



Universidad de Valladolid



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

PAPEL DEL GEN P53 EN LA NEURODEGENERACIÓN DE LA RETINA: UN BIOMARCADOR GENÉTICO

Verónica Sosa Castellano

Director: Ricardo Usategui Martin

Universidad de Valladolid
Máster en Investigación Biomédica
2022- 2023

Abreviaturas

Ac.	Anticuerpo	LC3	Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1
ADN	Ácido desoxirribonucleico	LC3β	Cadena ligera 3 β de la proteína asociada a microtúbulos 1
AMPK	Proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina	LUBAC	Complejo de Ensamblaje de Cadenas de Ubiquitina Lineales
APAF	Factor Activador de Proteasas Apoptóticas	LPS	Lipopolisacárido
ARG	Arginina	mARN	ARN mensajero
ARN	Ácido Ribonucleico	min	Minuto
ATG	Genes relacionados con la autofagia	MLKL	Proteína Semejante a Quinasa de Dominio de Línea Mixta
BAK	Bcl-2 Homologo	mM	Milimolar
BAX	Antagonista/Asesino	mTOR	Blanco de Rapamicina en mamíferos
BCLIN1	Proteína Interactuante de BCL2 en forma de hélice enrollada, similar a moesina	NF-κB	Factor Nuclear kappa B
BCL-2	Linfoma de células B 2	ng	Nanogramo
BH3	Bcl-2 Homologo 3	nm	Nanómetro
CASP3	Caspasa 3	ONL	Capa nuclear externa
CASP8	Caspasa 8	PFA	Paraformaldehído
CASP9	Caspasa 9	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
cADN	ADN copia	poli(I:C)	activador de respuesta inmune
clAP1/2	Proteína Inhibidora de la Apoptosis Celular 1/2	PRO	Prolina
c-FLIPL	Proteína inhibidora celular de FLICE de isoforma larga	p53	Proteína supresora de tumores
CYBB	Citocromo b-245, subunidad beta	qPCR	PCR cuantitativa
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño	RIPK1	Quinasa de Interacción con el Receptor 1
DE	Desvío estándar	RIPK3	Quinasa de Interacción con el Receptor
DED	Dominio de Muerte	RT-PCR	PCR en tiempo real
dNTP	dNTP – Desoxirribonucleótido trifosfato	s	Segundo
DR	Desprendimiento de retina	SNC	Sistema nervioso central
EROs	Especies reactivas del oxígeno	SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
FADD	Factor Asociado a la Muerte con Dominio DED	SQSTM1	Sequestrosoma 1
Fas	Receptor de muerte Fas	TA	Temperatura ambiente
FasL	Ligando de Fas	TAK1	Quinasa Activada por el Factor de Crecimiento Transformante Beta-1
FIP 200	Proteína Interactuante de FAK de 200 kDa	TBK1	Quinasa 1 de Unión a TANK
gr	Gramo	TLR4	Receptor Tipo Toll 4
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	TRIF	Adaptador Conteniendo Dominio TIR que Induce Interferón-β
GCL	Capa de células ganglionares	TNFα	Factor de Necrosis Tumoral α
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	TNRF1	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral 1
h/hs	Hora/horas	TP53	Gen codificante de proteína P53
HMGB1	Proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad	ULK1 /	Proteína quinasa similar a Unc-51 de mamífero 1 y 2
HyE	Hematoxilina y eosina	ULK2	Vitreorretinopatía proliferativa
IL-1	Interleucina 1	VRP	
IL-1α	Interleucina 1α	°C	Grados Celcius
IL-6	Interleucina 6	μg	microgramo
IL-10	Interleucina 10	μL	Microlitro
INL	Capa nuclear interna	μM	Micromolar
IPL	Capa plexiforme interna		
kDa	Kilo Dalton		

CONTENIDO

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCION.....	2
2.1.	Sistema visual y estructura ocular	2
2.2.	Anatomía de la neuroretina.....	3
2.3.	Desprendimiento de retina.....	4
2.4.	Neurodegeneración retiniana.....	5
2.5	Gen <i>TP53</i> y polimorfismo p. Arg72Pro.....	7
3.	HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	8
3.1.	Hipótesis.....	8
3.2.	Objetivo general	8
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1.	Diseño experimental	9
4.2.	Animales.....	9
4.3.	Caracterización morfométrica e inmunohistoquímica.....	10
4.3.1.	Obtención y procesamiento de las muestras de neuroretina	10
4.3.2.	Inmunohistoquímica de proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	10
4.3.3.	Microscopía	11
4.4.	Análisis de la expresión génica.....	11
4.4.1.	Obtención y procesamiento de muestras de neuroretina	11
4.4.2.	Extracción del ARNm.....	11
4.4.3.	Retrotranscripción del ARNm	11
4.4.4.	Amplificación del ADNc por PCR cuantitativa comparativa en tiempo real (qPCR) 12	
4.5.	Análisis estadístico	13
5.	RESULTADOS.....	14
5.1.	Análisis de la gliosis: inmunoexpresión de GFAP.	14
5.2.	Análisis de la expresión génica.....	14
5.2.1.	Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en muerte celular programada.....	14
5.2.2.	Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en necroptosis	15
5.2.3.	Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en autofagia	16
5.2.4.	Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en inflamación.....	16
5.2.5.	Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en estrés oxidativo.....	17
6.	DISCUSIÓN	19
7.	CONCLUSIÓN	21
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	22

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema anatómico del globo ocular. _____	3
Figura 2. Arquitectura de la retina.. _____	3
Figura 3. Regulación de la necroptosis. _____	5
Figura 4. Regulación de la apoptosis. _____	6
Figura 5. Regulación de autofagia. _____	7
Figura 6. Diseño experimental. _____	9
Figura 7. Evaluación inmunohistoquímica de la gliosis. _____	14
Figura 8. Expresión relativa de ARNm para genes implicados en apoptosis. _____	15
Figura 9. Expresión de ARNm relativa para genes implicados en necroptosis. _____	15
Figura 10. Expresión de ARNm relativa para genes implicados en autofagia. _____	16
Figura 11. Expresión de ARNm relativa para genes implicados en inflamación. _____	17
Figura 12. Expresión de ARNm relativa para genes implicados en estrés oxidativo. _____	18

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Programa de retrotranscripción. _____</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 2. Secuencias génicas específicas de los cebadores utilizados en las qPCR. _</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 3. Programa de qPCR _____</i>	<i>13</i>

1 RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas de la retina representan una causa significativa de discapacidad visual y ceguera permanente. El desprendimiento de retina (DR) ocurre cuando la capa neurosensorial de la retina se separa de la parte posterior del ojo, resultando en una privación de oxígeno y nutrientes que conduce a la neurodegeneración del tejido. En algunos casos, este desprendimiento puede dar lugar a la vitreoretinopatía proliferativa (VRP), un proceso anormal de cicatrización que se considera una de las principales causas de fracaso en las cirugías para tratar el DR.

Aunque se han realizado numerosas investigaciones para identificar factores de riesgo clínicos que puedan predisponer a la VRP, estas variables no logran explicar plenamente la probabilidad de su manifestación. La presencia de polimorfismos de un solo nucleótido, que implican cambios en la secuencia de ADN, podría jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedades genéticas en los seres humanos. Estos polimorfismos pueden ser útiles para identificar predisposiciones genéticas y comprender las causas subyacentes de ciertas condiciones.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue analizar los cambios moleculares asociados con procesos como la apoptosis, necroptosis, autofagia, inflamación y estrés oxidativo que ocurren tras un DR en un modelo murino y la influencia del polimorfismo p. *Arg72Pro* del gen *TP53*. Los resultados revelaron que dicho polimorfismo podría modular la apoptosis, autofagia, inflamación y estrés oxidativo durante los procesos neurodegenerativos que ocurren tras sufrir un DR. Dichos resultados apoyan la hipótesis de que la variante p. *Arg72Pro* del gen *TP53* podría ser un biomarcador génico para identificar a los pacientes con peor pronóstico tras sufrir un DR.

ABSTRACT

Neurodegenerative retinal diseases represent a significant cause of visual impairment and permanent blindness. Retinal detachment (RD) occurs when the neurosensory layer of the retina separates from the back of the eye, resulting in deprivation of oxygen and nutrients, leading to neurodegeneration of the tissue. In some cases, this detachment can lead to proliferative vitreoretinopathy (PVR), an abnormal scarring process that is considered one of the main causes of failure in surgeries to treat RD.

Although numerous research studies have been conducted to identify clinical risk factors that may predispose to PVR, these variables fail to fully explain the likelihood of its manifestation. The presence of single nucleotide polymorphisms, which involve changes in the DNA sequence, could play an important role in the development of genetic diseases in humans. These polymorphisms can be useful in identifying genetic predispositions and understanding the underlying causes of certain conditions.

In this context, the aim of this study was to analyze the molecular changes associated with processes such as apoptosis, necroptosis, autophagy, inflammation, and oxidative stress that occur after retinal detachment in a murine model, and the influence of the p.*Arg72Pro* polymorphism in the *TP53* gene. The results revealed that this polymorphism could modulate apoptosis, autophagy, inflammation, and oxidative stress during the neurodegenerative processes that occur after experiencing RD. These findings support the hypothesis that the p.*Arg72Pro* variant of the *TP53* gene could be a genetic biomarker to identify patients with a worse prognosis after experiencing RD.

2 INTRODUCCION

La visión desempeña un papel fundamental en todas las esferas de nuestra vida, siendo parte indisociable de la interacción social y personal, ya que gran parte de la información se transmite mediante señales no verbales, tales como gestos y expresiones faciales (1).

A nivel mundial, se estima que más de 2.200 millones de personas sufren de deficiencia visual o ceguera, y al menos mil millones tienen una discapacidad visual evitable o no tratada. La mayoría de los casos de discapacidad visual y ceguera permanente en todo el mundo son causados por enfermedades neurodegenerativas de la retina (2, 3).

La retina, ubicada en la parte posterior del ojo, es un tejido que desempeña un papel crucial en la percepción de la luz y el envío de imágenes al cerebro. Cuando la retina se separa de su posición habitual debido a un desgarro, se produce lo que se conoce como desprendimiento de retina (DR) (4). Esto determina una interrupción del suministro de oxígeno y nutrientes, y conlleva al deterioro y muerte del tejido retiniano (5). Este problema puede afectar a personas de todas las edades, pero es más común en mayores de 40 años. Si no se aborda a tiempo, puede derivar en una pérdida permanente de la visión, por lo que se considera una situación de emergencia médica, y debe de ser intervenido quirúrgicamente de forma inmediata (4). Aun así, existe un porcentaje de fracaso del tratamiento quirúrgico a causa de la vitreoretinopatía proliferativa (VRP) (un proceso de cicatrización anormal) (6).

