



**Universidad de Valladolid**



## **Master en Investigación en Ciencias de la Visión**

2012-2013

Universidad de Valladolid

Trabajo de Fin de Master

### **DESARROLLO DE UN MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA PORCINA SUPLEMENTADO CON CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA**

*Salvatore Di Lauro*

#### **Directores**

*Prof. Manuel José Gayoso Rodríguez*

*Dr. Iván Fernández Bueno*

## ***Agradecimientos***

- *A mis tutores, Dr. Iván Fernández Bueno y Prof. Manuel José Gayoso Rodríguez que me han apoyado y guiado.*
- *Al Grupo de Retina del IOBA y, en especial, a Maite García Gutiérrez, a David Rodríguez Crespo, al Dr. Girish Kumar Srivastava y a Amar Kumar Singh, sin los cuales todo este trabajo no hubiera sido posible.*

## **Financiación**

Esta línea de investigación ha contado con la financiación parcial de un proyecto FIS (PS09/00938) concedido al Dr. GK Srivastava.



# INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	7
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	8
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	9
<b>4. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
4.1 EL DESPRENDIMIENTO DE RETINA.....	10
4.2 EL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA (EPR).....	12
4.3 CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA.....	14
4.4 LA RETINA DE CERDO.....	17
<b>5. MATERIAL Y METODO</b> .....	18
5.1 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA (EPR).....	19
5.2 PREPARACIÓN DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINA PORCINA.....	23
5.3 PROCESAMIENTOS.....	26
5.4 TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	29
5.5 MICROSCOPIA.....	32
5.6 ANALISIS DEL ESPESOR RETINIANO.....	33
<b>6. RESULTADOS</b> .....	34
6.1 CARACTERIZACIÓN CITOLÓGICA DEL CULTIVO PRIMARIO DE EPR DE CERDO.....	34
6.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.....	36
6.3 EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	48
7.1 ELECCIÓN DE UN MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA PORCINA.....	48
7.2 DISCUSIÓN DEL MATERIAL Y MÉTODO.....	51
7.3 DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	54
7.4 LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONTINUACIÓN DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN.....	56
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>Bibliografía</b> .....	59



# RESUMEN

**Objetivo:** desarrollar un modelo de cultivo organotípico de retina neural porcina suplementado con células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) que simule las modificaciones celulares y estructurales asociadas al desprendimiento de retina.

**Material y método:** A partir de 11 ojos de cerdo, se aislaron células del EPR y se prepararon explantes de neuroretina, procedentes de la región del área centralis, de modo que se obtuvieron explantes control y experimento de cada ojo. Se realizaron 6 cultivos control (cultivo organotípico de neuroretina de cerdo) y 6 experimento (cultivo organotípico de neuroretina de cerdo suplementado con EPR) durante 9 días. A la finalización del cultivo, los explantes fueron procesados y evaluados histológicamente, tinción con Azul de Toluidina, y mediante técnicas de inmunohistoquímica, anticuerpos frente a GFAP (glial fibrillary acidic protein), CRALBP (cellular retinaldehyde binding protein), calbindina y sinaptofisina.

**Resultados:** las muestras procedentes de los cultivos experimento presentaron un menor grado de degeneración, menores alteraciones estructurales y mayor espesor respecto a los controles. Además, se observó una expresión contenida de GFAP, mientras que la expresión de calbindina y de sinaptofisina fue superior en los experimentos respecto a los controles.

**Conclusiones:** se ha puesto a punto un modelo de cultivo organotípico de neuroretina de cerdo con células del EPR que simula las modificaciones celulares asociadas con los procesos de degeneración retiniana de una manera más cercana al desarrollo in vivo, con respecto a los modelos in vitro previos. La presencia de las células del EPR influye positivamente en la ralentización de los procesos de degeneración retiniana durante el cultivo.

# 1. JUSTIFICACIÓN

El desprendimiento de retina (DR), entendido como la separación entre la neuroretina y el epitelio pigmentario de la retina (EPR), es una patología en continuo aumento [1, 2] en la que nuevas investigaciones, de manera directa sobre el ser humano, resultan complejas, debido a la dificultad para obtener muestras en una fase fisiopatológica temprana [3]. Por ello, se hace necesario recurrir a modelos experimentales alternativos, como son los cultivos organotípicos de retina neural [4-10]. Se han desarrollado cultivos de explantes retinianos de múltiples especies animales, tanto de aves como de mamíferos, pero entre todas éstas, la retina porcina presenta la gran ventaja de poseer unas características anatómicas y fisiológicas muy similares a la humana. Por otra parte, el Grupo de Retina del IOBA (Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada) ha puesto a punto en los últimos años un modelo de cultivo organotípico de neuroretina porcina que simula gran parte de las modificaciones celulares que han sido descritas en modelos animales de DR [5, 11], sin embargo, este modelo presenta una limitación importante, como es la carencia de células del EPR. Esta estructura posee importantes funciones fisiológicas para el mantenimiento de la homeostasis neuroretiniana en condiciones normales, y en la fisiopatología del DR a lo largo del tiempo [12, 13]. Por ello, trabajos previos han desarrollado cocultivos con EPR, como es el caso de los modelos de cultivo de Kobuch [9] y Kaempfler [8], en los cuales, sin embargo, el EPR está en contacto directo con la neuroretina y, por tanto, no se pueden considerar como modelos adecuados de DR.

En este trabajo se propone el desarrollo de un nuevo modelo de cultivo organotípico de neuroretina porcina suplementado con células del EPR, que permita simular, de manera más cercana a las condiciones *in vivo*, las modificaciones celulares que se producen en el parénquima retiniano tras un DR, y por tanto, que permita profundizar en el estudio de la fisiopatología de esta enfermedad. Además, la puesta a punto del modelo propuesto permitiría llevar a cabo, *in vitro*, el ensayo de fármacos neuroprotectores, así como estudios de seguridad farmacológica, de los efectos de sustancias endógenas, como los factores de crecimiento y las citoquinas, y de técnicas de bioingeniería, como paso previo al empleo de animales de experimentación.

## 2. HIPÓTESIS

En un modelo de cultivo organotípico de retina neural la presencia de células del epitelio pigmentario de la retina (EPR), células esenciales para el mantenimiento de la homeostasis retiniana, conlleva una reducción en los procesos de degeneración y de muerte de los fotorreceptores, lo que permite mantener la viabilidad y las características morfológicas del resto de neuronas y de células gliales retinianas, así como de la estructura tisular que conforman.



### 3. OBJETIVOS

De forma general, se propone desarrollar un modelo de cultivo organotípico de retina neural porcina suplementado con células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) que permita profundizar en el conocimiento de los procesos de degeneración retiniana que ocurren en el desprendimiento de retina (DR), patología en la que la retina neural pierde el contacto físico con el EPR, pero donde se mantiene el efecto que los factores secretados por estas células ejercen sobre la neuroretina.

De forma específica, con este trabajo se pretende:

- Poner a punto y estandarizar un modelo de cultivo de retina neural con células del EPR, a partir de un modelo de cultivo organotípico de neuroretina de cerdo previamente desarrollado y caracterizado por el Grupo de Retina del IOBA [5, 11], que simule las modificaciones celulares y estructurales asociadas al DR y que permita estudiar las interacciones entre las células de la neuroretina y las citoquinas/factores de crecimiento secretados por el EPR.
- Evaluar y caracterizar las modificaciones tisulares y celulares, concretamente de los fotorreceptores y de las células de Müller, que se producen a lo largo del cultivo, en presencia/ausencia de células del EPR, mediante tinciones convencionales y técnicas de inmunquímica para la detección de proteínas específicas de los diferentes tipos celulares.

# 4. INTRODUCCIÓN

## 4.1 EL DESPRENDIMIENTO DE RETINA

El desprendimiento de retina (DR) se produce por la separación de la retina neurosensorial y del EPR [1, 14]. La forma más frecuente, denominada regmatógena, se origina por la formación de un desgarro retiniano que crea una vía de acceso al espacio subretiniano por la cual el vítreo se introduce entre la neurorretina y el EPR, lo que da lugar a la separación de estas dos estructuras.

La prevalencia actual de esta patología se estima en 1,6 casos nuevos por cada 10.000 habitantes al año [15, 16], sin embargo, el número de casos está aumentando de forma notable, debido fundamentalmente a un progresivo envejecimiento de la población general y al aumento exponencial en el número de intervenciones de catarata. Esta cirugía está considerada como el factor de riesgo más importante para el posterior desarrollo de un DR, así se calcula que el riesgo de desarrollar un DR se incrementa 5,5 veces a los 10 años de la cirugía de cataratas [2, 16-22].

Desde la década de los años 90, se han conseguido estabilizar los resultados anatómicos de la cirugía del DR en valores de éxito superiores al 90% [2, 15], sin embargo, los resultados funcionales aún están lejos de los valores deseables en términos de agudeza visual, sensibilidad al contraste y visión de los colores [16, 23-28]. Así, un estudio reciente realizado por el Grupo de Retina del IOBA [2], determinó que solo el 42% de los DR reaplicados quirúrgicamente obtienen una agudeza visual  $\geq 20/40$  a los 3 meses, mientras que un 20% conservan valores inferiores a 20/100, es decir muy por debajo del límite de la ceguera legal en España. Por ello, el reto actual al que se enfrenta la oftalmología respecto a la patología del DR es alcanzar una recuperación funcional adecuada.

Durante los últimos años, se han identificado diversos factores implicados en esa pérdida de función visual, a pesar del éxito quirúrgico [29]. Así, se reconoce claramente que la degeneración de los fotorreceptores tras el DR, tanto por necrosis como por apoptosis [30, 31], es un evento fundamental

para la pérdida de agudeza visual, así como otras modificaciones celulares que afectan significativamente a la recuperación funcional tras un DR [3, 14, 32]. Estas modificaciones se producen de forma muy precoz tras el DR [3, 32] y han sido adecuadamente descritas por el Grupo de Retina del IOBA mediante la utilización de modelos de cultivo organotípico tanto de neuroretina humana como porcina [4, 5, 11]. De forma resumida, los hallazgos encontrados incluyen (Figura 1) un progresivo acortamiento y pérdida de los segmentos externos de los fotorreceptores, la pérdida de mitocondrias y la descompartmentalización de las organelas intracelulares en el segmento interno de los fotorreceptores [32], la progresiva disminución del espesor retiniano, como resultado de la degeneración y la desorganización de las capas nucleares externa e interna, de las capas plexiformes y de las células ganglionares, así como la proliferación y la hipertrofia/hiperplasia de las células de Müller [3, 32]. Estos estudios han contribuido a complementar los conocimientos acerca de la patogenia precoz del DR y han permitido identificar una serie de factores de crecimiento y de citoquinas que pueden constituir importantes dianas terapéuticas en un futuro inmediato [33], como el TNF- $\alpha$  [34].

Por todo ello, actualmente los esfuerzos en la investigación del DR se centran en el desarrollo de tratamientos farmacológicos, basados fundamentalmente en la neuroprotección [35, 36], como adyuvantes del procedimiento quirúrgico, con la finalidad de reducir los fenómenos de degeneración y de muerte celular que acontecen en el parénquima retiniano tras el DR. Sin embargo, como paso previo, es necesario contar con un modelo *in vitro* que reproduzca adecuadamente los procesos *in vivo* y que permita realizar pruebas de seguridad y de eficacia concluyentes.

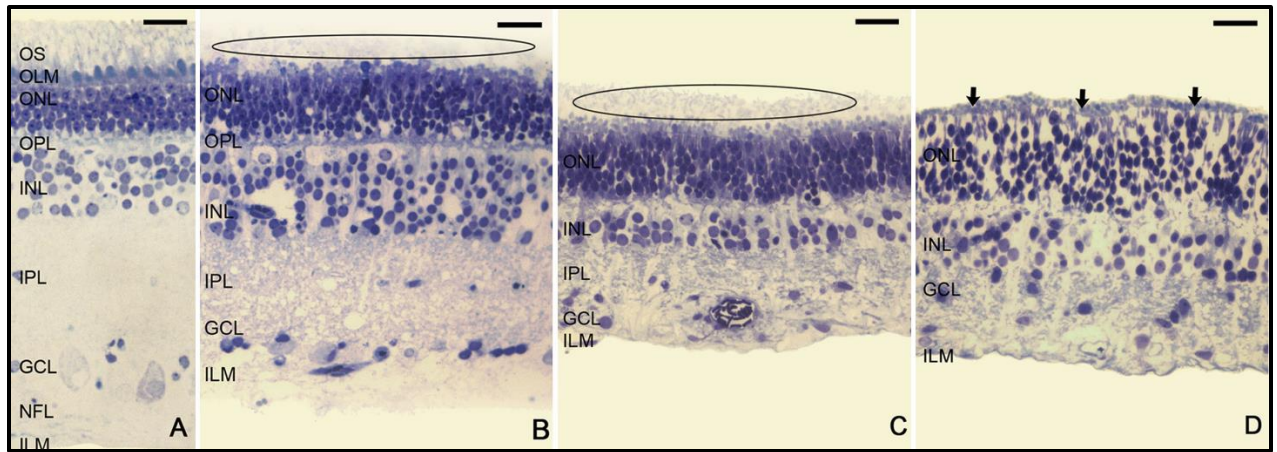


Figura 1: Figura modificada de Fernández-Bueno et al. (2008) [5] donde se observan los cambios en la estructura retiniana a lo largo del cultivo organotípico de la neuroretina porcina. (A) Imagen de una neuroretina inmediatamente tras el desprendimiento experimental, donde se observa una estructura retiniana con todas sus capas adecuadamente conservadas. (B) Neuroretina después de 3 días de cultivo donde se observa un ligero acortamiento retiniano y una alteración de los segmentos externos de los fotorreceptores (circulo); (C) Después de 6 días de cultivo aumenta la degeneración de los segmentos externos de los fotorreceptores (circulo), se pierden núcleos en la capa nuclear interna y la retina sigue perdiendo su espesor; (D) A los 9 días de cultivo la retina mantiene su arquitectura parcialmente, pero con una importante pérdida celular, el tejido glial originado supera la membrana limitante externa (flechas); OS: outer segment; OLM: outer limitant membrane; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cells layer; NFL: nerve fiber layer; ILM: inner limitant membrane.

## 4.2 EL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA (EPR)

El EPR es una monocapa de células epiteliales cuboideas, localizada en la parte más externa de la retina, que contacta con la membrana de Bruch externamente y con los segmentos externos de los fotorreceptores internamente. En el ser humano, hay aproximadamente 4-6 millones de células del EPR, con un cociente fotorreceptores/EPR de aproximadamente 45/1 y una densidad de 1,500-4,500 células/mm<sup>2</sup> [12, 37]. Estas células son fundamentales para la función visual [37, 38], por ello, el complejo fotorreceptores/células pigmentarias se presenta en la mayoría de los ojos del reino animal, desde los moluscos a los primates [39]. Así, el EPR es esencial para la supervivencia de las células neuroretinianas, en particular de los fotorreceptores, y además posee otras numerosas funciones (Figura 2) [12, 38]:

- 1) Incrementa la calidad del sistema óptico del ojo absorbiendo la luz dispersada y así, contribuye a mejorar la calidad de la imagen [38];

- 2) Participa en el metabolismo de la vitamina A y en el ciclo visual [38, 40]. El todo-trans-retinal de los fotorreceptores es re-isomerizado a 11-cis-retinal gracias a un complejo de enzimas del EPR, que comprende la LRAT (lecithin retinol acil transferase), la RPE65 (proteína RPE de 65 kDa) y RDH5 (11-cis-retinol dehydrogenase 5) , y posteriormente reincorporado a los fotorreceptores [41];
- 3) Fagocita los segmentos externos de los fotorreceptores, de modo que se renueven constantemente para reemplazar las estructuras dañadas a causa del estrés foto-oxidativo y del metabolismo celular, lo que garantiza una adecuada función visual [38, 42, 43];
- 4) Garantiza el aporte de nutrientes a los fotorreceptores, como la glucosa a través de transportadores específicos [44, 45], y los ácidos grasos  $\omega$ -3 [46]; controla la homeostasis iónica (transporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) en el espacio sub-retiniano (particularmente importante para mantener la excitabilidad de los fotorreceptores a los cambios rápidos de concentración iónica durante el proceso de foto-transducción) [38], elimina metabolitos, como el ácido láctico [38, 45], y el exceso de fluido en el espacio sub-retiniano, mediante transporte activo [47-49]. Todas estas acciones son particularmente importantes si se considera que los fotorreceptores tienen la mayor tasa metabólica del cuerpo humano y que el transporte para-celular está abolido por la barrera hematorretiniana, por lo que su nutrición depende casi exclusivamente del flujo de nutrientes que les llega desde la circulación coroidea a través del EPR [50];
- 5) Secreta factores tróficos y de crecimiento. Las células del EPR son capaces de secretar varias moléculas, como ATP (*Adenosine-5'-triphosphate*), FGF (*fibroblast growth factor*) [51-55], TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) [55, 56], IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) [57, 58], CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) [54, 59], PDGF (*platelet-derived growth factor*) [60, 61], VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [58, 62-64], LEDGF (*lens epithelium-derived growth factor*) [65], interleuquinas [66, 67], TIMP (*tissue inhibitor of matrix metalloprotease*) [38] y PEDF (*pigment epithelium-derived factor*) [68-70]. Estas moléculas son secretadas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y contribuyen a la homeostasis retiniana. Por ejemplo, el PDGF es un factor neurotrófico que posee efectos anti-apoptóticos [69, 71], lo que protege a las neuronas del daño inducido por la hipoxia y el glutamato, y anti-angiogénicos [68], lo que reduce la proliferación de las células endoteliales de la coriocapilar [70], mientras que el CNTF protege los fotorreceptores del daño inducido por la luz [59, 72];

6) Conformar la barrera hematorretiniana y mantener el estado de privilegio inmunitario del ojo. Debido a la presencia de “tight junctions” intercelulares el EPR separa y aísla la retina del sistema circulatorio. Además, las células del EPR interactúan con las células del sistema inmune, mediante la secreción de factores inmuno-moduladores, como la IL-8 (interleuquina-8) [73], el factor del complemento H [74] o la MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) [75].

