



Universidad de Valladolid

**RESPUESTA DE LA MICROGLÍA DURANTE
LA NEURODEGENERACIÓN TRAS UN
DESPRENDIMIENTO DE RETINA. PAPEL
DEL POLIMORFISMO p.Arg72Pro DEL GEN
TP53.**

Trabajo Fin de Máster Curso 2024-2025

Máster en Investigación Biomédica y Terapias Avanzadas

Autor: **Alberto Carnicero Martín**

Tutor: Dr. Ricardo Usategui Martín

Departamento de Biología celular, Genética, Histología y Farmacología

Facultad de Medicina

Universidad de Valladolid (UVa)

Tabla de Contenido

1.	Abstract y Resumen.	1
2.	Introducción.	2
2.1.	El sentido de la vista: la retina.	2
2.2.	Neurodegeneración retiniana y desprendimiento de retina.	5
2.3.	Células de la Glía en la retina.	6
2.4.	Factores genéticos en el desprendimiento de retina. Gen <i>TP53</i> .	7
3.	Hipótesis de trabajo y objetivos.	9
3.1.	Hipótesis.	9
3.2.	Objetivo general.	9
4.	Materiales y Métodos.	10
4.1.	Modelo murino de desprendimiento de retina inducido.	10
4.2.	Extracción de ARN total, transcripción reversa y PCR a tiempo real cuantitativa.	12
4.3.	Caracterización inmunohistoquímica.	12
4.4.	Análisis estadístico.	13
5.	Resultados.	14
6.	Discusión.	20
7.	Conclusiones.	22
8.	Bibliografía.	23
9.	Material Suplementario	27

1. Abstract y Resumen.

Abstract

Retinal detachment (RD) is a major cause of irreversible vision loss due to the neurodegeneration suffered by the photoreceptors because of the separation of the retinal neuronal layer from the retinal pigment epithelium. Microglia cells, the resident macrophages of the central nervous system (CNS), play a key role in the inflammatory response occurred during RD, with both a beneficial and detrimental effect as they have been shown to further the damage done and to enhance the repairment of the damaged tissue. The tumour suppressor protein p53 is crucial for the correct regulation of apoptosis and cell cycle arrest. The p.Arg72Pro single nucleotide polymorphism (SNP) of the gene *TP53* has been described as a modulator of the neurodegenerative processes that occur following a RD. Therefore, the aim of this study was to analyse the influence of this SNP on microglial cell activation following RD. To this end, a humanized knock-in (KI) mouse model for the SNP p.Arg72Pro was used. Gene expression analysis of *Iba1*, *Tmem119*, *Trem2* and *Cx3xr1* by RT-qPCR; and microglia cell counting by immunofluorescence techniques were performed at 3- and 10-days post-surgery. Gene expression trends supported early microglial activation hypothesis. Also, the results showed an increase of microglia cell count in RD compared to controls, with significant differences at both time points. On the other hand, a greater activation of microglia dependent on the Pro variant of the SNP p.Arg72Pro has been also described, fundamentally on day 3. All this allows us to establish the SNP p.Arg72Pro of the *TP53* gene as a crucial biomarker in neurodegeneration following a RD.

Resumen

El desprendimiento de retina (DR) es una importante causa de pérdida irreversible de la visión debido a la neurodegeneración sufrida por los fotorreceptores tras la separación de la capa neuronal de la retina del epitelio pigmentario retiniano. Las células de la microglía, macrófagos residentes del sistema nervioso central (SNC), desempeñan un papel clave en la respuesta inflamatoria producida durante el DR, con un efecto tanto beneficioso como perjudicial, ya que se ha demostrado que son capaces tanto de aumentar el daño causado como de favorecer la reparación tisular. La proteína supresora de tumores p53 es crucial para la correcta regulación de la apoptosis y detención del ciclo celular. El polimorfismo de un único nucleótido (SNP) p.Arg72Pro de *TP53* se ha descrito como un modulador de los procesos neurodegenerativos que ocurren tras un DR. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de este SNP en la activación de la microglía tras un DR. Para ello, se utilizó un modelo murino humanizado knock-in (KI) para el SNP p.Arg72Pro. Se realizó un análisis de la expresión génica de *Iba1*, *Tmem119*, *Trem2* y *Cx3xr1* mediante RT-qPCR; y un recuento de células microgliales mediante inmunofluorescencia a los 3 y 10 días posoperatorios. Las tendencias vistas en la expresión génica respaldaron la hipótesis de la activación microglial temprana. Asimismo, los resultados mostraron un aumento en el conteo de células microgliales en la situación de DR en comparación con los controles, con diferencias significativas en ambos tiempos del experimento. Por otra parte, también se describe una mayor activación de la microglía dependiente de la variante Pro del SNP p.Arg72Pro, fundamentalmente a día 3. Todo ello permite establecer el SNP p.Arg72Pro del gen *TP53* como un biomarcador crucial en la neurodegeneración tras sufrir un DR.

2. Introducción.

2.1. El sentido de la vista: la retina.

El sentido de la vista, uno de los 5 sentidos del ser humano, se encarga de la percepción de los estímulos luminosos (fotones) del entorno que rodea a la persona, transforma esa energía lumínica en un impulso nervioso y lo envía hasta el cerebro, donde se procesa y es interpretado como una imagen. Es importante conocer la anatomía del sentido para poder comprender su funcionalidad y las patologías que le afectan. En el sentido de la vista existen diversos tejidos o estructuras encargadas cada una de realizar una función concreta. A continuación, se detalla brevemente cada una de ellas de acuerdo con la literatura (1). En la Figura 1 (2), aparecen representados estos componentes de manera esquemática:

- Globo ocular: también conocido como el ojo. Es una estructura cuasi-esférica que se aloja en la cavidad orbitaria, tiene unos 24mm de diámetro en un humano adulto y su peso promedio de 7.5g (1). Cuenta, a su vez, con varias estructuras:
 - Córnea: es una capa transparente y curvada que permite la entrada de luz y es la principal encargada del enfoque ocular (1,3,4).
 - Cristalino: es una estructura con forma biconvexa capaz de ajustar su forma para permitir el enfoque de objetos en función de la distancia a la que se hallen. A este proceso se le conoce como acomodación ocular (1,5).
 - Humores acuoso y vítreo: son dos líquidos de consistencia gelatinosa (debido a su contenido en proteínas) y con las características físicas de un fluido no newtoniano, es decir, su viscosidad no permanece constante si no que depende de la tensión o fuerza que se le aplique. Esta propiedad les permite mantener la forma del ojo y, como tienen un alto porcentaje de agua en su composición, facilitan también la refracción de la luz (1,6,7).
 - Iris: es la parte con color del ojo y tiene la capacidad de dilatarse o contraerse a fin de ajustar el tamaño de la pupila (la abertura central) y, con eso, regular la cantidad de luz que entra (1,8).
 - Esclerótica: es la membrana externa del ojo y se caracteriza por ser gruesa, de color blanco, resistente y ser rica en fibras de colágeno. Funcionalmente se encarga de dar forma al globo ocular y proteger los elementos internos del mismo(1,9).
 - Cuerpo ciliar: es una estructura situada entre el iris y la retina y su función es la producción de humor acuoso y permitir la acomodación del cristalino (1,10).
 - Coroides: es una membrana altamente irrigada con vasos sanguíneos y tejido conectivo, con tonalidad oscura por la presencia de melanina y localizada entre la retina y la esclerótica. Su principal función es evitar que la luz rebote de manera indebida dentro del globo ocular. Como curiosidad cabe indicar que el efecto de “ojos rojos” en una fotografía se debe a la reflexión de la luz sobre los vasos sanguíneos de esta capa ocular (1,11).
 - Retina: es la capa más externa del ojo y en ella se encuentra el tejido nervioso capaz de detectar los fotones y transformarlo en el impulso eléctrico que llegará hasta el nervio óptico. Estos fotorreceptores son, principalmente, los conos (perciben los colores y los detalles) y los bastones (detectan la luz tenue). A su vez, dentro de la retina se encuentra la mácula lútea, una zona de

color amarillento rica en conos y que se sitúa en el centro de la retina. Dentro de la mácula se encuentra la fóvea centralis, que es una pequeña depresión dentro de la estructura, pero donde se encuentra, a su vez, la mayor cantidad de conos y, por tanto, es la zona con mayor agudeza visual de todo el ojo (1,12).

- **Nervio óptico y vías visuales:** el nervio óptico, formado por los axones de las neuronas ganglionares que forman la última capa de la retina, recoge los impulsos nerviosos generados en la propia retina y se transportan hacia el cerebro a través de las llamadas “vías visuales”, que incluyen el quiasma óptico (donde se entrecruzan los dos nervios ópticos, derecho e izquierdo, uno por cada ojo), los tractos ópticos y los cuerpos geniculados laterales del metatálamo. Desemboca en la corteza visual del lóbulo occipital (1,12,13).
- **Centros cerebrales:** la corteza visual primaria, también llamada área 17 de Brodmann o simplemente V1, es la región del cerebro encargada de interpretar los estímulos nerviosos y combinarlos para formar imágenes (1,14).

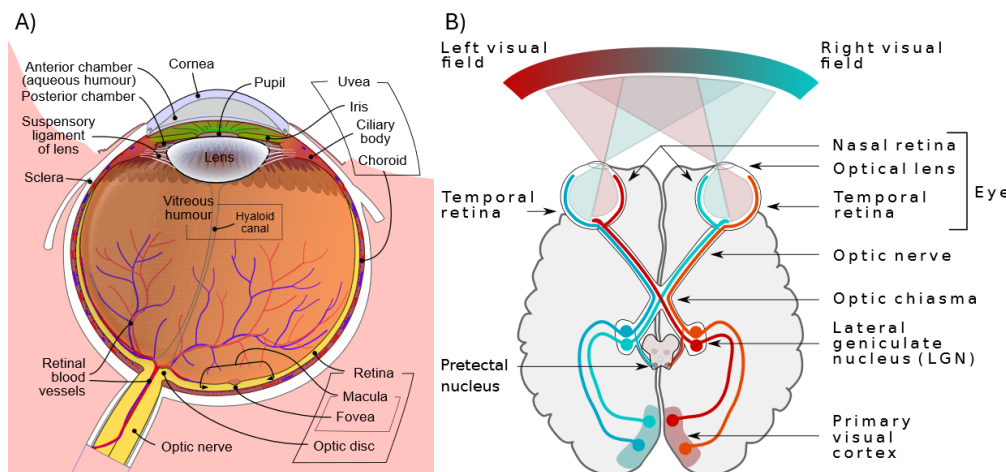


Figura 1. Esquema del sentido de la vista humano (2). A) El ojo y sus componentes. B) Componentes del sistema visual.

