinados receptores de muerte celular situados en la superficie de la célula con ligandos de muerte celular. Los receptores de muerte celular principalmente pertenecen a la familia de receptores del TNF (*Tumor Necrosis Factor*) e incluyen Fas, TNFR1 (*TNF Receptor 1*) y el receptor de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), y son activados por sus respectivos ligandos, FasL (*Fas ligand*), TNF $\alpha$  y TRAIL. La unión de estos receptores y sus ligandos desencadena una compleja cascada de señalización que activa

factores intermedios como el FADD (*Fas Associating Death Domain*) o el TRADD (*TNF Receptor Associating Death Domain*), que a su vez activan las caspasas iniciadoras 8 y 10<sup>34</sup>.

Finalmente, ambas vías convergen para desencadenar la activación de las caspasas efectoras (3, 6 y 7) por medio de la caspasa 9 en la vía intrínseca, y de la caspasa 8 en la vía extrínseca<sup>33</sup>.

La apoptosis es un proceso necesario para el correcto desarrollo postnatal de la retina<sup>35</sup>, que interviene regulando el número final de fotorreceptores que conformarán la retina del adulto<sup>36</sup>.

La muerte de fotorreceptores por apoptosis tras un DR fue descrita por primera vez por Chang et al. en 1995 cuando observaron la presencia de este tipo de muerte celular tras un DR traumático<sup>37</sup>. Desde entonces, ha sido ampliamente estudiada en diversos modelos animales y se ha correlacionado con cambios funcionales<sup>3</sup>. Además, la apoptosis se ha identificado como mecanismo implicado en pérdida de fotorreceptores en diversas patologías retinianas como DR<sup>3,24,38</sup>, degeneraciones retinianas hereditarias<sup>9,39</sup>, daño retiniano inducido por luz<sup>40</sup>, daño por isquemia-reperfusión<sup>41,42</sup>, DMAE<sup>10</sup> y retinopatía diabética<sup>8</sup>, entre otras.

En modelos experimentales se ha descrito un aumento en la actividad de las caspasas 3, 7, 8 y 9 tras el DR<sup>43,44</sup>. También se ha sugerido un papel importante de las vías apoptóticas mediadas por Bax<sup>35,36</sup> (vía intrínseca) y por Fas<sup>44,45 46</sup> (vía extrínseca) tras un DR<sup>47,48</sup>.

Se sabe que los procesos apoptóticos comienzan a producirse a las horas del DR, con un pico máximo a los 3 días<sup>49,50</sup> en el que se alcanza la muerte por este mecanismo aproximadamente el 85% de los fotorreceptores<sup>48</sup>, y decaen de manera abrupta y progresiva a lo largo de las siguientes semanas<sup>44,49,50</sup>. En DR experimentales se ha demostrado la activación de la apoptosis tanto por su vía intrínseca como por su vía extrínseca<sup>43-45</sup>. Además, se ha observado un patrón de muerte celular y remodelación en humanos tras un DR similar al de los modelos experimentales<sup>51</sup>.

En diversos estudios se ha intentado reducir la muerte de los fotorreceptores utilizando inhibidores de las caspasas, como el Z-VAD<sup>50</sup>. Sin embargo, no se ha conseguido disminuir la pérdida de los fotorreceptores tras el DR al bloquear solamente la ruta de las caspasas<sup>50</sup>, por lo que se piensa que en esta situación podrían haberse incrementado otros mecanismos de muerte celular independientes de las caspasas. La permeabilización de la membrana mitocondrial también puede desencadenar la muerte celular por procesos independientes a la activación de las caspasas. Esto sucede por ejemplo en la apoptosis inducida por AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), y se ha demostrado su presencia tras DR en modelos murinos y en humanos<sup>50,52</sup>.

La apoptosis inducida por estrés del retículo endoplasmático es otro tipo de muerte celular en la que se acumulan proteínas no plegadas en el lumen del retículo endoplasmático (RE). Su principal mediador es el GADD153 (*Growth Arrest DNA Damage-inducible gene 153*), capaz de inducir la parada del ciclo celular y apoptosis<sup>53</sup>. Se ha demostrado la

presencia de este tipo de muerte celular en los fotorreceptores tras un DR<sup>53,54</sup>, así como en degeneraciones retinianas y en enfermedades neurodegenerativas<sup>55</sup>.

Por otra parte, la *necrosis* se define como la muerte celular patológica reconocible por signos morfológicos que aparecen en el citoplasma y en el núcleo. Así en el citoplasma, aparece hipereosinofilia y desestructuración, mientras que en el núcleo puede aparecer condensación de la cromatina (picnosis), disolución del núcleo (cariolisis) o fragmentación del núcleo con cromatina condensada (cariorrexis). Las alteraciones del citoplasma y del núcleo coexisten. Estas características morfológicas se acompañan de un proceso inflamatorio y su aparición es siempre patológica<sup>56</sup>.

La necrosis ha sido considerada hasta ahora como un proceso de muerte celular pasivo y no regulado. Análisis morfológicos previos han revelado la presencia de necrosis tras un DR experimental<sup>57</sup>. Además, se ha demostrado la presencia de proteínas del grupo box1, liberadas por células necróticas, pero no apoptóticas, en muestras de vítreo tras un DR en humanos<sup>58</sup>, por lo que se postula que este tipo de muerte celular coexiste con la apoptosis tras un DR, aunque en menor cantidad.

Recientemente se ha descrito un tipo de necrosis inducida por RIP (*Receptor Interacting Protein*) kinasas, que ha sido denominado necrosis programada o *necroptosis*<sup>56,59</sup>. Se estima que tras el DR mueren el doble de fotorreceptores por apoptosis que por necroptosis, pero en determinadas condiciones en las que las caspasas están inhibidas (como en el tratamiento con Z-VAD) o no son activadas de un modo efectivo, la necroptosis está



favorecida convirtiéndose en la principal vía de muerte celular<sup>60</sup>. La necroptosis posee características morfológicas similares a la necrosis pero, a diferencia de ésta, se activa bajo la estimulación del TNF $\alpha$ , del FasL y del TRAIL, ligandos con capacidad de activar también la apoptosis<sup>61</sup>.

La formación del complejo RIP1-RIP3 es un paso crítico, necesario para la activación de RIP1 y por tanto la inducción de la necroptosis, por lo que se sugiere el papel clave de la RIP3 en la regulación de la necroptosis tras un DR<sup>62</sup>. De hecho, se ha demostrado la reducción de la muerte de fotorreceptores por necroptosis tras un DR en un modelo deficiente en RIP3<sup>62</sup>.

En la actualidad se utiliza el término de *muerte programada* para englobar todos aquellos procesos desencadenados por la unión de determinados ligandos con sus respectivos receptores, que resultan en la muerte celular<sup>63</sup>. De este modo, la unión de ligandos de muerte celular, pertenecientes a la familia del TNF, con receptores de muerte celular resulta en la transcripción de señales que pueden desencadenar apoptosis, necroptosis o supervivencia celular<sup>64,65</sup>, a través de los mecanismos representados en la Fig.2.

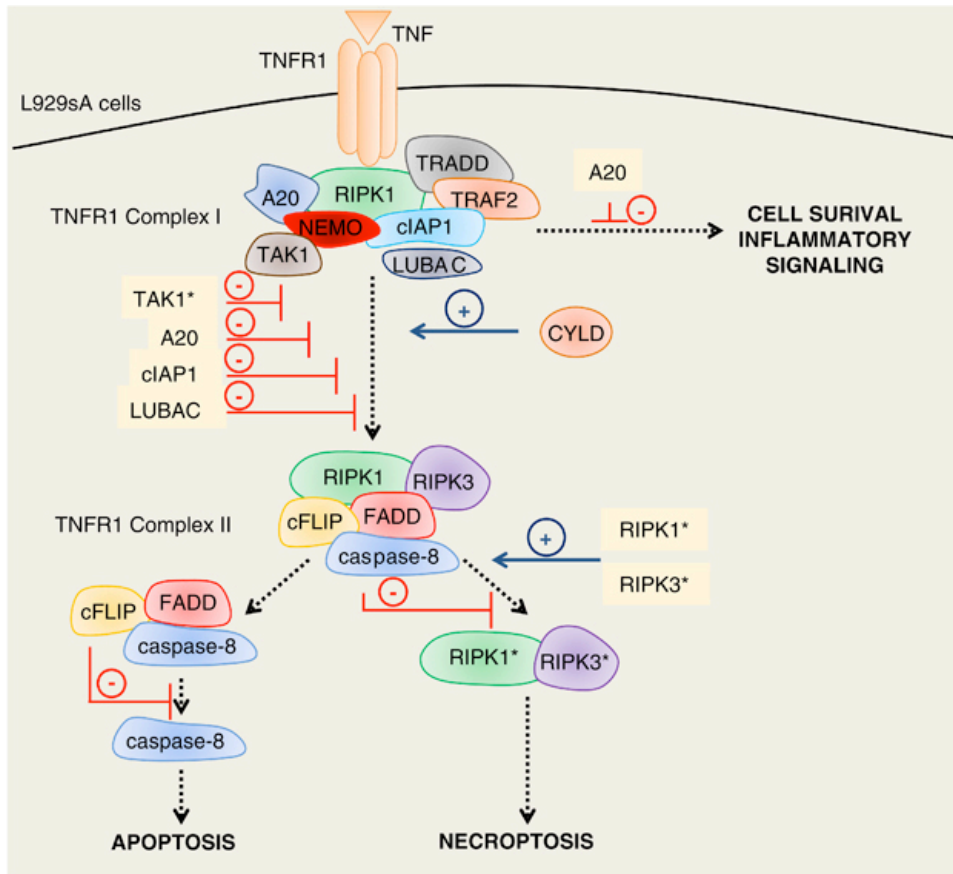


Fig. 2: Los tres complejos de señalización inducidos por TNF que determinan la supervivencia celular, apoptosis o necroptosis, (Imagen obtenida de Vanlangenakker et. al, 2011).

Como se puede observar, los procesos de muerte celular programada, no son independientes y sus vías de señalización se cruzan.

La Necrostatina-1 es un inhibidor de la necroptosis, que no afecta a la apoptosis, que actúa inhibiendo la fosforilación de la proteína RIP1. Esta sustancia ha demostrado mejorar los resultados funcionales tras un DR, puestos de manifiesto mediante electroretinografía, en ratas<sup>66</sup>. A pesar de

estos resultados, al bloquear la necroptosis con Necrostatina-1, se ha observado un aumento de la muerte celular por apoptosis<sup>64</sup>.