Conocer los procesos moleculares que subyacen a dichos fenómenos, podría servir de base sólida, fiable y como punto de partida para futuras investigaciones de posibles tratamientos o terapias que mejoren la calidad de vida de estos pacientes.

2.1. Sistema visual y estructura ocular

El sistema visual comprende los globos oculares, los nervios ópticos y las vías que los conectan con las diversas estructuras del cerebro, incluyendo la corteza visual. La córnea y el cristalino, ubicados en la parte frontal del ojo, enfocan la luz para que sea captada por la retina, donde se transforma en señales nerviosas. Las señales se transmiten a través de los nervios ópticos y las vías hacia la corteza visual, pero también se envían a otras áreas del cerebro para integrarse con información de otros sentidos y de la memoria, lo que permite a una persona entender su entorno y actuar en consecuencia (1). Con el objetivo de lograr una mejor comprensión en el estudio del ojo se lo suele dividir en dos segmentos principales, uno anterior que comprende la córnea, la cámara anterior, el iris y los cuerpos ciliares, y otro posterior que comprende al cristalino o también llamado lente, coroides, humor vítreo, retina y nervio óptico (**Figura 1-B**) (7, 8).

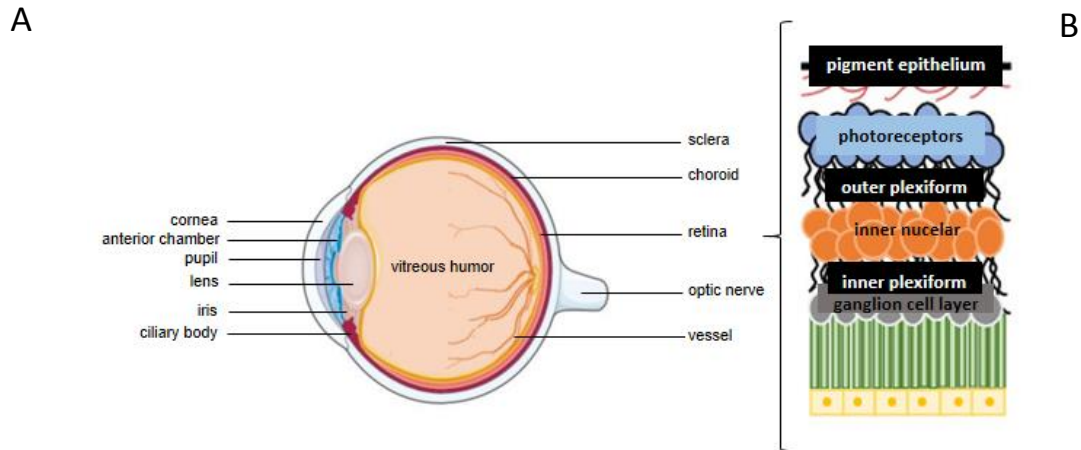


Figura 1. Esquema anatómico del globo ocular. (A) Segmento anterior comprende a la córnea, cámara anterior, iris y cuerpos ciliares. El segmento posterior comprende al lente, esclerótica, coroides, humor vítreo, retina y nervio óptico. (B) Se representa esquemáticamente las capas que constituyen la retina. Extraído y modificado de Fevereiro- Martins, M., y col., 2023 (7).

2.2. Anatomía de la neuroretina

La retina es parte del sistema nervioso central (SNC). En la parte más externa (o escleral) de la retina (**Figura 2**), se encuentra el epitelio pigmentario. Esta capa celular juega un papel crítico en el mantenimiento de la integridad, ya que se encarga de proveer nutrientes necesarios para la adecuada función de los fotorreceptores, así como de eliminar los segmentos que se desprenden de los mismos (9).

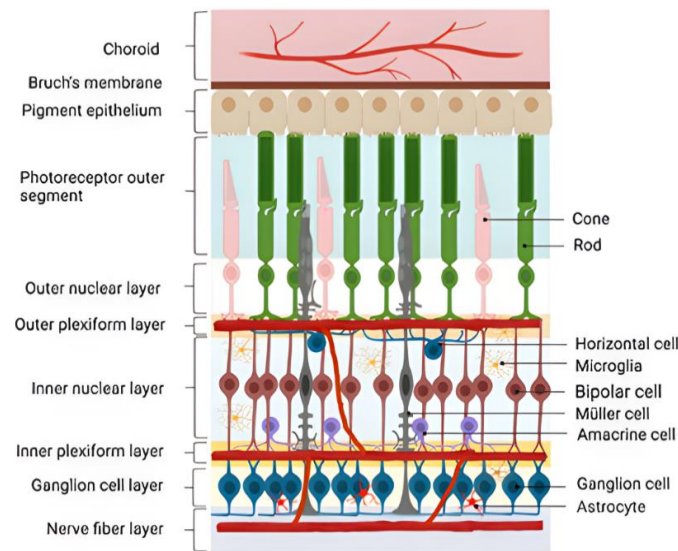


Figura 2. Arquitectura de la retina. En el esquema se observa la organización en capas de la retina. Extraído de Zhou, J. y col., 2023 (11).

La capa subsiguiente se compone de células especializadas llamadas fotorreceptores. Funcionan como fotosensores y son los responsables de la convertir la luz en señales eléctricas por medio del proceso de fototransducción (8). En el reino animal, se han identificado al menos dos tipos de fotorreceptores: los bastones y conos, responsables de la visión en luz tenue y de la visión diurna, color y brillo respectivamente (9). La siguiente capa es la capa plexiforme externa, en ella ocurre la sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares e interplexiformes (10).

A continuación, se encuentra la capa nuclear interna, compuesta por los cuerpos neuronales de las células bipolares, horizontales y amacrinas (11). La capa adyacente inmediatamente a la nuclear interna, es la plexiforme interna, en donde los axones de las células bipolares hacen sinapsis con las dendritas de las células ganglionares, dando origen a potenciales de acción ascendentes con información visual desde la retina al cerebro. También contiene las sinapsis entre células horizontales y amacrinas (8, 11). Finalmente, la información generada a través del proceso descrito se transmite a las células ganglionares, las cuales emiten impulsos eléctricos a través de sus prolongaciones axonales. De esta manera, se establece la conexión entre la retina y el cerebro, a través del nervio óptico (8).

La retina, es parte del sistema nervioso central, y por tanto en ella se encuentran diversas células de la glía, incluyendo las células de Müller, los astrocitos y la microglía. Las células de Müller cumplen múltiples funciones entre las que se destacan el mantenimiento de la homeostasis del entorno extracelular, participación en la respuesta inmune, aporte de nutrientes a neuronas y eliminación de residuos metabólicos (3, 8). Los astrocitos dan soporte estructural a las neuronas, regulan el metabolismo, y también participan en la respuesta inflamatoria y regulación del flujo sanguíneo (11). Mientras que las de la microglia cumplen con la función principal de vigilancia inmunológica, pueden actuar como fagocitos y eliminar restos de células dañadas de las capas internas de la retina (12).

2.3. Desprendimiento de retina

En todo el mundo, las enfermedades neurodegenerativas de la retina son responsables de la mayoría de los casos de discapacidad visual y ceguera permanente (2, 3). Como se mencionó anteriormente, ocurre un DR cuando la capa neurosensorial de la retina se separa de la parte posterior del ojo y deja de recibir el suministro de oxígeno y nutrientes causando la muerte del tejido. Existen tres tipos de DR, regmatógeno (el tipo más común de desprendimiento de la retina. Puede suceder si tiene un pequeño desgarro o rotura en la retina, el humor vítreo puede fluir detrás de la retina y empujar la parte posterior haciendo que la retina se desprenda), por tracción (ocurre cuando el tejido cicatrizado de la retina provoca que se separe de la parte de atrás del ojo, la causa más común es la retinopatía diabética, en donde los vasos dañados pueden cicatrizar de tal forma que traccionen hasta desprender la retina) y exudativo (sucede cuando se acumula líquido detrás de la retina, pero no hay desgarros ni roturas, la presión que ejerce el líquido procedente de vasos o productos de un proceso inflamatorio pueden hacer que la retina se desprenda) (13). Todo esto conlleva a ocasionar la separación de la retina del epitelio pigmentario, y la falta de nutrientes y soporte de oxígeno provocan la muerte celular, estableciendo el estado de neurodegenerativo. Por todo ello, el DR es una emergencia médica que debe de ser tratada quirúrgicamente (5).

Después de la cirugía, no todos los pacientes experimentan una evolución similar y la VRP es una de las principales causas de fracaso de las cirugías de DR afectando a un 75% de los personas que lo padecen (6), siendo la VRP un proceso de cicatrización anormal que se produce cuando hay una ruptura en la retina. (6).

A pesar de que la mayoría de las investigaciones han buscado identificar factores de riesgo clínicos que puedan predisponer a la VRP, estas variables no son capaces de explicar completamente su probabilidad de manifestación (14).

2.4. Neurodegeneración retiniana

La neurodegeneración es el principal proceso implicado en las enfermedades que afectan a la retina e involucra la muerte celular progresiva de células nerviosas que conforman este tejido (15).

La inflamación, el estrés oxidativo y la muerte celular están intrínsecamente relacionados en varios procesos tanto fisiológicos como patológicos. Ante una agresión, se desencadena una cascada de eventos que pueden conducir a establecer un estado de estrés oxidativo y si se mantiene en el tiempo y sobrepasa la capacidad de reparación de las células, conlleva a la muerte celular. La inflamación es un proceso complejo que implica la respuesta de múltiples células inmunitarias para combatir patógenos y reparar las lesiones, liberando citoquinas proinflamatorias (16). Está estrechamente relacionada con la necroptosis, ya que las células al morir generan patrones moleculares asociados al daño (DAMP), como la interleucina-1 α (IL-1 α), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), los cuales pueden exacerbar significativamente el proceso inflamatorio (16). Los DAMPs pueden ser generados por la microglía (considerada la primera línea de defensa del sistema nervioso central), y por tanto tiene un papel clave en equilibrar la homeostasis y la enfermedad mediante efectos citotóxicos y citoprotectores (17). Cuando la microglía se activa de forma prolongada, puede desencadenar necroptosis por la activación de la proteína RIPK1/RIPK3, liberando los DAMPs proinflamatorios (17).