La retina es un tejido neurosensorial altamente especializado formado por 10 capas organizadas con precisión para captar, procesar y transmitir la información visual hasta el cerebro. En la Figura 2 (1), se puede ver la estructura por capas de la retina, así como las células presentes en cada una. La capa más externa (entendiéndose como aquella que se encuentra en la cara más posterior del globo ocular) es el epitelio pigmentario de la retina (RPE) (Figura 2-1) y está formada por una monocapa de células densamente empaquetadas con gránulos de pigmento cuya función es la de nutrir y proteger a los fotorreceptores. A continuación, se sitúa la capa de células fotorreceptoras (Figura 2-2), formada por los segmentos más externos de los conos y bastones. En tercera posición está la mal llamada membrana limitante externa (Figura 2-3), ya que realmente no es una membrana si no una zona rica en uniones adherentes entre los fotorreceptores y las células de Müller y su función es la de dar soporte estructural a la retina. Detrás de ella están las capas nuclear (Figura 2-4) y la capa plexiforme (Figura 2-5) externas (ONL y OPL respectivamente). La nuclear alberga los núcleos de los conos y los bastones; mientras que en la capa plexiforme estos fotorreceptores están estableciendo conexiones sinápticas con las células bipolares y horizontales, iniciándose así la integración de la señal visual. Detrás de ellas se encuentra la capa

nuclear interna (INL) (Figura 2-6), donde se sitúan los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas y de Müller; y tras esta capa se localiza la zona de sinapsis entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares, en la conocida como capa plexiforme interna (IPL) (Figura 2-7). En octavo lugar se encuentra la zona de células ganglionares (GCL) (Figura 2-8), las cuáles son las neuronas encargadas de transmitir el impulso nervioso generado por los fotorreceptores hasta el cerebro a través de sus axones, los cuales se agrupan en la capa de las fibras nerviosas (Figura 2-9) para formar el nervio óptico. Por último, se encuentra la membrana limitante interna (Figura 2-10), compuesta por la zona terminal de las células de Müller y cuya función es la de separar la retina del humor vítreo y contribuir a la integridad estructural del tejido. En definitiva, esta arquitectura tan compleja que conforma la retina es lo que le permite actuar de manera tan precisa a la hora de captar las señales lumínicas y transformarlas para que puedan ser procesadas en el cerebro (1).

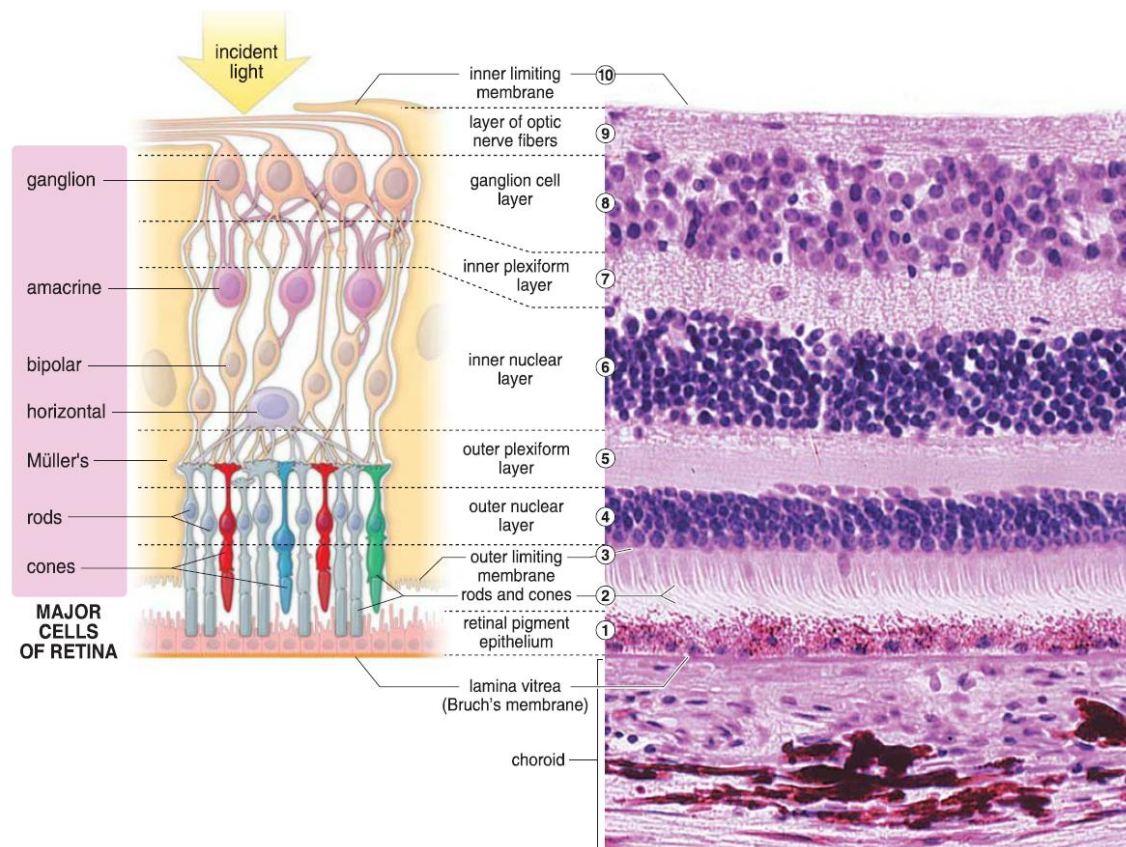


Figura 2. Estructura de las capas de la retina (1). Izquierda: Ilustración con los principales tipos celulares presentes en cada capa retiniana. Derecha: Microfotografía de la retina con tinción hematoxilina-eosina (HE) 440X.

2.2. Neurodegeneración retiniana y desprendimiento de retina.

Existe un grupo de patologías neurodegenerativas de etiología heterogénea que afectan a la retina y cuyo nexo común es la degeneración y pérdida progresiva de células neuronales retinianas, concretamente, de los fotorreceptores y de las células ganglionares. Comúnmente, los pacientes que sufren de dichas enfermedades sufren una pérdida gradual e irreversible de la visión; con el agravante de que los tratamientos actuales suelen ser caros y no logran buenos resultados, en la mayoría de los casos solo se frena el progreso (15,16). Entre las patologías más frecuentes se encuentran la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (17), la retinitis pigmentosa (16), la retinopatía diabética proliferativa (18), el glaucoma (19) y el desprendimiento de retina. Todas estas enfermedades implican profundas alteraciones estructurales y funcionales de la retina, donde la disrupción del microambiente neuronal y vascular desencadena procesos de muerte celular programada (mayormente por apoptosis de fotorreceptores y células ganglionares) e inflamación crónica (15).

La inflamación crónica, mediada por la activación de la microglía y la gliosis reactiva de las células de Müller y los astrocitos, contribuye a amplificar el daño tisular mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores neurotóxicos (15,20).

Además, estos procesos patológicos se suelen ver acompañados de una remodelación de la arquitectura retiniana, que incluye reorganización sináptica aberrante, migración celular y, en fases avanzadas, neovascularización patológica, tal y como sucede en la retinopatía diabética o la degeneración macular exudativa (15,18,21).

En conjunto, esta sucesión de eventos neurodegenerativos y de remodelación arquitectónica compromete la posibilidad de la recuperación funcional y estructural de la retina, planteándose, así como un reto cuyo advenimiento es crucial de cara al desarrollo de nuevas terapias y tratamientos eficaces.

La Academia Americana de Oftalmología (AAO) define el desprendimiento de retina (DR) como la patología ocular en que la retina se separa de la parte posterior del ojo, haciendo que ésta no funcione y el paciente sufra una visión borrosa que irá empeorando gradualmente, pudiendo llegarse incluso a la pérdida total de la visión del ojo afectado (22). Se trata, pues, de una urgencia médica que ha de ser tratada con la mayor brevedad posible, puesto que cursa con una degeneración irreversible de las células fotorreceptoras. A nivel anatómico, la retina neurosensorial (es decir, los segmentos ONL y OPL, donde se encuentran los conos y bastones) es la que se separa del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y esto causa que se produzca una hipoxia y no lleguen nutrientes suficientes a la retina, con lo que se produce la muerte celular (23).

Tal y como se observa en la Figura 3, existen 3 tipologías de DR clasificadas atendiendo al fenómeno que lo causa:

- Desprendimiento de retina regmatógeno (DRR): es el DR más frecuente entre la población. Ocurre cuando se producen fuerzas de tracción asociadas con la separación del humor vítreo de la retina, y esto causa que se forme un pequeño agujero o ruptura en la propia retina, entrando así líquido vítreo en el espacio entre el RPE y la retina, produciéndose así el DR (23).
- Desprendimiento de retina por tracción (DRT): es un tipo de DR que se asocia habitualmente a la retinopatía diabética proliferativa, la última fase de la retinopatía que se produce al padecer una diabetes mal controlada. Este tipo de

DR se caracteriza por la aparición de membranas fibróticas en la superficie de, dentro de, o detrás de la retina. La contracción de las membranas fibróticas es lo genera la distorsión de la anatomía retiniana (23).

- Desprendimiento de retina exudativo o sérico (DRE): es un tipo de DR de origen más idiopático y comúnmente asociado a procesos inflamatorios, neoplasias o lesiones vasculares. Al igual que en el DRR el DR se produce debido a la acumulación de líquido entre la retina y el RPE, pero con la salvedad de que en el DRE no se ha producido ningún agujero o fisura de la retina previo (23).