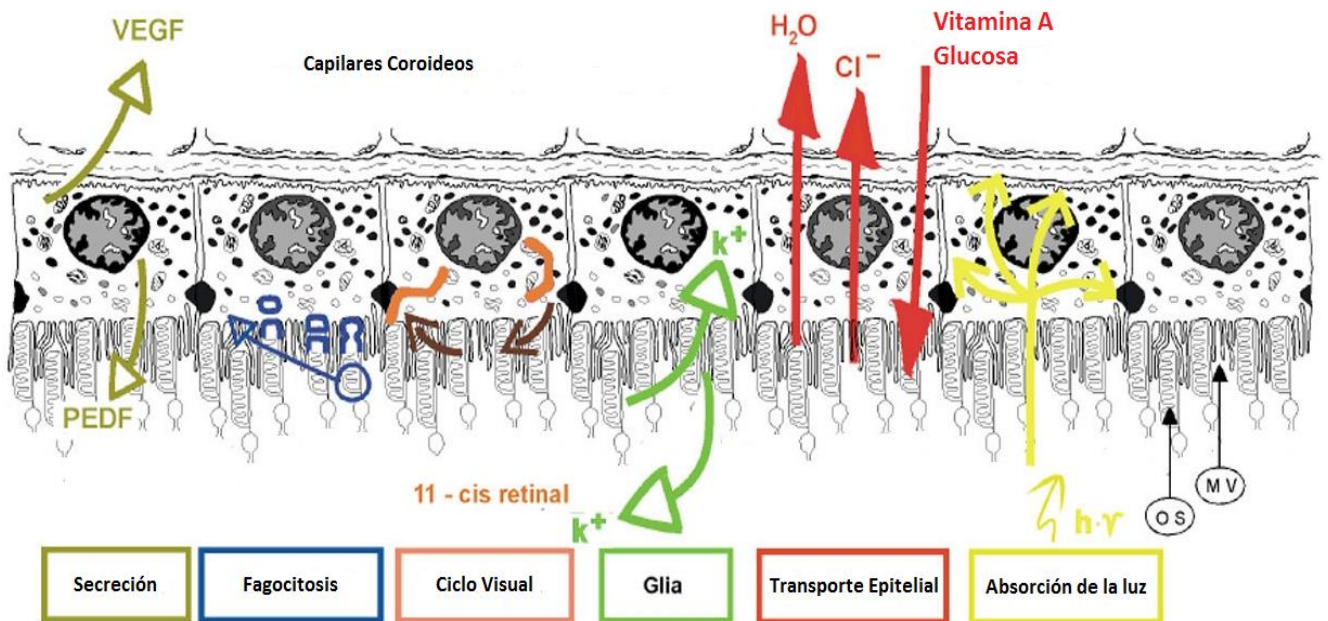


Figura 2: Funciones del epitelio pigmentario de la retina (EPR) (modificado de Strauss, 2005) [38]. El EPR incrementa la calidad del sistema óptico del ojo absorbiendo la luz dispersada, participa en el metabolismo de la vitamina A y en el ciclo visual, fagocita los segmentos externos de los fotorreceptores, garantiza el aporte de nutrientes a los fotorreceptores, controla la homeostasis iónica a través del transporte trans-epitelial y secreta factores tróficos y de crecimiento

Por todo ello, además del papel que juegan las células del EPR en la fisiopatología del DR, las alteraciones en la funcionalidad del EPR originan varias patologías oftalmológicas, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) [76, 77], la Retinitis Pigmentosa [78-80], la enfermedad de Stargardt [79] o la enfermedad de Best [81].

## 4.3 CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA

Los cultivos organotípicos de retina son modelos tisulares *in vitro* que ya fueron descritos hace casi un siglo. Así, los primeros experimentos en este sentido se deben a Strangeways y Fell [82] que en 1926

realizaron cultivos de retina a partir de ojos embrionarios de pollo, y a Tansley, que en los años 30 desarrolló un modelo de cultivo de retinas de rata [83]. Años más tarde, en 1950, Trowell describió el método de cultivo sobre membrana, en el cual los explantes de retina se colocan sobre una membrana porosa, de modo que el tejido se mantiene en una interfase aire-medio de cultivo, con la porción interna de la retina (vítrea) en contacto con la membrana [84]. Hasta la década de 1980 este sistema representó el “gold standard” para el estudio de las modificaciones que se producían en los explantes neuroretinianos a lo largo del cultivo. Sin embargo, en 1989 Caffé et al. [85] describen por primera vez el cultivo de explantes de neuroretina cultivados con los fotorreceptores en contacto con la membrana porosa, que se ha convertido en el método más utilizado actualmente para el cultivo de neuroretinas.

El desarrollo de los cultivos organotípicos de retina ha representado desde sus orígenes una herramienta fundamental para el estudio de la diferenciación de la retina pre- y post-natal [6, 85-87] y sobre todo en el entendimiento de la fisiopatología de los procesos de degeneración retiniana [88-91]. Los cultivos de explantes de neuroretina tienen la peculiaridad de reproducir las dinámicas funcionales neuroretinianas, basadas en la interacción entre las diferentes células que constituyen este tejido complejo. Por esta razón, el cultivo organotípico de retina neural resulta ser superior a los cultivos de células disociadas, en los cuales tales dinámicas están ausentes [92]. Por ello, estos modelos permiten el ensayo de medicamentos [89, 90, 93] y de toxicidad farmacológica [94], el estudio de los efectos de moléculas como los factores de crecimiento [95-97], y de cocultivos con células madre [98], de una forma más cercana a los procesos *in vivo*.

Las principales alteraciones observadas durante el cultivo de los explantes retinianos incluyen edema tisular [88], hipertrofia, proliferación y migración de las células de Müller [86], degeneración precoz de los segmentos externos de los fotorreceptores [86, 99] y reducción del espesor retiniano [85, 88, 99]. Estos cambios son similares a los observados en modelos experimentales de DR *in vivo*, principalmente los que implican a las capas retinianas externas, lo que ratifica su utilización en el ensayo de medicamentos y de técnicas de bio-ingeniería [7, 32, 100-102].

Por otra parte, también se han desarrollado cultivos de neuroretina y EPR, inicialmente descrito por Tamai et al. [103]. Posteriormente, otros investigadores desarrollaron diferentes cocultivos de retina neural-EPR, recurriendo a tejido embrionario o post-natal de roedores [85, 104, 105], pollo [82, 106, 107], rana [108, 109], y cerdo [8, 94]. En este sentido, uno de los cultivos organotípicos con EPR que resulta más interesante es el descrito por Kobuch et al. [9]. Este grupo desarrolla un modelo de cultivo organotípico constituido por explantes de complejos neuroretina-EPR-coroides, mantenidos en perfusión continua de medio de cultivo. En realidad este sistema de cultivo resulta complejo, necesita de un costoso equipamiento de perfusión continua y de una cámara de cultivo especial, y en la práctica no demostró grandes ventajas respecto al cultivo de explantes neuroretinianos sin EPR. De hecho, además del elevado coste de mantenimiento y de su complejidad, los resultados, en términos de supervivencia celular y de alteraciones estructurales en la retina, fueron análogos a los de los cultivos de neuroretinas aisladas. Además, en todos estos modelos de cultivo el EPR está en contacto con la retina neural y, por tanto, no simula realmente un DR, donde por definición, existe una separación física entre el EPR y la neuroretina.

En la actualidad, estos modelos de cultivo organotípico continúan siendo de interés para la comunidad científica y se utilizan activa y eficazmente para ampliar los conocimientos acerca de las patologías retinianas. En este sentido, a parte del Grupo de Retina del IOBA [4, 5, 11], otros grupos internacionales han publicado notables trabajos recientemente, donde destacan los de Lüke et al. (Universidad de Tübingen, Alemania), donde utilizan cultivos de neuroretina bovina [110] para estudiar la toxicidad de medicamentos [111] así como sus efectos sobre la supervivencia celular [112], mediante la aplicación de pruebas electrofisiológicas [113, 114]; los de Gosh et al. (Universidad de Lund, Suecia), mediante el cultivo de neuroretina porcina evalúan los efectos que las fuerzas de tensión laterales ejercen sobre la retina [115], y las funciones neuroprotectoras del GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) [116]; y los de Rodrigo et al. (Hospital Universitario La Fe, Universidad de Valencia) que han utilizado el modelo de cultivo organotípico para recrear, añadiendo al cultivo el fármaco Zaprinas<sup>®</sup>, inhibidor de la fosfodiesterasa 6 (PDE6), un modelo alternativo para el estudio de varias enfermedades humanas [102] asociadas a un defecto funcional de la PDE6, como algunas formas de



retinitis pigmentosa [117], la distrofia progresiva de conos [118], la distrofia de conos-bastones [119] y la amaurosis congénita de Leber [120].

## 4.4 LA RETINA DE CERDO

Los globos oculares de cerdo poseen dimensiones muy similares a las del ser humano y su retina presenta grandes similitudes a nivel anatómico e histológico en comparación con la retina humana.

Aunque en la retina de cerdo no se pueda definir una verdadera zona macular, se puede identificar una región muy parecida a ésta, denominada *area centralis*. Se trata de una porción localizada superiormente al nervio óptico que atraviesa horizontalmente la retina, que contiene la máxima densidad de conos y que no es atravesada por grandes vasos [121] (Figura 3).

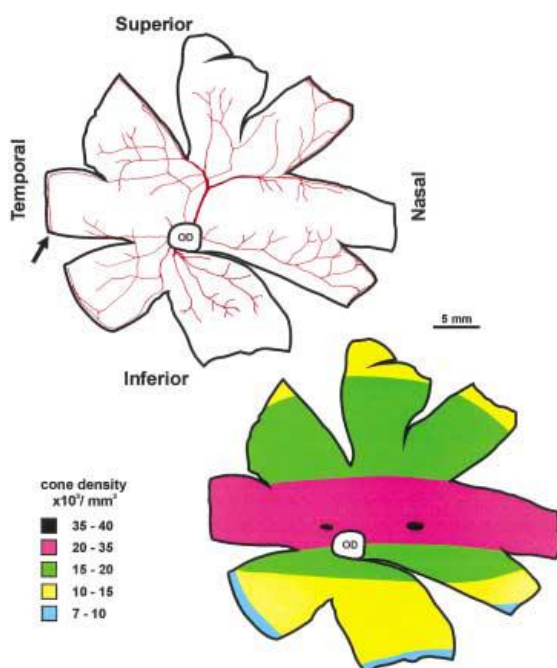


Figura 3: Distribución anatómica de la vascularización (imagen superior) y de la densidad de los conos/100mm<sup>2</sup> (imagen inferior) en la retina de cerdo (modificado de Hendrikson et.al) [121]. El *area centralis* (rosa) presenta la máxima densidad de conos (20,000-35,000/mm<sup>2</sup>) y ocupa un área central inmediatamente superior al nervio óptico, desde el borde nasal al temporal.

Además, el patrón de vascularización retiniana del cerdo es similar al humano, denominado holoangiótico, donde los vasos sanguíneos se extienden desde el disco óptico hasta la periferia,

ocupando toda la extensión retiniana, los axones de las células ganglionares no están mielinizados; la distribución de los fotorreceptores (conos y bastones) se aproxima mucho a la de los primates; y el cerdo al igual que el ser humano no posee *tapetum lucidum* [121, 122].

## 5. MATERIAL Y METODO

La ejecución de este trabajo fue autorizada por la Comisión de Investigación del IOBA con fecha 13/11/2012.

Para su desarrollo, se utilizaron 11 ojos de cerdos, entre 6 y 8 meses de edad, procedentes del matadero Justino Gutiérrez S.L. (Laguna de Duero, Valladolid, España). Los ojos se recogieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Paisley, Reino Unido), suplementado con 10% de antibióticos/antimicóticos (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomina y 2,5 µg/ml de Anfotericina B, Gibco®, Invitrogen, Paisley, UK), con el fin de reducir el riesgo de contaminación. Los ojos fueron trasladados refrigerados hasta el laboratorio de cultivos celulares del IOBA donde se procedió con el protocolo de extracción de los explantes de neuroretina y la preparación del cultivo. El tiempo transcurrido entre la muerte del animal/enucleación de los ojos hasta su procesamiento en el laboratorio se limitó a un máximo de 2 horas, con el fin de reducir la degeneración precoz de las células retinianas por falta de soporte nutricional tras la muerte del animal.

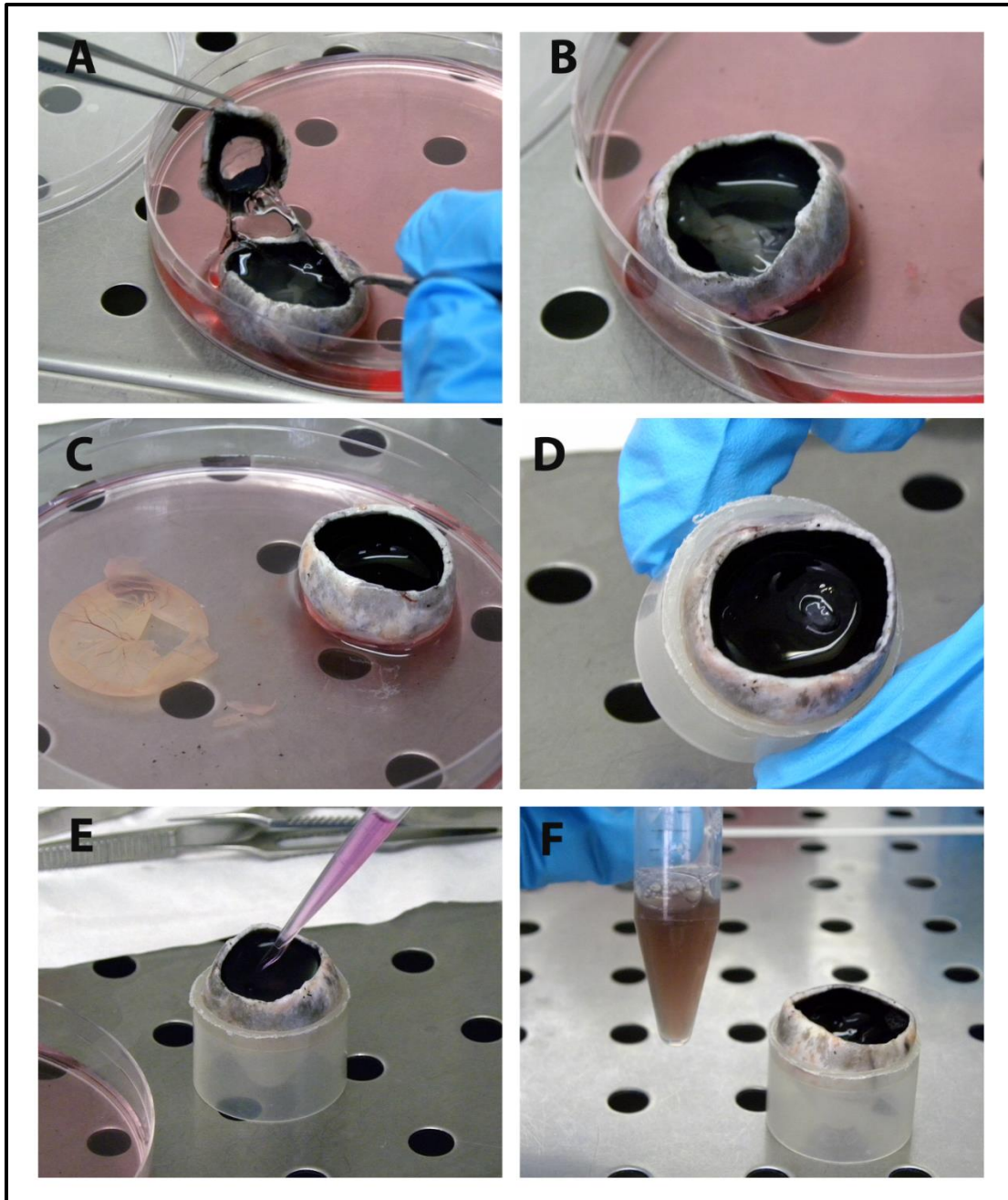
## 5.1 PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA (EPR)

Para la realización de los experimentos planteados se obtuvieron células de cultivo primario de EPR aisladas de 4 ojos de cerdo procedentes del matadero local.

El protocolo para el aislamiento de las células del EPR que se empleó fue el siguiente:

- 1- Se colocó el globo ocular en una placa de Petri (90 mm; Corning, NY, EE. UU.) con Betadine® (MEDA Pharma S.A., Madrid, España) y se limpiaron los restos de tejidos extraoculares (parpados, conjuntiva, capsula de Tenon, músculos y grasa orbitaria).
- 2- Bajo una campana de flujo laminar (Faster-BHN, 2004, Cultek, Madrid, España) se lavó cada globo ocular en Betadine® (2 minutos), etanol 70% (2 minutos) y DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico (3 lavados de 5 minutos).
- 3- Se colocó el globo ocular en una placa de Petri con medio DMEM suplementado con un 10% de antibiótico/antimicótico y se perforó el globo ocular con una aguja estéril de 22G, a través de la esclera y a la altura de la *ora serrata*, para realizar un ojal por el que poder introducir unas tijeras corneales que permitan hacer la disección del globo ocular en segmento anterior y posterior (Figura 4-A).
- 4- Se retiró por tracción el segmento anterior y se arrastró con él al vítreo. En algunos casos fue necesario ayudarse con un bastoncillo de algodón estéril para eliminar los restos de vítreo fuertemente adheridos a la retina periférica;

- 5- Se realizó un desprendimiento mecánico de la retina neural con la ayuda de un pincel y se realizó un corte a la altura del nervio óptico para retirar por completo la retina ( Fig. 4 C-D). En algunos casos la retina se desprendió parcialmente del EPR durante el proceso de separación vítrea ( Fig. 4-B).
- 6- Se colocó el segmento posterior, una vez limpio de restos vítreos y retinianos, en otra placa de Petri con medio DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico limpios.
- 7- Se añadieron 3 ml de Tripsina-EDTA 0,05 % (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) al segmento posterior y se incubaron a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos, para desprender las células del EPR de la membrana de Bruch (Fig. 4-E).
- 8- Se recogieron las células del EPR en un tubo de 15 ml ( Fig. 4-F) y se re-suspendieron en 5 ml de medio DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico y 10% de suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*-FBS) (Gibco®, Invitrogen, Paisley, Reino Unido), para interrumpir la acción de la tripsina.
- 9- Se centrifugaron las células a 1000 r.p.m (Allegra®X-22 Centrifuge, Beckam Coulter, Brea, CA, EE.UU.) durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se re-suspendieron las células en 10 ml de medio DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico y 10% de FBS. Se sembraron las células en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en cultivo a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.



*Figura 4: Extracción de las células del epitelio pigmentario de la retina de cerdo (EPR). Se retira por tracción el segmento anterior y se arrastra con él al vítreo (A); Se realiza un desprendimiento mecánico de la retina neural con la ayuda de un pincel y se realiza un corte a la altura del nervio óptico para retirar por completo la retina (C, D). En algunos casos la retina se desprendió parcialmente del EPR durante el proceso de separación vítreo (B); Se añaden 3 ml de Tripsina-EDTA 0,05% (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) al segmento posterior y se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos, para desprender las células del EPR de la membrana de Bruch (E); Se recogen las células del EPR en un tubo de 15 ml (F).*

El medio de cultivo se recambió cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron la confluencia, momento en el que se realizó una tripsinización y se sub-cultivaron las células en un ratio 1:5 y en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> (Pase 0).

