



Universidad de Valladolid



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

2020 – 2021

Universidad de Valladolid

Trabajo de Fin de Máster

Evaluación de la expresión de genes implicados en la muerte celular y en la autofagia en un modelo de neurodegeneración retiniana

Nadia Regina Galindo Cabello

Directores

Dr. Juan José Tellería Orriols

Dr. Ricardo Usategui Martín

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
2.1. Cultivo organotípico de retina.....	9
2.1.1. Globos oculares.....	9
2.1.2. Preparación de explantes de neuroretina porcina	9
2.1.3. Diseño experimental.....	10
2.2. Caracterización inmunohistoquímica de las células de la glía.....	10
2.2.1. Procesamiento de muestras de neuroretina	10
2.2.2. Inmunohistoquímica GFAP	11
2.2.3. Microscopía	11
2.3. Análisis de expresión génica.....	11
2.3.1. Extracción de mRNA	11
2.3.2. Retrotranscripción de mRNA.....	11
2.3.3. Amplificación de cDNA por PCR cuantitativa comparativa en tiempo real (qPCR)	12
3. RESULTADOS	14
3.1. Caracterización de las células de la glía durante la neurodegeneración retiniana.....	14
3.2. Análisis de la expresión relativa del mRNA de genes implicados en apoptosis.	14
3.3. Análisis de la expresión relativa del mRNA de genes implicados en la necroptosis. .	16
3.4. Análisis de la expresión relativa del mRNA de genes que codifican proteínas implicadas en la autofagia.....	18
4. DISCUSIÓN.....	20
5. CONCLUSIONES.....	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	25
7. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	27

RESUMEN

La degeneración de la retina es un proceso común entre diversas enfermedades neurodegenerativas como la retinitis pigmentosa o la degeneración macular asociada a la edad. Actualmente, estas patologías son la principal causa de ceguera a nivel mundial y carecen de tratamientos efectivos. Durante el proceso de neurodegeneración los mecanismos de muerte celular, necroptosis y la autofagia están implicados, y su alteración está asociada a estados patológicos de la retina. En este sentido, el uso de modelos de estudio de neurodegeneración retiniana son necesarios para caracterizar y entender a cómo se dan estos procesos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los genes implicados en la muerte celular y autofagia en un modelo de neurodegeneración retiniana. Se obtuvieron explantes de neuroretina porcina y la degeneración retiniana se evaluó a los días 0, 1, 3, 6 y 9 de cultivo. Las características morfológicas y de inmunoreactividad de la proteína GFAP fue mediante inmunohistoquímica. La cuantificación de la expresión relativa del mRNA de los genes implicados en la apoptosis, necroptosis y autofagia fue mediante qPCR. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v15. Los resultados mostraron un aumento de la inmunoreactividad de la proteína GFAP indicando la activación e incremento de la gliosis a lo largo del tiempo. Los genes implicados en la apoptosis *BAX*, *CASP3*, *CASP8* y *CASP9* incrementaron su expresión durante los días 3, 6 y 9, relacionándose a la apoptosis vía caspasa dependiente; por el contrario, el gen *BCL2* tuvo un descenso de la expresión desde el día 3. Los genes implicados en la necroptosis *MLKL*, *RIPK1* y *RIPK3* mostraron la formación del necrosoma durante los días 3 y 6. Los genes implicados en la autofagia indicaron su activación inhibiendo a *mTOR* y aumentando la expresión de *BCLIN1* y *ATG7* durante los días 1 y 3; además la expresión de *LC3B* reflejó la formación de autofagosomas desde el día 3; finalmente, *SQSTM1* tuvo expresión baja hasta el día 9. En conclusión, el modelo de neurodegeneración retiniana de explantes ex vivo mostró el incremento de la gliosis y activación de los mecanismos de apoptosis, necroptosis y autofagia.

ABSTRACT

Retinal degeneration is a common process among various neurodegenerative diseases such as retinitis pigmentosa or age-related macular degeneration. Currently, these pathologies are the main cause of blindness worldwide and lack effective treatments. During the neurodegeneration process, the mechanisms of cell death, necroptosis, and autophagy are involved, and their alteration is associated with pathological states of the retina. In this sense, the use of retinal neurodegeneration study models is necessary to characterize and understand how these processes occur. The objective of this work was to evaluate the expression of genes involved in cell death and autophagy in a retinal neurodegeneration model. Porcine neuroretina explants were obtained and retinal degeneration was evaluated at days 0, 1, 3, 6, and 9 of culture. The morphological and immunoreactivity characteristics of the GFAP protein were by immunohistochemistry. The quantification of the relative expression of the mRNA of the genes involved in apoptosis, necroptosis, and autophagy was through qPCR. Statistical analysis was performed with SPSS v15 software. The results showed an increase in the immunoreactivity of the GFAP protein indicating the activation and increase of gliosis over time. The genes involved in apoptosis *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, and *CASP9* increased their expression during days 3, 6, and 9, which is related to apoptosis via caspase-dependent; on the contrary, the *BCL2* gene had a decrease in expression from day 3. The genes involved in necroptosis *MLKL*, *RIPK1*, and *RIPK3* showed necrosome formation during days 3 and 6. The genes involved in autophagy indicated their activation inhibiting *mTOR* and increasing the expression of *BCLIN1* and *ATG7* during days 1 and 3; in addition, the expression of *LC3B* reflected the formation of autophagosomes from day 3; finally, *SQSTM1* had low expression until day 9. In conclusion, the ex vivo explant retinal neurodegeneration model showed increased gliosis and activation of apoptosis, necroptosis, and autophagy mechanisms.

1. INTRODUCCIÓN

La retina es un tejido del sistema nervioso central (SNC) que se encuentra dentro del globo ocular, el cual tiene una estructura en capas donde se ubican las neuronas sensoriales que responden a la luz y los circuitos neuronales donde se realizan las primeras etapas del procesamiento de imágenes^{1,2}. Las células de la retina están dispuestas en capas, las cuales se muestran en la **Figura 1**.

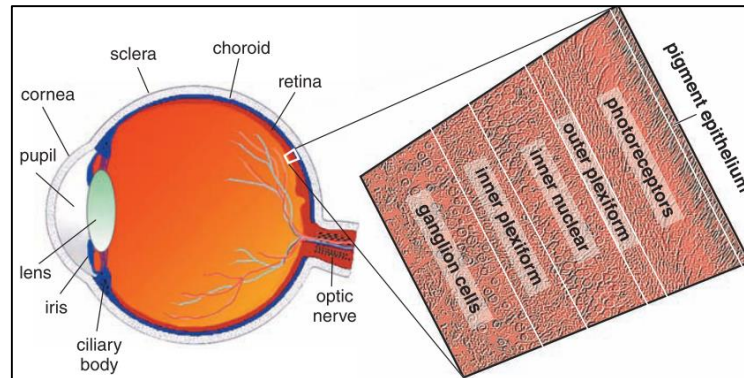


Figura 1. Diagrama del ojo humano, muestra las diferentes capas de las que está compuesto. Tomado de Kolb, Helga, 2003¹.

Cada capa de la retina, está compuesta por diferentes células, las cuales se pueden observar en la **Figura 2**.

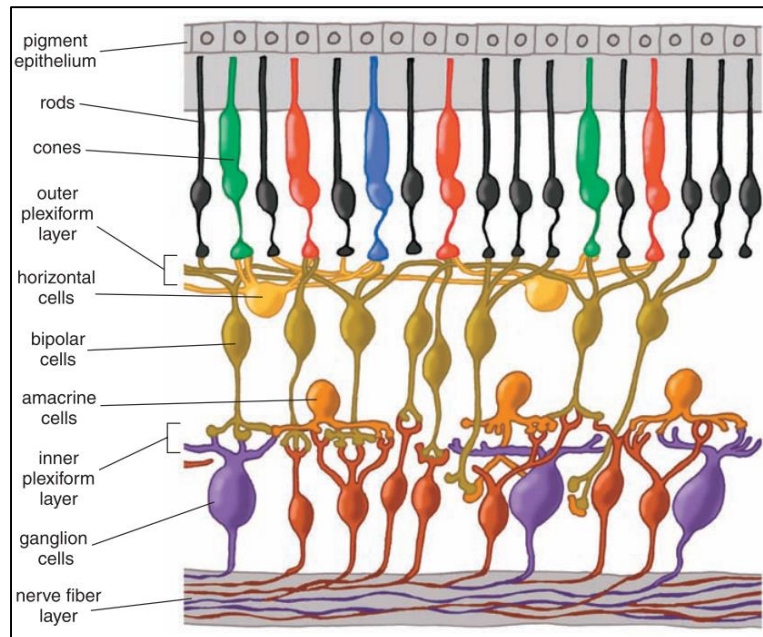


Figura 2. Células en la retina están dispuestas en capas. Los fotorreceptores están en la parte superior, seguidas de los cuerpos de las células horizontales y bipolares. Luego las células amacrinas están en contacto con las células ganglionares, cerca de la superficie de la retina. Tomado de Kolb, Helga, 2003¹.

En la parte superior se encuentra el epitelio pigmentario de la retina, compuesto por células con microvellosidades apicales que interactúan con los segmentos externos de los fotorreceptores (FR), este tejido mantiene la homeostasis de la retina mediante el transporte de nutrientes y la eliminación de segmentos de los FR que se desprenden³. La siguiente capa contiene a los FR, los cuales son fotosensores responsables de la fototransducción. Los vertebrados, tienen al menos dos tipos de FR, los bastones que son responsables de la visión en de luz tenue y representan el 95% en la retina humana, y los conos que son los responsables de la visión diurna, color y brillo^{1,4}. Seguidamente, está la capa plexiforme externa (OPL), dónde las dendritas de las células bipolares, conos y bastones establecen conexiones sinápticas con las terminaciones axonales de los bastones (esférulas) y conos (pedículos), respectivamente². Luego se ubica la capa nuclear interna (INL), dónde se encuentran los cuerpos de las células horizontales y células bipolares. Posteriormente se ubican las células amacrinas, las cuales junto a las células bipolares establecen una red compleja de interconexiones sinápticas en la capa plexiforme interna (IPL), con las células ganglionares. Finalmente, la información eléctrica se transmite a las células ganglionares, que envían impulsos a través de sus prolongaciones axonales que conectan la retina con el cerebro a través del nervio óptico^{1,2}.