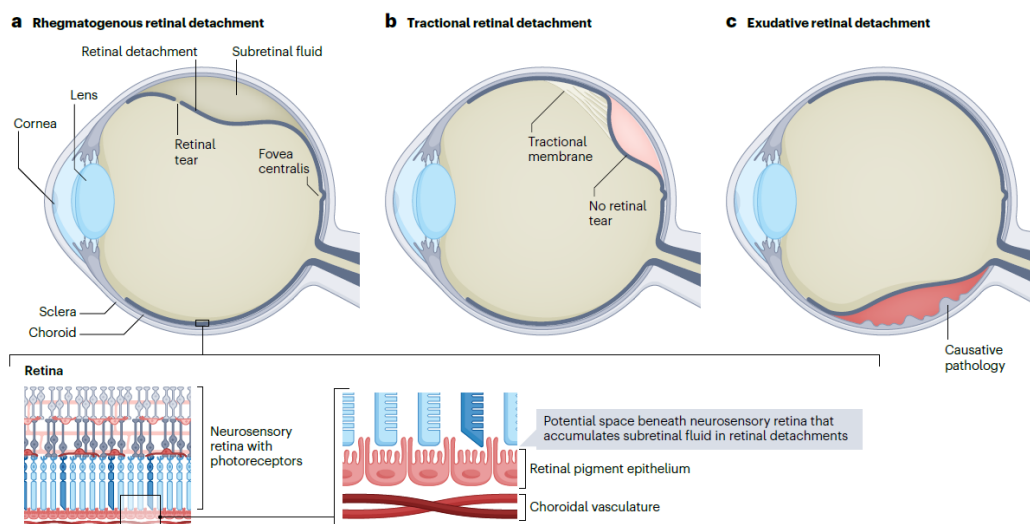


Figura 3. Clasificación de los tipos de DR según la patología causante. A) DRR. B) DRT. C) DRE. La figura se ha extraído del trabajo de revisión publicado por Lin *et al*, 2024 (23).

2.3. Células de la Glía en la retina.

La retina, además de contar con neuronas especializadas como los fotorreceptores, las células ganglionares y las células bipolares, cuenta con un sistema de soporte celular esencial al formar parte del SNC: la glía. La glía es una red celular conformada principalmente por 3 tipos de células: los astrocitos (21), las células de Müller (24) y la microglía (21). Las células de Müller constituyen la glía principal de la retina, distribuyéndose a lo largo de todo su espesor, otorgando soporte estructural, regulación del ambiente extracelular y contribuyendo a la homeostasis iónica y metabólica (24). Por su parte, los astrocitos, localizados en la capa de fibras nerviosas, se encargan del soporte vascular y forman, junto a las células endoteliales de la retina, la llamada barrera hematorretiniana (BHR) (21,25). Por último, se encuentra la microglía, caracterizadas en 1919 por el vallisoletano Pío del Río Hortega, al discernir el “tercer elemento” de los centros nerviosos que, su mentor, Ramón y Cajal no pudo distinguir; de ahí que también se conozcan como células de Hortega. La microglía es un tipo de macrófagos residentes de la retina y SNC (26). En condiciones fisiológicas, las células microgliales se mantienen en estado de vigilancia, ejerciendo un papel clave en la homeostasis tisular al estar realizando un escaneo constante en busca de daño (27,28), momento en el que se activan, proliferan y migran hacia la zona lesionada, donde liberan citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (29). Esta liberación de

químicos tiene consecuencias ambivalentes, sobre todo en el DR, ya que, si bien se ha visto que tiene efectos beneficiosos a corto plazo(30), también puede ser la responsable de un agravamiento de la neurodegeneración si la respuesta inmune se desregula o se prolonga demasiado en el tiempo (31).

La neurodegeneración retiniana producida en el DR es un proceso patológico muy complejo de estudiar debido a la cantidad y diversidad de componentes implicados, tales como los diferentes tipos de muertes celulares (apoptosis, necrosis, ferroptosis...); la inflamación aguda al inicio del DR y que acaba cronificándose; y el estrés oxidativo producido debido a la hipoxia y los procesos autofagocíticos debidos a la detención en la llegada de nutrientes a las células (23).

2.4. Factores genéticos en el desprendimiento de retina. Gen *TP53*.

El DR es una urgencia oftalmológica caracterizada por la separación de la retina neurosensorial del epitelio pigmentario, dando lugar a una cascada de procesos neurodegenerativos que comprometen la viabilidad de los fotorreceptores (32). Aunque los factores anatómicos y traumáticos son determinantes para su aparición, cada vez se cuenta con un mayor número de evidencias científicas de que la evolución clínica del DR, así como de la aparición de complicaciones tales como la vitreorretinopatía proliferativa (VRP), se encuentran condicionadas por factores genéticos (32). En la literatura científica se pueden encontrar estudios que identifican variantes genéticas capaces de modular la respuesta inflamatoria, la fibrosis e incluso la reparación tisular. Entre los genes descritos se encuentran *MMP2*, *MMP9*, *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , y *TP53* (32,33).

Por ejemplo, los polimorfismos descritos para las proteínas metaloproteasas de matriz *MMP2* y *MMP9*, se han asociado con una mayor predisposición a la formación de membranas epirretinianas; mientras que las variantes genéticas de los genes proinflamatorios (*IL-1 β* , *IL-6* y *TNF- α*) se han vinculado a un mayor aumento de citoquinas proinflamatorias, induciendo en una fibrosis más exacerbada (32,33).

Destaca entre estos factores genéticos el gen *TP53*. Este gen se sitúa en el cromosoma 17p13.1 y codifica para la proteína p53, cuya función clave en la regulación de la muerte celular programada y los procesos de parada del ciclo celular para permitir la reparación del ADN (y, por extensión, es fundamental también para la reparación tisular) le han otorgado el apodo de “el guardián del genoma” (34,35). La variante rs1042522 de *TP53* es la más estudiada para este gen, y se trata del polimorfismo de un único nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) *TP53* p.Arg72Pro, asociado en la literatura con una modificación estructural y funcional de la proteína resultante (34).

La proteína p53, tal y como se observa en la figura 4, es un factor de transcripción compuesto por varios dominios funcionales. En la región amino-terminal se encuentra el dominio de transactivación; en la zona central se encuentra una región rica en prolinas seguida del dominio de unión a ADN característico de la superfamilia P53; y en la región carboxilo terminal se encuentra la señal de localización nuclear (NLS), el dominio de tetramerización, la señal de exportación nuclear (NES) y un dominio básico terminal (36).

Es dentro de esta región rica en prolinas, en el codón 72 (CGC), donde se produce la mutación que genera el SNP p.Arg72Pro al mutar la guanina (G) por una citosina (C). El nuevo codón (CCC) durante el proceso de traducción implica que se incorpore una prolina (Pro) en lugar de la arginina (Arg) original. Esta sustitución se localiza cerca del dominio de transactivación, con funcionalidad proapoptótica, por lo

que desde su caracterización ha sido objeto de estudio al haberse hipotetizado que podría tener importancia a la hora de controlar la apoptosis y/o el secuestro del ciclo celular en respuesta a estímulos de estrés celular (34).

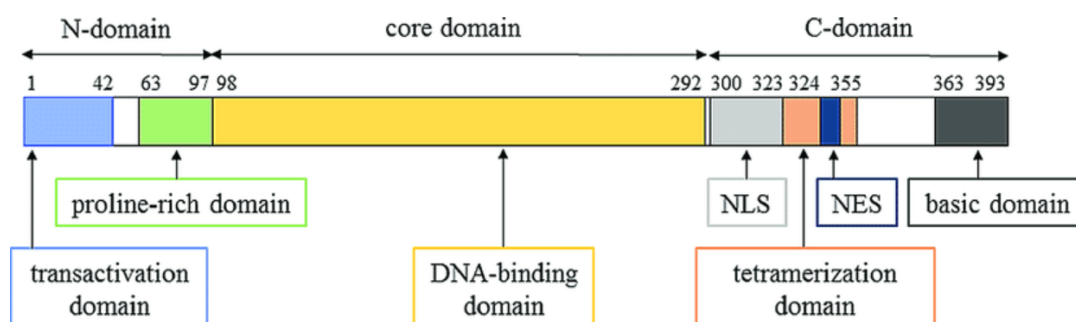


Figura 4. Motivos estructurales y dominios funcionales de p53. Extraído de Tanaka *et al* (36).

Diversos estudios han relacionado la variante *wild type* (WT), es decir, la variante con Arg72, con una mayor eficacia a la hora de inducir la apoptosis por la vía mitocondrial con respecto a la variante Pro72, que se ha relacionado con un efecto más preventivo a la hora de causar una parada del ciclo celular y fomentar la reparación del ADN (37). Parece, por tanto, que el SNP p.Arg72Pro puede ser un factor de riesgo o de protección en diversas patologías y con ello se le está dando una alta relevancia clínica.

Existen también evidencias recientes que han relacionado el polimorfismo p.Arg72Pro con el pronóstico de los pacientes tras sufrir un DR. Concretamente, los hallazgos descritos asociaron la variante Pro72 a una mayor preservación de la integridad de los fotorreceptores y una reducción de los niveles de apoptosis tras DR (38). Además, la variante del SNP Pro72 se ha vinculado también a una respuesta proinflamatoria más intensa tras producirse el DR, habiéndose visto una mayor activación de las células de Müller, agentes clave en la regulación de la homeostasis de la retina y la amplificación de la inflamación (38).

Por tanto, todos estos hallazgos descritos en la literatura sugieren que el SNP p.Arg72Pro podría modular de forma diferencial la respuesta inflamatoria y la activación glial tras el DR, justificándose así la necesidad de profundizar en el estudio de la microglía como mediadora clave en este proceso.

3. Hipótesis de trabajo y objetivos.

3.1. Hipótesis.

El SNP p.Arg72Pro del gen *TP53* podría tener un impacto sobre el grado de activación de la microglía durante la neurodegeneración de la retina tras un DR.

3.2. Objetivo general.

El objetivo de este trabajo es comprender y analizar la influencia del SNP p.Arg72Pro de *TP53* tras un DR inducido en un modelo murino humanizado.

4. Materiales y Métodos.

4.1. Modelo murino de desprendimiento de retina inducido.

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) humanizados *knock-in* (KI) *TP53* Pro72 y *TP53* Arg72 cedidos por el laboratorio de la Dra. Almeida Parra del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) (39). Se siguieron las directrices para el manejo de animales propuestas por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO por sus siglas en inglés), que incluyen el principio de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) y la minimización del número de animales de experimentación pero que permita obtener resultados fiables y precisos. Los ratones fueron criados y mantenidos en el Servicio de Bienestar Animal e Investigación de la Universidad de Valladolid de acuerdo con el RD 53/2013 que regula la legislación actual a nivel nacional. Todos los experimentos con animales de laboratorio se llevaron a cabo cumpliendo todas aquellas normativas y políticas internacionales aplicables, incluyendo la Directiva Europea para la protección de los vertebrados utilizados con fines experimentales y científicos (2010/63/EU) promulgada en 2010 por el Parlamento Europeo. Asimismo, el Comité Institucional de la Universidad de Valladolid para el Cuidado y Uso de Animales revisó y aprobó los experimentos realizados.