El Protocolo de tripsinización empleado fue el siguiente:

- 1- Se añadieron 2 ml de tripsina-EDTA 0,05% al frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y se incubó a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 minutos;
- 2- Cuando el proceso de tripsinización consiguió despegar las células de la base del frasco de cultivo (se observan las células flotando en el medio de cultivo), se procedió a su contaje y a determinar su viabilidad mediante el empleo del ensayo del Tripán Azul (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en una cámara de Neubauer;
- 3- Posteriormente, se centrifugaron las células a 1000 r.p.m, se re-suspendieron y se sembraron 1x10<sup>6</sup> células en un frasco de 75 cm<sup>2</sup> (ratio 1:5) en medio DMEM suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico y 10% de FBS (15 ml de medio) y se mantuvo en incubadora a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Se renovó el medio (DMEM suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico y 10% de FBS) cada 2-3 días. Las células remanentes se congelaron utilizando un medio de congelación compuesto por un 70% de DMEM suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico, 20% de FBS y 10% de DMSO, a una concentración de 1x10<sup>6</sup> células/ml (Pase 0). Alcanzada la confluencia del cultivo, se sub-cultivaron las células en un ratio 1:5 (Pase 1). Para la tripsinización, contaje celular y sub-cultivo se repitió el protocolo anteriormente descrito.

Para el cocultivo con explantes retinianos se sembraron 30.000 células/cm<sup>2</sup> (P2) en placas de cultivo Transwell® y se mantuvieron en incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas antes del inicio del cocultivo con las neurorretinas.

## 5.2 PREPARACIÓN DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINA PORCINA

Se aislaron 12 explantes de neurorretina, a partir de 6 ojos de cerdo, procedentes de la región del *área centralis*, de modo que se obtuvieron 2 explantes (control y experimento) de cada ojo .

El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Se repitieron los pasos 1 a 4 descritos en el protocolo para la preparación de las células del EPR (Fig. 6 A-B);
2. Se colocó el segmento posterior en una placa de Petri con medio DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico limpios;
3. Se realizó un desprendimiento mecánico de la retina neural con la ayuda de un pincel y mediante el paso de medio de cultivo DMEM entre la neurorretina y el EPR, de modo que se redujeran los tiempos de manipulación retiniana y el posible daño mecánico resultante de la manipulación directa de la retina. En algunos casos la retina se desprendió parcialmente del EPR durante el proceso de separación vítrea (Fig. 6, C-D);
4. Se identificó el *área centralis* y se recortaron dos explantes cuadrados y adyacentes (5x5mm) aproximadamente 1 mm por encima del nervio óptico (Fig. 5, Fig. 6-E), evitando la presencia de vasos visibles y de bordes irregulares. Para ello, se emplearon unas tijeras de Vannas (John Weiss International, Milton Keynes, Reino Unido) unos pinceles y una espátula metálica de bordes romos (4x4 mm).
5. Se colocaron los explantes sobre la espátula metálica (Fig. 6-F), con ayuda de unos pinceles, y se depositaron sobre la membrana de los pocillos de las placas de cultivo Transwell® (Pore polycarbonate membrane insert, 0.4 µm de poro, 24 mm de diámetro; Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.) (Fig. 6-G), de modo que los fotorreceptores quedaran en contacto con ésta y que

no se formaran pliegues en los explantes, con el objetivo de conseguir un contacto apropiado con la membrana.

6. Tres de los seis pocillos de las placas Transwell<sup>®</sup> se definieron como experimento ( Fig. 6-H) y en ellos se sembraron células del EPR y se depositaron 1,6 mL de medio de cultivo el día anterior a la obtención de los explantes retinianos. Los otros 3 pocillos se definieron como controles y se depositaron en ellos 1,6 mL de medio de cultivo. Este volumen predeterminado de medio permite su contacto con la membrana del pocillo pero sin sobrepasarla, lo que a su vez, permite que la retina se adhiera perfectamente a la membrana del pocillo, evitando que flote sobre el medio. Como medio de cultivo se utilizó una dilución 1:1 de medio DMEM (suplementado con 1% de Antibiótico/Antimicótico y 10% de FBS) y de medio Neurobasal A (suplementado con 10% de FBS, 1% de Antibiótico/Antimicótico, 1% de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y 2% de B-27 (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Paisley, Reino Unido).

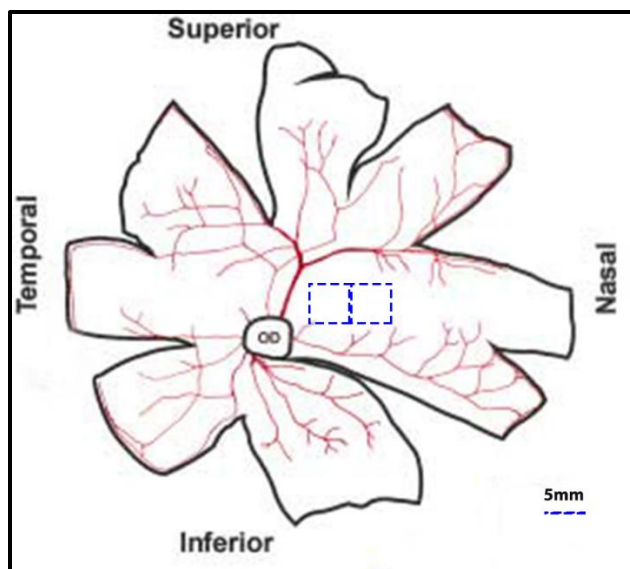


Figura 5: Para la preparación de los explantes de retina neural se obtuvieron dos cuadrados de tejido (5x5 mm) adyacentes del area centralis de cada ojo y superiormente al nervio óptico, se evitó que los explantes tuvieran vasos visibles y bordes irregulares. Modificado de Hendrickson et al. (2002) [121]



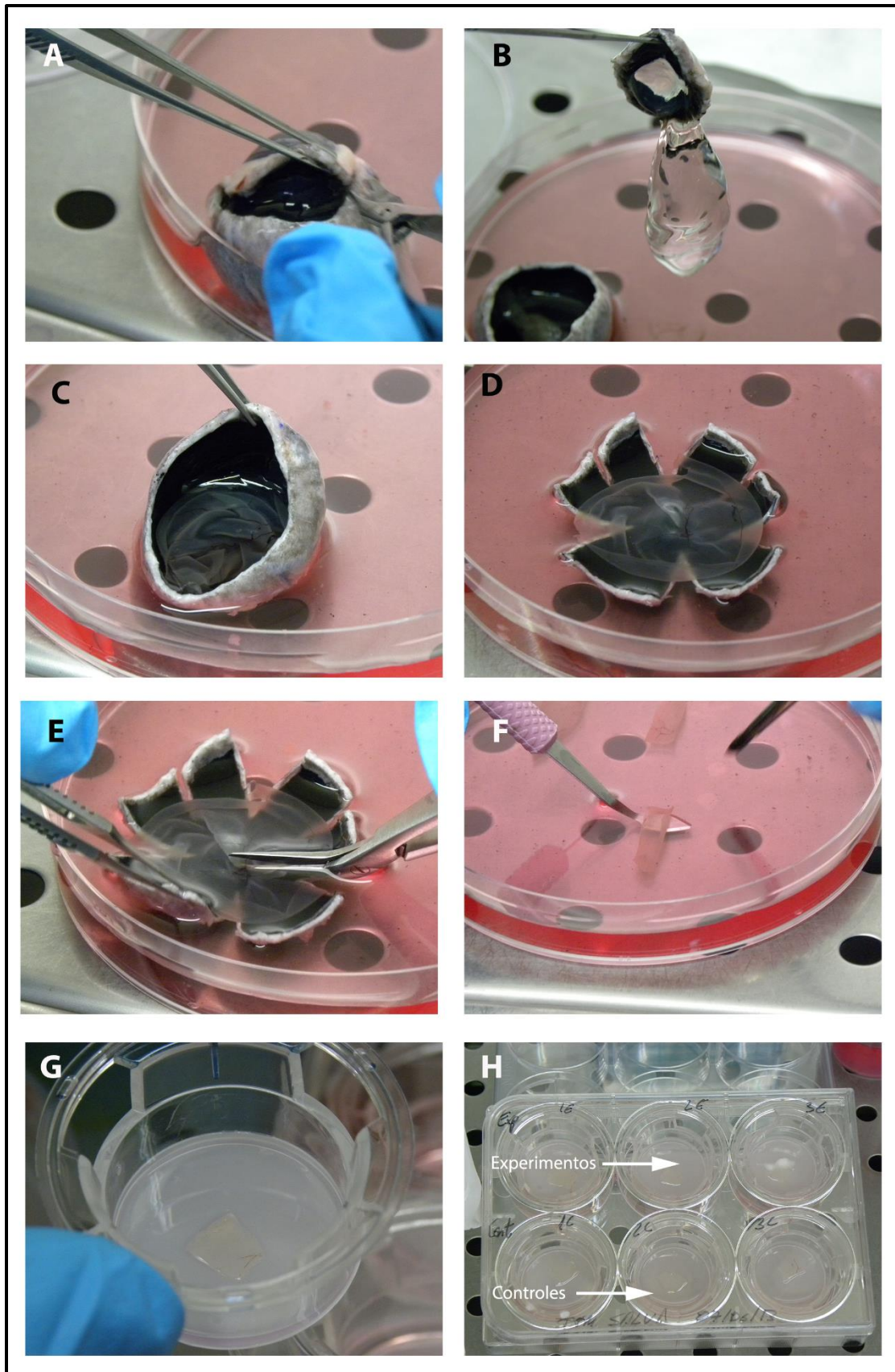


Figura 6: Protocolo de preparación de los explantes de neuroretina porcina. A) separación del segmento anterior del posterior; B) separación del vítreo; C) en algunos casos el proceso de separación del vítreo se acompaña de la completa separación de la neuroretina del EPR; D) detalle de la retina completamente desprendida; E) identificación del área centralis y corte de los explantes de neuroretina; F) los explantes se recogen con el ayuda de un pincel y de una espátula de metal para colocarlos sobre la membrana de los pocillos Transwell®; G) detalle de un explante de neuroretina colocado sobre la membrana de un pocillo Transwell®; H) placa de cultivo, se puede observar la distribución de cultivos experimento y control.

Las placas de cultivo se mantuvieron en una incubadora a 37°C con una atmósfera enriquecida al 5% de CO<sub>2</sub> a lo largo de los 9 días de duración del cultivo. El medio se renovó diariamente hasta la conclusión del experimento, añadiendo siempre 1.6 mL de medio recién elaborado y atemperado.

El medio de cultivo retirado en los días 1, 3, 5, 7 y 9 se recogió en tubos de 1,5 ml (Eppendorf, Corning, NY, EE. UU.) y se guardó en congelación a -80°C para poder evaluar, en experimentos futuros, la posible presencia de factores de crecimiento secretados por las células del EPR durante el cultivo, para ello se emplearán técnicas de ELISA semi-cuantitativo tipo sándwich.

Paralelamente se prepararon dos explantes, ambos procedentes del área centralis de un mismo ojo, que fueron directamente procesados para su análisis morfológico, de modo que se utilizaron como controles (a tiempo 0) para evaluar el estado de las neuroretinas previamente a la iniciación del cultivo.

## 5.3 PROCESAMIENTOS

A la finalización del cultivo, todos los explantes, control y experimento, fueron cortados en dos partes, de modo que una mitad fue incluida en epoxi-resina y evaluada mediante tinción con azul de toluidina, mientras que la otra fue procesada para crio-preservación y posterior evaluación mediante técnicas de inmunohistoquímica. En el caso de los explantes a tiempo 0, uno de ellos fue incluido en epoxi-resina, y el otro fue procesado para crio-preservación.

### 5.3.1 INCLUSIÓN EN EPOXI-RESINA (ARALDITA)

1. Se fijaron las muestras en paraformaldeido (PF; PANREAC Química S.A.U., Barcelona, España) al 4% en PB (Phosphate Buffer, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), durante un máximo de 2 horas;

2. Se lavaron las muestras en PB: tampón fosfato y se realizó una deshidratación en alcoholes crecientes:

- Etanol (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EE.UU) al 50% durante 10 minutos;
- Etanol al 75% durante 10 minutos;
- Etanol al 90% durante 10 minutos;
- Etanol al 96% durante 10 minutos;
- Etanol al 100% durante 10 minutos (2 veces);
- Óxido de Propileno (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EE.UU) durante 10 minutos;

3. Se realizó la impregnación en epoxi-resina (araldita; TAAB, Berks, Reino Unido):

- Óxido de Propileno/Araldita (3/1) durante 1 hora;
- Óxido de Propileno/Araldita (1/1) durante 1 hora;
- Óxido de Propileno/Araldita (1/3) durante 12 horas;
- Araldita a 60°C durante 30 minutos;

4. Se incluyeron las muestras en moldes y se dejó polimerizar la resina a 60°C durante 24 horas;

5. Se cortaron las muestras con ultramicrotomo (Ultratome III 8800; LKB, Bromma, Suecia) y se recogieron en portaobjetos tratados con (3-Aminopropyl) triethoxy-silane (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EE.UU.). Se conservaron a temperatura ambiente hasta la tinción de los cortes.

### 5.3.2 CRIOPRESERVACIÓN

Se fijaron y crio-preservaron las muestras neuroretinianas de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Se retiraron los pocillos de cultivo con la membrana porosa, a la cual estaba adherido el explante de neuroretina, y se recortó la membrana delimitando el explante;
2. Se introdujo el complejo explante-membrana en una placa de Petri de 35mm (Nunc, Rochester, NY, EE: UU.) con paraformaldeido al 4% (PF; PANREAC Química S.A.U., Barcelona, España) durante 2 horas a 4°C;
3. Se retiró el PF, se lavó la placa 2 veces con 2 ml de PBS y se añadió sacarosa al 15% (PANREAC Química S.A.U., Barcelona, España) durante 2 horas a 4°C;
4. Se retiró la sacarosa al 15% y se añadió sacarosa al 20% durante 2 horas a 4°C;
5. Se retiró la sacarosa al 20% y se añadió sacarosa al 30% durante un mínimo de 12 horas a 4°C;
6. Se congelaron las muestras retinianas a -80°C en Tissue-Tek® (O.C.T.™ Compound; Sakura Finetek Europe B.V., Alphen, Holanda), evitando la formación de burbujas y de pliegues en la retina;
7. Se guardaron las muestras en un ultra congelador a -80°C hasta su corte en criostato (CM 1900; Leica, Nussloch, Alemania);
8. Se realizaron secciones de 5 µm recogidas en portaobjetos comerciales tratados (SuperFrost® Plus; Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania) y se conservaron a -20°C hasta la realización de las técnicas de inmunohistoquímica.

### 5.3.3 TINCIONES

#### Azul de Toluidina

1. Se tiñeron los cortes incluidos en epoxi-resina con una gota de Azul de Toluidina (solución 1%; PANREAC Química S.A.U.) durante 5 minutos a 60°C.
2. Se lavaron en destilada y se dejaron secar a 60°C.
3. Se montaron con Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemania).

## 5.4 TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

### 5.4.1 PROTOCOLO PARA GFAP/CRALBP

Para el estudio de las modificaciones de las células de Müller se evaluó la proteína GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), presente en los filamentos intermedios de las células gliales retinianas (astrocitos y células de Müller) e implicada en los procesos de gliosis reactiva [123-126]; y la proteína CRALBP (Cellular Retinaldehyde-Binding Protein), presente en el citoplasma de las células de Müller e implicada en el metabolismo de la vitamina A [127, 128]. De modo que un doble marcaje para ambas proteínas, mediante el empleo de anticuerpos anti-GFAP y anti-CRALBP, permite diferenciar las células de Müller (GFAP+/CRALBP+) de los astrocitos, (GFAP-/CRALBP+) [128, 129].

Se siguió el siguiente protocolo:

1. Se atemperaron los cortes retinianos durante 10 minutos a temperatura ambiente
2. Se lavaron en agua destilada durante 30 minutos, para eliminar los restos de Tissue-Tek® (O.C.T.™ Compound; Sakura Finetek Europe B.V., Alphen, Holanda).

3. Se secaron los portas, se enmarcaron los cortes rodeándolos con una sustancia hidrófoba (Liquid Bloquer Super Pap Pen; Daido Sangyo Co. Ltd., Tokio, Japón) y se colocaron en una cámara húmeda.
4. Se incubaron los cortes durante 2h a temperatura ambiente en PBS + 0.1% de Triton X-100 + 5% de suero de cabra (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EE.UU.) en cámara húmeda.
5. Se incubó el anticuerpo primario anti-GFAP (1:500, polyclonal rabbit anti-cow GFAP; DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, EE.UU.), diluyendo el anticuerpo en PBS + 0.1% de Triton X-100 + 5% de suero de cabra, a temperatura ambiente durante 30 minutos.
6. Se lavaron las muestras 3 veces con PBS+ 0.1% Triton X-100 durante 15 minutos.
7. Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario anti-CRALBP (1:1000, monoclonal mouse anti-human CRALBP; Abcam plc., Cambridge, UK), diluyendo el anticuerpo en PBS + 0.1% de Triton X-100 + 5% de suero de cabra, a 4°C durante toda la noche en una cámara húmeda.
8. Se lavaron los portas con PBS (3 lavados de 5 minutos).
9. Se incubaron los anticuerpos secundarios (1:200; Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse Ig-G + Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit Ig-G; Molecular Probes™, Eugene, EE.UU.) y durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad.
10. Se lavaron los portas con PBS en oscuridad (3 lavados de 5 minutos).
11. Se secaron los portas y se añadió DAPI (10 µg/mL, 4',6-diamino-2-phenilindole dihydrochloride; Molecular Probes™) que se incubó 5 minutos en oscuridad.
12. Se lavaron los portas con PBS en oscuridad (3 lavados de 5 minutos).
13. Se montaron los portas con un medio específico para muestras de inmunofluorescencia (Fluorescent Mounting Medium, Dako Cytomation Inc.).

### 5.4.1 PROTOCOLO PARA CALBINDINA/SINAPTOFISINA

Para el estudio de las modificaciones de las neuronas retinianas, se utilizaron anticuerpos frente a calbindina, proteína de 28 kDa conocida también como proteína ligada al calcio vitamina-D dependiente o colecalcina [130], forma parte de la súper-familia de la troponinaC y en la retina se presenta a nivel de los conos y de las células horizontales [32]; y frente a sinaptofisina, proteína que se encuentra en las vesículas pre-sinápticas de las neuronas del sistema nervioso central y de la retina [130], y que permite identificar las capas plexiformes y en particular las sinapsis de los conos con las células bipolares y con las horizontales [32].

Se siguieron los pasos 1, 2, 3, 4 y 5 previamente descritos en el protocolo de inmunohistoquímica para GFAP/CRALBP.

1. Se incubó el anticuerpo primario anti-Calbindina (1:500, Rabbit polyclonal, Swant, #CB-38<sup>a</sup>, Bellinzona, Suiza) diluyendo el anticuerpo en PBS+ 0.1% de Triton X-100+ 5% de suero de cabra, a temperatura ambiente durante 60 minutos;
2. Se lavaron las muestras 3 veces con PBS+ 0.1% Triton X-100 durante 15 minutos;
3. Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario anti-Sinaptofisina (1:1000, Mouse Monoclonal Antibody, clone SY38, MAB5258, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) a 4°C durante toda la noche;
4. Se lavaron los portas con PBS (3 lavados de 5 minutos);
5. Se incubaron los anticuerpos secundarios (1:200; Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-mouse Ig-G + Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 goat anti-rabbit Ig-G; Molecular Probes<sup>™</sup>, Eugene, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad;
6. Se lavaron los portas con PBS en oscuridad (3 lavados de 5 minutos);

7. Se secaron los portas y se añadió DAPI (10 µg/mL, 4',6--diamino--2--phenilindole dihydrochloride; Molecular Probes™, Eugene, EE.UU.) que se incubó 5 minutos en oscuridad;
8. Se lavaron los portas con PBS en oscuridad (3 lavados de 5 minutos);
9. Se montaron los portas con Fluorescent Mounting Medium.

