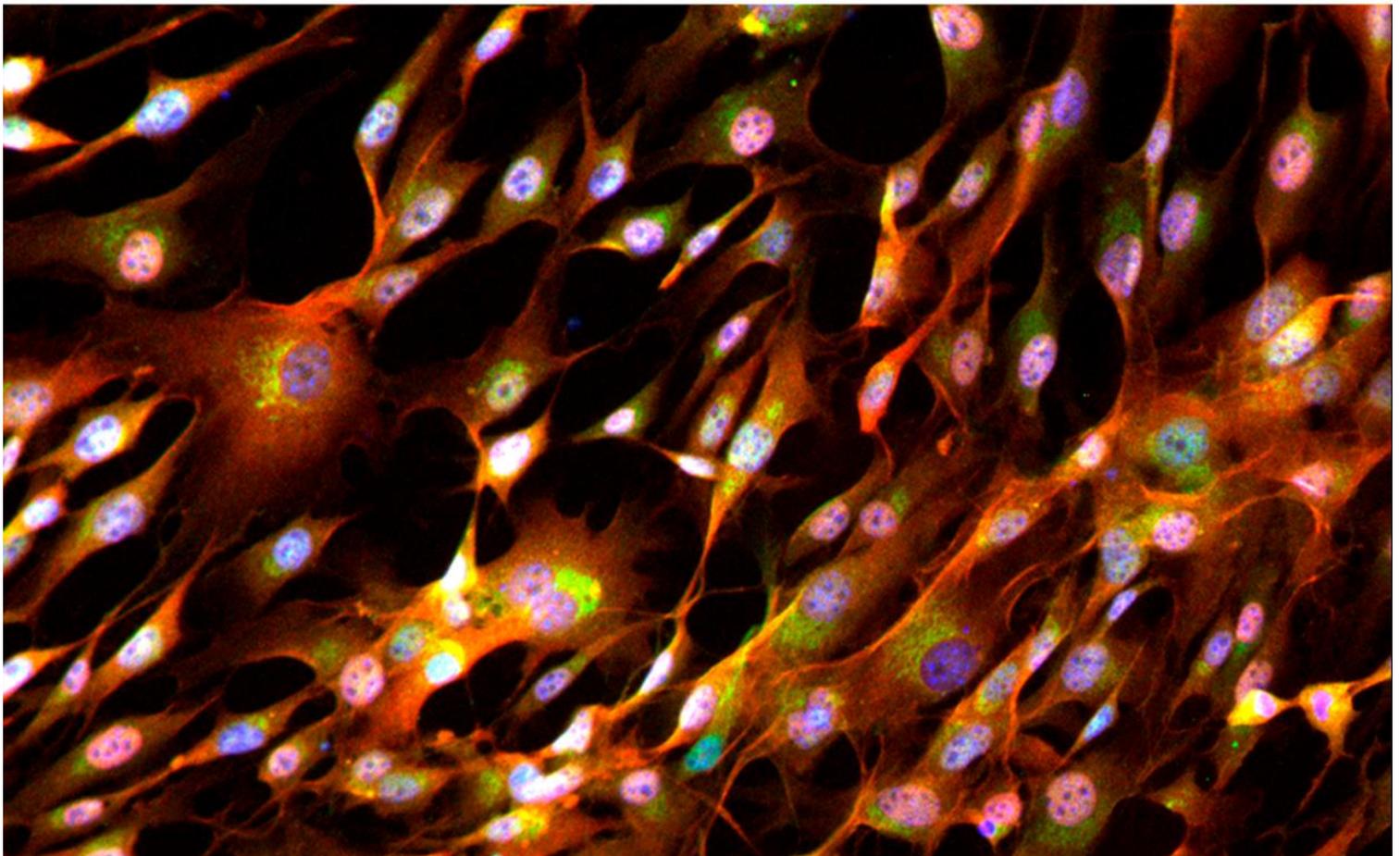


**ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE LAS ALTERACIONES
ESTRUCTURALES Y METABÓLICAS DE LAS CÉLULAS
DE MÜLLER COMO RESPONSABLES DE LOS
EVENTOS CONDUCTENTES A LA DEGENERACIÓN
RETINIANA EN EL MODELO ANIMAL DE RETINOSIS
PIGMENTARIA *Crb1^{RD8}***



TESIS DOCTORAL

VICENTE VALLE ÁLVAREZ

SALAMANCA, 2019



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE LAS
ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y
METABÓLICAS DE LAS CÉLULAS DE MÜLLER
COMO RESPONSABLES DE LOS EVENTOS
CONDUCENTES A LA DEGENERACIÓN
RETINIANA EN EL MODELO ANIMAL DE
RETINOSIS PIGMENTARIA *Crb1^{rd8}*

Memoria presentada por Vicente Valle Álvarez para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directora:

Prof. Dra. María Concepción Lillo Delgado

Salamanca, 2019



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y
PATOLOGÍA INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE
CASTILLA Y LEÓN

M^ª CONCEPCIÓN LILLO DELGADO
INCyL – C/ Pintor
Fernando
Delgado, 1 E-
37007 Salamanca
(España/Spain)
Tel: +34 923 294500 ext. 5334 · Fax: +34 923 294750

Salamanca, 10 de julio de 2019

D^{ña} María Concepción Lillo Delgado, Profesora Titular de Biología Celular

HACE CONSTAR:

QUE la Tesis Doctoral titulada “Análisis del potencial de las alteraciones estructurales y metabólicas de las células de Müller como responsables de los eventos conducentes a la degeneración retiniana en el modelo animal de Retinosis Pigmentaria *Crb1^{rd8}*”, ha sido realizada por el licenciado en Biología D. Vicente Valle Álvarez en el departamento de Biología Celular y Patología y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

QUE ha sido desarrollada bajo mi dirección y dentro del programa de doctorado en *Neurociencias* de nuestra Universidad.

QUE, en mi opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales, y por tanto, autorizo la defensa de la Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmo en Salamanca, a 10 de julio de 2019

La directora

Agradecimientos

Quisiera dar las gracias, por un lado, a la Dra Lillo, la investigadora que me aceptó en su grupo de investigación años atrás, que me enseñó los entresijos de la investigación universitaria, que me motivó a la hora de diseñar y realizar experimentos, y que en definitiva me formó en esta etapa investigadora; por el otro, a Conchi, por su calidad humana y comprensión permanente durante todos estos últimos años.

A mis compañeros de laboratorio, pasados y presentes. A Antonio, quien me ayudó en los primeros compases, y con quien entablé más de una conversación trascendental en el comedor universitario San Bartolomé. A Jorge y Alicia, a quienes he tenido (literalmente) a mi lado en el laboratorio, quienes me han apoyado, ayudado, escuchado y sufrido en más de un episodio de combustión por mi parte que, elegantemente, han sabido apagar.

Al resto de personas que han compartido laboratorio con nuestro grupo de investigación y me han alegrado el día; a Silvia, por sus consejos vitales; a Julia, por su energía y sus bromas constantes; a Cris, por su serenidad en mitad del caos; a Andrés, por sus ánimos y enorme gusto musical; y al resto, a Carlos, Laura, Dani, María y Verónica, por compartir lunes de aguas y pizzas en buena compañía.

A todo el personal del INCYL, con especial cariño a Ana y su sonrisa perenne.

A la maga Marianny, quien siempre estuvo a mi lado, en los buenos y malos momentos, de quien aprendí tanto, y que cada día me hace sentir el hombre más afortunado del universo.

Por último, y desde el fondo de mi alma, a mi madre y a mi hermana; en quienes pienso todas las mañanas al despertarme para enfrentarme a un nuevo día. Dos valientes, dos tesoros. Porque, sin ellas, este manuscrito no habría existido.

Índice

INTRODUCCIÓN	
LA RETINA	3
TIPOS CELULARES DE LA RETINA	6
Células fotorreceptoras	7
Células bipolares	8
Células horizontales	8
Células amacrinas	9
Células ganglionares	9
Astrocitos	9
Células de la microglía	11
Células de Müller	12
VASCULARIZACIÓN DE LA RETINA	15
LAS PROTEÍNAS CRB	16
CRB Y LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR	19
DISTROFIAS RETINIANAS	21
MODELOS ANIMALES PARA MUTACIONES EN CRB	22
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	29
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	31
CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÜLLER	31
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS	33
INMUNOFLUORESCENCIA	33
WESTERN-BLOT	36
MEDICIONES DE RESISTENCIA ELÉCTRICA EN CULTIVOS CELULARES	38

ANÁLISIS DE LA VASCULARIZACIÓN RETINIANA	39
ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN MICROGLIAL	40
OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
RESULTADOS	45
ESTADO DE LA MLE Y RSA EN EL ESTADIO POSTNATAL P7 EN RETINAS CONTROL Y MUTANTE PARA CRB1	47
EL PROCESO ANGIOGÉNICO EN EL MODELO MUTANTE <i>Crb1^{rd8}</i>	51
LA POBLACIÓN MICROGLIAL EN EL ESTADIO P7	55
ESTADO DE LA MLE Y RSA A P21 Y P90	57
EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES KIR4.1 Y GLAST EN LA GLÍA RADIAL	62
EXPRESIÓN DE GLUTAMINA SINTETASA Y LA BOMBA Na^+/K^+ -ATPASA EN LA GLÍA RADIAL	64
EL TRANSPORTADOR DE AGUA ACUAPORINA-4 EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER	67
EXPRESIÓN PROTEICA DE MARCADORES HOMEOSTÁTICOS	69
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA YAP EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER	70
LA POBLACIÓN MICROGLIAL EN LOS ESTADIOS P21 Y P90	72
LAS CÉLULAS NEURALES EN LOS ESTADIOS P21 Y P90	75
LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO	79
DISCUSIÓN	93
LOS COMPLEJOS DE POLARIDAD Y LAS UNIONES ADHERENTES EN EL MODELO <i>Crb1^{rd8}</i>	95
EL DESARROLLO ANGIOGÉNICO EN EL MODELO MUTANTE	99
LA POBLACIÓN MICROGLIAL EN EL MODELO <i>Crb1^{rd8}</i>	101
LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN EL MODELO MUTANTE	104
ESTADO DE LA RETINA NEURAL EN EL MODELO MUTANTE	111

LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO	113
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFÍA	123

INTRODUCCIÓN

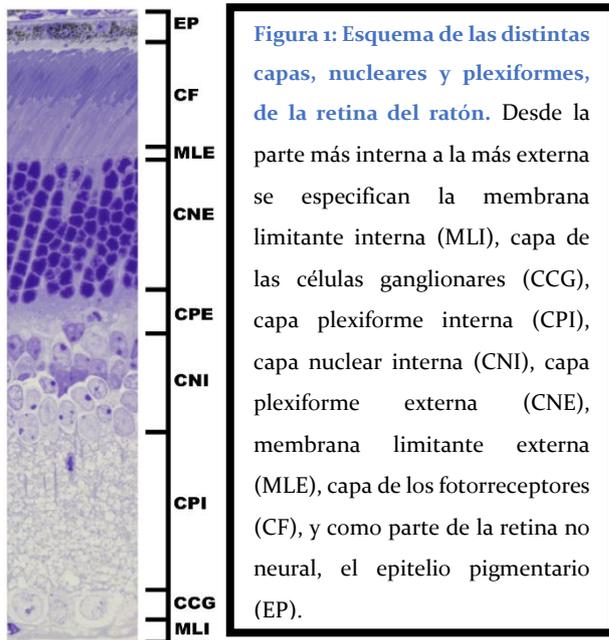
LA RETINA

La retina, considerada como la primera estación neural del sistema visual, posee los elementos funcionales y estructurales necesarios para proporcionar la función visual. Esta estructura sensible a la luz se localiza en el área posterior del globo ocular, encargándose de transformar la energía luminosa, que llega en forma de fotones, a señales químicas y eléctricas, para eventualmente atravesar el nervio óptico hasta llegar a la corteza visual en los centros superiores del cerebro, lugar donde la información será pertinentemente procesada, almacenada e interpretada, en un proceso que recibe el nombre de fototransducción (**Fu y Yau, 2007**).

La retina se considera parte del Sistema Nervioso Central (SNC) por dos razones concretas: desde un punto de vista embrionario, pues se origina a partir del prosencéfalo del tubo neural en desarrollo, que puede dar lugar a las vesículas ópticas, desde las que surgen las retinas, o a futuras estructuras cerebrales, como los hemisferios, el tálamo o el hipotálamo (**Davis y Dyer, 2010**); y desde una perspectiva funcional, ya que se trata de una estructura capaz de integrar estímulos sensoriales concretos para, posteriormente, procesarlos (**Masland, 2012**).

En mamíferos, la retina presenta una estructura histológica altamente conservada y un gran número de elementos celulares, llegando a postularse la presencia de más de medio centenar de subtipos celulares en ella, en relación a sus diferencias morfológicas y funcionales (**Masland, 2001**). Sus somas se encuentran ubicados en capas nucleares concretas, en función del tipo celular, conectándose por medio de prolongaciones que atraviesan las capas plexiformes para así desarrollar una serie de circuitos específicos capaces de actuar simultáneamente con objeto de asegurar el fenómeno de la fototransducción (**Kolb et al., 2000**). Si bien tres de estos tipos celulares (los conos, bastones y algunas células ganglionares) pueden ser catalogados como las neuronas fotosensitivas que residen en la retina, debe existir una precisa regulación funcional, estructural y homeostática entre todos los elementos retinianos para desarrollar una transmisión de la señal exitosa (**Foster, 2009**).

Al realizar un corte transversal de este órgano se pueden apreciar una serie de capas que pueden ser clasificadas, desde la parte más interna, o vitreal, hasta la más externa, o escleral, en (Figura 1):



- **Membrana Limitante Interna (MLI):** Lámina basal de la retina interna, está constituida por las uniones de los pies de las células de Müller (Gelman et al., 2015). A pesar de su nomenclatura, no constituye una verdadera membrana en su definición más clásica, pues no puede ser considerada como tal.
- **Capa de las Células Ganglionares (CCG):** capa nuclear donde residen los cuerpos celulares de las células ganglionares, así como el de algunas células amacrinas desplazadas (Müller et al., 2007; Raza et al., 2011). A partir de los axones de las primeras se puede dar lugar al nervio óptico (que conecta la retina al cerebro), quiasma óptico (donde se entrecruzan los nervios ópticos) y tracto óptico (que finaliza en la base del núcleo geniculado lateral, la siguiente estación de relevo del sistema visual) (Springer y Mednick, 1986).
- **Capa Plexiforme Interna (CPI):** capa de neuropilo constituida por las conexiones sinápticas entre los axones de células bipolares y las células amacrinas, por un lado, y dendritas de las células ganglionares por el otro (Euler et al., 2014). Es notable destacar cómo, dentro de la CPI, las conexiones sinápticas pueden dar lugar a dos subdivisiones dentro de ésta, una más interna (constituida por sinapsis producidas entre las células bipolares-ON y las ganglionares o amacrinas) y otra más externa (entre las células bipolares-OFF y las ganglionares y amacrinas).
- **Capa Nuclear Interna (CNI):** En esta capa se localizan los somas de un gran número de células retinianas, como el de las células bipolares (transmitiendo la

señal desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares), células horizontales, células amacrinas, células interplexiformes, o los elementos gliales más abundantes de la retina, las células de Müller (**Remington, 2012**).

- **Capa Plexiforme Externa (CPE):** capa donde se están realizando las sinapsis entre algunos de los elementos localizados en la CNI, como las dendritas pertenecientes a células bipolares o células horizontales, y los terminales de los fotorreceptores (denominados pedículos en el caso de los conos; y esférulas para los bastones) (**Remington, 2012**).
- **Capa Nuclear Externa (CNE):** en esta capa se localizan los somas de las neuronas de primer orden, las células fotorreceptoras, los conos y los bastones, presentando estos últimos un cuerpo celular de menor tamaño (**Remington, 2012**).
- **Membrana Limitante Externa (MLE):** Localizada en la parte apical de la CNE, constituye una delimitación estructural formada por una serie de uniones adherentes entre los procesos más apicales de las células de Müller y los fotorreceptores que determina los correctos mecanismos de polaridad apico-basal; cumple además un papel clave al prevenir la difusión de algunas proteínas más allá del espacio extracelular que engloba los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (**Omri et al., 2010**).
- **Capa de los Segmentos de los Fotorreceptores (CF):** Compuesta por segmentos externos e internos de los fotorreceptores. Los segmentos externos se caracterizan por presentar discos membranosos donde se concentra una gran cantidad de ftopigmentos, como la rodopsina. Por su parte, es en los segmentos internos donde se localizan los orgánulos responsables de mantener las altas demandas metabólicas de estas células. Entre ambos tipos de segmentos, y conectándolos, se dispone el cilio de conexión (**Goldberg et al., 2016**).
- **Epitelio Pigmentario (EP):** Si bien no forma parte de la retina neural, esta estructura es esencial para el correcto funcionamiento retiniano. Dispuesta como una monocapa de células epiteliales, su lado apical permite el contacto

con los segmentos externos de los fotorreceptores, permitiendo un permanente reciclaje de pigmentos y fagocitosis de estos segmentos, así como la liberación de diversos factores tróficos esenciales en su mantenimiento (Strauss, 2005).

TIPOS CELULARES DE LA RETINA

De manera general, en la retina se pueden encontrar 5 tipos celulares neuronales (células fotorreceptoras, células bipolares, células amacrinas, células horizontales y células ganglionares) y 3 tipos de elementos gliales (astrocitos, microglía y células de Müller) (Figura 2).

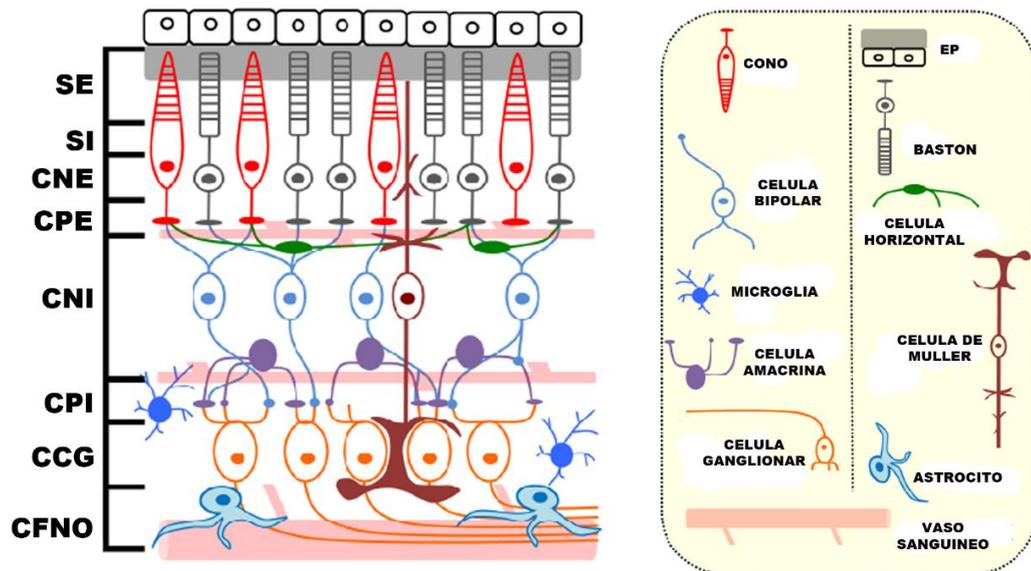


Figura 2: Esquema simplificado que muestra la diversidad y conectividad de los distintos tipos celulares, tanto nerviosos como gliales, en la retina de ratón adulto. SE: Segmentos externos de los fotorreceptores. SI: Segmentos internos. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCG: Capa de las células ganglionares. CFNO: Capa de las fibras del nervio óptico. Modificado de Roche et al., 2016.

Células fotorreceptoras

Son los principales elementos retinianos encargados de responder al estímulo lumínico. Si bien su función radica en llevar a cabo el fenómeno de la fototransducción,

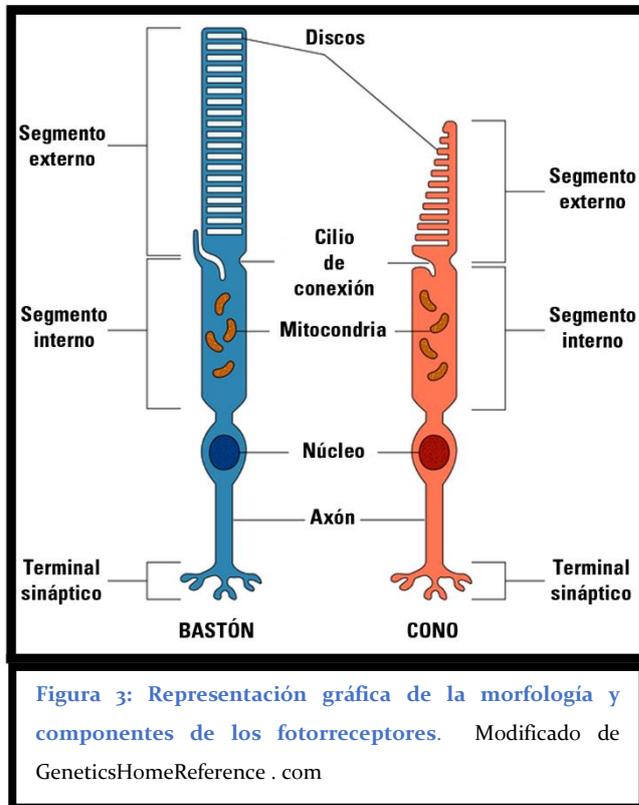


Figura 3: Representación gráfica de la morfología y componentes de los fotorreceptores. Modificado de GeneticsHomeReference . com

presentan una serie de diferencias, tanto estructurales como anatómicas o funcionales, que ponen de manifiesto como cada uno de estos tipos celulares llevan a cabo su acción bajo distintas condiciones lumínicas. De este modo, los conos se presentan como células relativamente poco sensibles a la luz, que actúan bajo condiciones fotópicas, y que aportan a nuestro sentido visual de una alta agudeza visual, además de poder discernir colores (Morrow et al., 1998); por el contrario, los bastones atesoran la capacidad de detectar hasta un único fotón en condiciones lumínicas pobres (Rieke, 2000), siendo los responsables

de actuar durante la visión escotópica, aunque a expensas de una baja resolución espacial y nula capacidad de distinguir colores (Mustafi et al., 2009) (Figura 3).

La proporción entre ambos tipos celulares al comparar distintas especies animales es muy variable. En el ser humano, los conos apenas constituyen un 5% del total de células fotorreceptoras, con una estimación de aproximadamente 4 millones y medio de conos, aunque su elevada distribución en el centro de la mácula, la fovea central (que presenta la mayor densidad de conos en todo el ojo), permite la visión más precisa y detallada (Volland et al., 2015). Por su parte, el número de bastones asciende hasta los 91 millones, con una mayor densidad de éstos respecto a los conos a lo largo de toda la retina exceptuando, como ya se ha referenciado, en la fovea central.

La percepción visual se inicia cuando los fotorreceptores, localizados en los segmentos externos de los fotorreceptores, absorben un fotón y cambian su conformación (Terakita, 2005); esto conduce a una cascada de señalización, que resulta en el cierre de canales catiónicos y una hiperpolarización de la membrana celular. La transmisión de la señal es dirigida a células de la CNI, como las células

bipolares, mediante sinapsis en la CPE. A su vez, estas células envían señales a las células ganglionares, en la CCG, mediante sinapsis localizadas en la CPI. Los axones de las células ganglionares constituyen el nervio óptico, que atraviesa la capa de las fibras del nervio óptico, y transmitiendo así la señal nerviosa hacia los centros superiores de control visual, en el encéfalo.

Células bipolares

Consideradas como neuronas de segundo orden, se encargan de transmitir el impulso nervioso desde las células fotorreceptoras hasta las células amacrinas y ganglionares; presentan su cuerpo celular en la CNI, realizando sinapsis con los conos y los bastones en la CPE gracias a sus dendritas, para posteriormente propagar la información, por medio de sus axones, a la CPI (**Strettoi et al., 2010**). Dentro de los vertebrados, se pueden dividir en células bipolares ON (que se despolarizan en respuesta a la iluminación central de sus campos receptivos) y OFF (cuando sufren una hiperpolarización) (**Shiells, 1995**). Las señales que surgen de cada uno de los fotorreceptores llegan a células bipolares específicas; de esta forma, la totalidad de las señales que surgen de los bastones tienen como destino un tipo muy concreto, las células bipolares de bastón, que son únicamente del tipo ON, y que son responsables de propagar la señal en condiciones lumínicas pobres, realizando contacto con las células amacrinas. Las células bipolares restantes pueden ser de tipo ON u OFF, y en su mayor parte recibirán las señales directamente de los conos, para posteriormente contactar con las células ganglionares (**Ghosh et al., 2004; Pignatelli y Strettoi, 2004**).

Células horizontales

Se engloban dentro de las células interneuronales de la retina ubicadas en la CNI. Son responsables de modular la señalización existente entre los fotorreceptores y las células bipolares (**Poché y Reese, 2009**). En mamíferos, pueden dividirse en células horizontales de tipo A, las cuales carecen de prolongaciones axónicas y sólo contactan con los conos; y las de tipo B, cuyos terminales dendríticos hacen contacto con los pedículos de los conos y sus largos axones, con las esférulas de bastones (**Kolb, 1974**), en la CPE. Son éstos últimos el único tipo de célula horizontal en ratones (**Peichl y González-Soriano, 1994**).

Células amacrinas

Si bien algunas de estas células presentan su núcleo en la CCG, recibiendo el nombre de amacrinas desplazadas, la mayor parte de ellas localizan su cuerpo celular en la CNI, con sus prolongaciones posicionadas en la CPI (**Kolb et al., 2000**). Recibirán señales de bastones, o de conos y bastones, bien a través de las células bipolares o indirectamente a través de las uniones GAP entre los dos tipos de receptores (**Fain y Sampath, 2018**), y serán las encargadas de regular la información que llegará hasta las células ganglionares (**Marc et al., 2018**).

Células ganglionares

Representan la culminación de todos los mecanismos, tanto excitatorios como inhibitorios, que han experimentado las señales eléctricas hasta llegar a estas células dentro de la retina, pues representan la última estación de relevo de la información visual en este órgano. Su cuerpo celular ocupa la CCG, caracterizándose por presentar el mayor tamaño de todos los elementos interneuronales (**Nelson, 2007**). Sus dendritas se extienden hasta la CPI para realizar sinapsis con las células bipolares y las amacrinas, mientras que sus axones dan lugar a la capa de las fibras del nervio óptico (CFNO), donde se organizan estos axones para dirigirse al nervio óptico, que llegará al núcleo geniculado lateral, situado en el tálamo (**Brooks et al., 1999**). Su relación con los astrocitos durante el proceso de vascularización de la retina es clave, pues los axones de las células ganglionares emiten señales capaces de orientar a los astrocitos en migración (**O'Sullivan et al., 2017**).

Astrocitos

Junto con las células de Müller y oligodendrocitos, los astrocitos se encuadran dentro de los elementos macrogliales de la retina (**de Hoz et al., 2016**). Son componentes gliales que se encuentran restringidos, casi exclusivamente, a las capas más internas de la retina, específicamente en la CFNO y en la CCG (**Fernández-Sánchez et al., 2015; Cajal, 1893**). En contraposición a las células de Müller, su origen no deriva del epitelio retiniano embrionario, ya que se piensa que sufren más bien un

proceso de migración desde el cerebro y se introducen a través del nervio óptico hasta llegar a la retina junto con los vasos sanguíneos (Tao y Zhang, 2014).

Es notorio destacar, por un lado, la ausencia de este tipo celular en aquellas áreas que carecen de vasos sanguíneos retinianos; y cómo su presencia y distribución están reducidas a áreas vascularizadas (Stone y Dreher, 1987). Su morfología varía en función de la especie analizada: en humanos se diferencia un tipo celular alargado, localizado en la CFNO, y otro más estrellado, que reside en la CCG (Ramírez et al., 1996), mientras que en los ratones y ratas se visualizan en una única disposición estrellada (Ramírez et al., 2010).

Una de las funciones más ampliamente estudiadas de los astrocitos es su papel en el desarrollo y función de la vasculatura retiniana, torrente sanguíneo y barrera hematoencefálica (Kur et al., 2012). De este modo, estas células tienden a compactarse alrededor de los vasos sanguíneos en retinas de ratones en situaciones control, pudiendo transportar una serie de moléculas de pequeño tamaño (como la glucosa) desde el torrente sanguíneo hasta las neuronas en las arterias, por un lado, y llevar desechos metabólicos desde las neuronas de vuelta al torrente sanguíneo, en las venas (Jammalamadaka et al., 2015).

La relación entre los astrocitos y los vasos sanguíneos no es la única existente en la retina; en la CFNO, al fin y al cabo, coexisten estos dos tipos celulares junto con los axones de las células ganglionares. Los astrocitos se disponen sobre la superficie axónica de las células ganglionares, delimitando así una estructura tubular sobre la que discurren los axones a lo largo del nervio óptico (Kolb et al., 2000), ejerciendo una función estructural sobre estas células nerviosas, aunque también pueden proporcionar una serie de factores tróficos, esenciales para su supervivencia (Gao et al., 2017; Kolb, 2000), con el objeto de limitar los procesos oxidativos que puedan causar daños potenciales en la retina.

Como células macrogliales, muchas de sus funciones se comparten con las realizadas por las células de Müller; así, son capaces de controlar la homeostasis de iones extracelulares (como los niveles de potasio), pero también del agua o pH (de Hoz et al., 2016); regular el metabolismo de neurotransmisores como el GABA, además de presentar abundantes niveles de glucógeno para nutrir con glucosa a las neuronas (Kolb, 2000).

Células de la microglía

Son consideradas los macrófagos residentes de la retina, viéndose involucradas ante procesos degenerativos, inflamatorios o lesivos que puedan ocurrir (**Río Hortega y Penfield, 1927; Zhang et al., 2018**). Su distribución en la retina madura y sana es relativamente heterogénea, situándose en la CCG, CPI, CNI y CPE. Bajo condiciones patológicas, las células microgliales pueden sufrir procesos migratorios hacia las zonas más externas de la retina, localizándose, de manera temporal, en la CNE y en el espacio subretinal (**Chen et al., 2002; Ma et al., 2012**). Aun hoy en día hay controversia a la hora de definir el origen de este tipo celular, aunque se acepta que un subtipo de precursores microgliales se introduce en la retina antes del proceso de vascularización (desde el margen ciliar) (**Provis et al., 1996**) y otro subtipo, que presenta marcadores típicos de macrófagos, lo hacen durante el comienzo de la vascularización acompañando a los vasos sanguíneos que atraviesan la cabeza del nervio óptico (**Santos et al., 2008**).

Existe correlación entre la morfología de estas células y sus funciones; de este modo, las consideradas como “residentes” se caracterizan por presentar una morfología ramificada, ayudándose de sus prolongaciones para escanear permanentemente sus inmediaciones y poder así detectar perturbaciones relacionadas con posibles mecanismos degenerativos pero que, bajo condiciones patológicas, pueden sufrir un cambio fenotípico, retrayendo esas extensiones y mostrando una apariencia más redondeada, siendo catalogadas como microglía “reactiva” (**Fischer et al., 2011; Noailles et al., 2014; Ramírez et al., 2017**) (**Figura 4**).



Figura 4: Cambios morfológicos de las células microgliales. La microglía es una célula dinámica, y ante posibles daños en el SNC, puede alterar su forma y funciones. Modificado de Karperien et al., 2013.

Las funciones que realizan estos elementos gliales son muy diversas, recayendo sobre ellos el peso de los mecanismos fagocíticos en la retina, tanto durante el desarrollo retiniano como bajo condiciones patológicas, cuando la retina debe ser liberada de restos metabólicos y celulares (**Egensperger et al., 1996; Murinello et al., 2016; Silverman y Wong, 2018; Zhao et al., 2015b**); actuando bajo condiciones inflamatorias, mediante la liberación de citoquinas que desencadenan una cascada de señalización para facilitar la llegada de leucocitos en la retina (**Ibrahim et al., 2011; Rashid et al., 2018**); o durante la angiogénesis, debido a la estrecha influencia que ejercen sobre la vasculatura en desarrollo, pudiendo modular la extensión de las células endoteliales a medida que progresa el frente vascular (**Arnold y Betsholtz, 2013; Rymo et al., 2011**).

Células de Müller

Catalogadas como glía radial, son los elementos gliales predominantes en la retina (**Cajal, 1893; Müller, 1851; Kumar et al., 2013**). A diferencia de los astrocitos y las células microgliales, las células de Müller se localizan exclusivamente en la retina, y derivan directamente de los progenitores retinianos, diferenciándose en una etapa tardía (**Hamon et al., 2016**). Su cuerpo celular se ancla en la CNI, del cual surgen procesos capaces de atravesar toda la extensión de la retina neural madura, proporcionando así un soporte arquitectónico (**Goldman, 2014**). Es esta capacidad expansiva la que delimita la retina neural ya que establece la MLE, en la parte más escleral de la retina, cuando las prolongaciones más apicales de las células de Müller se unen entre sí y con los segmentos de los fotorreceptores delimitando el espacio subretinal; y la MLI, en las capas más internas de la retina y humor vítreo, mediante los contactos de los pies de este tipo celular, que establece una barrera entre la retina neural y el humor vítreo (**Omri et al., 2010; Ramírez et al., 1996**). Varios tipos celulares son capaces de migrar entre capas vitreales y esclerales de la retina, en columna, aprovechando esta disposición radial de las células de Müller, destacando los bastones, las células bipolares y algunas células amacrinas (**Reichenbach et al., 1993**); y es esta disposición radial la que permite guiar la luz desde las capas más internas hasta los fotorreceptores, previniendo una posible dispersión de los fotones (**Agte et al., 2011**). Cada célula de Müller constituye el núcleo de una columna de neuronas retinianas, donde se dispone un cono por célula de Müller, y un número variable de

bastones y células ganglionares (**Bringmann y Wiedemann, 2012**). Son estas características anatómicas las que condicionan muchas de las funciones que están destinadas a ejercer.

Al igual que ocurre con el resto de componentes gliales, las células de Müller están relacionadas con las células endoteliales, contactando y envolviendo los vasos sanguíneos (**Vecino et al., 2016**); mientras que los astrocitos se encargan de interactuar con la capa más superficial de la vasculatura, las células de Müller pueden también encargarse de capas más profundas, gracias al correcto equilibrio en la liberación de factores pro y anti-angiogénicos; la alteración de este tipo celular puede dar lugar a un desbalance que produzca una ruptura de la barrera hemato-encefálica (**Le, 2017**). Paralelamente a este proceso, la glia radial presenta la capacidad de transportar nutrientes, iones o agua desde las neuronas hasta los vasos sanguíneos, actuando como un intermediario entre ambos tipos celulares (**Bringmann et al., 2006**).

Como responsables de preservar la supervivencia de las células nerviosas, las células de Müller poseen una serie de transportadores claves para el correcto funcionamiento de la retina. De este modo, la presencia de transportadores de glucosa permite introducir este elemento en las células, que puede ser almacenada en forma de glucógeno o aportado a las neuronas para su correcto metabolismo. Además, también actúan como receptoras de una serie de sustancias que liberan los fotorreceptores y otras neuronas durante su funcionamiento normal, como glutamato, amonio o iones de potasio (**Ishii et al., 1997; Poitry et al., 2000; Sarthy et al., 2005**).

Siendo el neurotransmisor excitatorio más abundante del SNC, incluyendo la retina, el L-glutamato es un elemento clave para la correcta transmisión del impulso nervioso durante la transmisión de la señal en la vía vertical, donde participan las células fotorreceptoras, bipolares y ganglionares, presentando inmunoreactividad para este neurotransmisor estos tres tipos de elementos nerviosos (**Connaughton, 2005**). Puede presentar un perfil neurotóxico cuando sus niveles extracelulares son elevados, característica común en determinadas patologías oculares, como la retinopatía diabética o el glaucoma, conduciendo a una muerte progresiva de las células ganglionares. Hasta la fecha, se ha descrito la presencia de 5 transportadores dependientes de sodio, bautizados como transportadores de aminoácidos excitatorios, o EAATs. De ellos, 4 se expresan en la retina: EAAT-1 (o GLAST) se expresa en las células de Müller; EAAT-2 se encuentra en fotorreceptores y células bipolares; EAAT-3 en

células horizontales, ganglionares y algunas amacrinas; y por último, EAAT-5 en fotorreceptores y células bipolares (**Harada et al., 1998; Schneider et al., 2014**).

GLAST es considerado un transportador clave en la regulación homeostática retiniana, permitiendo por un lado finalizar el proceso de transmisión de la señal nerviosa y previniendo, por otro lado, tanto la difusión glutamatérgica más allá de la hendidura sináptica, como su acumulación, que conduciría a un escenario neurotóxico (**Ishikawa, 2011**). La enzima glutamina sintetasa, exclusiva de este tipo celular, se encarga de crear L-glutamina a partir del glutamato y amonio, que llegará a las células nerviosas para dar lugar a los neurotransmisores glutamatérgicos y GABAérgicos (**Bringmann et al., 2013**). En el caso del potasio extracelular, los canales Kir y la bomba Na^+/K^+ -ATPasa son responsables de tomar el exceso iónico extracelular para depositarlo en el espacio subretinal, el cuerpo vítreo o el torrente sanguíneo; el papel homeostático de las células de Müller depende de su potencial de membrana negativo, en torno a los -80 mV, llevado a cabo gracias a la abundante expresión del canal Kir 4.1 (**Bringmann et al., 2006**).

Las células de Müller expresan un transportador de agua, la acuaporina-4, que puede verse asociada con el canal Kir 4.1. Esta expresión conjunta hace que ambos canales estén potencialmente involucrados en la regulación homeostática del agua en la retina, y ya que los iones deben ser rápidamente modulados durante el proceso de señalización, especialmente en las capas plexiformes, que presentan una alta resistencia al movimiento de fluidos, el papel de la acuaporina-4 se antoja clave, tanto como para permitir un aporte de agua a partir de esta glía radial como para regular su circulación hasta el torrente sanguíneo (**Bringmann et al., 2013; Lassiale et al., 2016**).

La reactividad glial de las células de Müller ante un daño en la retina conduce a una serie de alteraciones. Entre las más características, se encuentra un incremento en la expresión de la proteína ácido fibrilar y de vimentina, que son los filamentos intermedios más abundantes en este tipo glial (**Luna et al., 2010**). Si bien en condiciones basales, sin lesión alguna, la expresión de GFAP queda restringida prácticamente a los astrocitos, en condiciones lesivas, las células de Müller sobre-expresan esta proteína pudiendo extenderse hasta capas más externas (**Roche et al., 2018**). La regulación del transportador de glutamato GLAST también se ve alterada, pudiendo sufrir una disminución en su expresión en modelos para retinopatía diabética

o glaucoma, o de la enzima glutamina sintetasa, involucrada en el reciclaje del glutamato (**Bringmann y Wiedemann, 2012**).

Gracias a los procesos apicales de las células de Müller que forman la MLE, se permite una conexión con los segmentos internos de los fotorreceptores resultando en una estructura densa en uniones con acúmulos de filamentos de actina, semejante a las zonula adherens. El papel de las células de Müller a la hora de establecer este límite es necesario para mantener una correcta disposición de las células fotorreceptoras y poder limitar el paso de sustancias al espacio subretinal debido a su capacidad semipermeable (**Omri et al., 2010; Bunt-Milam et al., 1985**).

VASCULARIZACIÓN DE LA RETINA

La vascularización retiniana comprende una serie de procesos altamente coordinados, en los que participan diversos tipos celulares para dar lugar al surgimiento y desarrollo de la vasculatura. El término vasculogénesis hace referencia a la formación de vasos sanguíneos a partir de los angioblastos, o progenitores endoteliales, mientras que durante la angiogénesis se crean nuevos vasos a partir de pre-existentes, éstos ya presentes. Ambos procesos son requisitos indispensables para el correcto desarrollo de la retina.

Si bien en el momento de su nacimiento el ser humano posee una retina con una vasculatura ya desarrollada, no ocurre lo mismo en los modelos de roedores, que no es hasta el final de su tercera semana post-natal cuando se completa la maduración de la red vascular (**Stahl et al., 2010**). Esta progresión temporal y espacial proporciona una excelente plataforma a la hora de analizar la correcta progresión, o posible alteración, de los elementos vasculares tanto durante el desarrollo de la retina como bajo la influencia degenerativa en una serie de distrofias retinianas.

Durante el desarrollo embrionario, la vasculatura en la retina del ratón se sustenta a través de sistemas coroideos e hialoideos que, en el momento de su nacimiento, experimentan una progresiva regresión (**Edwards y Lefebvre, 2013**). Es a partir de esta edad cuando, a través del disco óptico (DO), irán migrando las células endoteliales que delimitarán los plexos vasculares. De este modo, durante la primera semana post-natal se producirá el establecimiento del plexo superficial a lo largo de la CFNO, cuando los

vasos sanguíneos se extienden de modo progresivo desde el centro hasta la periferia retiniana; a partir de ellos se crearán los plexos profundos e intermedios (localizados en las capas plexiformes) durante la segunda y tercera semana post-natal, respectivamente, por medio de la internalización vertical de los capilares superficiales (Uemura et al., 2006) (Figura 5). El balance entre factores pro- y anti-angiogénicos permite regular de un modo dinámico la angiogénesis (Stahl et al., 2010); el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es considerado el mayor determinante pro-angiogénico, promoviendo procesos de migración de las células endoteliales, y en la retina puede ser liberado por células del epitelio pigmentario (Miller et al., 1997), células endoteliales (Robbins et al., 1997), células ganglionares (Shen et al., 2018), células de Müller (Wang et al., 2015) o astrocitos (Scott et al., 2010), siendo estos dos últimos componentes gliales los mayores productores (Penn et al., 2008).

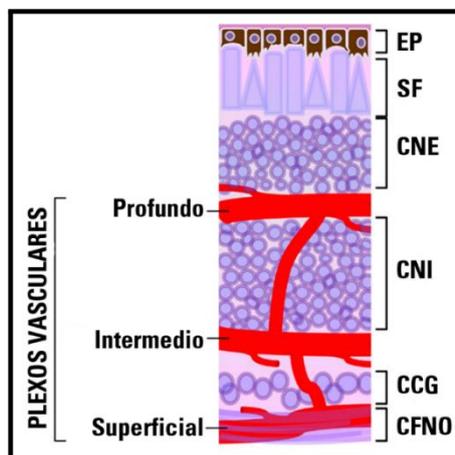


Figura 5: La vasculatura retiniana. El plexo superficial se dispone sobre la CFNO, mientras que los plexos intermedios y profundo se disponen a cada lado de la CNI; todos se encuentran conectados entre sí. CFNO: Capa de fibras del nervio óptico. CCG: Capa de células ganglionares. CNI: Capa nuclear interna. CNE: Capa nuclear externa. SF: Segmentos de los fotorreceptores. EP: Epitelio pigmentario. Modificado de Liu et al., 2017.