En cuanto a la necrosis, en la actualidad se entiende (aunque solía ser considerada un proceso pasivo de muerte celular), que está regulada molecularmente y se han descubierto mecanismos diferenciales que subyacen a la llamada necroptosis o necrosis programada (18). Se sabe que la muerte celular se regula activamente (**Figura 3**) a nivel de la transcripción y traducción génica ya que la muerte celular fisiológica requiere la síntesis de ARN y proteínas para su ejecución (19).

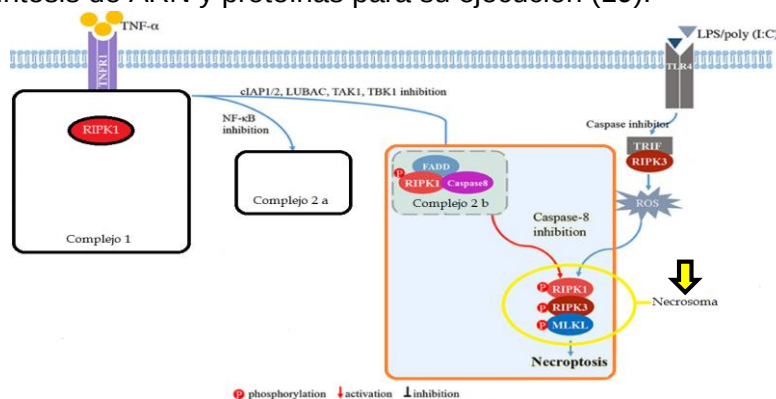


Figura 3. Regulación de la necroptosis. Cuando el TNF α (Factor de Necrosis Tumoral α), se une al Receptor del Factor de Necrosis Tumoral 1 (TNFR1) recluta diferentes proteínas y forma el Complejo 1 nucleado alrededor de la cadena de RIPK1 (Quinasa de Interacción con el Receptor 1). Cuando hay inhibición de NF- κ B (Factor Nuclear kappa B) se disocia el Complejo 1 en Complejo 2 a induciendo apoptosis independiente de RIPK1. En cambio, cuando se produce la inhibición de cIAP1/2 (Proteína Inhibidora de la Apoptosis Celular 1/2), TAK1 (Quinasa Activada por el Factor de Crecimiento Transformante Beta-1), TBK1 (Quinasa 1 de Unión a TANK) o LUBAC (Complejo de Ensamblaje de Cadenas de Ubiquitina Lineales), se forma el Complejo 2 b con RIPK1, FADD, caspasa-8 y c-FLIPL (Proteína inhibidora celular de FLICE de isoforma larga), lo que induce la apoptosis dependiente de RIPK1. Los heterodímeros procaspasa-8/cFLIPL previenen la necroptosis. Tras la inhibición de la caspasa-8, RIPK1 activado se heterodimeriza con RIPK3 (Quinasa de Interacción con el Receptor 3) y RIPK3 fosforila MLKL (Proteína Semejante a Quinasa de Dominio de Línea Mixta), lo que impulsa la polimerización de RIPK1, RIPK3 y MLKL, y forman el necrosoma. Por otra parte, TLR4 (Receptor Tipo Toll 4) de macrófagos y microglía, reconoce a LPS (lipopolisacárido) y poli (I: C) (activador de respuesta inmune), y cuando hay inhibición de caspasas, el complejo TRIF (Adaptador Conteniendo Dominio TIR que Induce Interferón- β)/RIPK3 induce la acumulación de EROs (especies reactivas del oxígeno) y posteriormente, desencadena la necroptosis. Extraído y modificado de Tao y col, 2022 (18).

Se denomina apoptosis al proceso de muerte celular que implica la eliminación controlada de células enfermas o innecesarias, con una liberación mínima de enzimas y otros componentes que podrían causar daño a las células y tejidos circundantes (20). Dependiendo de si el estímulo proviene de la propia célula o del medio externo, se activa la vía intrínseca o extrínseca de apoptosis, como se observa en la **Figura 4**, y que terminan en la activación intracelular de la cascada de caspasas (21).

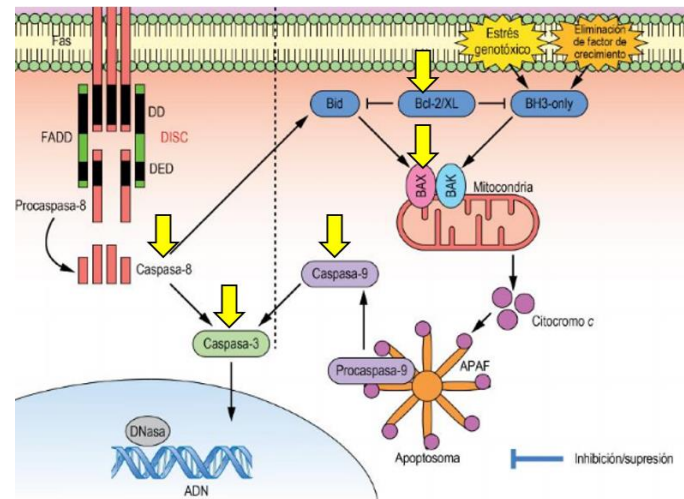


Figura 4. Regulación de la apoptosis. A la izquierda la activación por vía extrínseca: cuando el Receptor de Muerte Fas se une al ligando FasL, interactúa mediante su región de Dominio de Muerte (DED), con la región DED del adaptador Factor Asociado a la Muerte con Dominio DED (FADD), para formar el Complejo de Señalización de muerte (DISC), y éste recluta y activa las caspasas. A la derecha se observa la activación por vía intrínseca, favoreciendo a la proteína proapoptótica BH3 (Bcl-2 Homólogo 3) que estimula directamente a BAX (Bcl-2 Homólogo Antagonista/Asesino). BH3 también inhibe a la proteína BCL-2 (Linfoma de células B 2), cuya función es evitar la liberación del citocromo C. Por su parte BAX (proteína Bcl-2 asociada a X) y BAK, una vez activadas, forman poros en la membrana de la mitocondria que promueven la liberación de factores proapoptóticos, como el citocromo C. Éste último se asocia a proteínas APAF (Factor Activador de Proteasas Apoptóticas) y forman el apoptosoma, se activa la Caspasa-9 que a su vez activa la Caspasa-3 y activan las enzimas responsables de la fragmentación del ADN y la degradación celular característica de la apoptosis. Extraído y modificado de Baynes, J.W. y col., 2019 (21).

La autofagia es un proceso por el cual los componentes celulares como macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y orgánulos (mitocondrias) son degradados por el lisosoma (22). Implica la formación de vacuolas llamadas autofagosomas (**Figura 5-A**), que capturan y secuestran materiales citoplasmáticos para luego fusionarse con los lisosomas y originar autofagolisosomas (**Figura 5-B**), donde se degrada el contenido capturado. Es inducida por la falta de nutrientes para proporcionar energía reciclada y para eliminar orgánulos dañados de la célula.

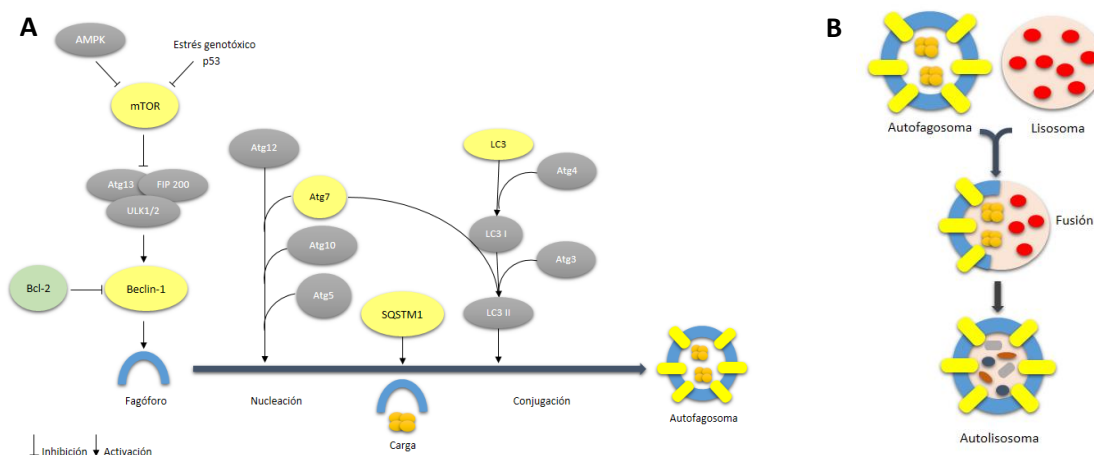


Figura 5. Regulación de autofagia. (A): Se observa como AMPK (Proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina), así como p53 (proteína supresora de tumores), inhiben a mTOR (Blanco de Rapamicina en mamíferos), que a su vez inhibe la activación de Beclin-1 por medio de la inhibición de Atg13, FIP 200 (Proteína Interactuante de FAK de 200 kDa) y ULK1 y 2 (Proteína quinasa similar a Unc-51 de mamífero 1 y 2 respectivamente), siendo Beclin-1 imprescindible para formación del fagóforo. Por otra parte se observa que Bcl-2 también inhibe a Beclin-1. Para continuar el proceso de va a determinar la formación del autofagosoma, es necesario que intervengan Atg12, Atg7, Atg10 y Atg5, lo mismo con SQSTM1 (Sequestosome 1), LC3 (Proteína de cadena ligera 3), que sufre dos conjugaciones, la primera por Atg4 originando a LC3I y posteriormente por Atg7 y Atg3 para dar LC3II, que se incluirá en la membrana del autofagosoma ya ensamblado. (B): Se observa cómo reacciona el autofagosoma con un lisosoma, fusionando sus membranas para dar lugar al autolisosoma. Autoría propia.

2.5 Gen TP53 y polimorfismo p. Arg72Pro

El papel del gen *TP53* como supresor de tumores es fundamental en la reparación celular de mutaciones genómicas que pueden propiciar diversos tipos de tumores. Asimismo, se ha constatado su capacidad para desencadenar procesos como la detención del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia o la diferenciación celular en respuesta al estrés (23).

Existen múltiples variaciones polimórficas, incluyendo polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), descritos en el gen *TP53*. Entre ellos, el polimorfismo rs1042522, que se ubica en el exón 4, es un cambio de una guanina por una citosina en la posición 2 del codón 72 en la región N-terminal; el cual regula la interacción con el factor B nuclear y la transactivación de genes relacionados con la apoptosis, la inmunidad y la inflamación, y ha sido asociado con diversos tipos de cáncer y procesos inflamatorios (26).