<b>Marcador molecular</b>	Tipo de anticuerpo	Dilución	Casa comercial
<b>GFAP</b>	Anticuerpo primario policlonal	1:500	DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, EE.UU.
<b>CRALBP</b>	Anticuerpo primario monoclonal	1:1000	Abcam, Cambridge, Reino Unido
<b>Calbindina D-28K</b>	Anticuerpo primario policlonal	1:500	Swant, Bellinzona, Suiza
<b>Sinaptofisina</b>	Anticuerpo primario monoclonal	1:1000	Millipore, Billerica, MA, EE.UU.

*Table 1: Tabla resumida de los anticuerpos primarios utilizados en los protocolos de inmunohistoquímica*

## 5.5 MICROSCOPIA

Para el estudio morfológico de las células de EPR se utilizó el microscopio de contraste de fase microscopio óptico Elipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón)

Para la detección de la emisión de fluorescencia de los anticuerpos secundarios se utilizó el microscopio DM4000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los estudios comparativos basados en la expresión de los marcadores inmunofluorescentes se llevaron a cabo en imágenes adquiridas con los mismos niveles de exposición, intensidad y ganancia. El brillo y el contraste de las imágenes fueron ajustados mediante el software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, San Jose, EE.UU.)



## 5.6 ANALISIS DEL ESPESOR RETINIANO

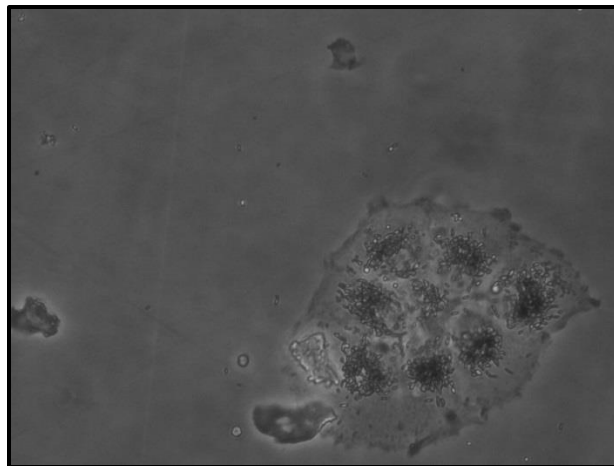
El espesor retiniano fue evaluado a partir de las imágenes obtenidas a una magnificación de 20x con el programa ImageJ (versión 1.47v, NIH Image, National Institute of Health, EE.UU), evaluando la distancia entre la OLM y la ILM. En el caso de las muestras de 0 días se tomaron tres medidas, una en la parte central y dos en la periferia, mientras que en los controles y en los experimentos cultivados 9 días, se realizó una medida en la parte central de cada roseta y dos a los extremos de éstas, ya que el perfil de la OLM resultó curvilíneo por la presencia de rosetas de degeneración. Los datos obtenidos de estas medidas fueron analizados con el software Microsoft Excel 2013® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE. UU.) y las comparaciones entre medias se realizaron mediante la prueba T de Student una vez comprobada la distribución normal de las muestras analizadas así como la similitud de sus varianzas, estableciéndose el límite significativo en un valor p menor de 0.05.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZACIÓN CITOLÓGICA DEL CULTIVO PRIMARIO DE EPR DE CERDO

Tras su obtención, las células de EPR fueron cultivadas y evaluadas a lo largo del cultivo, donde se observó como las células mantuvieron su morfología hexagonal y su contenido en pigmentos durante todo el cultivo hasta P2 y durante el cocultivo con explantes de neuroretina.

Las células aisladas comenzaron a originar islotes de células confluentes que conservaban el contenido en gránulos de pigmento y su forma hexagonal, el primer día tras el aislamiento (Figura 7).



*Figura 7: Imagen de epitelio pigmentario de la retina (EPR) en cultivo (día 1). Se observa un islote de células de EPR con gránulos intracelulares de pigmento. Imagen a 20x.*

Aproximadamente a los 4-5 días se observaron células de EPR adheridas a la superficie del frasco de cultivo y en división, formando islotes celulares de mayor tamaño, y conteniendo gránulos de pigmento en su interior (Figura 8).

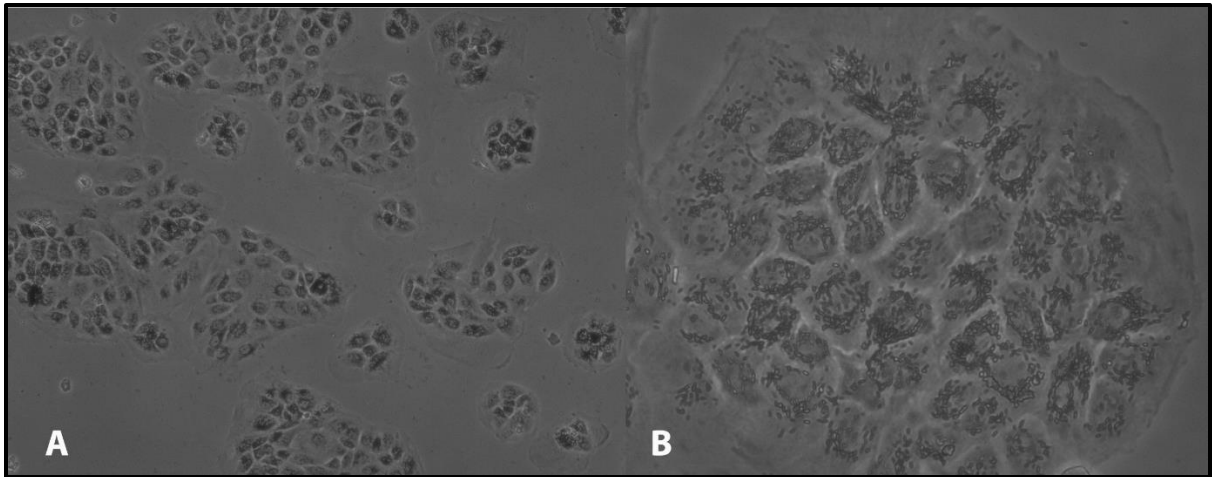


Figura 8: Imagen de EPR en cultivo (día 4) a 20x (A) y 40x (B). Las células se agrupan en islotes de mayor tamaño en comparación con el día 1 (Fig. 7).

Al finalizar la fase P0 las células presentaron una gran confluencia, con características de epitelio monoestratificado con una morfología conservada, sin embargo, también se observaron algunas células de mayor tamaño y con un menor número de gránulos intracelulares (Figura 9). Estas características celulares se mantuvieron hasta P2, fase en la que las células de EPR se plantaron en los pocillos Transwell® para su cocultivo con las neuroretinas. (Figura 9):

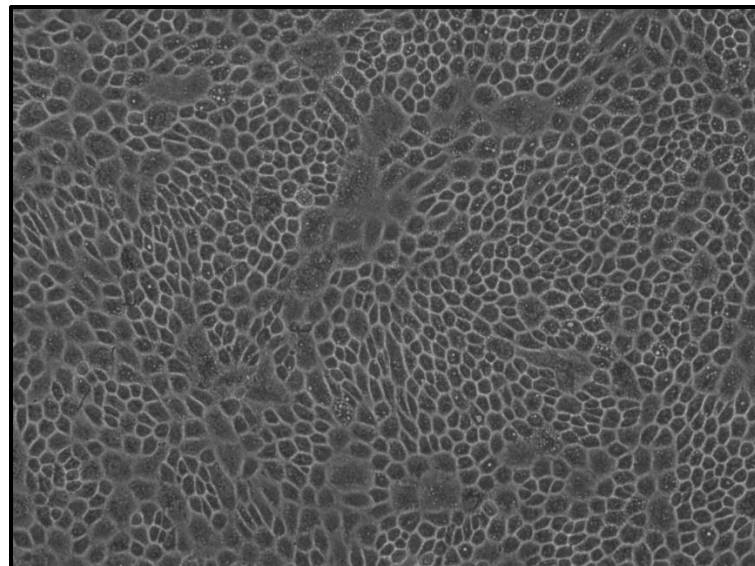


Figura 9: células de EPR densamente confluentes, Fase 0 (magnificación 10x)

A los 9 días de cocultivo de las células del EPR con las neuroretinas, estas células mantuvieron su morfología de epitelio confluyente mono-estratificado, hexagonal y con restos de pigmentos (Figura 10)

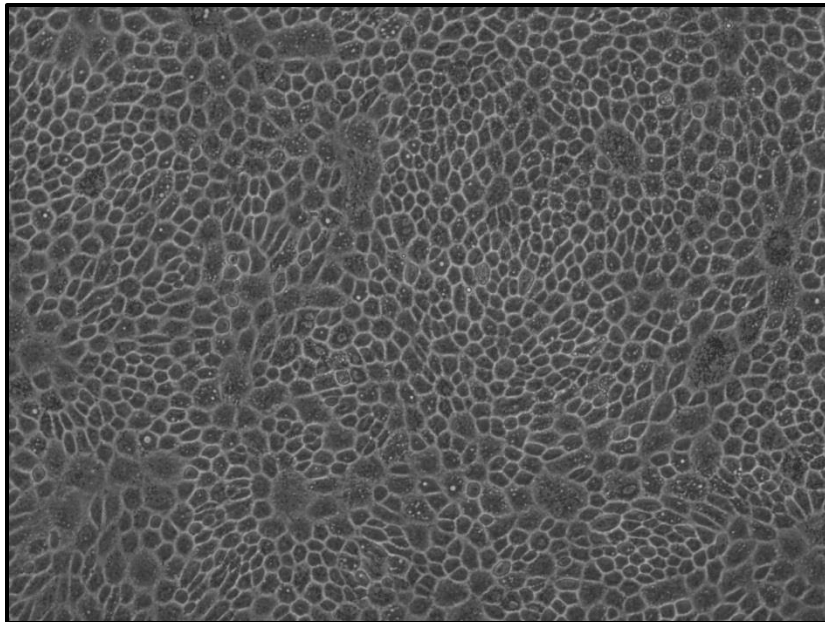


Figura 10: Imagen de epitelio pigmentario de la retina (EPR) a los 9 días de cultivo. Se observa un epitelio mono-estratificado confluyente de morfología conservada (magnificación 10x).

## 6.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

La tinción de las muestras con Azul de Toluidina permitió evaluar las modificaciones que sufrió la estructura tisular y celular retiniana durante el cultivo.

Las muestras frescas (0 días) de la retina porcina revelaron una adecuada preservación de la estructura retiniana (Figura 11 A, D, G) tras la preparación de los explantes y previamente al inicio del cultivo. Así, se observó cómo los segmentos externos (Figura 11 A, D: puntas de flecha) e internos de los fotorreceptores (*photoreceptor outer segments* – POS; *photoreceptor inner segments* - PIS) se presentaron adecuadamente conservados y se diferenciaron claramente las capas neuroretinianas (Figura 11 A), en particular la capa nuclear externa (*outer nuclear layer* – ONL), la capa plexiforme externa (*outer plexiform layer* – OPL), la capa nuclear interna (*inner nuclear layer* - INL), la capa plexiforme interna (*inner plexiform layer* - IPL) y la capa de las células ganglionares (*ganglion cells layer* – GCL). Por otra parte, permitió corroborar la gran similitud existente entre la retina neural de cerdo y la humana a nivel histológico.

Después de mantener los explantes en cultivo durante 9 días (controles), se observó una desestructuración de la arquitectura neuroretiniana (Figura 11 B), muy notable en las capas más externas. En el caso de los fotorreceptores, se apreció la pérdida de la mayor parte de los POS de los bastones, así como el acortamiento y la edematización de los POS (Figura 11 H: puntas de flecha) y PIS de los conos, mientras que la ONL apareció desorganizada y con formaciones características de un proceso de degeneración, denominadas rosetas; además, se apreció una vacuolización celular en todas las capas, particularmente evidente en la ONL y en la INL; una disminución del espesor total de la neuroretina, muy manifiesta en la OPL y en la IPL; y una hipertrofia de las células de Müller (Figura 11 E, H: flechas), que extienden sus prolongaciones celulares hasta ocupar la región correspondiente con el espacio subretiniano, dando lugar a la formación de membranas subretinianas (Figura 11 B, E: puntas de flecha).

En las muestras experimento (Figura 11 C, F, I), las capas externas conservaron en parte su arquitectura, ya que los fotorreceptores mantuvieron parcialmente su estructura, se observó un acortamiento y reducida edematización de los POS de los conos (Figura 11- I: puntas de flecha), sin embargo, la ONL se mostró relativamente bien organizada, sin que se apreciaran formaciones en roseta. Además, la OPL, la INL y la IPL conservaron gran parte su espesor y se observaron relativamente pocas células de Müller hipertróficas (Figura 11- I: flecha), lo que dio lugar a membranas subretinianas de espesor aparentemente reducido (Figura 11-C: puntas de flecha).

Por tanto, mientras en las muestras control (cultivo aislado de neuroretina) se observaron grandes rosetas de degeneración (Figura 11 B), en la ONL, con una amplia área central ocupada por los segmentos externos de los fotorreceptores degenerados, la arquitectura de las muestras experimento (cultivo de neuroretina con EPR) se conservó mejor durante el cultivo, ya que no se observaron verdaderas formaciones en rosetas (Figura 11 C). En las muestras experimento, los fotorreceptores conservaron en parte su estructura, presentando unos POS con menor vacuolización respecto a las muestras control, así como un mejor estado de la ONL y de la INL con menor grado de picnosis y mayor densidad nuclear. Además, en las muestras control fue posible identificar múltiples

células de Müller hipertrofiadas, que ocupaban todo el espesor retiniano y contenían numerosos gránulos intracelulares (Figura 11 H: flechas), y que además formaban membranas subretinianas de grosor notable. Sin embargo, en las muestras experimento no se apreciaron células de Müller de gran tamaño, se originaron membranas subretinianas de menor grosor y estas células contenían un pequeño número de gránulos intracelulares.

Por otro lado, el espesor de la INL, IPL y GCL fue mayor en las muestras experimento, así como su arquitectura mejor conservada, lo que conllevó a un mayor grosor medio de la neuroretina.

El análisis del espesor retiniano determinó que las muestras de retina de cerdo frescas midieron  $135,29 \pm 17,01 \mu\text{m}$ , mientras que el espesor de los controles y de los experimentos a los 9 días de cultivo fue de  $92,28 \pm 14,94 \mu\text{m}$  y  $109,35 \pm 4,24 \mu\text{m}$ , respectivamente (Grafico 1), siendo las diferencias entre controles y experimentos estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

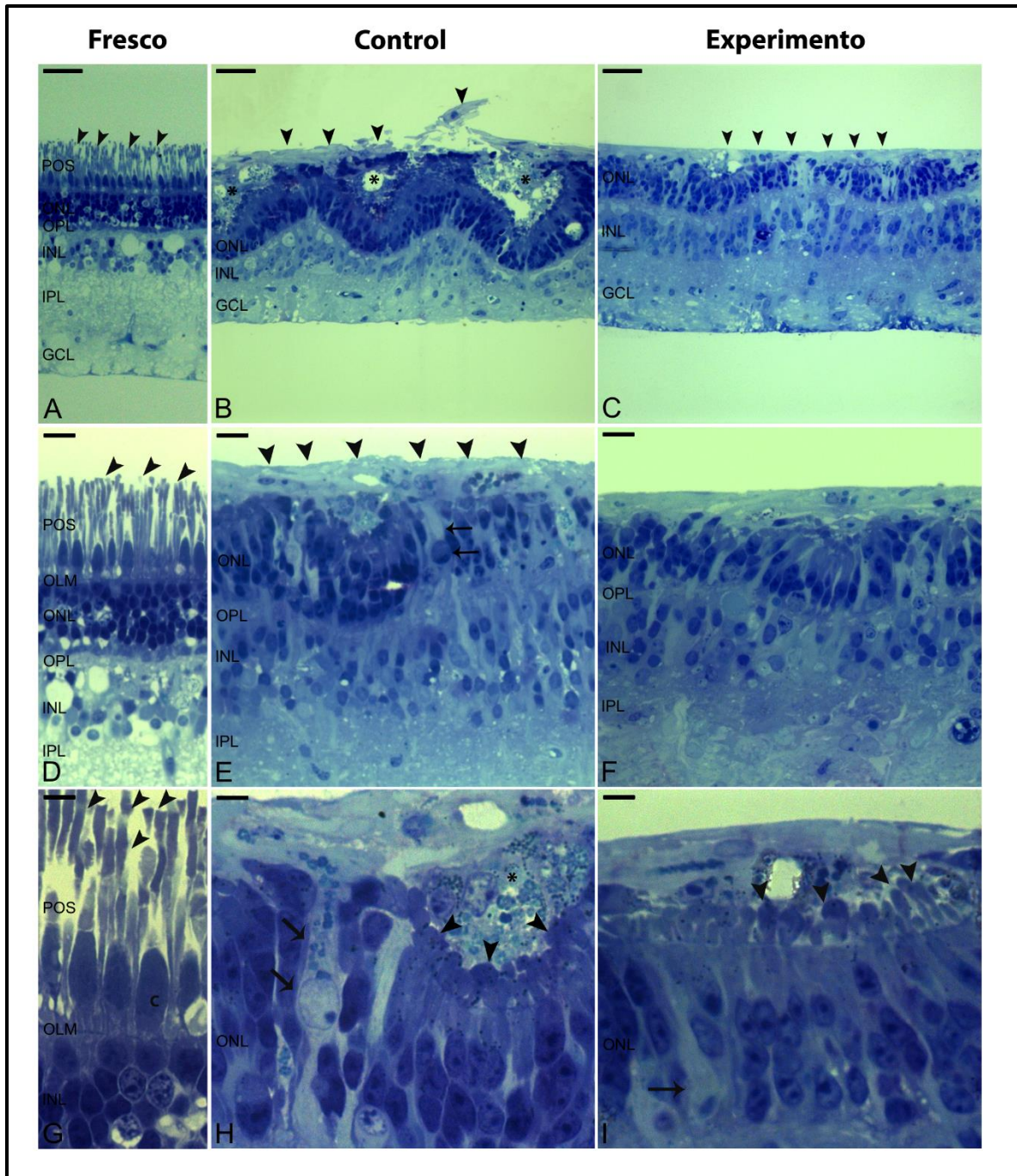


Figura 11: Explantes retinianos teñidos con Azul de Toluidina. Las muestras frescas (0 días) mostraron una arquitectura retiniana adecuadamente conservada previamente al inicio del cultivo (A), especialmente en las capas más externas donde se preservan las frágiles estructuras de los segmentos externos de los fotorreceptores (A, D, G: puntas de flecha;) y la morfología de los conos en detalle (G: "C"). En las muestras control (cultivo organotípico de neuroretina de cerdo; 9 días) (B, E, H) se pueden observar extensas formaciones en roseta, que junto con la formación de membranas subretinianas de gran espesor (B, E: puntas de flecha), alteran la arquitectura retiniana y se acompañan de una evidente disminución del espesor retiniano (B). Las rosetas presentan un marcado perfil curvilíneo y englobando abundantes restos celulares (B, H puntas de flecha), que se corresponderían a los segmentos externos de los fotorreceptores degenerados (B, H: "\*"). Los fotorreceptores presentes poseen segmentos externos muy acortados y vacuolizados (H, puntas de flecha) y en la capa nuclear externa (ONL) se observan núcleos picnóticos (H). Además, se pueden observar numerosas células de Müller hipertróficas y con abundantes gránulos intracelulares (E, H: flechas), a partir de las cuales se originan membranas subretinianas (B, E: puntas de flecha). En las muestras experimento (cultivo organotípico de neuroretina de cerdo con EPR; 9 días) (C, F, I) la arquitectura retiniana aparece mejor conservada ya que no se observan formaciones en roseta, los segmentos externos de los fotorreceptores se muestran mejor conservados (I, puntas de flecha), las membranas subretinianas tienen aparentemente menor grosor (C, puntas de flecha), las células de Müller muestran menor hipertrofia (I, flecha) y aparece una mayor densidad nuclear en la capa nuclear externa. POS (photoreceptors outer segment – segmentos externos de los fotorreceptores); ONL (outer nuclear layer-capla nuclear externa); OPL (outer plexiform layer-capla plexiforme externa); INL (inner nuclear layer-capla nuclear interna); IPL (inner plexiform layer-capla plexiforme interna); GCL (ganglionar cells layer-capla de las células ganglionares). Barra de escala: 20  $\mu$ m. Magnificación 40x.