LAS PROTEÍNAS CRB

Al igual que para el resto de tipos celulares presentes en la retina, el establecimiento y mantenimiento de una correcta polaridad apico-basal y mecanismos de adhesión celular son requisitos necesarios para el correcto funcionamiento de los fotorreceptores (van de Pavert et al., 2004). No en vano, alteraciones en las proteínas involucradas en estos procesos, que dan lugar a los complejos de polaridad celular, pueden acarrear graves consecuencias en la estructura y funcionalidad retinianas (Alves et al., 2013; Park et al., 2011; Pellissier et al., 2013). Hasta la fecha, se han descrito tres complejos proteicos que actúan sobre la polaridad celular: el complejo Scrib (que determina la zona basal de la célula), que se compone de las proteínas Scribble, Dlg y Lgl y los

complejos Par y Crb (involucrados en la determinación de la zona apical), compuestos por las proteínas Par6, Par 3 y PKC atípica en el caso del primero, y por CRB, PALS-1 y Patj, en el caso del segundo (Su et al., 2012).

El complejo Crb se encuentra altamente conservado a lo largo de la escala evolutiva, pudiendo encontrarse desde en esponjas hasta en mamíferos (Bazellieres et al., 2009). En la retina adulta de estos últimos, las proteínas que forman el complejo Crb se localizan en la región subapical (RSA), que se encuentra adyacente a las uniones adherentes formadas entre las células fotorreceptoras y las células de Müller (Pellissier et al., 2013). Esta ubicación concreta define su importancia en el mantenimiento de la correcta continuidad de la MLE en la retina, y cómo las alteraciones en los componentes del complejo podrían estar condicionando su estructura.

La proteína CRB fue identificada por primera vez en *Drosophila* (donde se denomina Crumbs), que presenta un único gen que codifica para esta proteína (Tepass et al., 1990). En mamíferos, la familia de las proteínas CRB está a su vez compuesta por tres miembros: CRB1, CRB2 y CRB3 (Paniagua et al., 2015). Son proteínas caracterizadas por su naturaleza transmembranaria, con un gran dominio extracelular en el caso de las dos primeras, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (Djuric et al., 2016; Makarova et al., 2003) (Figura 6).

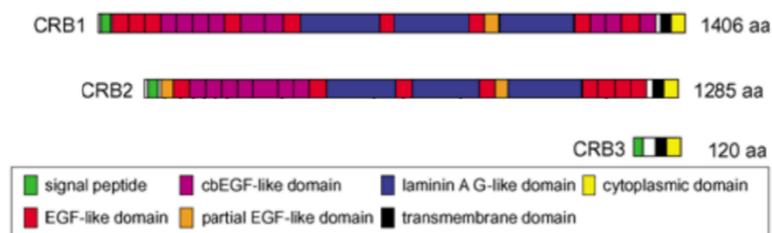
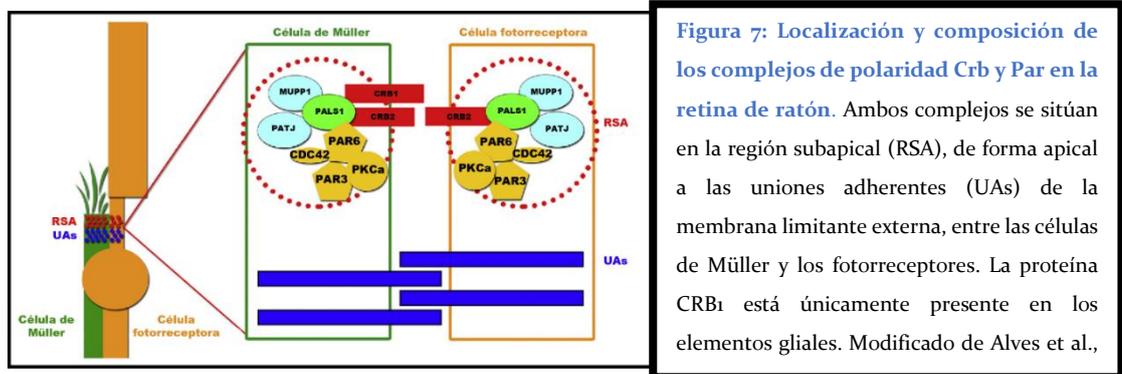


Figura 6: Las proteínas CRB1, CRB2 y CRB3: Tanto CRB1 como CRB2 presentan un gran dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. La proteína CRB3, por su parte, carece del dominio extracelular, aunque su dominio intracelular es muy similar al de las dos proteínas anteriores. Tomado de van den Hurk et al., 2005.

Es interesante destacar que en el dominio intracelular, altamente conservado y compuesto por 37 aminoácidos, se halla un sitio FERM que interactúa con la proteína EPB4.1L5, y que es clave en la transición epitelio-mesénquima durante el proceso de gastrulación; y un sitio PDZ en su extremo C-terminal, crítico para la interacción con otras proteínas pertenecientes al complejo Crb, como PALS-1 (Lemmers et al., 2004; Quinn et al., 2017). Es esta unión la que a su vez provoca la incorporación de otras proteínas del complejo Crb, como PATJ y MUPP1 para dar lugar al ensamblaje del complejo CRB (Bulgakova y Knust, 2009). Además, otros elementos que se anclan al dominio intracelular son la proteína PAR6, perteneciente al complejo Par, que lo hace al sitio PDZ y que conduce a su vez a la incorporación de otro tipo de proteínas, como PAR3, aPKC y CDC42, dando lugar al otro complejo de polaridad apical, el conocido como complejo PAR (Hurd et al., 2003) (Figura 7).



Las proteínas CRB presentan una expresión variable en función del tejido donde se expresa. De este modo, la proteína CRB1 se expresa de forma abundante en retina y cerebro (den Hollander et al., 1999); CRB2 lo hace en retina, epitelio pigmentario, cerebro y riñón (van den Hurk et al., 2005); y por último, la proteína CRB3 se expresa en todos los tipos celulares epiteliales, así como sus derivados (Lemmers et al., 2004). Es importante destacar, que se ha encontrado una diferencia importante en cuanto a la expresión de las proteínas CRB1 y CRB2 entre la retina del ser humano y el ratón. Así, CRB1 se localiza en la retina humana tanto en las células de Müller como en los fotorreceptores, mientras que CRB2 lo hace exclusivamente en la región subapical de las células de Müller; por su parte, el patrón de expresión de estas proteínas en la retina del ratón se invierte, de modo que CRB1 se encuentra principalmente en la glía radial (Van Rossum et al., 2006). En la retina de este animal, CRB3 se localiza en la región subapical, tanto en células de Müller como en fotorreceptores, además de en los segmentos internos de los fotorreceptores, en sus

terminales sinápticos, y en subpoblaciones de células amacrinias y bipolares en la CPI (Herranz-Martín et al., 2012).

CRB Y LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

En la correcta regulación de los mecanismos proliferativos y de diferenciación celular de progenitores retinianos participan una serie de rutas de señalización esenciales que actúan tanto durante el desarrollo embrionario como post-natal, como son la ruta Notch, la ruta Wnt y la ruta Hippo (Figura 8).

A grandes rasgos, la ruta Notch está compuesta de 5 ligandos (Dll 1, 3, 4 y Jagged 1 y 2), 4 receptores (Notch 1-4) y un factor de transcripción, RBP-J, que es capaz de regular la expresión génica de los miembros de la familia Hes. Al producirse la unión entre ligando y receptor, éstos últimos sufren la acción de la proteasa gamma-secretasa, liberándose el dominio intracelular Notch (NICD) y provocando su translocación nuclear, donde interactúa con el factor de transcripción RBP-J para activar la transcripción génica (Bray, 2006). Modificaciones en algunos de estos componentes durante el proceso de retinogénesis puede ocasionar alteraciones en los subtipos celulares; un menor número de progenitores retinianos y mayor número de células ganglionares se origina como consecuencia de la supresión del ligando Dll1, por ejemplo (Rocha et al., 2009). En *Drosophila melanogaster*, se ha comprobado que Notch promueve la expresión de Crumbs, quien a su vez reprime la actividad de Notch durante la formación de los discos epiteliales de sus alas (Herranz et al., 2006) y durante el proceso de formación de sus ojos, la pérdida de Crumbs acarrea una hiperplasia de los mismos (Richardson y Pichaud, 2010). Crumbs podría estar, por un lado, inhibiendo la endocitosis de Notch y, por el otro, limitando la actividad de la gamma-secretasa a través de sus dominios transmembrana.

Dentro de la ruta Wnt, las proteínas Wnt actúan como los verdaderos factores de señalización celular. La interacción de sus ligandos con los receptores transmembrana Fzd puede dar lugar a la activación de hasta 3 rutas distintas; la más estudiada se corresponde con la ruta canónica, que requiere de la activación de los ligandos tanto con el receptor Fzd como con los co-receptores LRP5 y LRP6. Esto provoca la activación de la proteína Dsh y la posterior desfosforilación de beta-catenina, induciendo su

translocación nuclear para así regular la expresión de genes involucrados en la proliferación celular (He et al., 2004). Es interesante destacar cómo la unión del ligando Norrin con el receptor Fzd es requisito indispensable para el correcto desarrollo y mantenimiento de la vasculatura retiniana (Zhang et al. 2017). Ya que las proteínas CRB están involucradas en la formación de uniones adherentes y en la óptima localización de beta- y p120- cateninas, su papel en esta ruta parece ser el de regulador de su localización o función en la membrana. El ratón mutante que carece de CRB1 y CRB2 presenta una pérdida de estas cateninas en las uniones adherentes, aunque un análisis génico temprano mostrase un incremento en los niveles de p120-catenina (Pellissier et al., 2013).

La ruta de señalización Hippo actúa en varios procesos biológicos, como durante el control del tamaño de órganos mediante mecanismos de proliferación y muerte celular o en la diferenciación de progenitores de varios tejidos, incluyendo la retina. En mamíferos, consta de las quinasas MST1 y MST2, LATS 1 y LATS 2, y los cofactores transcripcionales YAP y TAZ, cuya fosforilación provoca una localización restringida al citoplasma celular; pero cuando la ruta no está regulada, los cofactores YAP y TAZ pueden translocarse al núcleo, interactuar con el dominio del factor de transcripción TEAD y regular genes implicados en proliferación celular. La regulación de la cascada de señalización se produce en respuesta a múltiples estímulos, como ocurre ante señales mecánicas, estrés oxidativo o durante mecanismos de polaridad apico-basal, donde las proteínas CRB presentan un papel clave en esta ruta, actuando como reguladores del crecimiento tisular en *Drosophila* (Chen et al., 2010). Recientemente, se ha demostrado que el cofactor YAP y el factor de transcripción TEAD están involucrados en los mecanismos degenerativos de la retina del modelo de ratón rd10, presentando ambos una sobre-expresión en células de Müller reactivas tras la muerte de los fotorreceptores (Hamon et al., 2017).

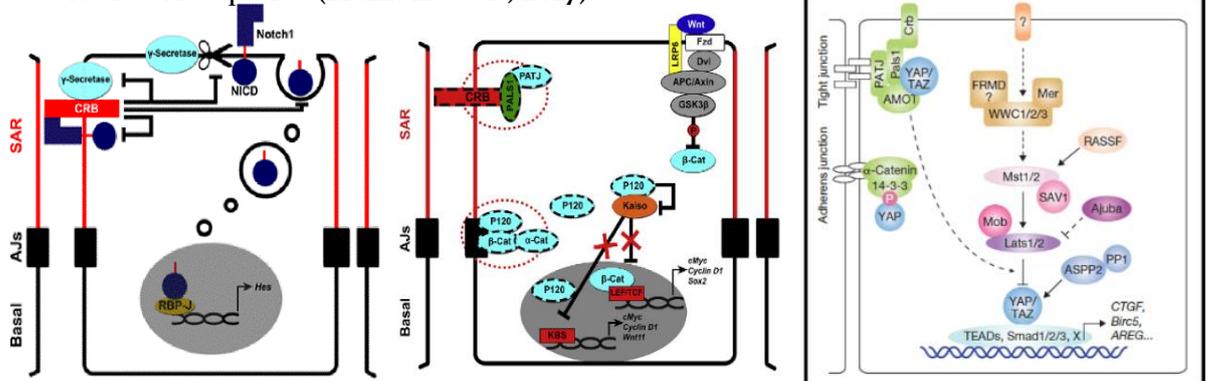


Figura 8: El papel del complejo CRB como regulador. Los miembros del complejo CRB actúan como reguladores en determinadas rutas de señalización, como en la ruta Notch1 (izquierda), Wnt (centro) e Hippo (derecha). Modificado de Alves et al., 2014; Zhao et al., 2011.

DISTROFIAS RETINIANAS

Se denominan distrofias retinianas a los mecanismos degenerativos que afectan a la retina, causados en su mayor parte por mutaciones en genes propios de las células fotorreceptoras o de las células del epitelio pigmentario, y que presenta una alta variabilidad en sus manifestaciones clínicas (**Nash et al., 2015; Thompson et al., 2000**). Estas complicaciones retinianas condicionan la calidad de vida del paciente, quien ve mermada su agudeza visual. Los patrones de herencia para estos desórdenes pueden encuadrarse en un patrón autosómico recesivo, autosómico dominante, herencia ligada al sexo o una aparición espontánea (**Nash et al., 2015**); todas ellas tienen una característica común, pues eventualmente provocará una alteración en los mecanismos funcionales y morfológicos de la retina (**Bujakowska et al., 2012**). A grandes rasgos, se pueden encuadrar en 3 grupos en función de la célula fotorreceptora que se encuentre alterada al inicio de la enfermedad: distrofias de tipo bastón y bastón-cono; distrofias de tipo cono y cono-bastón; y distrofias generalizadas.

Dentro de las distrofias bastón y bastón-cono, la retinosis pigmentaria (RP) es el grupo de enfermedades más característico. Posee una prevalencia de 1/4000 personas, y puede ser heredada según un patrón autosómico dominante, autosómico recesivo, o ligado al sexo (**Ferrari et al., 2011**). Si bien existe una alta heterogeneidad génica para esta enfermedad, con más de 60 genes asociados a la RP hoy en día (**Anasagasti et al., 2012**), los rasgos clínicos tienden a ser muy similares, presentando una dificultad para ver bajo condiciones lumínicas pobres que resulta en ceguera nocturna, o nictalopía, y una pérdida progresiva del campo visual más periférico, que puede conducir a una visión en túnel (**Hamel, 2006**). Ambos procesos están directamente relacionados con la pérdida progresiva de los bastones, aunque en algunos subtipos los conos pueden también sufrir de manera secundaria procesos apoptóticos, si bien de un modo más lento, conduciendo así a una ceguera total (**Campochiaro y Mir, 2018**). Otros elementos retinianos también se ven alterados, como la activación de las células microgliales y de las células de Müller, caracterizadas por un estado de gliosis reactiva (**Gupta et al., 2003; Jones et al., 2016**). Mutaciones en el gen *CRB1* están asociadas con distrofias bastón-cono tempranas, como la RP de tipo autosómica recesiva. Los individuos con este gen mutado presentan señales nulas en los registros de bastones en electroretinogramas (ERGs) o valores bajos para su agudeza visual, entre otros (**Aleman et al., 2011**).

En el caso de las distrofias cono y cono-bastón, se caracteriza por la alteración primaria de los conos, lo que compromete la percepción normal de los colores o los procesos que requieren de alta agudeza visual. Son patologías con una tasa de prevalencia más baja al ser comparada con la RP, de 1/40000 individuos. Hasta la fecha se han descrito mutaciones en hasta 30 genes diferentes que pueden cursar con este tipo de distrofia, relacionados con diversas funciones específicas de los conos (**Hamel, 2006**).

La última clase de distrofia retiniana cursa con los mecanismos degenerativos más severos, debido a la alteración simultánea en ambos tipos de fotorreceptores. La distrofia de este tipo más común es la Amaurosis Congénita de Leber (ACL), que en su mayor parte se corresponde con un patrón autosómico recesivo y presenta una incidencia de aproximadamente 1/50000 individuos. En claro contraste con las alteraciones progresivas propias de las enfermedades descritas previamente, la ACL condiciona de un modo abrupto la función visual, careciendo de cualquier tipo de respuesta ante los estímulos visuales una vez superada la infancia. Han sido descritas mutaciones en hasta 24 genes que pueden provocar esta enfermedad, entre los que se incluye el gen *CRB1*; la ausencia de una relación directa entre el genotipo y fenotipo para las mutaciones en el gen *CRB1* sugiere cómo otros componentes adicionales del complejo CRB podrían estar condicionando las alteraciones durante estas enfermedades (**den Hollander et al., 2008**).

MODELOS ANIMALES PARA MUTACIONES EN CRB

Debido a la importante función biológica que realizan los distintos componentes de los complejos de polaridad, existen en la actualidad varios modelos animales que presentan mutaciones, naturales o condicionadas, destinados a elucidar la influencia de estas proteínas ante su fallo o ausencia. Cabe destacar entre ellos los modelos en ratón que presentan mutaciones en los genes *Crb1* y *Crb2*, y que resultan válidos para analizar y comparar las alteraciones fenotípicas frente a las que ocurren en pacientes afectados por la mutación de *CRB1*.

Actualmente existen tres modelos de ratón que presentan mutaciones en el gen *Crb1*, entre los que se incluye el utilizado en la presente tesis doctoral, el modelo *Crb1^{rd8}*,

único modelo donde la mutación se ha producido de manera espontánea. La primera descripción de las alteraciones retinianas en este ratón se remonta a 2003 (**Mehalow et al., 2003**). Como consecuencia de la delección de un par de bases de una citosina en el exón 9 en *Crb1*, se produce un desplazamiento del marco de lectura, dando lugar a un codón de parada prematuro, resultando en un truncamiento de los dominios transmembrana e intracelulares de la proteína CRB1, la cual preserva únicamente su dominio extracelular. Se han descrito las primeras modificaciones en estas retinas a una edad tan temprana como 14 días post-natal (P14), cuando la MLE presenta una serie de discontinuidades, que condicionará eventualmente el mantenimiento de las uniones adherentes y que resultará en la aparición de unas estructuras características, las rosetas de fotorreceptores, consecuencia de la pérdida de polaridad, así como la pérdida de fotorreceptores y degeneración principalmente en sus áreas inferiores; este fenotipo sólo está presente en ratones homocigotos para cada alelo mutado, desarrollándose por tanto de un modo similar en los pacientes de RP y ACL, quienes presentan un patrón de herencia autosómico recesivo para esta mutación (**Mehalow et al., 2003**).

La inactivación de ambos alelos del gen *Crb1* (CRB1 $-/-$) en el modelo animal mediante la eliminación de la región de promotor y el primer exón codificante para el N-terminal suprime su expresión proteica y la retina también se ve condicionada, presentando una serie de alteraciones degenerativas en su región inferior, aunque con menor frecuencia comparada con el modelo de mutación espontánea, siendo estas alteraciones más evidentes a partir de los 3 meses de edad (**van de Pavert et al., 2004**). Por su parte, el modelo *knock-in* presenta la sustitución de un aminoácido cisteína por un triptófano en el dominio extracelular de la proteína CRB1, presentando igualmente la pérdida de fotorreceptores, si bien en etapas incluso más tardías que en el caso del modelo knock-out (**van de Pavert et al., 2007b**). Aunque el modelo condicional *Crb1^{-/-}* también presenta alteraciones degenerativas en su región inferior, éstas son menos frecuentes que en el caso de la mutación espontánea, presentándose de manera constante a partir de los 3 meses de edad.

En el caso de la proteína CRB2, hay un modelo knockout, *CRB2 -/-*, que presenta una letalidad embrionaria en el estadio E 12.5, consecuencia de disfunciones importantes en la polaridad apico-basal del epiblasto durante la gastrulación tardía (**Xiao et al, 2011**); y un modelo condicional (*Crb2* cKo) donde únicamente los progenitores retinianos carecen de su expresión, provocando alteraciones en los procesos de laminación de la capa de fotorreceptores durante el desarrollo y una

posterior degeneración que afecta a todos los cuadrantes de la retina, contrastando con las lesiones restringidas a las áreas inferiores en las mutaciones para CRB1 (Alves et al, 2013). Por su parte, el modelo condicional para CRB1 y CRB2 (*Crb1 Crb2* cKo) carece de ambas proteínas en los progenitores retinianos tempranos, cursando con un fenotipo muy severo donde destaca la presencia de únicamente dos capas nucleares separadas por una única capa plexiforme, numerosos núcleos ectópicos y una considerable reducción en las amplitudes del electroretinograma desde el primer mes de vida (Pellissier et al, 2013).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la literatura relacionada con los complejos de polaridad celular en modelos animales se ha descrito que, en la retina del ratón, la proteína CRB1 se expresa únicamente (o mayoritariamente) en las células de Müller (**van Rossum et al., 2006**). En el modelo de degeneración de retina *Crbl^{rd8}*, la mutación en el gen *Crbl* provoca la desestructuración de la membrana limitante externa, produciéndose una pérdida de polaridad celular y condicionando la viabilidad de las células fotorreceptoras, reflejándose en la aparición de rosetas especialmente concentradas en el cuadrante inferior de la retina. Si bien la bibliografía actual sobre este modelo describe que las primeras alteraciones en este modelo se producen en el estadio P14 (**Mehalow et al., 2003**), estudios previos realizados en nuestro laboratorio mediante análisis a microscopía electrónica evidenciaron que ya en la primera semana de vida, concretamente en el estadio postnatal P7, se producía una pérdida puntual de las uniones adherentes entre fotorreceptores y células de Müller en las retinas del ratón *Crbl^{rd8}* (**Herranz-Martín, 2013**).

A pesar de que las células de Müller expresan la proteína CRB1, las descripciones relacionadas con este tipo celular han estado restringidas a los mecanismos de gliosis que pueden experimentar ante los mecanismos degenerativos en el modelo *Crbl^{rd8}*. Sin embargo, no se han estudiado las alteraciones que pudieran producirse en proteínas relacionadas con los procesos homeostáticos de la retina en los que están involucradas las células de Müller, ni las posibles alteraciones que esta mutación puede provocar sobre otros tipos celulares, tanto neurales como microgliales, durante el inicio y la progresión de la degeneración.

Dado el predominio en el número de células de Müller frente a otros elementos gliales retinianos y su función tanto en la citoarquitectura de la retina como en el control y papel fundamental en los mecanismos homeostáticos de la retina, nos planteamos la **hipótesis** de que la mutación en el gen *Crbl* induce alteraciones tanto estructurales como funcionales en algunas de las proteínas esenciales para el correcto desempeño de las células de Müller, que en consecuencia afecta al normal funcionamiento de otros tipos celulares de la retina y que en definitiva podrían iniciar y/o acelerar los mecanismos degenerativos de la retina en el modelo experimental de Retinosis Pigmentaria, *Crbl^{rd8}*.

Para comprobar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Analizar el estado de la retina del modelo *Crbl^{rd8}* en el estadio temprano P7, mediante el análisis de componentes de los complejos de polaridad y su desarrollo angiogénico.
- 2) Caracterizar el estado de las células de Müller mediante el análisis de la distribución y expresión de transportadores de membrana plasmática que son esenciales para su función, así como de proteínas involucradas en determinadas rutas de señalización.
- 3) Analizar el estado de la población de células microgliales durante el desarrollo de la degeneración en la retina del modelo *Crbl^{rd8}* para investigar la influencia que la mutación en la proteína CRB1 puede provocar sobre este tipo celular.
- 4) Analizar el estado de los elementos neurales, así como de sus sinapsis, en las retinas afectadas por la mutación en CRB1.
- 5) Estudiar en cultivos primarios la expresión de proteínas relacionadas con diversas funciones de las células de Müller, así como el estado de las uniones que se establecen entre ellas, para poder dilucidar si las alteraciones observadas en las células de Müller *in vivo* se deben a la mutación intrínseca del gen *Crbl* en las propias células, o es necesaria la influencia del entorno y los contactos/funciones celulares que se establecen en las retinas *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para esta tesis doctoral se han empleado ratones (*Mus Musculus*), de la estirpe C57BL/6J, tanto silvestres como portadores de la mutación $CRB1^{rd8}$ en homocigosis (C57BL/6J $Crbl^{rd8}/Crbl^{rd8}$), con edades comprendidas entre los 3 días postnatales a los 3 meses de edad. El mantenimiento y manejo se ha realizado conforme a la normativa europea 2010/63/UE y española RD 53/2013 vigentes. La eutanasia de estos animales se ha realizado mediante decapitación para los animales de 3 y 7 días de edad; y mediante la administración de CO_2 para los animales de 21 (P21) y 90 (P90) días de edad.

CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE MÜLLER

Para la obtención de los cultivos de células de Müller se ha seguido el protocolo establecido por Hicks y Courtois (**Hicks y Courtois, 1990**), incluyendo algunas modificaciones. Los pasos seguidos han sido:

- 1) Los ratones de edad postnatal 7 se sacrificaron por decapitación; se extrajeron los globos oculares y se incubaron en viales de 2 ml con una solución compuesta de DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”), F12 Glutamax (Lonza®) suplementada con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS, “fetal bovine serum”, Gibco®) y 1 % (v/v) de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco®) durante 12 horas a 37° C en oscuridad. Este medio se denomina a partir de ahora, medio DMEM+FBS+Ab.
- 2) Las placas y pocillos sobre los que se cultivaron las células de Müller fueron tratados al menos 1 hora antes del sembrado de las células con una solución conteniendo 0,1 mg/ml (p/v) de Poli-lisina (Poli-L) en tampón fosfato salino (PBS) a 37° C, para facilitar la adhesión de las células al sustrato. Antes de sembrar las células en las placas, se retira la Poli-L y se realizan 3 lavados con PBS.
- 3) Los globos oculares, después de la incubación de 12 horas en el medio DMEM+FBS+Ab se transfieren a una solución compuesta de DMEM y las enzimas colagenasa (Sigma-Aldrich®) (70 U/ml) y tripsina (Sigma-Aldrich®) al

0,1 % (p/v), donde se mantienen durante 30 min. en un incubador con temperatura constante de 37° C y con el 5 % de CO₂.

- 4) Para detener la reacción enzimática se añadió de nuevo medio DMEM+FBS+Ab y bajo campana se procedió al paso de las retinas a placas Petri de 35 mm donde se realizó una disgregación mecánica mediante pipeteo, tras lo cual, las retinas disgregadas se transfirieron a placas de 6 pocillos, si son destinadas a obtener lisados proteicos para western-blot o de 12 pocillos con cubreobjetos en su base, si su destino es la fijación y el análisis por inmunofluorescencia. En el primer caso se siembra el equivalente a una retina por pocillo en un volumen de 2 ml de DMEM+FBS+Ab, mientras que en el segundo, se destina el equivalente a la mitad de una retina en un volumen de 1 ml.
- 5) Los disgregados de retina se incubaron en el medio DMEM+FBS+Ab con temperatura constante de 37° C y 5 % de CO₂ durante 3 días. A partir de entonces, se realizó el primer cambio de medio de cultivo, retirando el medio original junto con los restos celulares que no se han adherido a la base del pocillo, y añadiendo 2 ó 1 ml de DMEM+FBS+Ab en función de la placa, realizando previamente 3 lavados con el mismo medio.
- 6) El cambio de medio se realizó cada dos días empleando para ello una bomba de vacío (KNFLab, Laboport) y añadiendo posteriormente el volumen de medio DMEM+FBS+Ab correspondiente, en función del tipo de placa.
- 7) En el día de cultivo 15 (DIC 15), la confluencia de las células en la placa era de aproximadamente un 75 % mientras que, en el día de cultivo 21 (DIC 21) era próxima al 100 %. Para los análisis de inmunofluorescencia (detallado en el apartado de “Inmunofluorescencia”) se fijaron células de ambos días de cultivo y para los análisis de expresión proteica (detallado en el apartado de “western-blot”), también se utilizaron lisados proteicos de cultivos primarios de ambos periodos, DIC 15 y DIC 21.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Para generar anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína CRB2 de ratón se empleó la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para seleccionar una secuencia antigénica única de esta proteína, usando la herramienta Antigenicity Plot de la página web www.bioinformatics.org. La secuencia correspondiente a los aminoácidos 1243 a 1256 con una cisteína en su extremo terminal N-terminal fue enviada a la empresa GenScript Corporation™ para la generación del péptido y antisuero purificado de conejo.

INMUNOFLUORESCENCIA

Se han realizado análisis mediante inmunofluorescencia en criosecciones de globos oculares, en preparaciones *flat-mount* de retinas, y en cultivos primarios de células de Müller. En cada uno de los casos, la obtención y preparación del material se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Criosecciones

Tras el sacrificio de animales control y mutantes en los estadios P7, P21 y P90 (al menos 5 animales de cada edad), se extrajeron sus globos oculares y se realizó una incisión en la córnea con una cuchilla para permitir la entrada del fijador. Los ojos se fijaron durante 2 horas, con paraformaldehído (PFA) al 4 % (p/v) diluido en tampón fosfato 0,1 M pH 6,9, a 4°C en agitación tras lo cual se efectuaron varios lavados durante 1 hora con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 para eliminar el exceso de fijador. Bajo lupa se procedió a la disección de la córnea y los globos oculares se crioprotegieron en soluciones crecientes de sacarosa (p/v) de 10, 20 y 30 % en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 durante 12 horas a 4°C en agitación. Posteriormente, se incluyeron en Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura) y se congelaron en nitrógeno líquido, siendo almacenados a -20°C hasta el momento de su utilización. Para la obtención de secciones de 14 µm de grosor se utilizó el criostato Microm HM560 de Thermo Scientific. Las secciones fueron recogidas en portaobjetos Superfrost Ultra Plus® (ThermoFisher Scientific), y conservadas a -20°C hasta el momento de su utilización.

2. Obtención de preparaciones *flat-mount* de retina

Con objeto de analizar el desarrollo vascular y disposición microglial en las retinas de animales control y mutante, se obtuvieron retinas *flat-mount* mediante la decapitación de animales en el estadio P3 y P7. Seguidamente, se realizó una marca sobre la porción dorsal del globo ocular con una aguja incandescente, que sirvió de referencia de la orientación de la retina a lo largo del proceso de extracción. Los globos oculares se fijaron y lavaron del mismo modo que el descrito para las criosecciones. Posteriormente se procede a la extracción de la retina neural con pinzas y tijeras oftalmológicas, realizando un pequeño corte en su área dorsal para poder extenderla en plano. Sobre la retina *flat-mount* se realizó la técnica inmunofluorescente correspondiente y una vez finalizada, se hicieron cuatro cortes perpendiculares dos a dos en la retina para extenderla en un portaobjetos donde se añadió el medio de montaje Prolong® Gold antifading reagent (ThermoFisher Scientific) y se coloca el cubreobjetos.

3. Cultivos

La fijación de los cultivos primarios de células de Müller a los 15 y 21 días de cultivo, se realizó tras la retirada del medio de cultivo, tras lo cual se añadió PFA al 4 % diluido en tampón fosfato 0,1 M pH 6,9 a temperatura ambiente durante 10 minutos.

A continuación, y para todos los casos, se ha procedido al siguiente protocolo de inmunofluorescencia:

Lavados y permeabilización

En todos los casos (criosecciones, preparaciones *flat-mount* y cultivos celulares), en primer lugar se realizó un lavado con de 10 min. con PBS pH 7,4 a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con PBS con Triton™ X100 (Sigma-Aldrich®) (PBS-Tx) a una concentración de 0,02 % (v/v) para las criosecciones, 0,5 % para las retinas *flat-mount* y 0,2 % para los cultivos primarios de células de Müller. En aquellos pasos que requieren permeabilización, se utiliza la misma concentración de detergente Triton™ X100.

Pre-incubación

Para bloquear los sitios inespecíficos en el tejido o células y evitar el marcaje de fondo, las muestras incubaron en una solución de PBS-Tx con BSA al 1 % (p/v) y suero al 5 % (v/v) del animal en el cual está hecho el anticuerpo secundario a utilizar, durante 1 hora, a temperatura ambiente.

Incubación con el anticuerpo primario

Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (marcaje simple), o mezcla de anticuerpos primarios (doble marcaje) (indicados en la [Tabla 1](#)) en PBS-Tx, 1 % de BSA y 2 % de suero del animal en el cual esté hecho el anticuerpo secundario a utilizar durante una noche a 4° C. Tras la incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tx de 10 min. cada uno.

Incubación con el anticuerpo secundario y marcadores nucleares

Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (marcaje simple), o mezcla de anticuerpos secundarios (doble marcaje) AlexaFluor® 488, AlexaFluor 555® (ThermoFisher Scientific), CY2 o CY3 (Sigma-Aldrich®) dirigidos contra la fracción constante del anticuerpo primario a una concentración de 1:750 (v/v) en el caso de los anticuerpos Alexa, y a una de concentración de 1:250 en el caso de los anticuerpos CYs, en una solución de PBS-Tx, 1% de BSA y 2% de suero del animal en el que está hecho el anticuerpo secundario. Además se añadió el marcador nuclear DAPI. Tras varios lavados con PBS-Tx de 10 min. cada uno, se realizó un último lavado con PBS tras lo cual se añadió el medio de montaje Prolong® Gold antifading reagent (ThermoFisher Scientific) y se colocó un cubreobjetos.

Control de especificidad

Se han utilizado dos tipos de controles negativos:

- Eliminación del anticuerpo primario en la primera incubación, para determinar posibles uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
- Eliminación de la incubación con el anticuerpo secundario, para determinar la presencia de autofluorescencia en el tejido.

WESTERN-BLOT

Preparación de muestras

Para la obtención de todos los lisados proteicos se ha empleado tampón de lisis RIPA (150 mM cloruro sódico, 1 % Triton X-100 (v/v), 0,5 % deoxicolato sódico (p/v), 0,1 % dodecil sulfato sódico (SDS) (p/v), 50 mM Tris, pH 8) al que se añadió inhibidor de proteasas (1:1000 (v/v), Sigma-Aldrich™). En el caso de las retinas, se extrajeron los globos oculares, diseccionado la retina neural bajo lupa con tijeras oftalmológicas y pinzas en el tampón anterior, para posteriormente ser disgregadas mecánicamente mediante el uso de homogeneizadores de vidrio. Las retinas así procesadas se incubaron en el mismo tampón de lisis durante 2 horas a 4° C en agitación y se centrifugaron a 12.000 g durante 20 minutos a 4° C con objeto de obtener el sobrenadante y desechar el precipitado. Para la obtención de las proteínas a partir de los cultivos primarios de células de Müller, primero se retiró el medio de cultivo, se añadió el tampón de lisis y se empleó un raspador de células para obtener las muestras. La concentración de proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories), utilizando el espectrofotómetro LT 400 microplate reader (Labtech). A posteriori se añadió tampón de carga Laemmli pH 6,8 a una concentración final de 2 % SDS (v/v), 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 10% glicerol (v/v), 0,002 % bromophenol blue (p/v), 62,5 mM Tris HCl.

Electroforesis

Para la electroforesis de las proteínas extraídas se utilizaron geles de poliacrilamida (AMRESCO®) bajo condiciones desnaturizantes, compuestos por un gel de separación (a un porcentaje que varía del 10 al 14%, en función del peso molecular de la proteína analizada) y un gel de concentración (4%). Para ello se calentaron las muestras a 70° C durante 10 minutos para conseguir su desnaturalización y se mantuvieron en hielo hasta ser cargadas en el gel. Junto con las proteínas se carga el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad Laboratories). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de entre 90 a 150 voltios en tampón de migración, compuesto de 25 mM de TRIS base, 190 mM de glicina y SDS al 0,1 %, pH 8,3 en agua, en una cubeta mini-PROTEAN™ (Bio-Rad Laboratories) hasta el momento en el que las proteínas de menor peso molecular alcanzan el extremo inferior del gel.

Transferencia

Para la transferencia se emplearon membranas de PVDF Immobilon™ (Millipore®) que previamente fueron activadas con metanol. Se aplicó un amperaje constante de 300 mili-amperios durante 3 horas a 4° C en tampón de transferencia, compuesto de 25 mM de TRIS base, 190 mM de glicina y 20 % metanol (v/v), pH 8,3 en agua, en un sistema Mini Trans-Blot (Bio Rad®).

Preincubación

Previo a la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se incubó en tampón Tris Base Salino con 0,01 % de Tween (v/v) (TBST) y 2 % de BSA (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.

Incubación con el anticuerpo primario

Las membranas con las proteínas se incubaron en una solución con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2) diluidos en tampón TBST-BSA 2 % durante una noche a 4° C.

Lavados e incubación con el anticuerpo secundario

Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente con TBST, tras lo cual, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch™) a una concentración de 1:5000 (v/v) en TBST-BSA 2 % y leche en polvo desnatada al 5 % (p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación se realizaron 3 lavados con TBST de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.

Revelado

Para el revelado de las membranas se empleó el kit de quimioluminiscencia Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio Rad Laboratories) que, debido a la presencia de la peroxidasa de rábano hace que se produzca una señal quimioluminiscente que es expuesta a una película fotográfica Super RX (Fujifilm). La señal se reveló con el kit RP X-OMAT EX II y LO (Kodak).

Tratamiento y cuantificación de imágenes

Las películas fotográficas fueron escaneadas y las bandas proteicas cuantificadas con el programa informático ImageJ, comparando la intensidad de cada banda respecto a su correspondiente control de carga.

MEDICIONES DE RESISTENCIA ELÉCTRICA EN CULTIVOS CELULARES

Para conocer el estado de las uniones celulares que se establecen entre las células de Müller en cultivo se llevaron a cabo mediciones de resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER), empleando para ello el siguiente protocolo:

A los 10 días de cultivo (DIC 10), las células de Müller se resembraron en placas con cestas Transwell®. Para ello, cada pocillo fue tratado con 1 ml de Tripsina-EDTA 1X (Sigma-Aldrich®) durante 5 minutos a 37 °C, previa retirada del medio DMEM+FBS+Ab. La acción de la tripsina fue bloqueada con la adición de 2 ml de FBS, y el volumen final se recogió en un vial de 15 mililitros, que fue centrifugado a 250 rpm durante 5 minutos. Tras desechar el sobrenadante, las células de Müller se resuspendieron en 1 mililitro del medio DMEM+FBS+Ab. En los nuevos pocillos Transwell® se sembraron aproximadamente 50.000 células por pocillo. Para ello, las células se cuantificaron empleando Tripán Blue (Sigma-Aldrich®) para visualizarlas en una cámara Thoma. Una vez conocido el número de células, se llevó la dilución celular a la concentración deseada y se sembraron 100 µl en la cámara del Transwell, y 600 µl de medio DMEM+FBS+Ab en su cámara inferior (Figura M1).

Para registrar la medida de resistencia de las células, se ha utilizado un voltímetro (EVOM2, Epithelial Volttohmer, World Precision Instruments), con electrodos STX2 (World Precision Instruments) que se sumergen en cada una de las cámaras de las cestas Transwell®. El valor de la resistencia se expresa en $\Omega \text{ cm}^2$ y se ha calculado sustrayendo el valor de un blanco (medido en una cámara que carece de células), y normalizada respecto al área del filtro del cultivo. Las células se mantuvieron en cultivo durante 21 días y las mediciones realizadas en tres estadios diferentes, DIC7, DIC14 y DIC21.

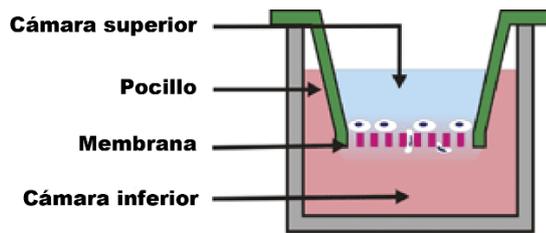


Figura M1: Esquema representativo de las placas de cultivo con cestas Transwell, donde también pueden apreciarse las cámaras superior e inferior. Modificado de Zhu et al., 2011

ANÁLISIS DE LA VASCULARIZACIÓN RETINIANA

Para el análisis del área que ocupa la vasculatura de la retina, las preparaciones *flat-mount* procedentes de animales silvestres y el modelo mutante *Crb1^{rd8}* de los estadios P3 y P7 se tiñeron con el marcador isolectina B₄, y se tomaron imágenes con el objetivo 10X de toda la retina *flat-mount*, procediendo a su posterior reconstrucción utilizando para ello la herramienta *Photomerge* del programa informático Adobe® Photoshop® CS6 Extended (Figura M2). Posteriormente, se midió la cantidad de área ocupada por la vasculatura, delimitando cuadrantes con la misma área y realizando 8 mediciones en cada una de las regiones en las que se dividieron las retinas: dorsonasal (DN), dorsotemporal (DT), ventronasal (VN) y ventrotemporal (VT), utilizando para ello el programa informático ImageJ.

Para evaluar el número de vasos sanguíneos, así como el calibre de los mismos, se adquirieron 4 imágenes por cada región con el objetivo 40X, se trazó una línea perpendicular a la orientación del plexo vascular y se cuantificó el número de ocasiones en los que los vasos atravesaban la línea. Para medir su grosor, se trazaron líneas desde un lado del vaso al otro y se midió la longitud de esa línea. Las mediciones se realizaron sobre 4 imágenes aleatorias de cada región y sobre 10 vasos sanguíneos aleatorios por imagen obtenida.

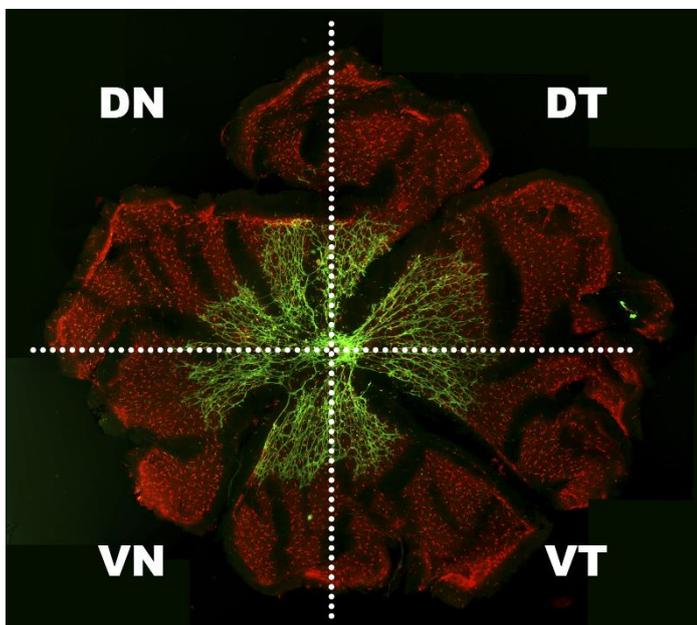


Figura M2:
Reconstrucción representativa de retina *flat-mount*, dividida en cuadrante dorsonasal (DN), dorso-temporal (DT), ventronasal (VN) y ventro-temporal (VT).

ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN MICROGLIAL

Para el análisis de las células microgliales en el estadio P7, las preparaciones *flat-mount* y criosecciones procedentes de animales silvestres y el modelo mutante *Crbl^{rd8}* se identificaron con el anticuerpo IBA-1. Para ello, se obtuvieron imágenes con el objetivo 10X de la totalidad de las retinas *flat-mount* y a lo largo de toda la extensión de las criosecciones y se reconstruyeron con la herramienta *Photomerge* del programa informático Adobe® Photoshop® CS6 Extended. El recuento del número de células positivas para IBA-1 se ha realizado a partir de esas reconstrucciones utilizando para ello la herramienta “Recuento” del programa informático Photoshop® CS6 Extended. En las reconstrucciones obtenidas a partir de las criosecciones se contabilizaron todos los elementos microgliales que se disponen sobre la retina neural, a lo largo de toda la extensión de las secciones. Para cada n, se ha obtenido el promedio de hasta tres reconstrucciones representativas procedentes del mismo animal.

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes de fluorescencia empleadas en este trabajo fueron obtenidas con el microscopio de epifluorescencia Olympus PROVIS AX70 mediante una cámara digital DP Olympus© acoplada a éste, o el microscopio invertido Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Microscopy, UC, USA, Zeiss®) acoplado a una cámara Axio MRm Zeiss®. Las imágenes fueron capturadas con el programa informático Micro CDD en el caso del primero, y con el programa informático ZEN 2011, en el caso del segundo. Los distintos fluorocromos utilizados (AlexaFluor® 488 o CY2 Sigma-Aldrich®, AlexaFluor® 555 o CY3

Sigma–Aldrich®) fueron excitados con láseres de 488 nm y 543 nm respectivamente. La captura de imágenes de todos los canales se realizó de modo secuencial. Para cada anticuerpo, las imágenes obtenidas se realizaron con las mismas condiciones de exposición. Los ajustes de brillo y contraste han sido realizados con el programa informático Adobe® Photoshop® CS6 Extended.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos realizados en la presente tesis doctoral se han basado en el programa informático IBM® SPSS® Statistics 20.0.

Como primer paso, y para comprobar si las variables a estudiar siguen una distribución normal de sus datos, se ha utilizado el test de Kolmogorov–Smirnof, cuando la n es mayor de 50; y el test de Shapiro–Wilk para muestras con una n menor de 50. Para aquellas muestras que presentan una distribución paramétrica, se ha comprobado la homogeneidad en sus varianzas, es decir, si son o no son homocedásticas. Para tal fin, se ha utilizado la prueba de Levene. Las muestras paramétricas y homocedásticas han sido sometidas a tests paramétricos, mientras que en las muestras que presentan una distribución no paramétrica o con varianzas distintas, han sido sometidas a tests no paramétricos.

Para determinar si existen diferencias en muestras con una distribución paramétrica y varianzas iguales, se ha realizado la prueba de T de Student, para comparaciones entre dos grupos, o el test ANOVA para comparaciones de más de dos grupos.

Para las muestras que no tienen una distribución paramétrica, o con varianzas distintas, se ha determinado si existen diferencias entre las muestras mediante la prueba de U de Mann–Whitney para comparar dos muestras independientes, o la de Kruskal–Wallis para comparar más de dos muestras independientes.

Se ha considerado que existen diferencias significativas cuando el p–valor obtenido ha sido menor de 0,05 (abreviado como *), y diferencias altamente significativas cuando el p–valor ha sido menor de 0,01 (abreviado como **).

ANTICUERPOS Y MOLÉCULAS FLUORESCENTES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	CONCENTRACIÓN
Acuaporina 4	Alomone Labs	249 - 323	1 / 500
aPKC ζ	Santa Cruz Biotechnologies	sc-216	1 / 200
Bassoon	Santa Cruz Technologies	sc - 216	1 / 5000
β - catenina	Santa Cruz Technologies	sc - 1496	1 / 250
Catenina - p120	BD Biosciences	610134	1 / 200
CD - 68	Abserotec	MCA341R	1 / 250
CRB2	ThermoFisher scientific	PA5 - 25628	1 / 200
DAPI	Sigma - Aldrich	D9542	1 / 10000
F-actina - FITC	Sigma - Aldrich	P5282	1 / 500
FosfoYAP	Cell Signaling	4911S	1 / 200
GFAP	Sigma - Aldrich	G6171	1 / 500
Glast	LSBio	LS-C94136	1 / 400
Glutamina - Sintetasa	Millipore	MAB302	1 / 500
IBA - 1	Wako Industries	019-19741	1 / 750
Islet - 1	Hibridoma Bank	402D	1 / 500
Isolectina B4	Vector Laboratories	FL - 1201	1 / 100
Kir 4.1	Alomone Labs	APC - 035	1 / 400
Na -K - ATPasa	abcam	ab7671	1 / 200
PALS - 1	Abnova	H00064398 - A01	1 / 250
PAR 3	Millipore	07 - 330	1 / 100
PATJ	Abcam	Ab102113	1 / 250
PKC α	Sigma - Aldrich	P4334	1 / 5000
PNA - FITC	Sigma Aldrich	L7381	1 / 500
YAP	Santa Cruz Biotechnologies	sc-101199	1 / 100
ZO - 1	ThermoFisher scientific	33 - 9100	1 / 100

Tabla 1. Tabla en la que se muestran los anticuerpos y moléculas fluorescentes utilizadas para análisis inmunofluorescentes, la casa comercial donde se han adquirido, su referencia de venta y la concentración utilizada.

ANTICUERPOS	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	CONCENTRACIÓN
Acuaporina 4	Alomone Labs	249 - 323	1 / 500
B - catenina	Santa Cruz Technologies	sc - 1496	1 / 250
CD - 11B	Abcam	Ab75476	1 / 500
CRB2	Diseño propio		2,25 µg / ml
GAPDH	Sigma - Aldrich	G8795	1 / 10000
Kir 4.1	Alomone Labs	APC - 035	1 / 400
Na -K - ATPasa	Abcam	Ab7671	1 / 200
PALS - 1	Abnova	H00064398 - A01	1 / 1000
PATJ	Abcam	Ab102113	1 / 500
VEGF	Bioss	BS - 0279R	1 / 500
B - actina	Millipore	MAB302	1 / 5000
B - tubulina	Sigma - Aldrich	T2200	1 / 10000

Tabla 2. Tabla en la que se muestran los anticuerpos usados para los análisis de Western-blot, la casa comercial donde se han adquirido, su referencia de venta y la concentración utilizada.

RESULTADOS

ESTADO DE LA MLE Y RSA EN EL ESTADIO POSTNATAL P7 EN RETINAS CONTROL Y MUTANTE PARA CRB1

Por los estudios realizados en modelos mutantes para CRB1, se conoce que las primeras alteraciones observadas en la retina del modelo mutante *Crb1^{rd8}* se producen a las dos semanas de edad (Mehalow et al., 2003); sin embargo, estudios previos en nuestro grupo de investigación pusieron de manifiesto, gracias a experimentos realizados a microscopía electrónica, que a una edad tan temprana como P7 ya se producían una serie de modificaciones en las uniones entre las células de Müller y los fotorreceptores en la MLE (Herranz-Martín, 2013). Ya que el complejo de polaridad Crb, y la proteína CRB1 en particular, tienen un papel indispensable en el mantenimiento de la polaridad celular y en el correcto establecimiento de las uniones celulares, nos propusimos comprobar el estado de la MLE en las retinas control y mutantes mediante el empleo de distintos anticuerpos en este estadio tan temprano.

En primer lugar, quisimos analizar la expresión de dos elementos que forman parte del complejo de polaridad Crb, las proteínas CRB2 y PALS-1, y su posible alteración estructural debido a la disfunción de CRB1 en el modelo *Crb1^{rd8}* (Figura R1: A-D). En retinas control, estas proteínas se disponen en la RSA de la MLE de un modo continuo, sin apreciarse discontinuidades a lo largo de toda esta estructura (Figura R1: A y C). Por el contrario, en la retina del modelo mutante encontramos alteraciones a lo largo de toda su extensión, caracterizadas principalmente porque el marcaje de la RSA de la MLE era más estrecho, no abarcaba todo el grosor de este área como ocurre en las retinas control, e incluso por la ausencia de este marcaje en zonas puntuales (asteriscos en Figura R1: B y D). Estas alteraciones en el marcaje son más notorias en zonas en las que se está produciendo una desestructuración de la CNE, reflejo de los primeros signos de la formación de una roseta de fotorreceptores en desarrollo en el modelo mutante (Figura R1: D), que podría deberse a que la disfunción de la proteína CRB1 condiciona el correcto ensamblaje de otros miembros del complejo Crb en un estadio temprano.

Para analizar si la desestructuración del complejo Crb también influye en la localización del otro complejo de polaridad apical, el complejo Par, se analizó la

distribución de dos de sus componentes, concretamente PAR-3 y aPKC ζ

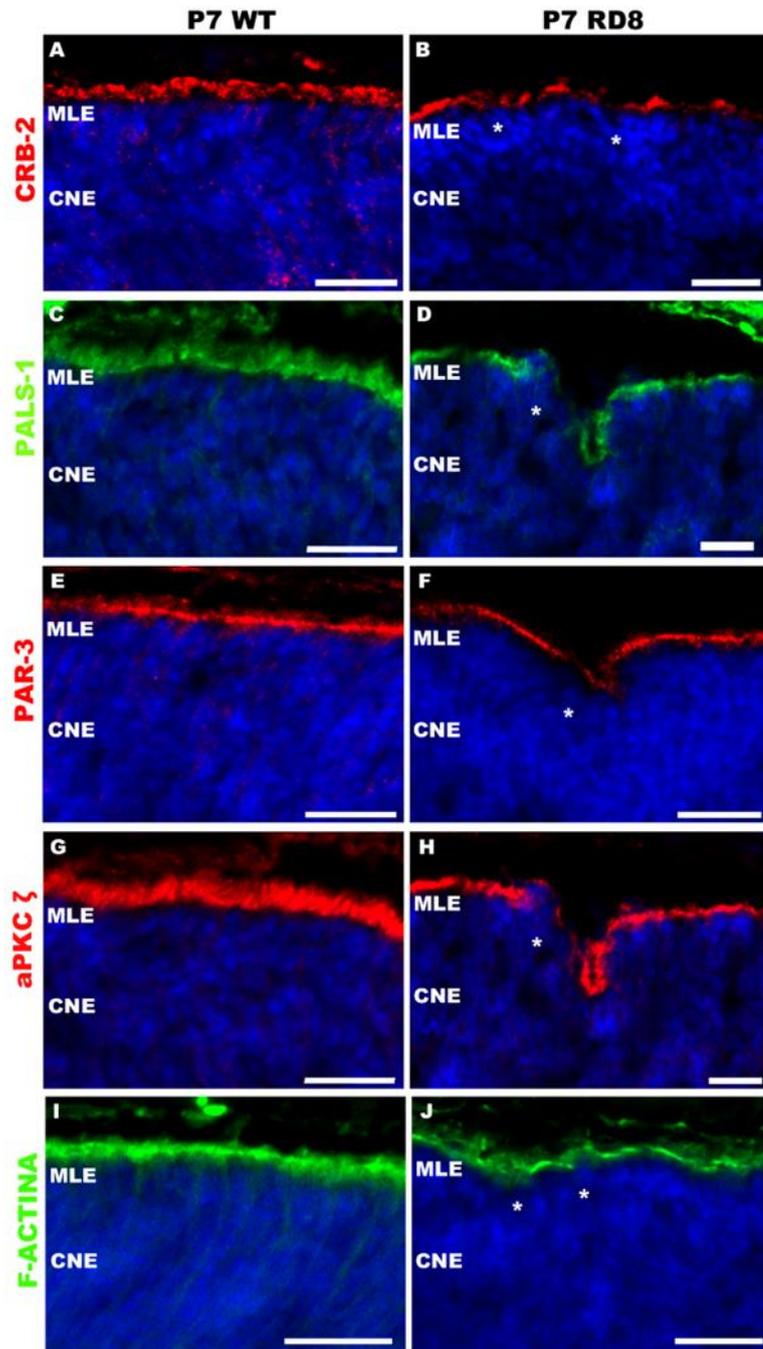


Figura R1: Estructura de la RSA y la MLE de retinas control y mutantes para CRB1 a P7. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de retinas silvestres (A, C, E, G, e I) y del modelo mutante *Crbr^{rd8}* (B, D, F, H y J) mostrando la expresión de los miembros del complejo Crb, CRB2 (A y B) y PALS-1 (C y D), de los componentes del complejo Par, PAR-3 (E y F) y aPKC ζ (G y H) y de F-actina como marcador del estado de la MLE (I y J). En las retinas mutantes, existen discontinuidades en algunos puntos de la RSA y MLE, provocando la ausencia de marcaje de estos anticuerpos (asteriscos). CNE: Capa nuclear externa. MLE: Membrana limitante externa. Barras de escala: 20 μ m.

(Figura R1: E-H). De un modo similar a lo observado en las retinas silvestres con la distribución de las proteínas del complejo Crb, tanto PAR-3 como aPKC ζ muestran una localización continuada a lo largo de la RSA de la MLE del genotipo control (Figura R1: E y G). Sin embargo, también como ocurría con las proteínas del complejo Crb, existe una discontinuidad en el marcaje para PAR-3 y aPKC ζ en las retinas mutantes especialmente vinculado a las primeras evidencias de rosetas en formación en este estadio temprano (Figura R1: F y H, asteriscos). De este modo, al igual que ocurre con alguno de los miembros del complejo Crb, la localización de estos miembros del complejo Par también se vería condicionada, desde un estadio temprano, por el truncamiento de la proteína CRB1, aunque en este modelo, estas alteraciones tengan lugar en áreas puntuales de la retina.

Para confirmar el estado de las uniones adherentes de la MLE en las retinas de ambos genotipos se ha empleado el marcador F-actina, ya que la actina es uno de los componentes que se asocia directamente a este tipo de uniones celulares. En las retinas de los animales control a P7 se observa un marcaje continuo a lo largo de la estructura que forma la MLE (Figura R1: I), y esta localización está comprometida en las retinas procedentes del genotipo mutante, donde hay zonas que carecen de esa continuidad, así como una menor intensidad en el marcaje para esta proteína (Figura R1: J, asterisco). Tomados en conjunto, los resultados obtenidos a partir del marcaje para algunos miembros de los complejos de polaridad apical Crb (CRB2 y PALS-1) y Par (PAR3 y aPKC ζ), así como de F-actina, marcador de la integridad de la MLE, refleja alteraciones de la RSA y MLE de las retinas del modelo mutante *Crb1^{rd8}* en el estadio temprano P7, evidenciando la importancia e influencia de la proteína CRB1 en el correcto ensamblaje de las proteínas de polaridad y de las uniones adherentes.

De manera adicional, para conocer si existen variaciones en la expresión de las proteínas del complejo Crb, CRB2 y PALS-1, y del marcador de uniones adherentes β -catenina. Para ello se realizaron análisis de western-blot de lisados proteicos de retinas procedentes de ambos genotipos (n=3 para cada genotipo) a P7 (Figura R2), donde el análisis cuantitativo mostró que no existen diferencias significativas entre ambos genotipos en la cantidad de proteína CRB-2 (p-valor=0,85) (Figura R2: A), PALS-1 (p-valor=0,39) (Figura R2: B) o β -catenina (p-valor=0,21) (Figura R2: C).

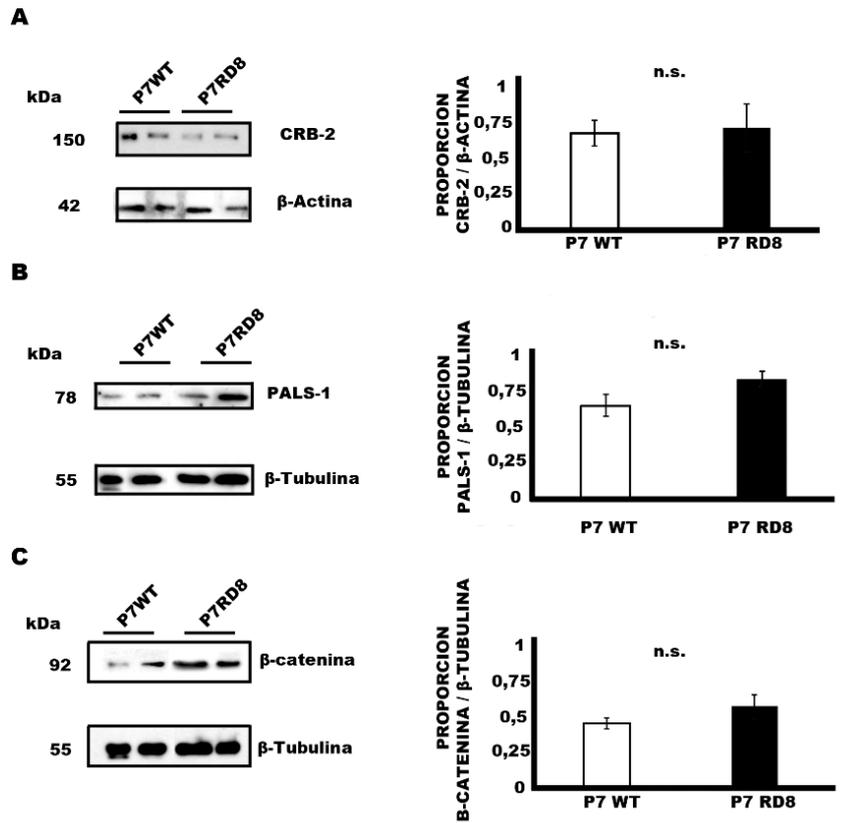


Figura R2: Análisis comparativo mediante western-blot de la expresión de CRB2, PALS-1 y β -catenina en las retinas control y mutantes en el estadio P7. La cuantificación de la cantidad de CRB2 (150 kDa) frente a su control de carga, β -actina (42 kDa) (A), de PALS-1 (78 kDa) (B) y de β -catenina (92 kDa) (C) frente a su control de carga, β -tubulina (55 kDa) no mostró diferencias significativas entre retinas de ambos genotipos. Los datos se representan como la media \pm s.e.m. n.s.: No significativo.

EL PROCESO ANGIOGÉNICO EN EL MODELO MUTANTE *Crb1^{rd8}*

Tal y como se describió en la introducción, la angiogénesis en la retina de roedores se produce durante las tres primeras semanas del desarrollo post-natal gracias a la acción conjunta de varios elementos, como los astrocitos, células de Müller y las células microgliales. Las perturbaciones estructurales observadas por microscopía electrónica, así como el incremento de la proteína GFAP en las células de Müller ya habían sido previamente descritas en nuestro grupo de investigación para el estadio temprano P7 (Herranz-Martín, 2013). Esos datos, junto con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral en relación con el estado de la RSA y la MLE, que sugieren alteraciones tempranas de las células de Müller en este modelo mutante ya a P7, nos indujeron a analizar si estas alteraciones gliales podrían influir también en el correcto desarrollo angiogénico de estas retinas.

Para ello se ha realizado el análisis del plexo superficial angiogénico durante la primera semana de vida de los ratones, concretamente, a P3 y P7, tanto en animales control como mutantes para *CRB1*, utilizando para ello el marcador de vasos sanguíneos Isolectina-B4 en preparaciones de retina en *Flat-mount* (Figura R3). Esta técnica ha permitido dividir las retinas en distintos cuadrantes: dorsal, ventral, nasal y temporal. A P3, los vasos sanguíneos ya han invadido la retina a partir del disco óptico, pero sin alcanzar sus límites periféricos (Figura R3: A y B), mientras que a P7 se disponen ocupando la totalidad del plexo superficial (Figura R3: E y F). Para analizar el porcentaje de área ocupada por los capilares en el estadio P3 se empleó el programa informático ImageJ (el procedimiento ha sido detallado previamente en el apartado de material y métodos), no encontrando diferencias significativas entre las retinas control y mutantes (n=3 retinas por cada genotipo), ni en la totalidad del área de la retina (p-valor=0,56), ni en ninguna de las áreas por separado (DN: p-valor=0,29; DT: p-valor=0,17; VN: p-valor=0,81; VT: p-valor=0,50) (Figura R3: I y J, detalle de la región ventronasal en C y D). Por el contrario, los datos indican que el área ocupada por los vasos sanguíneos en las retinas mutantes en el estadio P7 (n=5 retinas por cada genotipo) experimenta un incremento significativo en comparación con las retinas silvestres (p-valor=0,037) y que es específico de las regiones ventro-nasales y ventro-temporales (DN: p-valor=0,66; DT: p-valor=0,47; VN: p-valor=0,002; VT: p-valor=0,011) (Figura R3: K y L, detalle de la región ventronasal en G y H).

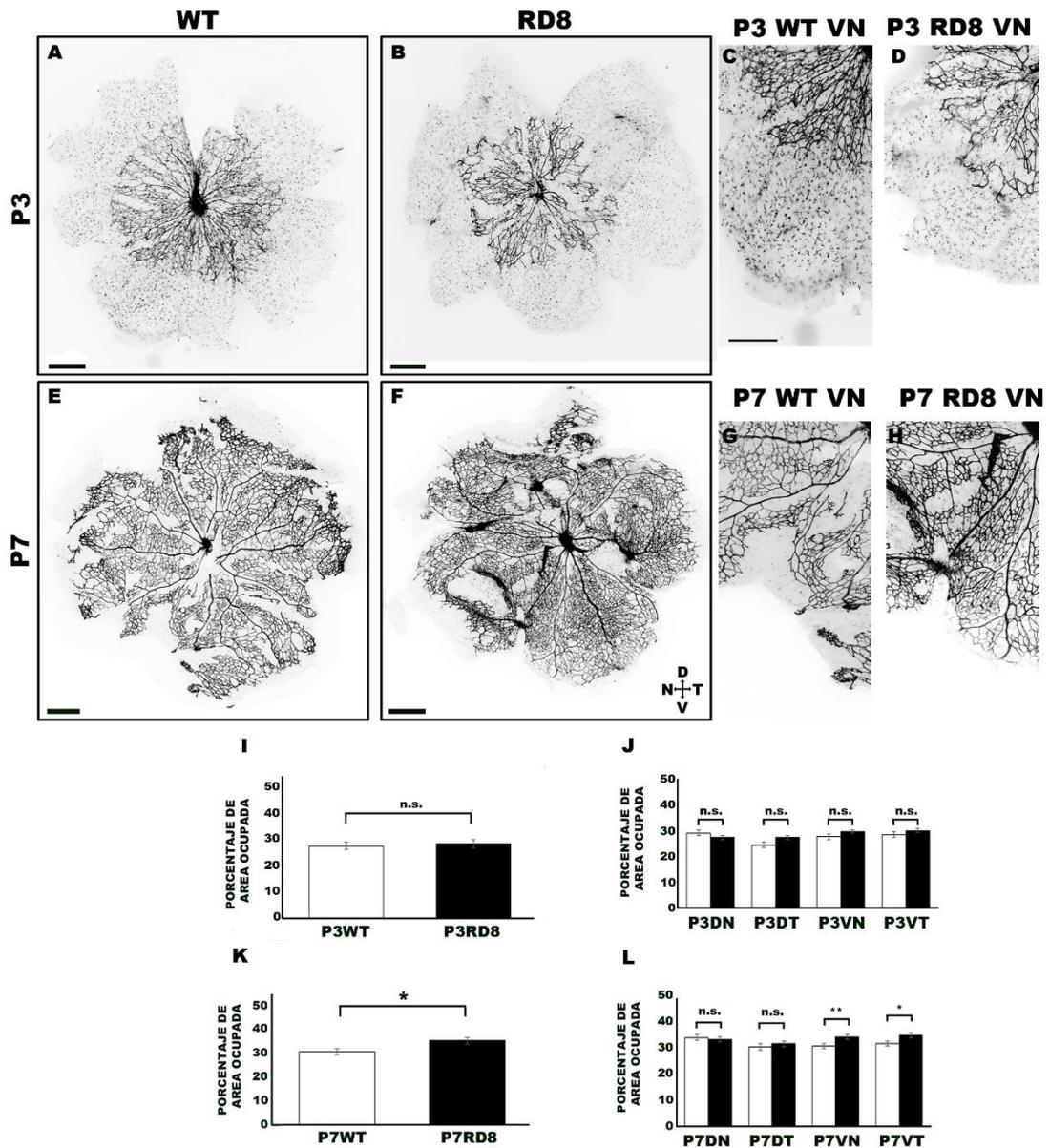


Figura R3: Ocupación vascular en las retinas control y mutantes. Imágenes representativas tomadas de preparaciones *Flat-mounts* de retinas silvestres y mutantes, en el estadio P3 (A-D) y P7 (E-H) para la tinción de vasos sanguíneos mediante el marcador Isolectina B4 (en negro). El porcentaje de área ocupada por los vasos no muestra diferencias significativas en el estadio P3, ni en la totalidad de la retina, ni en las distintas áreas, al comparar ambos genotipos (I y J). En el estadio P7 hay un incremento significativo del área ocupada por los vasos en el genotipo mutante (K), específicamente en las áreas ventro-nasales y ventro-temporales (L). D, dorsal; N, nasal; V, ventral; T, temporal; DN, dorsonasal; DT, dorsotemporal; VN, ventronasal; VT, ventrotemporal. Barras de escala: 500 μ m.

Debido a las diferencias encontradas en el área ocupada por los vasos sanguíneos en el estadio P7 entre genotipos, se analizó con más detalle el estado de la vascularización en estas retinas, midiendo su calibre y realizando una aproximación del número de vasos presentes en las retinas de cada genotipo (n=5 retinas por cada genotipo) (Figura R4). Para ello se utilizó el programa informático ImageJ (los procedimientos han sido detallados previamente en la sección de material y métodos). Para calcular el número de vasos se estableció una línea perpendicular a la orientación del frente angiogénico (similar a lo mostrado en Figura R4: B), y se cuantificó el número de intersecciones de los vasos sobre la línea, no encontrando diferencias significativas entre las retinas de ambos genotipos (p-valor=0,62) (Figura R4: C). La medición del calibre de los vasos, sin embargo, mostró un mayor grosor global de los elementos vasculares en el modelo mutante (p-valor=0,036), aunque las diferencias más significativas se correspondían con las zonas más ventrales (DN: p-valor=0,51; DT: p-valor=0,15; VN: p-valor=0,008; VT: p-valor=0,026) (Figura R4: D y E).

Para explorar qué factores podrían estar influyendo en este mayor grosor de los vasos sanguíneos de las áreas ventrales se analizó la expresión proteica de uno de los factores claves durante el desarrollo angiogénico de la retina, el factor pro-angiogénico VEGF. Para ello se realizaron experimentos de western-blot (Figura R4: F y G) a partir de lisados proteicos de retinas del estadio P7 procedentes de ambos genotipos (n=3 para cada genotipo). Los datos muestran que en las retinas mutantes hay un incremento significativo en la cantidad de VEGF respecto al control (p-valor=0,019). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que las primeras alteraciones sufridas por las células de Müller como consecuencia de la disfunción de la proteína CRB1 parecen estar condicionando el correcto desarrollo angiogénico en las retinas mutantes.

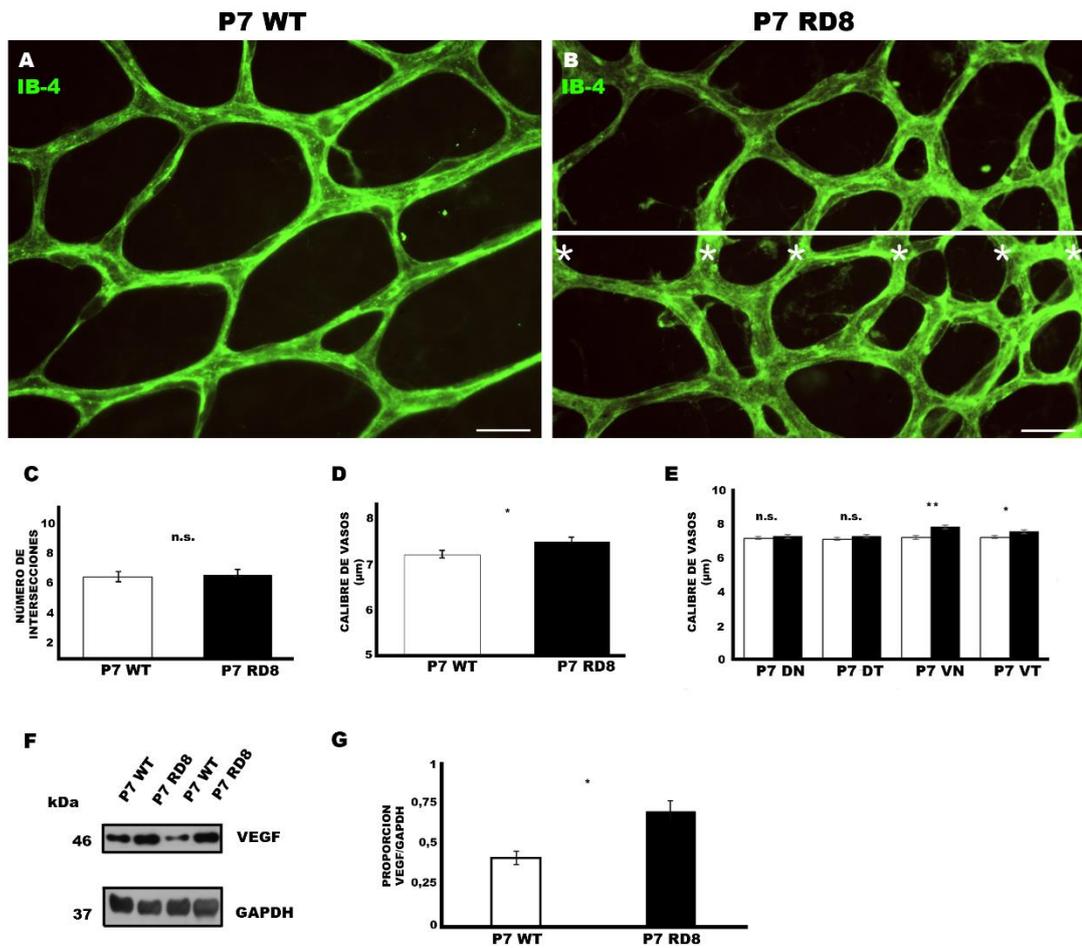


Figura R4: Medición del calibre y número de vasos sanguíneos en las retinas control y mutantes para CRB1. Imágenes de vasos sanguíneos procedentes de retinas control y mutantes en el estadio P7 teñidas con el marcador Isolectina B4 (en verde) (A y B). No existen diferencias significativas en el número de intersecciones del plexo vascular sobre la línea marcada entre ambos genotipos (C). El calibre de los vasos muestra mayor grosor en las retinas mutantes (D), concretamente en los de la zona ventral (E) y esta diferencia con las retinas control es significativa. Western-blot y cuantificación de los niveles relativos de VEGF frente a GAPDH (control de carga), de retinas P7 de ambos genotipos mostrando un incremento significativo en las retinas mutantes respecto al control (F y G). Barras de escala: 20 µm.

LA POBLACIÓN MICROGLIAL EN EL ESTADIO P7

Debido a las alteraciones morfológicas observadas en el estadio P7 en retinas mutantes para CRB1, tanto a nivel de la MLE, como en los vasos sanguíneos durante la angiogénesis, nos propusimos evaluar el comportamiento de las células microgliales en este estadio, ya que, al fin y al cabo, este tipo celular presenta una alta sensibilidad a cualquier tipo de perturbación que suceda en el SNC y su posible activación podría estar condicionando los mecanismos angiogénicos, un proceso que, como ya se ha descrito previamente, está regulado por distintos elementos celulares, entre ellos la microglía.

Con este propósito se realizó una primera aproximación mediante reconstrucciones de criosecciones de retinas de ambos genotipos, y se analizó la distribución de estas células mediante el marcaje mediante inmunofluorescencia para la proteína específica de células microgliales IBA-1 (Figura R5: A y B). En este estadio temprano, la distribución microglial se concentra principalmente en las capas más internas de la retina, especialmente en las retinas procedentes de los animales control, donde no se disponen más allá de la CPE (Figura R5: A), que concuerda con lo que ya se conoce de estas condiciones y tipo celular. De manera puntual, por el contrario, es posible encontrar elementos microgliales en zonas más externas en las retinas mutantes, asociados principalmente a áreas de la CNE que presentan alteraciones y que se corresponden con los primeros signos de desarrollo de rosetas (Figura R5: B, inserto en B). Tras el recuento de este tipo celular a lo largo de toda la extensión retiniana (procedimiento detallado en el apartado material y métodos), y su posterior análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas en el número total de células de microglía entre ambos genotipos ($n=3$ para genotipo, $p\text{-valor}=0,21$) (Figura R5: F).

Adicionalmente, y para analizar con más detalle el número y naturaleza de este tipo celular durante la ocupación vascular del plexo retiniano superficial, se realizó la reconstrucción y cuantificación de células de microglía marcadas para IBA-1 en *Flat-mount* de retina del estadio P7 (Figura R5: C y D). La obtención de imágenes con el objetivo de 20x permitió, por un lado, diferenciar entre elementos ramificados de ameboides en base a sus características morfológicas (Figura R5: E; flecha, microglía ramificada; punta de flecha, microglía ameboide) y, por el otro, cuantificar y comparar el número de ambos tipos celulares. Los análisis estadísticos ($n=3$ para cada genotipo) no arrojaron diferencias significativas entre el número de elementos ramificados (p -

valor=0,68), ameboides (p-valor=0,11) o total (p-valor=0,98) entre ambos genotipos (Figura R5: G).

Por todo ello, y en relación con los análisis de las células microgliales en este estadio temprano P7, se puede inferir que la formación de las primeras rosetas parece estar atrayendo a un restringido número de elementos microgliales hacia las capas más externas de las retinas mutantes, aunque esas lesiones, todavía tempranas y limitadas, no parecen estar provocando un incremento significativo en el número de tipo celular.

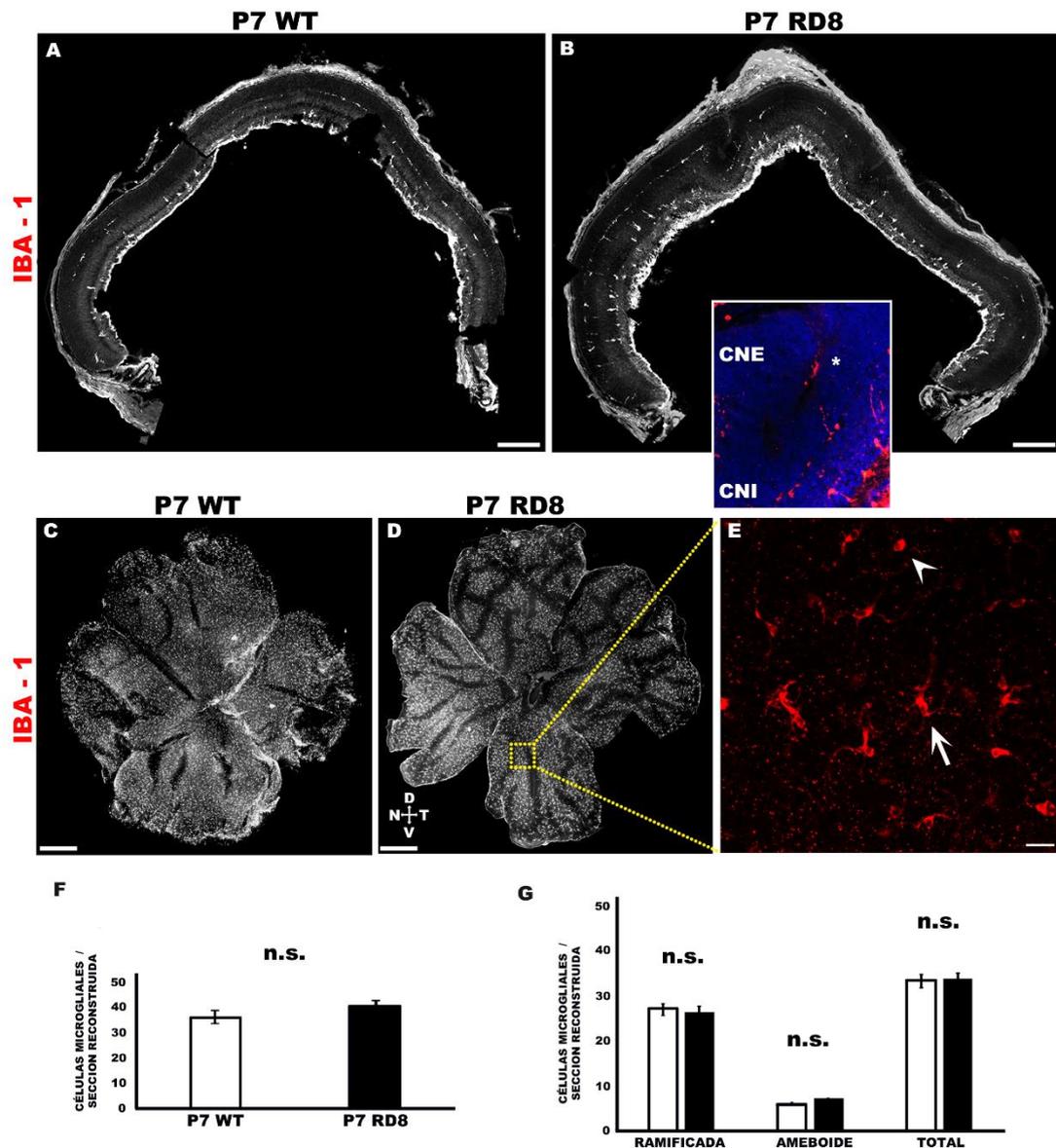


Figura R5: La microglía en el estadio temprano P7. A y B: Imágenes representativas de reconstrucciones de criosecciones de retina control y mutante para CRB1 con inmunofluorescencia para IBA-1 mostrando la distribución de células microgliales. Inserto en B: célula microglial en las capas más externas de la retina. C y D: Imágenes representativas de reconstrucciones de *Flat-mounts* de retina control y mutante para CRB1 con marcaje inmunofluorescente para IBA-1. E: Imagen representativa a 20X de células marcadas para IBA-1. Flecha: microglía ramificada, cabeza de flecha: microglía ameboides. F: Gráfica de la cuantificación del número de células de microglía total en retinas control y mutantes para CRB1 mostrando que no hay diferencias significativas en el número de células entre genotipos. G: Gráfica de la cuantificación del número de células microgliales diferenciando entre el fenotipo ameboides y ramificada. No se encontraron diferencias significativas entre genotipos. CNE: Capa nuclear externa. CNI: Capa nuclear interna. Barras de escala: 100 μm en A y B. 500 μm en C y D. 20 μm en E.

ESTADO DE LA MLE Y RSA EN LOS ESTADIOS P21 Y P90

Una vez se analizaron las posibles alteraciones en la retina del modelo mutante a un estadio temprano como es a P7, se investigaron los procesos que podrían estar relacionados con la mutación de CRB1 en las células de Müller y la influencia que esta mutación podría estar ocasionando sobre la funcionalidad y estructura retiniana en edades más avanzadas. Para ello se seleccionaron dos estadios, uno considerado intermedio, P21, y un tardío, P90, cuando los mecanismos degenerativos se encuentran más avanzados. Para ello, se analizaron:

- El estado de la RSA y MLE y la localización y expresión de varias de las proteínas involucradas en polaridad celular y en uniones celulares.
- Marcadores específicos de las células de Müller que puedan aportar información del comportamiento de este tipo celular y si su alteración puede condicionar determinados mecanismos homeostáticos y de gliosis en la retina.
- La población microglial y cómo el progresivo daño en la retina puede estar modulando su proliferación o activación.
- El estado de elementos neurales en estas retinas en ambos estadios, como las células fotorreceptoras y sus sinapsis, células bipolares y células ganglionares.
-

De la misma forma que el análisis realizado a P7, el estadio más temprano empleado en el presente estudio, se ha comparado la expresión de determinadas proteínas de polaridad y de uniones adherentes entre las retinas de los genotipos control y mutante para CRB1 a P21 y P90, los estadios intermedio y más tardío analizados. De este modo, en las retinas del genotipo control, la proteína del complejo Crb, CRB2, y el componente del complejo Par, PAR-3, muestran una localización homogénea y continua a lo largo de la RSA en ambos estadios (Figura R6 y R7: A y C), que es lo esperable en aquellas retinas que no sufran alteraciones en los complejos de polaridad o sin degeneración. Para analizar la organización de las uniones adherentes de la MLE, de la misma forma que los estudios a P7, se empleó el marcador F-actina y en el genotipo silvestre esta estructura muestra un marcaje continuado y lineal, que es un indicativo del correcto establecimiento de las adhesiones celulares en este estrato (Figura R6 y R7: E). En el caso de las retinas del modelo mutante, la tinción con estos mismos marcadores revela diferencias en comparación con el modelo silvestre, de forma similar a lo mostrado en las retinas mutantes más jóvenes (estadio P7). Para todos los marcadores se evidencia una deslocalización de las proteínas, especialmente llamativa en aquellas áreas que

presentan translocación de núcleos de la CNE al espacio subretinal, cuando existe una desorganización de la CNE, o cuando se ha formado una roseta ya consolidada. En estas mismas áreas también se evidencia una notoria pérdida de tinción para la proteína CRB2 en la RSA de la MLE (Figura R6 y R7: B). De la misma forma, la pérdida de polaridad provocada por la disfunción de CRB1 podría estar condicionando asimismo la localización de los miembros del complejo Par, como ocurre con la proteína PAR-3 (Figura R6 y R7: D). La tinción frente a F-actina muestra que esta proteína no se dispone de manera continuada en el modelo mutante, demostrando una pérdida de uniones adherentes en ambas edades, incluso en áreas sin signos de rosetas (Figura R6 y R7: F). Además, al analizar la integridad de las uniones adherentes por el marcaje para β -catenina, una de las proteínas relevantes en este tipo de unión, se hace evidente que en las retinas silvestres la MLE presenta una continuidad a lo largo de toda su extensión y que en las retinas mutantes se produce pérdida de adhesión de forma puntual en aquellas porciones con presencia de rosetas de fotorreceptores. Pero además, este marcaje es más intenso en las prolongaciones de las células de Müller y en sus somas a lo largo de estas estructuras aberrantes que rodean a las rosetas (Figura R7: G y H).