En resumen, tras un DR la principal vía de muerte celular parece ser la apoptosis, y coexiste con la necroptosis. La inhibición de la apoptosis produce un aumento de la muerte por necroptosis y viceversa (Fig.3)<sup>62,67</sup>. Por este motivo, hay estudios recientes que sugieren la regulación simultánea de la apoptosis (con agentes como el Z-VAD) y la necroptosis (con agentes como la necrostatina-1) para una adecuada neuroprotección y rescate de fotorreceptores tras un DR<sup>62,67</sup>.

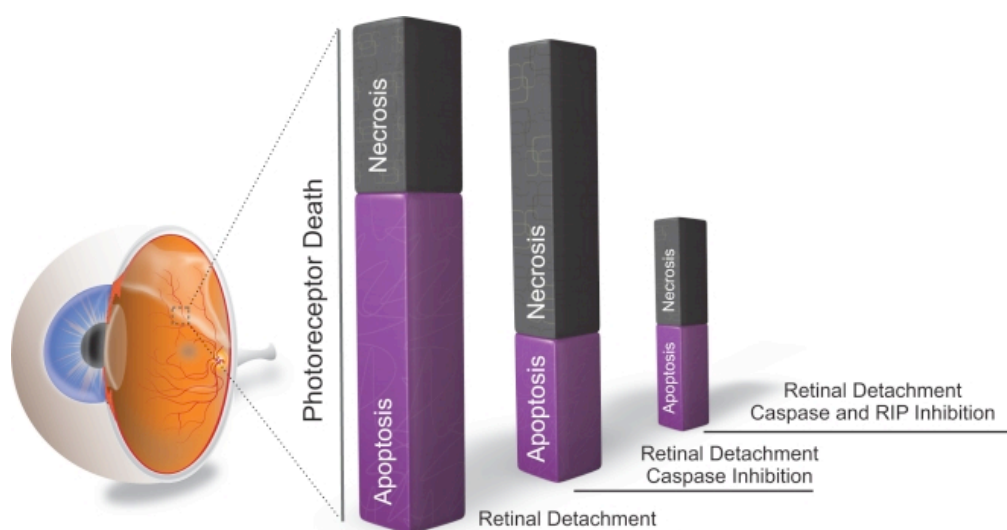


Fig. 3: La muerte de fotorreceptores tras un DR se produce principalmente por apoptosis (barra de la izqda.) aunque coexiste con la necrosis. La inhibición de las caspasas, por tanto de la apoptosis, produce un aumento de la muerte por necrosis (barra central). Una inhibición de caspasas y RIP kinasas, es decir inhibición simultánea de apoptosis y necroptosis, disminuye de manera global la muerte celular (barra de la dcha.). (Imagen obtenida de Murakami et. al, 2011).

## EL PAPEL DEL P53 EN LA RETINA

La proteína p53 está implicada en múltiples funciones celulares responsables del mantenimiento de la homeostasis celular, como la regulación de la transcripción de diversos genes implicados en los mecanismos de parada del ciclo celular, senescencia y apoptosis.

En condiciones normales, se expresa en todas las células de manera inactiva y a bajas concentraciones debido a su rápida degradación por su antagonista Mdm2. Pero bajo determinadas situaciones como hipoxia, isquemia, radiaciones o aumento de ROS (*reactive oxygen species*) que pueden originar daños en el DNA celular, se produce un incremento rápido de los niveles de p53, así como un descenso de los niveles de su antagonista<sup>68,69</sup>.

El p53 es sintetizado en el citoplasma celular. En condiciones normales, y por lo tanto inactivo, se localiza en el citoplasma y es transportado temporalmente al núcleo durante la transición de G1 a S del ciclo celular. Sus funciones, cuando está activo, las realiza principalmente en el núcleo celular, y por tanto es necesario que se produzca un transporte adecuado hasta ese lugar. Una vez en el núcleo activado, oligomeriza su extremo C-terminal, para formar tetrámeros que se unirán a ADN para modificar la transcripción de determinados genes<sup>70</sup>.

En respuesta al daño en el ADN, p53 provoca la parada de la célula en la fase G1 (checkpoint), impidiendo de este modo la síntesis de ADN dañado. Por esto se le asigna clásicamente el nombre de “el guardián del genoma”<sup>71</sup>. Se ha demostrado que p53 también puede detener el ciclo celular en las

fases S y G2/M. Esta parada del ciclo celular mediada por p53 se produce mediante la activación de la transcripción del gen Cdkn1a que codifica la proteína p21.

Por tanto, el p53 provoca la parada del ciclo celular en respuesta al estrés para facilitar la reparación del ADN. Cuando el daño no puede ser reparado, el p53 activa la apoptosis.

La proteína p53 puede desencadenar la apoptosis a través de las vías intrínseca y extrínseca: a través de la vía intrínseca, es capaz de modificar la permeabilidad de la membrana mitocondrial con la consiguiente liberación de factores apoptóticos, o bien inducir la transcripción de Bax o inhibir la de Bcl-2<sup>72</sup>. A través de la vía extrínseca, p53 regula la transcripción de genes que inician la muerte celular por esta vía, como el gen del FasL<sup>73</sup>.

Los principales reguladores del p53 son las proteínas Mdm2 (*Murine Double Minute 2*) y Mdm4. Mdm2 se une al p53 oligomerizado y provoca su degradación. Este proceso ocurre en el núcleo celular, donde la ubiquitinización del p53 por parte del Mdm2 provoca su transporte al citosol, donde puede ser degradado por el proteasoma. Curiosamente la activación de p53 provoca la transcripción de, entre otros genes, el que codifica el Mdm2, estableciéndose así un *feed-back* negativo entre ambas proteínas<sup>70</sup>.

El Mdm4, o MdmX, forma un heterodímero con el Mdm2 y de este modo es capaz de regular la ubiquitinización del p53 por parte del Mdm2. Pero también puede regular los niveles de p53 de manera independiente al Mdm2; Mdm4 se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria, y el Mdm4 mitocondrial facilita la unión del p53 al Bcl-2 para la regulación de la

apoptosis<sup>74</sup>. P53 puede escapar a este control ejercido por Mdm2 y Mdm4 mediante su acetilación, que impide la interacción entre ellos y permite al p53 responder al estrés celular<sup>75</sup>.

La mayoría de estudios sobre p53 se han focalizado en su implicación en la patogénesis el cáncer. Se han identificado mutaciones en el gen del p53 en el 50% de los tumores sólidos<sup>76</sup>. En cuanto a su función en la retina, se ha observado su implicación en el desarrollo retiniano, en diferentes tipos celulares como células de Müller<sup>77</sup>, astrogliá<sup>78</sup> y fotorreceptores<sup>79</sup>, así como en el desarrollo del retinoblastoma<sup>70</sup>. Sin embargo, su papel en la muerte de fotorreceptores y otras células retinianas tras un DR está todavía por determinar.

Se cree que en condiciones de isquemia retiniana, como ocurre en un DR, p53 actúa induciendo apoptosis<sup>70</sup>. Se ha demostrado un aumento de la expresión del gen del p53<sup>80</sup> y de la proteína p53<sup>81</sup> en la retina en respuesta a la isquemia, por lo que se piensa que los procesos apoptóticos que ocurren en situaciones en las que el flujo sanguíneo está disminuido, y la retina está en condiciones de hipoxia, están mediados por p53<sup>70</sup>.

Se han descrito varios polimorfismos (SNP, o *single nucleotide polymorphisms*), o variantes de la secuencia de ADN, en el gen que codifica la proteína p53 (Tp53)<sup>82</sup>. El polimorfismo del codón 72 se ha relacionado con la respuesta apoptótica. Tiene dos variantes; la variante Arg/Arg (arginina) se ha relacionado con una respuesta pro-apoptótica, mientras que la variante Pro/Pro (prolina) se relaciona con una respuesta contraria, menos apoptótica. Un estudio realizado por la Universidad de Salamanca sobre el sistema

nervioso central, asoció un peor pronóstico funcional a los pacientes portadores de la variante Tp53 Arg/Arg (pro-apoptótica) tras haber sufrido un accidente cerebrovascular (isquémico o hemorrágico)<sup>83</sup>. A partir de este descubrimiento, el grupo de retina del IOBA, encontró una susceptibilidad de los pacientes portadores de la variante Tp53 Pro/Pro (menos apoptótica) a padecer vitreorretinopatía proliferante (VRP) tras un DR<sup>84</sup>.

Además, en un reciente estudio que emplea Nutlin-3, un agente que impide la interacción de p53 con su antagonista Mdm2, destaca la proteína p53 como elemento clave en el DR y la VRP<sup>69</sup>.

Por todo ello, se cree necesario ampliar la información sobre la implicación del p53 en la muerte celular que ocurre tras un DR.

Este estudio pretende conocer más acerca del papel que juega el p53 en la muerte de fotorreceptores, observando los principales procesos de muerte celular que ocurren tras un DR en un ratón p53-KO, y comparándolos con los que se producen en un ratón WT.

## **MODELOS EXPERIMENTALES DE DR**

Los modelos experimentales propocionan una manera controlada y sistemática de estudiar las respuestas moleculares y celulares que ocurren tras un DR<sup>27</sup>, y se han empleado durante décadas. Para producir el DR se han empleado diversos métodos entre los que se incluyen la inyección intravítrea de enzimas disruptoras de las membranas basales, la inyección subretiniana de suero salino para crear un DR transitorio, o la inyección de ácido hialurónico para producir un DR crónico<sup>85</sup>. Los animales más

empleados para este fin han sido gatos, conejos, ratas, ratones y primates<sup>7</sup>. La ardilla de tierra<sup>2</sup> y más recientemente el pollo<sup>85</sup> han servido para el estudio de los conos. A continuación se hará una breve descripción de los principales modelos experimentales empleados para el estudio de patologías retinianas.

La retina felina está dominada por bastones<sup>86</sup> y tiene una circulación intrarretiniana, al igual que el ser humano, excluida de la capa de fotorreceptores, irrigados por la circulación coroidea. Su gran tamaño hace fácil el abordaje quirúrgico y la presencia de *tapetum lucidum* permite una mejor visualización funduscópica<sup>27</sup>.