La variante *72Arg-TP53* se ha asociado con la traducción de una proteína con un efecto altamente proapoptótico (25, 26). La proteína BAX y BAK, generan poros en la membrana de las mitocondrias, lo cual facilita la liberación de factores proapoptóticos, entre ellos el citocromo C, el mismo de une a proteínas APAF, y el apoptosoma. Una vez activado, el apoptosoma activa la Caspasa-9, la cual a su vez activa la Caspasa-3. Estas caspasas activan las enzimas que son responsables de la fragmentación del ADN y la degradación celular característica de la apoptosis. Esta muerte de células establece el estado de neurodegeneración. Además, el proceso se ve favorecido gracias a la producción de EROs, que hace que esta vía esté más activa (21). El SNP se ha relacionado con la predisposición a varias enfermedades, incluyendo patologías neurodegenerativas. Entre ellas, se ha identificado una asociación entre el SNP rs1042522, particularmente la variante prolina, y un mayor riesgo de desarrollar VRP (27).

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El polimorfismo rs1042522 del gen *TP53* (*p. Arg72Pro*) podría condicionar el proceso neurodegenerativo de la retina tras sufrir un DR.

3.2. Objetivo general

Evaluar la influencia del polimorfismo *p. Arg72Pro* del gen *TP53* en la neurodegeneración retiniana tras sufrir un DR.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental

Para cumplir con el diseño experimental (**Figura 6**), se emplearon 14 globos oculares para realizar la caracterización morfométrica e inmunohistoquímica, y 12 globos oculares adicionales para evaluar la expresión génica.

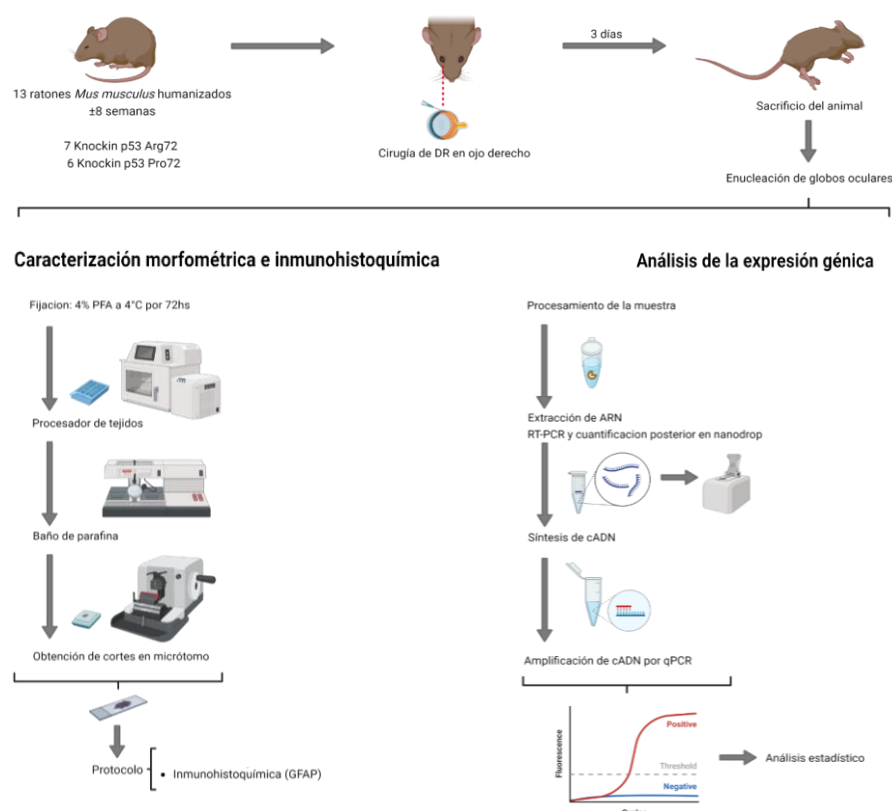


Figura 6. Diseño experimental. Se representa de forma esquemática el diseño experimental y el flujograma de trabajo seguido para la caracterización morfométrica e inmunohistoquímica y el análisis de la expresión génica.

4.2. Animales

Se evaluaron un total de 13 ratones *Mus musculus* humanizados, 7 Knockin *p53 Arg72* y 6 Knockin *p53 Pro72*, adultos de 8 ± 1 semanas. Los animales fueron cedidos amablemente por el laboratorio de la Prof^a. Ángeles Almeida, del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Se siguieron las directrices establecidas por la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), según el principio de las 3R (Replacement, Reduction and Refinement), y se utilizó el menor número posible de animales con el fin de obtener resultados fiables y precisos. Los animales fueron criados en el Servicio de Bienestar Animal e Investigación de la Universidad de Valladolid de acuerdo con la legislación española (RD 53/2013). Todos los experimentos se llevaron a cabo cumpliendo las normas y políticas internacionales aplicables, incluida la Directiva de la Unión Europea para la protección de los

vertebrados utilizados con fines experimentales y científicos (2010/63/EU), y fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional de la Universidad de Valladolid para el Cuidado y Uso de Animales.

Modelo murino de desprendimiento de retina

El modelo murino de DR, se realizó mediante una cirugía en el ojo derecho del ratón bajo anestesia general y con la ayuda de un microscopio quirúrgico. Los ratones fueron anestesiados con una inyección peritoneal de una mezcla de tribromoetanol y yert-amil-alcohol (AVERTIN) en una proporción de 200 μ L/ 10 gr, se administró como agentes midriáticos ciclopentolato al 1 % (Alcon Cusí S.A., Es.), y fenilefrina al 2,5 % (Alcon Cusí S.A., Es.), y como anestésico local oxibuprocaina al 0,2 % (Alcon Cusí S.A., Es.). Después de la disección de la conjuntiva, se realizó un túnel escleral utilizando una aguja 30 G, y en la córnea clara una paréntesis para impedir el aumento de la presión intraocular. Se infundieron 4 μ L de hialuronato sódico (Healon GV 1,4 %; Abbott Medical Optics AMO) en el espacio sub-retiniano de la hemirretina superior, ubicado entre la retina y el epitelio pigmentario, utilizando una jeringa Hamilton de 10 μ L con una aguja de 33 G para completar este procedimiento. Como medida post- operatoria, se aplicó pomada de ciprofloxacino tópico (Oftacilox®, Alcon S.A. Es.) en el ojo con DR.

4.3. Caracterización morfométrica e inmunohistoquímica

4.3.1. Obtención y procesamiento de las muestras de neuroretina

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical después de ser anestesiados y sus globos oculares enucleados 3 días después de realizado el DR. Se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% a 4° C por 72 hs. Posteriormente, los globos oculares se colocaron por separado en casetes y se lavaron bajo agua de grifo fría durante 1 h 30 min. A continuación, las muestras fueron colocadas en el procesador de tejidos. Al terminar, las muestras se llevaron al baño de parafina precalentado. El molde de metal fue seleccionado de acuerdo al tamaño del globo ocular y se colocó bajo el chorro de parafina caliente. La muestra se retiró del casete y se sumergió en el molde de parafina caliente para luego retirarlo a la zona fría para dejar baje su temperatura y solidifique.

Los cortes de las muestras se realizaron en micrótopo giratorio HM 340E (Microm, EE.UU.), con un espesor de 5 μ m.

4.3.2. Inmunohistoquímica de proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Se utilizó inmunohistoquímica de GFAP específica para células de Müller, para observar la neurodegeneración retiniana evaluando el nivel de gliosis empleando el protocolo del kit "Polyclonal Rabbit Anti- Glial Fibrillary Acidic Protein (Dako Omnis) Clone Polyclonal". Las láminas con los cortes histológicos se desparafinaron siguiendo la metodología del apartado 5.4.2. Se colocaron en cámara húmeda y se agregó 75 μ L de solución de tripsina 0,25 % en PBS 1x por 10 min a TA (temperatura ambiente). Luego de lavar con PBS 1x a chorro, se agregó 75 μ L de solución de bloqueo en PBS 1x + 4 % suero de cabra + 0,3 % de tritón por 1h a TA. Se lavó con PBS 1x (3 veces de 5 min cada uno), se agregó 75 μ L de anticuerpoprimario anti GFAP en solución de bloqueo, dilución 1:500 por 1 h a TA, se lavó con PBS 1x (3 lavados de 5 min cada uno) y se agregó 75 μ L de

anticuerpo secundario cabra anti-conejo alexa fluor 568 en PBS 1x; dilución 1:200 por una hora a TA. Luego de lavar con 3 veces con PBS 1x, se agregó 75 µL de solución DAPI (10 µg/ ml), se lavó 3 veces con PBS 1x, se colocó medio de montaje cubriendo con portaobjetos. Fueron almacenadas en cámara húmeda, bajo refrigeración hasta su observación al microscopio.

4.3.3. Microscopía

Las muestras inmunohistoquímicas fueron examinadas utilizando microscopio confocal invertido LEICA SP5 modelo DMI 6000B (Leica Microsystems, Alemania), en combinación con el software informático LEICA LAS AF.

4.4. Análisis de la expresión génica

4.4.1. Obtención y procesamiento de muestras de neuroretina

Luego de que los globos oculares fueron enucleados 3 días después de realizado el DR, las muestras de retina que se emplearon para realizar los análisis de la expresión génica se almacenaron en ultracongelación a -80 °C en PBS 1x.

4.4.2. Extracción del ARNm

Para poder realizar el análisis de la expresión génica, se realizó en primera instancia, la extracción de ARNm de las muestras de retina, las cuales fueron descongeladas y mantenidas en frío con hielo. Se utilizó el protocolo de recomendado por PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen™, EE.UU.). Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 10 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante dejando el pellet. A continuación, se le agregó 600 µL de buffer de lisis con 1% de mercaptoetanol y se pasó por vórtex 40 s. Se centrifugó a 3000 g por 5 min a TA. Luego se agregó 600 µL de etanol al 70% y se homogeneizó con micropipeta. Se transfirió 700 µL del lisado a las columnas de purificación y se centrifugó a 1200 g por 25 s a TA. Se descartó el centrifugado y la columna se reinsertó en el mismo tubo colector. Luego se agregó 700 µL de Buffer Wash 1 a la columna y se centrifugó a 1200 g por 25 s a TA, al terminar se descartó el lavado poniendo la columna en un nuevo tubo colector. A continuación se agregó 500 µL de Buffer Wash 2 a la columna y se centrifugó a 1200 g 25 s a TA. Se descartó el lavado, y la columna se volvió a colocar en el tubo colector vacío para repetir este paso, y se centrifugó a 1200 g por 2 min. Se descartó el tubo colector y se colocó la columna en el tubo de recuperación. Se agregó 10 µL de agua libre de ARNasas y se dejó incubar 1 min a TA para posteriormente centrifugar a 12500 g por 2 min a TA. Se hizo una nueva elución con 10 µL de agua libre de ARNasas, se repitió el proceso de centrifugación a 12500 g por 2 min a TA para luego descartar la columna. El ARN fue almacenado en ultracongelación a -80°C.