Este modelo experimental de DR se indujo en ratones macho *TP53* Pro72 KI y *TP53* Arg72 KI humanizados de 12 semanas siguiendo el protocolo descrito por Matsumoto *et al* (40). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano 3% (Isovet, Braun) en una cámara de inducción con una tasa baja de flujo de gas fresco (SomnoSuite, Kent Scientific). Para el mantenimiento de la anestesia se utilizó isoflurano 1.5% a través de una mascarilla de inhalación. El DR se realizó en el ojo derecho (OD) con la ayuda de un microscopio quirúrgico. Se administró tópicamente ciclopentolato 1% (Alcon, Bélgica) y fenilepinefrina 2.5% (Sigma) a fin de inducir midriasis; y oxibuprocaina 0.2% (Benoxi, Unimed Pharma Ltf) como anestésico local. La conjuntiva temporal se desprendió de la esclera mediante una incisión. Utilizando una aguja de calibre 30 y con el bisel hacia arriba, se realizó una esclerotomía de 1mm posterior al limbo, creándose así el túnel escleral. Con otra aguja de calibre 30 se realizó una paracentesis con el objetivo de reducir la presión intraocular. Se insertó una aguja de calibre 33 conectada a una jeringa y bomba de 10µL NanoFil (World Precision Instruments) en el espacio subretinal con el bisel hacia abajo y se inyectaron 4µL de una solución de hialuronato de sodio al 1%, desprendiendo la retina del epitelio regmatopigmentario (RPE). Por último, se aplicó sobre la herida escleral un pegamento quirúrgico de cianoacrilato (Webglue, Patterson Veterinary) y la conjuntiva se resituó en la posición original. Posteriormente, se excluyeron aquellos ojos que presentaron hemorragia subretinal o tras el análisis se vio que el DR inducido fue fallido. Tras la cirugía, los animales fueron depositados en un ambiente cálido para favorecer la recuperación. Una loción tópica de ciprofloxacina (Alcon®) se administró cada 24h tras la cirugía de manera diaria. El ojo izquierdo (OI) de cada ratón se utilizó como control negativo. Los animales se sacrificaron una vez transcurridos 3 y 10 días desde la intervención quirúrgica mediante dislocación cervical y se enuclearon ambos ojos de cada ratón para su posterior análisis de expresión génica e inmunofluorescencia. Se adjunta un esquema básico del protocolo seguido durante la cirugía en Figura 5 A; y del flujo temporal de los experimentos realizados *ex vivo* en la figura 5 B.

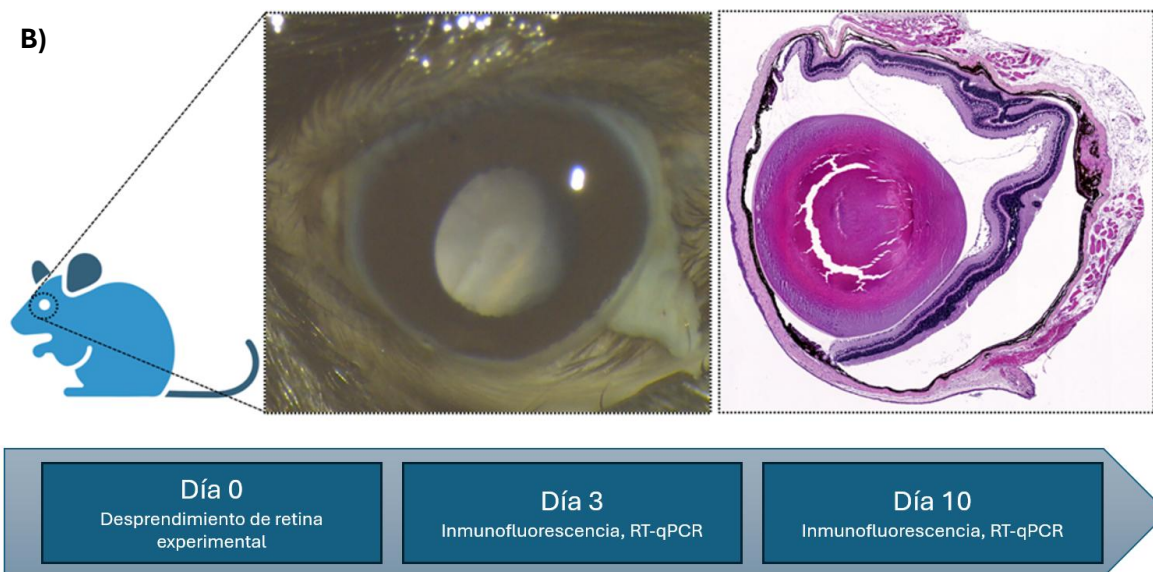
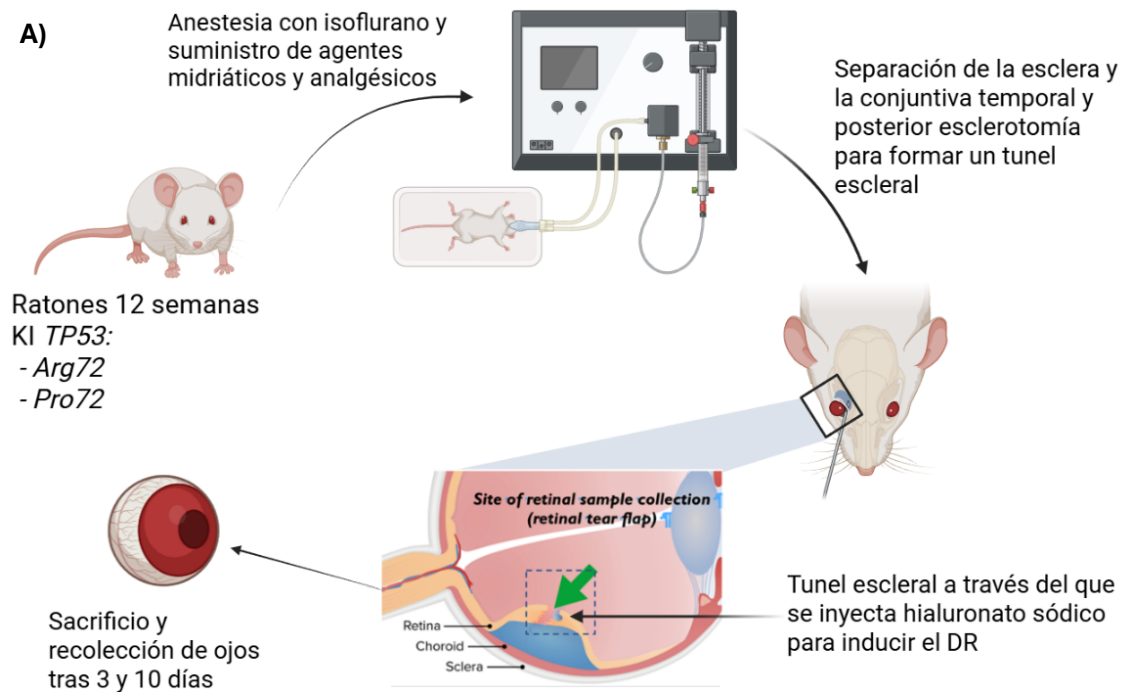


Figura 5. Esquema del flujo de trabajo seguido para la inducción experimental del DR (A) y los análisis *ex - vivo* realizados 3 y 10 días después (B). Esquema realizado con la herramienta BioRender.

4.2. Extracción de ARN total, transcripción reversa y PCR a tiempo real cuantitativa.

El ARN se extrajo de las muestras utilizando el mini kit *PureLink RNA* de Invitrogen. Tras su extracción, se sintetizó el ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa utilizando el kit de alta capacidad de Applied Biosystems. Con una PCR a tiempo real de cuantificación relativa (RT-qPCR) utilizando la *Master Mix* de SYBR Green (Applied Biosystems) y un conjunto de primers (cuyas secuencias diseñadas se pueden encontrar en la tabla 1 del material suplementario) se realizó la amplificación del ADNc para el estudio de los siguientes genes de interés: *Iba1*, *Tmem119*, *Trem2* y *Cx3cr1*.

Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C durante 10min; 40 ciclos de 95°C durante 15s y 60°C durante 1min; y un último paso para realizar la curva de *melting*. Como gen endógeno se utilizó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), una proteína con actividad enzimática en la glicolisis y de naturaleza ubicua. El umbral de detección se identificó de manera individualizada para cada reacción, y la expresión de los genes se realizó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (41). Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado y se realizó sobre un total de 24 muestras de ojos del modelo de DR experimental murino (12 tras 3 días de la intervención y otras 12 a los 10 días).

4.3. Caracterización inmunohistoquímica.

La caracterización inmunohistoquímica se realizó en las muestras de retina de ratón tras inducirseles de manera quirúrgica un DR, observadas en ratones sacrificados tras 3 y 10 días desde la intervención. El tejido se fijó con paraformaldehído al 4% (Panreac Química) en tampón fosfato (PBS) (Gibco) 1X y se dejó durante 1h a temperatura ambiente (RT). Tras ello, se lavaron las muestras con PBS 1X durante 10 minutos y a RT. Terminados el lavado, se introdujeron las muestras en tubos Eppendorf siguiendo un gradiente de sacarosa secuencial: sacarosa al 15% en PBS 1X durante 1h a RT; sacarosa al 20% en PBS 1X durante 1h a RT; y sacarosa al 30% en PBS 1X *overnight* a 4°C. A la mañana siguiente, las muestras se embebieron en OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek) empleando moldes de inclusión de plástico y un cristizador con hielo seco para congelar las muestras rápidamente a -80°C tras añadir el OCT. Con la ayuda de un criostato, se devastaron las muestras hasta llegar a la zona de la retina, se seccionaron en láminas de 17µm y se observaron en una lupa para comprobar el buen estado del corte y confirmar la presencia de retina en el mismo.

