



TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

Caracterización de los oligodendrocitos en la vía visual del pez cebra en desarrollo y en procesos regenerativos

FERNANDO LEÓN LOBERA

SALAMANCA, 2017



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL

**Caracterización de los oligodendrocitos en la vía
visual del pez cebra en desarrollo y en procesos
regenerativos**

FERNANDO LEÓN LOBERA

Salamanca, 2017



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



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

Caracterización de los oligodendrocitos en la vía visual del pez cebra en desarrollo y en procesos regenerativos

Memoria presentada por Fernando León Lobera para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca con
mención de “Doctorado Internacional”

Directores

Profa. Dra. D^a Almudena Velasco Arranz

Prof. Dr. D. José Aijón Noguera

Salamanca, 2017



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN
INCyL – C/ Pintor Fernando Gallego 1
37007 Salamanca (España)
Tel: +34 923 294500 ext. 5334

D. José Aijón Noguera, Catedrático de Biología Celular, y D^a. Almudena Velasco Arranz, Profesora Titular de Biología Celular

HACEN CONSTAR:

QUE el presente trabajo titulado “*Caracterización de los oligodendrocitos en la vía visual del pez cebra en desarrollo y en procesos regenerativos*”, ha sido realizado por el licenciado en Biología D. Fernando León Lobera en el departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

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

QUE, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral y así optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a veinte de junio de dos mil diecisiete.

El Director

La Directora

Fdo. José Aijón Noguera

Fdo. Almudena Velasco Arranz

*"The highway's jammed with broken heroes
On a last chance power drive
Everybody's out on the run tonight
but there's no place left to hide
Together, Wendy, we can live with the sadness
I'll love you with all the madness in my soul
Someday girl, I don't know when,
we're gonna get to that place
Where we really want to go
and we'll walk in the sun
But till then tramps like us
baby **we were born to run**"*

Born to run (Born to run, 1975)
Bruce Springsteen

**A mis padres y
a mi hermana**

A Seila

Agradecimientos

En Biología se afirma, de forma informal, que el fenotipo es la suma del genotipo y del ambiente. Esto mismo es lo que Ortega y Gasset muy castiza y filosóficamente afirmó cuando dijo que “yo soy yo y mis circunstancias”. Así pues, esta tesis y en general lo que soy no habría sido posible sin mi genotipo y de la gente o ambiente que me ha rodeado.

Por la parte del genotipo, quiero agradecer todo a mis padres, Félix e Isabel (papá y mamá en confianza), porque sin ellos no estaríais leyendo este libro gordo; porque con vuestro ejemplo me habéis enseñado a ser quien soy, me habéis apoyado en cada momento y habéis confiado en mí como sólo vosotros podíais. Os quiero. A mi hermana Alicia, la mejor hermana del mundo, con la que siempre he compartido más que los apellidos. Te quiero y te admiro, y espero que tengas un libro gordo como este lo antes posible. A David, por cuidarla y hacerla reír.

A Seila, mi mujer, porque eres un transposón que forma también parte de mi genoma. Gracias por esa paciencia infinita que tienes conmigo, por decirme lo bueno y lo malo, y por quererme y llegar en el mejor momento posible. Si yo nací para correr, quiero que corras a mi lado. Te quiero. A mis abuelas Loren y Visi, que junto a mis tías abuelas Pura y Sese se fueron mientras estaba cacharreando con mis peces. Os quiero y os echo de menos, como a mi abuelo Mele que se fue hace unos añitos más. A mi tía Cuca y a mi tío Jose, gracias por vuestro apoyo y cariño en todo momento. A S. Fernández: Sabina, Santiago, Silvia, Saúl, Sara, Sergio y Suse, además de Susana, Loli, Carmina, Unai, Iván y Lano, por acogerme como a uno más de vosotros y porque me siento en vuestra casa como en la mía. Os quiero.

Pero no sólo del genotipo vive el hombre, sino que necesita al ambiente que lo rodea. A mis directores, el Prof. Dr. D. José Aijón (el jefe) y la Prof. Dra. D^a. Almudena Velasco (Almu), por ayudarme siempre que lo he necesitado y por darme la oportunidad de descubrir que nací para ser científico (aunque ya lo sospechaba).

A Rafa, dueño y señor del Lab10 izquierda (aka la cueva), porque sin ti la tesis habría sido muchísimo más aburrida y larga. Gracias por tus consejos, tus charlas sobre ciencia y no ciencia, por tu sentido del humor y por descubrirme que Rick Astley es tu criptonita chechual. Eres una gran persona y científico, no lo olvides nunca.

Al resto de componentes del Lab10: a Ángel Porteros, por sus charlas sobre ciencia y no ciencia, y por estar siempre pendiente de mí. A Rosario Arévalo, por preocuparse por mí y estar siempre disponible cuando necesitaba ayuda. A Juan Lara, por sus discusiones de ciencia y por donarnos muestras de cerveza para hacer más ameno el trabajo.