Por todo ello, al igual que ocurría en el estadio temprano (P7), en los estadios intermedio y tardío analizados en este trabajo, la mutación en la proteína CRB1 parece estar condicionando la integridad de los correctos mecanismos de polaridad celular, reflejado por la ausencia en determinados puntos en la RSA de componentes de complejos de polaridad apical Crb, caso de CRB2, y del complejo Par, como PAR-3; y del mismo modo, en el modelo mutante también se ven comprometidas las uniones adherentes que se disponen a lo largo de la MLE.

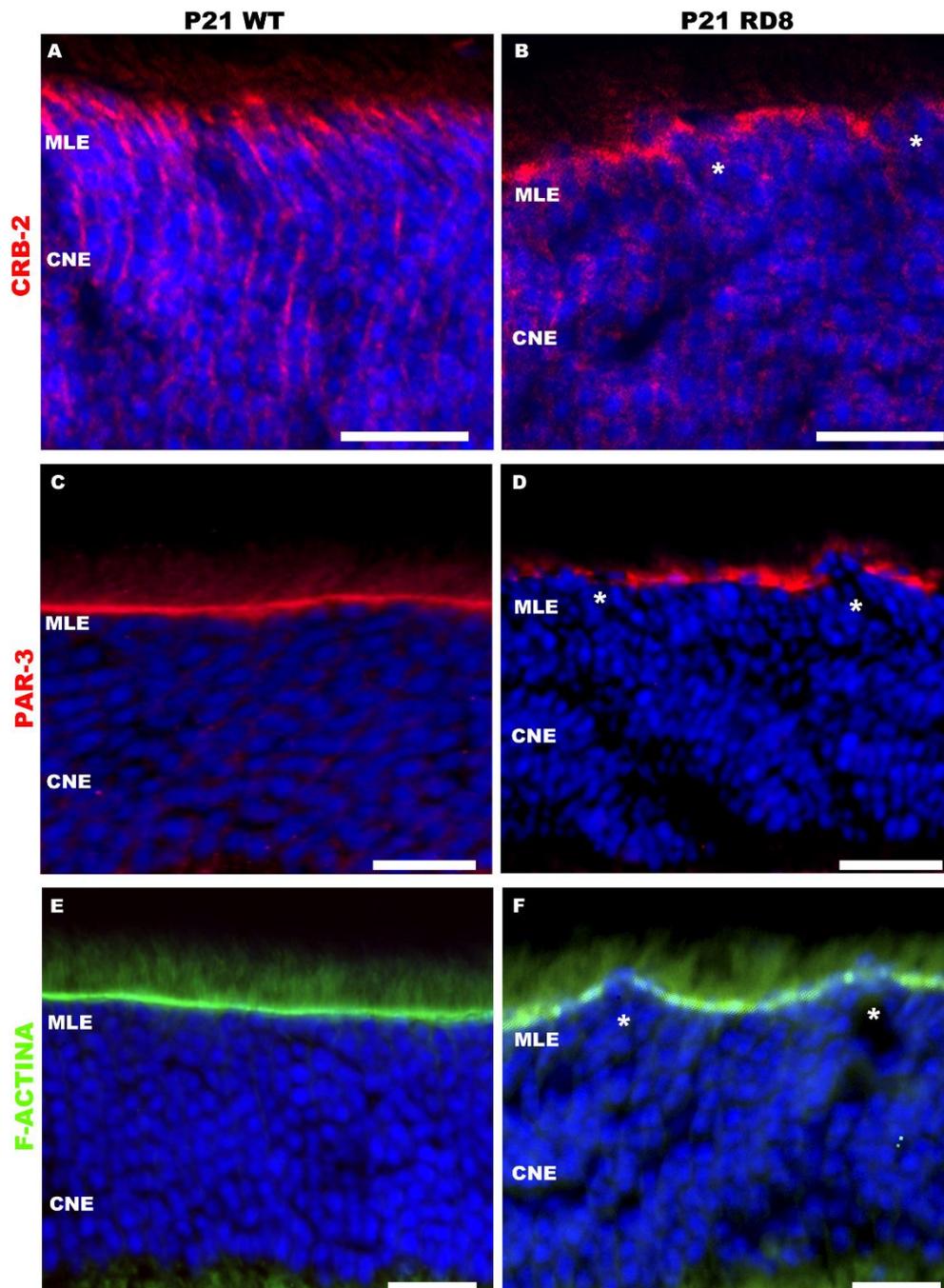


Figura R6: Estado de la RSA y MLE en retinas control y mutante para CRB1 a P21: Imágenes representativas de secciones de criostato con marcaje inmunofluorescente en retinas silvestres (A, C y E) y mutantes (B, D y F) para la proteína CRB-2 (A y B), PAR-3 (C y D) y F-actina (E y F). Los asteriscos denotan pérdida de marcaje en el modelo mutante. MLE: Membrana limitante externa. CNE: Capa nuclear externa. Barras de escala: 20 μ m.

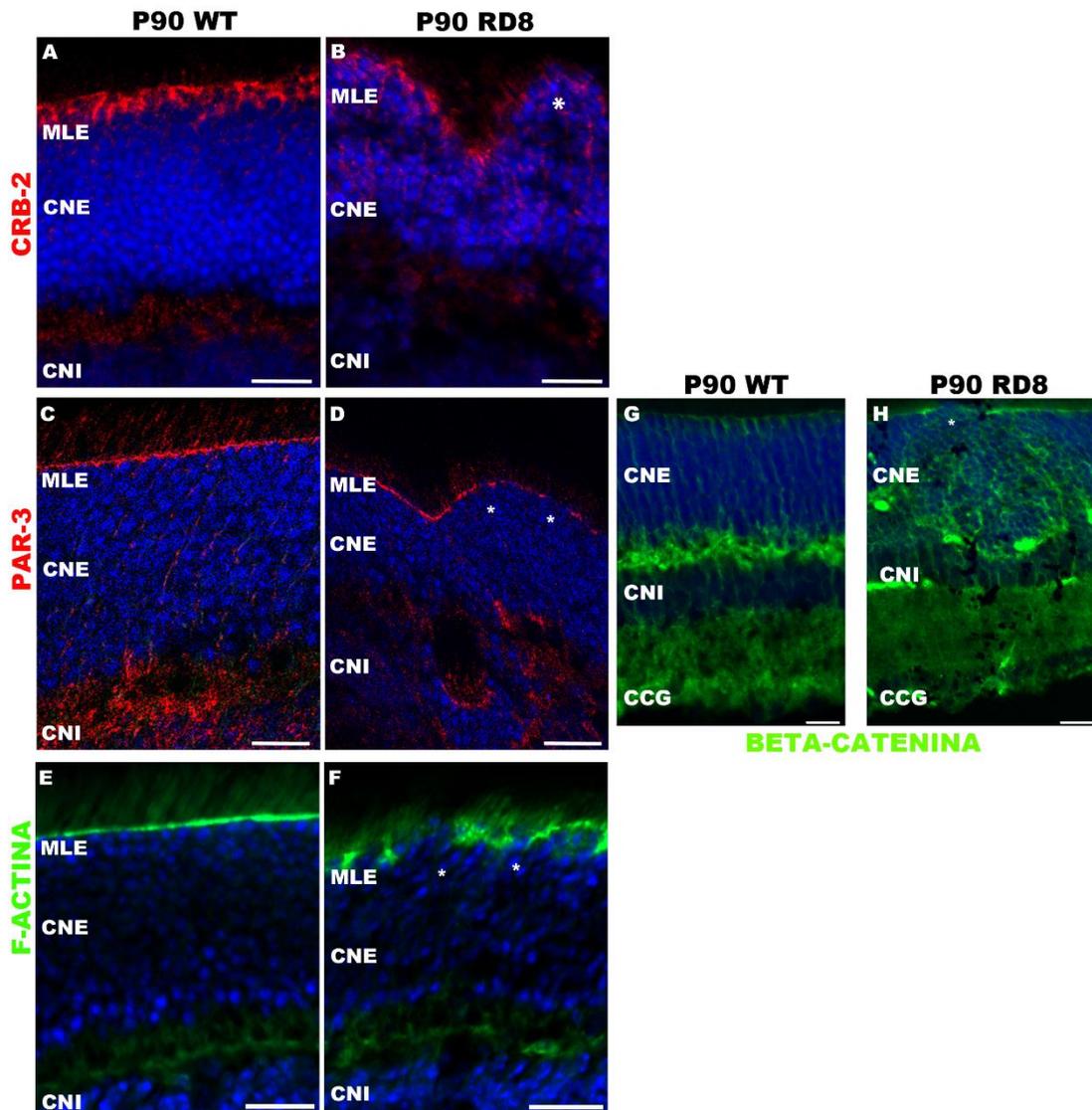


Figura R7: Estado de la RSA y MLE en retinas control y mutante para CRB1 a P90:

Imágenes representativas de secciones de criostato con marcaje inmunofluorescente en retinas silvestres (A, C, E y G) y mutantes (B, D, F y H) para la proteína CRB-2 (A y B), PAR-3 (C y D), F-actina (E y F) y β -catenina (G y H). Los asteriscos reflejan pérdida de tinción en el modelo mutante. MLE: Membrana limitante externa. CNE: Capa nuclear externa. CNI: Capa nuclear interna. CCG: Capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m.

Finalmente, para conocer si en el modelo mutante para CRB1, además de alteraciones en la localización de estas proteínas, también están afectados sus niveles de expresión, se hicieron análisis mediante western-blot de la expresión de las proteínas del complejo de polaridad apical Crb, CRB2 y PALS-1, y de la proteína de uniones adherentes β -catenina, en ambos estadios P21 y P90. A P21 (n=4 para cada genotipo), a pesar de que se aprecia un aumento en la expresión de todas las proteínas analizadas en las retinas mutantes para CRB1, al realizar el análisis estadístico se demuestra que no existen diferencias significativas entre el control y el mutante para CRB2 (p-valor=0,78), PALS-1 (p-valor=0,80) o β -catenina (p-valor=0,47) (Figura R8: A-C). En el estadio más tardío analizado, P90, las diferencias en la expresión de PALS-1 entre ambos genotipos no son significativas (p-valor=0,43), pero sí las hay en la cantidad de dos de las proteínas analizadas, CRB2 (p-valor=0,039) y β -catenina (p-valor=0,001), donde se ha detectado un incremento de expresión en los lisados proteicos procedentes del modelo mutante (Figura R8: D-F).

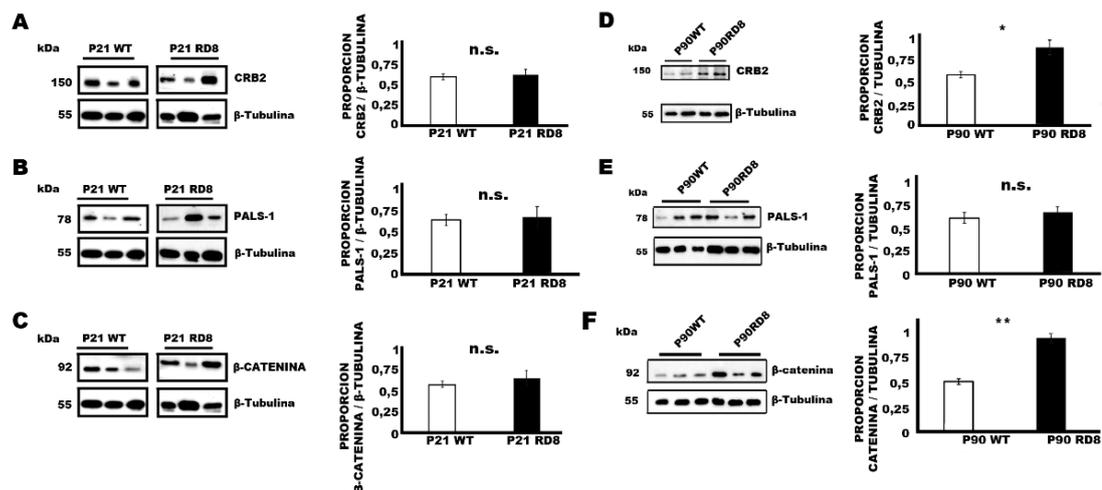


Figura R8: Western-blot y gráficas con el análisis estadístico de la expresión de CRB2, PALS-1 y β -catenina en las retinas control y mutante en los estadios intermedio (P21) y tardío (P90). A-C: La cuantificación de la cantidad de CRB2, PALS-1 y β -catenina frente a su control de carga, β -tubulina, en retinas de ambos genotipos no arroja diferencias significativas entre ellos a P21. D-F: A P90, la cuantificación de PALS-1 frente a su control de carga no resultó en diferencias significativas entre ambos genotipos (E), pero sí hay un aumento significativo para la cantidad de CRB2 (D) y muy significativo para β -catenina (F) en las retinas mutantes frente al control. Los datos se representan como la media \pm s.e.m. n.s.: No significativo ($p > 0,05$). *: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$.

EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES KIR 4.1 Y GLAST EN LA GLÍA RADIAL

Tal y como se describió en la introducción, las células de Müller son reguladoras clave en el correcto mantenimiento homeostático retiniano; por este motivo, nos propusimos analizar la expresión de Kir 4.1, un canal esencial en la regulación del equilibrio iónico en la retina y del principal transportador de glutamato en estas células, el transportador GLAST-1, en retinas procedentes de ambos genotipos a P21 y P90. De este modo, el marcaje inmunofluorescente para la proteína Kir 4.1 (Figura R9: A-D) muestra que ésta se localiza rodeando a los vasos sanguíneos, (Figura R9, puntas de flecha), y que este marcaje es especialmente intenso en las capas CPE y CCG, además de concentrarse en los somas de las células de Müller dispuestos en la CNI y sus proyecciones. Este marcaje es similar en las retinas de ambos genotipos, en todos los estadios analizados. Sin embargo, cabe destacar que la glía radial de las retinas mutantes presenta una mayor intensidad de marcaje, tanto en el estadio intermedio (P21) como en el tardío (P90), especialmente en las prolongaciones que atraviesan tanto la CPI como la CPE, fenómeno que puede apreciarse tanto en áreas donde existe desorganización de la CNE debido a la formación de rosetas de fotorreceptores (Figura R9: B) como en áreas carentes de ellas (Figura R9: D).

El marcaje para el transportador GLAST-1 (Figura R9: E-H) muestra que, en las retinas procedentes de animales control, esta proteína se expresa abundantemente en ambas capas plexiformes (CPE y CPI), así como rodeando el perímetro de los somas de las células de Müller en la CNI y en las proyecciones más externas, que delimitan la MLE, siendo especialmente intenso en el estadio más tardío analizado (P90) (Figura R9: E y G). Por su parte, en las retinas mutantes, la intensidad del marcaje para esta proteína está notablemente reducida, tanto el encontrado en las capas plexiformes como en los somas de las células de Müller, y, si bien esta observación es evidente en áreas donde no existe desorganización de la CNE, es especialmente llamativa en áreas donde pueden apreciarse rosetas de fotorreceptores (Figura R9: F y H).

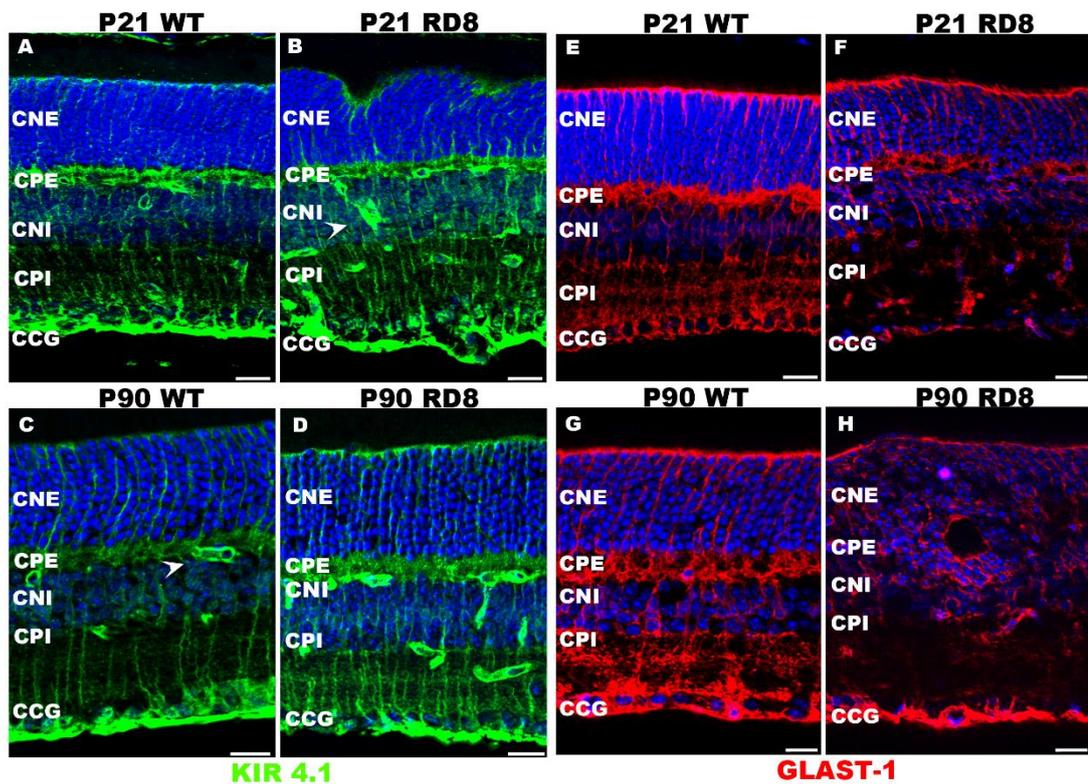


Figura R9: Análisis de la distribución de las proteínas Kir 4.1 y GLAST-1 en retinas control y mutante para *CRB1* en los estadios P21 y P90. (A-D): Imágenes representativas de marcaje por inmunofluorescencia para el canal transportador de potasio Kir 4.1 en retinas de animales control y mutante. Esta proteína se localiza en las células de Müller y se asocia a vasos sanguíneos (puntas de flecha) (E-H): Imágenes representativas de marcaje por inmunofluorescencia para el transportador de glutamato GLAST-1 en retinas control y mutante. Esta proteína se dispone en las células de Müller y adicionalmente, en capas plexiformes. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCG: Capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m.

EXPRESIÓN DE LA GLUTAMINA SINTETASA Y LA BOMBA

NA⁺/K⁺-ATPASA EN LA GLÍA RADIAL

Debido a las alteraciones encontradas en la expresión del transportador glutamatérgico GLAST-1 en las retinas mutantes para CRB1 (Figura R9), nos propusimos analizar la expresión de la enzima glutamina sintetasa (GS) en las células de Müller de estas retinas, ya que es la encargada de transformar el glutamato extracelular a glutamina, previa captación por el transportador GLAST-1. Éste es un mecanismo altamente regulado que controla de una forma muy eficiente la cantidad de neurotransmisor que se encuentra en el ambiente extracelular para poder modular la transmisión sináptica en la retina. De hecho, las células de Müller son el único tipo celular retiniano que expresa GS y una posible disfunción sería indicativo del estado de la glía radial y de su consecuencia en la correcta transmisión sináptica.

El marcaje frente a GS en retinas control en los estadios P21 y P90 permite delimitar de forma precisa los somas de las células de Müller en la CNI y sus prolongaciones, tanto apicales como basales, donde delinear por completo la MLE en la parte externa de la retina y la MLI con los procesos que llegan hasta la porción más vitreal, por lo que la tinción delimita por completo toda la extensión de la glía radial, ocupando todas las capas de la retina neural (Figura R10: A-D).

Es importante destacar que en las retinas procedentes de animales control en ambos estadios analizados, las prolongaciones que atraviesan la CNE presentan una apariencia ordenada y lineal (Figura R10: A y C). Sin embargo, en las retinas del modelo mutante CRB1^{rd8}, las prolongaciones de las células de Müller marcadas para GS están mucho más desorganizadas (Figura R10: B y D, puntas de flecha), mostrando un aspecto - hipertrófico. De manera adicional, las prolongaciones celulares localizadas en las zonas más vitreales de la retina presentan un aspecto menos robusto en el modelo mutante, en comparación con las retinas control (Figura R10: B y D, asteriscos). Además, los núcleos de la glía radial aparecen desorganizados y en general, el marcaje parece menos intenso que en las retinas control. Por último, destacar que las alteraciones previamente descritas se observan en el modelo mutante desde P21, considerado el estadio intermedio en este trabajo. Tomando en conjunto estos resultados, parece factible que la diferencia en la expresión y distribución de la enzima GS en la glía radial en la retina del modelo mutante respecto al control pueda estar condicionando la eficiencia en la

transformación de glutamato a glutamina en las células de Müller del animal mutante para CRB1.

Como se aprecia en los datos mostrados en la figura R9, el análisis mediante inmunofluorescencia del transportador de potasio Kir 4.1 reveló que había alteraciones en la expresión de este transportador en los procesos de las células de Müller del modelo mutante a partir de P21, ya que parece haber una mayor concentración de procesos marcados para este tipo de canal. Otros transportadores que están involucrados en el control de la homeostasis iónica en la retina son las bombas Na⁺/K⁺-ATPasa, que en la retina neural se expresan a lo largo de la membrana plasmática de las células de Müller y su función principal es controlar los niveles de iones de sodio y potasio, por lo que son consideradas elementos clave en el mantenimiento del potencial de membrana. Por tanto, decidimos analizar la expresión de la subunidad α -1, que en retina adulta se expresa en las células de Müller para comprobar si, al igual que ocurre con el transportador Kir 4.1, estos canales también están alterados en este modelo mutante para CRB1.

El análisis de la distribución de esta proteína en el estadio P21 de retinas control revela un marcaje distribuido a lo largo de la retina neural, especialmente concentrado en la MLE, aunque también se encuentra, con menor intensidad de marcaje, en ambas capas plexiformes, especialmente en la CPE, donde se aprecia mayoritariamente tapizando los vasos sanguíneos localizados en esta capa (Figura R10: E). La tinción en el genotipo mutante a esta edad muestra una mayor concentración de marcaje en la MLE en comparación con la retina silvestre, y por el contrario, la intensidad del marcaje en la CPI es más débil (Figura R10: F). A P90, el estadio más tardío analizado, el marcaje en las retinas control es más intenso en las capas plexiformes que a P21, así como en las prolongaciones que cruzan la CNE (Figura R10: G, punta de flecha). Las retinas mutantes, por su parte, presentan más intensidad de marcaje en general en toda la extensión de la retina, respecto al estadio previo, siendo este incremento especialmente notable en el marcaje asociado a las rosetas de fotorreceptores (Figura R10: H, asterisco) y a la MLE, pudiendo apreciarse, cualitativamente, una mayor abundancia de prolongaciones, o prolongaciones más gruesas, que atraviesan la CNE en las retinas del modelo mutante (Figura R10: H, punta de flecha). Así, la expresión de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa parece estar incrementada o focalizada en las zonas más esclerales de las retinas mutantes, donde parece acumularse en las áreas donde la CNE está más desorganizada.

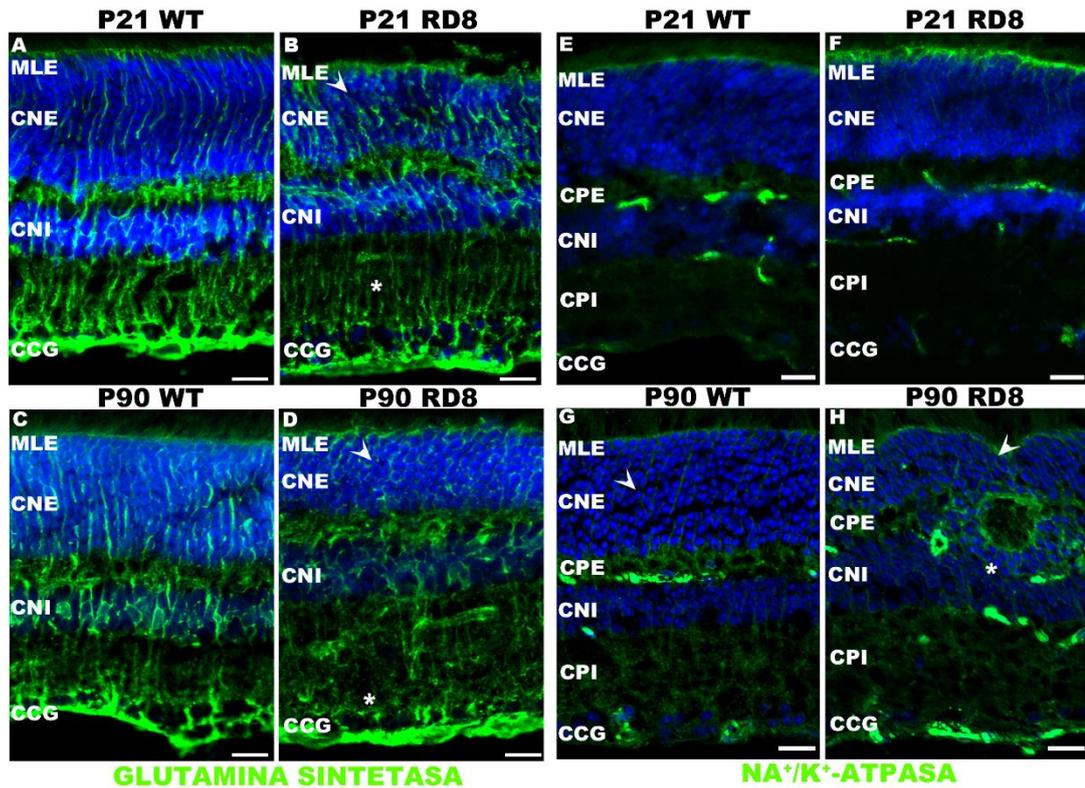


Figura R10: Expresión de las proteínas glutamina sintetasa y Na⁺/K⁺-ATPasa en retinas controles y mutantes para CRB1 en los estadios P21 y P90. (A-D). Imágenes representativas de secciones de criostato de retinas de animales control y mutante con marcaje inmunofluorescente para la enzima glutamina sintetasa, presente en las células de Müller. En el modelo mutante se observa desorganización de las prolongaciones gliales en la CNE (**puntas de flecha en B y D**), y una menor tinción en los procesos más vitreales (**asteriscos en B y D**). (E-H) Imágenes representativas de secciones de criostato de retinas de animales control y mutante con marcaje inmunofluorescente para la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa. A P21 se aprecia tinción de la MLE y capas plexiformes (E y F). En el mutante a P90, las prolongaciones gliales (**puntas de flecha en H**) son especialmente abundantes y presentan mayor tinción rodeando a las rosetas de fotorreceptores (**asterisco en H**). MLE: Membrana limitante externa. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCG: Capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μm.

EL TRANSPORTADOR DE AGUA ACUAPORINA-4 EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER

Debido a que se detectaron alteraciones en la expresión del transportador de potasio Kir 4.1 y de glutamato GLAST-1 en las retinas mutantes para CRB1, nos propusimos investigar si otro de los reguladores clave en la homeostasis, el transportador de agua Acuaporina-4 (AQP-4), podría experimentar modificaciones en el modelo mutante. Se ha descrito que Kir 4.1 y AQP-4 colocalizan en diversos tipos celulares, entre los que se incluye las células de Müller, sugiriendo que ambos transportadores actúan de manera conjunta en la regulación homeostática retiniana, pues los flujos de agua mediados por AQP-4 podrían ayudar a modular los niveles de potasio extracelular.

El análisis del marcaje en retinas silvestres muestra que en ambos estadios, la expresión se localiza principalmente en las capas más internas, destacando la MLI y ambas capas plexiformes, aunque también puede apreciarse tinción sobre los somas de las células de Müller ubicados en la CNI (Figura R11: A y C). Por su parte, el marcaje para esta proteína parece ser más intenso en las retinas mutantes para CRB1, donde, a diferencia de lo observado en las retinas control, su expresión se expande a zonas más esclerales, siendo notable el marcaje de las prolongaciones gliales que cruzan la totalidad de la CNE (Figura R11: B y D). Además, en áreas degenerativas, donde son evidentes las rosetas de fotorreceptores, se observa un aumento notable en la expresión para AQP4 especialmente rodeando a las rosetas. Además, el doble marcaje para AQP4 y GFAP permitió corroborar la colocalización entre AQP4 y GFAP, sobre todo en los pies más vitreales de las células de Müller que rodean estas rosetas de fotorreceptores, que permite inferir que las prolongaciones donde AQP4 es especialmente abundante se corresponden con las prolongaciones de las células de Müller reactivas (Figura R11: E).

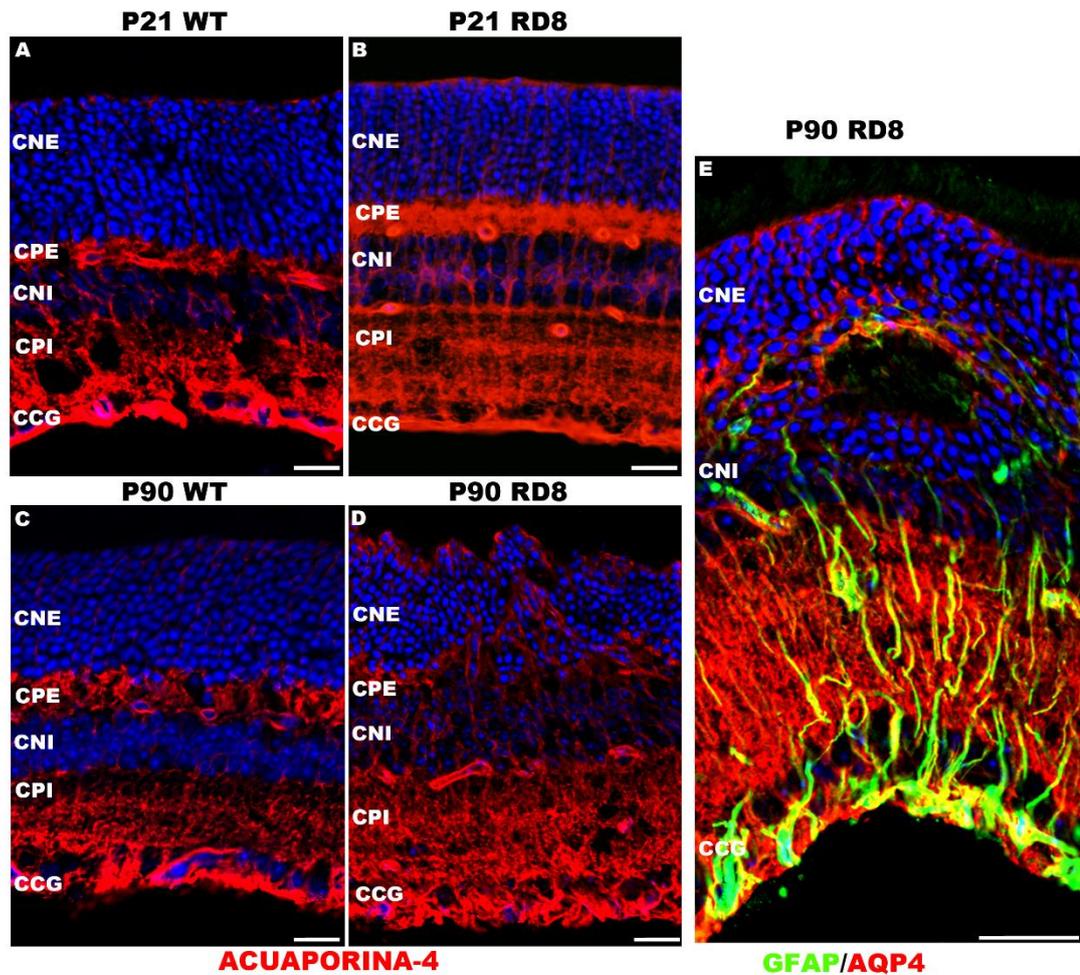


Figura R11: Análisis de la expresión de la proteína ACUAPORINA-4 en retinas control y mutantes en los estadios P21 y P90. (A-D). Imagen representativa de criosecciones de retinas de animales control y mutante de los estadios P21 y P90 con marcaje inmunofluorescente para AQP-4. En retinas control, la expresión se concentra en las capas plexiformes, CCG y somas de células de Müller, mientras que en el genotipo mutante el marcaje es especialmente intenso en las prolongaciones que atraviesan la CNE y en la MLE. (E). **Doble inmunofluorescencia AQP4/GFAP.** En las rosetas de áreas degenerativas hay colocalización entre AQP-4 y el marcador de gliosis reactiva GFAP. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCG: Capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m.

EXPRESIÓN PROTEICA DE MARCADORES HOMEOSTÁTICOS

Para completar el análisis de los marcadores homeostáticos de las células de Müller también se analizó mediante western-blot la expresión de varias de las proteínas implicadas en estos procesos en lisados proteicos de retinas a P21 y P90 procedentes de ambos genotipos, control y mutante para CRB1. En el estadio intermedio, P21 (n=4 para cada genotipo) no se encontraron diferencias significativas entre ambos genotipos para la cantidad de proteína Kir 4.1 (p-valor=0,31), para Na⁺-K⁺-ATPasa (p-valor=0,48) ni para Acuaporina-4 (p-valor=0,38), aunque sí se apreció una tendencia a incrementar la expresión de estas proteínas en los lisados del genotipo mutante (Figura R12: A-C). El análisis realizado en los lisados de retina del estadio más tardío, P90 (n=4 para cada genotipo) tampoco arroja diferencias significativas entre los dos genotipos para la cantidad de proteína Kir 4.1 (p-valor=0,14), Na⁺-K⁺-ATPasa (p-valor=0,18) o Acuaporina-4 (p-valor=0,32), aunque en este estadio, la tendencia en el incremento en la expresión de estas proteínas en el modelo mutante CRB1^{rd8} parece más acusado que en la edad previa (Figura R12: D-F).

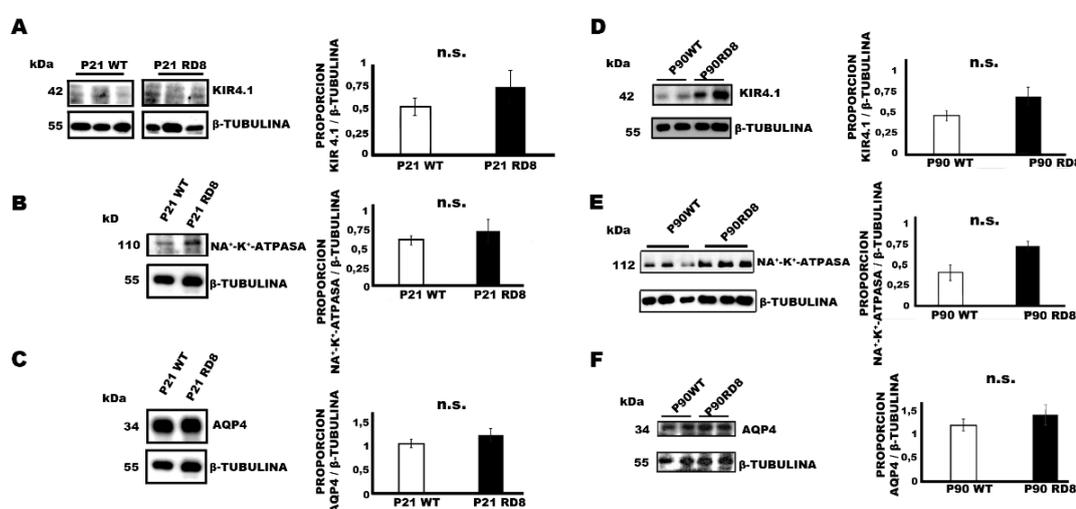


Figura R12: western-blot y gráficas con el análisis comparativo de la expresión de KIR 4.1, Na⁺-K⁺-ATPasa y Acuaporina-4 en los estadios P21 y P90 de las retinas control y mutante para CRB1. A-C: La cuantificación de la cantidad de las tres proteínas frente al control de carga, β -tubulina, en las retinas de ambos genotipos a P21 muestra un incremento en la expresión de las proteínas del genotipo mutante, aunque las diferencias no son significativas. D-F: A P90 el incremento en la expresión proteica de las tres proteínas en las retinas mutantes es más acusado que a P21, aunque tampoco se encontraron diferencias significativas. Los datos se representan como la media \pm s.e.m. n.s.: No significativo (p > 0,05).

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA YAP EN LAS CÉLULAS DE MÜLLER

Tal y como se indicó en la introducción, las proteínas CRB parecen presentar un papel regulador en la ruta de señalización Hippo, donde la proteína YAP actúa como un co-activador clave. Debido a que por un lado, variaciones en los niveles de CRB pueden estar ocasionando alteraciones en esta ruta, condicionando los correctos mecanismos de polaridad y proliferativos y que, por otro lado, ante procesos degenerativos retinianos como el que ocurre en el modelo *rdio* la ruta Hippo no se encuentra regulada (Hamon et al., 2017), nos propusimos explorar la posibilidad de que esta ruta también estuviese alterada en el modelo mutante para CRB₁. Para ello se analizó la expresión de la proteína YAP mediante marcaje inmunofluorescente en secciones de criostato.

El marcaje para YAP muestra que esta proteína se expresa de manera selectiva en las células de Müller (Figura R13: A-D), y se detectaron diferencias notables entre el marcaje en ambos genotipos. En la retina de animales silvestres el marcaje se localiza preferentemente en el núcleo de las células, en los dos estadios analizados, aunque también puede apreciarse tinción en los límites de la retina neural, concretamente en la MLI y MLE, presentando un patrón de expresión similar en las dos edades estudiadas (Figura R13: A y C). Sin embargo, frente a la aparición de áreas en degeneración en las retinas de los animales mutantes para CRB₁, además del marcaje nuclear y las membranas limitantes observado en las retinas control, este marcaje se extiende y es abundante en las prolongaciones que se proyectan hacia los límites de la retina neural. Además, algunos núcleos de células de Müller positivos para YAP están translocados de la CNI y en zonas en degeneración se sitúan rodeando las rosetas de fotorreceptores. También encontramos un marcaje discontinuo de la MLE, así como un incremento en la intensidad en la MLI (Figura R13: B y D).

Por último, reconstrucciones globales de retinas control y mutante ponen de manifiesto las diferencias de expresión para YAP entre los dos genotipos, ya que se aprecia una mayor intensidad en el marcaje para YAP en aquellas áreas que presentan rosetas de fotorreceptores, por lo que parece haber una mayor expresión de esta proteína en células de Müller bajo condiciones de gliosis reactiva (Figura R13: E y G).

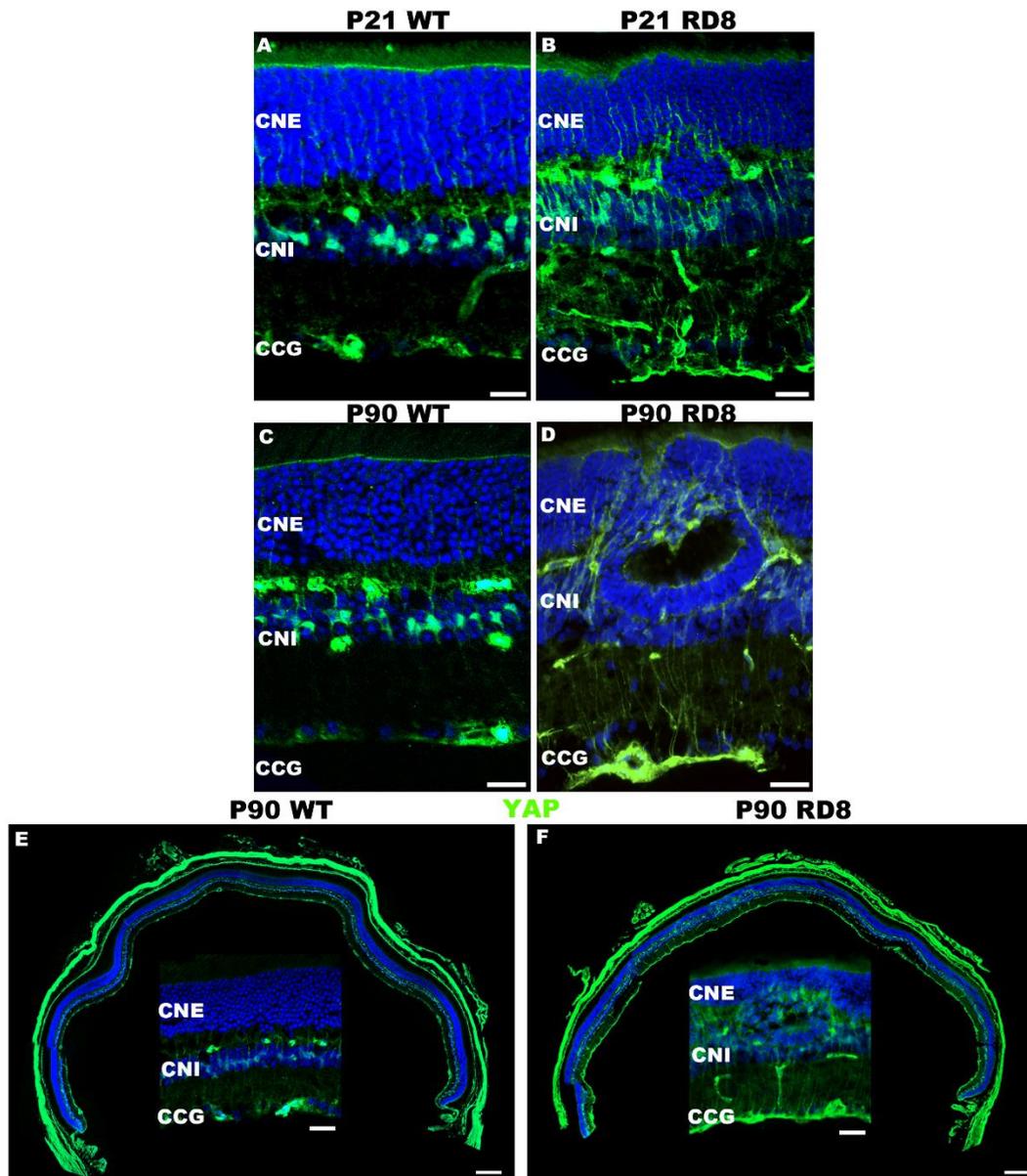


Figura R12: Análisis de la expresión de la proteína YAP en retinas control y mutante para CRB1 en los estadios P21 y P90. (A-D): Imágenes representativas de retinas control y mutante en ambos estadios mostrando la inmunorreactividad para YAP, que se presenta en las células de Müller. (E y F): Marcaje para la proteína YAP en reconstrucciones globales de retinas adultas procedentes de animales control (E) y mutantes (F). CNE: Capa nuclear externa. CNI: Capa nuclear interna. CCG: Capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μm en A, B, C, D e insertos de E y F; 100 μm en E y F.