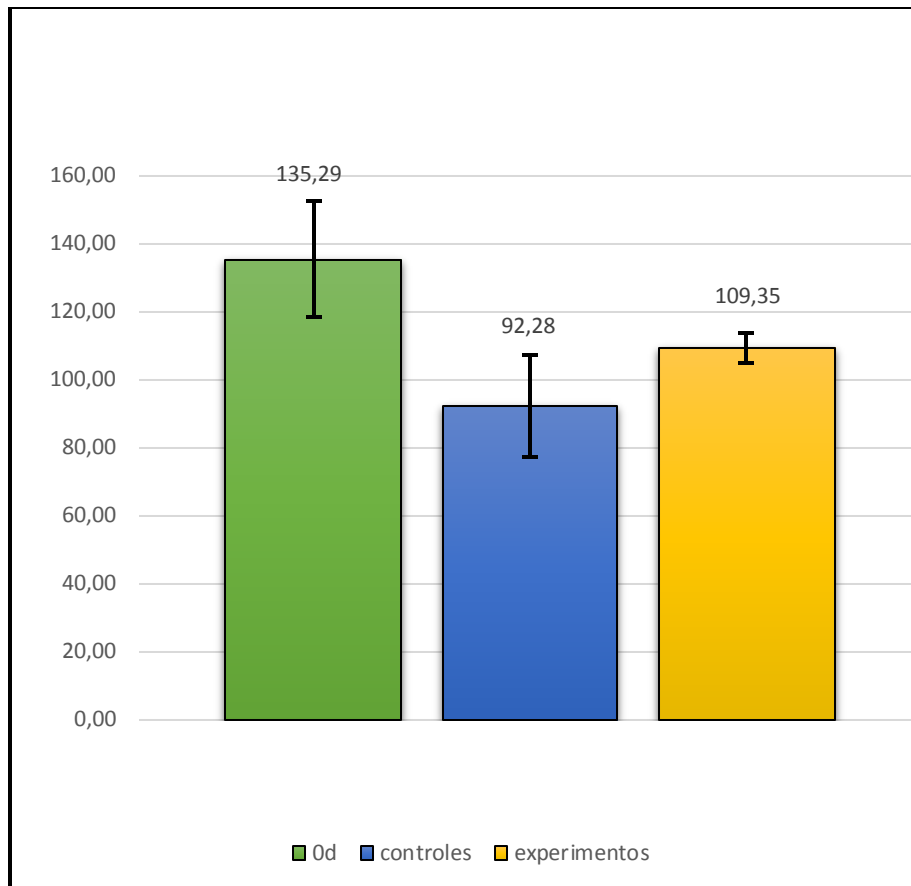


Grafico 1: Análisis del espesor retiniano. Se tomaron las medidas de las neurorretinas entre la membrana limitante externa (OLM) y la membrana limitante interna (ILM) por medio del programa ImageJ. El espesor medio de las muestras frescas (0 días) fue de 135,29  $\mu\text{m}$  (DE  $\pm 17,01 \mu\text{m}$ ), mientras los controles y los experimentos midieron 92,28  $\mu\text{m}$  (DE  $\pm 14,94 \mu\text{m}$ ) y 109,35  $\mu\text{m}$  (DE  $\pm 4,24 \mu\text{m}$ ), respectivamente

## 6.3 EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

### 6.3.1 CÉLULAS GLIALES (CÉLULAS DE MÜLLER Y ASTROCITOS)

En las muestras de neurorretina de cerdo frescas (0 días) (Figura 12, A-D) se observó la expresión de la proteína GFAP en las capas retinianas más internas, lo que identifica a células de Müller y astrocitos, mientras que la CRALBP se detectó desde la membrana limitante interna (*inner limiting membrane* – ILM) hasta la membrana limitante externa (*outer limiting membrane* – OLM) (Figura 12 A, D: puntas de flecha), lo que corresponde al citoplasma de las células de Müller, siendo más manifiesta en las capas externas (Figura 12 A, B, D). Las capas nucleares (INL y ONL) se apreciaron intensamente teñidas con DAPI, con una organización y localización adecuada en el parénquima retiniano (Figura 12 C, D).



En las muestras control de 9 días (Figura 12 E-H) se observó una marcada disminución en la expresión del CRALBP y un aumento de la proteína GFAP (Figura 12 E, F, H), que se extendió a lo largo del tejido retiniano y superó el límite de la OLM, dando lugar a la formación de membranas subretinianas. La ONL se desorganizó, formando estructuras en roseta (Figura 12 G, H), de acuerdo con los hallazgos histológicos. Además, se observó, de forma subjetiva, un menor número de núcleos en la ONL, en la INL y en la GCL, mientras que aparecieron numerosos núcleos en la porción más externa de la retina, región correspondiente al espacio subretiniano, englobados por las membranas subretinianas GFAP+ (Figura 12 G, H).

En el caso de los explantes experimento a los de 9 días de cultivo (Figura 12 I, L) se observó la expresión de GFAP en el parénquima retiniano, en menor nivel que en los cultivos control, y se conservó ligeramente la de CRALBP (Figura 12 I, J, L). Por otra parte, se conserva la estructuración de las capas nucleares y de la GCL, mostrando un mayor número de núcleos que en los explantes control cultivados y por tanto, no se aprecia la formación de rosetas en la ONL (Figura 12 K, L).

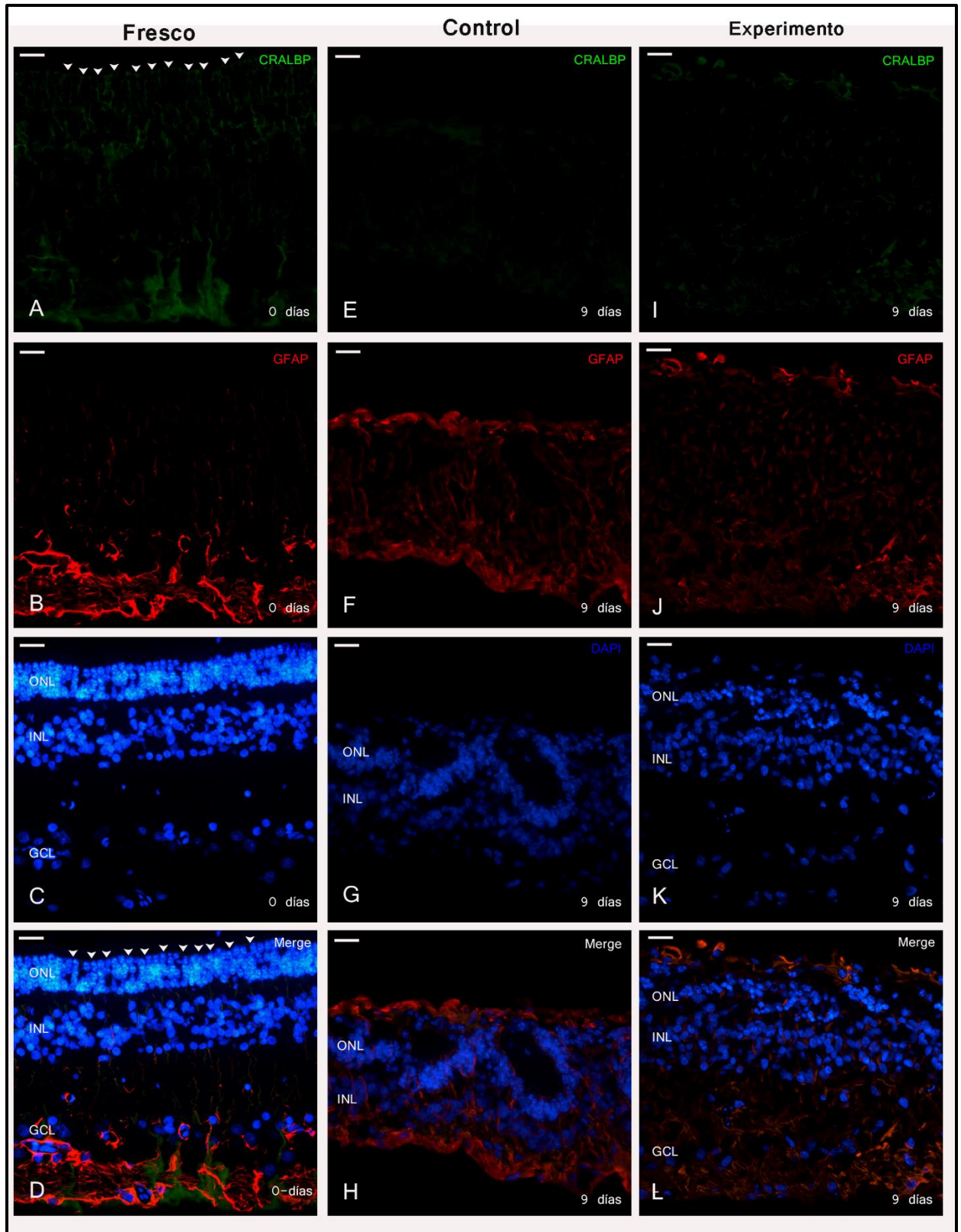


Figura 12: Evaluación inmunohistoquímica de las células gliales (células de Müller y astrocitos) con anticuerpos anti-GFAP/anti-CRALBP. A-D) Muestras de 0 días: se observó la expresión de la proteína GFAP en las capas retinianas más internas, lo que identifica a células de Müller y astrocitos, mientras que la CRALBP se detectó desde la membrana limitante interna (inner limiting membrane – ILM) hasta la membrana limitante externa (outer limiting membrane – OLM) (A, D puntas de flecha), lo que corresponde al citoplasma de las células de Müller, siendo más manifiesta en las capas externas (A, B, D). Las capas nucleares (INL y ONL) se apreciaron intensamente teñidas con DAPI, con una organización y localización adecuada en el parénquima retiniano (C, D); E-H) Muestras control (cultivo organotípico de neuroretina porcina) de 9

días: En las muestras control de 9 días (E-H) se observó una marcada disminución en la expresión del CRALBP y un aumento de la proteína GFAP (E, F, H), que se extendió a lo largo del tejido retiniano y superó el límite de la OLM, dando lugar a la formación de membranas subretinianas. La ONL se desorganizó, formando estructuras en roseta (G, H), de acuerdo con los hallazgos histológicos. Además, se observó, de forma subjetiva, un menor número de núcleos en la ONL, en la INL y en la GCL, mientras que aparecieron numerosos núcleos en la porción más externa de la retina, región correspondiente al espacio subretiniano, englobados por las membranas subretinianas GFAP+ (G, H); I-L) Muestras experimento (cultivo organotípico de neuroretina decerdo con EPR) de 9 días: se observó la expresión de GFAP en el parénquima retiniano, en menor nivel que en los cultivos control, y se conservó ligeramente la de CRALBP (I, J, L). Por otra parte, se conserva la estructuración de las capas nucleares y de la GCL, mostrando un mayor número de núcleos que en los explantes control cultivados y por tanto, no se aprecia la formación de rosetas en la ONL (K, L). Barra de escala: 20 µm. Magnificación: 40x. Abreviaciones: ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglionar cells layer; GFAP: glial fibrillary acidic protein; CRALBP: cellular retinaldehyde-binding protein; EPR: epitelio pigmentario de la retina.

### 6.3.2 NEURONAS RETINIANAS (CONOS, HORIZONTALES, BIPOLARES Y GANGLIONARES) Y CONEXIONES SINÁPTICAS (OPL E IPL)

En las muestras frescas (0d) (Figura 13 A-D) se observó la expresión de calbindina (Figura 13 B, D; Figura 14) a nivel de los conos, lo que permite evaluar el adecuado estado de sus segmentos externos (POS) (Figura 13 B, puntas de flecha; Figura 14: flechas), segmentos internos (PIS) (Figura 14: puntas de flecha) y pedículos; a nivel de la ONL, donde se reveló una intensa expresión en el cuerpo y las extensiones dendríticas de las células horizontales (Figura 13 B, D, Figura 14: "H");, además de marcar varias células bipolares (Figura 13 B, D, Figura 14: "B"); y células ganglionares (Figura 13 B, D: "G"). Por otra parte, se observó sinaptofisina (Figura 13 A, D) en la OPL, a nivel de las uniones sinápticas entre los fotorreceptores y las interneuronas, y en la IPL, a nivel de las uniones sinápticas entre las interneuronas y las células ganglionares.

En las muestras control, a los 9 días de cultivo (Figura 13 E-H), se observó una considerable disminución en la expresión de calbindina (Figura 13 F, H), restringiéndose a células dentro de las rosetas (Figura 13 F: puntas de flecha), donde se identifican conos con el segmento externo vacuolizado (Figura 15 A: puntas de flecha) y de tamaño muy reducido. No se apreciaron células horizontales, bipolares y/o ganglionares positivas al marcaje con anticuerpo anti-calbindina. De la misma manera, la expresión de sinaptofisina (Figura 13 E, H) se mostró notablemente reducida, hasta el punto de ser

prácticamente indetectable en las capas plexiformes (OPL e IPL), mientras que se pudo detectar de forma ectópica a nivel de los segmentos internos (PIS) de los conos (Figura 13-H y

Figura 15-A: flechas).

En las muestras experimento (9 días) (Figura 13I-L; Figura 15-B) se observó el marcaje con anticuerpos anti-calbindina (Figura 13J, L) de los conos, que presentaron una morfología degenerada, pero donde todavía fue posible distinguir los segmentos internos (PIS) edematizados y los pedículos (Figura 15-B: puntas de flecha), mientras que los segmentos externos (POS), muy degenerados, eran difíciles de identificar (Figura 13J, L: puntas de flecha; Figura 15-B: flechas); se conservó el intenso marcaje de las células horizontales (Figura 13J, L: "H") y, en menor medida, de las células bipolares (Figura 13J, L: "B"), y de algunas células ganglionares (Figura 13J, L: "G"). Por otra parte, se observó la expresión de sinaptofisina (Figura 13I, L) en la OPL y en la IPL.

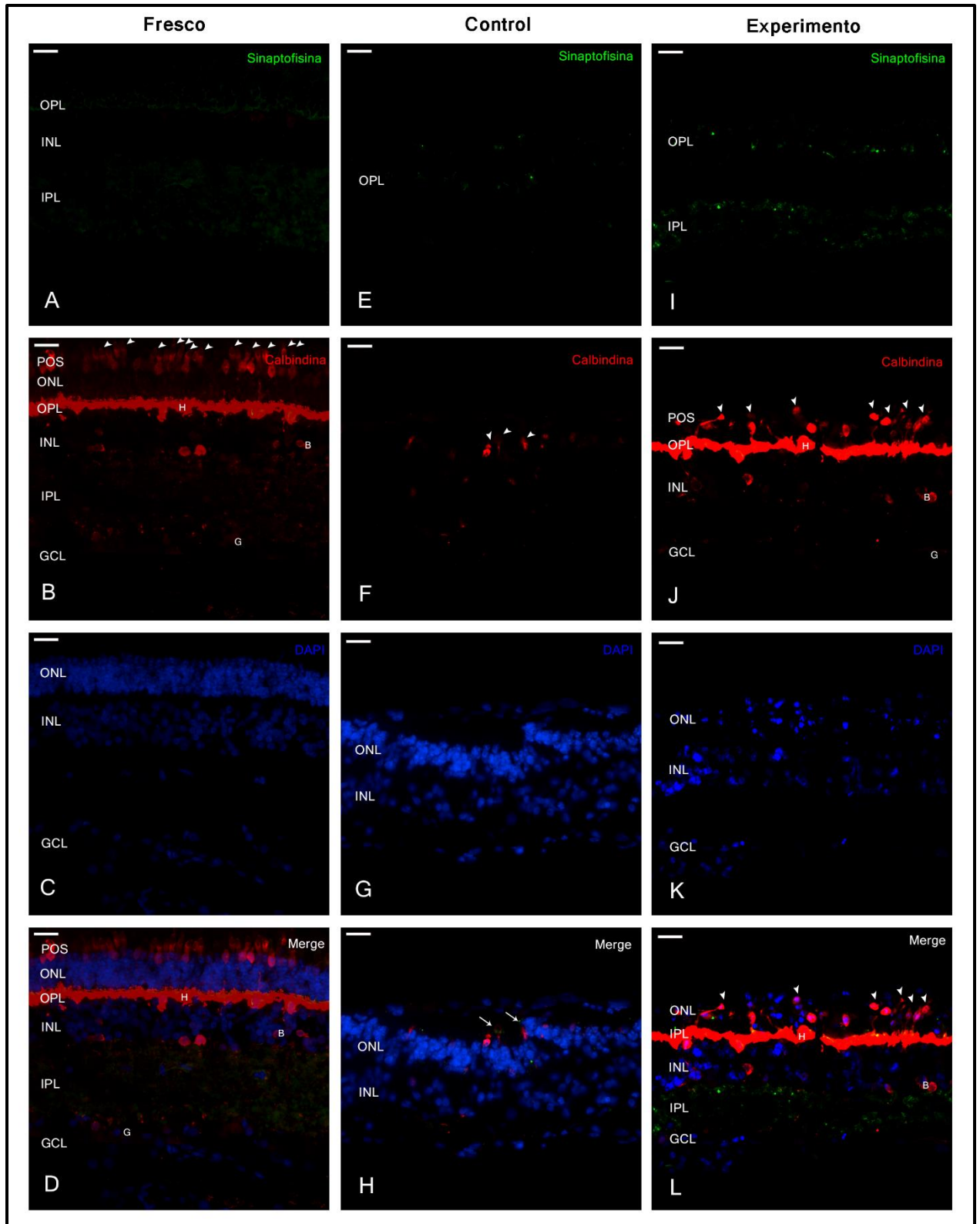


Figura 13: Evaluación inmunohistoquímica de neuronas retinianas (conos, horizontales, bipolares y ganglionares) y conexiones sinápticas (OPL e IPL). A-D) Muestras de 0 días: En las muestras frescas (0d) se observó la expresión de calbindina (B, D) a nivel de los conos, lo que permite evaluar el adecuado estado de sus segmentos externos (POS) (B, D: puntas de flecha), segmentos internos (PIS) y pedículos; a nivel de la ONL, donde se reveló una intensa expresión en el cuerpo y las extensiones dendríticas de las células horizontales (B, D: "H"); además de marcar varias células bipolares (B, D: "B"); y células ganglionares (B, D: "G"). Por otra parte, se observó sinaptofisina (A, D) en la OPL, a nivel de las uniones sinápticas entre los fotorreceptores y las interneuronas, y en la IPL, a nivel de las uniones sinápticas entre las interneuronas y las células ganglionares; E-H) Muestras control (cultivo organotípico de neuroretina de cerdo) de 9 días: se observó una considerable disminución en la expresión de calbindina (F, H), restringiéndose a células dentro de las rosetas (F: puntas de flecha), donde se identifican conos con el segmento externo vacuolizado y de tamaño muy reducido. No se apreciaron células horizontales, bipolares y/o ganglionares positivas al marcaje con anticuerpo anti-calbindina. De la misma manera, la expresión de sinaptofisina (E, H) se mostró notablemente reducida, hasta el punto de ser prácticamente indetectable en las capas

plexiformes (OPL e IPL), mientras que se pudo detectar de forma ectópica a nivel de los segmentos internos (PIS) de los conos (H: flechas); I-L) Muestras experimento (cultivo organotípico de neurorretina de cerdo con EPR) de 9 días: se observó el marcaje con anticuerpos anti-calbindina (J, L) de los conos, que presentaron una morfología degenerada, pero donde todavía fue posible distinguir los segmentos internos (PIS) edematizados y los pedículos, mientras que los segmentos externos (POS), muy degenerados, eran difíciles de identificar (J, L: puntas de flecha); se conservó el intenso marcaje de las células horizontales (J, L: "H") y, en menor medida, de las células bipolares (J, L: "B"), y de algunas células ganglionares (J, L: "G"). Por otra parte, se observó la expresión de sinaptofisina (I, L) en la OPL y en la IPL. Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$ . Magnificación: 40x. Abreviaciones: POS: photoreceptor outer segment; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion cells layer.