A todos mis padawans, de los que más que enseñar aprendí muchas cosas: Álvaro, el primogénito y mi ojito y pipeta derechos; Laura Carrera, por su paciencia y por todas las charlas de los tiempos de incubación; Alicia Vázquez, porque vales un montón y porque por mis padawans mato; Laura Santa, porque me enseñaste a ser mejor científico y persona; Laura de Oliveira (sí, en nuestro laboratorio abundan las Lauras), por su tesón y paciencia (nunca dejes de preguntar); A Jorge y Dani, por aguantarnos y sobrevivir ese curso con *overbooking*; a Olga, por ser la pequeña y la última que he instruido, te deseo lo mejor.

A los anteriores integrantes del Lab10, porque ellos me enseñaron todo y me ayudaron a integrarme científica y personalmente en el INCyL: a Miguelón, porque tienes un corazón tan grande como tú; a Héctor, porque me enseñaste a trabajar con cariño y cuidado, y por aquel viaje a los EEUU; Marta Parrilla, por ser mi jedi en el lab aunque por poco tiempo; a Maite, por ser ejemplo de lucha y de que hay vida después

de la tesis; a Adrián, por enseñarme a hacer *in situs*. También quiero agradecer a los componentes pasados y presentes del Lab7: A Rodri, porque eres un currante y por tener siempre una sonrisa en tu cara y corazón; a David (el primo), por ayudarme siempre que lo he necesitado; a Azu por su buen humor y su infinita paciencia; a Carlos, por ser el heredero de Rodri. A los componentes del Lab3, tanto en la parte de Juan Carlos (Cristina, Saray, Laura Calvo, Silvia, Julia) como a la de Conchi Lillo: a Antonio, por ayudarme ese verano donde no quedamos más que los novatos, ha sido un placer ser compañero a lo largo de estos años; a Saúl, porque eres la alegría y el buen humor en la ciencia que tanto necesitamos; a la Dra Lillo (aka Conchi), por su ayuda y jovialidad. A Jorge, Vicente y a Alicia, os deseo lo mejor.

Tampoco me puedo olvidar del resto de componentes del Departamento de Biología Celular y Patología: Al Dr. Jesús Briñón, por ayudarme en las prácticas a ser mejor docente; al Dr. Weruaga y al Dr. Alonso, a Maite técnico por su ayuda y sus consejos; a Carmen (secretaria) por su ayuda con todo el papeleo. Así mismo, al personal técnico del INCyL: Al Dr. Javi Herrero, porque me has aguantado y ayudado mucho, gracias por esa paciencia y comprensión; a Ana y Alberto, los técnicos; a la directiva anterior y actual, por tratarme con cariño y paciencia. A Carmen y Elena (SEA), por su inestimable ayuda con mis pezqueñines.

A Araceli, palentina de pro, que con tanta paciencia y casi sin regañinas me ayudó con mi beca FPU. La Universidad no sabe lo que ha perdido con tu jubilación.

A mis chicas del Lab 15. Porque sin vosotras no habría sobrevivido a la tesis, tanto a nivel científico como personal. Os quiero mucho: A Marta, porque eres fuerte y luchadora como no he conocido a nadie y a la vez sensible, achuchable y todo amor. Gracias por escucharme y ayudarme y quererme tanto. A Myriam, porque si te imito es porque te admiro y quiero como científica y como persona. Nunca dejes de reírte y asustarte si entro sin hacer ruido en el lab. A Sara, porque me encanta tu serenidad y tu buen humor. No cambies nunca (y canta un día conmigo en el karaoke ;). A Ana G, porque el mundo necesita a científicas y mujeres como tú. A Ester, no pierdas nunca el amor por la ciencia, por mucho que te lo pongan crudo. Tú sí que vales. A Maru, porque eres un crack. A Rocío, por continuar el buen nombre y ambiente del lab15. A Arancha, Josefa, Ana Velasco y José María, por aceptarme como una más del lab en mis constantes visitas.

A la parte del Lab 13: A Ada, por todo lo que hemos compartido. Sin ti la tesis habría sido mucho más dura. Gracias por ayudarme y escucharme, te quiero pero sin amor, como los abrazos. A Ad, porque eres un currante y porque todo tiene su recompensa. A Vero, por echarme un cable cuando lo necesitaba. A Raquel, por confiar y preocuparse en mí a lo largo de todo este tiempo.

I also want to thank Professor Bruce Appel and all the members of the Appel lab for their help and support during my stay. Especially thanks to Laura Hudish, Emily Mathews and Andy Ravanelli, which took care of me, patiently taught me and reminded me why I love science. I miss you, guys. Gracias también a Catia y a Diego, por hacer mi estancia en Denver mucho más cómoda e inolvidable.

A Gema Domínguez, mi profesora de Biología de Bachillerato. Porque sin ti no habría descubierto mi verdadera vocación. Has sido, con diferencia, la mejor profesora que jamás he tenido. Gracias por tu paciencia y por demostrarme que los garrafones de electrones no existen.

Al resto de profesores del colegio Maristas de Palencia y de la facultad de Biología, porque yo sé lo que sé gracias a vosotros. A mi padrino de Bioquímica, Enrique Villar, porque se fue antes de tiempo.