4.4.3. Retrotranscripción del ARNm

Para llevar a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc), se realizó una reacción de retrotranscripción utilizando el kit High Capacity ADNc Reverse Transcription (Invitrogen™, EE.UU.). Dicha reacción se realizó en un volumen final de 20 µL (2,0 µL RT Buffer 10x; dNTP Mix 25x 100 mM 0,8 µL; RT Random Primers 10x 2,0 µL;

MultiScribe™ Reverse Transcriptase 1,0 µL; 3,2 µL de agua libre de nucleasas), para 2 µg/ µL de ARN previamente cuantificado por absorbancia a 260-280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo, EE.UU.). El programa de retrotranscripción utilizado se detalla en la **Tabla 1** (33).

Tabla 1. Programa de retrotranscripción.

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

4.4.4. Amplificación del ADNc por PCR cuantitativa comparativa en tiempo real (qPCR)

Para la detección en tiempo real de la reacción de la qPCR, se utilizó SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, EEUU) y los cebadores cuyas secuencias se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Secuencias génicas específicas de los cebadores utilizados en las qPCR.

Nombre del gen	Cebadores directos (5' – 3')	Cebadores reversos (5' – 3')
<i>Gen relacionado con la autofagia 7 (ATG7)</i>	CTCCCTGGTCCTGATCTCC A	GTGCACATGGAAGGACCT GA
<i>Proteína Interactuante de BCL2 en forma de hélice enrollada, similar a moesina (BCLIN1)</i>	GTGCGCTACGCCAGATC	GATGTGGAAGGTGGCATT GAA
<i>Cadena ligera 3 beta de la proteína asociada a microtúbulos 1 (LC3β)</i>	GCGACTGGAGAGCTGTTT CT	AACCACATCCTAAGGCCA GC
<i>Blanco de Rapamicina en mamíferos (mTOR)</i>	CTGCAGAATCGTCAAGGG GT	ATCTCCCTGGCTGCTCCT TA
<i>Secuestrosoma 1 (SQSTM1)</i>	GGTGTGGTTCGCACTACT GA	AGCATCCTGCCAAGCTGA AT
<i>Proteína X asociada a Bcl-2 (BAX)</i>	CCCGAGAGGTCTTCTTCC	GCCTTGAGCACCAGTTTG
<i>Linfoma de células B 2 (BCL2)</i>	TTCAGGGATGGGGTGAAC TG	CACAGGGCGATGTTGT
<i>Caspasa 3 (CASP3)</i>	GTGGACTCTGGGATCTATC T	CCATGAATGTCTCTCTGA GG
<i>Caspasa 8 (CASP8)</i>	CGGGAAGACATAACCCAA CT	GTGGGATAGGATACAGCA GA
<i>Caspasa 9 (CASP9)</i>	AGTTCCCGGGTGCTGTCTA T	GCCATGGTCTTTCTGCTC AC
<i>Citocromo b-245, subunidad beta (CYBB)</i>	GACCTCCAGAGAACACA GC	ACCCTAGCCTGCTTATGG GA
<i>Glutación Peroxidasa 6 (GPX6)</i>	GTCACGGTTTTGGGCTTTC C	CCCCCTTCTCAAAGAGCT GG
<i>Superoxido dismutasa 1, soluble (SOD1)</i>	GGAACCATCCACTTCGAG CA	CCCATGCTGGCCTTCAGT TA
<i>Tiorredoxina 2 (TXN2)</i>	CTGTAGCCTGACCGCACTA G	AGGCAGGAGAGGAAATGT GC
<i>Tiorredoxin reductasa 1 (TXNRD1)</i>	CTCGGAGGAACGTGTGTG AA	AGTTGCGCGAGTCTTTCA GA
<i>Proteína Semejante a Quinasa de Dominio de Línea Mixta (MLKL)</i>	AATGAGAAGCTGAGAGAC GTCTG	CCACGCTAATTTGCAACT GCATC
<i>Quinasa de Interacción con el Receptor 1 (RIPK1)</i>	AGAAGACAGACCTAGACA GC	CCTCTTCCAAGAGAACCT CA
<i>Quinasa de Interacción con el Receptor 3 (RIPK3)</i>	CAAGCCCTCTAACATTCTG C	CGCTTTAGAAGCCTTCAG GT
<i>Interleucina-1 (IL-1)</i>	ACAAACCACCCGTTTCACC T	ATGGGTGGAGGGTTCACT CT
<i>Interleucina-6 (IL-6)</i>	GAGGATACCACTCCCAACA GACC	AAGTGCATCATCGTTGTTT ATACA

<i>Interleucina-10 (IL-10)</i>	GCTCTTACTGACTGGCATG AG	CGCAGCTCTAGGAGCATG TG
<i>Factor de Crecimiento Transformante $\beta 1$ (TGF$\beta 1$)</i>	CCTGGGTTGGAAGTGGAT CC	GGTTGTAGAGGGCAAGGA CC
<i>Factor de necrosis tumoral α (TNFα)</i>	ACCCTCACACTCAGATCAT CTTC	TGGTGGTTTGCTACGACG T
<i>Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)</i>	TGCACCACTGCTTAG C	CACCACCTTCTTGATGTCA TCA

La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ L (5 μ L de Master Mix, SYBR Green, 1 μ L de cebadores directos y reversos 20 μ M; 1,5 μ L de agua libre de nucleasas; 2,5 μ L de ADNc (cuantificado y diluido a concentración de 20 ng/ μ L).

Para realizar la amplificación se utilizó el termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, EE.UU.), bajo las condiciones que se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Programa de qPCR

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

El análisis de la curva de melting se realizó con el fin de evaluar la especificidad de los cebadores utilizados para la reacción. Para normalizar los niveles de expresión del ARNm se utilizó como gen de referencia a GAPDH. Se llevaron a cabo tres repeticiones por cada condición experimental en todas las reacciones de qPCR.

4.5. Análisis estadístico

En el presente estudio, las variables continuas han sido reportadas mediante la media y desviación estándar (DE). Para evaluar la distribución de dichas variables, se ha utilizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En aquellos casos en los que las variables son de naturaleza paramétrica, se ha aplicado la prueba t de análisis de varianza (ANOVA), mientras que, para las variables no paramétricas, se han empleado la prueba U de Mann-Whitney (en casos de comparación entre dos grupos) y la prueba de Kruskal-Wallis (en casos de comparación entre más de dos grupos). Los resultados con un valor de p inferior a 0,05 se han considerado significativos. Todas las pruebas estadísticas han sido realizadas mediante el paquete SPSS versión 22.0 (SPSS, EE.UU.).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la gliosis: inmunoexpresión de GFAP.

La inmunoexpresión de GFAP en retina sin DR se observó de forma delimitada a GCL tanto en cortes histológicos correspondientes a ratones *72Arg-TP53* como en los ratones *72Pro-TP53* (**Figura 7-A, C**).

Cuando se comparó la inmunoexpresión de GFAP en la retina de ratones con DR (**Figura 7-B, D**), respecto a los animales sin DR (**Figura 7-A, C**), se observó un aumento de la gliosis. La presencia de GFAP se evidenció en la capa de las células ganglionares, además de las capas IPL, INL y ONL. En la comparación entre las muestras de DR de ratones *72Pro-TP53* (**Figura 7-D**), respecto a retina con DR de ratones *72Arg-TP53* (**Figura 7-B**), se visualizó mayor presencia de GFAP en todas las capas en los ratones *72Pro-TP53*.

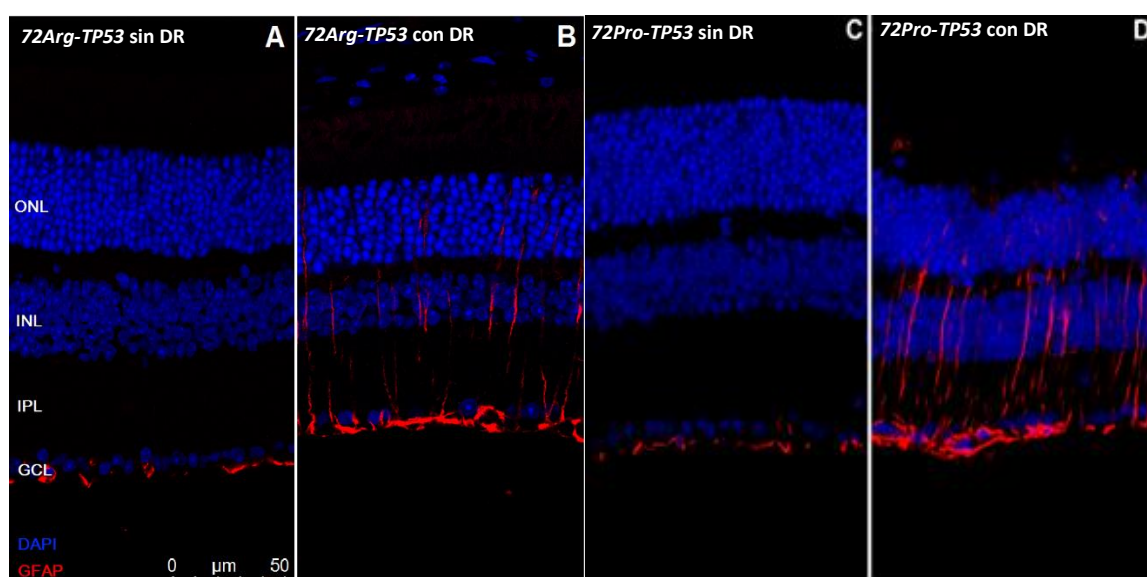


Figura 7. Evaluación inmunohistoquímica de la gliosis. (A) Ratones *72Arg-TP53* sin desprendimiento de retina. (B) Ratones *72Arg-TP53* con desprendimiento de retina. (C) Ratones *72Pro-TP53* sin desprendimiento de retina. (D) Ratones *72Pro-TP53* con desprendimiento de retina. (ONL) Capa nuclear externa; (INL) capa nuclear interna; (IPL) capa plexiforme interna; (GCL) capa de células ganglionares. Aumento 40x. Barra de escala a 50μm.