Las secciones de retina se incubaron durante 1h a 37°C y posteriormente se atemperaron a RT durante 10min para prevenir el desprendimiento de muestra del portaobjetos durante el proceso de inmunohistoquímica. Durante este periodo se prepararon la solución de lavado, compuesta por Tritón X-100 0.3% (Thermoscientific Invitrogen) en PBS 1X; y la solución de bloqueo, compuesta por suero normal de cabra (NGS) al 5% en solución de lavado. Cuando se atemperó la muestra, se realizó un primer lavado con solución de lavado a RT durante 10 minutos, se secaron y marcaron las muestras con un rotulador hidrofóbico (Thermoscientific Invitrogen). A continuación, se incubaron las muestras en solución de bloqueo durante 1h a RT. En el tiempo de espera, se preparó la solución con el anticuerpo primario. El anticuerpo utilizado fue un anti-iba1 de conejo (Ref.: 019-19741, Wako) diluido 1:500 en solución de lavado. Tras

haber finalizado la fase de bloqueo, se secaron las láminas con las muestras con cuidado, se añadió la solución de anticuerpo primario y se incubó *overnight* a RT. La mañana siguiente, se secaron las láminas y se realizó un lavado con solución de lavado durante 5min a RT. Después se realizó un segundo secado y se añadió la solución con el anticuerpo secundario. En este caso se usó un anticuerpo IgG cabra anti-conejo (H+L) marcado con Alexa Fluor 488 (Ref.: A11008, Thermoscientific Invitrogen) diluido 1:200 en solución de lavado. Se incubó con el anticuerpo secundario durante 2h a RT y en oscuridad. Por último, se secaron las láminas, se realizó un lavado con solución de lavado durante 5min a RT, se volvieron a secar y se incubaron durante 5min a RT con DAPI (Sigma-Aldrich) a 10µg/mL diluido en agua destilada. Por último, se lavó con solución de lavado durante 5min a RT, y tras haberse secado por última vez, se montaron con los cubreobjetos utilizando el producto Fluoromount-G (Thermoscientific Invitrogen).

Las imágenes de fluorescencia se tomaron utilizando un microscopio de fluorescencia y se analizaron utilizando el software Leica LAS AF.

4.4. Análisis estadístico.

Las variables cuantitativas continuas se han expresado como la media $\pm$ desviación estándar (SD). Para comprobar su distribución, se ha recurrido a la prueba de Kolmogórov-Smirnov. En función de si los datos disponían de carácter paramétrico o no, se han aplicado distintos enfoques: un análisis de la varianza (ANOVA) para aquellos que son paramétricos y la prueba de Mann-Whitney para comparar dos grupos de datos no paramétricos. Fueron considerados como significativos aquellos resultados con valores p inferiores a 0.05.

5. Resultados.

Para analizar el nivel de activación de la microglía tras un DR, se analizó el nivel de expresión de los genes *Iba1* (*Ionized calcium-binding adapter molecule 1*), que es un marcador de microglía independientemente de encontrarse estas células en estado de reposo o activo (42); *Tmem119* (*Transmembrane protein 119*), seleccionado por ser un marcador específico de microglía residente del SNC y permite distinguirla de macrófagos u otras células infiltrantes (43); *Trem2* (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), que sirve como marcador de la actividad de las células gliales al encargarse de la regulación funcional de estas (44); y *Cx3cr1* (*CX3C chemokine receptor*), elegido por ser una proteína que media la comunicación entre neuronas y microglía, aunque también se ha encontrado en monocitos, macrófagos y células NK (45).

Los resultados mostraron que a los 3 días tras el DR existe una tendencia a que haya una mayor expresión de los genes *Iba1* y *Cx3cr1* (Figura 6 A,B); mientras que en la expresión de los genes *Tmem119* y *Trem2* (Figura 6 C,D) no se observó esta tendencia. La ausencia de significancia estadística probablemente se debe a la gran desviación estándar observada en el grupo control. Los resultados y p-valor detallados se muestran en la Tabla 2 suplementaria.

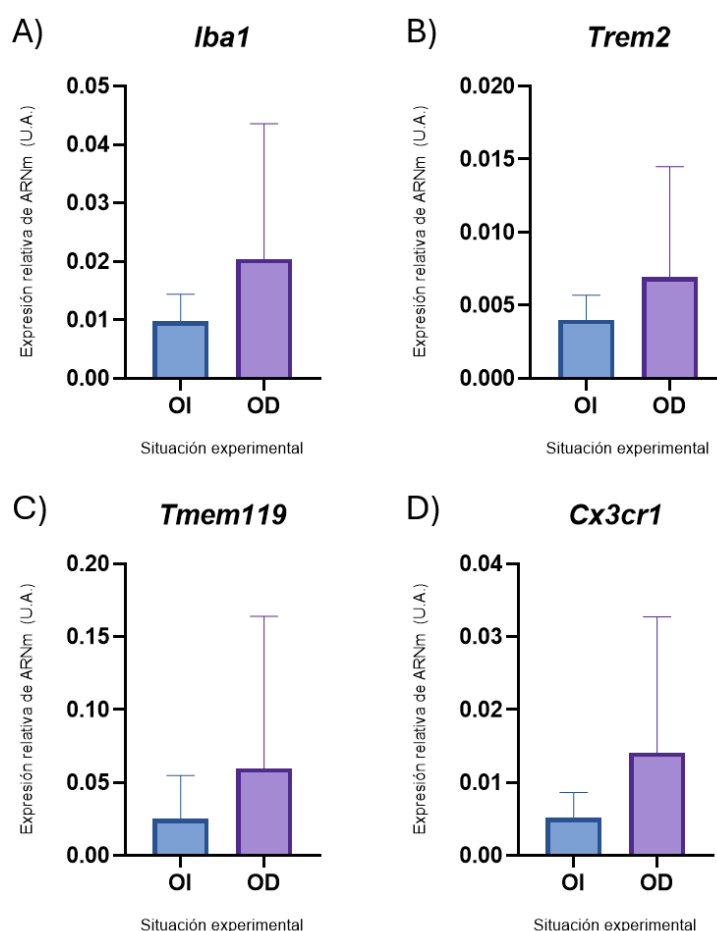


Figura 6. Expresión relativa de genes relacionados con activación de células de la microglía en OD (situación de DR) y OI (control) tras 3 días desde el DR. Los genes estudiados son *Iba1* (A), *Cx3cr1* (B), *Tmem119* (C) y *Trem2* (D).

Por otra parte, también se analizó la distribución de la proteína Iba1. Esta proteína, también conocida AIF-1, es una proteína de 17kDa citoplasmática específica de las células microgliales (y algunas poblaciones de macrófagos) que sirve como marcador de activación microglial. Su función fisiológica es la unión a la actina y a calcio mediante un motivo mano-EF, por lo que interviene en los procesos de activación y migración celular, así como en la homeostasis del calcio intracelular en las células en las que se expresa (42,46–49).

Los resultados mostraron que, a 3 días tras el DR, la inmunoexpresión de Iba1 fue estadísticamente mayor en los ojos que han sufrido un DR (Figura 7). Particularmente se observó una mayor expresión en las capas IPL, OPL, donde se encuentran habitualmente; así como en las capas INL, ONL, y GCL. Los resultados del conteo celular se recogen en la Tabla 3 suplementaria.

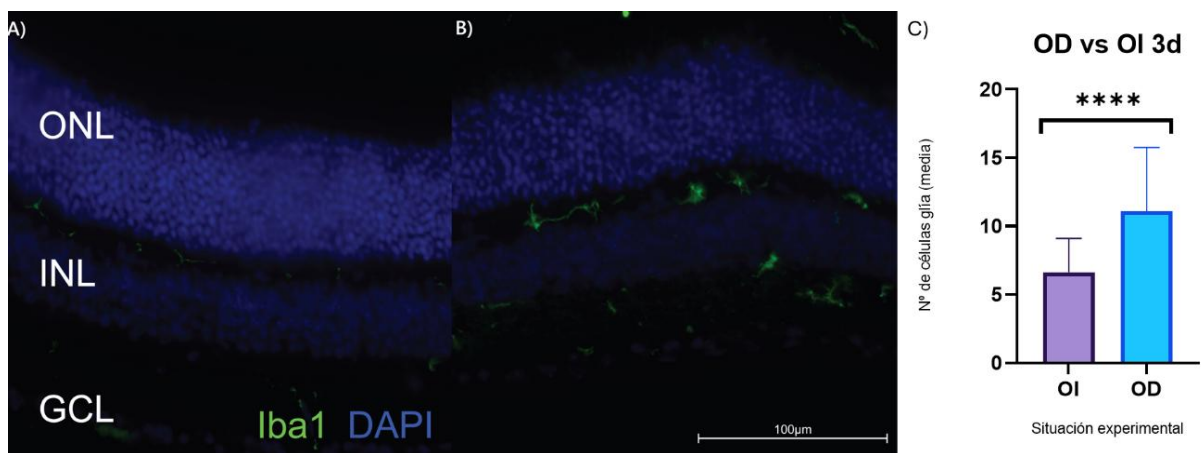


Figura 7. Experimento de inmunofluorescencia para OI y OD tras 3 días desde el DR inducido. A) OI (control) B) OD (DR inducido) C) Estadística del conteo de las células microgliales presentes en las capas de la retina.

Posteriormente, se procedió al análisis de las muestras recolectadas de 12 ratones sacrificados a los 10 días tras la intervención quirúrgica. Los resultados de la comparativa entre OD y OI, recogidos en la Figura 8, mostraron que no existían diferencias en los niveles de expresión relativa de los diferentes genes estudiados. Los resultados y p-valor detallados se hallan en la Tabla 2 suplementaria.

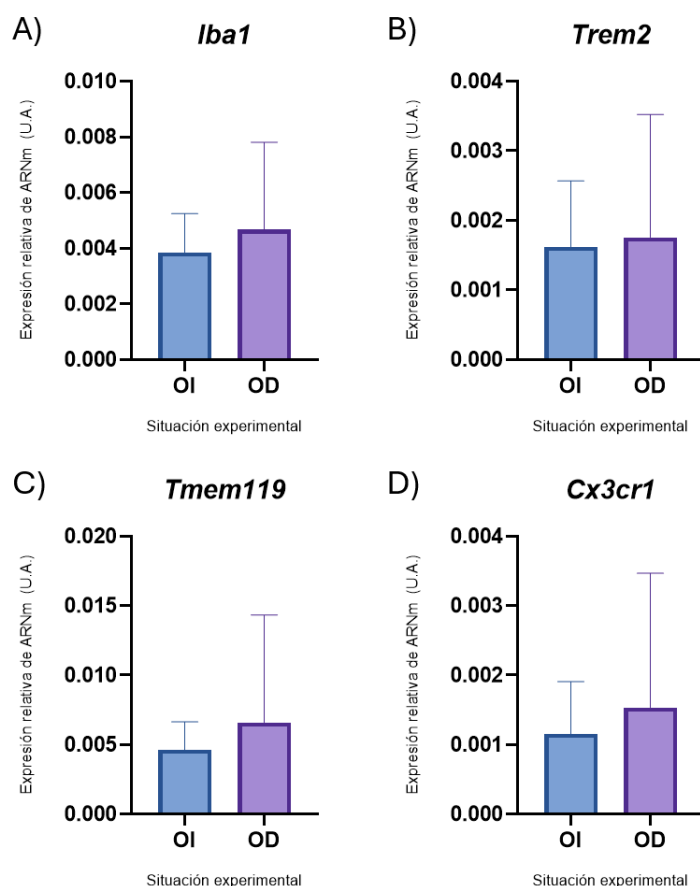


Figura 8. Expresión relativa de genes relacionados con activación de células de la microglía en OD y OI tras 10 días desde el DR. Los genes estudiados son *Iba1* (A), *Cx3cr1* (B), *Tmem119* (C) y *Trem2* (D).