La retina del conejo tiene aproximadamente la misma proporción de conos y bastones que la retina felina, aunque carece de circulación intrarretiniana. Su retina tiende a degenerar rápidamente y casi en su totalidad después del DR<sup>27</sup>.

La retina de los primates con fovea sea probablemente el modelo animal ideal, sin embargo su elevado coste y las consideraciones éticas al respecto hacen que se haya limitado su uso<sup>87</sup>.

La retina del ratón está dominada por bastones, mostrando una proporción bastones/conos de 35:1<sup>88</sup>. La densidad de conos es similar a la que presentan los primates a 3-4mm del centro de la fovea, pero en esta localización la densidad de bastones de los primates es menor<sup>88</sup>. Por tanto, se trata de un modelo dominado por bastones, similar a la retina extrafoveal humana. La proporción de otras células retinianas es similar a la del ser humano, aunque tras el DR parece que la reactividad de las células de Müller es menor<sup>7</sup>. Se trata de un modelo adecuado para el estudio de los fenómenos



que ocurren en la retina, aunque la limitación anatómica inherente a su reducido tamaño ha condicionado su estudio<sup>27</sup>.

Además, el ratón ofrece uno de los mejores modelos para la manipulación genética. El ratón deficiente en p53, o p53-KO fue creado en 1989 por Lavigueur et. al<sup>89</sup> y permitió confirmar el papel del gen del p53, como supresor de tumores, ya que hasta entonces se pensaba que era un oncogén<sup>90</sup>. El ratón p53-KO muestra una elevada incidencia de neoplasias con alta penetrancia, por lo que su esperanza de vida es corta<sup>70</sup>.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

La inducción experimental de un DR en un ratón p53-KO, deficiente en uno de los principales inductores de la apoptosis, producirá un menor grado de muerte celular que afecte a los fotorreceptores, o bien activará otros mecanismos alternativos que provocarán la muerte de estas células.

## OBJETIVOS

### **OBJETIVO GENERAL:**

Se propone estudiar el papel que juega el p53 en los procesos de muerte celular, principalmente apoptosis y necroptosis, que ocurren tras un DR en un modelo murino experimental.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1- Poner a punto del modelo de desprendimiento de retina en ratón C57, ya descrito en la literatura<sup>48</sup>.

2- Describir los cambios morfológicos que ocurren tras el DR, observando las muestras teñidas con HE a microscopía óptica, tanto en modelos p53-KO como WT a los 3 días tras el DR.

3- Conocer más acerca de la implicación de p53 sobre los procesos de muerte celular, apoptosis y necroptosis que ocurren a los 3 días tras un DR, comparando los cambios que se producen en el modelo p53-KO con los que se producen en el modelo WT. Se realizará para ello el análisis mediante IF con biomarcadores específicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio forma parte del proyecto Retina 4 orientado al estudio del componente genético e inflamatorio de las enfermedades retinianas, y que se lleva a cabo en el IOBA desde el año 2006. Ha sido supervisado por el Prof. Pastor Jimeno de la Universidad de Valladolid, el Prof. González Sarmiento, la Dra. Almeida Parra y la Dra. Delgado Esteban de la Universidad de Salamanca y la Dra. Pinilla Lozano de la Universidad de Zaragoza. Se ha realizado tras la aprobación del mismo por la Comisión de Investigación del IOBA y por el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal (CEEBA) de la Universidad de Valladolid.

Los animales para la realización del modelos experimental de DR se han obtenido tanto del animalario de la Universidad de Valladolid, como de la Universidad de Salamanca. La estancia, el transporte, y las medidas de acondicionamiento han sido supervisadas por los directores de los animalarios de las respectivas universidades.

Todos los procedimientos usados en animales se ciñen a las instrucciones y requerimientos del Comité de Ética para Experimentación y Bienestar Animal (CEEBA) de la Universidad de Valladolid y del Comité de Ética de la Universidad de Salamanca, cuyas normas se adecúan a la legislación vigente de la Unión Europea y a la resolución para la utilización de animales en investigación de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO).

#### **ANIMALES DEL ESTUDIO:**

Se emplearon ratones (*Mus musculus*) adultos (de 4 a 8 semanas) C57, p53-KO y WT. Se utilizaron 5 ratas (*Rattus norvegicus*) y 5 ratones C57, provenientes del animalario de la Universidad de Valladolid para realizar la curva de aprendizaje. Los animales del grupo experimental, 3 ratones macho WT y 2 ratones macho homocigotos p53-KO fueron cedidos del animalario de la Universidad de Salamanca.

#### **MODELO DE DR:**

El DR fue realizado en el ojo derecho del ratón bajo anestesia general con la ayuda de un microscopio quirúrgico. Se administraron tópicamente ciclopentolato (Colircusí ciclopléjico, Alcon Cusí S.A.) al 1% y fenilefrina (Colorcusí fenilefrina, Alcon Cusí S.A.) al 2.5% como agentes midriáticos, y oxibuprocaina (Colorcusí anestésico, Alcon Cusí S.A.) 0.2% como anestésico local. Tras la disección de la conjuntiva, se realizó una punción escleral a nivel del ecuador superonasal, y una paracentesis en córnea clara para evitar

el aumento de la presión intraocular. Tras esto, se infundieron 100 $\mu$ L de ácido hialurónico 1.4% (Healon GV; Abbott Medical Optics AMO) en el espacio subretiniano, comprendido entre la retina y el EPR, con la ayuda de una micropipeta y un microinyector. El ojo izquierdo ha sido empleado como control, sin manipulación alguna.

Para comprobar la existencia de el DR tras la intervención, se procedió a observar el fondo de ojo bajo el microscopio quirúrgico con metilcelulosa (Methocel, OmniVision, Francia) al 2% y un anillo de silicona. Se estimó válido el desprendimiento de al menos 2 cuadrantes de la retina.

En el postoperatorio se administró oxfloracino tópico (Exocín, Allergan S.A.) cada 8 horas en el ojo derecho del ratón.

Los ratones del grupo experimento fueron sacrificados y sus ojos enucleados para su posterior estudio a los 3 días de la inducción del DR.

### **PROTOCOLO DE ANESTESIA DE LOS ANIMALES:**

Los animales fueron sometidos a un ayuno de sólidos de 24 horas previas a la intervención, con acceso libre al agua de bebida. La inducción anestésica empleada ha sido una combinación de ketamina (Ketalar, Pzifer S.A.) (100mg/Kg) y de xilacina (Rompun, Bayer S.A.) (1mg/Kg) administrados por vía intraperitoneal.

### **MÉTODO DE EUTANASIA UTILIZADO:**

Los animales, tras el periodo de seguimiento establecido, fueron sacrificados por asfixia con dióxido de carbono en una cabina eutanásica.

## **VALORACIÓN MEDIANTE TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA**

### **(OCT):**

Se realizó gracias a la cesión de un equipo Spectralis (Heidelberg Engineering) cedido por Bloss Group S.A., que fue instalado en el quirófano experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid los días de los experimentos.

### **HISTOLOGÍA:**

Tras la extracción, los globos oculares se fijaron en formol tamponado al 10% durante un mínimo de 24 horas. Posteriormente se realizó el tallado a la mitad y se incluyeron en cassettes para su procesado. Se realizó un lavado con agua durante 1 hora y posteriormente se trataron con alcohol de 60° hasta su procesamiento. Se incluyeron las muestras en parafina en un procesador automático de tejidos ASP-300 (Leica). A continuación se retalló el bloque de parafina en forma de pirámide truncada. Se realizaron cortes en microtomo de rotación a 3 micras que se tiñeron con HE para poder estudiar la morfología y la estructura retinianas.

Para la IF, las muestras fueron tratadas con tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline, PBS), seroalbúmina bovina (5%), y Triton X (0.2%). Después se hicieron reaccionar con un anticuerpo primario, anti-rodopsina (Sigma-Aldrich) (1:50), anti-calbindina (Swant) (1:500), anti-RIPK1 (Sigma-Aldrich) (1:400) y anti-caspasa 3 activa (Cell Signaling) (1:100) durante una noche a 4°C. Tras repetidos lavados en PBS+ Triton X-100 (0.1%) se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario ALEXA

FLUOR (Molecular Probes) (1:200) en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se adecuó el protocolo empleado con cada anticuerpo a las recomendaciones dadas por el fabricante y a la experiencia de los investigadores del grupo.

Por último, se realizó la tinción 4', 6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhidrato (DAPI) para estudiar la estructura nuclear.

### **ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN RETINIANA TRAS EL DR:**

En primer lugar se analizaron los cambios producidos tras el DR de las muestras teñidas con HE.

Después, para observar los cambios en los fotorreceptores tras el DR se realizó la IF con anticuerpos anti-rodopsina y anti-calbindina, para visualizar bastones y conos respectivamente.

Además, el anticuerpo anti-calbindina tiñe otros tipos celulares de la retina interna. Se han evaluado de la misma manera las células positivas para analizar el grado de muerte celular que afecta a las capas internas de la retina.

### **CUANTIFICACIÓN DE LA MUERTE CELULAR:**

Para ello han empleado 2 técnicas; recuento de las células caspasa-3 activa positivas, y recuento de las células RIP-1 positivas.

Para cuantificar la apoptosis se empleó el método de detección de la caspasa 3 activa.

Para cuantificar la necroptosis se hicieron reaccionar las muestras con anticuerpos anti-RIPK1. Se hizo un recuento de las células RIPK1 positivas en al menos 4 cortes de cada muestra, y los resultados se expresaron en número de células por campo de gran aumento (40X).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Dado el escaso número de animales (n=5) se ha limitado a un cálculo de la media aritmética.

## **RESULTADOS**

Para ampliar la información acerca de la implicación del p53 sobre los procesos de muerte celular, se compararon las muestras de los ratones p53-KO con los ratones WT.

### **DESPRENDIMIENTO DE RETINA EN RATÓN Y VALORACIÓN MEDIANTE**

#### **OCT**

Tras completar la curva de aprendizaje, se realizaron con éxito los DR, y se evidenciaron mediante observación funduscópica bajo microscopio quirúrgico y mediante OCT (Fig. 4 y 5). Se lograron desprender con éxito las retinas de todos los ratones del grupo experimental.