Las enfermedades que afectan a la retina, incluyendo el glaucoma, la degeneración de fotorreceptores y retinopatía diabética, afectan a 11,8 millones de personas en los EE.UU⁵. En el caso del glaucoma, la destrucción de las células ganglionares de la retina, provocan la pérdida de la visión en más de 5 millones de personas en todo el mundo⁴. Las otras enfermedades causadas por la muerte de los fotorreceptores y/o por las células del epitelio pigmentario de la retina, como las retinopatías diabéticas y la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), son una causa muy importante de pérdida de visión incurable⁴. Estimaciones para el año 2020 esperaban que la cantidad de personas con DMAE a nivel mundial fueran alrededor de 200 millones, aumentando a casi 300 millones durante el año 2040⁶. El otro grupo de enfermedades que afectan a la retina son las distrofias hereditarias, en las que la muerte de fotorreceptores causan ceguera irreversible. Estas enfermedades genéticas pueden surgir de mutaciones en más de 200 genes diferentes y presentan una alta heterogeneidad genética, siendo las más comunes la enfermedad de Stargardt, la retinosis pigmentosa, la amaurosis congénita de Leber y el síndrome de Usher⁴. Estas enfermedades pueden provocar pérdida de la visión y ceguera, afectando la calidad de vida del paciente y suponiendo una carga económica tanto para las personas como para el sistema sanitario en general⁵; además, la mayoría de estas enfermedades como la DMAE y la retinitis pigmentosa no tienen tratamientos realmente eficaces, liderando las causas de ceguera a nivel mundial⁷.

Debido a la complejidad estructural y funcional de la retina, este tejido es vulnerable a sufrir alteraciones que desencadenan en procesos neurodegenerativos²; el tejido sufre modificaciones en la morfología y cambios en la transmisión de la información entre células, teniendo como consecuencia un remodelamiento de su estructura, desencadenando una serie de respuestas al daño con similares características celulares y moleculares^{2,7}. Sin embargo, la capacidad de respuesta a las lesiones o daños dependerá en gran medida de las células y tejidos involucrados, así como el tipo, duración y gravedad de la lesión⁸. En este sentido, las células microgliales son las

células inmunitarias del SNC y retina, y sus características son influenciadas por el microambiente local. En condiciones normales, la microglia está usualmente en la retina interna, fibra nerviosa, células ganglionares, capa plexiforme interna y capa nuclear interna con una morfología ramificada⁹.

La neurodegeneración retiniana es el mecanismo que está mayormente involucrado en las enfermedades de la retina¹⁰. La muerte neuronal normalmente está acompañada de una respuesta de las células gliales que reemplazan a las neuronas visuales¹⁰. Por otro lado, en el proceso de neurodegeneración se da la alteración de homeostasis de la retina, estando implicados los procesos de estrés oxidativo, inflamación y muerte celular². El estrés oxidativo es causado por el desbalance entre la generación y eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Elevados niveles de ROS se han relacionado con la degeneración neuronal y la inflamación de la retina. Además, las ROS pueden estimular la producción de citocinas inflamatorias, como son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6), provocando inflamación y muerte celular³.

Durante los procesos de muerte celular, no sólo ocurren cambios morfológicos, sino también bioquímicos y genéticos a nivel transcripcional y traduccional¹¹. La apoptosis es la forma más caracterizada de muerte celular programada y está mediada, por una familia de cisteín proteasas intracelulares llamadas caspasas, las cuales se activan frente a estímulos apoptóticos y participan en la traducción de señales y ejecución de la apoptosis¹¹, siendo las iniciadoras de este proceso las caspasas 2, 8, 9 y 10; y las ejecutoras las caspasas 3, 6 y 7¹². Sin embargo, algunas proteínas mitocondriales como el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G, las calpains, las catepsinas o la poli(ADP-ribosa) pilomerasa (PARPs) pueden inducir el proceso de apoptosis, independientemente de las caspasas¹¹ (**Figura 3**).

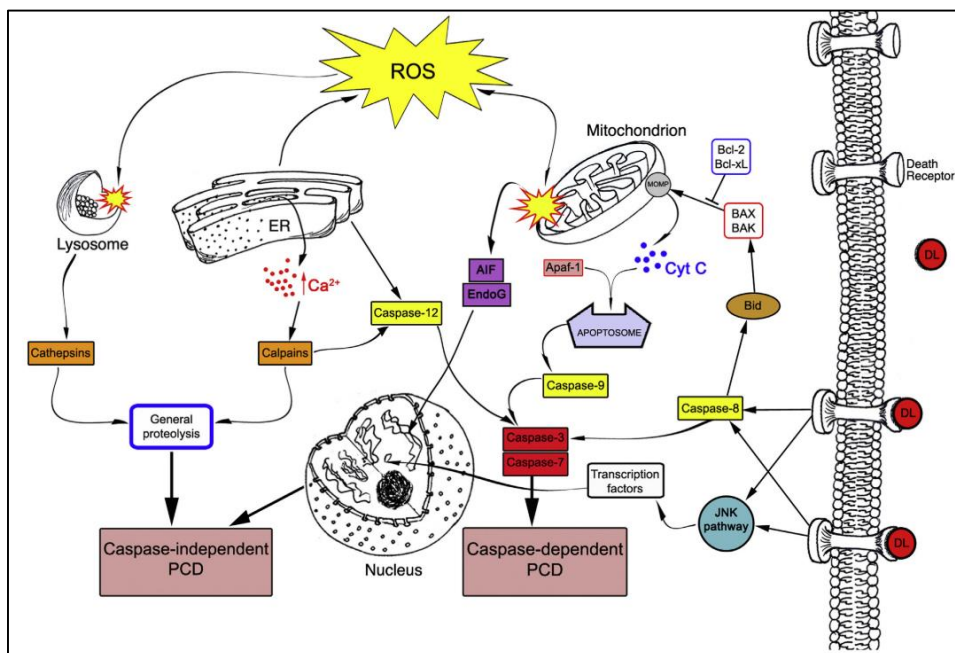


Figura 3. Vías de apoptosis en la retina. La acumulación de ROS asociadas a condiciones patológicas y daño a las mitocondrias como a los lisosomas, es la principal causa de estrés y muerte celular en la retina. Tomado de Cuenca et al., 2014².

Otro mecanismo de muerte celular es la necroptosis, donde ocurre una alteración en las membranas plasmáticas; además, los avances a nivel molecular y genético de la necrosis han revelado funciones previamente desconocidas en procesos fisiológicos y patológicos, incluida la degeneración de la retina¹³. Este proceso está regulado por los receptores de muerte inducida, donde el TNF- α no sólo causa apoptosis, sino también necrosis¹¹. La vía clásica de necroptosis requiere de la activación de la proteína quinasa RIP1 (RIPK1) que es desubiquitinada por CYLD y disociada del receptor TNF (TNFR1). Posteriormente, RIP1 se une a RIP3 (RIPK3), para formar un complejo pro-necrótico, que es estabilizado por la fosforilación de sus dominios serin/treonin quinasa y luego ambas proteínas se activan formando el necrosoma. Posteriormente, RIP3 activado recluta en el necrosoma a MLKL y lo fosforila. Finalmente, MLKL fosforilado se oligomeriza y se trasloca a la membrana plasmática^{13,14} (**Figura 4**).

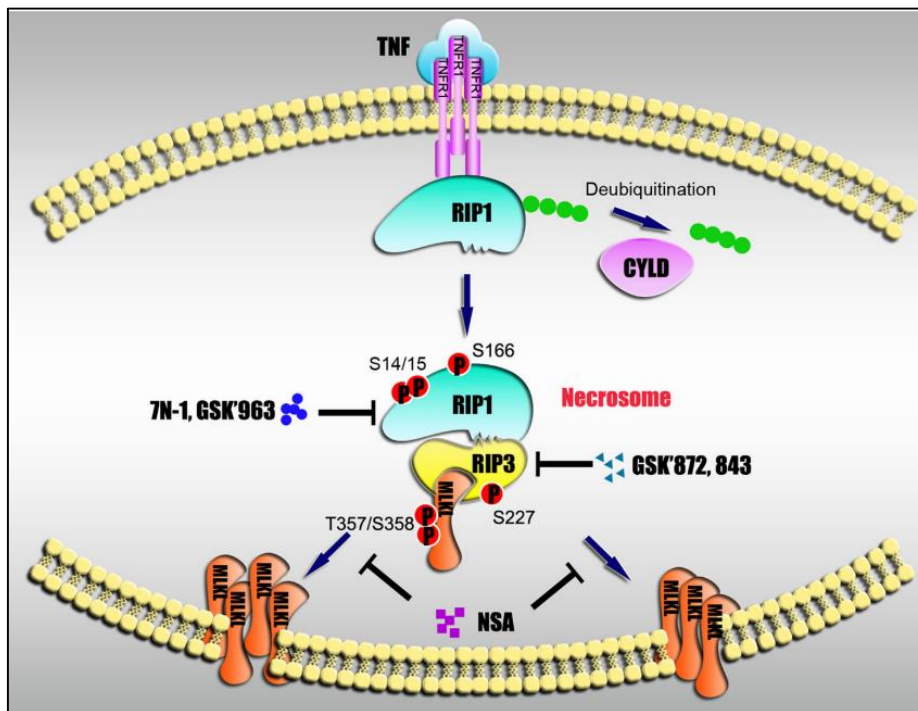


Figura 4. Vía de señalización de la necroptosis. Obsérvese la interacción inicial entre RIP1 y el receptor TNFR1, posteriormente la formación del necrosoma por la unión de RIP1 y RIP3; finalmente la translocación de MLKL fosforilado en la membrana plasmática. Tomado de He et al.,2016¹³.

Actualmente, existen más evidencias que demuestran que las proteínas de la autofagia están implicadas en la fisiología y patología de la retina; además que defectos en este mecanismo contribuyen a la degeneración de la retina^{2,15,16,17,18}. La autofagia es una vía catabólica que promueve la degradación y reciclaje de los componentes celulares como las proteínas, lípidos y organelas que son engullidos por autofagosomas y son eliminados por el lisosoma. Según la vía de degradación, la autofagia se clasifica en 3 tipos: la macroautofagia se da cuando el material citoplasmático es envuelto en una doble membrana que se cierra, formando el autofagosoma y luego se fusiona con el lisosoma, donde las hidrolasas ácidas degradan el material envuelto. Otro tipo de autofagia es la mediada por chaperonas (CMA), las cuales degradan selectivamente proteínas específicas que son llevadas al lisosoma y son translocadas por la proteína

LAMP-2A. Finalmente, la microautofagia es el proceso en el que el material a degradarse se une al lisosoma por invaginación de la membrana lisosomal o endosomal^{16,17}. Durante el presente trabajo nos referiremos a la macroautofagia como autofagia.

La regulación de la autofagia se da cuando las células necesitan generar nutrientes y energía intracelular durante procesos de inanición, abstinencia del factor de crecimiento o altas demandas bioenergéticas. Otra forma de cómo se regula la autofagia es cuando las células se preparan para procesos de remodelación estructural o para eliminar componentes citoplasmáticos dañinos generados durante el estrés oxidativo, la infección o la acumulación de agregados de proteínas¹⁸.