LA POBLACIÓN MICROGLIAL EN LOS ESTADIOS P21 Y P90

Tal y como se ha descrito previamente, el análisis de la población microglial a P7, el estadio más temprano analizado en esta tesis doctoral, no arrojó diferencias significativas en el número de elementos microgliales comparando ambos genotipos, aunque en el genotipo mutante, y de manera ocasional, podían observarse células microgliales en las capas más externas, asociadas a las áreas que presentaban la aparición de rosetas en formación (Figura R4). Sin embargo, debido a que determinados marcadores homeostáticos macrogliales se encontraban alterados en las retinas mutantes a P21 y P90, nos propusimos analizar y comparar la población de células microgliales en estas edades, en las que a priori las condiciones de la retina mutante se ven altamente comprometidas, para intentar dilucidar si esas perturbaciones estructurales y funcionales podrían estar condicionando el estado de los elementos microgliales.

De la misma manera que para los análisis realizados a P7, se llevaron a cabo reconstrucciones completas de secciones de retina en el estadio P21 (n=4 para cada genotipo) que permitieron cuantificar y analizar la distribución microglial en las distintas capas de la retina neural (Figura R14: A y B). El análisis permitió determinar que en las retinas del genotipo mutante aparecen elementos microgliales en las capas más externas, pudiendo verse asociados a aquellas áreas que están sufriendo una progresiva degeneración y a las rosetas que están totalmente desarrolladas. Este fenómeno no se observa en las retinas procedentes del genotipo control, donde las células microgliales no se extienden más allá de la CPE. Si bien ya se había descrito este fenómeno de forma puntual a P7, el estadio temprano, en el estadio P21 aparece de manera más evidente y de forma más abundante. Además, para conocer la relación existente entre la macro y microgliosis, se realizaron análisis de doble inmunofluorescencia para IBA-1 y GFAP. Estos experimentos pusieron de manifiesto que en las retinas del genotipo mutante, sobre todo en las áreas más afectadas por la lesión donde hay sobreexpresión de GFAP, correspondiente a los procesos reactivos de las células de Müller que se extienden hasta la CNE, envolviendo las rosetas, hay una clara presencia de células de la microglía, que no aparecen en las retinas control sugiriendo una relación entre ambos tipos celulares. Por último, el análisis estadístico realizado a P21 para comparar el número de elementos microgliales totales entre ambos genotipos demostró que había diferencias significativas entre ambos genotipos,

encontrando un incremento en el número de este tipo celular en las retinas del modelo mutante (n=4 para cada genotipo, p-valor=0,028) (Figura R14-C).

En el estadio más tardío analizado, a P90, y con objeto de discernir la naturaleza de las células microgliales que se encuentran en la retina mutante con este nivel de lesión, se realizaron marcajes dobles para las proteínas IBA-1 y CD68, siendo esta última una proteína que se expresa de forma específica en células de microglía activada o reactiva, y así poder correlacionar el estado microglial con los mecanismos degenerativos más notorios en un estadio más avanzado (Lee et al., 2010; Zabel et al., 2016). Los resultados ponen de manifiesto que en las retinas control, las células microgliales siguen presentando la misma distribución descrita para el estadio P21, ya que la localización más escleral de este tipo celular es CPE, aunque no hay colocalización de ambas proteínas en estas células (Figura R14: D y E). Sin embargo, en las retinas mutantes se pueden encontrar elementos microgliales en los que colocalizan ambas proteínas y además no están únicamente restringidos a las áreas que presentan rosetas de fotorreceptores, encontrándose de manera adicional en la CCG, la CPI o en la CNE de zonas alejadas de las áreas donde la desorganización de las capas debido a la degeneración es obvia (Figura R14: D-G). Por último, y para confirmar estos resultados, se analizó la expresión de proteínas relacionadas con la activación microglial en lisados proteicos de retinas procedentes de animales control y mutante para CRB1, por lo que se realizaron análisis de western-blot para la proteína CD11B, que es otro marcador específico para detectar activación microglial (Roy et al., 2006). Los datos muestran que la expresión de CD11B aumenta de manera significativa en las retinas del genotipo mutante en comparación con las retinas control (n=4 para cada genotipo, p-valor=0,018) (Figura R14 H), lo cual sugiere que hay activación de los componentes microgliales como consecuencia de las mayores perturbaciones presentes en las retinas mutantes en estadios avanzados.

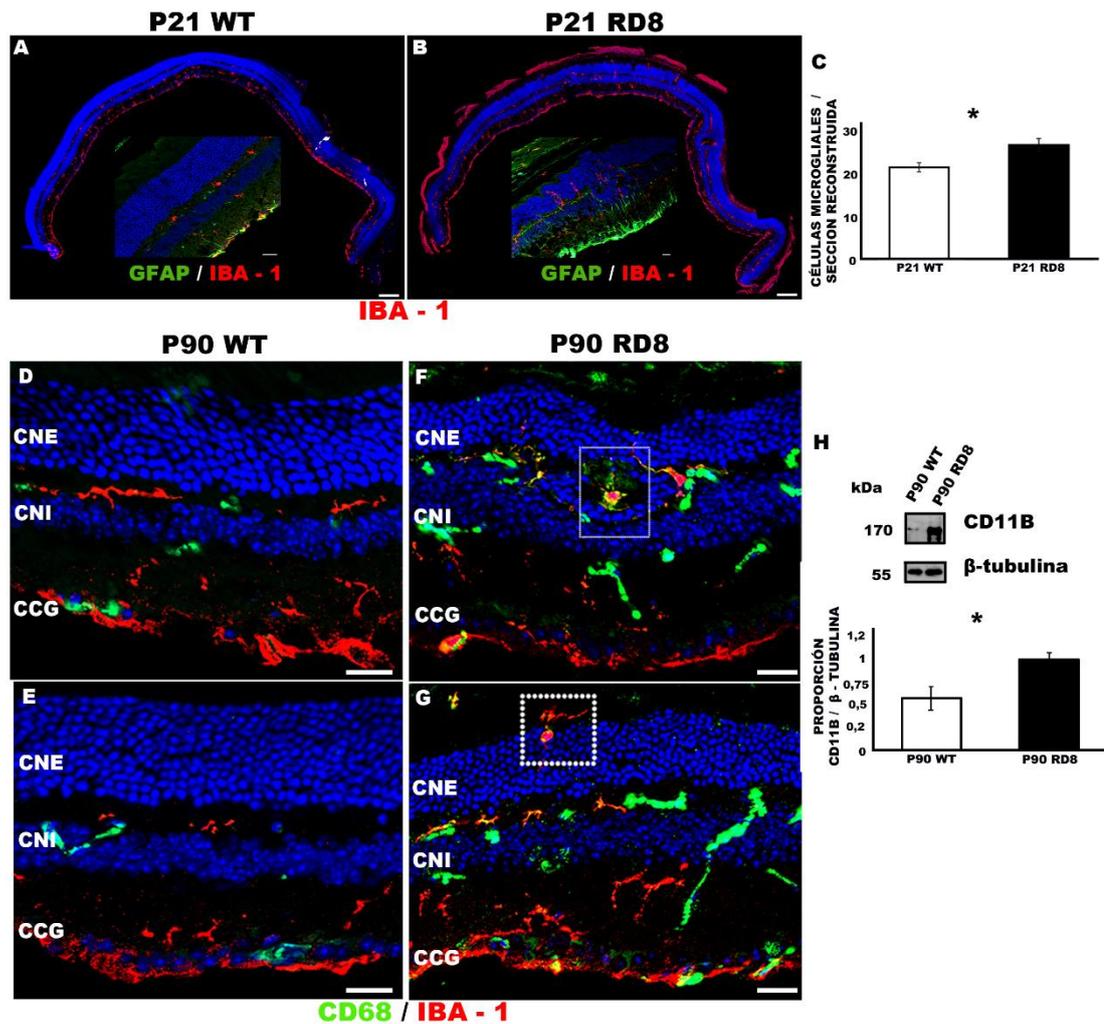


Figura R14: La población microglial en los estadios P21 y P90 en retinas control y mutante para CRB1. (A y B): Reconstrucciones globales de criosecciones de retina control y mutante a P21 con marcaje inmunofluorescente para IBA-1 mostrando la distribución de células microgliales. En las retinas control, la capa más escleral donde se disponen las células microgliales es la CPE, pero en las retinas mutantes traspasan esta capa. Los insertos muestran la doble inmunofluorescencia para el análisis de elementos microgliales (IBA-1) y células de Müller reactivas (GFAP) en el estadio P21. (C): Análisis estadístico mostrando un mayor número (estadísticamente significativo) de células microgliales en retinas mutantes respecto al control. (D-G): Doble inmunofluorescencia para IBA-1 y CD68 en el estadio P90. No hay colocalización entre ambas proteínas en las retinas control (D y E), pero sí en las mutantes (F y G). (H): Western-blot para CD11B en el estadio P90. Los niveles de CD11B son más elevados en el modelo mutante con respecto al control, con diferencias estadísticamente significativas. CNE: Capa nuclear externa. CNI: Capa nuclear interna. CCG: Capa de las células ganglionares. Barras de escala: 100 μm en A y B; 20 μm en insertos de A y B, y en D, E, F y G.

LAS CÉLULAS NEURALES EN LOS ESTADIOS P21 Y P90

Tras comprobar que los cambios que experimentan las células de Müller en el modelo *Crb1^{rd8}* debido a la mutación para CRB1 influye en la expresión y distribución de distintas proteínas presentes en este tipo celular a lo largo de su desarrollo post-natal, nos propusimos conocer el estado de otras células de la retina que, aunque no estén afectadas directamente por la alteración génica debido a que no expresan la proteína CRB1, sí podrían ver comprometido su correcto funcionamiento debido a las alteraciones de las células de Müller descritas en el presente trabajo, como es el caso de las células bipolares, células ganglionares o las células fotorreceptoras y sus sinapsis.

La regulación de la ruta de señalización Hippo depende del equilibrio en la fosforilación de la proteína YAP, promoviendo su degradación y evitando una translocación nuclear permanente que pueda conducir a mecanismos proliferativos incontrolados (Hamon et al., 2017). Las variaciones en la expresión de la proteína YAP descritas en nuestro modelo de estudio (Figura R12) parecían sugerir una posible desregulación de la ruta Hippo, teniendo en cuenta, por un lado, la mayor expresión observada para esta proteína en áreas degenerativas y por el otro, lo que ya se conocía sobre la regulación que el complejo CRB ejerce sobre esta ruta de señalización concreta (Alves et al., 2014). Por ello, nos propusimos analizar la expresión de la forma fosforilada de YAP, fosfoYAP en las células de Müller del genotipo control y mutante.

De este modo, se apreció que, además de que su expresión era más abundante en las células de Müller en áreas degenerativas en el modelo *Crb1^{rd8}*, el marcaje también se concentraba especialmente en estructuras que, por su localización, podían corresponderse con los segmentos de los fotorreceptores (Figuras R15: A-C y R16: A y B). Además, aparentemente, habría menos de estas estructuras positivas para YAP en las retinas del modelo mutante, especialmente en las áreas en degeneración, tanto en el estadio P21 (Figura R15: A-C) como a P90 (Figura R16: A y B). Para comprobar esta hipótesis se realizaron dobles inmunotinciones para fosfoYAP junto con el marcador PNA, que tiñe los segmentos de los conos. El doble marcaje puso de manifiesto que efectivamente, la forma fosforilada de la proteína YAP se localiza también en los segmentos externos de los conos (Figura 15: B).

Por otro lado, para investigar la posible alteración y disfunción de las células fotorreceptoras en el modelo mutante para CRB1 se realizaron experimentos para analizar algunos componentes de sus sinapsis, como la expresión de la proteína

Bassoon, que se localiza en los terminales pre-sinápticos de los fotorreceptores en la CPE y de las células bipolares en la CPI. En el genotipo control, en ambas edades analizadas, se encontró un marcaje punteado muy intenso en ambas capas plexiformes (CPE y CPI), que es especialmente abundante en la CPI. Por el contrario, se encontró una pérdida aparente de intensidad en el genotipo mutante, especialmente en la CPE, en aquellas zonas donde los procesos degenerativos están más avanzados (asteriscos en Figuras 15: D-F y 16: A-C), que sugiere una posible pérdida de función sináptica en los elementos fotorreceptores en las zonas dañadas de la retina mutada.

Para analizar cómo podían verse afectados otros elementos neurales retinianos involucrados en la correcta transmisión del impulso nervioso, como las células bipolares o células ganglionares, se emplearon marcadores específicos de estos tipos celulares. Así, el marcaje para PKC- α permite discernir los cuerpos celulares de las células bipolares de bastón en la CNI, con sus penachos dendríticos localizados en la CPE y sus terminales axónicos en la CPI, mostrando un patrón de expresión típico en las retinas silvestres, en ambos estadios estudiados (Figuras 15: G y 16: D). En las retinas procedentes del genotipo mutante se han encontrado alteraciones celulares utilizando este marcador, ya que en el estadio P₂₁ se aprecian expansiones de los penachos dendríticos más allá de la CPE, ocupando la CNE, y que se hacen más evidentes a P₉₀, el estadio más tardío analizado (Figuras 15: H e I; y 16: E y F). Del mismo modo, se aprecia una notable deslocalización de este tipo celular ante la aparición de las rosetas de fotorreceptores, donde parecen ser desplazadas hacia los focos de lesión (Figura 16: F).

Por último, y para analizar el comportamiento de la población de células ganglionares en las retinas mutantes para CRB₁ se empleó el anticuerpo Islet-1 que, además de marcar este tipo celular, también identifica una subpoblación de células en la CNI, concretamente algunas células amacrinas y bipolares. En el estadio intermedio, a P₂₁, la tinción en la CCG no muestra diferencias entre ambos genotipos al comparar el marcaje en las células ganglionares (Figura 15: J-L), aunque sí se aprecian alteraciones en algunas de las células de la CNI en las retinas mutantes, ya que su organización está evidentemente condicionada por la presencia de rosetas; al igual que ocurre en el estadio más tardío, donde además, se aprecia una aparente reducción en la cantidad de células en la CNI en las zonas más afectadas por la degeneración, aunque esta reducción no parece ser tan severa en la CCG (Figura 16: G-I). Tomando en conjunto estos resultados, la mutación en CRB₁ parece estar afectando, desde el estadio P₂₁, la

integridad y funcionalidad de células fotorreceptoras, condicionando a las células bipolares; pero los elementos más vitreales analizados, las células ganglionares, no parecen verse tan comprometidos, al menos en estas edades.

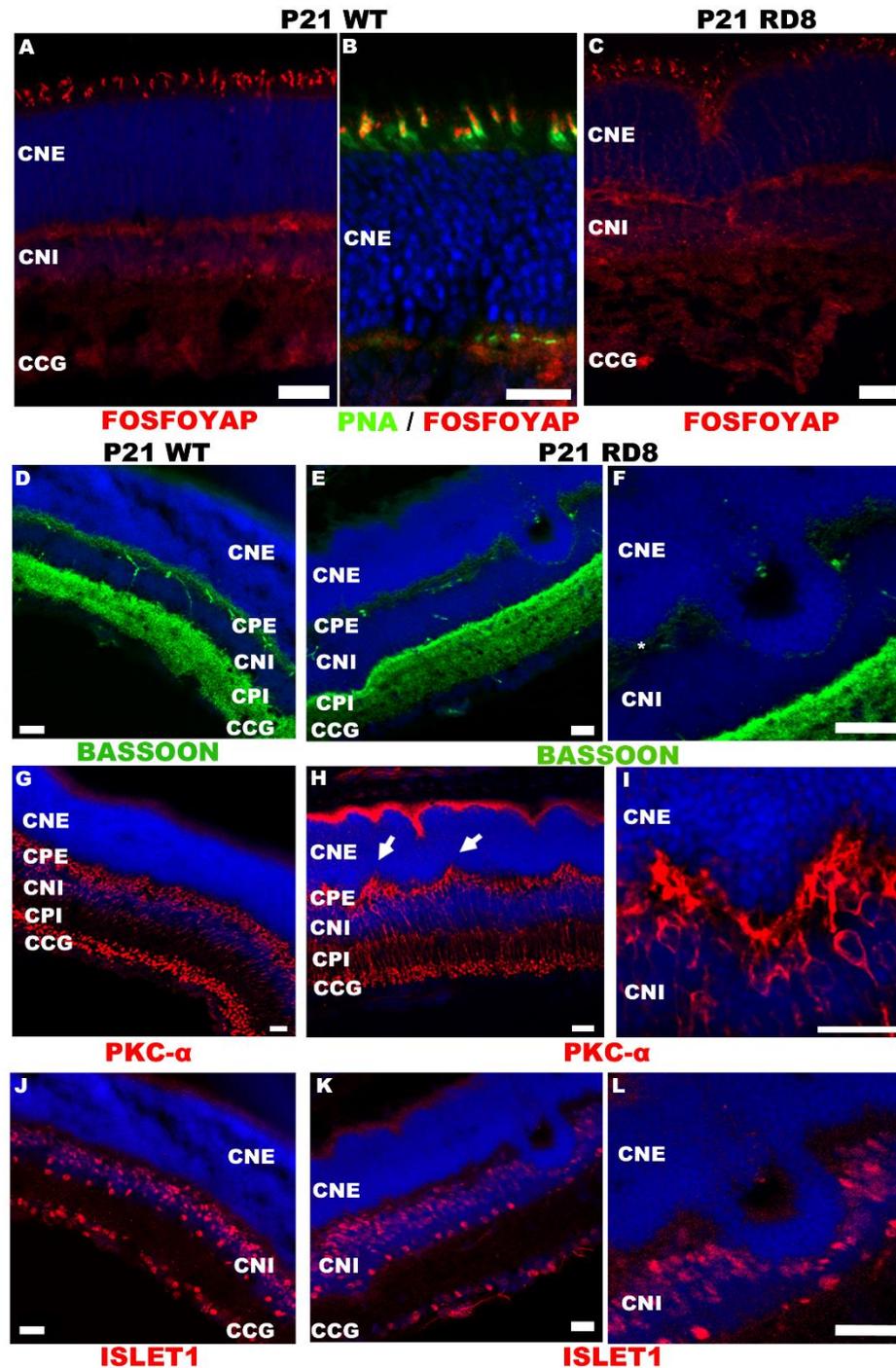


Figura R15: Análisis del estado de la retina neural en el estadio P21. (A-C): Secciones de criostato con marcaje inmunofluorescente para la proteína Fosfo-Yap y tinción con PNA (verde en B). Fosfo-YAP se localiza en las prolongaciones de las células de Müller y los segmentos externos de los conos, marcados en verde en B. (D-F): Marcaje inmunofluorescente para bassoon, proteína localizada en los terminales pre-sinápticos en la CPE y la CPI. En áreas con rosetas de fotorreceptores de la CPE, el marcaje para Bassoon disminuye considerablemente (asterisco en F). (G-I): Inmunofluorescencia para PKC- α que muestra la distribución de las células bipolares de bastón. En retinas mutantes (H-I), hay penachos dendríticos que se extienden hacia la CNE (flechas en H). (J-L): Marcaje inmunofluorescente para Islet-1 que tiñe células ganglionares en la CCG, así como amacrinias y bipolares en la CNI. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCG: Capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m.

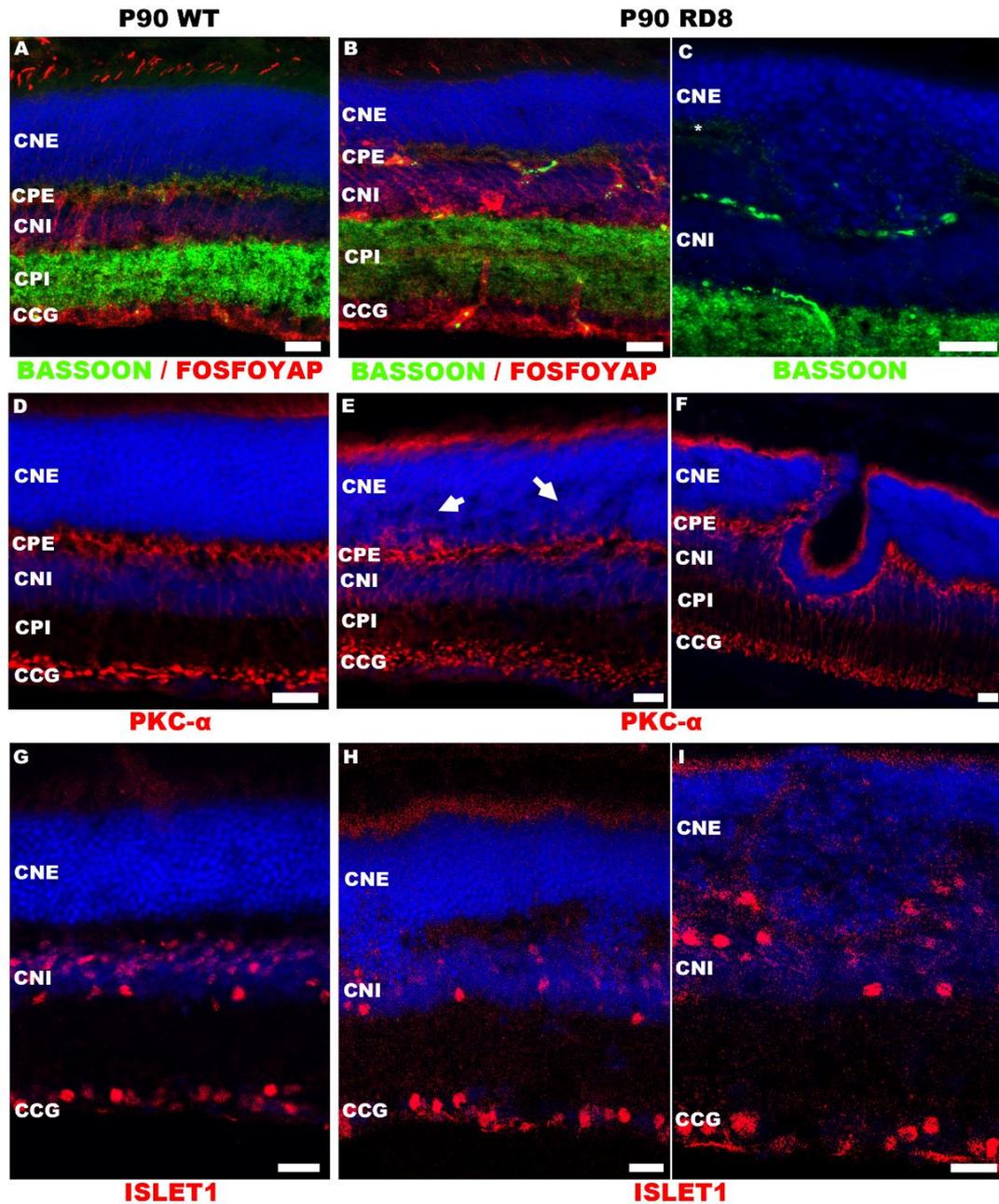


Figura R16: Análisis del estado de la retina neural en el estadio P90. (A-C): Secciones de criostato con doble marcaje inmunofluorescente para Fosfo-Yap y Bassoon (en A y B). En la retina mutante (B), la cantidad de segmentos de conos teñidos con Fosfo-Yap disminuye considerablemente. En la CPE, disminuye el marcaje frente a Bassoon (asterisco en C). (D-F): Inmunofluorescencia frente al anticuerpo PKC- α . La expansión de los penachos dendríticos de las células bipolares es evidente en las retinas mutantes (*flechas en E*). (G-I): Inmunofluorescencia para Islet-1 que marca células ganglionares en la CCG, así como amacrinas y bipolares en la CNI. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCG: Capa de las células ganglionares. Barras de escala: 20 μ m.

LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO

Debido a que se encontraron alteraciones en las proteínas relacionadas con las uniones celulares que conforman la MLE en las retinas de ratones mutantes para CRB₁, así como modificaciones en algunas de las proteínas necesarias para el correcto funcionamiento de la glía radial analizadas en criosecciones de retina y western-blot, nos propusimos conocer la expresión de alguno de estos marcadores en los cultivos celulares primarios de células de Müller procedentes de ambos genotipos, control y mutante para CRB₁, y cuya obtención se describe en el apartado “Material y métodos”.

Como primer paso, y para confirmar la pureza de los cultivos, se realizó una caracterización de los cultivos primarios de células de Müller mediante la identificación, gracias al marcaje inmunofluorescente, de varias de las proteínas relacionadas con funciones específicas de la glía radial de la retina (Figura R17). Este análisis permitió determinar que la totalidad de las células presentes en cultivo eran positivas para proteínas características de este tipo celular, como el marcador de filamentos intermedios Vimentina (Figura R17: A), el transportador de agua Acuaporina-4 (Figura R17: B), la enzima glutamina sintetasa (Figura R17: C) y el transportador de glutamato GLAST (Figura R17: D). El marcaje de estas proteínas permite discernir su expresión en toda la extensión de las células gliales en estos cultivos, confirmando la especificidad, así como la pureza de los cultivos primarios empleados en este estudio.

Para comprobar si, por un lado, la disfunción de la proteína CRB₁ en las células de Müller mutantes puede estar condicionando la expresión de otros miembros del complejo Crb, y, por el otro, el patrón de expresión las proteínas del complejo en este tipo celular *in vitro*, realizamos el análisis comparativo de su expresión entre los cultivos primarios de células de Müller procedentes de animales silvestres y mutantes para CRB₁ a DIC 15 y DIC 21 (DIC: días en cultivo).

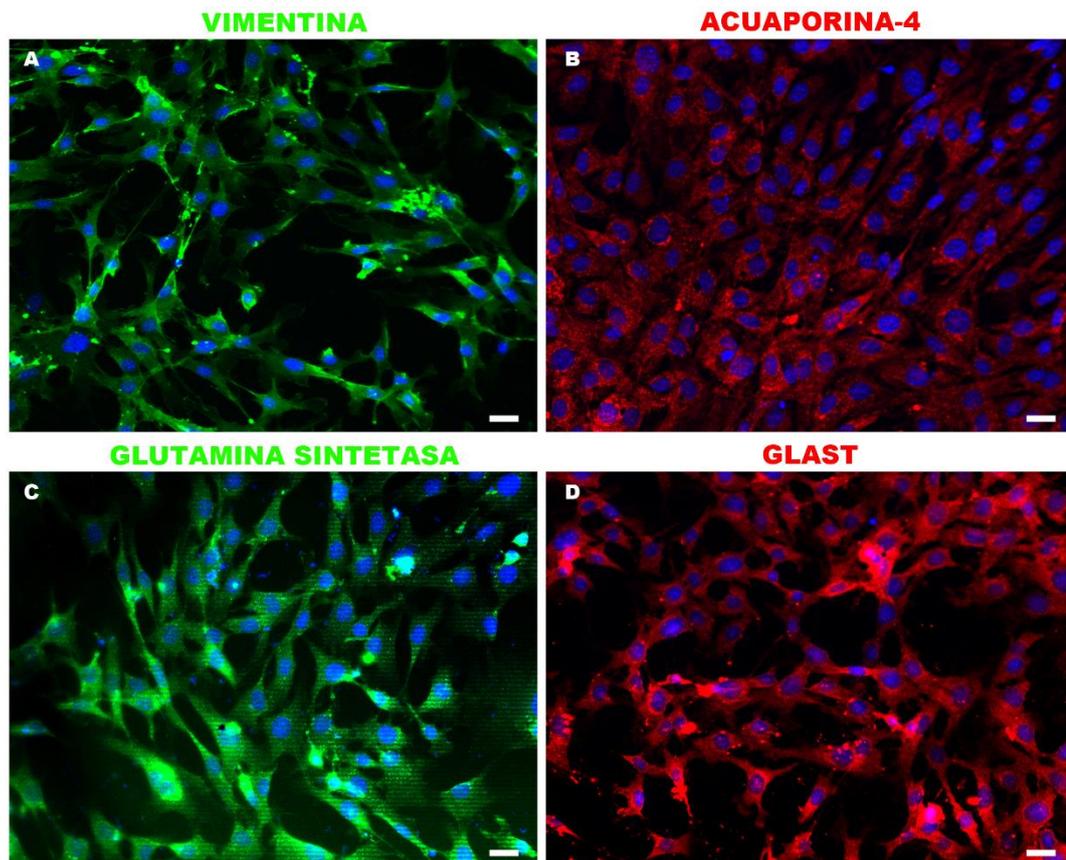


Figura R17: Caracterización de los cultivos primarios de células de Müller. Marcaje inmunofluorescente en el estadio DIC15 para proteínas específicas de células de Müller, como vimentina (A), Acuaporina-4 (B), glutamina sintetasa (C) y GLAST (D). Todas las células de los cultivos primarios son positivas para estos marcadores. Barras de escala: 20 μ m.

De este modo se analizó la expresión de las proteínas CRB2, PALS-1 y PATJ en los cultivos primarios. En el estadio DIC 15, el marcaje para la proteína CRB2 aparece distribuido por toda la extensión de célula de Müller en los cultivos de ambos genotipos, tanto en su cuerpo celular como en las prolongaciones (Figura R18: A y B), aunque en ambos tipos de cultivo parece haber una acumulación predominantemente en la región perinuclear (insertos en Figura R18: A y B). En el caso de PALS-1 (Figura R18: C, E, F y H), esta proteína también se distribuye por todo elemento glial, presentando una mayor concentración en la periferia celular; apreciándose de manera adicional el marcaje de lo que parece ser el aparato de Golgi (insertos en Figura R18: C y F), siendo este patrón de expresión similar en las células obtenidas de ambos genotipos. El marcaje para PATJ (Figura R18: D, E, G y H), es predominante en las regiones cercanas al núcleo, aunque permite delimitar los elementos celulares al completo (insertos en Figura R18: D y G). Además, hay colocalización entre estas dos proteínas, especialmente abundante en las regiones perinucleares (Figura R18: E y H).

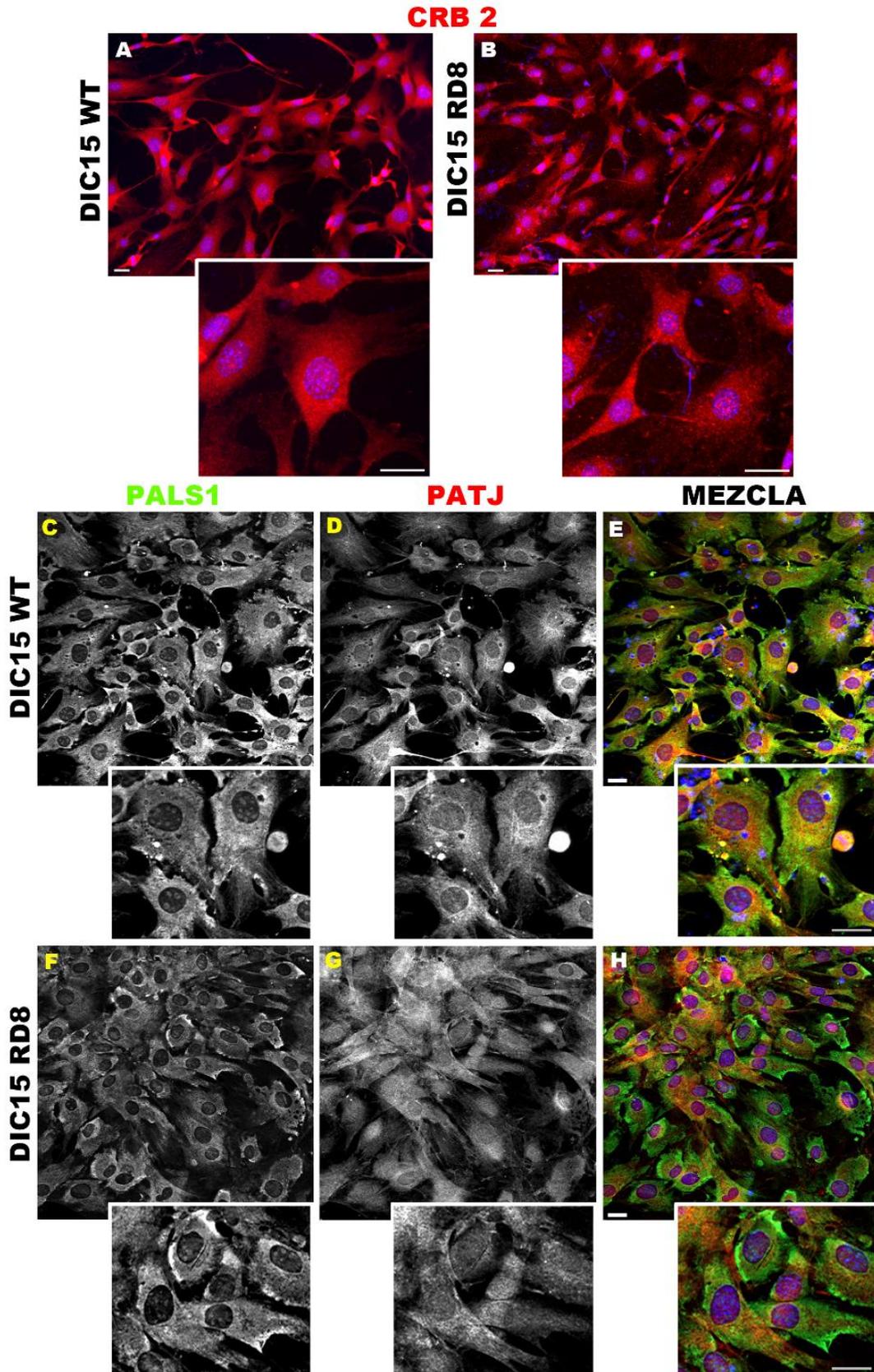


Figura R18: El complejo Crb en células de Müller en cultivo del estadio DIC15.

Marcaje inmunofluorescente para algunos de los componentes del complejo de polaridad apical Crb en células de Müller control y mutantes *Crbrd8*, como la proteína CRB2 (A y B), PALS-1 (C-E) y PATJ (F-H), en el estadio DIC15. Barras de escala: 20 μ m.

En el estadio DIC 21, el marcaje para CRB2 es diferente entre las células procedentes de las retinas silvestres y mutantes. En el caso de las primeras (Figura R19: A), el marcaje frente a CRB2 permite discernir la totalidad del cuerpo celular, y sus prolongaciones, de un modo más definido de lo que ocurre con su contrapartida mutante, donde se aprecia una tinción más difusa, y predominantemente acumulada en áreas perinucleares (Figura R19: B). En el caso de las células de Müller silvestres, la tinción frente a PALS-1 se asemeja a lo observado en el estadio DIC 15, ya que este marcaje es predominante en la periferia de la célula (Figura R19: C y E), al contrario de lo que ocurre en las células del genotipo mutante, donde, de la misma forma que lo observado con el marcaje para CRB2, parece estar más restringida a las zonas cercanas al núcleo (Figura R19: F y H). De la misma forma, el marcaje para PATJ, que delimita la periferia celular en el genotipo silvestre (Figura R19: D y E), en el caso de las células mutantes, este marcaje se muestra más difuminado con preferencia a acumularse en las zonas perinucleares (Figura R19: G y H). De manera similar a lo que ocurría en el estadio DIC15, las proteínas PALS-1 y PATJ colocalizan en las zonas cercanas al núcleo (Figura R19: E y H). De hecho, debido a que en las células del genotipo mutante, PALS-1 se localiza preferentemente en regiones perinucleares, estas dos proteínas colocalizan de forma más abundante en los cultivos de células de Müller del modelo *Crb1^{rd8}* (Figura R19: F-G).

Debido a que, como se ha descrito anteriormente, la proteína CRB1, que está mutada en el modelo *Crb1^{rd8}*, forma parte del complejo de polaridad celular Crb, ubicado en la RSA de las células de Müller, encargándose del establecimiento y mantenimiento de uniones celulares que definen la integridad de la MLE, nos propusimos analizar y comparar la expresión de proteínas de unión celulares, como β -catenina, catenina p120, o ZO-1, en cultivos primarios de células de Müller control y mutantes para CRB1 para investigar su posible alteración tras la mutación de CRB1.

En el estadio DIC 15, el marcaje para la proteína catenina P120 permite determinar que esta proteína, en cultivos de células de Müller control ya se localiza en su membrana plasmática mostrando una tinción relativamente constante que delimita perfectamente toda la periferia celular (Figura R20: A). Sin embargo, en las células del genotipo mutante se encontraron diferencias, ya que en las células gliales mutantes el marcaje se muestra de un modo desorganizado y más punteado, incluso apreciándose zonas donde el marcaje desaparece por completo (Figura R20: B, asteriscos).

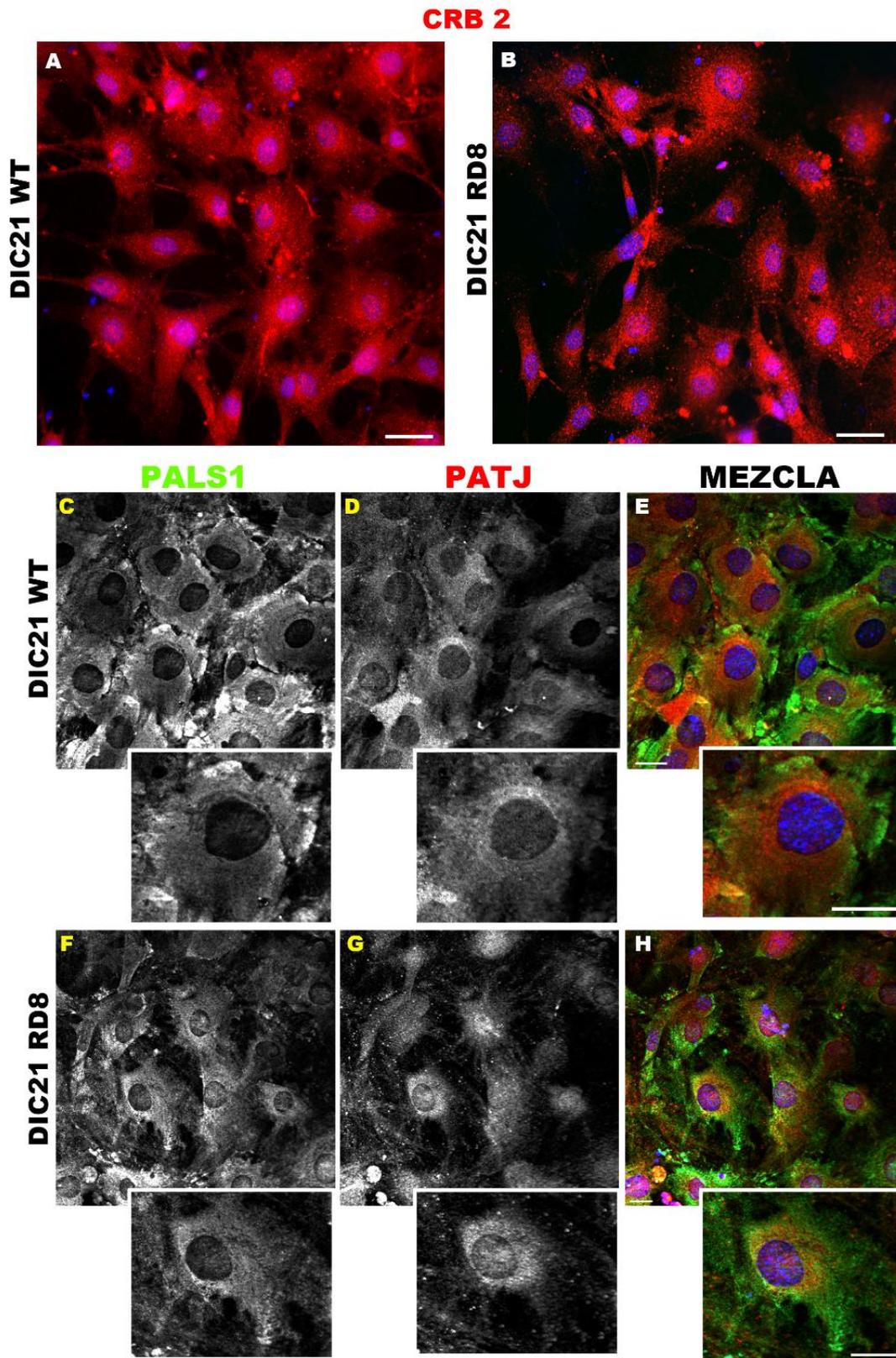


Figura R19: Distribución de las proteínas del complejo Crb en el estadio DIC21. Análisis mediante inmunofluorescencia de varios componentes del complejo de polaridad apical, como CRB₂ (A y B), PALS-1 (C-E) y PATJ (F-H) en el estadio DIC21 en células de Müller procedentes tanto de retinas control como mutantes *Crbr^{ds}*. Barras de escala: 20 μm.

El análisis del marcaje de otra proteína involucrada en las uniones adherentes, β -catenina, en células de ambos estadios muestra que ésta se dispone a lo largo de la periferia celular en las células control (Figura R20: C y G). Sin embargo, en el caso de las células mutantes se aprecian áreas en el contorno celular donde el marcaje periférico presenta una menor intensidad (Figura R20: D y H, asteriscos) y zonas puntuales en las que el marcaje muestra una apariencia desestructurada (Figura R20: D, puntas de flecha), contrastando con lo observado en las células del genotipo control.

Por último, el estudio de la proteína de uniones celulares ZO-1, también arroja diferencias entre las células control y mutantes para CRB1. El marcaje también se encuentra dispuesto en la membrana plasmática de las células, de manera más regular en el caso de la glía control (Figura R20: E, I), apareciendo fragmentado en el caso de las células mutantes, lo que sugiere que se producen alteraciones puntuales en los mecanismos de adhesión celular (Figura R20: F y J, asteriscos).

Debido a que la expresión de algunas proteínas relacionadas con la homeostasis celular, tales como Acuaporina-4, Kir 4.1 y GLAST, mostraron diferencias en las retinas del modelo experimental mutante para CRB1 respecto al control, nos propusimos analizar su expresión en las células de Müller en cultivo para investigar si estas alteraciones también se producían en las células aisladas del entorno de la retina, y poder conocer si estas alteraciones eran inherentes a las propias células de Müller debido a la mutación.