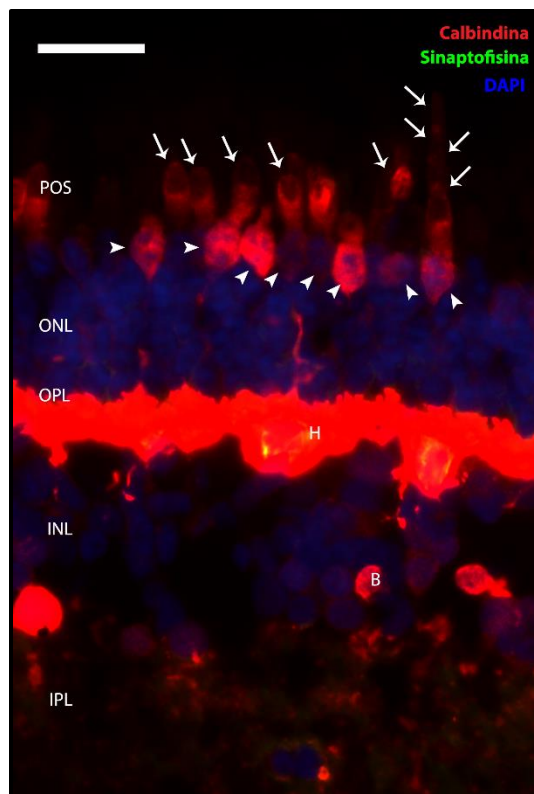


Figura 14: Imagen (63x) de inmunohistoquímica de una muestra de retina apenas desprendida (día 0). Se pueden observar unos conos bien estructurados con segmento externo (flechas) e interno (puntas de flecha) intactos, una elevada densidad de núcleos (DAPI/azul) en la capa nuclear externa (ONL) e interna (INL), así como unas células horizontales (H) y bipolares (B) marcadas intensamente con anticuerpos anti-calbindina (rojo). El marcaje con anticuerpos anti-calbindina (verde) resalta las capas plexiformes externa (OPL) e interna (IPL). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .

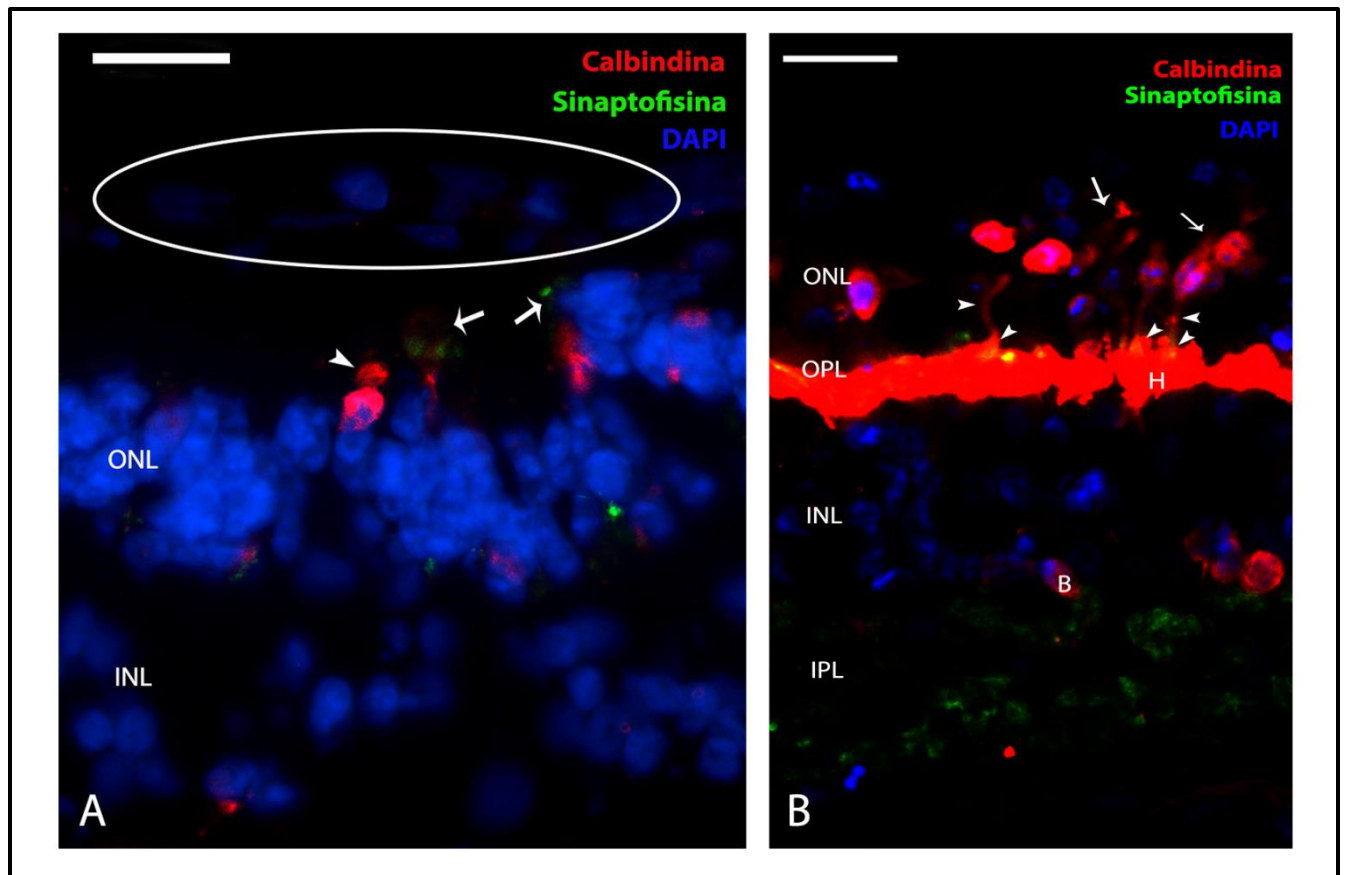


Figura 15: A) Detalle de la figura 10- H. Imagen de una roseta en una muestra control de 9 días donde se pueden observar un número escaso de conos marcados con anticuerpos anti-calbindina (rojo) con segmento externo muy deteriorado (punta de flecha) y expresión ectópica de la sinaptofisina (flecha) a nivel del segmento interno de los conos. Es posible, además, identificar gracias al marcaje con DAPI (azul) unos núcleos ectópicos que ocupan el techo de la roseta (elipse), que probablemente corresponden a núcleos de las células de Müller en las membranas subretinianas; B) Detalle de la figura 10- L. Imagen de inmunohistoquímica de una muestra experimento a los 9 días donde se observan conos relativamente bien conservados. Se pueden identificar en detalle unos segmentos externos acortados (flechas) y vacuolizados, un segmento interno bien conservado con un núcleo (DAPI/Azul) evidente, así como el axón con el terminal sináptico (puntas de flecha) que presenta todavía cierta positividad a los anticuerpos anti-sinaptofisina (verde) y células horizontales (H) y bipolares (B) con intensa expresión de calbindina. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

# 7. DISCUSIÓN

## 7.1 ELECCIÓN DE UN MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA PORCINA

El desprendimiento de retina (DR) es una patología con una prevalencia en aumento [1, 2] y con unos pobres resultados funcionales tras el proceso quirúrgico indicado, por ello, es necesario profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de este proceso. En los seres humanos, es complejo obtener muestras de ojos con desprendimiento de retina en fases iniciales, por lo tanto, solo de forma extraordinaria se pueden evaluar las modificaciones que sufre la retina inmediatamente tras el DR [3]. Así, es necesario recurrir a modelos experimentales que simulen las condiciones fisiopatológicas asociadas al DR.

Los modelos *in vivo* presentan algunas limitaciones, económicas, éticas y legislativas [131], que limitan su empleo y entre las técnicas *in vitro*, aunque los cultivos celulares permiten manipular el comportamiento celular, mediante la adición de sustancias externas, como fármacos, factores de crecimiento, etc. [132], no son capaces de simular las dinámicas celulares que suceden *in vivo*, ya que se pierden las interacciones celulares que caracterizan a un tejido complejo como es la retina [9, 92].

No obstante, se han empleado diversos tipos celulares en cultivos aislados [62, 97, 133-135], para el estudio de las patologías retinianas, entre ellos destacan el cultivo de células del EPR de ojos humanos procedentes de donantes, así como de ojos enucleados de primates no humanos, conejos, vacas, cerdos, ratas y ratones [135, 136]; y el cultivo de células de Müller aisladas de retinas humanas y de cerdo [134, 137-139]. Por otra parte, dentro de las técnicas *in vitro*, los modelos de cultivo organotípico de retina poseen la ventaja de simular fiablemente las dinámicas fisiológicas y patológicas de las células retinianas [10, 85, 86, 88-98, 140-142].

Entre las distintas especies animales empleadas en investigación en patologías retinianas, para el desarrollo de este trabajo se optó por la utilización de ojos porcinos, ya que comparten varias



similitudes con los ojos humanos, como el tamaño del globo ocular, el grosor y la rigidez escleral, y, sobre todo, la estructura, la ultra estructura, el tamaño y la extensión retinianas [121, 122]. Por otra parte, el empleo de neuroretinas procedentes de ojos de cadáver humano para el desarrollo de los experimentos planteados, resulta prácticamente inviable, ya que obviamente, no se puede programar temporalmente la obtención de las muestras, ni planificar con anterioridad el número de muestras de las que se dispondrá.

El ojo de cerdo posee doble circulación retiniana, similar a la humana, a diferencia, por ejemplo, de otros animales comúnmente empleados en experimentación como la rata o el conejo, y además carecen de *tapetum*, estructura típica de otras especies animales, como félidos, canidos y bóvidos [143]. En el cerdo, al igual que en el resto de especies animales, salvo los primates no humanos, no existe una verdadera mácula, sin embargo, en esta especie es posible identificar una área horizontal, con una elevada densidad de conos [122], localizada superiormente al nervio óptico [121, 122, 144, 145], denominada *area centralis* [121]. Además, esta región carece de vascularización directa por parte de los grandes vasos retinianos [121, 144, 146], de forma similar a la mácula de los primates, y se puede identificar fácilmente porque la retina de cerdo posee una evidente asimetría entre la hemiretina superior y la inferior, que es menos extensa (Figura 3). Igualmente, la retina del cerdo posee una densidad de bastones similar a la humana, a diferencia de otros animales como los gatos, cuya retina está prácticamente constituida por bastones [147] o la ardilla californiana cuya retina está constituida solo por conos [148]. Finalmente, otra característica que hace de la retina de cerdo un adecuado modelo de estudio, es que presenta un patrón de respuesta celular muy similar a la de la retina humana tras un DR [5], mientras que en el conejo se observan cambios muy rápidos y drásticos en todas las capas retinianas [149] y en la ardilla californiana, se observan pocas modificaciones a nivel de las células ganglionares, células de Müller y del EPR [148] [150].

Además, el modelo de cultivo organotípico ha sido previamente desarrollado por el Grupo de Retina del IOBA [5, 11] e inicialmente caracterizado por otros grupos [151], habiendo demostrado un elevado grado de similitud, en cuanto a los cambios retinianos, con los modelos experimentales de DR in vivo y con los modelos basados en explantes de retina neural humana, sobre todo en lo que respecta a las

modificaciones acontecidas a nivel de las capas retinianas externas [32, 143, 151-153]. Así, el modelo de cultivo organotípico de retina neural de cerdo supone numerosas ventajas que lo hacen adecuado para la investigación retiniana y además, los ojos son fáciles de obtener en un matadero local y económicos. Sin embargo, las alteraciones estructurales observadas en la retina interna durante el cultivo, que consisten en la aparición de edema asociado con una rápida degeneración de la GCL, son más parecidas a las originadas por axotomía y/o isquemia [151, 154].

Además, estos modelos poseen otras limitaciones como son la ausencia de la circulación coroidea, del vítreo, directamente implicado en el metabolismo de las capas internas de la retina y en el desarrollo patológico de membranas epirretinianas, y del EPR, que a través de la secreción de factores de crecimiento y del control local del metabolismo, es fundamental para la supervivencia de las capas más externas de la retina, en particular de los fotorreceptores, que son las primeras células en degenerar tras un DR.

Por todo ello, el nuevo modelo de cultivo organotípico de neuroretina con células del EPR, propuesto en este trabajo, intenta resolver una de las limitaciones que presentan los modelos previos, la ausencia de células del EPR. De este modo, se dispondría de un modelo de cultivo que simularía de una forma más cercana las modificaciones celulares que acontecen en un proceso de degeneración retiniana.

En la literatura se pueden encontrar modelos de cultivo de neuroretina de cerdo con parches de complejo EPR-coroideas y el cultivo en perfusión de explantes de neuroretina-EPR [9]. Sin embargo, estos cultivos, aunque demuestran un mejor mantenimiento general de la estructura retiniana, tienen un desarrollo complejo, resultan muy costosos y presentan patrones de degeneración retiniana, a lo largo del tiempo, muy similares a los del cultivo aislado de neuroretina [8, 9]. Así, en el modelo descrito por Kaempf [8], basado en un cocultivo de neuroretina-EPR-coroideas en bloque, se demostró que la muerte celular y las alteraciones estructurales en la retina neural eran inferiores respecto al cultivo aislado de neuroretina. Sin embargo, estos modelos no son adecuados como sistemas de simulación de los cambios que aparecen precozmente tras un DR, donde se pierde el contacto físico entre el EPR y los fotorreceptores, y por tanto, se alteran las funciones del EPR, como la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, el metabolismo de la vitamina A y la regulación del

intercambio iónico a nivel de la matriz inter-fotorreceptora. En el modelo planteado, se simularía esta situación al separar mecánicamente la retina neural de las células del EPR por medio de la membrana de los pocillos Transwell®, pero se permite que las sustancias secretadas por el mismo lleguen a la neurorretina a través del medio de cultivo, por ello, se consigue obtener un modelo más cercano a la patofisiología de la enfermedad.

## 7.2 DISCUSIÓN DEL MATERIAL Y MÉTODO

### 7.2.1 MODELO DE CULTIVO

Se utilizaron explantes de neurorretina porcina de 5x5 mm procedentes de la porción central del *area centralis*, debido a la elevada concentración de conos y la escasez de vasos presentes en esta zona, para que las modificaciones sean comparables entre experimentos, y para que fueran extrapolables a los cambios en la retina humana [14, 32]. Además, esto permite comparar cambios en el espesor retiniano a lo largo del cultivo, ya que el espesor inicial varía entre retina central y periférica. Por tanto, de cada ojo se obtuvieron 2 explantes, utilizados respectivamente como control (cultivo organotípico de neurorretina) y experimento (neurorretina con células del EPR). Además, se evitó la presencia de bordes irregulares, ya que estas porciones degenerarían rápidamente, y de zonas con vasos visibles, para descartar los posibles efectos de células endoteliales y hematíes en los procesos de degeneración de las células retinianas.

En los cultivos experimento, las células de EPR porcino se depositaron en la base de la placa, debajo de la membrana del pocillo Transwell®. De esta manera, la membrana del pocillo actúa como una barrera para el paso de las células de EPR, mientras que es permeable (tamaño de poro de 0,4µm) a los factores secretados por éste. Así, estas células no pueden migrar a la neurorretina, lo que limita su posible acción a la secreción de sustancias con acción sobre la retina, como los factores de crecimiento. Esta forma de cultivo simula, en parte, lo que ocurre en un DR, donde patológicamente se crea una

separación entre la neuroretina y el EPR, perdiendo el contacto físico, pero en el que se mantiene el efecto de los factores secretados por el EPR.

Los explantes se cultivaron durante 9 días porque el estudio a corto plazo no permitiría identificar cambios estructurales sutiles, como ha sido descrito por el Grupo de Retina del IOBA. Por otra parte, tiempos de cultivo más largos no son adecuados porque se produce una completa degeneración retiniana que dificulta considerablemente el estudio de las muestras [151].

En los cultivos experimento se sembraron 30.000 células de EPR/cm<sup>2</sup> (densidad normal en la macula humana de ~4500 células/mm<sup>2</sup> [12]), ya que en esta concentración las células consiguen alcanzar la confluencia en el fondo de la placa, creando un mono-estrato celular continuo, que simule el aspecto normal EPR adherido a la membrana de Bruch [12, 155], mientras que concentraciones superiores, hubieran dado lugar a una superposición celular lejana del aspecto normal de EPR y que hubiera podido influenciar su función.