En la prueba histológica, se examinó mediante inmunofluorescencia los cortes retinianos obtenidos de dos nuevos ratones sacrificados al décimo día post-DR inducido. Se cuantificaron las células microgliales y analizaron las microfotografías realizadas al microscopio (Figura 9 A, B). Con los resultados del análisis se observó un aumento en el número de células de microglía presentes en el OD frente al control (OI) (Figura 9 C). Los resultados del conteo celular se recogen en la Tabla 3 suplementaria.

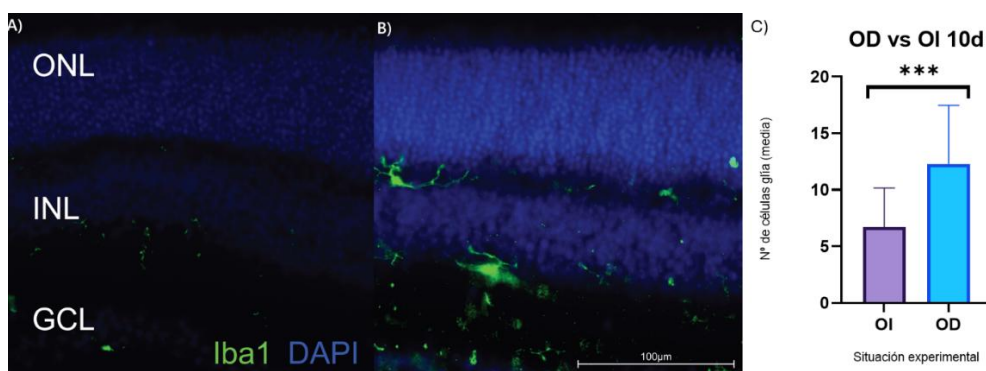


Figura 9. Experimento de inmunofluorescencia para OD y OI tras 10 días desde el DR. A) OI (control) B) OD (DR inducido) C) Estadística del conteo de las células microgliales presentes en las capas de la retina.

En paralelo, se realizaron los mismos análisis de expresión génica relativa mediante RT-qPCR e inmunofluorescencia, pero atendiendo al genotipo al que pertenecía cada ratón, pudiendo ser Arg72 o Pro72. En ambos casos se compararon situaciones de DR inducido (es decir, se estudiaron los OD de cada genotipo posible).

En el estudio de RT-qPCR para las 24 muestras de Arg72 y Pro72 tras 3 días desde el DR, tal y como se muestra en la Figura 10, se observó una tendencia a una mayor expresión de los genes marcadores de la activación de células microgliales en los ratones Pro72 con respecto a los ratones Arg72. En el grupo Pro72 se observó una desviación estándar elevada, lo cual puede que supusiera la ausencia de significancia estadística. Los resultados y p-valor detallados se hallan en la Tabla 2 suplementaria.

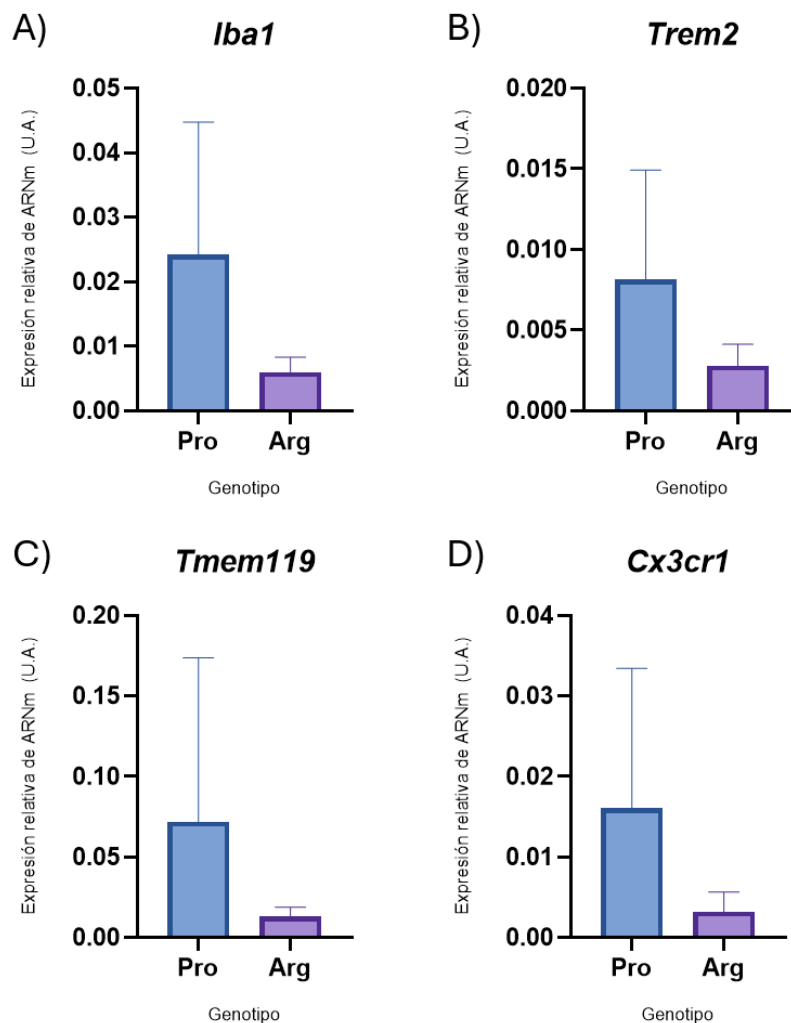


Figura 10. Expresión relativa de genes relacionados con activación de células de la microglía en un ratón Arg72 y un ratón Pro72 tras 3 días desde el DR inducido. Los genes estudiados son *Iba1* (A), *Cx3cr1* (B), *Tmem119* (C) y *Trem2* (D).

Tras el ensayo de inmunofluorescencia, se halló un mayor número de células microgliales en los cortes de retina procedentes de ratones Pro72 en comparación con las encontradas en los ratones Arg72, tal y como se puede observar en la Figura 11 (A-C). Los resultados del conteo celular se recogen en la Tabla 3 suplementaria.

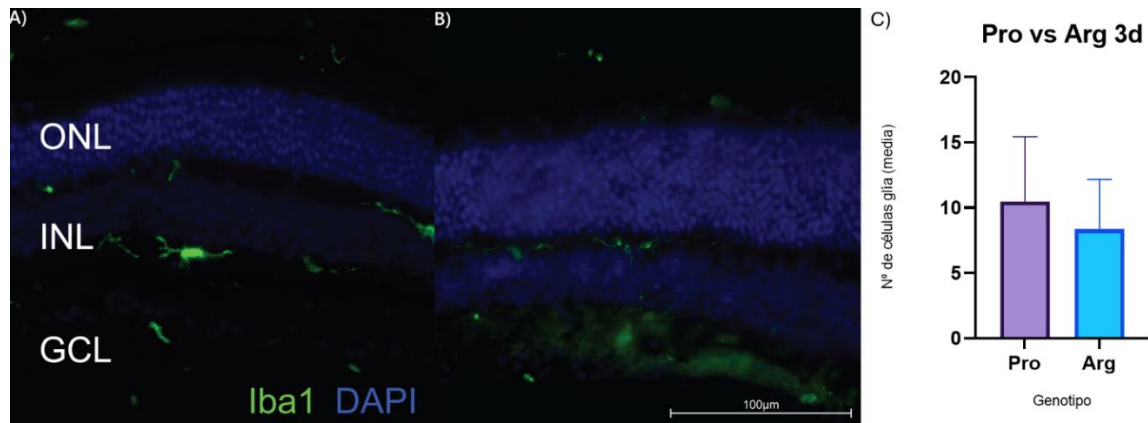


Figura 11. Experimento de inmunofluorescencia para un ratón Arg72 y un ratón Pro72 tras 3 días desde el DR. A) Pro72, B) Arg72, C) Estadística del conteo de las células microgliales presentes en las capas de la retina.

En el análisis de RT-qPCR que se realizó con las muestras de retina de ratones Arg72 y Pro72 a los 10 días tras la inducción del DR, de acuerdo con los datos representados en la Figura 12 no se observó ninguna variación entre la expresión génica de los ratones Pro72 en comparación con la expresión genética de los ratones Arg72. Los resultados y p-valor detallados se hallan en la Tabla 2 suplementaria.

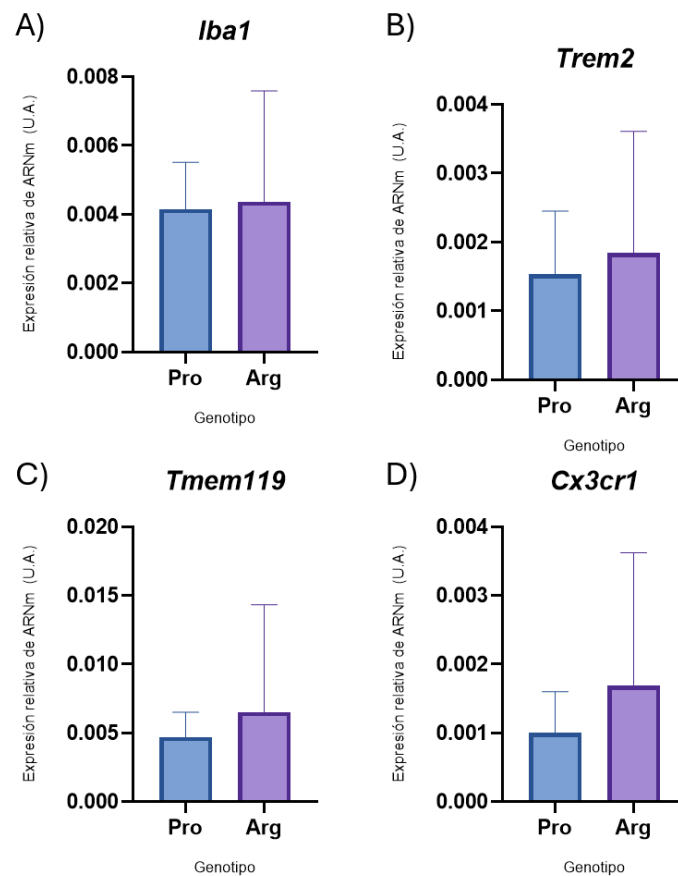


Figura 12. Expresión relativa de genes relacionados con activación de células de la microglía en un ratón Arg72 y un ratón Pro72 tras 10 días desde el DR inducido. Los genes estudiados son *Iba1* (A), *Cx3cr1* (B), *Tmem119* (C) y *Trem2* (D).