A DIC 15, el marcaje para Acuaporina-4 permite delimitar la totalidad del contorno y contenido de las células de Müller, tanto controles como mutantes, disponiéndose también por todo su citoplasma, aunque mostrando una tinción más intensa en las regiones perinucleares y sus prolongaciones, y no se observan diferencias evidentes en su expresión entre células control y mutantes para CRB1 (Figura R21: A y D). El marcaje para el canal de potasio Kir 4.1 tiñe por completo el citoplasma celular, y tiende a concentrarse en las áreas próximas a los núcleos y tampoco parece haber diferencias entre ambos genotipos (Figura R21: B y E). En el caso de la proteína GLAST, la tinción permite delimitar el contorno celular, concentrándose en las regiones perinucleares y en algunos de los filopodios de las células de Müller. En este caso, el marcaje para este transportador aparece menos intenso en las células de Müller del genotipo mutante (Figura R21: C y F).

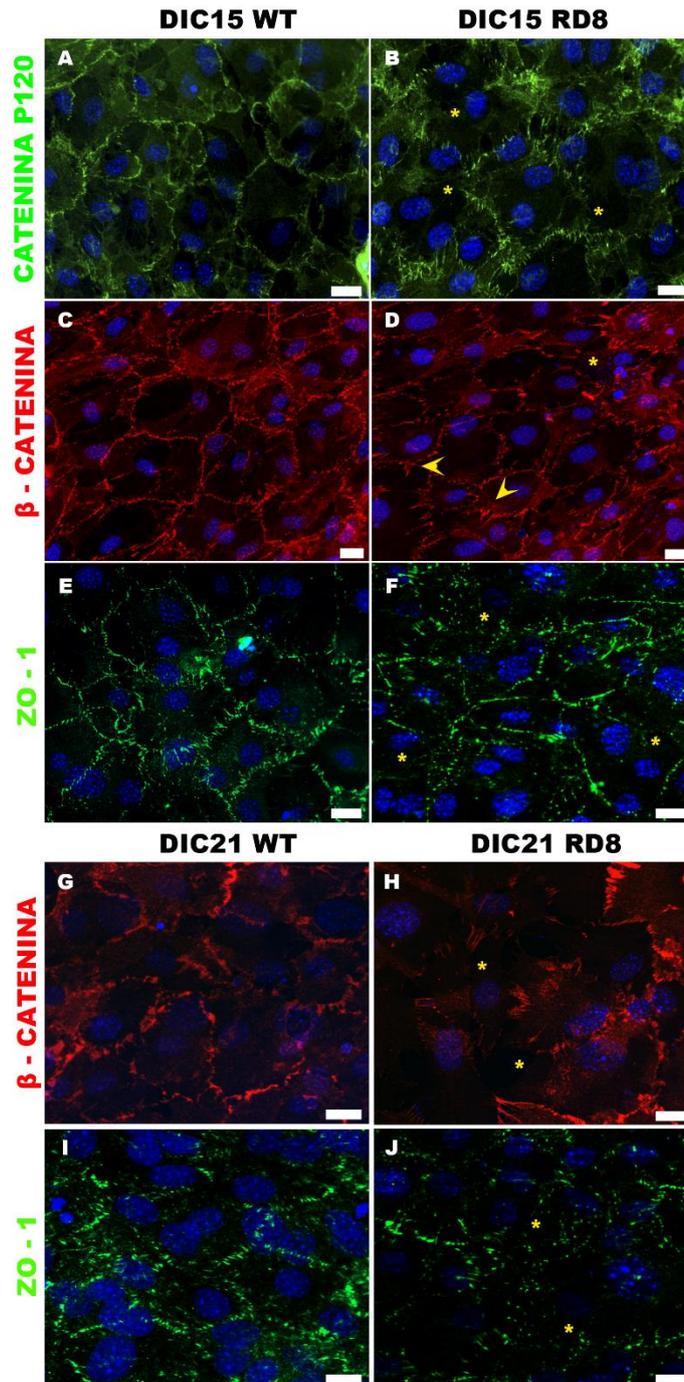


Figura R20: Uniones celulares de las células de Müller control y mutantes *Crbr^{rd8}*. Marcaje inmunofluorescente para las proteínas catenina P120 (A y B), β-catenina (C y D) y ZO-1 (E y F) en células de Müller procedentes de retinas silvestre y mutantes *Crbr^{rd8}*, en el estadio DIC15, y de β-catenina (G y H) y ZO-1 (I y J) en estadio DIC 21. Los asteriscos indican discontinuidades en la tinción y las puntas de flecha, áreas en las que la distribución de la proteína es anormal. Barras de escala: 20 μm.

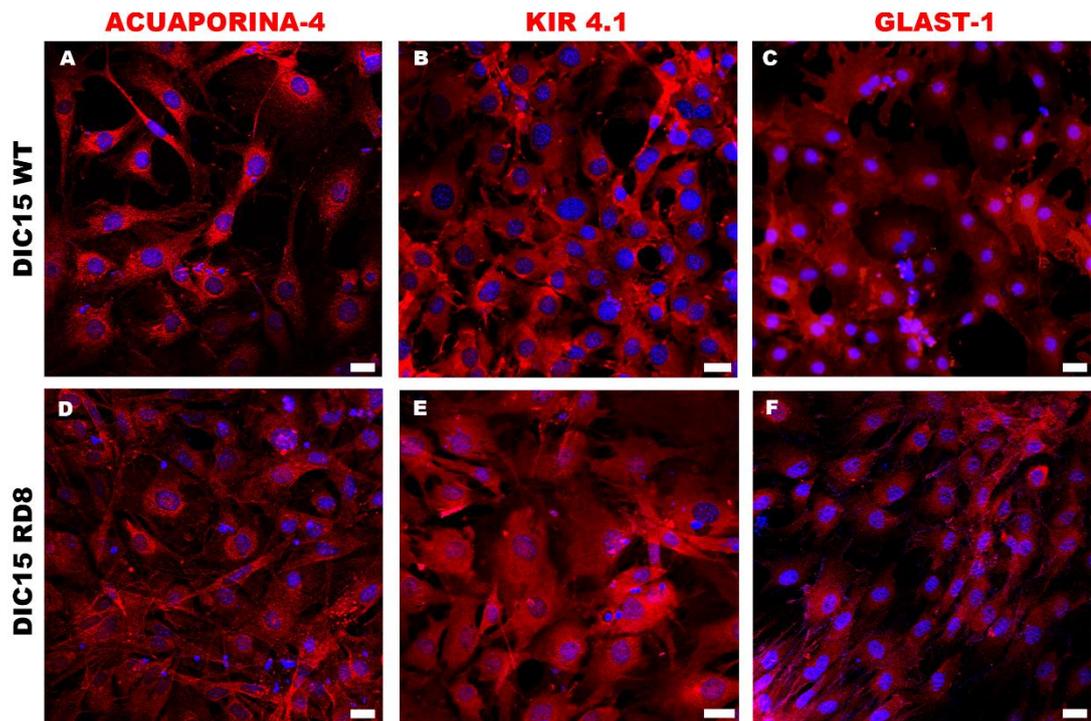


Figura R21: Expresión de marcadores homeostáticos de las células de Müller en el estadio DIC15. Análisis mediante inmunofluorescencia del transportador de agua Acuaporina-4 (A y D), el canal de potasio Kir 4.1 (B y E) y el transportador de glutamato GLAST (C y F), en células de Müller de ambos genotipos, en el estadio DIC15. Barras de escala: 20 μm .

En el estadio DIC 21, el marcaje frente a Acuaporina-4 permite la visualización de todo el contorno celular en las células procedentes de las retinas control (Figura R22: A), que parece menos definido en el caso de las células mutadas (Figura R22: D), con una mayor concentración en las regiones perinucleares. En este estadio, el marcaje para Kir 4.1 parece concentrarse en las prolongaciones de las células de Müller en ambos genotipos (Figura R22: B y E). Por último, la proteína GLAST aparece más concentrada en las áreas próximas al núcleo de las células mutantes en comparación con las células silvestres, y además muestra un marcaje más difuso y punteado (Figura R22: C y F).

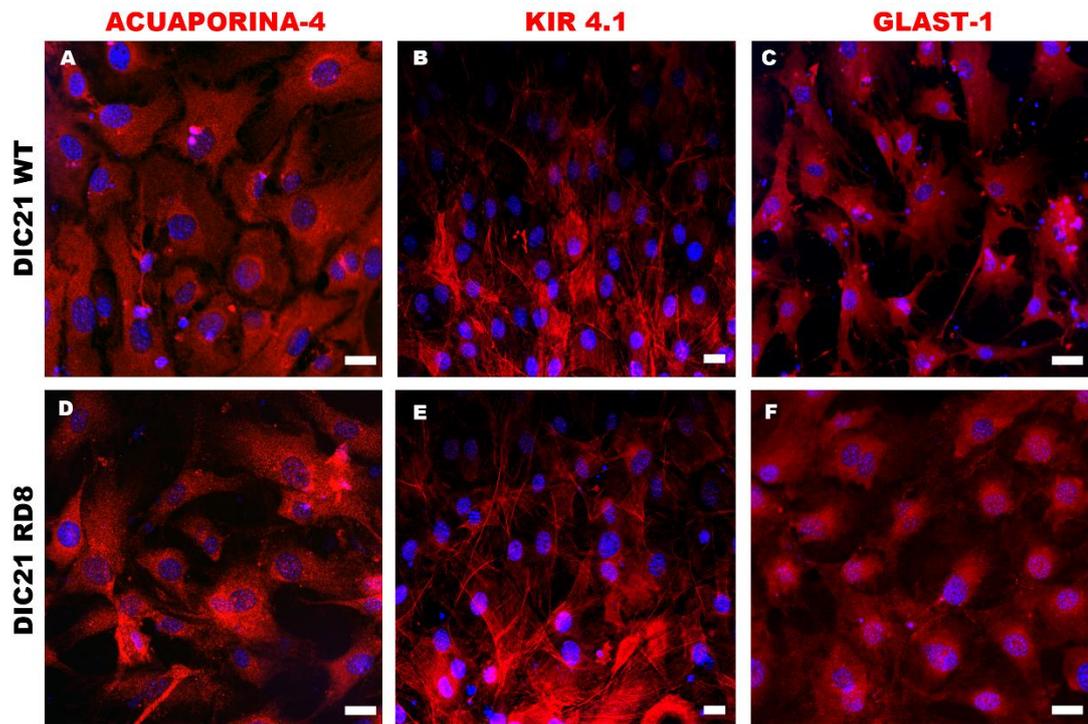


Figura R22: Expresión de marcadores homeostáticos de las células de Müller en el estadio DIC21. Marcaje mediante inmunofluorescencia de las proteínas Acuaporina-4 (A y D), Kir 4.1 (B y E) y GLAST (C y F) en las células de Müller silvestres y mutantes *Crbr^{rd8}*, en el estadio DIC 21. Barras de escala: 20 μ m.

Por otro lado, debido a que el análisis de la expresión de la proteína YAP, cofactor de la ruta Hippo en preparaciones de secciones retina mostró un incremento en las células de Müller del modelo mutante, más notorio en áreas en degeneración; que el complejo Crb actúa como regulador de la ruta Hippo pudiendo, entre otras funciones, limitar mecanismos proliferativos irregulares y porque se ha descrito que perturbaciones en el correcto establecimiento de uniones celulares puede desregular esta ruta provocando una translocación nuclear de YAP, nos propusimos analizar su expresión en los cultivos primarios de células de Müller y comparar su expresión entre la glía radial control y mutante. El marcaje inmunofluorescente mostró que existen diferencias en la expresión de esta proteína en las células de los cultivos de ambos genotipos. YAP se localiza tanto en los núcleos como en el citoplasma y prolongaciones de las células de Müller. No obstante, en los cultivos de células silvestres, tanto en el estadio DIC 15 (Figura R23: A y B) como en el estadio DIC 21 (Figura R23: F y G), no todas las células confluentes presentan YAP en el núcleo. Por el contrario, aparentemente, un mayor número de células mutantes presentaban marcaje nuclear de YAP, tanto a DIC 15 (Figura R23: C y D), como a DIC 21 (Figura R23: H e I). Para comprobar estas

diferencias, se realizó un análisis estadístico del marcaje para YAP, cuantificando el número de células que presentan YAP en el núcleo. Para ello se tomaron 4 imágenes aleatorias para cada cultivo de 3 cultivos diferentes de cada genotipo para ambos estadios (DIC 15 y DIC 21) y se contaron el número de células con marcaje nuclear de YAP en relación con el número total de núcleos teñidos con DAPI. De este modo se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de células con marcaje nuclear de YAP, siendo este porcentaje mayor en los cultivos mutantes en ambos estadios analizados. A DIC 15, las células procedentes de las retinas silvestres presentan un porcentaje medio $\bar{x}=46,36 \% \pm 3,89$ mientras que en las células del genotipo mutante es de $\bar{x}=65,81 \% \pm 4,12$ (p-valor=0,004). Para el estadio DIC 21, las células procedentes de retinas silvestres presentan un valor medio de $\bar{x}=49,68 \% \pm 4,30$ y las que proceden de las retinas del modelo mutante, $\bar{x}=74,95 \pm 8,76$ (p-valor=0,013). Estos datos indican, por tanto, que en las células de Müller mutantes, YAP se encuentra translocado preferentemente en el núcleo.

Para poder investigar si la mutación de CRB1 en las células de Müller puede alterar la expresión proteica de las proteínas involucradas en polaridad celular y en funciones gliales, se realizaron experimentos de western-blot para analizar la expresión de las proteínas del complejo Crb, CRB2, PALS-1 y PATJ y los marcadores gliales Kir 4.1 y Acuaporina-4. Para ello se extrajeron proteínas de 5 cultivos diferentes (n=5) de cada uno de los estadios analizados (DIC 15 y DIC 21) y genotipo. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre genotipos para la cantidad de CRB2 (p-valor=0,99 en el estadio DIC15; p-valor=0,83 en el estadio DIC21), de PALS-1 (p-valor=0,32 en el estadio DIC15; p-valor=0,40 en DIC21), de PATJ (p-valor=0,93 en el estadio DIC15; p-valor=0,47 en DIC21), de Kir 4.1 (p-valor=0,73 en el estadio DIC15; p-valor=0,44 en DIC21), ni de Acuaporina-4 (p-valor=0,60 para el estadio DIC15; p-valor=0,41 en DIC21) (Figura R24: A-E).

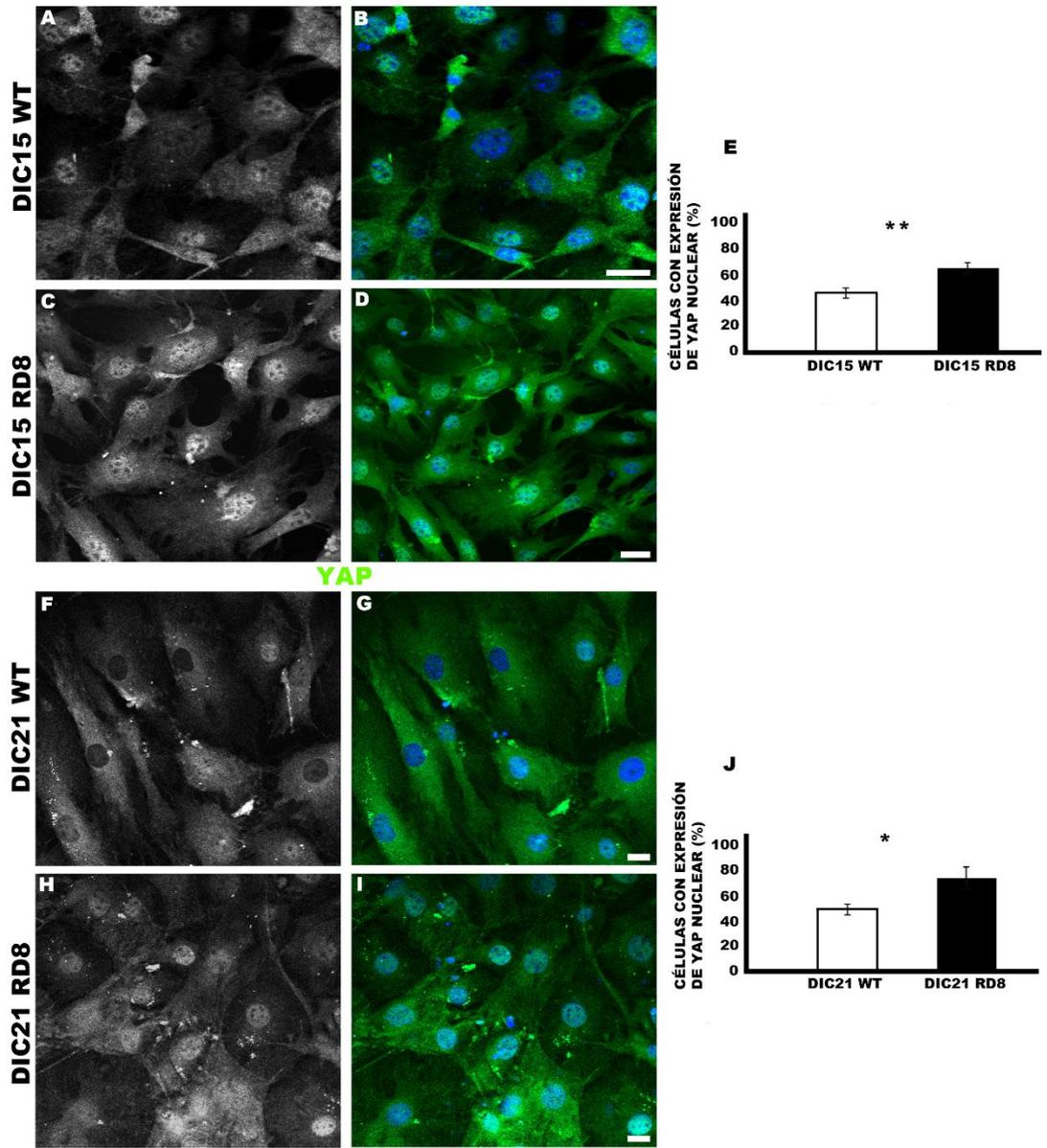


Figura R23: La proteína YAP en cultivos de células de Müller. YAP se localiza en el núcleo, citoplasma y prolongaciones de las células de Müller control y mutante *Crb1^{rd8}* en el estadio DIC15 (A–D) y DIC21 (F–I). Tanto a DIC15 (E) como a DIC21 (J), hay un mayor porcentaje de células de Müller mutantes que presentan una localización nuclear de YAP, en comparación con las células silvestres. En B, D, G e I los núcleos están teñidos con DAPI (azul). Barras de escala: 20 μ m.

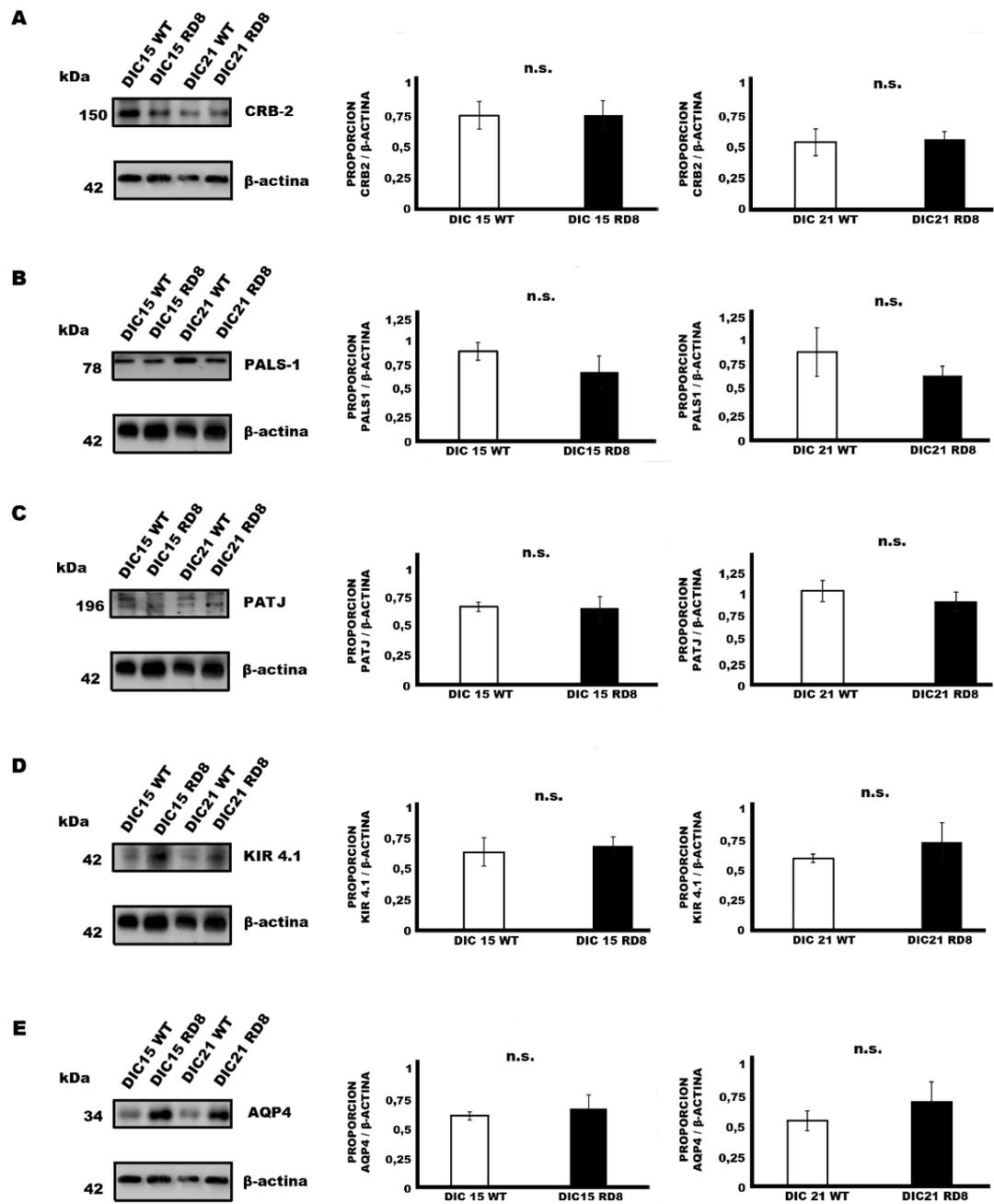


Figura R24: Western-blot y gráficas de la expresión de CRB2, PALS-1, PATJ, KIR 4.1 Y ACUAPORINA 4 en cultivos de células de Müller control y mutante *Crbr^{rd8}* a DIC15 y DIC21. La cuantificación de las proteínas frente a su control de carga, β -actina, de las células de Müller de ambos genotipos no arroja diferencias significativas para la cantidad de CRB2 (A), PALS-1 (B), PATJ (C), Kir 4.1 (D) o Acuaporina-4 (E), ni a DIC 15 ni a DIC 21. Los datos se representan como la media \pm s.e.m. n.s.: No significativo ($p > 0,05$).

Por último, y debido a que el análisis mediante inmunofluorescencia de la localización de las proteínas de uniones celulares mostró que, de manera puntual, había alteraciones en su distribución en los cultivos de células de Müller procedentes de las retinas mutantes, nos propusimos investigar la fortaleza de estas uniones celulares mediante mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Esta técnica permite analizar la resistencia que ejercen los cultivos celulares al paso de los iones del compartimento apical al basal en placas de cultivo con insertos, como una medida indirecta de la robustez de las uniones que se establecen. Tal y como se detalla en el apartado de “material y métodos”, las mediciones TEER se realizaron en placas con cestas Transwell® mediante el empleo de un voltímetro específico para este fin. Para ello se seleccionaron 4 cultivos diferentes (n=4) de cada genotipo, que en el estadio DIC₁₀ se tripsinizaron y sembraron en las placas Transwell®. Las mediciones TEER se realizaron a los 7 días en cultivo (DIC 7), 14 (DIC 14) y 21 (DIC 21) (Figura R25). Si bien no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los estadios analizados entre las células de los dos genotipos, los valores de resistencia de las células mutantes parecen disminuir respecto a las células silvestres. De este modo, a DIC₇, la resistencia para las células del genotipo control es de $\bar{x}=20,62\pm 0,63$ y para el genotipo mutante, $\bar{x}=18,56\pm 1,75$ (p-valor=0,27). A DIC₁₄, para el genotipo control, $\bar{x}=26,56\pm 1,23$ y para el genotipo mutante, $\bar{x}=22,49\pm 1,94$ (p-valor=0,10). Finalmente, en el estadio DIC₂₁, para el genotipo control $\bar{x}=30,30\pm 2,23$ y para el genotipo mutante $\bar{x}=25,46\pm 1,87$ (p-valor=0,11). Estos datos indican que, a pesar de que las uniones intercelulares de los cultivos de las células de Müller mutantes para CRB₁ parecen estar en parte desorganizadas o incluso puedan llegar a desaparecer en algunos puntos, esta ausencia, aunque se ve parcialmente reflejada en un descenso leve de su resistencia eléctrica transepitelial, no es suficiente para provocar una pérdida significativa de su adhesión y/o fortaleza intercelular.

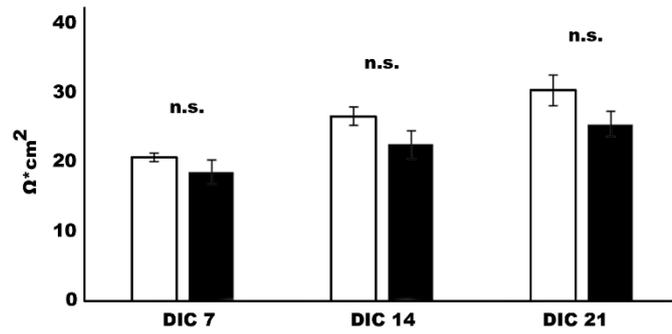


Figura R25: Representación gráfica de la resistencia media de las células silvestres y mutantes *Crb1^{rd8}*. Las mediciones realizadas en los estadios DIC 7, DIC 14 y DIC 21 muestran un descenso en la resistencia de las células mutantes *Crb1^{rd8}* en comparación con las células silvestres, aunque este descenso no es estadísticamente significativo. Los datos se representan como la media \pm s.e.m. n.s.: No significativo ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

LOS COMPLEJOS DE POLARIDAD Y LAS UNIONES ADHERENTES EN EL MODELO *Crb1^{rd8}*

En la bibliografía actual, las primeras alteraciones estructurales descritas resultantes de la mutación en CRB1 en retinas de ratón se corresponden al estadio P14, tanto para el modelo de estudio de la presente tesis doctoral, *Crb1^{rd8}* (Mehalow et al., 2003) como para el modelo knockout de *Crb1* (van de Pavert, 2007a). Sin embargo, los primeros fenómenos que parecen estar relacionados con el inicio de la degeneración retiniana en el modelo experimental *Crb1^{rd8}* y descritos en trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación se detectaron a P7, una edad relativamente temprana para un modelo clásico de degeneración retiniana lenta. Los análisis a microscopía electrónica ayudaron a determinar la pérdida puntual de uniones adherentes en la MLE entre los fotorreceptores y las células de Müller, así como el desplazamiento atípico de algunos núcleos de fotorreceptores hacia el espacio subretinal (Herranz-Martín, 2013).

Entre otras observaciones, es importante destacar que, en el trabajo de Mehalow y colaboradores (2013), el estado estructural y funcional de la MLE en el modelo *Crb1^{rd8}* en el estadio P14 sólo fue analizado mediante la localización de proteínas relacionadas con el estado de las uniones celulares, concretamente con la proteína pan-cadherina, por lo que hasta ahora, no se conocía si las alteraciones de las uniones celulares están o no relacionadas con el desempeño o situación de la localización y/o expresión de proteínas relacionadas con la polaridad celular, como las del complejo Crb o PAR (Mehalow et al., 2003). Por ello, el análisis detallado que se ha realizado en el presente trabajo sobre la actividad de las proteínas de polaridad apical de los complejos Crb y PAR resulta pionero en evidenciar que, ante la mutación de CRB1, se producen alteraciones en la disposición y funcionalidad de los complejos de polaridad en un estadio tan temprano como P7.

A diferencia de lo que se ha descrito en publicaciones previas para el modelo *Crb1^{rd8}*, en modelos que presentan mutaciones en otros miembros del complejo Crb, sí se han observado cambios estructurales más tempranos. En animales de experimentación con una mutación condicional de CRB2 en progenitores retinianos se ha descrito que experimentan alteraciones en la capa neuroepitelial ya en el estadio embrionario E18.5 (Alves et al., 2013). Concretamente, la delección específica de CRB2 en fotorreceptores en desarrollo cursa con un fenotipo severo, con presencia de rosetas de fotorreceptores desde el estadio embrionario E15.5 y pérdida de función visual al cabo de un mes de

vida, mientras que la delección específica de CRB2 en las células de Müller cursa con un fenotipo menos agresivo, observando alteraciones en la continuidad de la MLE al cabo de un mes de vida. Sin embargo, los autores no describen la presencia de rosetas o pérdida de estructura en las capas de la retina más evidentes (Alves et al., 2014), que en parte contrasta con los resultados encontrados en nuestro modelo en los distintos estadios. En retinas de modelos experimentales con mutación condicional para CRB1 y CRB2 en los progenitores retinianos, las primeras alteraciones se encontraron también durante un estadio embrionario de E13.5 (Pellissier et al., 2013). Asimismo, el modelo knockdown para PALS1, otro de los miembros del complejo Crb, muestra los primeros cambios estructurales en el estadio post-natal P6 (Park et al., 2011), mientras que el knockout para esta misma proteína lo hace en el estadio embrionario E15.5 (Cho et al., 2012).

Por tanto, el modelo *Crb1^{rd8}*, empleado en este trabajo presenta características diferentes en comparación con los modelos mencionados. Por un lado, en ratón, la proteína CRB1 se expresa de forma mayoritaria en las células de Müller, pero no en los fotorreceptores, mientras que se ha descrito la presencia de CRB2 y PALS1 en ambos tipos celulares (Alves et al., 2014). Por otro lado, las lesiones asociadas a las mutaciones en CRB1, tanto en el modelo *Crb1^{rd8}* como en el modelo knockout de *Crb1*, se encuentran principalmente afectando las regiones más ventrales, mientras que mutaciones en CRB2 o PALS1 afectan a la totalidad de la retina (Alves et al., 2014). Por tanto, según los resultados obtenidos en el presente estudio, en el estadio concreto de P7, la mutación en CRB1 y la subsecuente pérdida de la integridad en las uniones celulares parece comprometer la integridad de los complejos de polaridad apicales en la RSA, como se refleja en la desestructuración observada frente a los marcadores utilizados. Sin embargo, por el momento, y debido a las limitaciones del estudio, no es posible concretar hasta qué punto en este estadio tan temprano del desarrollo, la mutación que presenta la proteína CRB1, que resulta en el truncamiento de sus dominios intracelular y transmembrana, podría condicionar la unión con otros miembros de complejos de polaridad apicales, tanto del complejo Crb (Roh et al., 2003) como del complejo PAR (Bulgakova y Knust, 2009), a partir del sitio PDZ de su extremo C-terminal. El incremento de expresión de la proteína GFAP en el estadio P7 del modelo *Crb1^{rd8}*, descrito en trabajos previos en nuestro grupo de investigación parece estar reflejando una respuesta glial ante las alteraciones tempranas ocurridas en la estructura retiniana (Herranz-Martín, 2013). Por todo ello, nuestros resultados ponen de manifiesto que

el efecto de la mutación de CRB₁ sobre las células de Müller desestabiliza al complejo Crb, en consonancia con lo mostrado en mutaciones de proteínas de polaridad en otros modelos, como el modelo condicional para *Crb1* (**van de Pavert et al., 2004**) o *Crb2* (**Alves et al., 2014**), aunque en un estadio más temprano del descrito hasta la fecha, que acarrea perturbaciones de la estructura retiniana de forma precoz.

El análisis por inmunofluorescencia de la arquitectura y composición de la MLE y RSA en estadios más avanzados, tanto a P₂₁ como a P₉₀, reflejó del mismo modo alteraciones en las retinas mutantes para las proteínas de polaridad apical estudiadas, tanto del complejo Crb (CRB₂) como del complejo PAR (PAR-3), así como del estado general de la estructura de la MLE (F-actina). Si bien se ha descrito previamente el estado de estos estratos en estadios adultos en el modelo *Crb1^{rd8}*, estos análisis no incluían el análisis de la expresión y/o localización de estos elementos, que se suponen imprescindibles para la correcta organización estructural de la retina (**Hippert et al., 2015; Luhmann et al., 2015; Mehalow et al., 2003**). A estas edades, el fenotipo es más severo, encontrando rosetas ya bien definidas a P₂₁, que se mantienen y desarrollan con la progresión de la degeneración.

En cuanto a los resultados de los análisis mediante western-blot que permitieron conocer la variación en los niveles de expresión proteica de todas estas proteínas implicadas en polaridad y uniones celulares, éstos no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos, ni en el estadio temprano (P₇) ni en el intermedio (P₂₁). Sin embargo, el nivel de expresión de las proteínas CRB₂ y beta-catenina en las retinas del genotipo mutante para CRB₁ estadio más tardío analizado (P₉₀), sí mostró un incremento significativo respecto al genotipo control. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha descrito que el modelo *Crb1^{rd8}* experimenta un incremento en la expresión de la proteína CRB₂ en la corteza cerebral (**Dolón et al., 2018**). Dada la similitud en el peso molecular y la estructura entre CRB₁ y CRB₂, estos resultados parecen sugerir la existencia de un mecanismo compensatorio entre ambas proteínas, al menos en este tejido, que evite lesiones y alteraciones gliales en el cerebro de estos animales. En relación a la posible compensación retiniana entre CRB₁ y CRB₂, en el modelo knockout-condicional para CRB₂, los análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real de retinas en los estadios tempranos P₃ y P₁₀ evidenciaban un incremento en el gen *Crb1*, aunque ese incremento no resultaba significativo (**Alves et al., 2013**). El aumento de expresión proteica de CRB₂ en la retina del modelo *Crb1^{rd8}* en los estadios más tardíos analizados que encontramos en el presente estudio podría

deberse a que, a medida que el fenotipo se vuelve más severo en las retinas mutantes, se produzca una mayor expresión de la proteína CRB2 en aquellas células gliales que no han visto comprometidas su función, intentando compensar la disfunción de CRB1. Esto podría explicar, por un lado, que las diferencias significativas se produzca en las retinas de mayor edad, cuando más áreas de la retina se ven comprometidas por los mecanismos lesivos, y por el otro, dado que la expresión de CRB1 predomina en las células de Müller, pero no en los fotorreceptores, justificaría la restricción espacial de las lesiones en las retinas de nuestro modelo, previniendo la afectación de todos los cuadrantes retinianos.

De un modo similar, se detectó un incremento en la expresión de beta-catenina, una proteína que refleja la integridad de las uniones adherentes de la MLE (Campbell et al., 2007; Herranz-Martín, 2013; Stuck et al., 2012) pero que, adicionalmente, está involucrada en la regulación de la ruta wnt/beta-catenina, actuando como su mediador central (Logan y Nusse, 2004). Se ha visto que, frente a condiciones lesivas en la retina, se produce la activación de esta ruta y una mayor expresión de beta-catenina, como ocurre en el ratón modelo de DMAE *Ccl2^{-/-}/Cx3cr1^{-/-}* (Tuo et al., 2015), en el modelo degenerativo rd1 (Yi et al., 2007) o en modelos de retinopatía diabética (Zhou et al., 2014). Además, la activación de la ruta provoca un incremento en la señalización de la misma sobre las células de Müller, conduciendo a una respuesta glial que puede ser protectora y beneficiosa para los fotorreceptores, debido a la liberación de factores neurotróficos como BDNF o CNTF (Yi et al., 2007), o por el contrario, resultar perjudicial, como se ha comprobado en retinas de animales diabéticos, pues el incremento de beta-catenina condiciona un incremento de factores proangiogénicos como VEGF, provocando procesos de neovascularización e inflamatorios en la retina (Zhou et al., 2014).

La posible relación entre beta-catenina y los componentes del complejo Crb ha sido previamente descrita (Pellissier et al., 2013). La pérdida de las proteínas de este complejo en la región subapical de los progenitores retinianos en el modelo condicional para *Crb1* y *Crb2*, que compromete la integridad de los complejos de polaridad y de uniones adherentes, conduce a una desregulación de la ruta de señalización wnt/beta-catenina, provocando un aumento en la expresión proteica de algunos de sus componentes en estadios embrionarios (Pellissier et al., 2013). Por ello, el incremento en la expresión de beta-catenina que encontramos en nuestro modelo, tanto por inmunofluorescencia como por western-blot podría ser indicativo, por un lado, del

intento de las células de Müller por minimizar los daños más extendidos en el estadio adulto, de un modo similar a lo observado para la proteína CRB2 y por el otro, podría ser reflejo de una desregulación de la ruta wnt/beta-catenina como consecuencia de la mutación en CRB1.

EL DESARROLLO ANGIOGÉNICO EN EL MODELO MUTANTE

En los últimos años, la mayor parte de los estudios relacionados con el desarrollo angiogénico de la retina de roedores se han centrado en el análisis de los procesos altamente regulados que determinan este desarrollo vascular y en los que participan varios tipos celulares. Durante la primera semana de vida, el desarrollo de la capa vascular más superficial se ha relacionado con la acción de las células ganglionares y, más concretamente, con la de los astrocitos, que se encuentran dispuestos en áreas adyacentes a la zona de entrada de los vasos sanguíneos en formación y que actúan como molde para guiar la correcta colonización de la retina por los elementos vasculares (Gerhardt et al., 2003; O'Sullivan et al., 2017; Tao y Zhang, 2016). El desarrollo de la vascularización requiere de un correcto equilibrio de la liberación de factores pro y anti-angiogénicos (Cabral et al., 2017), y se ha considerado la secreción de VEGF por parte de los astrocitos como un aspecto esencial para la progresiva extensión de la red vascular, al menos durante la primera semana post-natal. Sin embargo, durante el desarrollo vascular se ha encontrado ARNm de VEGF en otros elementos retinianos, como las células de Müller (Stone et al., 1995).

Experimentos previos en nuestro grupo de investigación pusieron de manifiesto que las retinas del modelo mutante *Crb1^{rd8}* presentaban una mayor expresión de la proteína GFAP en el estadio P7, detectado tanto mediante western-blot como por su localización en la prolongaciones de las células de Müller que atraviesan la CPI (Herranz-Martín, 2013), así como indicios de alteraciones morfológicas en la red vascular de las retinas mutantes. En la presente tesis doctoral nos propusimos profundizar en esta observación previa para intentar determinar su verdadero alcance e implicaciones para el desarrollo de la lesión retiniana, así como intentar determinar si estas alteraciones se producen en estadios previos a los primeros signos de degeneración. Nuestros datos apuntan a que a P3 no se producen cambios en la red vascular en el genotipo mutante, aunque sí se ha detectado un aumento del área ocupada por la red vascular en estas retinas en el estadio P7, y estas diferencias son significativas en el cuadrante ventral. Estas

alteraciones se deben a que los vasos sanguíneos en la retina mutante tienen mayor calibre en esa área, que concuerda con el incremento de la expresión proteica del factor pro-angiogénico VEGF en las retinas mutantes en este estadio P7.

En estudios anteriores realizados en el modelo *Crbr^{rd8}* de dos meses de edad (P60) se había descrito que en áreas ventrales de la retina se detectaban células de Müller y microglía activadas y asociadas a vasos sanguíneos que atravesaban la CNE e incluso alcanzaban el epitelio pigmentario (Luhman et al., 2015). Estos autores sugieren que, frente a la activación de los elementos gliales, se produce un ambiente inflamatorio y pro-angiogénico más permisivo en estas retinas. Cabe señalar que, ante lesiones en la retina, y acompañando la hipertrofia celular de las células de Müller o la sobreexpresión de proteínas como GFAP o vimentina, también se produce un incremento de una serie de factores inflamatorios y citoquinas, entre los que se incluye VEGF (Eastlake et al., 2016). En modelos de retinopatía diabética, la sobre-expresión de VEGF induce procesos patogénicos, como la neo-vascularización retiniana o el edema macular (Wang et al., 2010), fenómenos también observados en modelos de retinopatía inducido por oxígeno (Werdich et al., 2004) o en la degeneración macular asociada a la edad (Penn et al., 2008). Existe la posibilidad de que, como consecuencia de la pérdida de polaridad temprana en el modelo mutante empleado en el presente estudio y el inicio de la desorganización de la CNE, se produzca una respuesta glial temprana reflejada por el incremento de los niveles de GFAP en la glía radial presente en aquellas áreas donde se producen las alteraciones, promoviendo la liberación de VEGF. El incremento en el área ocupada por los vasos sanguíneos sobre las áreas más ventrales durante el desarrollo angiogénico podrían ser reflejo de las modificaciones de las células de Müller en estadios tempranos, algo que, hasta la fecha, no había sido descrito en periodos tan tempranos en el modelo *Crbr^{rd8}*. De manera adicional, y reforzando el papel de CRB1 en la correcta regulación de la vasculatura, se ha descrito que tanto en pacientes que presentan mutaciones en CRB1 como en otro modelo animal con mutaciones en esta proteína, la rata BN-J, se producen mecanismos de telangiectasia, que implica la aparición de dilataciones en los capilares sanguíneos (Henderson et al., 2011; Zhao M et al., 2015), similar a lo descrito en la retina de nuestro modelo ya a los 7 días de nacimiento.

Por otro lado, o adicionalmente a estas observaciones, no hay que descartar el papel que puede estar ejerciendo la proteína CRB1 sobre alguna de las rutas de señalización implicadas en el desarrollo angiogénico. Por un lado, las células de Müller se encargan

de liberar el ligando Norrin, que tras su unión con el receptor Frizzled-4 provoca la activación de la ruta wnt/beta-catenina (Liu et al., 2013). En un modelo experimental de ratón en el que se inducía la inactivación de este receptor, Frizzled-4, se producía un retraso en la expansión de la vasculatura en el estadio P7 (Ye et al., 2009). Por otro lado, en el modelo *sEH*^{-/-}, la delección de la enzima epóxido hidrolasa soluble, que en la retina es liberada por las células de Müller, provoca un retraso en la extensión del plexo superficial en los estadios P2 y P5 del desarrollo postnatal de la vasculatura, además de producirse un incremento en la expresión de los genes *Hes1* y *Hey1*, que forman parte de la ruta de señalización Notch, produciendo una activación de esta ruta (Hu et al., 2014). Teniendo en cuenta como se ha visto que la delección condicional de *CRB1* y *CRB2* sobre progenitores neurales, en el modelo *Crb1Crb2* cko, provoca una disminución en la expresión de los genes *Hes1* y *Hey1*, tanto en el estadio embrionario de E17.5 como en el post-natal P3, lo que sugiere que, ante la disfunción de *CRB1* y *CRB2*, la ruta de señalización Notch puede verse alterada (Pellissier et al., 2013). Por todo ello, las alteraciones que encontramos en el desarrollo angiogénico también podrían deberse a una desregulación de las rutas de señalización Wnt/beta-catenina y Notch, como consecuencia de la mutación en *CRB1*. Análisis de otros componentes de las rutas en este estadio podrían ayudar a dilucidar otros efectos de la mutación.