5.2. Análisis de la expresión génica

5.2.1. Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en muerte celular programada

Nuestros resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes implicados en la apoptosis. Los resultados obtenidos indicaron que existió un incremento significativo en la expresión relativa del ARNm del gen *BAX* en las retinas de los ratones *72Pro-TP53* comparando con ratones *72Arg-TP53*. De manera similar, observamos un aumento significativo para la expresión relativa del ARNm del gen *CASP3* en ratones *72Pro-TP53*, y también para la expresión de *CASP9* para ratones *72Pro-TP53* respecto a ratones *72Arg-TP53*. En el caso de la expresión relativa del ARNm del gen *BCL2*, y *CASP8* no se observó diferencias significativas entre ratones *72Arg-TP53* y ratones *72Pro-TP53* (**Figura 8**).

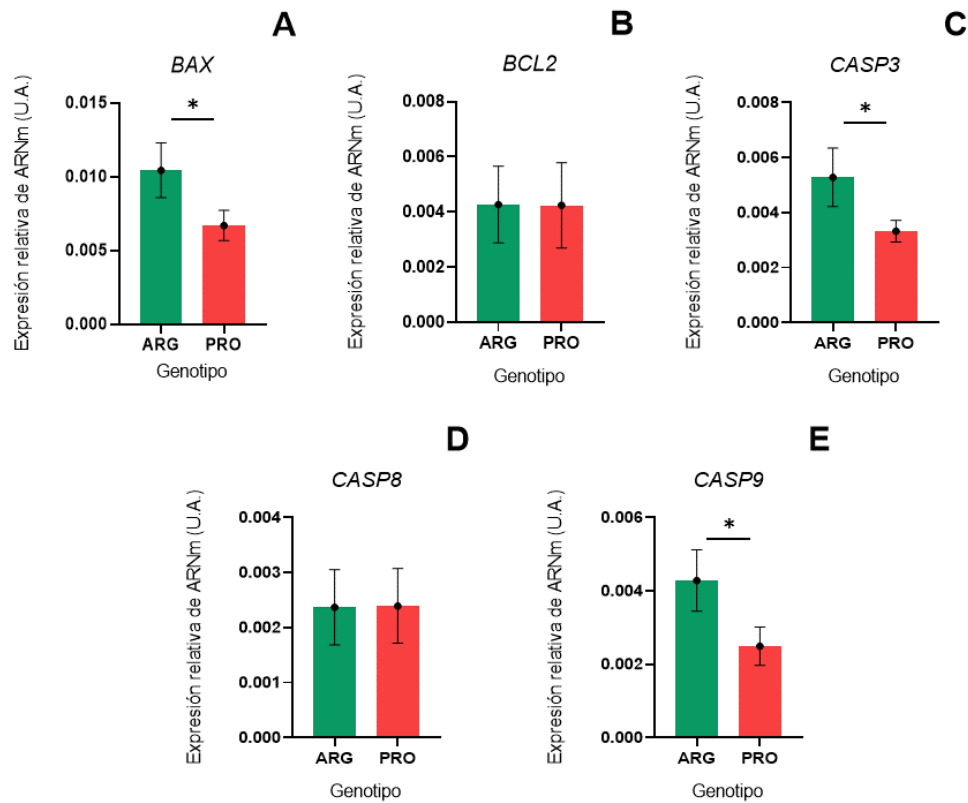


Figura 8. Expresión relativa de ARNm para genes implicados en apoptosis. (A): gen BAX, (B): BCL2, (C): CASP3, (D): CASP8 y en (E): CASP9. *p<0.05, U.A.: unidades arbitrarias.

5.2.2. Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en necroptosis

En el caso de la necroptosis, no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas (Figura 9).

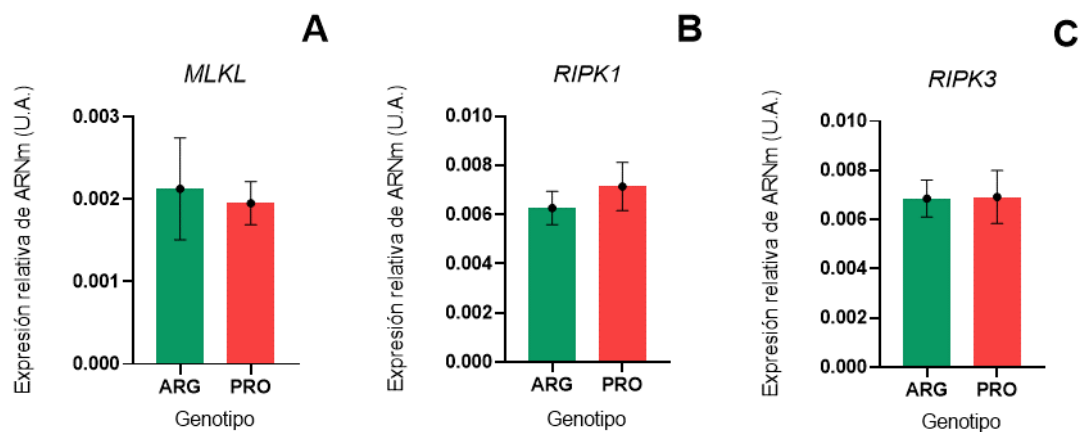


Figura 9. Expresión de ARNm relativa para genes implicados en necroptosis. (A): MLKL, (B): RIPK1 y (C): RIPK3. *p<0.05, U.A.: unidades arbitrarias. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre ratones 72Arg-TP53 y ratones 72Pro-TP53.

5.2.3. Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en autofagia

Para la expresión relativa de ARNm del gen *ATG7* (**Figura 10-A**) observamos un aumento significativo en los ratones *72Pro-TP53* en comparación con la retina de los ratones *72Arg-TP53*. También se observó que la expresión relativa de ARNm del gen *BCLIN1* (**Figura 10-B**), se incrementó significativamente cuando comparamos los ratones *72Pro-TP53* respecto a los ratones *72Arg-TP53*. En cuanto a la expresión relativa de ARNm del gen *SQSTM1* (**Figura 10-E**), se observó un incremento significativo en ratones *72Pro-TP53* en comparación a ratones *72Arg-TP53*. Sin embargo, cuando se comparan las expresiones relativas de ARNm de *LC3B* y *mTOR* (**Figura 10-C y D**), no se encontró diferencias significativas entre ratones *72Arg-TP53* y ratones *72Pro-TP53*.

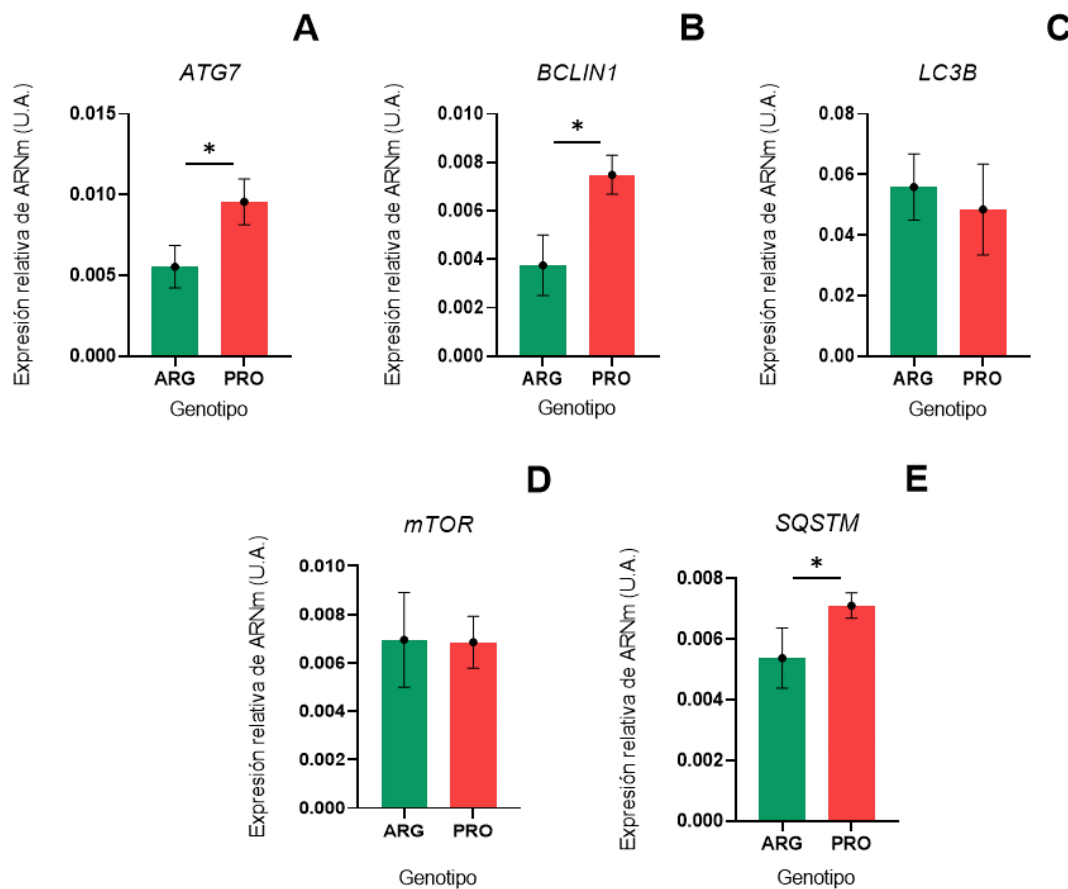


Figura 10. Expresión de ARNm relativa para genes implicados en autofagia. (A): *ATG7*, (B): *BCLIN1*, (C): *LC3B*, (D): *mTOR* y (E): *SQSTM1*. * $p < 0.05$, U.A.: unidades arbitrarias.

5.2.4. Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en inflamación

En la expresión relativa del ARNm del gen *IL-1* (**Figura 11-A**), observamos un aumento significativo en ratones *72Pro-TP53* en comparación con ratones *72Arg-TP53*. También observamos un aumento significativo en la expresión relativa del ARNm del gen *IL-6* (**Figura 11-B**) en ratones *72Pro-TP53* respecto a ratones *72Arg-TP53*, situación que se

repitió para la expresión relativa del ARNm del gen *TGFβ1* (**Figura 11-E**), no observamos diferencias significativas entre ratones *72Arg-TP53* y ratones *72Pro-TP53* para *IL-10* y *TNFα* (**Figura 11-C y D**).