Durante la formación del autofagosoma la regulación se da en las distintas etapas, durante la iniciación, la quinasa ULK1 desencadena la formación del complejo PI3K, promoviendo así la fase de nucleación. Seguidamente, en la fase de elongación se activan dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina, ambos catalizados por ATG7. El primer sistema media la conjugación de ATG12 a ATG5, mientras que en el segundo ATG7 media la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3 para formar la forma unida a autofagosoma llamado LC3-II. El ensamblaje continuo de estos complejos proteína-proteína y proteína-lípido y la entrega de lípidos al autofagosoma a través de ATG9, la única proteína que atraviesa múltiples membranas, permiten el alargamiento de la membrana del autofagosoma¹⁷ (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

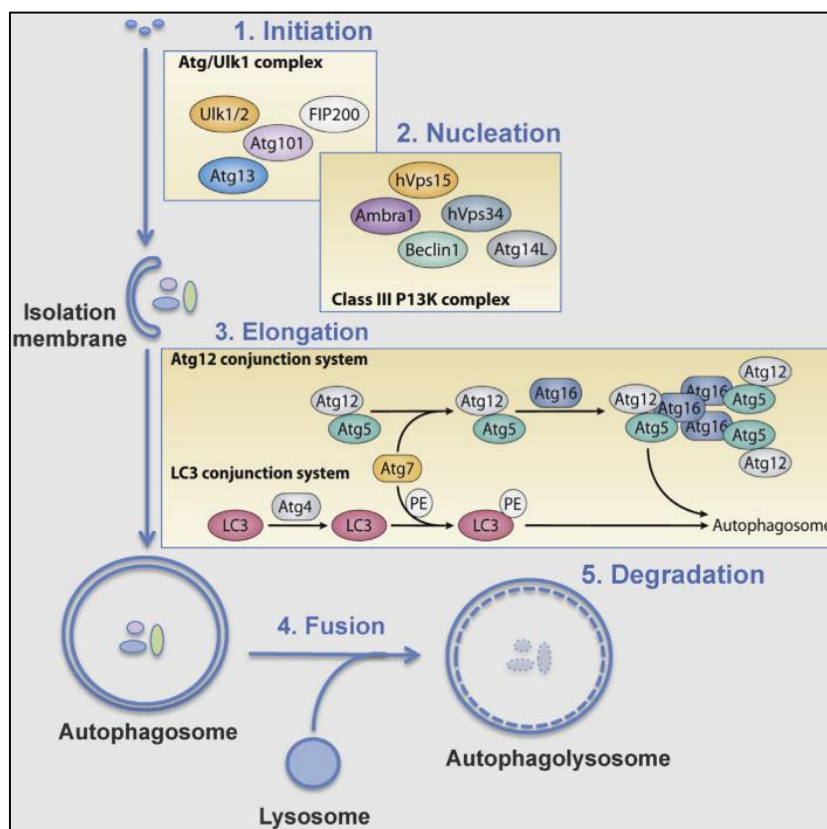


Figura 5. Fases de la formación del autofagosoma. La fusión del autofagosoma con el lisosoma permite la degradación del material ingerido durante la etapa de degradación. Tomado de Boya et al., 2016 ¹⁷.

Actualmente, los hallazgos sugieren que la autofagia es un proceso altamente selectivo, ya que los autofagosomas se dirigen específicamente a organelas como las mitocondrias, ribosomas, peroxisomas y otros componentes citoplasmáticos como lípidos, proteínas mal plegadas y patógenos intracelulares. Durante la autofagia selectiva, la ubiquitinación de sustratos permite su degradación específica al mediar su unión a receptores de autofagia como p62 y OPTN, que a su vez unen la carga ubiquitinada a la membrana autofagosomal mediada por la presencia de un dominio de interacción LC3^{17,19}.

Los modelos animales de estudio de enfermedades de la retina presentan características similares de degeneración y remodelación a la retina humana, los cuales pueden servir en el estudio y comprensión de las enfermedades neurodegenerativas de la retina en humanos². Sin embargo, otra alternativa de modelo de estudio son los sistemas de cultivo de explantes de retina, que están siendo usados desde hace muchos años, debido a que presentan varias ventajas en comparación del uso de animales de experimentación o líneas celulares²⁰. Entre las principales características y ventajas de los cultivos de neuroretina, resaltan su facilidad de manejo, bajo costo, la simulación muy cercana al tejido in vivo, ya que mantienen muchas de las interacciones celulares y moleculares entre los múltiples tipos de células y matrices intercelulares, haciéndola una herramienta adecuada para mejorar el conocimiento en la fisiología y patología retiniana^{20,21}.

Por lo expuesto, el estudio y caracterización de los procesos de neurodegeneración en el modelo de explantes de neuroretina ex vivo son esenciales para entender los procesos fisiológicos y patológicos que se dan en durante la neurodegeneración de la retina, enfocándonos en los procesos de muerte celular programada y la autofagia los cuales pueden servir a futuro para evaluar la eficacia de tratamientos o entender el rol que cumplen los factores de crecimiento. El presente estudio continúa la línea de investigación de los trabajos anteriores del Grupo de Retina del IOBA-UVA.

1.1 Hipótesis de trabajo y objetivos

1.1.1 Hipótesis:

La degeneración de la retina es un proceso común entre las enfermedades neurodegenerativas de este tejido; además, su alta prevalencia en la población y falta de tratamientos eficaces dificultan la detención de su progresión. Así mismo, existe la necesidad del uso de modelos de estudio para entender los procesos biológicos que participan durante la neurodegeneración de la retina a nivel molecular y celular, los cuales deben estar caracterizados para poder servir como base en futuras investigaciones sobre tratamientos u otro tipo de terapias. Por lo expuesto, planteamos que existen cambios en la expresión de genes implicados en la muerte celular programada y en la autofagia durante la neurodegeneración retiniana.

1.1.2 Objetivo general

Estudiar los cambios moleculares implicados en la muerte celular programada y autofagia que ocurren durante la neurodegeneración retiniana.

1.1.3 Objetivos específicos

- Evaluar los cambios morfológicos y expresión de la proteína glial fibrilar (GFAP) durante la degeneración retiniana.
- Evaluar la expresión de genes implicados en los procesos de apoptosis durante la neurodegeneración retiniana.
- Evaluar la expresión de genes implicados en la necroptosis durante la neurodegeneración retiniana.
- Evaluar la expresión de genes implicados en la autofagia durante la neurodegeneración retiniana.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cultivo organotípico de retina

Para cumplimentar los objetivos anteriormente planteados nos servimos de un cultivo organotípico de retina de cerdo.

2.1.1. Globos oculares

Se utilizaron 10 globos oculares porcinos de cerdos machos que tenían entre 6 y 8 meses de edad, procedentes del matadero local Justino Gutiérrez S.L. (Laguna de Duero, Valladolid, España). El medio de transporte usado fue DMEM suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico (10,000 IU/mL Penicillina, 10 mg/mL Estreptomicina, 25 µg/mL Anfotericina B), el cual se mantuvo en cadena de frío durante su traslado.

2.1.2. Preparación de explantes de neuroretina porcina

Se siguió la metodología descrita por Fernandez-Bueno & Usategui-Martin²¹, la cual se detalla en la Figura 6. Después de la obtención de las neuroretinas, se recortaron 5 explantes adyacentes de aproximadamente 5x5 mm en el área centralis de la retina, los cuales fueron depositados sobre la membrana de las placas de cultivo Transwell® usados para el experimento.

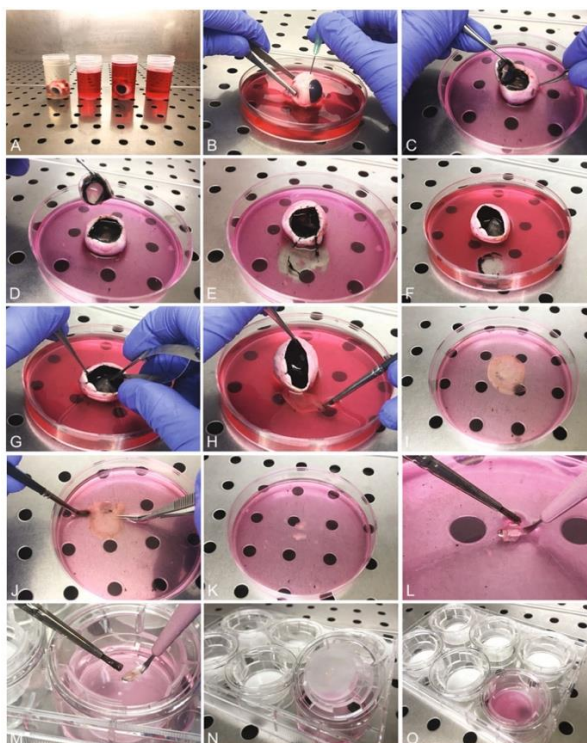


Figura 6. Preparación de explantes de neuroretina de los globos oculares, (A) Inmersión en etanol y lavados en DMEM limpio. (B) Punción escleral en la ora serrata y (C, D) disección del globo ocular en los oculares anterior y posterior. (E) Extirpación del vítreo del ocular posterior. (F) Desprendimiento de neuroretina del epitelio pigmentario de la retina cepillando suavemente y (G)

cortando el nervio óptico. (H) Deposición de neuroretina desprendida en medios de cultivo mediante cepillado. (I) Neuroretina se desenrolla y (J, K) se corta en explantes. (L) Transferencia de explantes de neuroretina y (M) deposición en la membrana. (N) El explante de Neuroretina se desenrolla y se ubica en el medio de la membrana mediante cepillado. (O) Agregar medio de cultivo apropiado a las placas de cultivo que contienen la membrana con el explante de neuroretina. Tomado de Fernandez-Bueno & Usategui-Martin, 2021²¹.

2.1.3. Diseño experimental

Para la evaluación del proceso de neurodegeneración el experimento se diseñó de la siguiente manera: 5 ojos para la evaluación inmunohistoquímica y otros 5 ojos para las pruebas de biología molecular. Se sacaron 5 explantes de neuroretina por ojo, los cuales fueron denominados de la siguiente manera:

- Día 0: neuroretina fresca, control.
- Día 1: neuroretina cultivada durante 1 día.
- Día 3: neuroretina cultivada durante 3 días.
- Día 6: neuroretina cultivada durante 6 días.
- Día 9: neuroretina cultivada durante 9 días.

El experimento se realizó en placas de cultivo Transwell® para los explantes de los días 1 al 9 (Figura 7); y en el caso de las muestras del día 0, estas fueron almacenadas directamente. El cultivo se realizó en el medio DMEM/Neurobasal A (1:1) suplementado con 10% de Suero fetal bovino, 1% L- glutamina, 2% B-27 y 1% de antibiótico/antimicótico; las condiciones de cultivo fueron a 37°C a 5% de CO₂. Una vez finalizado el experimento las muestras se procesaron para su utilización en los estudios inmunohistoquímicos y de expresión génica.