LA POBLACIÓN MICROGLIAL EN EL MODELO *Crb1*^{rd8}

Durante el desarrollo embrionario y post-natal de la retina de modelos animales como el ratón, las células microgliales se encuentran localizadas en las capas más internas y van experimentando una progresiva migración hacia las capas más esclerales en los días posteriores (Santos et al., 2008). Existe, sin embargo, una restricción en su disposición, pues no llegan a superar el límite de la CPE, ni durante las primeras semanas de su desarrollo, ni en la etapa adulta, que es señal de un correcto funcionamiento retiniano (Chen et al., 2002). No obstante, ante perturbaciones retinianas, las células de la microglía pueden sufrir procesos de activación, modificando su morfología y dirigiéndose a las zonas de lesión (Harada et al., 2002). Este fenómeno se ha descrito en modelos que cursan con la progresiva degeneración de la retina, entre los que se incluyen modelos para el estudio de retinosis pigmentaria, como en modelos de degeneración rápida *rd10* (Roche et al., 2016) y *rd1* (Zeng et al., 2005) o de degeneración lenta *Cngb1*^{-/-} (Blank et al., 2018) coincidiendo o precediendo a la

muerte de los fotorreceptores, demostrando la gran sensibilidad de la microglía ante los primeros síntomas degenerativos. Estos antecedentes nos indujeron a analizar este tipo celular en el estadio temprano P7, edad en la que hemos descrito las primeras alteraciones en nuestro modelo *Crbl^{rd8}*, y así confirmar si estos primeros cambios pueden estar comprometiendo a la población microglial.

La relación entre la mutación en el gen *Crbl* y la población microglial ha sido analizada previamente por Aredo y colaboradores (2015) en preparaciones *flat mount* de epitelio pigmentario y en secciones seriadas de retina. En dicho estudio encontraron un incremento en el número de células microgliales así como en su activación en el epitelio pigmentario y en el espacio subretinal de los ratones mutantes, especialmente en ratones de avanzada edad, sugiriendo la existencia de condiciones proinflamatorias en estas retinas (Aredo et al., 2015). Por su parte, Luhmann y colaboradores encontraron alteraciones degenerativas en las regiones inferiores de las retinas de animales mutantes de dos meses de edad, caracterizadas por la desestructuración de la CNE y una activación de las células de Müller y de los elementos microgliales (Luhmann et al., 2015). Nuestros resultados en el estadio P7 aportan información novedosa en relación al papel de este tipo celular en un estadio temprano, poniendo de manifiesto que en el modelo *Crbl^{rd8}* la presencia de células microgliales aisladas en capas más externas de la retina, parece indicar su asociación a la desestructuración que se correspondería con los primeros signos de formación de rosetas de fotorreceptores. No obstante, la cuantificación de la población microglial en estas edades no mostró diferencias significativas en el número de estos elementos a lo largo de la retina. Estos resultados parecen sugerir que en el estadio P7, las alteraciones observadas en las retinas mutantes son lesiones muy concretas, focalizadas y que únicamente condicionan a un reducido número microglial pero que, en ningún caso, provoca un incremento significativo de su población en la retina, al menos en esta edad.

La relación existente entre las células microgliales y la vasculatura ha sido previamente analizada, y se ha postulado que la microglía es capaz de modular el desarrollo vascular durante la primera semana de desarrollo, motivo por el que en el presente trabajo se cuantificó el número de células microgliales positivas para IBA-1 en preparaciones whole-mount en el estadio P7, para investigar si este tipo celular podría estar influyendo en las alteraciones vasculares observadas en nuestro modelo. Estudios previos han determinado que ante una delección específica de los elementos microgliales, se produce una disminución en la densidad vascular (Checchin et al.,

2006) o que, en el modelo *Csfi op/op*, que carece de una población microglial inicial, se produce una reducción en las ramificaciones del plexo vascular superficial (Kubota et al., 2009). Además, determinadas células microgliales se disponen entre células endoteliales vecinas, actuando como elementos puente que promueven la anastomosis de los capilares (Outtz et al., 2011). Sin embargo, los datos obtenidos de la cuantificación microglial en el modelo mutante para CRB1 a P7 mostraron que no había diferencias significativas en el número de células microgliales en comparación con el control en ninguna de las áreas retinianas analizadas. De esta forma, y al menos en base a estos datos, este tipo celular no parece ser el principal determinante de las alteraciones angiogénicas observadas en el estadio P7 del modelo *Crbr^{rd8}*.

El incremento en el número de células microgliales observado a P21 en las retinas mutantes sugiere que el avance de la severidad de la lesión retiniana a lo largo del tiempo promueve la proliferación de las células microgliales en comparación con el estadio más temprano. La apariencia redondeada de las células microgliales en las rosetas es la típica del fenotipo ameboide y fagocítico. Además, los elementos microgliales asociados a estas rosetas muestran una disposición vertical en la CNE, próximos a las prolongaciones gliales de las células de Müller, positivas para GFAP, que podría reflejar un proceso de migración a lo largo de la glía radial. En un modelo experimental de desprendimiento de retina (Nakazawa et al., 2007) y en la degeneración inducida por luz (Rutar et al., 2011), se ha descrito que las células de Müller pueden promover la migración de elementos microgliales a los focos de lesión mediante la liberación de proteínas quimioatrayentes. Por todo ello, puede sugerirse que, por un lado, ante el incremento en el número y severidad de las lesiones retinianas, las células de Müller muestran en este estadio un papel relacionado con la migración y la localización de las células microgliales en las rosetas degenerativas; y por el otro, ya que se ha descrito previamente como las rosetas cursan con la apoptosis de fotorreceptores en el modelo *Crbr^{rd8}* (Luhmann et al., 2015), la liberación de más factores apoptóticos podría ser responsable de atraer a más células de microglía.

Por último, el incremento en la expresión de la proteína CD11B en las retinas mutantes para CRB1 y la presencia de células de microglía que coexpresan IBA-1 y CD-68 a P90, el estadio más tardío estudiado, sugiere una correlación entre el avance de los mecanismos degenerativos en la retina con una activación progresiva de las células microgliales. La presencia de microglía positiva para IBA-1 y CD68 en la CNE, independientemente de la presencia de rosetas o de una desestructuración clara de la

laminación retiniana, podría ser debido a una alteración homeostática local que comprometa la correcta viabilidad de los fotorreceptores, que provocaría la migración de elementos fagocíticos hacia esas áreas.

LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN EL MODELO MUTANTE

El correcto transporte del flujo de agua en la retina depende, en gran medida, de la correcta actuación del transportador específico acuaporina-4, que en la retina se expresa en los astrocitos y las células de Müller (Nagelhus et al., 1998), y este transporte ayuda a mantener una correcta homeostasis de agua e iones en los espacios extra e intracelulares (Kida et al., 2017; Nagelhus et al., 1998). En algunos modelos de degeneración retiniana se ha descrito que se producen alteraciones en la expresión y funciones de este transportador (Lassiale et al., 2016; Vogler et al., 2013), que provocan alteraciones en la homeostasis retiniana, pero se desconoce si en modelos mutantes para proteínas de polaridad celular, que son cruciales para controlar el mantenimiento de la disposición espacial de las proteínas de membrana en general, hay también modificaciones de estos canales. Se ha propuesto que el patrón de expresión de acuaporina-4 en condiciones normales, principalmente aquel asociado a las zonas más internas de la retina, es debido a que las células de Müller regulan los flujos de agua e iones dirigiéndolos prioritariamente, y de manera polarizada, en dirección al cuerpo vítreo (Hamann et al., 1998; Nagelhus et al., 1998).

En diversos modelos que cursan con degeneración retiniana la expresión de acuaporina-4 está alterada y se ha comprobado que se dispone en capas más esclerales de la retina, que además va acompañada de una mayor expresión del marcador clásico de gliosis, GFAP. Esto ocurre por ejemplo, en el caso de la rata transgénica CMV-PKD₂(1/703)HA, que presenta una mutación de la proteína policistina-2, expresada en fotorreceptores, y que condiciona la supervivencia de éstos (Vogler et al., 2013); en el modelo de retinopatía inducido tras el tratamiento con luz azul en rata (Iandiev et al., 2008); o en un modelo de retinopatía diabética, donde, de manera adicional, la sobreexpresión de acuaporina-4 va acompañada de una mayor expresión de VEGF y de óxido nítrico (Kida et al., 2017). Para estos autores, esto supone una respuesta de las células de Müller frente a los mecanismos apoptóticos que sufren los fotorreceptores, cuando se produce una mayor liberación de agua al descender el volumen celular de éstos, o frente la aparición de edema local (Vogler et al., 2013; Iandiev et al., 2008).

Los resultados obtenidos en el presente estudio en el mutante para CRB1 muestran que hay una mayor intensidad generalizada en el marcaje para esta proteína, especialmente en la CNE, en comparación con las retinas silvestres, incluso en aquellas zonas de la retina en las que no se aprecia una evidente degeneración. Sin embargo, este incremento es más evidente en áreas en degeneración, donde encontramos procesos celulares con gliosis que también expresan la proteína GFAP, rodeando las rosetas de fotorreceptores, que, tal y como se ha descrito en otros modelos animales, sugiere una posible relación entre los mecanismos de gliosis y el transporte de los flujos de agua. Es importante destacar que en animales mutantes para acuaporina-4, en los que esta proteína carece de función, tras ser inducidos a condiciones de glaucoma (Luo et al., 2016) o de isquemia (Da y Verkman, 2004), las lesiones retinianas eran menores que en su contrapartida silvestre, lo que sugiere que, frente a condiciones lesivas, la expresión de la acuaporina-4 podría estar induciendo un mayor daño en la retina. Por todo ello, una mayor expresión de esta proteína en las prolongaciones más esclerales, y sobre la CNE, pone de manifiesto la existencia de posibles alteraciones en el correcto transporte de los flujos de agua en el modelo mutante *Crbr^{rd8}*, que podría ser debido a la pérdida de polaridad de la glía radial, que condicionaría la integridad de la CNE. La presencia de procesos de células de Müller positivos para GFAP rodeando las rosetas en la CNE en nuestro modelo y su colocalización con acuaporina-4, reflejaría la respuesta de las células de Müller ante los procesos apoptóticos. Aunque no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de acuaporina-4 mediante western-blot, se ha encontrado que estos niveles aumentan con la edad del animal, reflejando un posible aumento en la expresión de este transportador sobre todo, y de forma más notable, en las zonas de la retina más afectadas por la lesión.

En relación con los transportadores de membrana plasmática, también hemos encontrado alteraciones en la expresión del transportador de iones de potasio, Kir 4.1, una proteína homeostática propia de las células de Müller (Lassiale et al., 2016; Lin et al., 2018) en algunas de las células del modelo *Crbr^{rd8}*. En el mutante se observó un incremento en la expresión de estos canales en las prolongaciones que atraviesan las capas de la retina y que conformarán la MLE y la MLI, en determinadas zonas de la retina, en comparación con las retinas control. No existe un claro consenso respecto a cómo y a qué se deben los cambios en la expresión del transportador Kir 4.1 ante mecanismos degenerativos de la retina, aunque parecen estar asociados a la velocidad de degeneración de la retina. De este modo, el modelo *rds* se caracteriza por una

degeneración retiniana lenta, y si bien las células de Müller presentan una mayor expresión de GFAP desde el estadio P14, no existen cambios en la marcaje del transportador Kir 4.1 a lo largo de los procesos degenerativos (**Iandiev et al., 2005**), similar a lo que ocurre en el modelo de rata RCS (**Lassiale et al., 2016**). Por el contrario, frente a la inducción de isquemia (**Iandiev et al., 2006**) o diabetes (**Pannicke et al., 2006**) las células de Müller disminuyen la expresión de este canal, lo que podría conducir a un incremento del potasio extracelular y el posterior descenso en el transporte de glutamato, glucosa o agua (**Belecky-Adams et al., 2013**). La localización de acuaporina-4 y Kir 4.1 en condiciones normales en retina silvestres, es mayoritaria, al menos, en los pies de las células de Müller, en las capas más vitreales (**Bringmann et al., 2006; Nagelhus et al., 1999**), ya que en condiciones normales, la acción conjunta de ambos transportadores permite regular los niveles de potasio extracelular elevado, dirigiéndolos a zonas de menor concentración, como el vítreo o los vasos sanguíneos, ayudándose de los flujos de agua (**Kofuji y Newman, 2004**). La expresión que observamos en las retinas del modelo *Crbr^{rd8}* desde el estadio P21 para las proteínas Kir 4.1 y acuaporina-4, sin embargo, contrasta con la descripción anterior. La presencia de marcaje para el canal de potasio en la CNE, incluso en condiciones en las que la estructura retiniana no parece estar gravemente afectada, parece sugerir una alteración en la regulación de la polaridad, que podría desembocar en alteraciones homeostáticas locales que potencien los mecanismos lesivos retinianos.

Los canales Kir 4.1 no son los únicos responsables de mantener la correcta homeostasis del potasio, pues la bomba Na^+/K^+ -ATPasa también contribuye a ello (**Reichenbach et al., 1993**). Ya que las células de Müller regulan la actividad de la bomba en función de las demandas locales de la toma de potasio, y junto con los canales Kir, pueden redirigir el exceso de potasio extracelular en la retina (**Tsacopoulos y Magistretti, 1996**). El incremento observado de manera adicional, especialmente en el estadio más tardío analizado, para la subunidad catalítica alfa-1 de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa parece sugerir una alteración en el equilibrio iónico en nuestro modelo de estudio, que se acentúa en áreas con rosetas de fotorreceptores. La actividad constante de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, introduciendo 2 iones de potasio al interior celular y expulsando 3 iones de sodio, es un requisito para el correcto mantenimiento del potencial de membrana (**Larsen et al., 2016**). Hasta qué punto las células de Müller pueden ver condicionado su potencial de membrana, especialmente teniendo en cuenta las alteraciones descritas, es algo que desconocemos. El análisis de *patch-clamp*

en este tipo de glía radial podrían arrojar información adicional en relación a la regulación iónica en este modelo animal.

Por tanto, los resultados obtenidos en el modelo *Crbl^{rd8}* y lo que se conoce del comportamiento de estos canales en otros modelos patológicos de degeneración de retina parece sugerir que, frente a la mutación de la proteína CRB1, que acarrea la pérdida de polaridad celular, y posiblemente también la deslocalización de estos transportadores debido a esta pérdida de polaridad celular, la correcta regulación de los flujos iónicos y de agua podrían verse afectados, perturbando el equilibrio homeostático y potenciando los mecanismos lesivos que pueden afectar la estructura de la CNE y la viabilidad de los fotorreceptores.

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante del Sistema Nervioso Central, también en la retina (**Meldrum, 2000; Thoreson y Witkovsky, 1999**), especialmente debido a su papel transmisor en los circuitos compuestos por las células fotorreceptoras, células bipolares y las células ganglionares, elementos nerviosos que lo liberan (**Crooks y Kolb, 1992; Finlayson e Iezzi, 2010**). El mantenimiento de los niveles de glutamato extracelular es un requisito indispensable pues, si bien en el interior de neuronas su concentración puede ser alta, fuera de ellas puede conducir a un escenario excitotóxico que comprometa la correcta homeostasis del tejido (**De Hoz et al., 2016; Ishikawa, 2013**). El transportador de glutamato GLAST (EAAT-1) se expresa en las células de Müller (**Barnett y Pow, 2000; Derouiche y Rauen, 1995**), y permite a estas células realizar la captación efectiva del exceso de neurotransmisor que, eventualmente, podría condicionar la correcta función visual. En condiciones normales, GLAST se distribuye de una forma uniforme por las capas plexiformes, la CNI y las prolongaciones de las células de Müller que se extienden por la retina neural (**Harada et al., 1998; Namekata et al., 2009**). Hasta la fecha, no se había descrito si alteraciones en la expresión y/o funciones de las proteínas de polaridad celular pueden estar afectando a la disposición y/o funciones de estos canales transportadores o directamente en el metabolismo glutamatérgico. Debido a que las células gliales del mutante para CRB1 parecen experimentar alteraciones en la distribución de distintos elementos relacionados con sus funciones específicas, nos propusimos investigar esta posibilidad. De hecho, el análisis de las retinas mutantes muestra una disminución en la intensidad del marcaje de esta proteína en las capas plexiformes en comparación con las retinas control. Además, los procesos positivos para GLAST muestran una notable desorganización, especialmente en áreas concretas que presentan más degeneración.

En otros modelos animales de degeneración retiniana también se ha descrito la disminución en la expresión de este transportador específico de las células de Müller. Por ejemplo, aunque la retina del ratón mutante para GLAST no muestra alteraciones anatómicas evidentes, el análisis de sus electroretinogramas evidenciaba cambios en la transmisión sináptica, resultando en una disminución de las ondas-b, correspondiente a la respuesta entre fotorreceptores y bipolares, sugiriendo un papel importante de GLAST en la correcta transmisión de la señal entre ambos tipos celulares (**Harada et al., 1998**). En modelos de glaucoma, la reducción de transportadores glutamatérgicos pertenecientes a elementos neurales (GLT-1) y a la glía radial, como es el caso de GLAST, se traduce en un incremento de los niveles glutamatérgicos extracelulares que condiciona la viabilidad de las células ganglionares (**Harada et al., 2007**). Incluso, en un modelo de retinopatía diabética, el descenso en la expresión de GLAST va acompañado de forma simultánea de la sobreexpresión de proteínas involucradas en la gliosis reactiva típica de las células de Müller, como GFAP y vimentina (**Bringmann et al., 2006**). Ya que en la presente tesis doctoral hemos descrito que desde el estadio P21 se produce un incremento en la expresión de GFAP, así como un descenso en la intensidad para GLAST, parece ser que se está produciendo un estado de gliosis en la glía radial que podría estar condicionando su función homeostática.

Debido a que una disfunción de la acción transportadora glutamatérgica conduce a alteraciones en la recaptación del glutamato, nuestros resultados sugieren que la disminución en la expresión de este transportador en el modelo *Crbr^{rd8}*, al menos en las áreas donde las lesiones son más evidentes, podría estar potenciando los procesos degenerativos que suceden tras la pérdida de los mecanismos de polaridad y adhesión como consecuencia de la mutación de CRB1 en este tipo celular concreto. No obstante, otra hipótesis a explorar y sin investigar aún es que, una menor disponibilidad glutamatérgica como consecuencia de la progresiva pérdida de fotorreceptores pudiera condicionar una menor expresión de GLAST en las células de Müller.

Otra de las proteínas clave para el correcto funcionamiento de las células de Müller es la glutamina sintetasa, pues ésta lleva a cabo de forma continuada la transformación del glutamato, previamente captado por el transportador GLAST, a glutamina que, eventualmente, será liberado y tomado en forma de precursor para la síntesis de neurotransmisores como el GABA y el glutamato por las neuronas; esto da lugar al ciclo de glutamato-glutamina (**Bringmann et al., 2013**). Esta proteína se extiende a lo largo de todos los procesos de la glía radial, abarcando toda la extensión de la retina. En las

retinas mutantes para CRB1 se observaron pequeñas modificaciones, ya que aunque la distribución de la proteína fue muy similar, sí se detectó una ligera disminución en el marcaje de los somas de las células de Müller en la CNI en el estadio de P90 y desorganización puntual del marcaje en sus prolongaciones en la CNE, y menos definición de los procesos localizados a lo largo de la CPI.

La expresión de la enzima glutamina sintetasa está alterada en determinados modelos de retinopatía. De hecho, se ha visto que la mutación espontánea de *Crb1* en las ratas BN-J provoca alteraciones en las células de Müller, que además de presentar una mayor inmunorreactividad para la proteína GFAP, también experimentan un descenso en la expresión de glutamina sintetasa (Zhao M et al., 2015), parecido a lo que hemos descrito en el modelo *Crb1^{rd8}*. En ratas RCS, que presentan una pérdida progresiva de sus bastones (Härtig et al., 1995), las células de Müller también presentan menor intensidad para el marcaje de esta proteína y sus prolongaciones tienen una morfología irregular, que los autores relacionan con la pérdida de células en la CNE de estos animales y una menor disponibilidad glutamatérgica. Del mismo modo, ante mecanismos lesivos inducidos por la aplicación de luz, se producía la disminución de la expresión de esta enzima, que iba acompañada de la muerte progresiva de bastones (Grosche et al., 1995). En ambos modelos destaca una sobreexpresión de GFAP, indicando mecanismos de gliosis reactiva. También, la inducción experimental de la sobreexpresión de glutamina sintetasa tras provocar trauma mecánico e isquemia en retinas de pollo condujo a un descenso en la muerte neuronal, sugiriendo un papel neuroprotector de esta enzima frente a condiciones lesivas (Gorovits et al., 1997).

En nuestro modelo experimental, si bien la disminución en el marcaje de los somas de las células de Müller en el mutante podría ser debido a una menor expresión de la enzima debido a la desestabilización metabólica de las propias células, pudiendo provocar por tanto unas condiciones más tóxicas en las retinas del modelo *Crb1^{rd8}*, no es posible concluir si por el contrario, la disminución en su actividad se debe a una menor disponibilidad glutamatérgica en el tejido. Por lo tanto, serían necesarios experimentos adicionales para aclarar estas hipótesis.

Los resultados obtenidos hasta la fecha, tanto en esta tesis doctoral como por otros grupos, ponen de manifiesto que la pérdida de polaridad celular debido a alteraciones en la expresión de CRB1 parece estar regulando no solo la estabilidad de las uniones celulares, como ya se había descrito en trabajos iniciales con modelos experimentales

con mutaciones en estas proteínas (**Mehalow et al., 2003; van de Pavert, 2007a**), sino también en las funciones esenciales de las células de Müller que tienen que ver con la presencia, expresión localizada y/o participación de proteínas de membrana. Es en la necesidad de conocer cuáles son los mecanismos reguladores y qué vías de regulación están implicadas en este proceso donde se han puesto los esfuerzos en los últimos años.

En este sentido se ha comprobado que en *Drosophila*, la proteína *crumbs* actúa como un regulador de la ruta de señalización Hippo; gracias a su motivo de unión FBM, localizado en el dominio intracelular, se produce la interacción con la proteína reguladora Expanded (Ex), que se encarga de regular la actividad de quinasas y del activador transcripcional Yorkie (Yki), el análogo de YAP en *Drosophila* (**Robinson et al., 2010**). Del mismo modo, alteraciones en el gen *crumbs* en este organismo pueden condicionar esta ruta de señalización, ya que una deficiencia en *crumbs*, por ejemplo, provoca la desregulación de la ruta, cursando con un incremento en el tamaño de sus ojos y alas a través de la mayor localización de Yki en el núcleo (**Ling et al., 2010**). El déficit de las proteínas CRB3 y PALS1 en células epiteliales causa una mayor localización nuclear de YAP en las mismas, así como defectos en la proteína de uniones adherentes α -catenina (**Varelas et al., 2010**). Estos antecedentes son indicativos de la importancia de los contactos celulares, la integridad de las uniones celulares y de los correctos mecanismos de polaridad apico-basal en la regulación de la ruta Hippo. De manera adicional, la delección de YAP en estadios embrionarios en la retina de ratón conduce a la desestabilización de proteínas como pan-Crb, PALS1 o PKC atípica, conduciendo a la formación de rosetas y degeneración retiniana (**Kim et al., 2016**). Destacar, por último, que el modelo de degeneración retiniana *rd10* presenta sobre-expresión de YAP y de su co-factor de transcripción TEAD en las células de Müller, así como una mayor expresión de sus genes diana *Ctgf* y *Cyr61*, a lo largo de los procesos degenerativos de estas retinas (**Hamon et al., 2017**). En el presente trabajo, el análisis de la localización de la proteína YAP en la retina neural puso de manifiesto su presencia en las células de Müller, predominantemente en los núcleos ubicados en la CNI. Sin embargo, en el modelo mutante, esta distribución estaba claramente alterada, ya que en las áreas con evidentes signos de degeneración, se aprecia una mayor expresión de la proteína en las prolongaciones de las células de Müller, tanto las que se dirigen a las capas internas como a las externas, y están especialmente asociadas a las rosetas de fotorreceptores. Estos resultados sugieren, junto a los datos aportados por otros grupos sobre la relación entre el complejo de polaridad apical Crb y la ruta Hippo que, ante la disfunción de la

proteína CRB₁, que acarrea una pérdida de polaridad y de uniones de la MLE en determinadas áreas retinianas en el modelo *Crbr^{rd8}*, se condiciona la correcta regulación de la ruta de señalización Hippo, que se ve reflejado en un aumento de YAP y su forma fosforilada a lo largo de la extensión de la glía radial, al menos, en aquellas áreas más afectadas por la degeneración, alteraciones que parecen estar acentuadas ante la presencia de fotorreceptores en degeneración. Sin embargo, para comprobar todas estas hipótesis es necesario realizar experimentos que permitan analizar el comportamiento e interacciones de otros miembros de esta ruta, como el co-factor TAZ, así como análisis génicos y de expresión proteica.

ESTADO DE LA RETINA NEURAL EN EL MODELO MUTANTE

Otra de las hipótesis que se han explorado es que las alteraciones en las células de Müller por la mutación de CRB₁ en los animales mutantes para *Crbr^{rd8}* no solo afecten a las uniones con los fotorreceptores a nivel estructural, sino que también se produzcan alteraciones en la distribución y funciones de los canales necesarios para el correcto desempeño de las células de Müller y que por tanto, podrían estar afectando al funcionamiento intrínseco de los fotorreceptores. Al fin y al cabo, parece factible que desregulaciones de alguno de estos canales puedan contribuir a modificaciones dentro de la retina. Por un lado, en el presente trabajo, y en relación a las células fotorreceptoras, hemos detectado que en las áreas que presentan claros signos de degeneración se produce una aparente disminución en el número de segmentos de fotorreceptores, que se observa al marcarlos con PNA o, de manera novedosa, con la forma fosforilada de la proteína YAP, FosfoYap, desde el estadio intermedio analizado, lo cual parece estar reflejando cómo, ante las disfunciones de la glía radial, la desregulación homeostática focal por un lado, y la pérdida de polaridad y de uniones, por el otro, comprometería la viabilidad de estas células. Por otro lado, y en relación más concretamente con el funcionamiento de los fotorreceptores, ya en el estadio intermedio analizado, se detectó una disminución notable en el marcaje para bassoon (una proteína importante para la transmisión sináptica de este tipo celular), en la CPE, donde los fotorreceptores hacen sinapsis con horizontales y células bipolares. Esta disminución de marcaje es más evidente en áreas con rosetas de fotorreceptores, y el descenso es más acusado en las retinas del estadio más tardío analizado. La reducción de proteínas relacionadas con las sinapsis en la CPE, entre los que se incluyen

sinaptofisina, bassoon o el receptor glutamatérgico mGluR6 se ha descrito en modelos degenerativos como los ratones *rdi* (Dagar et al., 2014) y *rd10* (Gargini et al., 2007), o las ratas transgénicas *P23H* (Lu et al., 2013) y RCS (He et al., 2019), los cuales, si bien son modelos de degeneración rápida, a diferencia del modelo *Crbr^{rd8}*, este análisis permite determinar que se está produciendo una pérdida progresiva de los fotorreceptores que compromete el establecimiento de las sinapsis. Es posible que el descenso en la expresión de bassoon en la CPE en el estadio intermedio degenerativo de *Crbr^{rd8}*, estrechamente vinculado a las rosetas, sea indicativo de una pérdida local de los fotorreceptores debido al deterioro que se produce en esas zonas, mientras que la disminución más generalizada de marcaje en el estadio más tardío analizado en el modelo *Crbr^{rd8}* podría ser reflejo de la progresión de los eventos degenerativos que se extienden por toda la retina. Sin embargo, en la literatura no se han descrito alteraciones en los registros celulares medidos mediante electroretinogramas, ni en el modelo de estudio empleado en esta tesis doctoral (Aleman et al., 2011), ni el *knock-out* para CRB1 (van de Pavert et al., 2004), sugiriendo que la función celular de las zonas retinianas no afectadas por la degeneración podrían compensar la respuesta visual.

El trastorno que se produce en la transmisión sináptica de los fotorreceptores, aunque sea puntual y su pérdida sea gradual, podría afectar al correcto funcionamiento de las células receptoras de esta información, como las células bipolares de bastón. Ya que sus terminales dendríticos establecen sinapsis con las esférulas de los bastones en la CPE, y éstos parecen verse comprometidos en los procesos degenerativos, se analizaron algunos de los componentes funcionales de este tipo celular. En el modelo mutante *Crbr^{rd8}* se encontraron alteraciones evidentes en los penachos dendríticos de este tipo celular en ambos estadios analizados, que consistieron en expansiones dendríticas más allá de la CPE, pudiendo alcanzar la CNE. Se ha descrito que, frente a mecanismos degenerativos en diversos modelos animales, se produce la alteración de las células bipolares, como en el modelo de degeneración rápida *rd10*, donde ya a partir del estadio P25 se produce la reducción en el número de terminales dendríticos en la CPE, llegando a retraerse por completo con el paso del tiempo (Gargini et al., 2007); procesos que suceden de forma similar en el modelo *rdi* (Strettoi et al., 2003) o en la rata *P23H* (Cuenca et al., 2014). Del mismo modo, alteraciones en la retina tras la aplicación de láser simulando mecanismos de hipertensión ocular provocaba la expansión de dendritas de células bipolares en la CNE (Cuenca et al., 2010), en retinas

de ratones silvestres de edades avanzadas (Liets et al., 2006), en humanos que presentan Retinosis Pigmentaria (Li et al., 1995) o, más notablemente, en el ratón knockout para la proteína bassoon (Dick et al., 2003), resultados que concuerdan con lo observado en nuestro modelo. Esto puede ser indicativo de cómo la disfunción en la transmisión sináptica, como consecuencia de la pérdida de fotorreceptores en el modelo *Crbr^{rd8}*, esté promoviendo una expansión dendrítica de las células bipolares para intentar contactar con los fotorreceptores que todavía persisten.

Por último, hemos querido comparar el estado de las células ganglionares en estas dos edades mediante el uso del factor de transcripción Islet-1, que tiñe tanto la mayoría de este tipo celular como células amacrinas y bipolares (Fischer et al., 2002). Se ha descrito la pérdida de las células ganglionares en algunos modelos de degeneración, como las ratas P23H (García-Ayuso et al., 2010) o las RCS (Villegas-Pérez et al., 1998), aunque estos estudios ponen de manifiesto la muerte de estas células en etapas tardías, a partir de los 6 meses de edad, como consecuencia del bloqueo de sus axones por vasos sanguíneos desplazados. Por el contrario, modelos de degeneración rápida como el ratón *rd1* (Lin y Peng, 2013) y *rd10* (Mazzoni et al., 2008), o degeneración lenta como el ratón *pcd/pcd* (Marchena et al., 2011) no presentan la pérdida de estas células concretas a lo largo de las etapas estudiadas. Si bien no hemos realizado cuantificaciones sobre las células ganglionares en la presente tesis doctoral, de manera cualitativa no parece apreciarse una alteración evidente de este tipo celular en el modelo mutante *Crbr^{rd8}*, contrastando con lo observado para los fotorreceptores y las células bipolares de bastón en los estadios P21 y P90, lo cual sugiere que la mutación en el gen *Crbr1* parece afectar, al menos en las edades analizadas, a los elementos neurales más externos.

LAS CÉLULAS DE MÜLLER EN CULTIVO

Las células de Müller son capaces de establecer uniones, por un lado, con los fotorreceptores, y por el otro, con las células de Müller vecinas (Fernández-Sánchez et al., 2015; Kolb et al., 2000). Estas interacciones, mediadas por uniones adherentes en la MLE, pueden verse comprometidas ante la pérdida de componentes de los complejos de polaridad (van de Pavert et al., 2004). Tal y como se ha descrito en este trabajo, la mutación en la proteína CRB1 parece alterar, de manera adicional, la expresión de proteínas importantes para el control homeostático propio de las células

de Müller que afectan directamente a la estructura del tejido *in vivo*. Nuestros experimentos en cultivos de células de Müller han ido destinados a analizar la posible alteración de estos procesos ante la mutación en CRB₁, sin la influencia de otros tipos celulares.

Los cultivos primarios de células de Müller obtenidas de animales mutantes para CRB₁ permitieron evidenciar que, a pesar de que las uniones intercelulares mostraron alteraciones evidentes, ya que estaban desorganizadas y con claras discontinuidades por toda la periferia celular, la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en estos cultivos, que proporciona el valor de la fortaleza de estas uniones, no mostró diferencias significativas con los cultivos control, aunque sí se encontró una tendencia a la baja, sobre todo en los cultivos más tardíos (DIC 21).

Los marcadores de proteínas de uniones intercelulares que han sido empleados para analizar el estado de estas uniones en los cultivos primarios de células de Müller, como betacatenina, catenina p-120 y ZO-1, han sido previamente utilizados en distintos trabajos para analizar la integridad de la MLE en distintos modelos animales (Campbell et al., 2007; Hippert et al., 2015; Jimeno et al., 2016). La información obtenida a partir de los experimentos en cultivos primarios en la presente tesis doctoral permite confirmar que la mutación en CRB₁ en las células de Müller produce una limitación a la hora de mantener la integridad de determinadas uniones adherentes entre ellas, incluso en ausencia de los fotorreceptores. Sin embargo, es posible encontrar algunas uniones correctamente establecidas entre células de Müller mutantes, y esta observación es similar a lo que ocurre en las retinas *in vivo* del modelo *Crb1^{rd8}*, donde esta pérdida de uniones entre fotorreceptores y células de Müller en la RSA y la MLE es parcheada.

Una de las funciones clave que ejerce la proteína CRB₁ en la retina es la del mantenimiento, que no el establecimiento, de las uniones celulares (van de Pavert et al., 2004). El incremento en los valores de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) que se ha registrado en los cultivos de células de Müller a lo largo de los días analizados (DIC 7, DIC 14 y DIC 21) tanto en células silvestres como en células mutantes permite determinar que se están desarrollando uniones celulares eficientes. El hecho de no encontrar diferencias significativas entre las medidas de las células silvestres y mutantes para CRB₁ y que la pérdida de uniones celulares en los cultivos del genotipo mutante no sea generalizada podría ser porque, por una parte, este modelo presenta

una mutación espontánea que no supone una pérdida total de función y no todas las células mutantes en cultivo podrían verse comprometidas del mismo modo por esta mutación; y por la otra, por los estadios en los que hemos realizado los registros y los análisis por inmunofluorescencia de la distribución de proteínas de uniones celulares. Estos análisis en células mutantes en periodos más tardíos a los estudiados podría confirmar si efectivamente existe una disminución en la resistencia eléctrica a largo plazo y una pérdida de uniones debido a que, como se ha mencionado anteriormente, la función de la proteína CRB1 está más relacionada con el mantenimiento de las uniones, y no tanto con su establecimiento (**van de Pavert et al., 2004**). Las uniones celulares de cultivos a más largo plazo podrían necesitar reemplazamiento de sus componentes, por lo que podrían verse debilitadas con el tiempo si este mecanismo está comprometido por la mutación de CRB1.

La mayor parte de los estudios realizados con el objetivo de conocer la expresión y localización de los miembros del complejo Crb *in vitro* han sido realizados sobre líneas celulares con características epiteliales, como las líneas celulares MDCK, que procede del epitelio renal canino, o CaCo2, procedente de adenocarcinoma de colon humano, y que son capaces de presentar uniones ocluyentes y un alto grado de polaridad apicobasal (**Lemmers et al., 2004; Wang et al., 2007**). En este tipo de cultivos celulares, las proteínas PALS1 y PATJ se encuentran asociadas a las uniones ocluyentes (**Straight et al., 2004**). Por el contrario, no hay trabajos que analicen la expresión de los componentes del complejo Crb en cultivos de células de Müller. Dado que, adicionalmente, en las retinas del modelo mutante *Crb1^{rd8}* ya desde el estadio P7 se ha comprobado que la disfunción en la proteína CRB1 parecía provocar la deslocalización de otros miembros del complejo Crb, como CRB2 o PALS1 (**Figura R1**), era relevante realizar un análisis de estos componentes del complejo en las células de Müller procedentes de retinas silvestre y mutante para CRB1.

En la retina *in vivo*, los complejos de polaridad apical (Crb y Par) y basal (Scribble) se localizan en la región subapical de la MLE, en contacto con los segmentos de los fotorreceptores (**Gosens et al., 2008; Kim et al., 2015; van Rossum et al., 2006**), donde las proteínas CRB2, PALS1 y PATJ pueden expresarse tanto en células de Müller como en fotorreceptores (**Quinn et al., 2017; van Rossum et al., 2006**). En los cultivos realizados en el presente trabajo se ha mostrado que la distribución de proteínas del complejo Crb como CRB2, PALS1 o PATJ es menos específica o no tan localizada en la membrana celular como el encontrado en las células en tejido *in vivo*, ya que este

marcaje es preferentemente citoplasmático, en las prolongaciones o concentrado en zonas de unión entre las células de Müller silvestres. Este marcaje es más difuso y concentrado en regiones perinucleares en las células mutantes para CRB1, algo especialmente evidente en el estadio más tardío. Es posible que la causa de este marcaje generalizado y menos específico en la membrana celular sea debido a la ausencia de la influencia directa de otros elementos que sí se encuentran presentes en retina, como por ejemplo, los fotorreceptores, lo que podría provocar que las células gliales no posean una naturaleza polarizada como ocurre en el tejido *in vivo*. Del mismo modo, éste podría ser el motivo por el que no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión proteica de ninguno de estos marcadores medidos mediante western-blot, a pesar de que sí se encontró diferencia para al menos los niveles de CRB2 en las retinas P90 del modelo mutante *Crb1^{rd8}*, aumento que podría ser debido a un posible mecanismo compensatorio en respuesta a las condiciones lesivas existentes en el tejido, tal y como ocurre en el cerebro de este modelo experimental (Dolón et al., 2018).

En relación con el análisis de las proteínas características de las funciones homeostáticas de las células de Müller en cultivo, en el presente estudio no hemos encontrado una expresión diferencial en la distribución de estas proteínas entre células de ambos genotipos, ni tampoco diferencias en la expresión proteica en los lisados celulares en ninguno de los estadios analizados. La tinción de acuaporina-4 en el citoplasma de estas células en cultivo se asemeja a lo descrito en retinas de ratón, que coincide con lo descrito en estudios previos (Hu et al., 2014) o en astrocitos de hipocampo (Zhang y Verkman, 2008). La tinción para Glast se corresponde con el marcaje citoplasmático de células de Müller de ratón (Mysona et al., 2009) o rata (Wang et al., 2003), así como para astrocitos procedentes de la corteza cerebral del ratón para el transportador de potasio Kir 4.1 (Kinboshi et al., 2017). Estos resultados parecen sugerir que en las células de Müller en condiciones *in vitro*, los marcadores de homeostasis no parecen presentar alteraciones notables, al menos no de un modo similar a lo que observamos en preparaciones de retina. Por tanto, si en cultivos, la mutación en la proteína CRB1 afecta a las células de Müller, lo hace principalmente comprometiendo la viabilidad de las uniones establecidas entre ellas, semejante a lo observado en tejido en los primeros estadios analizados. La ausencia en estos cultivos, no sólo de otros tipos celulares, sino también de características propias del sistema

fisiológico *in vivo*, como los flujos de agua o el aporte glutamatérgico, podría estar condicionando el desempeño y distribución de estas proteínas.

Por último, en el presente trabajo hemos descrito una evidencia adicional de los efectos que provoca la mutación de CRB₁ sobre las células de Müller aisladas y que está relacionada con la expresión de la proteína YAP, de la ruta de señalización de Hippo, ya que en las células provenientes del genotipo mutante se encontró que de forma significativa había más células de Müller en las que YAP tenía una localización preferentemente nuclear. Por tanto, este efecto está relacionado directamente con la mutación intrínseca de CRB₁ en las células de Müller, ya que no parece ser necesaria que haya una interacción con otros tipos celulares de la retina.

Tal y como se ha mencionado previamente en la presente tesis doctoral, el complejo Crb presenta un papel regulador en diversas rutas de señalización, como la ruta Hippo (**Chen et al., 2010**). En ella, YAP actúa como un activador transcripcional. Se ha descrito que, en el modelo *knockout* condicional para CRB₁ y CRB₂, los niveles proteicos de YAP y su forma fosforilada se encontraban reducidos en estadios embrionarios (E 17.5) y post-natales (P₁), lo cual hacía sugerir el papel de estas proteínas del complejo en la correcta señalización de la ruta Hippo en la retina de estos animales (**Pellissier et al., 2013**). Del mismo modo, este modelo animal presentaba una mayor proliferación de los progenitores retinianos tardíos, entre los que se incluyen las células de Müller (**Pellissier et al., 2013**); un fenómeno que también ha sido descrito en el modelo *knockout* condicional para CRB₂ en el estadio P₃, por lo que las proteínas CRB parecen estar involucradas en el control de la proliferación celular (**Alves et al., 2013**).

Es interesante destacar que la delección génica de la proteína de uniones adherentes alfa-catenina, en queratinocitos provoca la expresión de YAP en el núcleo de manera constitutiva, amén de un incremento en los mecanismos proliferativos de estas células (**Silvis et al., 2011**). De manera relacionada, el silenciamiento de la proteína beta-catenina en cultivos de epitelio de mama humano, MCF10A, conducía del mismo modo a la acumulación nuclear de YAP (**Kim et al., 2011**), lo cual sugiere la importancia de la función de las cateninas y del establecimiento de las uniones adherentes en la regulación de la ruta Hippo.

La mayor translocación nuclear de la proteína YAP en las células de Müller en nuestro modelo de estudio podría ser reflejo de la menor integridad de las uniones adherentes, que se ven condicionadas por la mutación en CRB₁; y ya que la proteína YAP se

encuentra transcripcionalmente activa cuando se localiza en el núcleo, y que es capaz de promover la transcripción de genes que estimulan los mecanismos proliferativos (Meng et al., 2016), nuestros resultados sugieren que, bajo condiciones *in vitro* la mutación en CRB1 que presentan las células de Müller podría estar conduciendo a unos mayores niveles proliferativos de las mismas. Esto reforzaría lo descrito en análisis previos de nuestro laboratorio, donde se evidenciaba un incremento de células positivas para Ki67, marcador de proliferación celular, en los cultivos de células mutadas (Herranz-Martín, 2013).