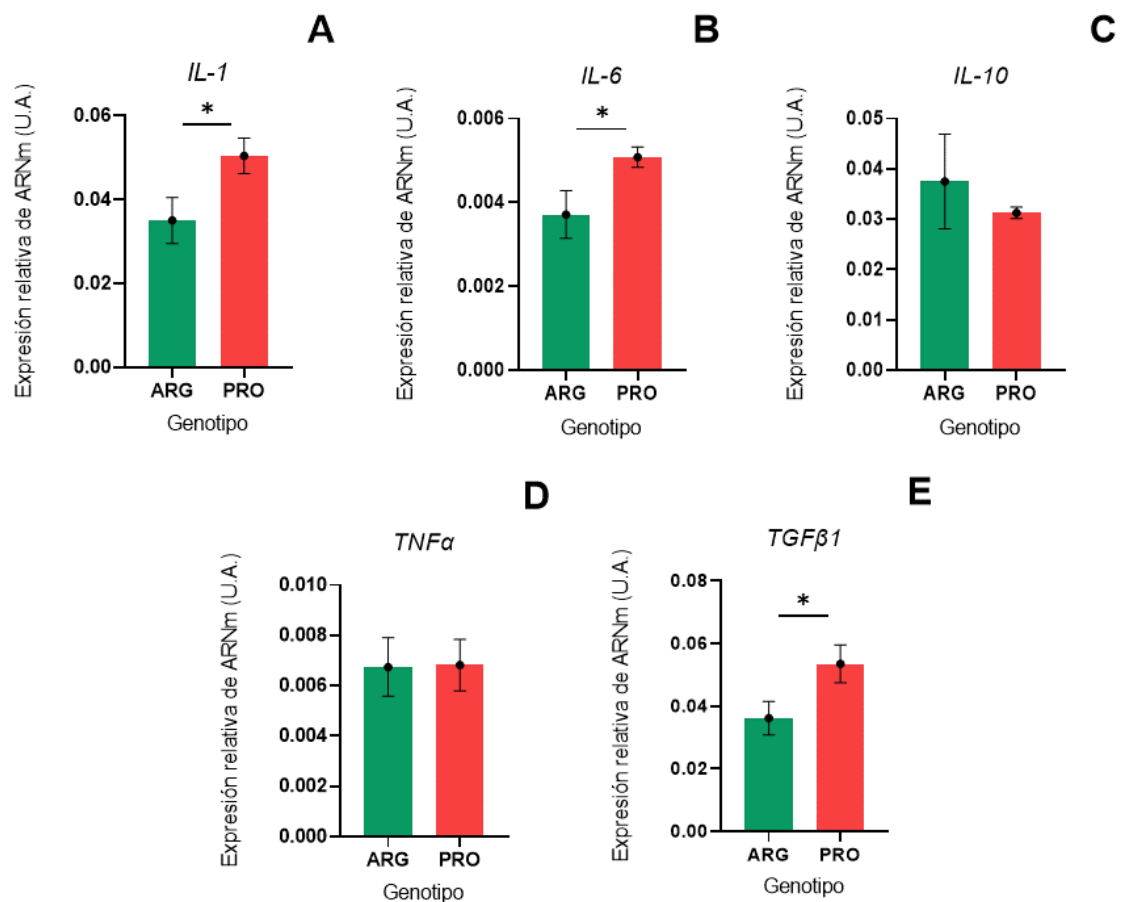


Figura 11. Expresión de ARNm relativa para genes implicados en inflamación. (A): IL-1; (B): IL-6; (C): IL-10; (D): TNFα y (E): para TGFβ1. *p<0.05, U.A.: unidades arbitrarias.

5.2.5. Análisis de la expresión relativa de ARNm de genes implicados en estrés oxidativo

Cuando comparamos la expresión relativa de ARNm para ratones *72Arg-TP53* y ratones *72Pro-TP53*, de los genes *CYBB*, *GPX6*, *TXN2* y *TXNRD1* (**Figura 12- A, B, D y E**) no se observó un incremento significativo en ratones *72Pro-TP53*, en comparación con ratones *72Arg-TP53* tras el DR. Sin embargo en la expresión relativa del ARNm del gen *SOD1* (**Figura 12-C**) se observó un incremento significativo en ratones *72Pro-TP53*, en comparación con ratones *72Arg-TP53* tras el DR.

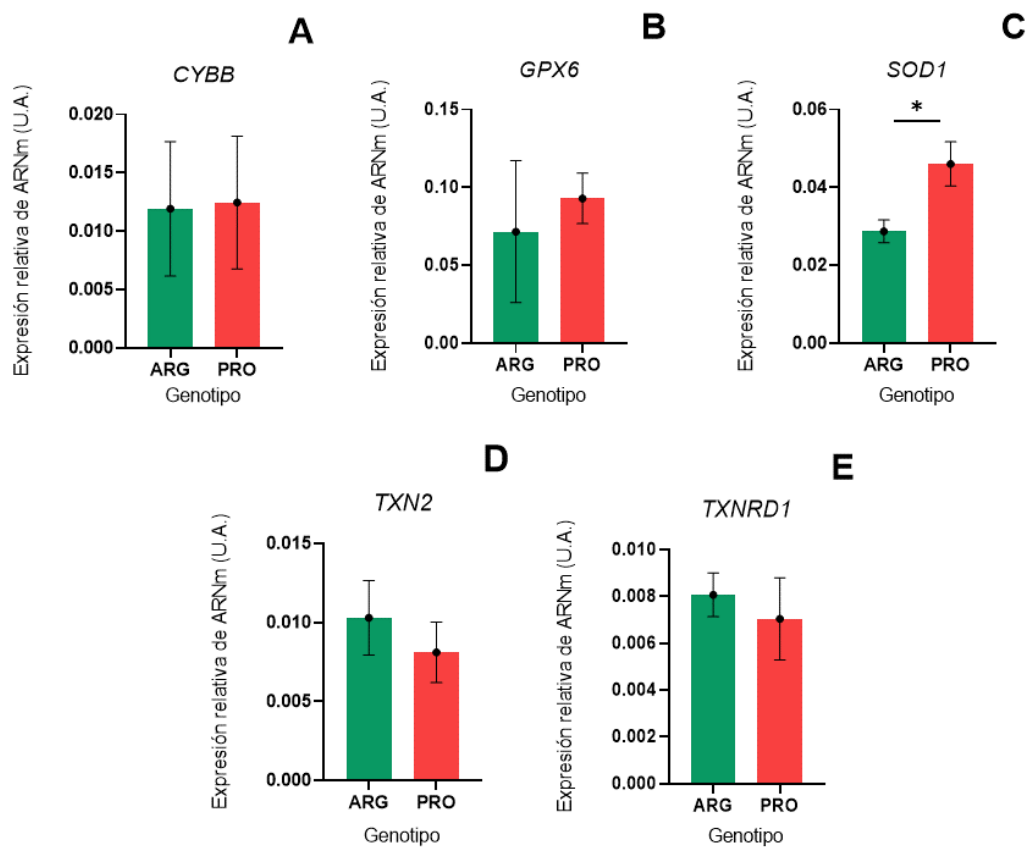


Figura 12. Expresión de ARNm relativa para genes implicados en estrés oxidativo. (A): CYBB; (B): GPX6; (C): SOD1, (D): TXN2 y (E): TXNRD1. $*p < 0.05$, U.A.: unidades arbitrarias.

6. DISCUSIÓN

Para analizar la influencia de la variante rs1042522 del gen *TP53* sobre la neurodegeneración de la retina tras un DR, se desarrolló y evaluó un modelo experimental de DR en ratones humanizados para dicho SNP. La retina es un tejido sensible a la luz, compuesto de varias capas, ubicado en el segmento posterior del ojo. Está compuesta por varias capas de células, incluyendo los fotorreceptores (conos y bastones) que detectan la luz y transmiten señales visuales a través del nervio óptico, las células ganglionares reciben estas señales y las envían al cerebro para su procesamiento visual (1, 7, 8). Cuando se habla de enfermedades neurodegenerativas, se refiere a la progresiva degeneración y pérdida de las células nerviosas en el SNC, incluyendo a las células de la retina (15). Dentro de este grupo de enfermedades se encuentra el DR, que al separarse del epitelio pigmentario conlleva a una interrupción en el suministro de oxígeno y nutrientes a las células retinianas suponiendo su muerte (6). En los últimos tiempos se ha demostrado como los factores genéticos son importantes la hora de determinar la susceptibilidad individual a sufrir este tipo de enfermedades.

Nuestros resultados mostraron que el SNP *p. Arg72Pro* del gen *TP53* podría asociarse con una modulación de la apoptosis, la inflamación, el estrés oxidativo y la autofagia tras sufrir un DR. Es decir polimorfismo *p. Arg72Pro* del gen *TP53* podría ser importante en la modulación de la neurodegeneración tras sufrir un DR, resultados que podrían estar en línea por lo publicado previamente por nuestro grupo de investigación, que asocian dicho SNP con un mayor riesgo de sufrir VRP, particularmente la variante prolina (28).

La apoptosis implica la eliminación controlada de células enfermas o innecesarias, con una liberación mínima de productos y componentes que podrían causar daño a las células y tejidos circundantes (20). Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la expresión de *BAX*, *CASP3* y *CASP9* está incrementada en los ratones *72Arg-TP53*, dichos genes están involucrados en la vía intrínseca de la apoptosis. Es decir, tras un DR se podría producir una mayor activación de la vía intrínseca de la apoptosis en las neuronas de la retina de los ratones *72Arg-TP53*. Nuestros resultados están en línea por lo publicado por Gomez-Sanchez et al, que asocian el pronóstico tras sufrir un ictus con el SNP *p. Arg72Pro* del gen *TP53*. En dicho trabajo también asocian una mayor muerte neuronal con la variante Arg de dicho polimorfismo, particularmente a través de la activación de la vía intrínseca (33).