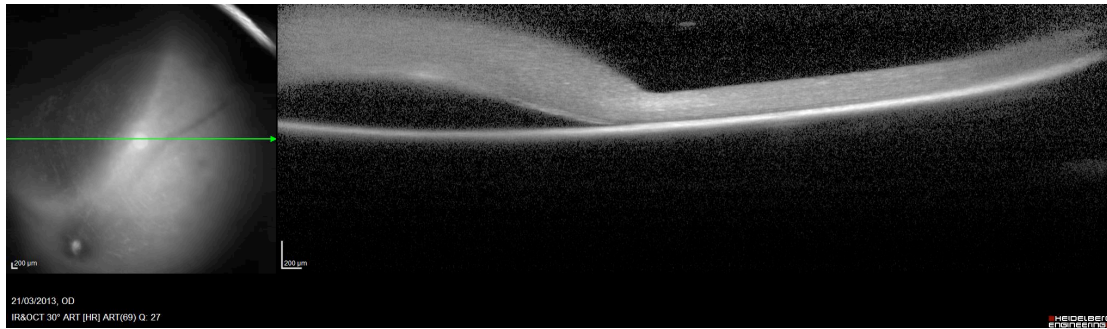


Fig. 4: Tomografía de coherencia óptica (OCT) en la que se observa la separación de la retina neurosensorial del EPR, obtenida de uno de los ratones del grupo experimental (n=5).

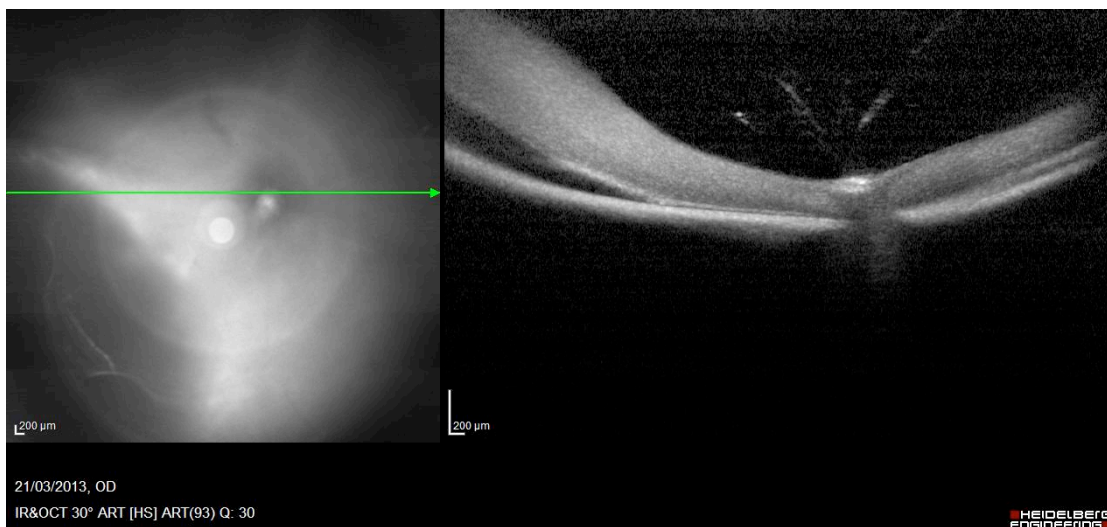


Fig. 5: OCT del mismo ratón en la que se visualiza el nervio óptico, y en la región temporal el DR.



## EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MUESTRAS TEÑIDAS CON HEMATOXILINA-EOSINA

A partir de las muestras fijadas, incluidas en parafina y teñidas con técnicas de rutina (HE), se observó la estructura de la neuroretina, diferenciándose con facilidad las capas que la conforman. Comparando las muestras de retinas no desprendidas (Fig. 6) con las desprendidas (Fig. 7), se observó la existencia de una degeneración de los OS de los fotorreceptores y una disminución discreta del espesor de la ONL.

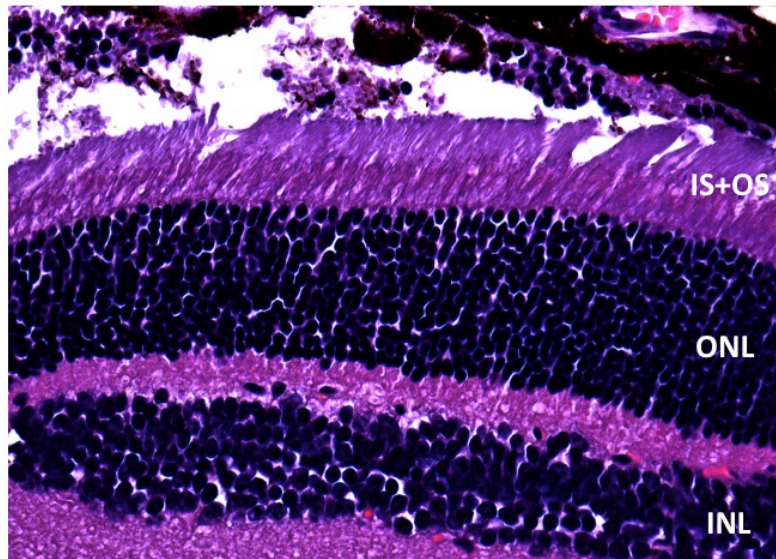


Fig. 6: Corte histológico de una retina de un ojo control (WT) teñida con HE. Se aprecia la indemnidad de los OS de los fotorreceptores.

IS+OS= segmentos internos y externos de los fotorreceptores. ONL=capa nuclear externa. INL=capa nuclear interna.

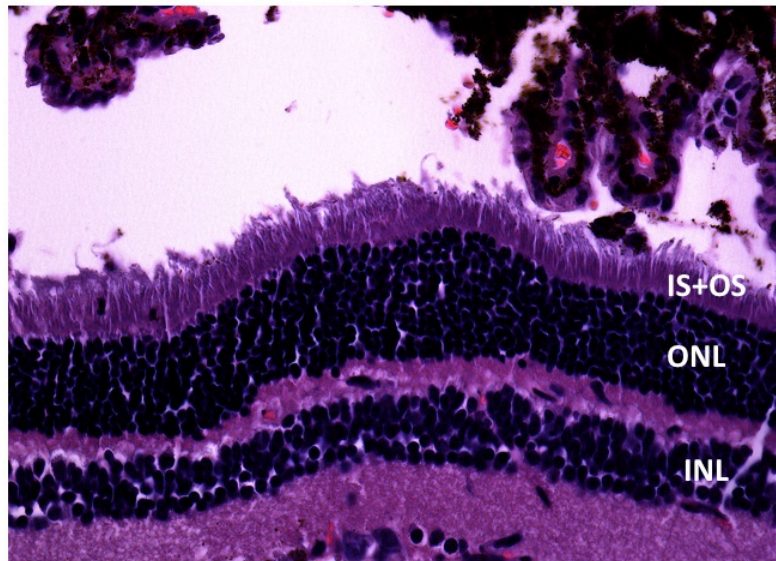


Fig 7: Corte histológico teñido con HE del ojo contralateral del mismo ratón, en el que se realizó el DR experimental. Se observan los cambios a los 3 días del desprendimiento; una degeneración de los OS, visiblemente acortados y desestructurados, y un adelgazamiento de la ONL.

IS+OS= segmentos internos y externos de los fotorreceptores. ONL=capa nuclear externa. INL=capa nuclear interna.

## ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN RETINIANA MEDIANTE LA INMUNOFLORESCENCIA CON ANTICUERPOS ANTI-RODOPSINA Y ANTI-CALBINDINA

- **Rodopsina:** la rodopsina es una proteína implicada en el proceso de fototransducción que se localiza en los discos de los OS de los

fotorreceptores. Se empleó el anticuerpo anti-rodopsina (anti-RHO) en este estudio para visualizar los cambios que ocurrían en la expresión de rodopsina (de algún modo intentar observar fotorreceptores supervivientes) y los cambios morfológicos que afectaban a los OS tras el DR.

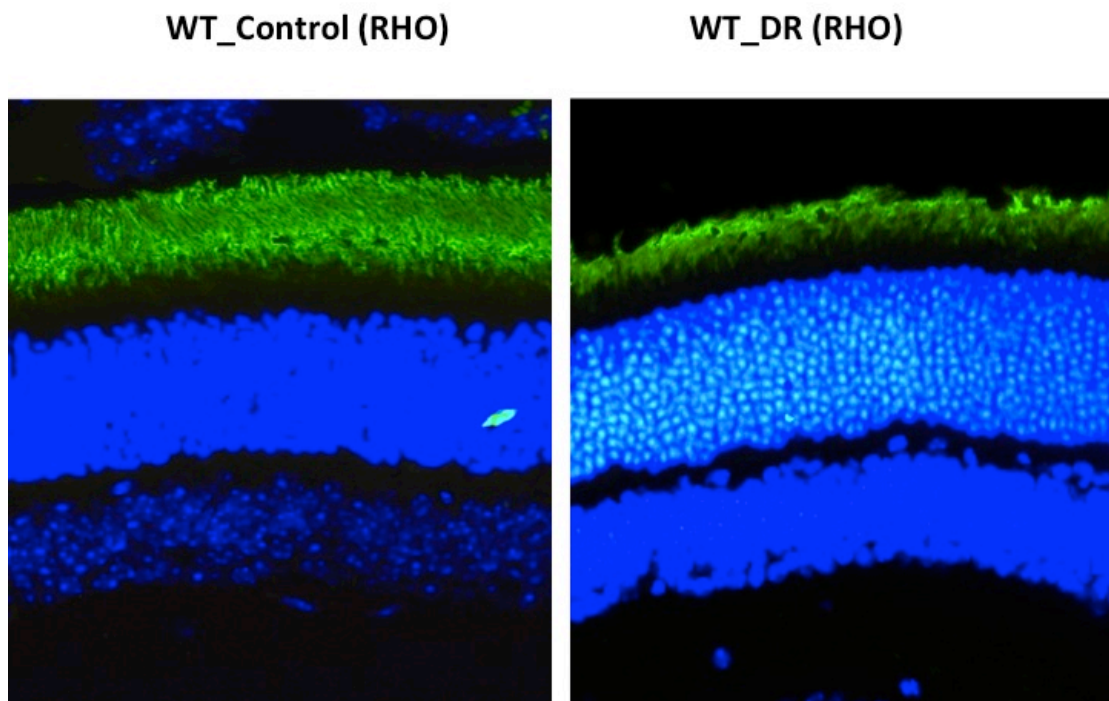


Fig 8: Comparación de las IF con anti-rodopsina (verde) en los ratones WT. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). A la izqda. el ojo control y a la dcha. el ojo del DR. Tras el DR, se observa el acortamiento de los OS de los bastones, donde se localiza la rodopsina.