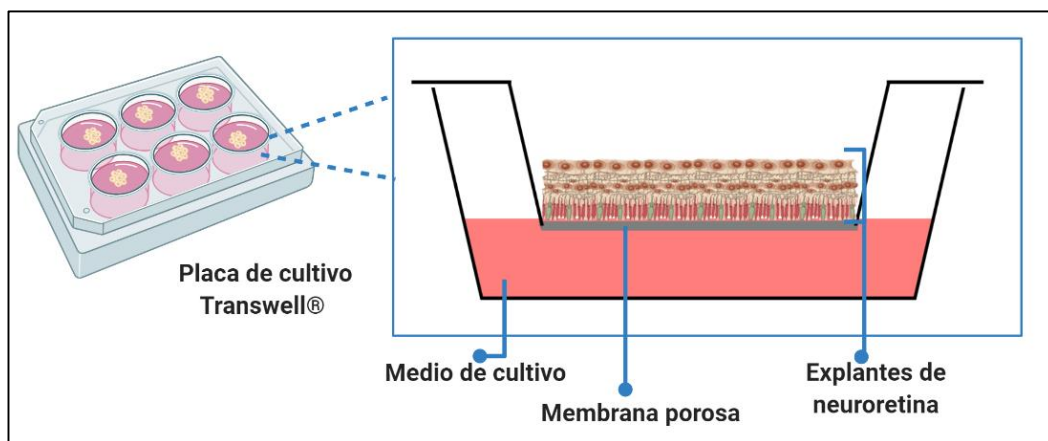


Figura 7. Cultivo organotípico de neuroretina. Los explantes son cultivados sobre membranas porosas estando en contacto con el medio de cultivo.

2.2. Caracterización inmunohistoquímica de las células de la glía

2.2.1. Procesamiento de muestras de neuroretina

Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS, durante 1 hora a 4 °C, luego fueron procesadas en gradiente de sacarosa para su criopreservación²¹. Al día siguiente las neuroretinas fueron incluidas en Tissue-Tek® (O.C.T.™

Compound, Netherlands) a 4 °C y fueron cortadas en secciones de 5µm en el criostato (CM 1900; Leica, Alemania) y puestas sobre portaobjetos tratados (SuperFrost® Plus; Alemania). Finalmente se almacenaron a 4°C hasta su uso.

2.2.2. Inmunohistoquímica GFAP

Para observar la neurodegeneración retiniana se evaluó el nivel de gliosis, para lo cual se estudió la inmunexpresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que es específica de células de Müller²⁰. El protocolo empleado fue el establecido por el Laboratorio de Anatomía Patológica del IOBA-UVa para inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo específico para GFAP a una concentración de 1:200 siendo incubado durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (2- 4-amidinofenil-1H-indol-6-carboxamida; 10µg/ml) durante 5 minutos a (TA). Finalmente, las muestras se lavaron en PBS y se montaron con solución de montaje para fluorescencia y se cubrieron con cubreobjetos.

2.2.3. Microscopía

Las muestras se observaron en el microscopio confocal LEICA SP5 modelo DMI 6000B acoplado a un software informático LEICA LAS AF. El brillo y el contraste de las imágenes se ajustaron mediante el software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, EE.UU.)

2.3. Análisis de expresión génica

2.3.1. Extracción de mRNA

Los explantes de neuroretina fresca y cultivadas durante 9 días, previamente almacenadas a -80 °C fueron procesadas según el protocolo de extracción de RNA con trizol. El tejido de neuroretina se homogeneizó con 1 ml de Trizol (Invitrogen, EE.UU.) en un eppendorf de 1,5ml RNase-free (Eppendorf, EE.UU.) y se incubó 10 minutos (min) a 4 °C. Luego se añadieron 200 µl de cloroformo y se mezcló brevemente con vortex y se incubó 3 min a TA. Después se centrifugó a 12000g a 4 °C durante 15 min, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo eppendorf RNase-free. Se añadieron 500 µl de isopropanol y se agitó por inversión y se incubó por 10 min a TA. Después se centrifugó a 12000 g a 4 °C durante 15 min, y luego se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µl de EtOH al 70%. Luego se centrifugó a 7000 g durante 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante con cuidado y se secó 10 min a TA. Finalmente, se resuspendió el ARN en 50 µl de H₂O-DEPC. Se almacenó a -20 °C y se pasó a -80 °C hasta su uso. La cuantificación y pureza del RNA fue determinada por absorbancia a 260-280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo, EE.UU.).

2.3.2. Retrotranscripción de mRNA

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA), se realizó una reacción de retrotranscripción usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen, EE.UU.) siguiendo el manual del fabricante para el análisis de

expresión de mRNA. La reacción se realizó en un volumen final de 20 μL : 2 μL de RT Buffer 10x, 0.8 μL de dNTP Mix 25x, 2 μL de RT Random Primers 10x, 1 μL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 μL de inhibidor de RNAsa, 3.2 μL de agua libre de nucleasas, 10 μL de RNA (a la cual previamente se le ajustó la concentración para no superar los 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). El programa de retrotranscripción se muestra en la **Tabla 1**; finalizado el proceso las muestras se almacenaron a -20 °C y posteriormente a -80 °C. La cuantificación y pureza del cDNA fue determinada por absorbancia a 260-280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo, EE.UU.).

Tabla 1. Programa de la Retrotranscripción

Temperatura °C	Tiempo (min)
25	10
37	120
85	5
4	∞

2.3.3. Amplificación de cDNA por PCR cuantitativa comparativa en tiempo real (qPCR)

Los experimentos para evaluar la expresión de los genes implicados en la apoptosis, necroptosis y autofagia, se realizó mediante la amplificación del cDNA sintetizado previamente usando la reacción PCR cuantitativa comparativa en tiempo real (qPCR). Para la reacción de qPCR se usó SYBR Green master mix (Applied Biosystems, EE.UU.) y los oligonucleotidos que se detallan en la **Tabla 2**. La reacción se realizó en un volumen final de 10 μL : 5 μL de Master Mix SYBR Green, 1 μL de Primer's forward y reverse 20 μM , 1.5 μL de agua libre de nucleasas, 2.5 μL de cDNA (previamente cuantificado y diluido a la concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Tabla 2. Secuencias génicas específicas de los primer's usados en el qPCR

Nombre del gen	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')
<i>Bcl-2 Associated X-protein (BAX)</i>	GAAGTTGAGCGAGTGTCT	AGTTGAAGTTGCCGTCAG
<i>B-cell lymphoma 2 (BCL2)</i>	TCATGAGTGTCAACTACCTG	TTGAGGAAGAGTAGGCTGTG
<i>CASPASA 3 (CASP3)</i>	GGATTGAGACGGACAGTG	TTCGCCAGGAATAGTAACC
<i>CASPASA 8 (CASP8)</i>	GCATCATCTACGGCTCTG	ATAGGCTTCTGTCTGTTCTG
<i>CASPASA 9 (CASP9)</i>	ACAGATGGATGTCCTGTGTC	ACCCATGGTCTTCTGTTC
<i>Pseudokinase mixed lineage kinase domain-like (MLKL)</i>	CCCAGTTGCAGGAGGTCATT	CACGTGGCTTCACAAAAGGG
<i>Receptor interacting protein kinase 1 (RIPK1)</i>	GGAGCATAACGAGCAGCGGAAG	CCAGAGCACGATGGCGAAGC
<i>Receptor interacting protein kinase 3 (RIPK3)</i>	CATCGGGACCTCAAACCCTC	TCCCTGAAATGTGGACAGGC
<i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase (mTOR)</i>	ACTGGTTCCAGCTCAGATG	TGGCAAATCTCCGATTCCG
<i>Coiled-coil, moesin-like BCL2 interacting protein (BCLIN1)</i>	AGGAGCTGCCGTTGTACTGTTCT	TGCTGCACACAGTCCAGGAA
<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B)</i>	AACGAAATTCCTGGTGCCTGA	AAGGCTTGTTAGCATTGAGCTG
<i>Autophagy Related 7 (ATG7)</i>	CGGGAACACTGTATAACACC	TCCTGCAACCGTCAAGAGGA
<i>Sequestosome 1 (SQSTM1)</i>	CGCTTCAGCTTCTGTTTCAG	TACGACATCGCCATCGTCAGTT
<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)</i>	GGACTCATGACCACGGTCCAT	TCAGATCCACAACCGACACGT

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EE.UU.), las condiciones se detallan en la **Tabla 3**. El análisis de la curva de melting fue para detectar la especificidad de los primers. Por otro lado, el gen endógeno usado fue el *GAPDH* para realizar la normalización de los niveles de expresión del mRNA. El valor de CT (“Threshold cycle”, número de ciclos para alcanzar el umbral de detección) se determinó para cada reacción y la expresión génica se cuantificó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ como se detalla²². Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado para n = 3 por condición experimental.

Tabla 3. Programa de la qPCR

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
95	10 min	1
95	15 seg	40
60	1 min	
95	15 seg	Curva de Melting
60	1 min	
95	15 seg	
60	15 seg	

2.3.4. Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron como la media (desviación estándar (DE)). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de variables continuas. En el caso de las variables paramétricas, se aplicó la prueba t de análisis de varianza (ANOVA). En el caso de las variables no paramétricas, los grupos se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney (dos grupos) o la prueba de Kruskal-Wallis (más de dos grupos). Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS versión 22.0 (SPSS, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de las células de la glía durante la neurodegeneración retiniana

En la retina, las células gliales como las células de Müller y la microglia, participan en el mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia de neuronas. Cuando existen lesiones en la retina, se desencadena la activación de las células gliales, las cuales son caracterizadas por la secreción de factores proinflamatorios y la fagocitosis². Para evaluar la degeneración retiniana a través del nivel de gliosis, se estudió la inmunexpresión de la GFAP en el cultivo organotípico de neuroretina de cerdo, la cual es una proteína fibrosa que forma filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular en células gliales².

Se observó que la inmunexpresión de la GFAP en la neuroretina se localizó al margen interno de la capa de fibras nerviosas (NFL) (**Figura 8A**). Durante el día 1 y 3 se observó un avance de la gliosis hacia la INL (**Figura 8B-C**); posteriormente, en el día 6 ya se detecta una invasión completa de la INL y de la ONL; además de pérdida de estructura característica de las capas de la retina (**Figura 8D**). Finalmente, en el día 9 se observó una total invasión de la INL, ONL y hasta parte del segmento interno (IS) (**Figura 8E**). En los días día 6 y 9 se observa la pérdida de toda la estructura de capas de la retina.