CONCLUSIONES

1. La mutación en la proteína CRB1 parece desestabilizar el correcto ensamblaje de los complejos de polaridad apical en las células de Müller, condicionando así la integridad de las interacciones con los fotorreceptores en la retina del modelo mutante *Crbr^{rd8}* ya desde un estadio temprano, que se ve reflejado en alteraciones estructurales y funcionales focales de la retina.
2. Además de las alteraciones que se producen en las células de Müller en el modelo mutante *Crbr^{rd8}*, los fotorreceptores y células bipolares ven comprometida su funcionalidad, al menos a partir del estadio intermedio analizado en este trabajo, afectando a su transmisión sináptica, especialmente en las áreas más afectadas por la degeneración.
3. Las modificaciones estructurales y metabólicas que presentan las células de Müller en el modelo mutante *Crbr^{rd8}*, debido a la presencia de la proteína CRB1 truncada, producen alteraciones en la distribución y función de canales y transportadores ligados al correcto mantenimiento de la homeostasis, metabolismo celular y mecanismos de señalización intercelular que podrían ser los responsables de potenciar los daños en la retina que se producen en este modelo de Retinosis Pigmentaria.
4. La población microglial del modelo de Retinosis Pigmentaria *Crbr^{rd8}* parece responder desde estadios tempranos a los primeros signos de degeneración, pero presenta un papel más activo a lo largo de la progresión de las lesiones asociadas a la mutación de CRB1.
5. El incremento en los niveles proteicos de CRB2 y beta-catenina en la retina del modelo mutante *Crbr^{rd8}*, gracias a lo que ya se conoce de las consecuencias de esta reacción en otros tipos celulares, sugiere que en la retina dañada se genera una respuesta por parte de la glía radial como intento de evitar la extensión de la lesión.
6. La mutación en la proteína CRB1 compromete el comportamiento y el funcionamiento de las células de Müller en condiciones *in vitro*, especialmente las funciones relacionadas con el mantenimiento de las uniones adherentes y en la posible regulación de la ruta de señalización Hippo.
7. Las células de Müller del genotipo *Crbr^{rd8}* en cultivo no presentan alteraciones en la distribución y/o funcionamiento de proteínas implicadas en el control de la homeostasis retiniana, poniendo de manifiesto que estos defectos dependen, no solo de la mutación en CRB1, sino también de la influencia de otras células y su interacción con el ambiente de la retina, tanto en condiciones normales como en lesión.

BIBLIOGRAFÍA

- Agte S, Junek S, Matthias S, Ulbricht E, Erdmann I, Wurm A, Schild D, Käs JA, Reichenbach A (2011). Müller glial cell-provided cellular light guidance through the vital guinea-pig retina. *Biophys J*, 101(11):2611-9.
- Aleman TS, Cideciyan AV, Aguirre GK, Huang WC, Mullins CL, Roman AJ, Sumaroka A, Olivares MB, Tsai FF, Schwartz SB, Vandenberghe LH, Limberis MP, Stone EM, Bell P, Wilson JM, Jacobson SG (2011). Human CRB1-associated retinal degeneration: comparison with the rd8 Crb1-mutant mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(9):6898-910.
- Alves CH, Sanz AS, Park B, Pellissier LP, Tanimoto N, Beck SC, Huber G, Murtaza M, Richard F, Sridevi Gurubaran I, Garcia Garrido M, Levelt CN, Rashbass P, Le Bivic A, Seeliger MW, Wijnholds J. (2013). Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene. *Hum Mol Genet*, 22(1):35-50.
- Alves CH, Pellissier LP, Vos RM, Garcia Garrido M, Sothilingam V, Seide C, Beck SC, Klooster J, Furukawa T, Flannery JG, Verhaagen J, Seeliger MW, Wijnholds J. (2014). Targeted ablation of Crb2 in photoreceptor cells induces retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet*, 23(13): 3384-401.
- Anasagasti A, Irigoyen C, Barandika O, López de Munain A, Ruiz-Ederra J (2012). Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa. *Vision Res*, 75:117-29.
- Aredo B, Zhang K, Chen X, Wang CX, Li T, Ufret-Vincenty RL (2015). Differences in the distribution, phenotype and gene expression of subretinal microglia/macrophages in C57BL/6N (Crb1 rd8/rd8) versus C57BL/6J (Crb1 wt/wt) mice. *J Neuroinflammation*, 12:6.
- Arnold T, Betsholtz C (2013). The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell*, 5(1):4.
- Barnett NL, Pow DV (2000). Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(2):585-91.
- Bazellieres E, Assemat E, Arsanto JP, Le Bivic A, Massey-Harroche D (2009). Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci*, 14:2149-69.
- Belecky-Adams L, Chernoff E, Wilson JM, Dharmarajan S (2013). Reactive Muller Glia as Potential Retinal Progenitors. *Neural Stem Cells*, 2013.
- Blank T, Goldmann T, Koch M, Amann L, Schön C, Bonin M, Pang S, Prinz M, Burnet M, Wagner JE, Biel M, Michalakis S (2018). Early Microglia Activation Precedes Photoreceptor Degeneration in a Mouse Model of CNGB1-Linked Retinitis Pigmentosa. *Front Immunol*, 8:1930.
- Bray SJ (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9):678-89. doi:10.1038/nrm2009.
- Bringmann A, Biedermann B, Reichenbach A (1999). Expression of potassium channels during postnatal differentiation of rabbit Müller glial cells. *Eur J Neurosci*, 11(8):2883-96.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*, 25(4):397-424.
- Bringmann A, Wiedemann P (2012). Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*, 227(1):1-19.
- Bringmann A, Grosche A, Pannicke T, Reichenbach A (2013). GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells. *Front Endocrinol*, 4:48.
- Brooks DE, Komáromy AM, Källberg ME (1999). Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Vet Ophthalmol*, 2(1):3-11.
- Bujakowska K, Audo I, Mohand-Saïd S, Lancelot ME, Antonio A, Germain A, Léveillard T, Letexier M, Saraiva JP, Lonjou C, Carpentier W, Sahel JA, Bhattacharya SS, Zeitz C (2012). CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat*, 33(2):306-15.
- Bulgakova NA, Knust E (2009). The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci*, 122(Pt 15):2587-96.
- Bunt-Milam AH, Saari JC, Klock IB, Garwin GG (1985). Zonulae adherentes pore size in the external limiting membrane of the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26(10):1377-80.
- Cabral T, Mello LG, Lima L, Polido J, Regatieri CV, Belfort R, Mahajan VB (2017). Retinal and choroidal angiogenesis: a review of new targets. *Int J Retina Vitreous*, 3: 31.
- Cajal, SR (1893). La rétine des Vertébrés. *Cellule* 9, 17-255.
- Campbell M, Humphries M, Kenna P, Humphries P, Brankin B (2007). Altered expression and interaction of adherens junction proteins in the developing OLM of the Rho(-/-) mouse. *Exp Eye Res*, 85(5):714-20.
- Campochiaro PA, Mir TA (2018). The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*, 62:24-37.
- Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S (2006). Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(8):3595-602.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm*, 10(1):27-39.

- Chen CL, Gajewski KM, Hamaratoglu F, Bossuyt W, Sansores-Garcia L, Tao C, Halder G (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(36):15810-5.
- Cho SH, Kim JY, Simons DL, Song JY, Le JH, Swindell EC, Jamrich M, Wu SM, Kim S. (2012). Genetic ablation of Pals1 in retinal progenitor cells models the retinal pathology of Leber congenital amaurosis. *Hum Mol Genet*, 21(12):2663-76.
- Connaughton V (2005). Glutamate and Glutamate Receptors in the Vertebrate Retina. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1526/>
- Crooks J, Kolb H (1992). Localization of GABA, glycine, glutamate and tyrosine hydroxylase in the human retina. *J Comp Neurol*, 315(3):287-302.
- Cuenca N, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, de la Villa P, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010). Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp Eye Res*, 91(2):273-85.
- Cuenca N, Fernández-Sánchez L, Sauvé Y, Segura FJ, Martínez-Navarrete G, Tamarit JM, Fuentes-Broto L, Sanchez-Cano A, Pinilla I (2014). Correlation between SD-OCT, immunocytochemistry and functional findings in an animal model of retinal degeneration. *Front Neuroanat*, 8: 151.
- Da T, Verkman AS (2004). Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(12):4477-83.
- Dagar S, Nagar S, Goel M, Cherukuri P, Dhingra NK (2014). Loss of photoreceptors results in upregulation of synaptic proteins in bipolar cells and amacrine cells. *PLoS One*, 9(3):e90250.
- Davis DM, Dyer MA (2010). Retinal progenitor cells, differentiation, and barriers to cell cycle reentry. *Curr Top Dev Biol*, 93:175-88.
- de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salazar JJ, Gallego BI, Triviño A, Ramírez JM (2016). Retinal Macrogial Responses in Health and Disease. *Biomed Res Int*, 2016: 2954721.
- den Hollander AI, ten Brink JB, de Kok YJ, van Soest S, van den Born LI, van Driel MA, van de Pol DJ, Payne AM, Bhattacharya SS, Kellner U, Hoyng CB, Westerveld A, Brunner HG, Bleeker-Wagemakers EM, Deutman AF, Heckenlively JR, Cremers FP, Bergen AA (1999). Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat Genet*, 23(2):217-21.
- den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res*, 27(4):391-419.
- Derouiche A, Rauen T (1995). Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res*, 42(1):131-43.
- Dick O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2003). The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron*, 37(5):775-86.
- Djuric I, Siebrasse JP, Schulze U, Granado D, Schlüter MA, Kubitscheck U, Pavenstädt H, Weide T (2016). The C-terminal domain controls the mobility of Crumbs 3 isoforms. *Biochim Biophys Acta*, 1863(6 Pt A):1208-17.
- Dolón JF, Paniagua AE, Valle V, Segurado A, Arévalo R, Velasco A, Lillo C (2018). Expression and localization of the polarity protein CRB2 in adult mouse brain: a comparison with the CRB1^{rd8} mutant mouse model. *Sci Rep*, 8(1):11652.
- Edwards MM, Lefebvre O (2013). Laminins and retinal vascular development. *Cell Adh Migr*, 7(1): 82-89.
- Eastlake K, Banerjee PJ, Angbohang A, Charteris DG, Khaw PT, Limb GA (2016). Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia*, 64(4): 495-506.
- Egensperger R, Maslim J, Bisti S, Holländer H, Stone J (1996). Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). *Brain Res Dev Brain Res*, 97(1):1-8.
- Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T (2014). Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci*, 15(8):507-19.
- Fain G, Sampath AP (2018). Rod and cone interactions in the retina. *Floures*, 7: F1000 Faculty Rev-657.
- Fernández-Sánchez L, Lax P, Campello L, Pinilla I, Cuenca N (2015). Astrocytes and Müller Cell Alterations During Retinal Degeneration in a Transgenic Rat Model of Retinitis Pigmentosa. *Front Cell Neurosci*, 9: 484.
- Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F (2011). Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Curr Genomics*, 12(4): 238-249.
- Finlayson PG, Iezzi R (2010). Glutamate Stimulation of Retinal Ganglion Cells in Normal and S334ter-4 Rat Retinas: A Candidate for a Neurotransmitter-Based Retinal Prosthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(7): 3619-3628.
- Fischer AJ, Dierks BD, Reh TA (2002). Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development*, 129(9):2283-91.

- Fischer F, Martin G, Agostini HT (2011). Activation of retinal microglia rather than microglial cell density correlates with retinal neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J Neuroinflammation*, 8:120.
- Foster KW (2009). Eye evolution: two eyes can be better than one. *Curr Biol*, 19(5):R208-10.
- Fu Y, Yau KW (2007). Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch*, 454(5):805-19.
- Gao FJ, Zhang SH, Li TT, Wu JH, Wu Q (2017). Expression and Distribution of Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor in the Retina and Optic Nerve. *Front Hum Neurosci*, 10:686.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2010). Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res*, 91(6):800-10.
- Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E (2007). Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J Comp Neurol*, 500(2):222-38.
- Gelman R, Stevenson W, Prospero Ponce C, Agarwal D, Christoforidis JB (2015). Retinal Damage Induced by Internal Limiting Membrane Removal. *J Ophthalmol*, 2015:939748.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 161(6):1163-77.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H (2004). Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol*, 469(1):70-82.
- Goldberg AF, Moritz OL, Williams DS (2016). Molecular basis for photoreceptor outer segment architecture. *Prog Retin Eye Res*, 55:52-81.
- Goldman D (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci*, 15(7):431-42.
- Gorovits R, Avidan N, Avisar N, Shaked I, Vardimon L (1997). Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(13):7024-9.
- Gosens I, den Hollander AI, Cremers FP, Roepman R (2008). Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina. *Exp Eye Res*, 86(5):713-26.
- Grosche J, Härtig W, Reichenbach A (1995). Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci Lett*, 185(2):119-22.
- Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 76(4):463-71.
- Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, Nagelhus EA, Ottersen OP, Agre P, Nielsen S (1998). Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *Am J Physiol*, 274(5):C1332-45.
- Hamel C (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*, 1:40.
- Hamon A, Roger JE, Yang XJ, Perron M (2016). Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. *Dev Dyn*, 245(7):727-38.
- Hamon CM, Bitard J, Gieser L, Roger JE, Perron M (2017). Retinal Degeneration Triggers the Activation of YAP/TEAD in Reactive Müller Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58(4):1941-1953.
- Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, Sasaki S, Okuyama S, Watase K, Wada K, Tanaka K (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8):4663-6.
- Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K (2002). Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci*, 22(21):9228-36.
- Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HM, Okumura A, Namekata K, Saeki T, Aihara M, Yoshida H, Mitani A, Tanaka K (2007). The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest*, 117(7):1763-70.
- Härtig W, Grosche J, Distler C, Grimm D, el-Hifnawi E, Reichenbach A (1995). Alterations of Müller (glial) cells in dystrophic retinæ of RCS rats. *J Neurocytol*, 24(7):507-17.
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131(8):1663-77.
- He J, Zhao C, Dai J, Weng CH, Bian BSJ, Gong Y, Ge L, Fang Y, Liu H, Xu H, Yin ZQ (2019). Microglia Mediate Synaptic Material Clearance at the Early Stage of Rats With Retinitis Pigmentosa. *Front Immunol*, 10:912.
- Henderson RH, Mackay DS, Li Z, Moradi P, Sergouniotis P, Russell-Eggitt I, Thompson DA, Robson AG, Holder GE, Webster AR, Moore AT (2011). Phenotypic variability in patients with retinal dystrophies due to mutations in CRB1. *Br J Ophthalmol*, 95(6):811-7.

- Herranz H, Stamatakis E, Feiguin F, Milán M (2006). Self-refinement of Notch activity through the transmembrane protein Crumbs: modulation of gamma-secretase activity. *EMBO Rep*, 7(3):297-302.
- Herranz-Martín S, Jimeno D, Paniagua AE, Velasco A, Lara JM, Aijón J, Lillo C (2012). Immunocytochemical evidence of the localization of the Crumbs homologue 3 protein (CRB3) in the developing and mature mouse retina. *PLoS One*, 7(11):e50511.
- Herranz-Martín S. "Tesis doctoral: Participación de las proteínas CRB y proteínas asociadas en el desarrollo de la retina y en distrofias retinianas". Universidad de Salamanca (2013).
- Hicks D, Courtois Y (1990). The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res*, 51(2):119-29.
- Hippert C, Graca AB, Barber AC, West EL, Smith AJ, Ali RR, Pearson RA (2015). Müller glia activation in response to inherited retinal degeneration is highly varied and disease-specific. *Plos One*, 10(3):e0120415.
- Hu J, Popp R, Frömel T, Ehling M, Awwad K, Adams RH, Hammes H, Fleming I (2014). Müller glia cells regulate Notch signaling and retinal angiogenesis via the generation of 19,20-dihydroxydocosapentaenoic acid. *J Exp Med*, 211(2): 281-295.
- Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG, Margolis B (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol*, 5(2):137-42.
- Iandiev I, Biedermann B, Bringmann A, Reichel MB, Reichenbach A, Pannicke T (2005). Atypical gliosis in Müller cells of the slowly degenerating rds mutant mouse retina. *Exp Eye Res*, 82(3):449-57.
- Iandiev I, Tenckhoff S, Pannicke T, Biedermann B, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A (2006). Differential regulation of Kir4.1 and Kir2.1 expression in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett*, 396(2):97-101.
- Iandiev I, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Grimm C, Remé CE, Reichenbach A, Pannicke T, Bringmann A (2008). Müller cell response to blue light injury of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(8):3559-67.
- Ibrahim AS, El-Remessy AB, Matragoon S, Zhang W, Patel Y, Khan S, Al-Gayyar MM, El-Shishtawy MM, Liou GI (2011). Retinal microglial activation and inflammation induced by amadori-glycated albumin in a rat model of diabetes. *Diabetes*, 60(4):1122-33.
- Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y (1997). Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, K_{AB-2}/Kir4.1, on mammalian retinal Müller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci*, 17(20):7725-35.
- Ishikawa M, Yoshitomi T, Zorumski CF, Izumi Y (2011). Downregulation of Glutamine Synthetase via GLAST Suppression Induces Retinal Axonal Swelling in a Rat Ex Vivo Hydrostatic Pressure Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52(9): 6604-6616.
- Ishikawa M (2013). Abnormalities in Glutamate Metabolism and Excitotoxicity in the Retinal Diseases. *Scientifica (Cairo)*, 2013: 528940.
- Jammalamadaka A, Suwannat P, Fisher SK, Manjunath BS, Höllerer T, Luna G (2015). Characterizing spatial distributions of astrocytes in the mammalian retina. *Bioinformatics*, 31(12):2024-31.
- Jimeno D, Gómez C, Calzada N, de la Villa P, Lillo C, Santos E (2016). RASGRF2 controls nuclear migration in postnatal retinal cone photoreceptors. *J Cell Sci*, 129(4):729-42.
- Jones BW, Pfeiffer RL, Ferrell WD, Watt CB, Marmor M, Marc RE (2016). Retinal remodeling in human retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res*, 150:149-65.
- Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci*, 7: 3. doi: 10.3389/fncel.2013.00003.
- Kida T, Oku H, Horie T, Fukumoto M, Okuda Y, Morishita S, Ikeda T (2017). Implication of VEGF and aquaporin 4 mediating Müller cell swelling to diabetic retinal edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 255(6):1149-1157.
- Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(29):11930-5.
- Kim JY, Song JY, Karnam S, Park JY, Lee JJ, Kim S, Cho SH (2015). Common and distinctive localization patterns of Crumbs polarity complex proteins in the mammalian eye. *Gene Expr Patterns*, 17(1):31-7.
- Kim JY, Park R, Lee JH, Shin J, Nickas J, Kim S, Cho SH (2016). Yap is essential for retinal progenitor cell cycle progression and RPE cell fate acquisition in the developing mouse eye. *Dev Biol*, 419(2): 336-347.
- Kinboshi M, Mukai T, Nagao Y, Matsuba Y, Tsuji Y, Tanaka S, Tokudome K, Shimizu S, Ito H, Ikeda A, Inanobe A, Kurachi Y, Inoue S, Ohno Y (2017). Inhibition of inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels facilitates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in astrocytes. *Front Mol Neurosci* 7:10.408.
- Kolb H (1974). The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat: electron microscopy of Golgi preparations. *J Comp Neurol*, 155(1):1-14.
- Kolb H, Fernández E, Nelson R (2000). Webvision: <http://webvision.med.utah.edu/>.
- Kofuji P, Newman EA (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4):1045-56.

- Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H, Suda T (2009). M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med*, 206(5):1089-102.
- Kumar A, Pandey K, Miller LJ, Singh P, Kanwar M (2013). Müller Glia in Retinal Innate Immunity: A perspective on their roles in endophthalmitis. *Crit Rev Immunol*, 33(2): 119-135.
- Kur J, Newman EA, Chan-Ling T (2012). Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 31(5):377-406.
- Larsen BR, Holm R, Vilsen B, MacAulay N (2016). Glutamate transporter activity promotes enhanced Na⁺ /K⁺ -ATPase-mediated extracellular K⁺ management during neuronal activity. *J Physiol*, 594(22):6627-6641.
- Lassiale S, Valamanesh F, Klein C, Hicks D, Abitbol M, Versaux-Botteri C (2016). Changes in aquaporin-4 and Kir4.1 expression in rats with inherited retinal dystrophy. *Exp Eye Res*, 148:33-44.
- Le YZ (2017). VEGF production and signaling in Müller glia are critical to modulating vascular function and neuronal integrity in diabetic retinopathy and hypoxic retinal vascular diseases. *Vision Res*, 139:108-114.
- Lee S, Varvel NH, Konerth ME, Xu G, Cardona AE, Ransohoff RM, Lamb BT (2010). CX₃CR₁ deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol*, 177(5):2549-62.
- Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, Delgrossi MH, Médina E, Arsanto JP, Le Bivic A (2004). CRB₃ binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 15(3):1324-33.
- Li ZY, Kljavin IJ, Milam AH (1995). Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. *J Neurosci*, 15(8):5429-38.
- Liets LC, Eliasieh K, van der List DA, Chalupa LM (2006). Dendrites of rod bipolar cells sprout in normal aging retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(32):12156-60.
- Liu B, Hunter DJ, Rooker S, Chan A, Paulus YM, Leucht P, Nusse Y, Nomoto H, Helms JA (2013). Wnt signaling promotes Müller cell proliferation and survival after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(1):444-53.
- Lin B, Peng EB (2013). Retinal ganglion cells are resistant to photoreceptor loss in retinal degeneration. *PLoS One*, 8(6):e68084.
- Lin Z, Huang P, Huang S, Guo L, Xu X, Shen X, Xie B, Zhong Y (2018). Effect of Adenosine and Adenosine Receptor Antagonists on Retinal Müller Cell Inwardly Rectifying Potassium Channels under Exogenous Glutamate Stimulation. *Biomed Res Int*, 2018: 2749257.
- Ling C, Zheng Y, Yin F, Yu J, Huang J, Hong Y, Wu S, Pan D (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(23):10532-7.
- Logan CY, Nusse R (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:781-810.
- Lu B, Morgans CW, Girman S, Lund R, Wang S (2013). Retinal morphological and functional changes in an animal model of retinitis pigmentosa. *Vis Neurosci*, 30(3):77-89.
- Luhmann UF, Carvalho LS, Holthaus SM, Cowing JA, Greenaway S, Chu CJ, Herrmann P, Smith AJ, Munro PM, Potter P, Bainbridge JW, Ali RR (2015). The severity of retinal pathology in homozygous *Crb1*^{rd8/rd8} mice is dependent on additional genetic factors. *Hum Mol Genet*, 24(1):128-41.
- Luna G, Lewis GP, Banna CD, Skalli O, Fisher SK (2010). Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Mol Vis*, 16:2511-23.
- Luo S, Ding N, Zou W, Zhang Z, Yuan Z, Wu Z (2016). Ocular aquaporin-4 reverses up-regulation of glial fibrillary acidic protein in mice retina following elevated intraocular pressure. *Int J Clin Exp Pathol*, 9(3):3322-3330.
- Ma W, Zhao L, Wong W (2012). Microglia in the Outer Retina and their Relevance to Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Adv Exp Med Biol*, 723: 37-42.
- Makarova O, Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B (2003). Mammalian Crumbs₃ is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene*, 302(1-2):21-9.
- Marc RE, Sigulinsky CL, Pfeiffer RL, Emrich D, Anderson JR, Jones BW (2018). Heterocellular Coupling Between Amacrine Cells and Ganglion Cells. *Front Neural Circuits*, 12:90.
- Marchena M, Lara J, Aijón J, Germain F, de la Villa P, Velasco A (2011). The retina of the PCD/PCD mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study. *Exp Eye Res*, 93(5):607-17.
- Masland RH (2001). The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*, 4(9):877-86.
- Masland RH (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76(2):266-80.
- Mazzoni F, Novelli E, Strettoi E (2008). Retinal ganglion cells survive and maintain normal dendritic morphology in a mouse model of inherited photoreceptor degeneration. *J Neurosci*, 28(52):14282-92.

- Mehalow AK, Kameya S, Smith RS, Hawes NL, Denegre JM, Young JA, Bechtold L, Haider NB, Tepass U, Heckenlively JR, Chang B, Naggert JK, Nishina PM. (2003). CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Hum Mol Genet*, 12(17), 2179-89.
- Meldrum BS (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, 130(4S Suppl):1007S-15S.
- Meng Z, Moroishi T, Guan KL (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev*, 30(1): 1-17.
- Miller JW, Adamis AP, Aiello LP (1997). Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy.** *Diabetes Metab Rev*, 13(1):37-50.
- Morrow EM, Furukawa T, Cepko CL (1998). Vertebrate photoreceptor cell development and disease. *Trends Cell Biol*, 8(9):353-8.
- Müller H (1851). Zur Histologie der Netzhaut. *Zeitschrift für Wiss Zool* 3:234-237.
- Müller A, Hauk TG, Fischer D (2007). Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation. *Brain*, 130(Pt 12):3308-20.
- Murinello S, Moreno SK, Macauley MS, Sakimoto S, Westenskow PD, Friedlander M (2016). Assessing Retinal Microglial Phagocytic Function In Vivo Using a Flow Cytometry-based Assay. *J Vis Exp*, 18;(116).
- Mustafi D, Engel AH, Palczewski K (2009). Structure of Cone Photoreceptors. *Prog Retin Eye Res*, 28(4): 289-302.
- Mysona B, Dun Y, Duplantier J, Ganapathy V, Smith SB (2009). Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc⁻ in mouse retinal Müller glial cells. *Cell Tissue Res*, 335(3): 477-488.
- Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P, Ottersen OP (1998). Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci*, 18(7):2506-19.
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 26(1):47-54.
- Namekata K, Harada C, Guo X, Kikushima K, Kimura A, Fuse N, Mitamura Y, Kohyama K, Matsumoto Y, Tanaka K, Harada T (2009). Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAC1-deficient mice. *Neurosci Lett*, 465(2):160-4.
- Nakazawa T, Takeda M, Lewis GP, Cho KS, Jiao J, Wilhelmsson U, Fisher SK, Pekny M, Chen DF, Miller JW (2007). Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(6):2760-8.
- Nash BM, Wright DC, Grigg JR, Bennetts B, Jamieson R (2015). Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Transl Pediatr*, 4(2): 139-163.
- Nelson R (2007). Visual Responses of Ganglion Cells
- Noailles A, Fernández-Sánchez L, Lax P, Cuenca N (2014). Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects. *J Neuroinflammation*, 11:186.
- Omri S, Omri B, Savodelli M, Jonet L, Thillaye-Goldenberg B, Thuret G, Gain P, Jeanny JC, Crisanti P, Behar-Cohen F (2010). The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. *Clin Ophthalmol*, 4:183-95.
- O'Sullivan ML, Puñal VM, Kerstein PC, Brzezinski JA, Glaser T, Wright KM, Kay JN (2017). Astrocytes follow ganglion cell axons to establish an angiogenic template during retinal development. *Glia*, 65(10):1697-1716.
- Outtz HH, Tattersall IW, Kofler NM, Steinbach N, Kitajewski J (2011). Notch1 controls macrophage recruitment and Notch signaling is activated at sites of endothelial cell anastomosis during retinal angiogenesis in mice. *Blood*, 118(12):3436-9.
- Paniagua AE, Herranz-Martín S, Jimeno D, Jimeno ÁM, López-Benito S, Carlos Arévalo J, Velasco A, Aijón J, Lillo C (2015). CRB2 completes a fully expressed Crumbs complex in the Retinal Pigment Epithelium. *Sci Rep*, 5:14504.
- Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, vom Hagen F, Reichenbach A, Wiedemann P, Hammes HP, Bringmann A (2006). Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes*, 55(3):633-9.
- Park B, Alves CH, Lundvig DM, Tanimoto N, Beck SC, Huber G, Richard F, Klooster J, Andlauer TF, Swindell EC, Jamrich M, Le Bivic A, Seeliger MW, Wijnholds J (2011). PALS1 is essential for retinal pigment epithelium structure and neural retina stratification. *J Neurosci*, 31(47):17230-41.
- Peichl L, González-Soriano J (1994). Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci*, 11(3):501-17.
- Pellissier LP, Alves CH, Quinn PM, Vos RM, Tanimoto N, Lundvig DM, Dudok JJ, Hooibrink B, Richard F, Beck SC, Huber G, Sothilingam V, Garcia Garrido M, Le Bivic A, Seeliger MW, Wijnholds J. (2013). Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis. *PLoS Genet*, 9(12):e1003976.

- Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME (2008). Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res*, 27(4):331-71.
- Pignatelli V, Strettoi E (2004). Bipolar cells of the mouse retina: a gene gun, morphological study. *J Comp Neurol*, 476(3):254-66.
- Poché RA, Reese BE (2009). Retinal horizontal cells: challenging paradigms of neural development and cancer biology. *Development*, 136(13):2141-51.
- Poitry S, Poitry-Yamate C, Ueberfeld J, MacLeish PR, Tsacopoulos M (2000). Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci*, 20(5):1809-21.
- Provis JM, Diaz CM, Penfold PL (1996). Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol*, 3(3):213-22.
- Quinn PM, Pellissier LP, Wijnholds J. (2017). The CRB1 Complex: Following the Trail of Crumbs to a Feasible Gene Therapy Strategy. *Front Neurosci*, 11:175.
- Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J (1996). Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res*, 36(14):2029-36.
- Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM (2010). Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(11):5690-6.
- Ramírez AI, de Hoz R, Salobarra-García E, Salazar JJ, Rojas B, Ajoy D, López-Cuenca I, Rojas P, Triviño A, Ramírez JM (2017). The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma. *Front Aging Neurosci*, 9: 214.
- Rashid K, Wolf A, Langmann T (2018). Microglia Activation and Immunomodulatory Therapies for Retinal Degenerations. *Front Cell Neurosci*, 12: 176.
- Raza AS, Cho J, de Moraes CG, Wang M, Zhang X, Kardon RH, Liebmann JM, Ritch R, Hood DC (2011). Retinal ganglion cell layer thickness and local visual field sensitivity in glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 129(12):1529-36.
- Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chao TI, Dettmer D, Hertz L (1993). What do retinal müller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *J Chem Neuroanat*, 6(4):201-13.
- Remington LA (2012). *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System*. Elsevier. 3rd Ed. 13: 233-252.
- Richardson EC, Pichaud F (2010). Crumbs is required to achieve proper organ size control during Drosophila head development. *Development*, 137(4):641-50.
- Rieke F (2000). Mechanisms of single-photon detection in rod photoreceptors. *Methods Enzymol*, 316:186-202.
- Río-Hortega P y Penfield, W (1927). Cerebral cicatrix. Reaction of neuroglia and microglia to brain wounds. *Johns Hopkins Hosp. Bul* L41.278-1927.
- Robbins SG, Conaway JR, Ford BL, Roberto KA, Penn JS (1997). Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in vascular and non-vascular cells of the normal and oxygen-injured rat retina. *Growth Factors*, 14(4):229-41.
- Robinson BS, Huang J, Hong Y, Moberg KH (2010). Crumbs acts via the FERM-domain protein Expanded to regulate Salvador/Warts/Hippo signaling in Drosophila. *Curr Biol*, 20(7): 582-590.
- Rocha SF, Lopes SS, Gossler A, Henrique D (2009). Dll1 and Dll4 function sequentially in the retina and pV2 domain of the spinal cord to regulate neurogenesis and create cell diversity. *Dev Biol*, 328(1):54-65.
- Roche SL, Wyse-Jackson AC, Byrne AM, Ruiz-Lopez AM, Cotter TG (2016). Alterations to retinal architecture prior to photoreceptor loss in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Int J Dev Biol*, 60(4-6):127-39.
- Roche SL, Ruiz-Lopez AM, Moloney JN, Byrne AM, Cotter TG (2018). Microglial-induced Müller cell gliosis is attenuated by progesterone in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Glia*, 66(2):295-310.
- Roh MH, Fan S, Liu CJ, Margolis B (2003). The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Sci*, 116(Pt 14):2895-906.
- Roy A, Fung YK, Liu X, Pahan K (2006). Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *J Biol Chem*, 281(21):14971-80.
- Rutar M, Natoli R, Valter K, Provis JM (2011). Early focal expression of the chemokine Ccl2 by Müller cells during exposure to damage-inducing bright continuous light. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(5):2379-88.
- Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen Sand F, Lang R, Uv A, Betsholtz C (2011). A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PLoS One*, 6(1):e15846.
- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martín-Oliva D, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA (2008). Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol*, 506(2):224-39.

- Sarthy VP, Pignataro L, Pannicke T, Weick M, Reichenbach A, Harada T, Tanaka K, Marc R (2005). Glutamate transport by retinal Muller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia*, 49(2):184-96.
- Scott A, Powner MB, Gandhi P, Clarkin C, Gutmann DH, Johnson RS, Ferrara N, Fruttiger M (2010). Astrocyte-derived vascular endothelial growth factor stabilizes vessels in the developing retinal vasculature. *PLoS One*, 5(7):e11863.
- Schneider N, Cordeiro S, Machtens JP, Braams S, Rauen T, Fahlke C (2014). Functional properties of the retinal glutamate transporters GLT-1c and EAAT5. *J Biol Chem*, 289(3):1815-24.
- Shen J, Xiao R, Bair J, Wang F, Vandenberghe LH, Dartt D, Baranov P, Ng YSE (2018). Novel engineered, membrane-localized variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) protect retinal ganglion cells: a proof-of-concept study. *Cell Death Dis*, 9(10):1018.
- Shiells R (1995). Photoreceptor-bipolar cell transmission.
- Silverman SM, Wong WT (2018). Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci*, 4:45-77.
- Silvis MR, Kreger BT, Lien WH, Klezovitch O, Rudakova GM, Camargo FD, Lantz DM, Seykora JT, Vasioukhin V (2011). α -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal*, 4(174):1a33.
- Springer AD, Mednick AS (1986). Simple and complex retinal ganglion cell axonal rearrangements at the optic chiasm. *J Comp Neurol*, 247(2):233-45.
- Stahl A, Connor K, Sapielha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Löfqvist C, Hellström A, Smith L (2010). The Mouse Retina as an Angiogenesis Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(6): 2813-2826.
- Stone J, Dreher Z (1987). Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol*, 255(1):35-49.
- Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci*, 15(7 Pt 1):4738-47.
- Straight SW, Shin K, Fogg VC, Fan S, Liu CJ, Roh M, Margolis B (2004). Loss of PALSi expression leads to tight junction and polarity defects. *Mol Biol Cell*, 15(4):1981-90.
- Strauss O (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85(3):845-81.
- Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, Porciatti V, Falsini B (2003). Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vision Res*, 43(8):867-77.
- Strettoi E, Novelli E, Mazzoni F, Barone I, Damiani D (2010). Complexity of retinal cone bipolar cells. *Prog Retin Eye Res*, 29(4):272-83.
- Stuck MW, Conley SM, Naash M (2012). Defects in the outer limiting membrane are associated with rosette development in the *Nrl*^{-/-} retina. *PLoS One*, 7(3):e32484.
- Su WH, Mruk DD, Wong EW, Lui WY, Cheng CY (2012). Polarity protein complex Scribble/Lgl/Dlg and epithelial cell barriers. *Adv Exp Med Biol*, 763:149-70.
- Tao C, Zhang X (2014). Development of astrocytes in the vertebrate eye. *Dev Dyn*, 243(12):1501-10.
- Tao C, Zhang X (2016). Retinal Proteoglycans Act as Cellular Receptors for Basement Membrane Assembly to Control Astrocyte Migration and Angiogenesis. *Cell Rep*, 17(7):1832-1844.
- Tepass U, Theres C, Knust E (1990). crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*, 61(5):787-99.
- Terakita A (2005). The opsins. *Genome Biol*, (3):213.
- Thompson DA, Gyürüs P, Fleischer LL, Bingham EL, McHenry CL, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Lorenz B, Richards JE, Jacobson SG, Sieving PA, Gal A (2000). Genetics and phenotypes of RPE65 mutations in inherited retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(13):4293-9.
- Thoreson WB, Witkovsky P (1999). Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res*, 18(6):765-810.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*, 16(3):877-85.
- Tuo J, Wang Y, Cheng R, Li Y, Chen M, Qiu F, Qian H, Shen D, Penalva R, Xu H, Ma JX, Chan CC (2015). Wnt signaling in age-related macular degeneration: human macular tissue and mouse model. *J Transl Med*, 13:330.
- Uemura A, Kusuhara S, Katsuta H, Nishikawa S (2006). Angiogenesis in the mouse retina: a model system for experimental manipulation. *Exp Cell Res*, 312(5):676-83.
- van den Hurk JA, Rashbass P, Roepman R, Davis J, Voesenek KE, Arends ML, Zonneveld MN, van Roekel MH, Cameron K, Rohrschneider K, Heckenlively JR, Koenekoop RK, Hoyng CB, Cremers FP, den Hollander AI (2005).

- Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Mol Vis*, 11:263-73.
- van de Pavert SA, Kantardzhieva A, Malysheva A, Meuleman J, Versteeg I, Levelt C, Klooster J, Geiger S, Seeliger MW, Rashbass P, Le Bivic A, Wijnholds J (2004). Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci*, 117(Pt 18):4169-77.
- van de Pavert SA, Sanz AS, Aartsen WM, Vos RM, Versteeg I, Beck SC, Klooster J, Seeliger MW, Wijnholds J (2007a). Crb1 is a determinant of retinal apical Müller glia cell features. *Glia*, 55(14):1486-97.
- van de Pavert SA, Meuleman J, Malysheva A, Aartsen WM, Versteeg I, Tonagel F, Kamphuis W, McCabe CJ, Seeliger MW, Wijnholds J (2007b). A single amino acid substitution (Cys249Trp) in Crb1 causes retinal degeneration and deregulates expression of pituitary tumor transforming gene Pttg1. *J Neurosci*, 27(3):564-73.
- van Rossum AG, Aartsen WM, Meuleman J, Klooster J, Malysheva A, Versteeg I, Arsanto JP, Le Bivic A, Wijnholds J (2006). Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells. *Hum Mol Genet*, 15(18):2659-72.
- Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, Rossant J, Wrana JL (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev Cell*, 19(6):831-44.
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*, 51:1-40.
- Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD (1998). Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol*, 392(1):58-77.
- Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C, Williams DS (2015). A Comparison of Some Organizational Characteristics of the Mouse Central Retina and the Human Macula. *PLoS One*, 10(4): e0125631.
- Vogler S, Pannicke T, Hollborn M, Grosche A, Busch S, Hoffmann S, Wiedemann P, Reichenbach A, Hammes HP, Bringmann A (2013). Müller cell reactivity in response to photoreceptor degeneration in rats with defective polycystin-2. *PLoS One*, 8(6):e61631.
- Wang Z, Li W, Mitchell CK, Carter-Dawson L. (2003). Activation of protein kinase C reduces GLAST in the plasma membrane of rat Müller cells in primary culture. *Visual neurosci* 20(6), 611-619.
- Wang L, Srinivasan S, Theiss AL, Merlin D, Sitaraman SV (2007). Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. *J Biol Chem*, 282(11):8219-27.
- Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ (2010). Müller Cell-Derived VEGF Is Essential for Diabetes-Induced Retinal Inflammation and Vascular Leakage. *Diabetes*, 59(9): 2297-2305.
- Wang JJ, Zhu M, Le YZ (2015). Functions of Müller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World J Diabetes*, 6(5):726-33.
- Werdich XQ, McCollum GW, Rajaratnam VS, Penn JS (2004). Variable oxygen and retinal VEGF levels: correlation with incidence and severity of pathology in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res*, 79(5):623-30.
- Xiao Z, Patrakka J, Nukui M, Chi L, Niu D, Betsholtz C, Pikkarainen T, Vainio S, Tryggvason K (2011). Deficiency in Crumbs homolog 2 (Crb2) affects gastrulation and results in embryonic lethality in mice. *Dev Dyn*, 240(12):2646-56.
- Ye X, Wang Y, Cahill H, Yu M, Badea TC, Smallwood PM, Peachey NS, Nathans J (2009). Norrin, Frizzled4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell*, 139(2): 285-298.
- Yi H, Nakamura RE, Mohamed O, Dufort D, Hackam AS (2007). Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(12):5733-41.
- Zabel MK, Zhao L, Zhang Y, Gonzalez SR, Ma W, Wang X, Fariss RN, Wong WT (2016). Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX₃CL₁-CX₃CR₁ signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Glia*, 64(9):1479-91.
- Zeng HY, Zhu XA, Zhang C, Yang LP, Wu LM, Tso MO (2005). Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(8):2992-9.
- Zhang H, Verkman, AS (2008). Aquaporin-4 independent Kir4. 1 K⁺ channel function in brain glial cells. *Mol Cell Neurosci* 37(1), 1-10.
- Zhang C, Lai MB, Khandan L, Lee LA, Chen Z, Junge HJ (2017). Norrin-induced Frizzled4 endocytosis and endolysosomal trafficking control retinal angiogenesis and barrier function. *Nat Commun*, 8:16050.
- Zhang Y, Zhao L, Wang X, Ma W, Lazere A, Qian HH, Zhang J, Abu-Asab M, Fariss RN, Roger JE, Wong WT (2018). Repopulating retinal microglia restore endogenous organization and function under CX₃CL₁-CX₃CR₁ regulation. *Sci Adv*, 4(3):eaap8492.

- Zhao B, Tumaneng K, Guan KL (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol*, 13(8):877-83. doi: 10.1038/ncb2303.
- Zhao M, Andrieu-Soler C, Kowalczyk L, Paz Cortés M, Berdugo M, Dernigoghossian M, Halili F, Jeanny J, Goldenberg B, Savoldelli M, El Sanharawi M, Naud M, van Ijcken W, Pescini-Gobert R, Martinet D, Maass A, Wijnholds J, Crisanti P, Rivolta C, Behar-Cohen F (2015a). A New CRB1 Rat Mutation Links Müller Glial Cells to Retinal Telangiectasia. *J Neurosci*, 35(15): 6093–6106.
- Zhao L, Zabel MK, Wang X, Ma W, Shah P, Fariss RN, Qian H, Parkhurst CN, Gan WB, Wong WT (2015b). Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO Mol Med*, 7(9):1179-97.
- Zhou KK, Benyajati S, Le Y, Cheng R, Zhang W, Ma JX (2014). Interruption of Wnt signaling in Müller cells ameliorates ischemia-induced retinal neovascularization. *PLoS One*, 9(10):e108454.
- Zhu C, Xiong Z, Chen X, Lu Z, Zhou G, Wang D, Bao J, Hu X (2011). Soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 inhibits migration of human monocytic THP-1 cells in response to VEGF. *Inflamm Res*, 60(8):769-74. doi: 10.1007/s00011-011-0332-7.