En cuanto al ensayo de inmunofluorescencia, se detectó una ligera tendencia a una mayor presencia de células microgliales en los cortes retinianos correspondientes a los ratones Arg72 en comparación con los ratones Pro72, como puede apreciarse en la Figura 13. Los resultados del conteo celular se recogen en la Tabla 3 suplementaria.

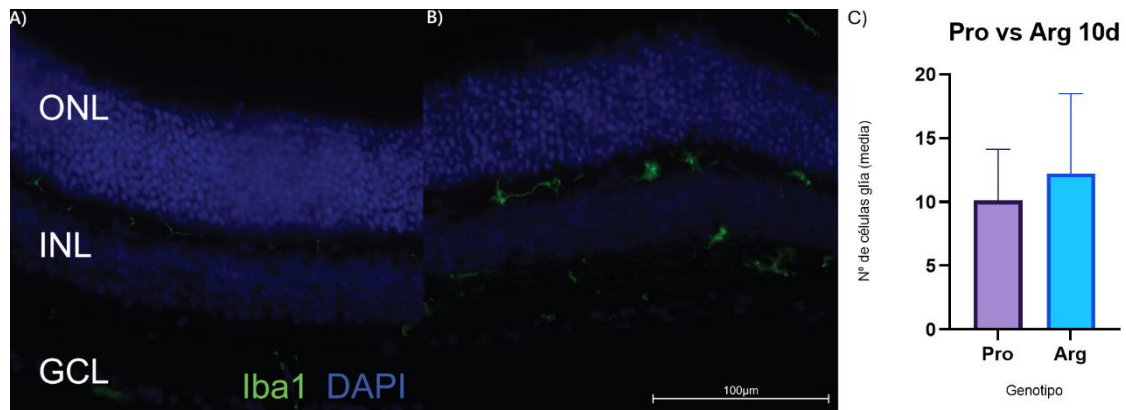


Figura 13. Experimento de inmunofluorescencia para un ratón Arg72 y un ratón Pro tras 10 días desde el DR. A) Pro72, B) Arg72, C) Estadística del conteo de las células microgliales presentes en las capas de la retina.

6. Discusión.

El DR es una de las principales causas de pérdida de visión irreversible. Tras producirse la separación de la neurorretina del epitelio pigmentario se desencadena una cascada de procesos neurodegenerativos que supone la muerte de los fotorreceptores; así como la activación de la respuesta inmune innata, que es llevada a cabo por la microglía (23,30). La activación de estas células cumple una función tanto de limpieza y fagocitosis de restos celulares, como de modulación de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y otros compuestos químicos capaces de modular y ampliar la respuesta inflamatoria y, consecuentemente, agravar el daño tisular si esta se perpetúa en el tiempo (15,20). Por ello es importante comprender los mecanismos encargados de la activación y regulación de la microglía a fin de mejorar el conocimiento que se tiene sobre la evolución del DR y abrir nuevas vías terapéuticas dirigidas a controlar y modular de manera controlada cómo se produce las respuestas inflamatoria y neurodegenerativa asociadas al DR.

Varios estudios han demostrado que la evolución clínica del DR está condicionada por factores genéticos, influyendo estos en la magnitud de la respuesta inflamatoria y de reparación tisular (38,50). Diferentes variantes genéticas han sido relacionadas con una mayor susceptibilidad a la aparición de complicaciones como la VRP o la fibrosis retinal, lo que resalta la importancia que tiene la genética en el pronóstico de una enfermedad (29,32,33).

El objetivo del trabajo ha sido analizar la activación de la microglía en un modelo murino de DR y comprobar si el SNP p.Arg72Pro del gen *TP53* podría modular la activación de la microglía durante un DR, combinando estudios de análisis de expresión genética y de recuento celular en un modelo de ratón humanizado (39) al que se le ha inducido quirúrgicamente el DR (40). El diseño experimental se basó en modelos animales bien caracterizados, estandarizados y validados en la literatura científica, y se adaptó al estudio de marcadores genéticos específicos de activación microglial (*Iba1*, *Trem2*, *Tmem119* y *Cx3cr1*), que aportaron una visión del fenotipo y estadio funcional de las células a estudiar.

Los resultados obtenidos tras inducir de manera experimental el DR mostraron que, tras ocurrir un DR, se produce una activación temprana de la microglía, evidenciándose por un aumento en la expresión de los genes relacionados con la activación microglial (*Iba1* y *Cx3cr1*) y por un mayor recuento de microglía detectada mediante inmunofluorescencia a los 3 días. Este hallazgo resulta coherente con lo descrito en estudios previos, que han demostrado una activación microglial temprana tras el DR, caracterizada tanto por el aumento en la expresión de genes proinflamatorios como por la migración de estas células hacia capas más externas de la retina (30,50). Transcurridos 10 días los resultados indicaron que la expresión génica volvió a niveles basales, aunque el número de células microgliales permaneció elevado, lo que sugiere que, aunque la activación proinflamatoria inicial haya disminuido con el transcurso de los días, las células microgliales permanecen infiltradas en la retina participando en procesos de remodelación tisular y/o cronificación de la inflamación, encontrándose en un estado de pseudo-activación crónica, como también ha sido descrito por otros autores (15).

En relación con la influencia del SNP p.Arg72Pro del gen *TP53*, a 3 días desde el DR se observó una tendencia a una mayor activación microglial en los ratones Pro72 frente a los Arg72. Por el contrario, los ratones Arg72 presentaron un mayor número de células microgliales transcurridos 10 días desde el DR. Estos datos obtenidos apuntan a que la variante Pro72 podría favorecer una respuesta proinflamatoria de carácter intenso pero breve; mientras que el genotipo Arg72 propiciaría una activación microglial

y una respuesta inmune más sostenida en el tiempo. Esto concuerda con lo publicado por Galindo-Cabello *et al.*, donde se demuestra una asociación de la variante 72Pro con una mayor respuesta inflamatoria tras sufrir un DR, probablemente debido a una menor activación de la apoptosis neuronal (38). Todo ello acompañado de una mayor activación de las células de Müller, la glía mayoritaria de la retina y encargada de la homeostasis del tejido. Tras sufrir un DR, las células de Müller se activan para liberar factores proinflamatorios y participar en la remodelación tisular (21). Este trabajo de investigación representa, hasta lo que se conoce, la primera vez en la que se describe esta posible relación entre el SNP p.Arg72Pro del gen *TP53* y la activación microglial tras sufrir un DR.

Los resultados obtenidos permiten poner en valor la importancia de considerar los diferentes tipos de perfiles genéticos que hay en la población como posibles moduladores de la respuesta inflamatoria en la retina, abriéndose así nuevas vías hacia terapias avanzadas y la posibilidad de realizar tratamientos de medicina personalizada en pacientes que han sufrido un DR, optimizando así el pronóstico de la enfermedad y reduciendo la susceptibilidad a la aparición de posibles complicaciones. Además, este trabajo posiciona al SNP p.Arg72Pro como un posible biomarcador de interés para predecir la evolución del DR a nivel tanto inflamatorio como neurodegenerativo, lo que podría resultar muy interesante en la práctica clínica para realizar estratificación de pacientes e identificar a aquellos que presenten un mayor riesgo de complicaciones.

Entre las principales limitaciones encontradas durante el desarrollo de este trabajo se encuentra que estos resultados deberían corroborarse en biopsias de retina humana. También llama la atención la gran desviación estándar observada en ciertos grupos experimentales.

Sería interesante, de cara a futuras investigaciones, incluir el análisis de marcadores genéticos adicionales, como el gen *P2RY12*, que es codificante de un receptor purinérgico cuyos niveles de expresión disminuyen tras activarse la microglía, y esto permitiría diferenciar entre microglía residente en estado inactivo y fenotipos más activos (51). Otro posible marcador es el gen *ITGAM*, que codifica para Cd11b+, una integrina que forma parte del complejo Cd11b/CD18 y permitiría detectar y excluir a monocitos y macrófagos infiltrados. La finalidad de añadir estos marcadores es obtener un mejor perfil fenotípico (y por tanto funcional) de las células microgliales en las distintas fases post-DR (52). También sería interesante realizar un diseño temporal del estudio mucho más detallado (p. ej.: 1, 3, 5, 7 y 10 días desde el DR) para obtener visión más dinámica de la respuesta inflamatoria. Finalmente, el uso de la técnica de transcriptómica de célula única combinada con citometría de flujo y separación celular por *cell sorting* podría arrojar información más precisa sobre los diferentes subtipos microgliales involucrados y del fenotipo de estos.

En conclusión, los resultados expuestos en este trabajo sugieren que la microglía desempeña un papel determinante en la modulación y evolución del DR y que el polimorfismo p.Arg72Pro del gen *TP53* estaría implicado en la modulación de la actividad microglial, sentando las bases para aumentar la experimentación en esta línea de investigación a fin de desarrollar estrategias clínicas mucho más personalizadas.

7. Conclusiones.

Este trabajo demuestra que la actividad de las células microgliales es clave en el pronóstico del DR y su activación podría estar regulada por el SNP p.Arg72Pro del gen *TP53*. Los resultados obtenidos posibilitan valorar este SNP como un posible biomarcador de riesgo para pacientes con DR y abren la puerta al desarrollo e implementación de terapias de medicina personalizada a fin de paliar la sintomatología, mejorar la evolución o incluso lograr una recuperación visual tras producirse un DR.