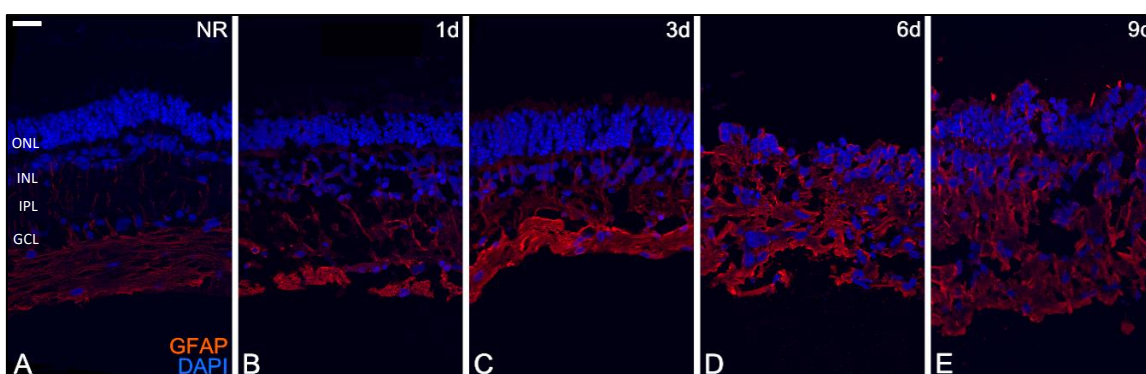


Figura 8: Inmunexpresión de la GFAP. (A) Neuroretina fresca, día 0. (B) NR día 1. (C) NR día 3. (D) NR día 6. (E) NR día 9. GFAP (rojo): proteína ácida fibrilar glial. DAPI (azul): núcleos. Barra de escala: 25 μ m.

3.2. Análisis de la expresión relativa del mRNA de genes implicados en apoptosis.

Con el objetivo de conocer cómo varía la apoptosis en el proceso de neurodegeneración retiniana en nuestro modelo, se analizó la expresión de los genes *BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8* y *CASP9*, los cuales están involucrados en el proceso de apoptosis.

Los resultados mostraron que la expresión relativa del mRNA del gen *BAX* (**Figura 9A**) se incrementa significativamente desde el día 3 de cultivo al día 6 y los valores se mantienen hasta el día 9; además, que entre la retina fresca y el día 1 de cultivo no hay diferencias estadísticamente significativas; por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas entre los días 3, 6 y 9.

En el caso del gen *BCL2* (**Figura 9B**), la expresión relativa del mRNA disminuye significativamente desde el día 3 de cultivo y se mantiene baja hasta el día 9; además, el nivel de expresión entre la muestra fresca y el día 1 no hay diferencia significativa; así mismo, se observa que entre los días 3, 6 y 9 no existen diferencias significativas.

Los resultados de la expresión relativa del mRNA del gen *CASP3* (**Figura 9C**) mostraron que se incrementa significativamente desde el día 3 de cultivo al día 6 y se mantiene hasta el día 9. También se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el día 6 y 9 respecto al día 3; sin embargo, entre los días 6 y 9 no hay diferencias, y tampoco entre la retina fresca y el día 1.

En el caso del gen *CASP8* (**Figura 9D**), la expresión relativa del mRNA se incrementa significativamente desde el día 3 de cultivo y tiene la mayor expresión en el día 6, para luego decrecer significativamente el día 9. Por otro lado, los niveles de expresión entre la muestra fresca y el día 1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas

Los resultados de la expresión relativa del mRNA del gen *CASP9* (**Figura 9E**) mostraron que se incrementa significativamente desde el día 1 de cultivo y se mantiene en valores similares hasta el día 9.

De forma general, nuestros resultados mostraron cómo se produce fundamentalmente un aumento de la expresión relativa de los genes *BAX*, *CASP3*, *CASP8* y *CASP9* durante los días 3, 6 y 9, mientras que el caso de *BCL2* se produce un descenso de la expresión relativa desde el día 3 y se mantiene hasta el día 9 (Figura 9).

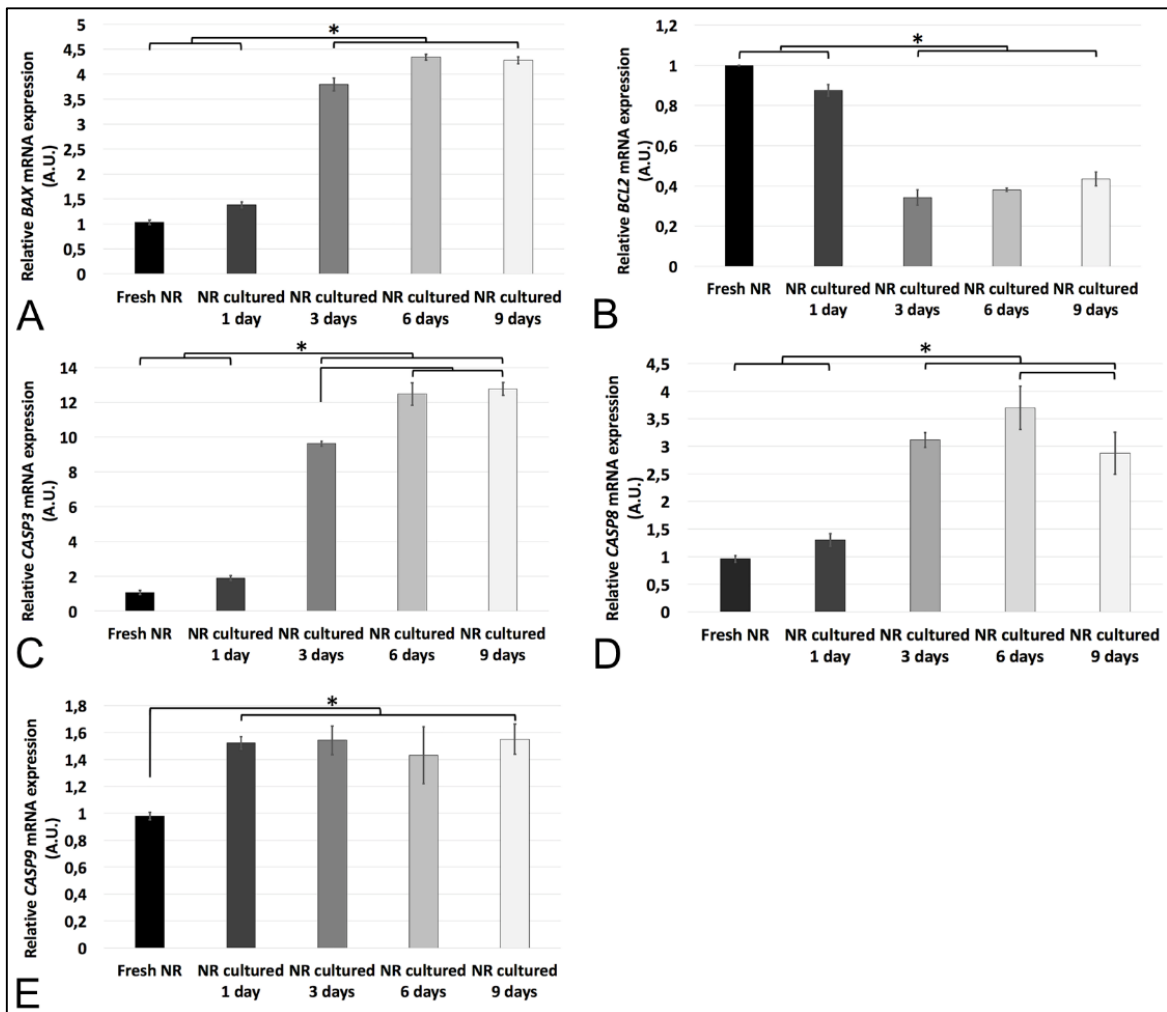


Figura 9: Expresión relativa de mRNA de genes implicados en la apoptosis a lo largo del tiempo. (A) gen *BAX*, (B) gen *BCL2*, (C) gen *CASP3*, (D) gen *CASP8*, (E) gen *CASP9*. (A.U) Unidades arbitrarias; (*) diferencias estadísticamente significativas.

3.3. Análisis de la expresión relativa del mRNA de genes implicados en la necroptosis.

Con el objetivo de conocer cómo varía la necroptosis en el proceso de neurodegeneración retiniana en nuestro modelo, se analizó la expresión de los genes *MLKL*, *RIPK1* y *RIPK3*, los cuales están implicados en proceso de necroptosis,

Los resultados mostraron que la expresión relativa del mRNA del gen *MLKL* (**Figura 10A**) se incrementan significativamente del día 3 al 6 de cultivo y disminuye significativamente para el día 9; además, que entre la retina fresca y el día 1 no hay diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre la retina fresca y los días 3, 6 y 9; así mismo, el cultivo del día 1 tuvo diferencias significativas con los días 3, 6 y 9. Por otro lado, el cultivo del día 3 tuvo diferencias significativas con los días 6 y 9; y finalmente, el día 6 también mostró diferencias estadísticamente significativas con el día 9.

En el caso del gen *RIPK1* (**Figura 10B**), la expresión relativa del mRNA incrementa significativamente desde el día 3 al 6 de cultivo y disminuye significativamente para el día 9; además, que entre la retina fresca y el día 1 no hay diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre la retina fresca y los días 3, 6 y 9; así mismo, el cultivo del día 1 mostró diferencias significativas con los días 3, 6 y 9. Finalmente, el cultivo del día 6 mostró diferencias significativas con los días 3 y 9.

Los resultados de la expresión relativa del mRNA del gen *RIPK3* (**Figura 10C**) mostraron que se incrementó significativamente del día 3 al 6 de cultivo y disminuye en el día 9; además, que entre la retina fresca y el día 1 no hay diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre la retina fresca y los días 3, 6 y 9; así mismo, el cultivo del día 1 mostró diferencias significativas con los días 3, 6 y 9.

De forma general, nuestros resultados mostraron cómo se produce fundamentalmente un aumento de la expresión relativa de los genes *MLKL*, *RIPK1* y *RIPK3* durante los días 3 y 6, mientras que en el día 9 se produce un descenso de la expresión (Figura 10).