p53-KO\_Control (RHO)

p53-KO\_DR (RHO)

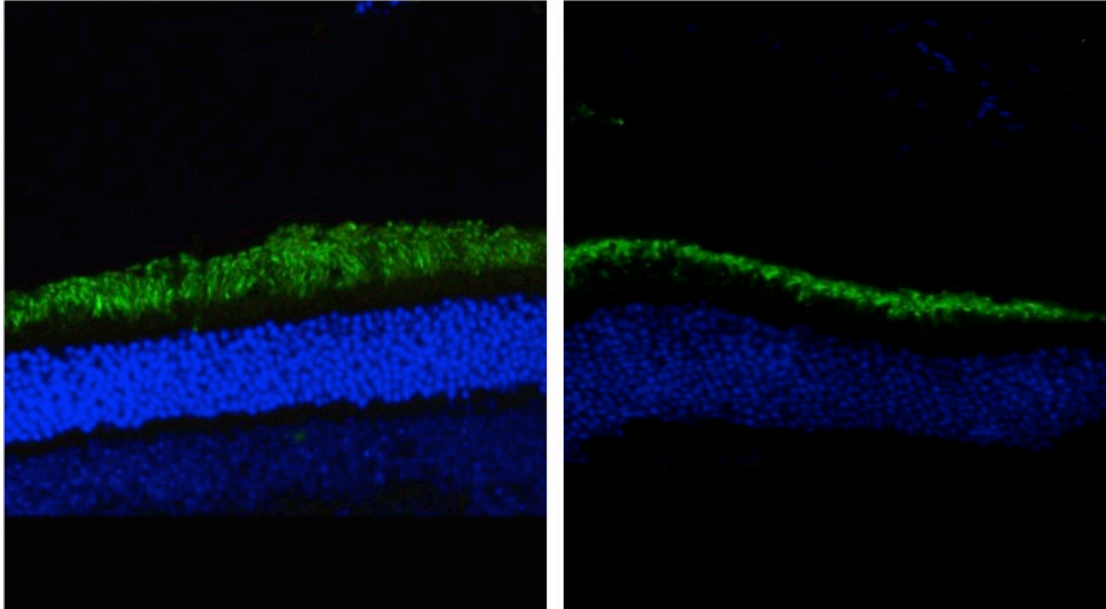


Fig 9: Comparación de las IF con el anticuerpo anti-rodopsina (verde) en los ratones p53-KO. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). A la izqda. el ojo control y a la dcha. el ojo del DR. Se aprecia una degeneración de los OS de los bastones tras el DR.

A la vista de los resultados, en ambos grupos, p53-KO y WT, se evidenció un acortamiento de los OS de los bastones.

- **Calbindina:** es una proteína ligadora de calcio, y su distribución varía en función de la especie<sup>91</sup>. En ratón, la especie que nos concierne, marca algunos conos, células horizontales, amacrinas y ganglionares. En nuestras muestras no se logró visualizar ningún cono, pero se

visualizaron muy bien las células horizontales. Así, se ha realizado el análisis comparativo haciendo un recuento de células horizontales positivas para el anticuerpo anti-calbindina con el fin de evaluar la afectación de la retina interna.

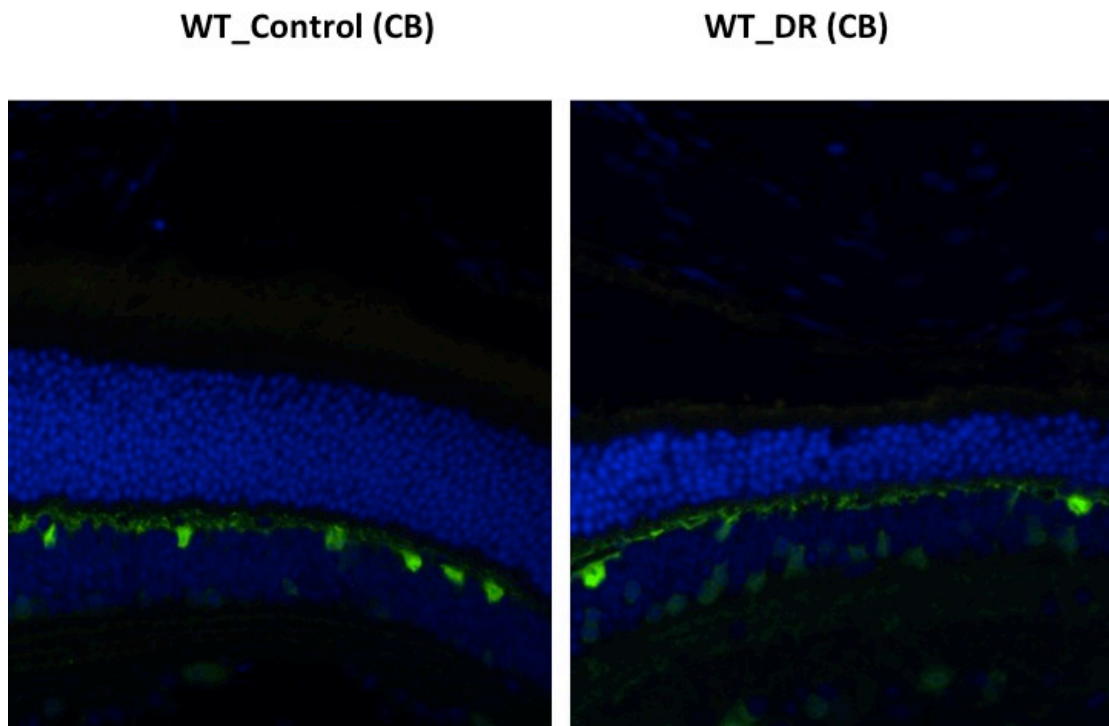


Fig 10: Comparación de las IF con el anticuerpo anti-calbindina (verde) en los ratones WT. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). A la izqda. el ojo control y a la dcha. el ojo del DR. Se puede apreciar una disminución del número de células positivas para calbindina en el ojo del DR. No se visualiza ningún cono.

p53-KO\_Control (CB)

p53-KO\_DR (CB)

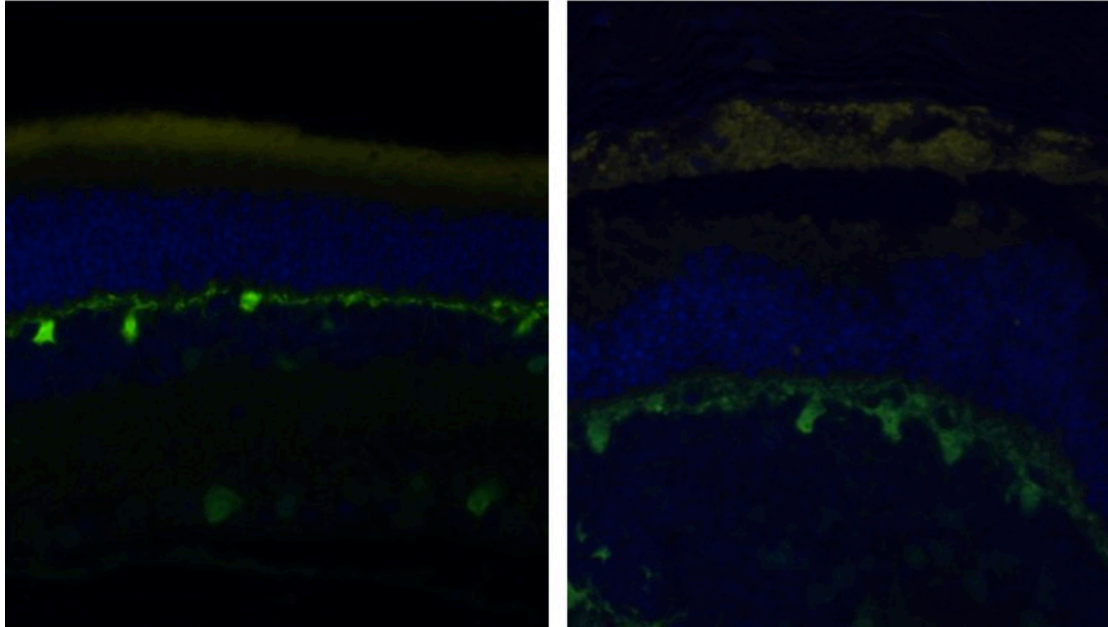


Fig 11: Comparación de las IF con el anticuerpo anti-calbindina (verde) en los ratones p53-KO. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). A la izqda. el ojo control y a la dcha. el ojo del DR. Se pone de manifiesto una disminución en el número de células que expresan calbindina tras el DR.

La siguiente tabla muestra la media de células horizontales positivas para el anticuerpo anti-calbindina en cada grupo estudiado. En el grupo p53-KO se analizaron 2 ojos DR y sus respectivos controles. En el grupo WT se analizaron 3 ojos DR y sus respectivos controles. Los resultados están expresados en células positivas por campo de gran aumento (40X).

	Ojo control	Ojo DR
p53-KO	5.50 n=2	4.75 n=2
WT	5.60 n=3	3.58 n=3

En ambos grupos, p53-KO y WT, tras la inducción del DR, disminuyó el número de células positivas para calbindina. En los ojos control no se observan diferencias entre p53-KO y WT. Sin embargo, al comparar los ojos en los que se realizó el DR, los p53-KO muestran un mayor número de células horizontales que expresan calbindina.

### **CUANTIFICACIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIANTE DETECCIÓN DE LA CASPASA-3 ACTIVA**

No se logró realizar la detección de la caspasa-3 activa. Se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante, y se probaron las concentraciones 1:1600, 1:400, 1:100, 1:50 y 1:25, sin éxito en ninguna de ellas, ya que la tinción fue inespecífica. Comparando los cortes con sus respectivos controles negativos, en los que se añadió anticuerpo secundario sin anticuerpo primario, se observó una tinción débil de todas las células de la retina. Para intentar resolver el problema, tras contactar con el fabricante, se modificó el protocolo, pero no se consiguieron resultados satisfactorios. Por ello, se ha decidido cuantificar la apoptosis de las muestras que se disponen en un segundo tiempo.