### 7.2.2 MEDIO DE CULTIVO

Como medio de cultivo se ha utilizado una combinación 1:1 de DMEM y Neurobasal A (suplementado con B-27, suero fetal bovino y L-Glutamina), de acuerdo a la experiencia del Grupo de Retina del IOBA en este tipo de cultivos [4, 5, 11]. Debido a que la combinación de Neurobasal A + B-27 + L-Glutamina es adecuada para el cultivo de células neuronales, pero es insuficiente para mantener a las células gliales retinianas, que necesitan suero fetal para un adecuado mantenimiento in vitro; por otra parte, además es necesario incluir DMEM, para el mantenimiento de las células de EPR, en este modelo. Complementariamente, para minimizar los efectos de los posibles factores de crecimiento presentes en el suero fetal, sobre el conjunto de células en cultivo, se empleó una concentración muy reducida de este, pero suficiente para mantener a las células gliales (2%) [92].

### 7.2.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Se optó por incluir las muestras en resina, en vez que utilizar una técnica más convencional como la inclusión en parafina, para que en el caso de encontrar hallazgos relevantes poder realizar estudios ultra-estructurales mediante microscopia electrónica. La microscopia electrónica es una técnica que permite estudiar la ultra estructura celular en el más mínimo detalle, permitiendo la visualización de estructuras intracelulares como mitocondrias, retículo endoplasmico, etc.

Se evaluó la gliosis reactiva, reacción inespecífica de daño retiniano que aparece precozmente tras un DR, mediante el estudio de expresión de las proteínas GFAP y CRALBP por técnicas de inmunofluorescencia [123-126, 156]. La GFAP es una proteína de los filamentos intermedios de las células gliales (células de Müller y astrocitos) [157] que no se expresa, o lo hace mínimamente a nivel de la ILM, en una retina normal. Pero el estudio de la expresión de GFAP únicamente, no permite diferenciar a los astrocitos de las células de Müller, principales implicadas en la gliosis reactiva retiniana. Por esta razón, se estudió otra proteína complementaria, la CRALBP, que está implicada en el metabolismo de la vitamina A y se expresa exclusivamente en las células de Müller. De esta manera, empleando dos marcadores para estas proteínas se pueden diferenciar células de Müller (GFAP+/CRALBP+) de los astrocitos (GFAP+/CRALBP-). Entre las otras proteínas descritas en otros estudios, por ejemplo, no se empleó la vimentina (otra proteína que, como la GFAP, forma parte de los filamentos intermedios de las células de Müller) porque parece marcar menos efectivamente las células de Müller activas respecto a la GFAP [14, 32, 153].

Paralelamente, se evaluó la expresión de las proteínas calbindina y sinaptofisina. La calbindina es una proteína ligada al calcio que se localiza en los conos, en las células amacrinas, en las horizontales, y en las bipolares y en las ganglionares, mientras que las células de Müller pueden ser inmunoreactivas a la calbindina bajo condiciones de estrés [4, 158, 159]. La sinaptofisina, a su vez, es una proteína de membrana presente en las vesículas sinápticas de los fotorreceptores (los pedículos de los conos y las esferulas de los bastones), de las neuronas de segundo orden y de las células ganglionares, mientras

que el cuerpo de los fotorreceptores puede manifestar inmuno-reactividad a la sinaptofisina tras un daño retiniano [4, 158, 159].

## 7.3 DISCUSION DE LOS RESULTADOS

### 7.3.1 EVALUACIÓN DEL CULTIVO DEL EPR

La evaluación de las células del EPR durante su cultivo mostró que tras el aislamiento las células formaron un epitelio monoestratificado adherido al fondo de la placa de cultivo, de forma hexagonal y con contenido de gránulos intracelulares de pigmento. Estas células también mantuvieron dichas características hasta los 9 días de cocultivo con los explantes neuroretinianos, aunque se detectaron algunas células aisladas de dimensiones mayores y con menor número de gránulos intracelulares.

### 7.3.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

En la evaluación histológica e inmunohistoquímica, se observa una mejor conservación de la estructura neuroretiniana en las muestras experimento (neuroretina con EPR) a los 9 días de cultivo, que se acompaña de la preservación de la morfología celular (fotorreceptores, células horizontales y bipolares). Es particularmente relevante la ausencia de formaciones en roseta en la ONL, signo constante de los fenómenos de degeneración de las capas más externas de la retina [83]. Por su parte, los conos, aunque con su morfología alterada, presentan una densidad superior respecto la encontrada en los controles a los 9 días, donde las células en degeneración dan lugar a abundantes formaciones en roseta que incluyen conos muy degenerados, con picnosis nuclear y vacuolización y/o pérdida de los segmentos externos. Estos hallazgos, son una característica constante del proceso de degeneración de los fotorreceptores [160, 161], durante el cual estas células se disgregan y vacuolizan, acortándose progresivamente, antes de su completa muerte celular [4, 32, 85, 88], y desde el punto de vista ultra-estructural, sufren una disminución del número de mitocondrias y pierden la compartimentalización de sus organelas intracelulares [32].

Por otra parte, la evaluación de la sinaptofisina también reveló cambios típicos del proceso de degeneración retiniana, como la expresión ectópica de esta proteína en el cuerpo celular de los fotorreceptores que se observa en los controles a los 9 días de cultivo. Este proceso se debe a una modificación en el lugar de expresión de la proteína y no a su migración [32, 158, 159]. Por el contrario, en las muestras experimento no se observó este fenómeno, mientras que se conservó cierto nivel de expresión en la OPL y en la IPL.

En los cultivos experimento se encuentra una menor hipertrofia de las células de Müller que da lugar a la formación de membranas subretinianas, aparentemente de menor grosor, positivas al marcaje con anticuerpos anti-GFAP, que son un constituyente esencial de los filamentos intermedios de estas células. Las células de Müller son las células más reactivas tras un DR ya que se produce una proliferación e hipertrofia de las mismas, con transposición de los núcleos hacia capas externas, normalmente localizados en la INL, dando lugar a la formación de membranas epi-, intra- y sub-retinianas [3-5, 14, 32, 86, 126, 129, 147, 153, 162, 163]. Las células de Müller representan aproximadamente el 90% de las células gliales en la retina de los vertebrados (los astrocitos representan solo el 10%) [164] y tienen un importante conjunto de funciones para el mantenimiento de la fisiología retiniana [165], como fornecer glutamina y taurina a las neuronas retinianas, mantener el balance de  $K^+$ ,  $H^+$  y agua, y proteger contra el estrés oxidativo [166]. La activación de las células de Müller empieza en minutos/horas tras un DR y persiste varios días [167-169], durante este tiempo, se incrementa la expresión de proteínas del cito-esqueleto y de los filamentos intermedios, como la vimentina, la tubulina y la GFAP [4, 5, 11, 14, 123-125, 129, 134, 138, 152, 156].

Originariamente, se creía que la activación de las células de Müller tenía un efecto protector, pero hoy resulta claro que es una de las posibles causas de los pobres resultados funcionales tras la cirugía del DR. Así, las células de Müller reducen la expresión de proteínas implicadas en funciones homeostáticas fundamentales, como la glutamina sintetasa, la proteína ligada al retinaldeido y la anhidrasa carbónica [166, 170, 171], y alteran la conductancia de sus membranas celulares al  $K^+$  y al  $Ca^{2+}$  [167, 169], lo que reduce su capacidad para retirar el exceso de  $K^+$  (neurotóxico) del espacio intercelular [169, 172]. Además, la fibrosis sub-retiniana inhibe la regeneración de los segmentos

externos de los fotorreceptores [173], mientras que las membranas intrarretinianas obstaculizan la reconexiones sinápticas a nivel de las capas plexiformes [174].

Todo ello, contribuye a que las muestras experimento presenten un mejor mantenimiento del espesor retiniano, cuya diferencia con los cultivos control resultó estadísticamente significativo. La medida del espesor retiniano se llevó a cabo entre la ILM y la OLM, con el fin de evitar el sesgo relacionado con la presencia de membranas subretinianas en las muestras cultivadas.

Por todo ello, es evidente que en las muestras experimento, donde se cocultivaron los explantes de neuroretina con células del EPR, los fenómenos de degeneración celular aparecen reducidos a nivel de todas las capas retinianas, que esto origina la mejor conservación del espesor y de la arquitectura retiniana y que reduce la reactividad de las células de Müller. En este sentido, de los hallazgos encontrados en los cultivos experimento se pueden desprender dos hipótesis, que el efecto neuroprotector originado por los factores secretados por el EPR influencia a todas las capas de la retina, manteniendo la morfología y la funcionalidad celular; o lo que se antoja más factible, que los factores secretados por el EPR ralenticen la degeneración de los fotorreceptores y que la supervivencia de éstos contribuya a una menor degeneración retiniana.

## 7.4 LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y CONTINUACIÓN DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

- El número total de cultivos realizados fue de 6 explantes experimento y 6 control (con la pérdida de una muestra experimento por contaminación fúngica a los 8 días de cultivo). Aunque limitado, el número de experimentos realizados se considera suficiente para poder extraer resultados preliminares acerca de la influencia que las células del EPR ejercen sobre las neuroretinas en cultivo, debido a la experiencia que el Grupo de Retina del IOBA tiene en el procesado de las muestras y en la



interpretación de los resultados. Sin embargo, se realizará una nueva batería de experimentos que permita evaluar las modificaciones de otros tipos celulares retinianos, como los bastones, y los procesos de muerte celular, así como el mantenimiento del fenotipo de las células del EPR durante el cocultivo, mediante el empleo de los marcadores correspondientes.

- Como objetivo de este trabajo se ha priorizado la estandarización del método de cultivo de neuroretina con células del EPR analizando las modificaciones celulares a los 9 días de cultivo. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo permiten plantear el estudio de los cambios retinianos de manera más progresiva, mediante el empleo de tiempos de estudio intermedios entre el día 0 y el 9, con el fin de obtener una información más completa acerca de los efectos que las células del EPR ejercen sobre el proceso de degeneración retiniana.

- Con este trabajo se ha determinado el efecto que la presencia de las células EPR ejerce sobre el cultivo de neuroretina, pero no se han identificado los factores secretados por el EPR que contribuyen a este efecto. Por ello, con los medios de cultivo recogidos durante el cocultivo y conservados en congelación, se pretende identificar, mediante ELISA, los principales factores secretados por el EPR que afectan a la fisiología retiniana, como son el PEDF, el PDGF y el CNTF.

## 8. CONCLUSIONES

- Se ha puesto a punto un modelo de cultivo organotípico de neurorretina de cerdo con células del epitelio pigmentario de la retina, que simula las modificaciones celulares asociadas con los procesos de degeneración retiniana, como sucede en el desprendimiento de retina.
- Este modelo reproduce dichas modificaciones de una manera más cercana a su desarrollo *in vivo*, con respecto a los modelos *in vitro* previos, ya que aporta la presencia de células del EPR como fuente de factores necesarios para el mantenimiento de la fisiología retiniana.
- La presencia de las células del EPR, probablemente ligada a la producción y a la secreción de factores difusibles, influye positivamente en la ralentización de los procesos de degeneración retiniana durante el cultivo.

# Bibliografía

1. Mitry, D., et al., *Pathogenesis of rhegmatogenous retinal detachment: predisposing anatomy and cell biology*. Retina, 2010. **30**(10): p. 1561-72.
2. Pastor, J.C., et al., *Visual loss in retinal detachment and macula-on after successful surgery, Retina-1 project*, in ARVO 2013: Seattle.
3. Wickham, L., et al., *Glial and neural response in short-term human retinal detachment*. Arch Ophthalmol, 2006. **124**(12): p. 1779-82.
4. Fernandez-Bueno, I., et al., *Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina*. Exp Eye Res, 2012. **104**: p. 26-38.
5. Fernandez-Bueno, I., et al., *Muller and macrophage-like cell interactions in an organotypic culture of porcine neuroretina*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 2148-56.
6. Hoff, A., H. Hammerle, and B. Schlosshauer, *Organotypic culture system of chicken retina*. Brain Res Brain Res Protoc, 1999. **4**(3): p. 237-48.
7. Kaempfer, S., et al., *Effects of bevacizumab (Avastin) on retinal cells in organotypic culture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(7): p. 3164-71.
8. Kaempfer, S., et al., *Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium*. J Neurosci Methods, 2008. **173**(1): p. 47-58.
9. Kobuch, K., et al., *Maintenance of adult porcine retina and retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterisation of an organotypic in vitro model*. Exp Eye Res, 2008. **86**(4): p. 661-8.
10. Koizumi, A., et al., *Organotypic culture of physiologically functional adult mammalian retinas*. PLoS One, 2007. **2**(2): p. e221.
11. Fernandez-Bueno, I., et al., *Adalimumab (tumor necrosis factor-blocker) reduces the expression of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity increased by exogenous tumor necrosis factor alpha in an organotypic culture of porcine neuroretina*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 894-903.
12. Binder, S., et al., *Transplantation of the RPE in AMD*. Prog Retin Eye Res, 2007. **26**(5): p. 516-54.
13. Strauss, O., *The Retinal Pigment Epithelium*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, Editors. 1995: Salt Lake City (UT).
14. Fisher, S.K., et al., *Cellular Remodeling in Mammalian Retina Induced by Retinal Detachment*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, Editors. 1995: Salt Lake City (UT).
15. de la Rúa, E.R., et al., *Non-complicated retinal detachment management: variations in 4 years. Retina 1 project; report 1*. Br J Ophthalmol, 2008. **92**(4): p. 523-5.
16. Pastor, J.C., et al., *Surgical outcomes for primary rhegmatogenous retinal detachments in phakic and pseudophakic patients: the Retina 1 Project--report 2*. Br J Ophthalmol, 2008. **92**(3): p. 378-82.
17. Pastor, J.C., et al., *Variations in Functional and Anatomical Outcomes and in Proliferative Vitreoretinopathy Rate along a Prospective Collaborative Study on Primary Rhegmatogenous Retinal Detachments: The Retina 1 Project—Report 4*. ISRN Ophthalmology, 2012. **2012**: p. 1-7.
18. Javitt, J.C., et al., *National outcomes of cataract extraction. Retinal detachment and endophthalmitis after outpatient cataract surgery*. Cataract Patient Outcomes Research Team. Ophthalmology, 1994. **101**(1): p. 100-5; discussion 106.
19. Norregaard, J.C., et al., *Risk of retinal detachment following cataract extraction: results from the International Cataract Surgery Outcomes Study*. Br J Ophthalmol, 1996. **80**(8): p. 689-93.
20. Tuft, S.J., D. Minassian, and P. Sullivan, *Risk Factors for Retinal Detachment after Cataract Surgery: A Case-Control Study*. Ophthalmology, 2006. **113**(4): p. 650-656.
21. Ripandelli, G., et al., *Cataract surgery as a risk factor for retinal detachment in very highly myopic eyes*. Ophthalmology, 2003. **110**(12): p. 2355-2361.
22. Erie, J.C., et al., *Risk of Retinal Detachment after Cataract Extraction, 1980–2004: A Population-Based Study*. Ophthalmology, 2006. **113**(11): p. 2026-2032.
23. Isashiki, M. and N. Ohba, *Recovery of differential light sensitivity following surgery for rhegmatogenous retinal detachment*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1986. **224**(2): p. 184-90.

24. Chisholm, I.A., E. McClure, and W.S. Foulds, *Functional recovery of the retina after retinal detachment*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1975. **95**(1): p. 167-172.
25. Schatz, P. and S. Andreasson, *Recovery of retinal function after recent-onset rhegmatogenous retinal detachment in relation to type of surgery*. Retina, 2010. **30**(1): p. 152-9.
26. Isernhagen, R.D. and C.P. Wilkinson, *Recovery of visual acuity following the repair of pseudophakic retinal detachment*. Trans Am Ophthalmol Soc, 1988. **86**: p. 291-306.
27. Nork, T.M., et al., *Selective loss of blue cones and rods in human retinal detachment*. Arch Ophthalmol, 1995. **113**(8): p. 1066-73.
28. Schatz, P., K. Holm, and S. Andreasson, *Retinal function after scleral buckling for recent onset rhegmatogenous retinal detachment: assessment with electroretinography and optical coherence tomography*. Retina, 2007. **27**(1): p. 30-6.
29. Trichonas, G., et al., *Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21695-700.
30. Cook, B., et al., *Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(6): p. 990-6.
31. Mervin, K., et al., *Limiting photoreceptor death and deconstruction during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation*. Am J Ophthalmol, 1999. **128**(2): p. 155-64.
32. Fisher, S.K., et al., *Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(3): p. 395-431.
33. Kunikata, H., et al., *Intraocular concentrations of cytokines and chemokines in rhegmatogenous retinal detachment and the effect of intravitreal triamcinolone acetonide*. Am J Ophthalmol, 2013. **155**(6): p. 1028-1037 e1.
34. Rojas, J., et al., *A strong genetic association between the tumor necrosis factor locus and proliferative vitreoretinopathy: the retina 4 project*. Ophthalmology, 2010. **117**(12): p. 2417-2423 e1-2.
35. Kubay, O.V., et al., *Retinal detachment neuropathology and potential strategies for neuroprotection*. Surv Ophthalmol, 2005. **50**(5): p. 463-75.
36. Ishibashi, T., *[Comprehensive strategy for retinal neuroprotection. Challenging the clinical application]*. Nihon Ganka Gakkai Zasshi, 2012. **116**(3): p. 165-98; discussion 199.
37. Sparrow, J.R., D. Hicks, and C.P. Hamel, *The retinal pigment epithelium in health and disease*. Curr Mol Med, 2010. **10**(9): p. 802-23.
38. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
39. Lamb, T.D., S.P. Collin, and E.N. Pugh, Jr., *Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(12): p. 960-76.
40. Lamb, T.D. and E.N. Pugh, Jr., *Dark adaptation and the retinoid cycle of vision*. Prog Retin Eye Res, 2004. **23**(3): p. 307-80.
41. Thompson, D.A. and A. Gal, *Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases*. Prog Retin Eye Res, 2003. **22**(5): p. 683-703.
42. LaVail, M.M., *Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1980. **19**(4): p. 407-11.
43. Kevany, B.M. and K. Palczewski, *Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(1): p. 8-15.
44. Ban, Y. and L.J. Rizzolo, *Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium*. Brain Res Dev Brain Res, 2000. **121**(1): p. 89-95.
45. Adler, A.J. and R.E. Southwick, *Distribution of glucose and lactate in the interphotoreceptor matrix*. Ophthalmic Res, 1992. **24**(4): p. 243-52.
46. Bazan, N.G., E.B. Rodriguez de Turco, and W.C. Gordon, *Docosahexaenoic acid supply to the retina and its conservation in photoreceptor cells by active retinal pigment epithelium-mediated recycling*. World Rev Nutr Diet, 1994. **75**: p. 120-3.
47. Hamann, S., *Molecular mechanisms of water transport in the eye*. Int Rev Cytol, 2002. **215**: p. 395-431.
48. Marmor, M.F., *Control of subretinal fluid: experimental and clinical studies*. Eye (Lond), 1990. **4** ( Pt 2): p. 340-4.
49. Hamann, S., et al., *Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 1): p. C1332-45.