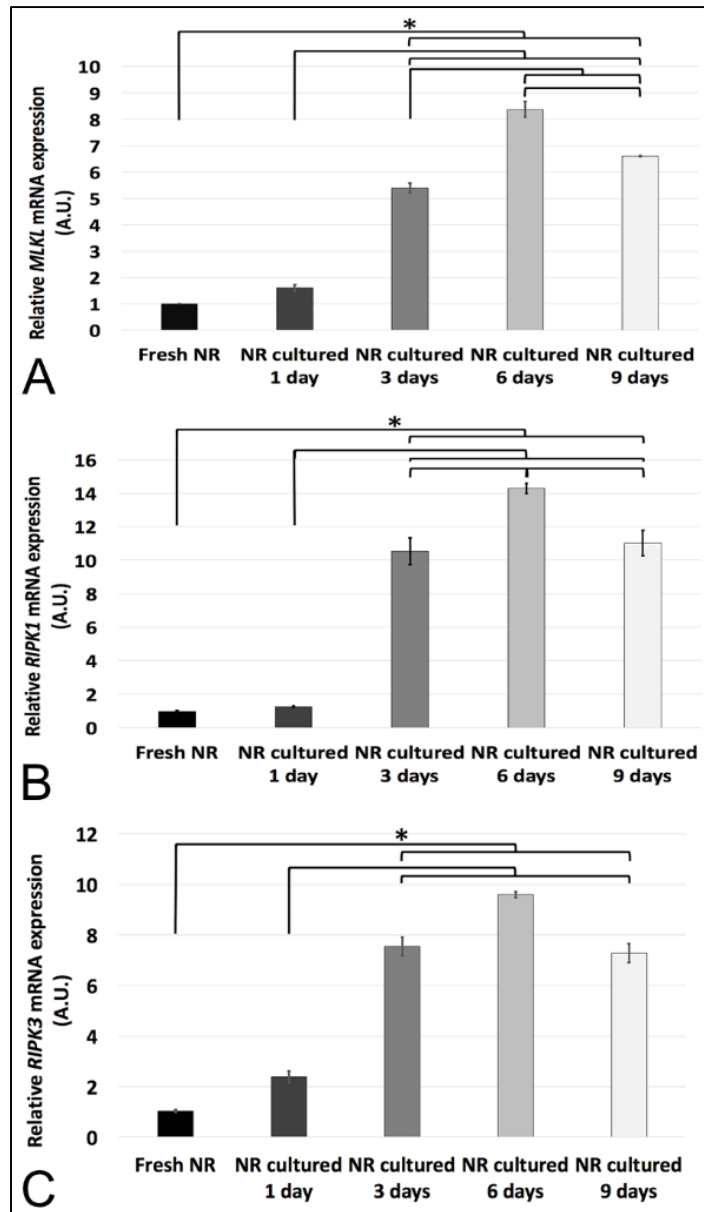


Figura 10: Expresión relativa de mRNA de genes implicados en la necroptosis a lo largo del tiempo. (A) gen *MLKL*, (B) gen *RIPK1*, (C) gen *RIPK3*. (A.U) Unidades arbitrarias; (*) diferencias estadísticamente significativas.

3.4. Análisis de la expresión relativa del mRNA de genes que codifican proteínas implicadas en la autofagia.

Con el objetivo de conocer cómo varía la autofagia en el proceso de neurodegeneración retiniana en nuestro modelo, se analizó la expresión de los genes *mTOR*, *BCLIN1*, *LC3B*, *ATG7* y *SQSTM1*.

Los resultados mostraron que la expresión relativa del mRNA del gen *mTOR* (**Figura 11A**) disminuye significativamente desde el día 1 de cultivo al día 9, manteniendo los mismos valores de expresión a lo largo del tiempo; además, no se observaron diferencias significativas de los valores de expresión relativa de mRNA entre los días 1, 3, 6 y 9.

En el caso del gen *BCLIN1* (**Figura 11B**), la expresión relativa del mRNA aumenta significativamente desde el día 1 de cultivo y se mantiene al día 3; luego tiene un marcado descenso significativo los días 6 y 9. Por otro lado, la muestra fresca tiene diferencia significativa con los días 1,3 y 6. Los niveles de expresión no tienen diferencia significativa entre el día 1 y 3; sin embargo, si existe diferencia significativa entre los días 1 y 3 con los días 6 y 9. Finalmente, entre el día 6 y 9 hay diferencia significativa entre los niveles de expresión relativa de mRNA.

Los resultados para la expresión relativa del mRNA del gen *LC3B* (**Figura 11C**) mostraron que disminuye significativamente desde el día 1 de cultivo y existe una diferencia significativa entre los valores de la muestra fresca y la de todos los días. Por otro lado, se observa un ligero incremento significativo desde el día 3 al 9; además, se observa una diferencia significativa entre el día 1 y los días 6 y 9; así mismo, el día 3 tiene una diferencia significativa con los días 6 y 9. Finalmente, no existe diferencia significativa entre el día y 9.

En el caso del gen *ATG7* (**Figura 11D**), la expresión relativa del mRNA aumenta significativamente desde el día 1 de cultivo y luego tiene un ligero descenso significativo desde el día 3 al 9. Por otro lado, la muestra fresca y la del día 9 tienen diferencia significativa con los días 1,3 y 6. Los niveles de expresión tienen diferencia significativa entre el día 1 y los días 3 y 6. Finalmente, entre el día 3 y 6 hay diferencia significativa entre los niveles de expresión relativa de mRNA.

Los resultados mostraron que la expresión relativa del mRNA del gen *SQSTM1* (**Figura 11E**) disminuye significativamente desde el día 1 de cultivo al día 9, manteniendo los mismos valores de expresión a lo largo del tiempo; además, no se observaron diferencias significativas de los valores de expresión relativa de mRNA entre los días 1, 3, 6 y 9.

En forma general, los valores de expresión de mRNA de los genes *mTOR* y *SQSTM1* son similares, ya que desde el día 1 de cultivo disminuyen significativamente y se mantienen hasta el día 9. Así mismo, el gen *LC3B* muestra una disminución significativa el día 1 de cultivo, y luego se observa un ligero incremento significativo progresivo desde el día 3, 6 y 9; sin embargo, los niveles de expresión nunca superan el valor de la neuroretina fresca. Por otro lado, la expresión se incrementa significativamente desde el día 1 de cultivo para los genes *BCLIN1* y *ATG7*, pero luego va disminuyendo progresivamente en el día 6 hasta el día 9, dónde llega a tener valores similares a los de neuroretina fresca (Figura 11).

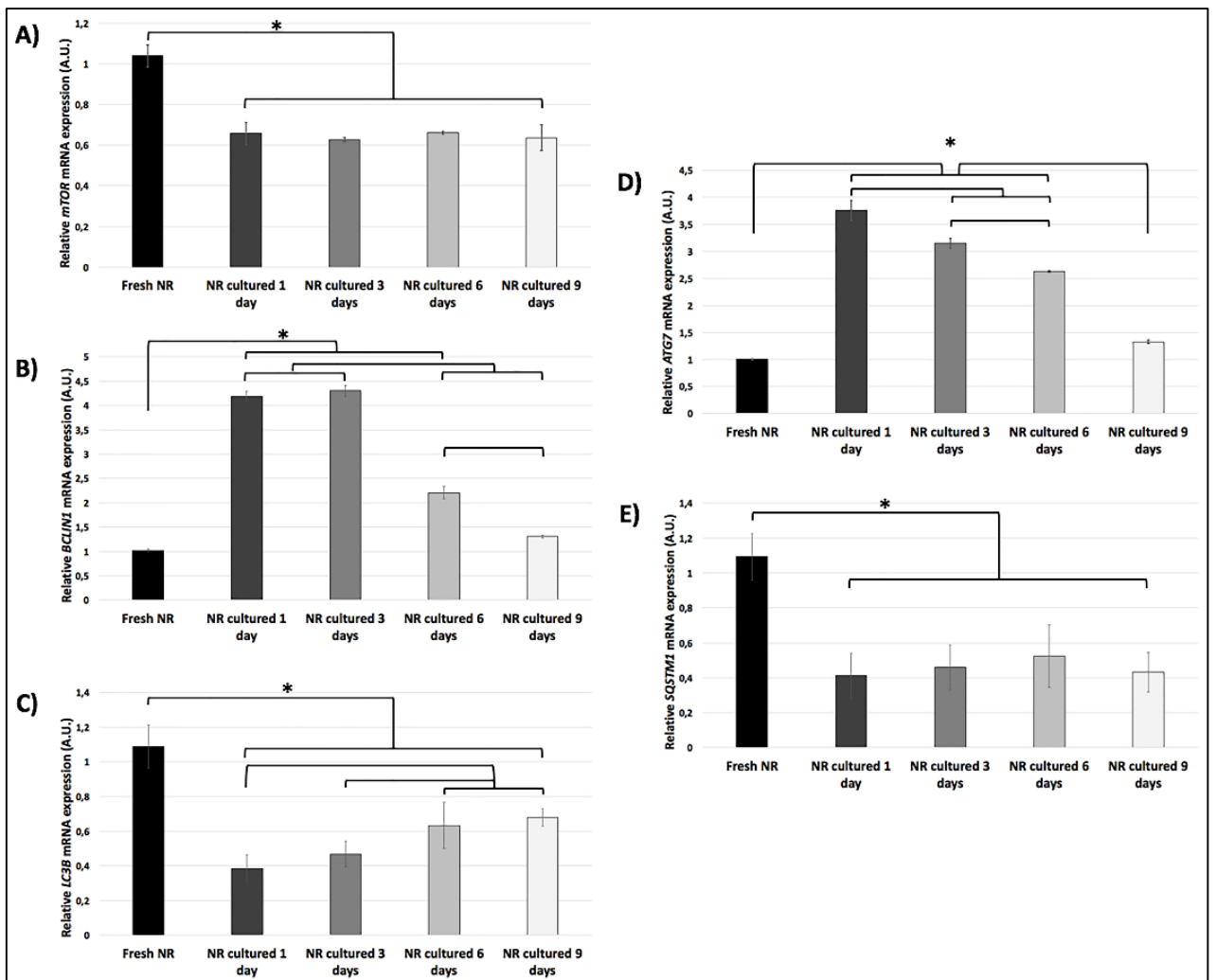


Figura 11: Expresión relativa de mRNA de genes que participan en la autofagia a lo largo del tiempo. (A) gen *mTOR*, (B) gen *BCLIN1*, (C) gen *LC3B*, (D) gen *ATG7*, (E) gen *SQSTM1*. (A.U) Unidades arbitrarias; (*) diferencias estadísticamente significativas.

4. DISCUSIÓN

Dentro del grupo de enfermedades neurodegenerativas de la retina son las principales causas de la pérdida de visión y ceguera⁵. El glaucoma es caracterizado por la degeneración de las células ganglionares de la retina, causando daño en el nervio óptico. La DMAE, es producida por el deterioro de las células epiteliales del pigmento retiniano y los fotorreceptores, además de angiogénesis vascular. La retinopatía diabética es originada por cambios en los vasos sanguíneos, los cuales se pueden hinchar y perder líquido y en otros casos crecer nuevos vasos sanguíneos anormales en la superficie de la retina. Finalmente, la retinitis pigmentosa es una enfermedad hereditaria, que provoca la degeneración de los fotorreceptores. Adicionalmente, también se han reportado disfunciones de la visión en desórdenes neurodegenerativos humanos, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson^{2,5}. Es por ello importante contar con modelos experimentales de estudio, los cuales sirvan para poder caracterizar a nivel fisiológico y patológico los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la muerte celular y autofagia, implicados en la degeneración de la retina, siendo pieza clave para entender y plantear futuros tratamientos.