## **CUANTIFICACIÓN DE LA NECROPTOSIS MEDIANTE LA DETECCIÓN DE RIPK1.**

El anticuerpo RIPK1 se utiliza como marcador de necrosis programada<sup>92</sup>. Su cuantificación permite estimar el grado de necroptosis de las muestras, especialmente interesante en el caso de los ratones p53-KO.

**WT\_Control (RIPK1)**

**WT\_DR (RIPK1)**

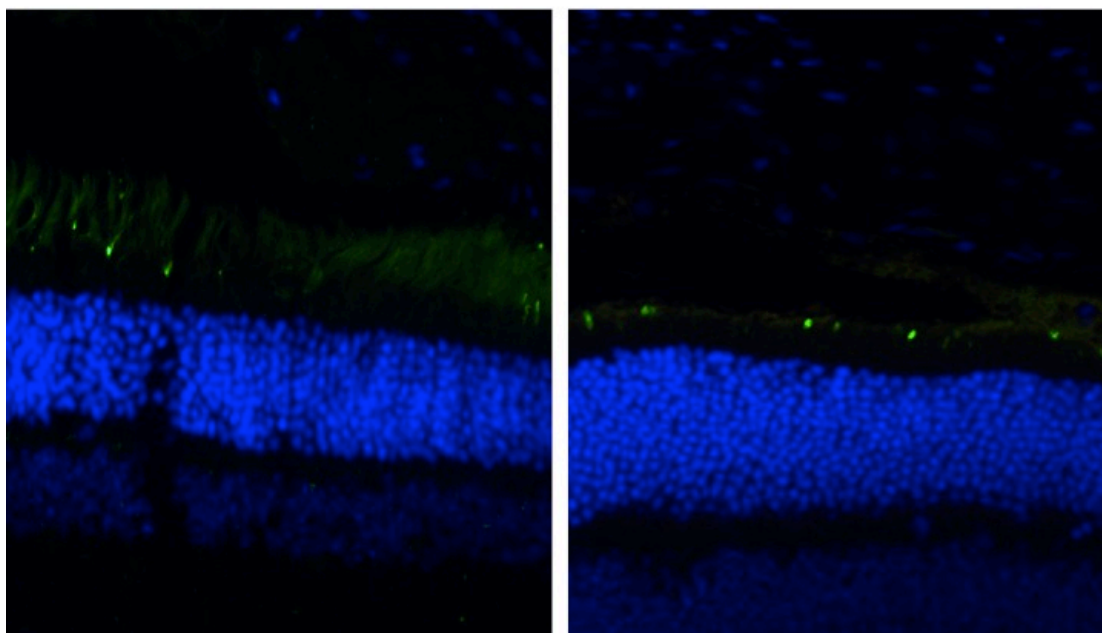


Fig. 12: Comparación de las IF con el anticuerpo anti-RIPK1 (verde) en los ratones WT. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). A la izqda. el ojo control y a la dcha. el ojo del DR. Se observa un aumento de las células que expresan RIPK1 tras el DR.



p53-KO\_Control (RIPK1)

p53-KO\_DR (RIPK1)

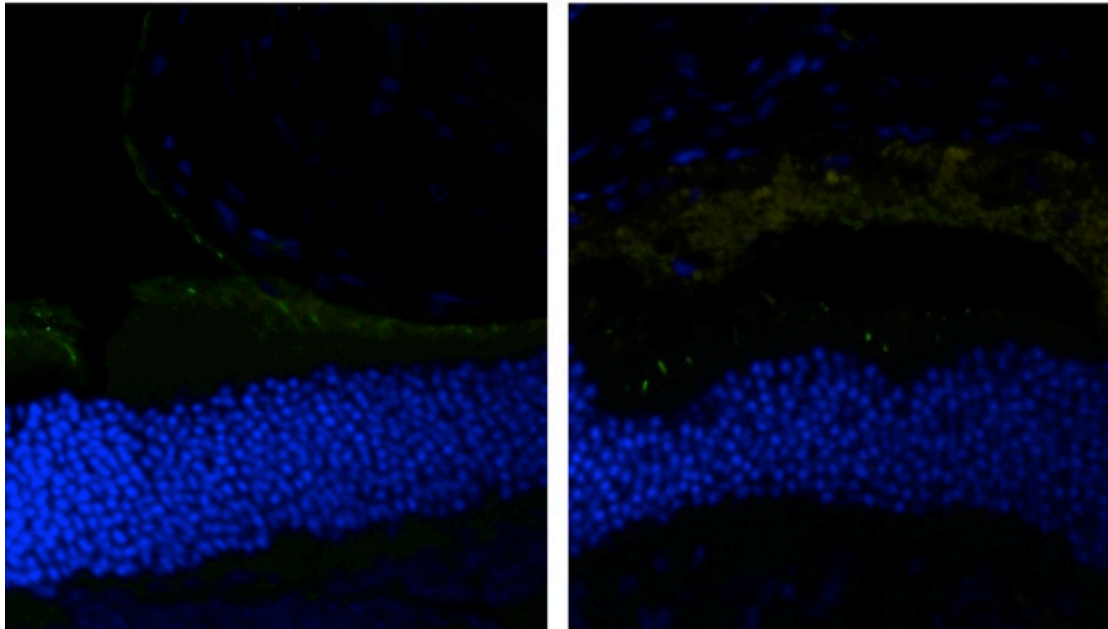


Fig 13: Comparación de las IF con el anticuerpo anti-RIPK1 (verde) en los ratones p53-KO. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). A la izqda. el ojo control y a la dcha. el ojo del DR. Tras el DR, se aprecia un aumento del número de células positivas para RIPK1.

En la siguiente tabla se expresan las medias del recuento de las células positivas para el anticuerpo RIPK1, realizadas bajo microscopio de fluorescencia. En el grupo p-53-KO se analizaron 2 ojos DR y sus respectivos controles. En el grupo WT se analizaron 3 ojos DR y sus respectivos controles. Los resultados están expresados en células positivas por campo de gran aumento (40X).

	Ojo control	Ojo DR
p53-KO	13.05 n=2	20.00 n=2
WT	10.93 n=3	19.64 n=3

En ambos grupos, p53-KO y WT se observa un aumento de las células que expresan RIPK1 tras el DR.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Ante la incapacidad para predecir el nacimiento de ratones p53-KO, los experimentos se programaron con poco tiempo de antelación, y se ha visto limitada la población de la muestra.

Existe una dificultad anatómica para realización de un DR en ratón, inherente a su pequeño tamaño. Además la altura del DR está limitada por gran tamaño cristaliniario del ratón.

El análisis histológico resultó difícil por cambios artefactuales producidos durante el tallado y procesado anatomopatológico de las muestras.

Además, los cortes de las muestras no fueron realizados al mismo nivel en todos los ojos, por lo que los hallazgos observados pueden no ser comparables.

No se consiguió visualizar los conos mediante la IF con calbindina, por lo que no fue posible observar la remodelación y muerte celular sobre estos fotorreceptores.

Existe una falta de experiencia y referencias bibliográficas con el anticuerpo anti-caspasa 3 activa sobre retina de ratón, por lo que no se pudo cuantificar la apoptosis mediante la detección de la caspasa 3-activa.

No se realizó un método objetivo de cuantificación de la muerte celular.

Dado el pequeño tamaño muestral, los resultados no son concluyentes.

## DISCUSIÓN

Se escogió el modelo en ratón para este estudio ya que se trata de un modelo in vivo, cuyas respuestas celulares han demostrado ser semejantes a las del ser humano<sup>2,27</sup>. Además es un modelo ampliamente estudiado<sup>27</sup>, permite la manipulación genética<sup>2</sup> y es de bajo coste.

Como ya se ha mencionado, la retina del ratón está dominada por bastones<sup>88</sup> y por tanto es similar a la retina extrafoveal humana. Sin embargo, el estudio de la respuesta de los conos tras el DR resulta más determinante que la de los bastones en cuanto a los resultados funcionales, ya que los conos son los responsables de la máxima agudeza visual, la visión diurna y la visión en color<sup>2,85</sup>. Como se ha comentado previamente, las respuestas de conos y bastones, y las células del EPR que contactan con éstos son diferentes, por lo que sería necesario estudiar los procesos de muerte celular

tras un DR en un modelo animal cuya proporción de conos sea mayor, como la ardilla de tierra<sup>27</sup> o el pollo<sup>85</sup>.

El modelo en ardilla de tierra, aunque adecuado para el estudio de los conos por representar éstos el 85% de sus fotorreceptores<sup>93</sup>, presenta desventajas importantes como su elevado coste, difícil manejo, y diferencias en cuanto a reactividad celular en zonas de retina desprendida<sup>94</sup>, entre otras. El pollo ha sido propuesto recientemente para sustituir al modelo en ardilla de tierra como modelo rico en conos, por su bajo coste y gran disponibilidad, sus respuestas celulares tras el DR han demostrado ser similares a las que se producen en mamíferos<sup>85</sup>, pero se aleja bastante del ser humano en la escala filogenética, por lo que se prefieren los estudios en mamíferos<sup>27</sup>. Es por ello que en numerosos estudios recientes, para evaluar respuestas celulares tras el DR se utiliza el modelo en ratón como paso previo al estudio en humanos<sup>46,95</sup>.

El principal problema que ofrece el ratón es la limitación anatómica para su abordaje quirúrgico, pero en este caso se logró poner a punto la técnica quirúrgica de una manera reproducible, ya que se lograron desprender al menos dos cuadrantes de la retina en todos los experimentos, lo que se comprobó mediante funduscopia y OCT. Esta limitación anatómica no sólo interfiere en la realización de la cirugía; la altura del DR, o distancia entre el EPR y la retina es un factor que condiciona la recuperación visual en humanos<sup>6</sup>, e interfiere en la remodelación retiniana<sup>2</sup>. Este modelo no permite la realización de un DR de gran altura, por la presencia de un cristalino que ocupa gran parte de la cavidad vítrea, por lo que puede que la degeneración

retiniana tras DR sea menor al existir un contacto más cercano entre la retina y el EPR, permitiendo la difusión de nutrientes y productos metabólicos<sup>6</sup>, en alguna medida.

El DR se realizó mediante la inyección de ácido hialurónico en el espacio subretiniano, comprendido entre la retina neural y el EPR, con ayuda de una micropipeta y un microinyector. Se accedió al espacio subretiniano a través de una incisión escleral, sin llegar a manipular la retina neural. Se podría argumentar que este modelo no reproduce lo que ocurre en un DR regmatógeno, que es el mecanismo de producción más frecuente, ya que no se ha creado una rotura en la retina. Éste ha sido un modelo ampliamente estudiado, y validado, que origina respuestas celulares similares a las que ocurren tras un DR regmatógeno<sup>27</sup>, por lo que se consideró apropiado.