8. Bibliografía.

1. Pawlina W. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2023. 957–957 p.
2. Perello Nieto M, Rhcastilhos, Jmarchn. https://en.wikipedia.org/wiki/Visual_system. 2025. Visual system - Wikipedia.
3. Reinhard T, Larkin F. Cornea and External Eye Disease (Essentials in Ophthalmology). 2006.
4. Balyen L. The Physiology of Cornea. JOJ Ophthalmol. 2022 Dec;9.
5. Ruan X, Liu Z, Luo L, Liu Y. The Structure of the Lens and Its Associations with the Visual Quality. Vol. 5, BMJ Open Ophthalmology. BMJ Publishing Group; 2020.
6. Levin L, Kaufman P, Hartnett M. ADLER ´s Physiology of the Eye. Vol. 12. 2024.
7. Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK. Aqueous humor dynamics: a review. Open Ophthalmol J. 2010 Sep;4:52–9.
8. Burkhardt A. The color and structure of the human iris. 1. Morphological studies. Anthropol Anz. 1992;50:83–126.
9. Watson PG, Young RD. Scleral structure, organisation and disease. A review. Exp Eye Res. 2004;78:609–23.
10. Fernández-Vigo JI, Kudsieh B, Shi H, De-Pablo-Gómez-de-Liaño L, Fernández-Vigo JÁ, García-Feijóo J. Diagnostic imaging of the ciliary body: Technologies, outcomes, and future perspectives. Vol. 32, European Journal of Ophthalmology. SAGE Publications Ltd; 2022. p. 75–88.
11. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. Vol. 29, Progress in Retinal and Eye Research. 2010. p. 144–68.
12. Masland RH. The Neuronal Organization of the Retina. Vol. 76, Neuron. 2012. p. 266–80.
13. Freddi T de AL, Ottaiano AC. The Optic Nerve: Anatomy and Pathology. Seminars in Ultrasound, CT and MRI. 2022 Oct;43:378–88.
14. Wandell BA, Winawer J. Imaging retinotopic maps in the human brain. Vol. 51, Vision Research. 2011. p. 718–37.
15. Cuenca N, Fernández-Sánchez L, Campello L, Maneu V, De la Villa P, Lax P, et al. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. Vol. 43, Progress in Retinal and Eye Research. Elsevier Ltd; 2014. p. 17–75.
16. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. Vol. 368, Lancet. Elsevier B.V.; 2006. p. 1795–809.
17. Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. Vol. 75, Neuron. 2012. p. 26–39.

18. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. In: The Lancet. Elsevier B.V.; 2010. p. 124–36.
19. Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The pathophysiology and treatment of glaucoma: A review. Vol. 311, JAMA. American Medical Association; 2014. p. 1901–11.
20. Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T. Microglia in retinal degeneration. Vol. 10, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2019.
21. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. Vol. 51, Progress in Retinal and Eye Research. Elsevier Ltd; 2016. p. 1–40.
22. Boyd K. <https://www.aao.org/salud-ocular/enfermedades/desgarramiento-desprendimiento-retina>. 2025. ¿Qué es un desprendimiento de retina?
23. Lin JB, Narayanan R, Philippakis E, Yonekawa Y, Apte RS. Retinal detachment. Nat Rev Dis Primers. 2024 Dec 1;10(1).
24. Bringmann A, Wiedemann P. Müller glial cells in retinal disease. Vol. 227, Ophthalmologica. 2011. p. 1–19.
25. Fresta CG, Fidilio A, Caruso G, Caraci F, Giblin FJ, Leggio GM, et al. A new human blood–retinal barrier model based on endothelial cells, pericytes, and astrocytes. Int J Mol Sci. 2020 Mar;21.
26. Rio-Hortega P Del. THE MICROGLIA. The Lancet. 1939 May;233:1023–6.
27. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Vol. 10, Nature Neuroscience. 2007. p. 1387–94.
28. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. Vol. 77, Neuron. 2013. p. 10–8.
29. Altmann C, Schmidt MHH. The role of microglia in diabetic retinopathy: Inflammation, microvasculature defects and neurodegeneration. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2018.
30. Okunuki Y, Mukai R, Pearsall EA, Klokman G, Husain D, Park DH, et al. Microglia inhibit photoreceptor cell death and regulate immune cell infiltration in response to retinal detachment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jul 3;115(27):E6264–73.
31. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. Vol. 11, Journal of Neuroinflammation. BioMed Central Ltd.; 2014.
32. Pastor JC, De La Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: Risk factors and pathobiology. Vol. 21, Progress in Retinal and Eye Research. Elsevier Ltd; 2002. p. 127–44.
33. Asaria RHY, Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: Developments in pathogenesis and treatment. Vol. 7, Comprehensive Ophthalmology Update. 2006. p. 179–85.

34. Whibley C, Pharoah PDP, Hollstein M. p53 polymorphisms: Cancer implications. Vol. 9, *Nature Reviews Cancer*. 2009. p. 95–107.
35. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. Vol. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. p. 275–83.
36. Tanaka T, Watanabe M, Yamashita K. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. Vol. 9, *Oncotarget*. Impact Journals LLC; 2018. p. 16234–47.
37. Dumont P, Leu JIJ, Della Pietra AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. 2003 Mar;33:357–65.
38. Galindo-Cabello N, Sobas-Abad EM, Lapresa R, Agulla J, Almeida Á, López A, et al. The TP53 Arg72Pro polymorphism predicts visual and neurodegenerative outcomes in retinal detachment. *Cell Death Dis*. 2025 Dec;16.
39. Zhu F, Dollé MET, Berton TR, Kuiper R V., Capps C, Espejo A, et al. Mouse models for the p53 R72P polymorphism mimic human phenotypes. *Cancer Res*. 2010 Jul;70:5851–9.
40. Matsumoto H, Miller JW, Vavvas DG. Retinal detachment model in rodents by subretinal injection of sodium hyaluronate. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;
41. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25:402–8.
42. Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jul;224:855–62.
43. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar;113:E1738–46.
44. Colonna M, Wang Y. TREM2 variants: New keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci*. 2016 Apr;17:201–7.
45. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, et al. Analysis of Fractalkine Receptor CX3 CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion . *Mol Cell Biol*. 2000 Jun;20:4106–14.
46. Schwab JM, Frei E, Klusman I, Schnell L, Schwab ME, Schluesener HJ. AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglialmacrophage phenotype following spinal cord injury in rats [Internet]. Vol. 119, *Journal of Neuroimmunology*. 2001. Available from: www.elsevier.com/locate/jneuroim
47. Shi FJ, Xie H, Zhang CY, Qin HF, Zeng XW, Lou H, et al. Is Iba-1 protein expression a sensitive marker for microglia activation in experimental diabetic retinopathy? *Int J Ophthalmol*. 2021 Feb 18;14(2):200–8.

48. De Leon-Oliva D, Garcia-Montero C, Fraile-Martinez O, Boaru DL, García-Puente L, Rios-Parra A, et al. AIF1: Function and Connection with Inflammatory Diseases. Vol. 12, Biology. MDPI; 2023.
49. Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286(2):292–7.
50. Zhou W, Zhou Y, He J, Rao Y, Fei P, Li J. TREM2 deficiency in microglia accelerates photoreceptor cell death and immune cell infiltration following retinal detachment. *Cell Death Dis.* 2023 Mar;14.
51. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* 2014 Jan;17:131–43.
52. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. Vol. 179, Cell. Cell Press; 2019. p. 292–311.

9. Material Suplementario

Tabla suplementaria 1. Secuencias de primer específicas para los genes estudiados en la RT-qPCR de las biopsias de retina de ratón.

Gen	Sentido del primer	Secuencia
<i>Gagph</i>	Forward (5' – 3')	TGCACCACCAACTGCTTAGC
	Reverse (5' – 3')	CACCACCTTCTTGATGTCATCA
<i>Iba1</i>	Forward (5' – 3')	GTCCTTGAAGCGAATGCTGG
	Reverse (5' – 3')	CAAGATGGCAGATCTCTTGCC
<i>Trem2</i>	Forward (5' – 3')	TGGGACCTCTCCACCAGTT
	Reverse (5' – 3')	GTCTCCCCCAGTGCTTCAAG
<i>Tmem119</i>	Forward (5' – 3')	CTTTCACCCAGAGCTGGTTC
	Reverse (5' – 3')	GGCTACATCCTCCAGGAAGG
<i>Cx3cr1</i>	Forward (5' – 3')	GGCCTCCACAATGCCATGTG
	Reverse (5' – 3')	CCGTTCCCTTCGGATTCTCC

Tabla suplementaria 2. Análisis estadístico de los resultados de expresión génica relativa de muestras de ADNc provenientes de ojos de ratón que han sido sometidos a DR quirúrgico.

Comparación	Tiempo	Gen	Media OD $\pm$ DE	Media OI $\pm$ DE	F (ANOVA)	p-valor
OD vs OI	3d	Iba1	0,0204 $\pm$ 0,0232	0,0098 $\pm$ 0,0046	1,22	0,295
		Trem2	0,0069 $\pm$ 0,0076	0,0040 $\pm$ 0,0017	0,871	0,373
		Tmem119	0,0597 $\pm$ 0,1045	0,0253 $\pm$ 0,0295	0,601	0,456
		Cx3cr1	0,0141 $\pm$ 0,0187	0,0052 $\pm$ 0,0035	1,315	0,278
OD vs OI	10d	Iba1	0,00468	0,00385	0,346	0,57
		Trem2	0,00176	0,00162	0,029	0,868
		Tmem119	0,00659	0,00462	0,362	0,561
		Cx3cr1	0,00153	0,00115	0,202	0,663
Arg vs Pro	3d	Iba1	0,00603	0,02419	4,622	0,057
		Trem2	0,00279	0,00813	3,559	0,089
		Tmem119	0,01293	0,07206	2,017	0,186
		Cx3cr1	0,00319	0,01606	3,213	0,103
Arg vs Pro	10d	Iba1	0,00437	0,00416	0,022	0,886
		Trem2	0,00184	0,00153	0,144	0,712
		Tmem119	0,00652	0,0047	0,307	0,592
		Cx3cr1	0,00168	0,001	0,68	0,429

Tabla suplementaria 3. Análisis estadístico de los resultados del conteo de células gliales mediante inmunofluorescencia en cortes de retina murina tras DR inducido.

Comparación	Tiempo	Media OD $\pm$ DE	Media OI $\pm$ DE	F	p-valor
OD vs OI	3d	6,64 $\pm$ 2,4644	11,093 $\pm$ 4,664	19,53	0
OD vs OI	10d	6,727 $\pm$ 3,4378	12,295 $\pm$ 5,1741	11,392	0,001
Arg vs Pro	3d	8,364 $\pm$ 3,8064	10,486 $\pm$ 4,949	3,894	0,053
Arg vs Pro	10d	12,214 $\pm$ 6,2737	10,111 $\pm$ 4,0128	2,175	0,146