El estudio de la degeneración en la retina en muestras humanas frescas está limitado debido a la dificultad de su obtención, así como los estudios que implican el uso de animales de experimentación²³. Sin embargo, el uso de cultivos de neuroretina de mamíferos se viene usando desde el año 1989 donde Caffé et al.,²⁴ describe esta metodología, desde ese entonces múltiples estudios se han desarrollado evaluando el proceso de diferenciación de la retina pre- y post natal²⁴, la dinámica celular y del citoesqueleto en neuroretina porcina^{23,25}, evaluación de tratamiento con células mesenquimales^{10,21}, entre otros; demostrando que es una herramienta útil, ya que cierra la brecha entre los cultivos celulares y los modelos animales; así mismo, estos modelos son más baratos y fáciles de manejar¹⁰. Sin embargo, los cultivos de explantes tienen algunas limitaciones como la axotomía de las células ganglionares, la ausencia de irrigación sanguínea y del epitelio pigmentario de la retina. A pesar de estas limitaciones, los cultivos de neuroretina porcina son un recurso excelente para estudiar la neurodegeneración retiniana²³ ya que cortes histológicos muestran que la apariencia es similar a la retina humana²⁵.

El rol que cumplen las células gliales (astrocitos, células de Müller y micróglia) en la retina, es el de mantener la homeostasis en el microambiente extracelular y preservando la supervivencia de las neuronas². Durante el inicio de la degeneración estas células gliales se activan y proliferan, dando inicio a la gliosis, un proceso que puede tener un efecto neuroprotector incrementando la expresión de factores crioprotectores y restaurando el equilibrio de neurotransmisores, denominado gliosis reactiva o por el contrario, puede acelerar la neurodegeneración durante una enfermedad crónica, causando daño directo e indirecto a las neuronas y la vasculatura, denominada la gliosis proliferativa^{2,26}. Así mismo, en las enfermedades neurodegenerativas de la retina se detectan señales endógenas que activan y hacen proliferar y migrar a las células gliales; además de ocurrir una fagocitosis mejorada y secreción de citocinas, quimiocinas y neurotoxinas². Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un progresivo avance de la gliosis en las diferentes capas de

la retina a lo largo de los 9 días de neurodegeneración analizados, la cual está reflejada en el incremento de la inmunoreactividad del tejido ante el marcador GFAP y en la desorganización de la estructura y morfología del tejido; esto concuerda con lo descrito por Winkler et al., 2002²⁵ donde hay un incremento y desplazamiento de las células de Müller a partir del día 3 de cultivo, además que se observó desintegración de las capas de la retina en el cultivo prolongado de los explantes. Así mismo, en el trabajo de Di Lauro et al, 2016²³ al día 9 de cultivo de neuroretina sola, se marcó todo el tejido con GFAP, además de mostrar pérdida de la estructura normal del tejido.

La muerte celular de los fotorreceptores es una de las principales causas de enfermedades retinianas y esta ocurre mayormente a través de la apoptosis¹¹. La transducción de señales para la ejecución de la apoptosis converge en la activación de las caspasas, estas proteínas se clasifican funcionalmente en 2 grupos: las caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7)². Estas proteínas están presentes en forma inactiva, pero son activadas por la presencia de estímulos apoptóticos que pueden ser extrínsecos o intrínsecos. Cuando los receptores de muerte en la membrana celular reaccionan a citoquinas de la familia del TNF, se activa la vía dependiente de caspasas (extrínseca). Si por el contrario, la apoptosis se activa por algunas proteínas mitocondriales como el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G, las calpainas, las catepsinas o la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARPs)¹¹, se denomina vía independiente de caspasas (intrínseca). La regulación de la formación de poros de la membrana externa mitocondrial (MOMP) está regulada por la familia Bcl-2, que es uno de los mecanismos anti-apoptóticos que protegen a las células de la muerte; además existen otras proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL, Bcl-w, A1 y Mcl1. Por otro lado, también existen moléculas efectoras que promueven la apoptosis como pueden ser la proteína Bax y Bak (antagonista de Bcl-2) las cuales permeabilizan la membrana mitocondrial externa; es decir, BAX y BAK promueven MOMP, mientras que la expresión de Bcl-2 y Bcl-XL dentro de la membrana mitocondrial externa protegen contra la formación de MOMP¹¹. Al observar nuestros resultados donde se obtuvo un aumento en la expresión relativa de los genes *BAX*, *CASP3*, *CASP8* y *CASP9* durante los días 3, 6 y 9, estos se relacionan a un aumento de la apoptosis vía caspasa dependiente; además, en el caso del marcador para *BCL2* el cual tuvo un descenso de la expresión relativa desde el día 3 y se mantuvo hasta el día 9, nos señala que su actividad protectora frente a la apoptosis es baja y que no podría estar impidiendo la formación de MOMP.

El otro mecanismo de muerte celular es la necroptosis, que está regulada por dos miembros de la familia protein quinasa RIP, RIP1 y RIP3 los cuales forman el necrosoma. La activación de este mecanismo se da en respuesta al estímulo de la TNF- α , el cual promueve la desubiquitinación de RIP1 por CYLD, un paso fundamental para el ensamblaje y la activación del necrosoma con RIP3. Posteriormente, RIP3 activado fosforila a MLKL y se desencadena la oligomerización y la localización de MLKL en la membrana, finalmente da como resultado la inducción de la ruptura de la membrana^{11,13}. Es importante tener en cuenta que, la inhibición de la caspasa puede inducir a que se desarrolle la necrosis; pero a su vez, las caspasas pueden inhibir directa o indirectamente la actividad de

la quinasa RIP, como sucede con la caspasa 8 que escinde e inactiva directamente el complejo RIP1 y RIP3¹¹. Adicionalmente, los niveles de RIP3 se correlacionan con la capacidad de respuesta a la muerte celular necrótica inducida por TNF- α . Los niveles de caspasas también cambian según los tipos y condiciones celulares. Por lo tanto, es probable que el equilibrio entre las caspasas y RIP3 puedan ser importantes para decidir entre la apoptosis o necrosis, en respuesta a la estimulación del receptor de muerte u otras señales²⁷. En nuestro caso, pudimos detectar que se produce un aumento de la expresión relativa de los genes *MLKL*, *RIPK1* y *RIPK3* durante los días 3 y 6 lo cual nos indica que se está llevando cabo la formación del necrosoma, mientras que en el día 9 se produce un descenso de la expresión relativa, lo cual podría ser consecuencia de la pérdida total de tejido retiniano durante la neurodegeneración.

La autofagia es la vía de degradación lisosomal la cual es esencial para la supervivencia, diferenciación, desarrollo y mantenimiento de la homeostasis¹⁸. Así mismo, la autofagia tiene un rol esencial en el desarrollo de la retina y su desregulación está implicada en patologías como el glaucoma, DMAE y distrofias de la retina²⁸. La inducción de la autofagia se da usualmente por inanición, ya que esta genera una respuesta celular al estrés. Este proceso está regulado a través de la señalización mediada por *mTOR* y AMPK, principales vías de monitorización del estado nutricional de la célula. Así mismo, la autofagia también puede ser inducida por factores como el estrés oxidativo, la hipoxia e infecciones. Es importante señalar que, aunque la regulación de la autofagia se da principalmente a nivel postraduccional, el estrés prolongado también puede aumentar la expresión del mRNA de los genes de la autofagia. Uno de los principales reguladores de estos genes es el factor de transcripción TFEB que se encuentra en el citoplasma en condiciones de reposo, pero cuando es fosforilado se traslada al núcleo activando la transcripción de genes ATG y genes lisosomales¹⁷. Uno de los reguladores clave de la autofagia es *mTOR*, que es la principal señal inhibidora que interrumpe la autofagia en presencia de factores de crecimiento y abundantes nutrientes¹⁹, es decir, en condiciones adversas y de estrés se da el inicio de la autofagia mediante la inhibición de *mTOR*. Los resultados obtenidos en este estudio, concuerdan con lo planteado anteriormente, ya que los valores de expresión del mRNA para el gen *mTOR* son bajos, siendo menores que el control hasta los 9 días de cultivo, con lo cual se corrobora una activación de la autofagia en el modelo de neurodegeneración de retina que estamos evaluando. Posteriormente activada la autofagia, se dan las etapas de nucleación dónde participa Beclin1, formando el complejo PI3K, seguido de la etapa de elongación dónde se activan dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina, ambos catalizados por ATG7. Las etapas antes mencionadas fueron evaluadas en nuestro modelo de estudio, obteniendo un incremento en la expresión de mRNA de los genes *BCLIN1* y *ATG7* durante los días 1 y 3 de cultivo; pero luego fueron disminuyendo progresivamente desde el día 6 hasta el día 9, dónde llega a tener valores similares a los de neuroretina fresca; significando que los días en los que se produjo una mayor activación de la autofagia fueron los días 1 y 3. Durante la formación del autofagosoma, LC3 es conjugado por la unión covalente de PE (LC3-II), un proceso mediado por la proteína Atg7. En células 661 W, la autofagia puede ser inducida por inanición de suero, observándose incrementos en los niveles de LC3-II y del flujo autofágico²⁸. Los resultados obtenidos sobre la expresión del

mRNA del gen *LC3B* en este estudio mostraron una disminución significativa en su expresión en el día 1 de cultivo, sin embargo, esta se fue incrementando progresivamente desde el día 3 al 9 reflejando la formación de autofagosomas en esos tiempos. Otra manera de evaluar el flujo autofágico en modelo de retina ex vivo de ratones fue desarrollado por Esteban-Martinez y Boya el 2015²⁸, dónde el método para evaluar la conjugación de LC3 es mediante Western blot, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Muchos receptores de la macroautofagia comparten una región conservada para la interacción con LC3 (LIR), que le permite unirse a sustratos de macroautofagia cerca del autofagosoma en formación con LC3; esto se aplica para p62, OPTN, entre otros¹⁶. La proteína p62, también llamada sequestrina 1 (*SQSTM1*), se co-localiza predominantemente con agregados de proteínas citoplasmáticas poliglutaminas (poliQ), que son encontrados en enfermedades del cerebro y del hígado^{29,30}. La proteína p62 reconoce los desechos celulares tóxicos, que luego son eliminados mediante la autofagia. El bloqueo de la autofagia conduce a la acumulación de p62, induciendo una respuesta de estrés celular que conduce a la enfermedad³¹. La investigación realizada por Saitoh et al., 2015³⁰ dónde estudia el rol de p62 en condiciones patogénicas in vivo, usando como modelo para enfermedades neurodegenerativas a *Drosophila*, concluyó que p62 juega un rol protector contra la neurodegeneración inducida por poliQ mediante la degradación por autofagia de los oligómeros de proteína poliQ, mostrando su potencial terapéutico para las enfermedades poliQ y posiblemente para otras enfermedades neurodegenerativas³⁰. En nuestro caso, al evaluar la expresión del mRNA del *SQSTM1*, pudimos observar que su expresión fue muy baja hasta el día 9 de cultivo, lo cual puede estar relacionado a la activación de autofagia reportada en los días 3 y 6, haciendo que no hayan agregados de proteínas ni p62 en el citoplasma.