Se decidió analizar la degeneración y la muerte celular a los 3 días del DR, ya que se estima que en ese momento se produce el pico máximo de procesos apoptóticos, habiéndose reportado la muerte por apoptosis de hasta el 85% de los fotorreceptores<sup>48</sup>. Además, el p53 tiene una vida media muy corta ya que es rápidamente degradado por su antagonista Mdm2; en condiciones normales, su vida media se limita a minutos, y bajo estrés celular horas, presenta una vida máxima de entre 48 y 72 horas<sup>70</sup>. Por tanto, para conocer la implicación del p53 sobre los procesos de muerte celular se consideró adecuado el estudio a 3 días.

Tras la observación de las muestras teñidas con HE a microscopía óptica, se evidenció el acortamiento de los OS en las regiones de retina desprendida, así como una discreta disminución del espesor de la ONL (Figs.

6 y 7). Estos hallazgos fueron consistentes con los resultados de estudios previos<sup>2</sup>. No se cuantificó el acortamiento de la ONL, como se ha realizado en otros estudios de muerte celular en retina, dado que requiere realizar muchos cortes de una muestra de tamaño reducido, y los cortes han de realizarse a nivel de nervio óptico para que los resultados sean comparables<sup>48</sup>. Además se consideró su cuantificación poco relevante para los resultados y conclusiones que se quieren obtener de este estudio, ya que la disminución de la ONL no es un indicador directo de muerte celular.

La IF con anti-rodopsina, permitió visualizar los bastones y poner de manifiesto la degeneración de los OS en estas células, pero la anti-calbindina no permitió visualizar ningún cono. Se pretendía comparar la muerte celular entre conos y bastones, haciendo reaccionar en la misma muestra los anticuerpos anti-rodopsina y anti-calbindina con los biomarcadores de muerte celular, para analizar la respuesta de los fotorreceptores al DR.

La incapacidad para visualizar los conos mediante esta técnica ha sido un hallazgo previamente descrito en la bibliografía. Ya se ha comentado en este trabajo que existen diferencias entre la respuesta de conos y bastones en la remodelación retiniana. Se cree que los conos supervivientes modifican sus funciones metabólicas en un intento de escapar de la muerte celular. Muchos de los conos pierden la expresión de proteínas no indispensables para su supervivencia como son las opsinas y la calbindina, para conservar su energía para poder realizar sus funciones vitales<sup>94,96</sup>.

La gran limitación que ha sufrido este trabajo ha sido la incapacidad para analizar la apoptosis mediante la detección de la caspasa-3 activa, que

es un método más específico que la técnica clásica de TUNEL<sup>97</sup>. La técnica de TUNEL (*Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling*) ha sido ampliamente estudiada y empleada para la detección de la apoptosis, pero la positividad de esta técnica no es siempre indicativa de apoptosis, ya que algunas células necróticas, no apoptóticas, aparecen como TUNEL positivas<sup>97</sup>.

Por el contrario, la activación de las caspasas es común a casi todas las vías apoptóticas<sup>98</sup>, siendo la caspasa 3 una caspasa efectora que en condiciones normales aparece en forma de procaspasa, y se activa para ejecutar la apoptosis. Se trata por tanto un método de detección de apoptosis altamente sensible y específico<sup>97</sup>.

Es necesario continuar con el estudio y conseguir cuantificar la apoptosis, para poder conocer la respuesta de los ratones p53-KO tras el DR, y compararla con el grupo WT. Se cree que la respuesta apoptótica en los p53-KO podría ser menor que en los WT y haber un aumento de las vías de muerte celular alternativas. Como previamente se ha descrito, una disminución de la apoptosis favorece la activación de la muerte celular por otras vías, como la necroptosis<sup>62</sup>.

Se ha verificado la presencia de células positivas para RIPK1 en ambos grupos. La RIPK1 pertenece a la familia de las serina/treonina kinasas y su detección ha sido empleada en varios estudios para cuantificar la necroptosis<sup>60,62</sup>, aunque también interviene como mediador en la apoptosis<sup>99</sup>. A los 3 días del DR se observó un aumento de las células positivas en ambos grupos.

Se considera necesario utilizar un método de cuantificación más fiable que el simple recuento de células RIPK1 positivas por campo de gran aumento (40X), y aumentar el tamaño de la muestra para que los resultados puedan alcanzar la significación estadística. De este modo se podrían comparar las respuestas necroptóticas de ambos grupos tras el DR. Se espera poder realizarlo en la continuación de este estudio.

Cabe mencionar que, a pesar de la existencia de numerosos métodos bioquímicos para la detección de la muerte celular, no existe un método perfecto que permita diferenciar apoptosis y necroptosis<sup>60</sup>. Estos procesos de muerte celular no son completamente independientes, como se ha comentado en su correspondiente apartado, sus vías se cruzan, sobre todo en las fases finales de la muerte celular, por lo que no se disponen de marcadores específicos para diferenciarlas. La microscopía electrónica de barrido, aunque menos empleada en el momento actual, sigue siendo el método más sensible y directo para evidenciar los cambios morfológicos que ocurren en los distintos procesos de muerte celular<sup>100</sup>, por lo que se estima emplearlo en los futuros experimentos de este estudio.

## CONCLUSIONES

En ambos grupos, p53-KO y WT se observó degeneración de los fotorreceptores tras el DR, sin que se hayan cuantificado diferencias objetivas entre ellos.



En ambos grupos se observó positividad frente al anticuerpo RIPK1, y un aumento del número de células positivas para este anticuerpo tras el DR.

Este estudio no está concluido y queda pendiente aumentar el tamaño muestral, visualizar los conos, analizar la apoptosis y cuantificar de manera objetiva los procesos de muerte celular.

Se piensa que en los ratones p53-KO, al carecer de uno de los principales activadores de la apoptosis, habrá un aumento de los procesos de muerte celular alternativos a la apoptosis.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias al Prof. Pastor Jimeno y la Dra. Sanabria Ruiz-Colmenares, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y tutelararlo.

Al Prof. González Sarmiento, la Dra. Almeida Parra y la Dra. Delgado Esteban, de la Universidad de Salamanca, por la cesión de los ratones, toda la ayuda y conocimientos que me han aportado.

A la Dra. Pinilla Lozano, de la Universidad de Zaragoza, por enseñarme a realizar los desprendimientos, gestionar el préstamo del equipo de OCT, orientarme y compartir conmigo su experiencia.

A Salvador Pastor Idoate y el Dr. Fernández Bueno, del Grupo de Retina del IOBA, por su tiempo, paciencia, ayuda y todo lo que me han enseñado.

Al Dr. Kumar Srivastava y Maite García Gutiérrez, del Laboratorio de Retina del IOBA. Jose Carlos López López y Nieves Fernández Alonso, de la

Unidad de Anatomía Patológica del IOBA. Al personal de los Animalarios de la Universidad de Valladolid y Salamanca.

Gracias a todos ellos por hacer posible la realización de este trabajo y enseñarme tantas cosas como he aprendido realizándolo. Espero que esto sea sólo el principio.

## FINANCIACIÓN

Este estudio ha recibido dos fuentes de financiación:

- Fondos del FIS PS09/00938 cedidos por el Dr. Girish Srivastava,
- Fondos del “Premio Investigación Médica en Retina 2012” concedido a Salvador Pastor Idoate por la Sociedad Española de Retina y Vítreo, financiado por Laboratorios Thea.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mitry D, Charteris DG, Fleck BW, Campbell H, Singh J. The epidemiology of rhegmatogenous retinal detachment: geographical variation and clinical associations. *Br J Ophthalmol* 2010;94:678-84.
2. Fisher SK, Lewis GP, Linberg KA, Verardo MR. Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:395-431.
3. Lo AC, Woo TT, Wong RL, Wong D. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue. *Ophthalmologica* 2011;226 Suppl 1:10-7.
4. Luthert PJ, Chong NH. Photoreceptor rescue. *Eye (Lond)* 1998;12 ( Pt 3b):591-6.
5. Pastor JC, Fernandez I, Rodriguez de la Rúa E, et al. Surgical outcomes for primary rhegmatogenous retinal detachments in phakic and pseudophakic patients: the Retina 1 Project--report 2. *Br J Ophthalmol* 2008;92:378-82.
6. Abouzeid H, Wolfensberger TJ. Macular recovery after retinal detachment. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84:597-605.
7. Fisher SK, Lewis GP. Muller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision Res* 2003;43:887-97.
8. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998;102:783-91.
9. Chang GQ, Hao Y, Wong F. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 1993;11:595-605.
10. Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, Milam AH. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1435-42.
11. Mitry D, Fleck BW, Wright AF, Campbell H, Charteris DG. Pathogenesis of rhegmatogenous retinal detachment: predisposing anatomy and cell biology. *Retina* 2010;30:1561-72.
12. Sanabria MR, Fernandez I, Sala-Puigdollers A, et al. A propensity score matching application: indications and results of adding scleral buckle to vitrectomy: The Retina 1 Project: Report 3. *Eur J Ophthalmol* 2012;22:244-53.
13. Campo RV, Sipperley JO, Sneed SR, et al. Pars plana vitrectomy without scleral buckle for pseudophakic retinal detachments. *Ophthalmology* 1999;106:1811-5; discussion 6.
14. Rashid S, Pilli S, Chin EK, Zawadzki RJ, Werner JS, Park SS. Five-year follow-up of macular morphologic changes after rhegmatogenous retinal detachment repair: Fourier Domain OCT Findings. *Retina* 2013.
15. Wolfensberger TJ. Foveal reattachment after macula-off retinal detachment occurs faster after vitrectomy than after buckle surgery. *Ophthalmology* 2004;111:1340-3.