50. Linsenmeier, R.A. and L. Padnick-Silver, *Metabolic dependence of photoreceptors on the choroid in the normal and detached retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(10): p. 3117-23.
51. Bost, L.M., A.E. Aotaki-Keen, and L.M. Hjelmeland, *Cellular adhesion regulates bFGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells*. Exp Eye Res, 1994. **58**(5): p. 545-52.
52. Connolly, S.E., L.M. Hjelmeland, and M.M. LaVail, *Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in mature and developing retinas of normal and RCS rats*. Curr Eye Res, 1992. **11**(10): p. 1005-17.
53. Hageman, G.S., et al., *Sequestration of basic fibroblast growth factor in the primate retinal interphotoreceptor matrix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(15): p. 6706-10.
54. Walsh, N., K. Valter, and J. Stone, *Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina*. Exp Eye Res, 2001. **72**(5): p. 495-501.
55. Khaliq, A., et al., *Oxygen modulates production of bFGF and TGF-beta by retinal cells in vitro*. Exp Eye Res, 1995. **60**(4): p. 415-23.
56. Kvanta, A., *Expression and secretion of transforming growth factor-beta in transformed and nontransformed retinal pigment epithelial cells*. Ophthalmic Res, 1994. **26**(6): p. 361-7.
57. Martin, D.M., D. Yee, and E.L. Feldman, *Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells*. Brain Res Mol Brain Res, 1992. **12**(1-3): p. 181-6.
58. Slomiany, M.G. and S.A. Rosenzweig, *Autocrine effects of IGF-I-induced VEGF and IGFBP-3 secretion in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(3): p. C746-53.
59. Cao, W., et al., *Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina*. Exp Eye Res, 1997. **65**(2): p. 241-8.
60. Campochiaro, P.A., et al., *Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells*. J Cell Sci, 1994. **107** ( Pt 9): p. 2459-69.
61. Campochiaro, P.A., et al., *Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media*. Exp Eye Res, 1989. **49**(2): p. 217-27.
62. Adamis, A.P., et al., *Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(2): p. 631-8.
63. Lu, M., et al., *Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression*. J Clin Invest, 1998. **101**(6): p. 1219-24.
64. Nagineni, C.N., et al., *Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases*. J Cell Physiol, 2003. **197**(3): p. 453-62.
65. Ahuja, P., et al., *Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) delays photoreceptor degeneration in explants of rd/rd mouse retina*. Neuroreport, 2001. **12**(13): p. 2951-5.
66. Ishida, K., et al., *Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms*. Ocul Immunol Inflamm, 2003. **11**(2): p. 91-105.
67. Streilein, J.W., et al., *Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants*. Vision Res, 2002. **42**(4): p. 487-95.
68. Dawson, D.W., et al., *Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis*. Science, 1999. **285**(5425): p. 245-8.
69. King, G.L. and K. Suzuma, *Pigment-epithelium-derived factor--a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions*. N Engl J Med, 2000. **342**(5): p. 349-51.
70. Ogata, N., et al., *Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(4): p. 1168-75.
71. Cao, W., et al., *In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(7): p. 1646-52.
72. Wen, R., et al., *Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina*. J Neurosci, 1995. **15**(11): p. 7377-85.
73. Relvas, L.J., et al., *Extracellular nucleotides and interleukin-8 production by ARPE cells: potential role of danger signals in blood-retinal barrier activation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(3): p. 1241-6.

74. Kim, Y.H., et al., *Regulated secretion of complement factor H by RPE and its role in RPE migration*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2009. **247**(5): p. 651-9.
75. Austin, B.A., et al., *Biologically active fibronectin fragments stimulate release of MCP-1 and catabolic cytokines from murine retinal pigment epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(6): p. 2896-902.
76. Lin, H., et al., *Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(6): p. 3521-9.
77. Glenn, J.V., et al., *Advanced glycation end product (AGE) accumulation on Bruch's membrane: links to age-related RPE dysfunction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(1): p. 441-51.
78. Bosl, M.R., et al., *Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl(-) channel disruption*. EMBO J, 2001. **20**(6): p. 1289-99.
79. Allikmets, R., *Simple and complex ABCR: genetic predisposition to retinal disease*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(4): p. 793-9.
80. Duncan, J.L., et al., *An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(2): p. 826-38.
81. Godel, V., et al., *Best's vitelliform macular dystrophy*. Acta Ophthalmol Suppl, 1986. **175**: p. 1-31.
82. Strangeways TSP, F.H., *Experimental studies on the differentiation of embryonic*

*tissues growing in vivo and in vitro. II. The development of the isolated*

*early embryonic eye of the fowl when cultivated in vitro.* . Proc R Soc, 1926(100): p. 273-83.

83. Tansley, K., *The Formation of Rosettes in the Rat Retina*. Br J Ophthalmol, 1933. **17**(6): p. 321-36.
84. Trowell, O.A., *A modified technique for organ culture in vitro*. Exp Cell Res, 1954. **6**(1): p. 246-8.
85. Caffè, A.R., et al., *Histotypic differentiation of neonatal mouse retina in organ culture*. Curr Eye Res, 1989. **8**(10): p. 1083-92.
86. Caffè, A.R., A. Soderpalm, and T. van Veen, *Photoreceptor-specific protein expression of mouse retina in organ culture and retardation of rd degeneration in vitro by a combination of basic fibroblast and nerve growth factors*. Curr Eye Res, 1993. **12**(8): p. 719-26.
87. Feigenspan, A., J. Bormann, and H. Wässle, *Organotypic slice culture of the mammalian retina*. Vis Neurosci, 1993. **10**(2): p. 203-17.
88. Ogilvie, J.M., et al., *A reliable method for organ culture of neonatal mouse retina with long-term survival*. J Neurosci Methods, 1999. **87**(1): p. 57-65.
89. Katsuki, H., et al., *Neuronal nitric oxide synthase is crucial for ganglion cell death in rat retinal explant cultures*. J Pharmacol Sci, 2004. **94**(1): p. 77-80.
90. Cossenza, M., et al., *Inhibition of protein synthesis by activation of NMDA receptors in cultured retinal cells: a new mechanism for the regulation of nitric oxide production*. J Neurochem, 2006. **97**(5): p. 1481-93.
91. Hartani, D., et al., *[Effect of nitrites and nitrates on bovine retina in vitro]*. J Fr Ophtalmol, 2006. **29**(1): p. 32-6.
92. Caffè, A.R., et al., *Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium*. J Chem Neuroanat, 2001. **22**(4): p. 263-73.
93. Syed, H., et al., *Sulfisoxazole, an endothelin receptor antagonist, protects retinal neurones from insults of ischemia/reperfusion or lipopolysaccharide*. Neurochem Int, 2006. **48**(8): p. 708-17.
94. Saikia, P., et al., *Safety testing of indocyanine green in an ex vivo porcine retina model*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(11): p. 4998-5003.
95. Delyfer, M.N., et al., *Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST?* Mol Vis, 2005. **11**: p. 677-87.
96. Franke, A.G., et al., *Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic proteins: cooperative players in chick and murine programmed retinal cell death*. J Comp Neurol, 2006. **495**(3): p. 263-78.
97. Lagreze, W.A., et al., *The peptides ADFN-9 and NAP increase survival and neurite outgrowth of rat retinal ganglion cells in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(3): p. 933-8.
98. Johnson, T.V. and K.R. Martin, *Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(8): p. 3503-12.
99. Kuhrt, H., et al., *Rabbit retinal organ culture as an in-vitro model of hepatic retinopathy*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004. **242**(6): p. 512-22.

100. Azadi, S., et al., *CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina*. Brain Res, 2007. **1129**(1): p. 116-29.
101. Liljekvist-Larsson, I. and K. Johansson, *Studies of host-graft interactions in vitro*. J Neural Eng, 2007. **4**(3): p. 255-63.
102. Martinez-Fernandez de la Camara, C., et al., *Phosphodiesterase inhibition induces retinal degeneration, oxidative stress and inflammation in cone-enriched cultures of porcine retina*. Exp Eye Res, 2013. **111**: p. 122-33.
103. Tamai, M., et al., *Development of photoreceptor cells in vitro: influence and phagocytic activity of homo- and heterogenic pigment epithelium*. Exp Eye Res, 1978. **26**(5): p. 581-90.
104. Pinzon-Duarte, G., et al., *Effects of brain-derived neurotrophic factor on cell survival, differentiation and patterning of neuronal connections and Muller glia cells in the developing retina*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(6): p. 1475-84.
105. Soderpalm, A.K., et al., *9-cis-retinoic acid in combination with retinal pigment epithelium induces apoptosis in cultured retinal explants only during early postnatal development*. Brain Res Dev Brain Res, 1999. **118**(1-2): p. 169-76.
106. Rizzolo, L.J., S. Zhou, and Z.Q. Li, *The neural retina maintains integrins in the apical membrane of the RPE early in development*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. **35**(5): p. 2567-76.
107. Katyal, S. and R. Godbout, *Alternative splicing modulates Disabled-1 (Dab1) function in the developing chick retina*. EMBO J, 2004. **23**(8): p. 1878-88.
108. Jablonski, M.M., et al., *Pigment epithelium-derived factor supports normal Muller cell development and glutamine synthetase expression after removal of the retinal pigment epithelium*. Glia, 2001. **35**(1): p. 14-25.
109. Wang, X., A. Iannaccone, and M.M. Jablonski, *Contribution of Muller cells toward the regulation of photoreceptor outer segment assembly*. Neuron Glia Biol, 2005. **1**: p. 1-6.
110. Lüke, M., et al., *The isolated perfused bovine retina—A sensitive tool for pharmacological research on retinal function*. Brain Research Protocols, 2005. **16**(1–3): p. 27-36.
111. Lüke, M., et al., *The safety profile of alkylphosphocholines in the model of the isolated perfused vertebrate retina*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2010. **248**(4): p. 511-518.
112. Alt, A., et al., *The Neuroprotective Potential of Rho-Kinase Inhibition in Promoting Cell Survival and Reducing Reactive Gliosis in Response to Hypoxia in Isolated Bovine Retina*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2013. **32**(1): p. 218-234.
113. Banat, M., et al., *The dihydropyridine isradipine inhibits the murine but not the bovine a-wave response of the electroretinogram*. Acta Ophthalmologica, 2008. **86**(6): p. 676-682.
114. Lüke, M., et al., *Electrophysiological effects of Brilliant Blue G in the model of the isolated perfused vertebrate retina*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2008. **246**(6): p. 817-822.
115. Taylor, L., et al., *Stretch to see: lateral tension strongly determines cell survival in long-term cultures of adult porcine retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(3): p. 1845-56.
116. Taylor, L., et al., *Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on the cultured adult full-thickness porcine retina*. Curr Eye Res, 2013. **38**(4): p. 503-15.
117. Bowes, C., et al., *Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase*. Nature, 1990. **347**(6294): p. 677-80.
118. Thiadens, A.A., et al., *Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(2): p. 240-7.
119. Buch, P.K., et al., *Dominant cone-rod dystrophy: a mouse model generated by gene targeting of the GCAP1/Guca1a gene*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18089.
120. Perrault, I., et al., *Spectrum of retGC1 mutations in Leber's congenital amaurosis*. Eur J Hum Genet, 2000. **8**(8): p. 578-82.
121. Hendrickson, A. and D. Hicks, *Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina*. Exp Eye Res, 2002. **74**(4): p. 435-44.
122. Chandler, M.J., et al., *Photoreceptor density of the domestic pig retina*. Vet Ophthalmol, 1999. **2**(3): p. 179-184.

123. Eisenfeld, A.J., A.H. Bunt-Milam, and P.V. Sarthy, *Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984. **25**(11): p. 1321-8.
124. Ekstrom, P., et al., *Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Muller radial glia during retinal degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988. **29**(9): p. 1363-71.
125. Sarthy, P.V. and M. Fu, *Transcriptional activation of an intermediate filament protein gene in mice with retinal dystrophy*. DNA, 1989. **8**(6): p. 437-46.
126. Lewis, G.P., et al., *Rapid changes in the expression of glial cell proteins caused by experimental retinal detachment*. Am J Ophthalmol, 1994. **118**(3): p. 368-76.
127. Bunt-Milam, A.H. and J.C. Saari, *Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina*. J Cell Biol, 1983. **97**(3): p. 703-12.
128. Johnson, P.T., et al., *Cellular retinaldehyde binding protein in developing retinal astrocytes*. Exp Eye Res, 1997. **64**(5): p. 759-66.
129. Guerin, C.J., D.H. Anderson, and S.K. Fisher, *Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. **31**(8): p. 1474-82.
130. <http://www.millipore.com>. 2013.
131. Agrawal, R.N., et al., *In vivo models of proliferative vitreoretinopathy*. Nat Protoc, 2007. **2**(1): p. 67-77.
132. Forrester, J.V., et al., *Cellular proliferation in the vitreous: the use of vitreous explants as a model system*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986. **27**(7): p. 1085-94.
133. Yu, H.S., et al., *Melatonin inhibits the proliferation of retinal pigment epithelial (RPE) cells in vitro*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1993. **29A**(5): p. 415-8.
134. Guidry, C., *Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. **37**(5): p. 740-52.
135. Gamulescu, M.A., et al., *Transforming growth factor beta2-induced myofibroblastic differentiation of human retinal pigment epithelial cells: regulation by extracellular matrix proteins and hepatocyte growth factor*. Exp Eye Res, 2006. **83**(1): p. 212-22.
136. Jin, M., et al., *Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(13): p. 4324-32.
137. Guidry, C., *Tractional force generation by porcine Muller cells. Development and differential stimulation by growth factors*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(2): p. 456-68.
138. Guidry, C., *The role of Muller cells in fibrocontractive retinal disorders*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(1): p. 75-86.
139. Guidry, C., K.M. Bradley, and J.L. King, *Tractional force generation by human muller cells: growth factor responsiveness and integrin receptor involvement*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(3): p. 1355-63.
140. Engelsberg, K., K. Johansson, and F. Ghosh, *Development of the embryonic porcine neuroretina in vitro*. Ophthalmic Res, 2005. **37**(2): p. 104-11.
141. Allamby, D., et al., *Cell attachment to, and contraction of, the retina in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(10): p. 2064-72.
142. Garcia, M., et al., *Effects of muller glia on cell survival and neuritogenesis in adult porcine retina in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(12): p. 3735-43.
143. Jackson, T.L., et al., *An experimental model of rhegmatogenous retinal detachment: surgical results and glial cell response*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(9): p. 4026-34.
144. De Schaepdrijver, L., et al., *Morphologic and clinical study of the retinal circulation in the miniature pig. B: Fluorescein angiography of the retina*. Exp Eye Res, 1992. **54**(6): p. 975-85.
145. Hebel, R., *Distribution of retinal ganglion cells in five mammalian species (pig, sheep, ox, horse, dog)*. Anat Embryol (Berl), 1976. **150**(1): p. 45-51.
146. Simoens, P., L. De Schaepdrijver, and H. Lauwers, *Morphologic and clinical study of the retinal circulation in the miniature pig. A: Morphology of the retinal microvasculature*. Exp Eye Res, 1992. **54**(6): p. 965-73.
147. Lewis, G.P., et al., *Microglial cell activation following retinal detachment: a comparison between species*. Mol Vis, 2005. **11**: p. 491-500.



148. Kryger, Z., et al., *The topography of rod and cone photoreceptors in the retina of the ground squirrel*. Vis Neurosci, 1998. **15**(4): p. 685-91.
149. Faude, F., et al., *Experimental retinal detachment causes widespread and multilayered degeneration in rabbit retina*. J Neurocytol, 2001. **30**(5): p. 379-90.
150. Linberg, K.A., et al., *Experimental retinal detachment in the cone-dominant ground squirrel retina: morphology and basic immunocytochemistry*. Vis Neurosci, 2002. **19**(5): p. 603-19.
151. Winkler, J., et al., *Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina*. Exp Eye Res, 2002. **74**(6): p. 777-88.
152. Iandiev, I., et al., *Glial cell reactivity in a porcine model of retinal detachment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(5): p. 2161-71.
153. Fisher, S.K. and G.P. Lewis, *Müller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data*. Vision Research, 2003. **43**(8): p. 887-897.
154. Watanabe, M. and Y. Fukuda, *Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats*. Prog Retin Eye Res, 2002. **21**(6): p. 529-53.
155. Panda-Jonas, S., J.B. Jonas, and M. Jakobczyk-Zmija, *Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes*. Am J Ophthalmol, 1996. **121**(2): p. 181-9.
156. Bringmann, A. and A. Reichenbach, *Role of Muller cells in retinal degenerations*. Front Biosci, 2001. **6**: p. E72-92.
157. Sarthy, V., *Focus on molecules: glial fibrillary acidic protein (GFAP)*. Exp Eye Res, 2007. **84**(3): p. 381-2.
158. Fernandez-Sanchez, L., et al., *Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(8): p. 4998-5008.
159. Barhoum, R., et al., *Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse*. Neuroscience, 2008. **155**(3): p. 698-713.
160. Marc, R.E., et al., *Neural remodeling in retinal degeneration*. Prog Retin Eye Res, 2003. **22**(5): p. 607-55.
161. Jones, B.W., et al., *Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations*. J Comp Neurol, 2003. **464**(1): p. 1-16.
162. Pastor, J.C., et al., *Intraretinal immunohistochemistry findings in proliferative vitreoretinopathy with retinal shortening*. Ophthalmic Res, 2006. **38**(4): p. 193-200.
163. Lewis, G.P., et al., *Identification of ganglion cell neurites in human subretinal and epiretinal membranes*. Br J Ophthalmol, 2007. **91**(9): p. 1234-8.
164. Sarthy, V.P., *Muller cells in retinal health and disease*. Arch Soc Esp Oftalmol, 2000. **75**(6): p. 367-8.
165. Bringmann, A., et al., *Muller cells in the healthy and diseased retina*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(4): p. 397-424.
166. Marc, R.E., et al., *Amino acid signatures in the detached cat retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(9): p. 1694-702.
167. Uhlmann, S., et al., *Early glial cell reactivity in experimental retinal detachment: effect of suramin*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(9): p. 4114-22.
168. Geller, S.F., G.P. Lewis, and S.K. Fisher, *FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Muller and RPE cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(6): p. 1363-9.
169. Francke, M., et al., *Electrophysiology of rabbit Muller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(5): p. 1072-9.
170. Lewis, G., et al., *Limiting the proliferation and reactivity of retinal Muller cells during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation*. Am J Ophthalmol, 1999. **128**(2): p. 165-72.
171. Lewis, G.P., et al., *Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment*. Exp Eye Res, 1989. **49**(1): p. 93-111.
172. Newman, E. and A. Reichenbach, *The Muller cell: a functional element of the retina*. Trends Neurosci, 1996. **19**(8): p. 307-12.
173. Anderson, D.H., et al., *Morphological recovery in the reattached retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986. **27**(2): p. 168-83.
174. Erickson, P.A., et al., *Retinal detachment in the cat: the outer nuclear and outer plexiform layers*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983. **24**(7): p. 927-42.