La importancia de la retina, como modelo de estudio no sólo la implica para enfermedades oculares, sino también nos sirve como herramienta de estudio del SNC, el cerebro y procesos neuronales desde las etapas iniciales del desarrollo hasta la neurodegeneración. Además, su fácil manejo en cultivos organotípicos simulando condiciones fisiológicas acorta una brecha entre los cultivos celulares y los modelos animales. Durante el desarrollo de este trabajo hemos buscado caracterizar los patrones de expresión de los genes envueltos en la muerte celular y la autofagia; los cuales puedan brindar un mejor entendimiento de estos procesos durante la neurodegeneración de la retina y así mismo puedan servir como base para la evaluación de nuevas estrategias de tratamiento de enfermedades retinianas asociadas a la pérdida de neuronas. Adicionalmente, las evaluaciones de los procesos de muerte celular y autofagia deben de incluir análisis morfológicos, bioquímicos y moleculares para tener un mejor entendimiento de lo que pasa, además de identificar los roles de cada molécula involucrada.

Finalmente, es necesario que se caractericen adecuadamente los modelos de estudio para poder definir y precisar cuándo los valores de muerte celular y autofagia pueden ser beneficiosos o patológicos y así poder predecir el rol que cumplen en la enfermedad retiniana. Conociendo estos mecanismos a fondo, se podrían dirigir para modular la progresión de la enfermedad en la retina, previniendo e inhibiendo la muerte celular, promoviendo el reciclaje de proteínas u orgánulos dañados para

la reconstrucción de la retina, aumentando la eliminación de las mitocondrias dañadas para aliviar el estrés oxidativo inducido por ROS e inhibiendo la activación de las células microgliales retinianas; resultando una alternativa terapéutica para este tipo de enfermedades.

5. CONCLUSIONES

- Se observó el aumento de la inmunoreactividad de la proteína GFAP en los explantes de neuroretina a lo largo del tiempo, lo cual nos indica que hay una activación e incremento de la gliosis que está relacionado con procesos de neurodegeneración.
- Se logró caracterizar el proceso de apoptosis, mediante la evaluación de los genes *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* y *BCL2*; dónde obtuvimos un aumento en la expresión relativa de los genes *BAX*, *CASP3*, *CASP8* y *CASP9* durante los días 3, 6 y 9, relacionándose a un aumento de la apoptosis vía caspasa dependiente; por el contrario, el gen *BCL2* tuvo un descenso de la expresión relativa desde el día 3 y se mantuvo hasta el día 9, señalando que su actividad protectora frente a la apoptosis es baja y que no podría estar impidiendo la formación de MOMP.
- La caracterización de la necroptosis en el modelo de neurodegeneración retiniana mediante el análisis de la expresión relativa de los genes *MLKL*, *RIPK1* y *RIPK3* mostró que se está llevando a cabo la formación del necrosoma durante los días 3 y 6, mientras que en el día 9 se produce un descenso de la expresión relativa.
- La caracterización del proceso de la autofagia mostró que existe una inhibición de la expresión del gen *mTOR* debido a la activación de la autofagia, por ello los niveles de expresión de los genes *BCLIN1* y *ATG7* se incrementaron teniendo la mayor activación los días 1 y 3. Además gen *LC3B* tuvo una disminución significativa en su expresión en el día 1 de cultivo, sin embargo, esta se fue incrementando progresivamente desde el día 3 al 9 reflejando la formación de autofagosomas en esos tiempos. Finalmente, la expresión de gen *SQSTM1* fue muy baja hasta el día 9 de cultivo, lo cual puede estar relacionado a la activación de autofagia reportada en los días 1 y 3, haciendo que no hayan agregados de proteínas ni p62 en el citoplasma.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kolb H. How the Retina Works. *Am Sci* [Internet]. 2003;91(1):28. Available from: <http://www.americanscientist.org/issues/feature/2003/1/how-the-retina-works>
2. Cuenca N, Fernández-Sánchez L, Campello L, Maneu V, De la Villa P, Lax P, et al. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2014 Nov;43:17–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135094621400041X>
3. Ruan Y, Jiang S, Musayeva A, Gericke A. Oxidative stress and vascular dysfunction in the retina: Therapeutic strategies. *Antioxidants*. 2020;9(8):1–30.
4. Gagliardi G, Ben M'Barek K, Goureau O. Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: A pluripotent stem cell-based approach. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2019;71(November 2018):1–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.03.001>
5. Pardue MT, Allen RS. Neuroprotective strategies for retinal disease Machele. *Prog Retin Eye Res*. 2018;65:50–76.
6. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng CY, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2014;2(2):e106–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1)
7. Puertas Neyra KL. Evaluación in vitro del potencial neuroprotector de las células madre mesenquimales sobre los fotorreceptores. 2019.
8. Gupta MP, Herzlich AA, Sauer T, Chan CC. Retinal anatomy and pathology. *Dev Ophthalmol*. 2016;55:7–17.
9. Wu J, Gao G, Shi F, Xie H, Yang Q, Liu D, et al. Activated microglia-induced neuroinflammatory cytokines lead to photoreceptor apoptosis in A β -injected mice. *J Mol Med*. 2021;
10. Usategui-Martín R, Puertas-Neyra K, García-Gutiérrez MT, Fuentes M, Pastor JC, Fernandez-Bueno I. Human Mesenchymal Stem Cell Secretome Exhibits a Neuroprotective Effect over In Vitro Retinal Photoreceptor Degeneration. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2020;17(June):1155–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.003>
11. Murakami Y, Notomi S, Hisatomi T, Nakazawa T, Ishibashi T, Miller JW, et al. Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2013;37:114–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.08.001>
12. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(33):21777–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R800084200>
13. He S, Huang S, Shen Z. Biomarkers for the detection of necroptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(11–12):2177–81.
14. Murakami Y, Matsumoto H, Roh M, Giani A, Kataoka K, Morizane Y, et al. Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. *Cell Death Differ* [Internet]. 2014;21(2):270–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.109>
15. Lin W, Xu G. Autophagy: A Role in the Apoptosis, Survival, Inflammation, and Development of the Retina. *Ophthalmic Res*. 2019;61(2):65–72.
16. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 2017;36(13):1811–36.

17. Boya P, Esteban-Martínez L, Serrano-Puebla A, Gómez-Sintes R, Villarejo-Zori B. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Prog Retin Eye Res.* 2016;55:206–45.
18. Beth Levine, Guido Kroemer. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell.* 2008;132(1):27–42.
19. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2016;26(1):6–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.010>
20. Fernandez-Bueno I, Fernández-Sánchez L, Gayoso MJ, García-Gutierrez MT, Pastor JC, Cuenca N. Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Exp Eye Res* [Internet]. 2012;104:26–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2012.08.012>
21. Fernandez-Bueno I, Usategui-Martín R. Ex Vivo Model of Spontaneous Neuroretinal Degeneration for Evaluating Stem Cells' Paracrine Properties. In: *Cellular Therapy and Transplantation.* 2021. p. 125–37.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
23. Di Lauro S, Rodriguez-Crespo D, Gayoso MJ, Garcia-Gutierrez MT, Pastor JC, Srivastava GK, et al. A novel coculture model of porcine central neuroretina explants and retinal pigment epithelium cells. *Mol Vis.* 2016;22(September 2015):243–53.
24. Caffé AR, Visser H, Jansen HG, Sanyal S. Histotypic differentiation of neonatal mouse retina in organ culture. *Curr Eye Res* [Internet]. 1989;8(10). Available from: <https://scihub.do/10.3109/02713688908997401>
25. Winkler J, Hagelstein S, Rohde M, Laqua H. Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina. *Exp Eye Res.* 2002;74(6):777–88.
26. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(4):331–71.
27. He MX, He YW. A role for c-FLIP L in the regulation of apoptosis, autophagy, and necroptosis in T lymphocytes. *Cell Death Differ.* 2013;20(2):188–97.
28. Esteban-Martínez L, Boya P. Autophagic flux determination in vivo and ex vivo. *Methods.* 2015;75:79–86.
29. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005;171(4):603–14.
30. Saitoh Y, Fujikake N, Okamoto Y, Akiko Popiel H, Hatanaka Y, Ueyama M, et al. P62 Plays a Protective Role in the Autophagic Degradation of Polyglutamine Protein Oligomers in Polyglutamine Disease Model Flies. *J Biol Chem.* 2015;290(3):1442–53.
31. Rusten TE, Stenmark H. P62, an autophagy hero or culprit? *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010;12(3):207–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0310-207>
32. Puertas-Neyra K, Usategui-Martín R, Coco RM, Fernandez-Bueno I. Intravitreal stem cell paracrine properties as a potential neuroprotective therapy for retinal photoreceptor neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2020;15(9):1631–8.

7. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Parte de los resultados del presente TFM han sido expuestos en diferentes congresos:

- **Caracterización de la autofagia en un modelo in-vitro de neurodegeneración retiniana.** N. Galindo-Cabello, L. Hernández-Rodríguez, K. Puertas-Neyra, JC. Pastor, I. Fernandez-Bueno, R. Usategui-Martin. Libro de Resúmenes VII Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La aventura de la Ciencia y la Tecnología. Abril 2021, página 43. <http://hdl.handle.net/10259/5713>
- **Evaluación de la necroptosis en un modelo organotípico e neurodegeneración retiniana.** L.A Hernández-Rodríguez, N. Galindo-Cabello, K. Puertas-Neyra, JC. Pastor, R. Usategui-Martin, I. Fernandez-Bueno. Libro de Resúmenes VII Jornadas de Investigadoras de Castilla y León: La aventura de la Ciencia y la Tecnología. Abril 2021, página 86. <http://hdl.handle.net/10259/5713>
- **Retinal cells death rates in *in vitro* neuroretinal degeneration model: preliminary data.** Fernandez-Bueno I; Puertas-Neyra K; Hernández-Rodríguez L; Galindo-Cabello N;¹Pastor JC; Usategui-Martín R. ARVO 2021: Revolutionary Eye and Vision Research.