16. Wolfensberger TJ, Gonvers M. Optical coherence tomography in the evaluation of incomplete visual acuity recovery after macula-off retinal detachments. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240:85-9.
17. Veckeneer M, Derycke L, Lindstedt EW, et al. Persistent subretinal fluid after surgery for rhegmatogenous retinal detachment: hypothesis and review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250:795-802.
18. Joe SG, Kim YJ, Chae JB, et al. Structural recovery of the detached macula after retinal detachment repair as assessed by optical coherence tomography. *Korean J Ophthalmol* 2013;27:178-85.
19. Jones BW, Kondo M, Terasaki H, Lin Y, McCall M, Marc RE. Retinal remodeling. *Jpn J Ophthalmol* 2012;56:289-306.
20. de Souza CF, Kalloniatis M, Polkinghorne PJ, McGhee CN, Acosta ML. Functional and anatomical remodeling in human retinal detachment. *Exp Eye Res* 2012;97:73-89.
21. Fisher SK, Erickson PA, Lewis GP, Anderson DH. Intraretinal proliferation induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1739-48.
22. Immel J, Negi A, Marmor MF. Acute changes in RPE apical morphology after retinal detachment in rabbit. A SEM study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27:1770-6.
23. Iribarne M, Canto-Soler MV, Torbidoni V, Suburo AM. Controlling retinal pigment epithelium injury after experimental detachment of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1348-54.
24. Kubay OV, Charteris DG, Newland HS, Raymond GL. Retinal detachment neuropathology and potential strategies for neuroprotection. *Surv Ophthalmol* 2005;50:463-75.
25. Delyfer MN, Raffelsberger W, Mercier D, et al. Transcriptomic analysis of human retinal detachment reveals both inflammatory response and photoreceptor death. *PLoS One* 2011;6:e28791.
26. Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:607-55.
27. Lewis GP, Charteris DG, Sethi CS, Fisher SK. Animal models of retinal detachment and reattachment: identifying cellular events that may affect visual recovery. *Eye (Lond)* 2002;16:375-87.
28. Wickham L, Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK, McLeod DC, Charteris DG. Glial and neural response in short-term human retinal detachment. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1779-82.
29. Fernandez-Bueno I, Fernandez-Sanchez L, Gayoso MJ, Garcia-Gutierrez MT, Pastor JC, Cuenca N. Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Exp Eye Res* 2012;104:26-38.
30. Fernandez-Bueno I, Pastor JC, Gayoso MJ, Alcalde I, Garcia MT. Muller and macrophage-like cell interactions in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Mol Vis* 2008;14:2148-56.
31. Besirli CG, Chinsky ND, Zheng QD, Zacks DN. Autophagy activation in the injured photoreceptor inhibits fas-mediated apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:4193-9.
32. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87:99-163.

33. Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:871-7.
34. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-8.
35. Livesey FJ, Cepko CL. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:109-18.
36. Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, et al. Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:689-735.
37. Chang CJ, Lai WW, Edward DP, Tso MO. Apoptotic photoreceptor cell death after traumatic retinal detachment in humans. *Arch Ophthalmol* 1995;113:880-6.
38. Mervin K, Valter K, Maslim J, Lewis G, Fisher S, Stone J. Limiting photoreceptor death and deconstruction during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation. *Am J Ophthalmol* 1999;128:155-64.
39. Bode C, Wolfrum U. Caspase-3 inhibitor reduces apoptotic photoreceptor cell death during inherited retinal degeneration in tubby mice. *Mol Vis* 2003;9:144-50.
40. Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, et al. The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med* 1997;3:346-9.
41. Li SY, Fu ZJ, Ma H, et al. Effect of lutein on retinal neurons and oxidative stress in a model of acute retinal ischemia/reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:836-43.
42. Li SY, Yang D, Yeung CM, et al. Lycium barbarum polysaccharides reduce neuronal damage, blood-retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 2011;6:e16380.
43. Zacks DN, Hanninen V, Pantcheva M, Ezra E, Grosskreutz C, Miller JW. Caspase activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1262-7.
44. Zacks DN, Zheng QD, Han Y, Bakhru R, Miller JW. FAS-mediated apoptosis and its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4563-9.
45. Zacks DN, Boehlke C, Richards AL, Zheng QD. Role of the Fas-signaling pathway in photoreceptor neuroprotection. *Arch Ophthalmol* 2007;125:1389-95.
46. Besirli CG, Zheng QD, Reed DM, Zacks DN. ERK-mediated activation of Fas apoptotic inhibitory molecule 2 (Faim2) prevents apoptosis of 661W cells in a model of detachment-induced photoreceptor cell death. *PLoS One* 2012;7:e46664.
47. Eversole-Cire P, Chen J, Simon MI. Bax is not the heterodimerization partner necessary for sustained anti-photoreceptor-cell-death activity of Bcl-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1636-44.
48. Yang L, Bula D, Arroyo JG, Chen DF. Preventing retinal detachment-associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:648-54.

49. Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:990-6.
50. Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T, et al. Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. *Am J Pathol* 2001;158:1271-8.
51. Arroyo JG, Yang L, Bula D, Chen DF. Photoreceptor apoptosis in human retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2005;139:605-10.
52. Hisatomi T, Nakazawa T, Noda K, et al. HIV protease inhibitors provide neuroprotection through inhibition of mitochondrial apoptosis in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2025-38.
53. Zhu H, Qian J, Wang W, et al. RNA interference of GADD153 protects photoreceptors from endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis after retinal detachment. *PLoS One* 2013;8:e59339.
54. Liu H, Qian J, Wang F, et al. Expression of two endoplasmic reticulum stress markers, GRP78 and GADD153, in rat retinal detachment model and its implication. *Eye (Lond)* 2010;24:137-44.
55. Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 2006;13:385-92.
56. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007;32:37-43.
57. Erickson PA, Fisher SK, Anderson DH, Stern WH, Borgula GA. Retinal detachment in the cat: the outer nuclear and outer plexiform layers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:927-42.
58. Arimura N, Ki-i Y, Hashiguchi T, et al. Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment. *Lab Invest* 2009;89:278-89.
59. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:1371-87.
60. Murakami Y, Miller JW, Vavvas DG. RIP kinase-mediated necrosis as an alternative mechanisms of photoreceptor death. *Oncotarget* 2011;2:497-509.
61. Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005;1:112-9.
62. Trichonas G, Murakami Y, Thanos A, et al. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:21695-700.
63. Peter ME. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. *Nature* 2011;471:310-2.
64. Han W, Xie J, Li L, Liu Z, Hu X. Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis. *Apoptosis* 2009;14:674-86.
65. Besirli CG, Chinskey ND, Zheng QD, Zacks DN. Inhibition of retinal detachment-induced apoptosis in photoreceptors by a small peptide inhibitor of the fas receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:2177-84.

66. Dong K, Zhu H, Song Z, et al. Necrostatin-1 protects photoreceptors from cell death and improves functional outcome after experimental retinal detachment. *Am J Pathol* 2012;181:1634-41.
67. Dong K, Sun X. Targeting death receptor induced apoptosis and necroptosis: a novel therapeutic strategy to prevent neuronal damage in retinal detachment. *Med Hypotheses* 2011;77:144-6.
68. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:332-7.
69. Lei H, Rheaume MA, Cui J, et al. A novel function of p53: a gatekeeper of retinal detachment. *Am J Pathol* 2012;181:866-74.
70. Vuong L, Conley SM, Al-Ubaidi MR. Expression and role of p53 in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:1362-71.
71. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
72. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594-604.
73. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005;24:2899-908.
74. Mancini F, Di Conza G, Pellegrino M, et al. MDM4 (MDMX) localizes at the mitochondria and facilitates the p53-mediated intrinsic-apoptotic pathway. *EMBO J* 2009;28:1926-39.
75. Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 2008;133:612-26.
76. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303:844-8.
77. Ueki Y, Karl MO, Sudar S, et al. P53 is required for the developmental restriction in Muller glial proliferation in mouse retina. *Glia* 2012;60:1579-89.
78. Salazar JJ, Gallego-Pinazo R, de Hoz R, et al. "Super p53" mice display retinal astroglial changes. *PLoS One* 2013;8:e65446.
79. Vuong L, Brobst DE, Ivanovic I, Sherry DM, Al-Ubaidi MR. p53 Selectively Regulates Developmental Apoptosis of Rod Photoreceptors. *PLoS One* 2013;8:e67381.
80. Joo CK, Choi JS, Ko HW, et al. Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:713-20.
81. Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta H, et al. The role of the p53 protein in the selective vulnerability of the inner retina to transient ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2132-9.
82. Harris SL, Gil G, Hu W, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005;70:111-9.
83. Gomez-Sanchez JC, Delgado-Esteban M, Rodriguez-Hernandez I, et al. The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *J Exp Med* 2011;208:429-37.
84. Pastor-Idoate S, Rodriguez-Hernandez I, Rojas J, et al. The p53 codon 72 polymorphism (rs1042522) is associated with proliferative vitreoretinopathy: the Retina 4 Project. *Ophthalmology* 2013;120:623-8.
85. Cebulla CM, Zelinka CP, Scott MA, et al. A chick model of retinal detachment: cone rich and novel. *PLoS One* 2012;7:e44257.

86. Steinberg RH, Reid M, Lacy PL. The distribution of rods and cones in the retina of the cat (*Felis domesticus*). *J Comp Neurol* 1973;148:229-48.
87. Guerin CJ, Anderson DH, Fariss RN, Fisher SK. Retinal reattachment of the primate macula. Photoreceptor recovery after short-term detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1708-25.
88. Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 1998;18:8936-46.
89. Lavigueur A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 1989;9:3982-91.
90. Mercer WE, Nelson D, DeLeo AB, Old LJ, Baserga R. Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:6309-12.
91. Pasteels B, Rogers J, Blachier F, Pochet R. Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci* 1990;5:1-16.
92. Miao B, Degterev A. Methods to analyze cellular necroptosis. *Methods Mol Biol* 2009;559:79-93.
93. Jacobs GH, Calderone JB, Sakai T, Lewis GP, Fisher SK. An animal model for studying cone function in retinal detachment. *Doc Ophthalmol* 2002;104:119-32.
94. Linberg KA, Sakai T, Lewis GP, Fisher SK. Experimental retinal detachment in the cone-dominant ground squirrel retina: morphology and basic immunocytochemistry. *Vis Neurosci* 2002;19:603-19.
95. Nakazawa T, Kayama M, Ryu M, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates photoreceptor death in a rodent model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1384-91.
96. Rex TS, Fariss RN, Lewis GP, Linberg KA, Sokal I, Fisher SK. A survey of molecular expression by photoreceptors after experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:1234-47.
97. Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem* 2002;50:449-54.
98. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000;102:1-4.
99. Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, et al. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis* 2012;3:e437.
100. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990;181:195-213.