La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico ante una lesión, infección o irritación, en un intento de proteger al organismo. Las células del sistema inmunológico liberan sustancias químicas, como histaminas, citocinas y quimosinas, en el área afectada. En nuestro estudio se observó un incremento significativo de la expresión de *IL-1*, *IL-6* y *TGFβ1* en las retinas de los ratones *72Pro-TP53* respecto a *72Arg-TP53*. Genes involucrados en procesos pro- inflamatorios, siendo *IL-1* e *IL-6* característicos de la inflamación aguda. Además, observamos un mayor grado gliosis en los animales *72Pro-TP53* en comparación a *72Pro-TP53*. Se observó una mayor inmunoexpresión de GFAP. Cuando hay un daño en el tejido, en este caso el DR, las células de la glía actúan para intentar reestablecer la homeostasis del microambiente extracelular (8, 29). Esta reacción glial consiste, entre otras cosas, en un alto nivel de expresión de GFAP en las células de Muller (29). Hay estudios que indican que la gliosis reactiva, puede determinar cambios en el citoesqueleto de las células gliales, alterando el tráfico vesicular de endosomas y lisosomas, lo que trae como consecuencia liberación de sustancias que influyen en los procesos neurodegenerativos (30).

El estado de estrés oxidativo se establece por un desbalance entre los oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros. En relación a los genes asociados al estrés oxidativo, se observó una diferencia significativa en la expresión relativa de ARNm de SOD1, el gen que codifica la enzima superóxido dismutasa 1. Esta enzima desempeña un papel crucial en la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y agua (H_2O). La diferencia encontrada entre las variantes *72Arg-TP53* y *72Pro-TP53* puede deberse a disparidades en el estado de estrés oxidativo, posiblemente relacionadas con diferentes generaciones de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, lo cual podría tener implicancias significativas en vías de señalización (31, 32). Estos resultados, junto con los observados en la inflamación, podrían explicar el posible aumento de la autofagia que observamos en los ratones *72Pro-TP53* tras sufrir un DR. La autofagia es un proceso por el cual los componentes celulares son degradados para proporcionar energía reciclada o para eliminar orgánulos dañados de la célula (22). En este sentido, el estado de mayor inflamación que observamos en los animales *72Pro-TP53* podría inducir una mayor activación de la autofagia.

Previamente, la variante Pro del SNP p. *Arg72Pro* del gen *TP53* se ha asociado con un mayor riesgo de sufrir VRP (28). La VRP es un proceso de cicatrización anormal que se produce cuando hay una ruptura en la retina y las células del epitelio pigmentario se liberan en un entorno vítreo pro-inflamatorio (al perderse la adhesión célula-célula, las células se convierten en pluripotenciales, migran y proliferan y en ese proceso forman membranas a ambos lados de la retina que terminan traccionando la retina empeorando el DR y agudizando el proceso neurodegenerativo (6). Nuestros resultados asocian la variante Arg con una mayor apoptosis tras el DR, y la variante Pro con una mayor reacción inflamatoria. Estos resultados nos sugieren la hipótesis de que la mayor reacción inflamatoria que se produce en pacientes Pro (para el SNP p. *Arg72Pro* del gen *TP53*) podría ser consecuencia de unos niveles menores en la activación de apoptosis. Una menor apoptosis podría favorecer la supervivencia de células dañadas (tras el DR) y ello desembocar en un proceso pro-inflamatorio. Ese mayor proceso inflamatorio tras sufrir un DR, podría estar relacionado con el tener un mayor riesgo de sufrir VRP en el caso de los individuos Pro para el SNP p. *Arg72Pro* del gen *TP53*.

Los biomarcadores génicos pueden emplearse para identificar, diagnosticar o prevenir enfermedades pues nos permiten identificar a los individuos con mayor riesgo de sufrir cierta patología. Incluso nos ayudan a evaluar la respuesta a determinados tratamientos. (33). A la vista de los resultados de nuestro trabajo, el polimorfismo p. *Arg72Pro* del gen *TP53* podría ser un buen biomarcador genético para identificar a los pacientes susceptibles de sufrir una mayor neurodegeneración retiniana tras sufrir un DR, y así aumentar la investigación destinada a diseñar acciones terapéuticas destinadas a frenar esos procesos neurodegenerativos.

7. CONCLUSIÓN

El polimorfismo *p. Arg72Pro* del gen *TP53* podría ayudar a identificar a los pacientes susceptibles de sufrir una mayor neurodegeneración retiniana tras sufrir un DR, pues los resultados de nuestro trabajo lo asocian con una modulación de la apoptosis, inflamación, estrés oxidativo y autofagia tras sufrir un DR.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la visión [World report on vision]. [Internet]. Ginebra; 2020 [cited 2023 May 11]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331423/9789240000346-spa.pdf>
2. GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*. 2021 Feb;9(2):e144–60.
3. Puertas-Neyra K, Galindo-Cabello N, Hernández-Rodríguez LA, González-Pérez F, Rodríguez-Cabello JC, González-Sarmiento R, et al. Programmed Cell Death and Autophagy in an in vitro Model of Spontaneous Neuroretinal Degeneration. *Front Neuroanat*. 2022 Feb 11;16.
4. MedlinePlus en español [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.). Desprendimiento de retina. [actualizado 7 enero 2021; revisado 30 oct. 2018; consulta 14 jun. 2023]; [aprox. 2 p.]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/retinaldetachment.html>.
5. Blair K; CCN. Retinal Detachment. StatPearls Publishing. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551502/>. 2023. Último acceso: 21/06/2023.
6. de la Rúa ER, Pastor JC, Fernandez I, Sanabria MR, Garcia-Arumi J, Martinez-Castillo V, et al. Non-complicated retinal detachment management: variations in 4 years. Retina 1 project; report 1. *British Journal of Ophthalmology*. 2008 Apr 1;92(4):523–5.
7. Feveireiro-Martins M, Marques-Neves C, Guimaraes H, Bicho M. Retinopathy of prematurity: A review of pathophysiology and signaling pathways. *Surv Ophthalmol*. 2023 Mar;68(2):175–210.
8. 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*. 2014 Nov;43:17–75.
9. 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>. Último acceso: 19/06/2023
10. Lledó Riquelme M, CME, CN. La transducción visual. In: *Annals d’Oftalmologia*. Alicante, Spain.; 2010. p. 130–6.
11. Zhou J, Chen B. Retinal Cell Damage in Diabetic Retinopathy. *Cells*. 2023 May 8;12(9):1342.
12. Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>.
13. National Eye Institute. Tipos y causas del desprendimiento de la retina. Recuperado de <https://www.nei.nih.gov/espanol/aprenda-sobre-la-salud-ocular/enfermedades-y-afecciones-de-los-ojos/desprendimiento-de-la-retina/tipos-y-causas-del-desprendimiento-de-la-retina>. Último acceso: 25/06/23.
14. Pastor JC, de la Rúa ER, Aragón J, Mayo-Iscar A, Martínez V, García-Arumi J, et al. Interaction Between Surgical Procedure for Repairing Retinal Detachment and Clinical Risk Factors for Proliferative Vitreoretinopathy. *Curr Eye Res*. 2005 Jan 2;30(2):147–53.
15. 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.* 2020 Jun;17:1155–66.
16. Wallach D, Kang TB, Kovalenko A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jan 13;14(1):51–9.
 17. Rodríguez-Gómez JA, Kavanagh E, Engskog-Vlachos P, Engskog MKR, Herrera AJ, Espinosa-Oliva AM, et al. Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells.* 2020 Jul 17;9(7):1717.
 18. Tao Y, Murakami Y, Vavvas DG, Sonoda KH. Necroptosis and Neuroinflammation in Retinal Degeneration. *Front Neurosci.* 2022 Jun 29;16.
 19. 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.* 2013 Nov;37:114–40.
 20. WILSON SE. Stimulus-specific and Cell Type-specific Cascades: Emerging Principles Relating to Control of Apoptosis in the Eye. *Exp Eye Res.* 1999 Sep;69(3):255–66.
 21. Baynes JW; DMH. *Bioquímica médica. Muerte celular: apoptosis, necrosis y autofagia.* 5ta ed. Elsevier Connect ; 2019.
 22. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2010 Sep;12(9):823–30.
 23. Hede SM, Nazarenko I, Nistér M, Lindström MS. Novel Perspectives on p53 Function in Neural Stem Cells and Brain Tumors. *J Oncol.* 2011;2011:1–11.
 24. Frank AK, Leu JIJ, Zhou Y, Devarajan K, Nedelko T, Klein-Szanto A, et al. The Codon 72 Polymorphism of p53 Regulates Interaction with NF-κB and Transactivation of Genes Involved in Immunity and Inflammation. *Mol Cell Biol.* 2011 Mar 1;31(6):1201–13.
 25. van Heemst D, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, de Craen AJM, Brandt BW, et al. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp Gerontol.* 2005 Jan;40(1–2):11–5.
 26. Dumont P, Leu JIJ, Della Pietra AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003 Mar 3;33(3):357–65.
 27. Rojas J, Fernandez I, Pastor JC, Garcia-Gutierrez MT, Sanabria MR, Brion M, et al. A Strong Genetic Association between the Tumor Necrosis Factor Locus and Proliferative Vitreoretinopathy: The Retina 4 Project. *Ophthalmology.* 2010 Dec;117(12):2417–23.
 28. Pastor-Idoate, S., Rodríguez-Hernández, I., Rojas, J., Fernández, I., García-Gutierrez, M. T., Ruiz-Moreno, J. M., Rocha-Sousa, A., Ramkissoon, Y., Harsum, S., MacLaren, R. E., Charteris, D., van Meurs, J., González-Sarmiento, R., & Pastor, J. C. (2013). The p53 Codon 72 Polymorphism (rs1042522) Is Associated with Proliferative Vitreoretinopathy. *Ophthalmology*, 120(3), 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.08.019>.
 29. Middeldorp, J.; Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421–443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>.
 30. Potokar, M., Stenovec, M., Gabrijel, M., Li, L., Kreft, M., Grilc, S., Pekny, M., & Zorec, R. (2010). Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia*, 58(10), 1208–1219. <https://doi.org/10.1002/glia.21000>.
 31. Lo ACY, Woo TTY, Wong RLM, Wong D. Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms after Retinal Detachment: Implications for Photoreceptor Rescue. *Ophthalmologica.* 2011;226(Suppl. 1):10–7.
 32. Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), 5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>.

Instituto Nacional del Cáncer. Pruebas de biomarcadores para el tratamiento del cáncer. Recuperado de

<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/pruebas-de-biomarcadores-tratamiento-cancer>. Ultimo acceso: 25/06/2023

33. Gomez-Sanchez, J. C., Delgado-Esteban, M., Rodriguez-Hernandez, I., Sobrino, T., Perez de la Ossa, N., Reverte, S., Bolaños, J. P., Gonzalez-Sarmiento, R., Castillo, J.; Almeida, A. (2011). The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 429–437. <https://doi.org/10.1084/jem.20101523>.