A mis amigos de Palencia, porque a pesar de haber estado tanto tiempo fuera siempre que vuelvo me siento como si no hubiera pasado el tiempo con vosotros. Porque me habéis aguantado sin rechistar en este viaje que es la tesis. A David (el primo) y a Andrea, por escucharme cuando más lo he necesitado a lo largo de estos años; a Cris Gil y a Chony, por siempre estar disponibles y proponer planes; a Eva (la prima), por las clotoideas y por todo lo que hemos compartido juntos desde hace tanto tiempo; a Cris Illera (Crispis), porque a pesar de ser profe de infantil también me has enseñado a mí (que soy un niño grande) y contribuido a ser quien soy. A Pedro, por seguir siendo mi amigo a pesar del tiempo y de la distancia. Eres una persona de las que ya no quedan. A Burgos, porque hemos pasado mucho tiempo juntos y te estimo y aprecio un montón. Te echo de menos. A Carmen (chima), porque a pesar de la distancia nunca me olvido de ti.

A mis amigos de la resi de Salamanca, a Juan, Nacho, Toño, Dani, Iago, Miguel Bece y Luis. Con vosotros pasé años extraordinarios e hice cosas extraordinarias. Os echo de menos y a salir un jueves sin morir los dos días siguientes. I'm too old for this shit. A mis compas de la facultad: Almu, Mari, Kike y Pablo. Sin vosotros esos años habrían sido mucho más duros. A Laura Parrilla, por ser compañera de fatigas tesísticas además de buenos ratos fuera del lab. Por ser tan curranta y tener ese humor siempre a punto. Te deseo lo mejor y espero verte pronto de vuelta por aquí. A Patricia Rodríguez, por tu buen humor y porque eres una gran persona y te mereces lo mejor. Espero verte pronto por aquí o verte por allí donde estés. A Irene y Alfonso, por su cariño. A Carmen García, por ser un ejemplo de superación. A Violeta, por sentirnos tan identificados en este proceso que ha sido la tesis. Ánimo que ya llegamos.

A Emma, por toda la sintonía personal que siempre hemos tenido desde que nos conocimos en la biblioteca de la facultad (aún recuerdo tu pelo largo y el acento extrañamente gallego, jaja). Espero seguir contando contigo muchos años más. Te quiero un montón.

Por último, gracias especiales a Bego (Doña Bego), por cuidarme tanto y escucharme siempre que lo he necesitado. A ti debo mi actual estado civil y siempre te lo agradeceré. Gracias por todo, también a Don Luis. Siento abandonar el club de los doctores consortes, pero ya me tocaba. Os deseo lo mejor.

Siento haber soltado tanto rollo pero es lo que siento y que quería transmitir. Gracias a todos por haberme apoyado y animado a seguir. Os quiero.

Fer

Este trabajo ha sido financiado gracias a todos mediante la ayuda a la Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación que he recibido **(AP2010-0517)**.

Índice

Abreviaturas	1
Introducción.....	5
Justificación y objetivos	51
Material y métodos.....	57
Resultados	77
Discusión	203
Resumen	247
Conclusiones.....	255
English summary	259
Conclusions.....	289
Bibliografía.....	293

Abreviaturas

ABREVIATURAS

AC: Arteria central
ADNc: ADN copia
AMPc: AMP cíclico
APC: *Astrocyte Progenitor Cell*, célula progenitora de astrocitos
ARNm: ARN mensajero
BMP: *Bone Morphogenetic Protein*
BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor*
BrdU: 5' Bromo-desoxiuridina
CAM: *Cell Adhesion Molecule*
CCG: Capa de las células ganglionares
CFNO: Capa de fibras del nervio óptico
Ck: Citoqueratina
CNE: Capa nuclear externa
CNI: Capa nuclear interna
CNO: Cabeza de nervio óptico
CPE: Capa plexiforme interna
CPI: Capa plexiforme interna
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
Dp: Días post lesión
Dpf: Días post fecundación
DMSO: Dimetilsulfóxido
DO: Disco óptico
EP: Epitelio pigmentario
FGF-2: *Fibroblast Growth Factor 2*
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial
GS: Glutamina sintetasa
Golli: Gene of oligodendrocyte lineage
Hpf: Horas post fecundación
IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1*
IHQ: Inmunohistoquímica
IL-6: Interleucina 6
LIF: Factor inhibidor de la leucemia
LPC: Lisofosfatidilcolina
Mbp: *Myelin basic protein*, proteína básica de la mielina
MLE: Membrana limitante externa

ABREVIATURAS

MLI: Membrana limitante interna

MOSP: *Myelin oligodendrocyte-specific protein*, proteína específica de oligodendrocitos y mielina

Mpz: *Myelin protein zero* (P₀)

MTZ: Metronidazol

NIRG: *Non-astrocytic Inner Retinal Glia-like cell*

NO: Nervio óptico

Olig2: *Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*

OPC: *Oligodendrocyte Progenitor Cell*, célula progenitora de oligodendrocitos

Pax2: *Paired box gene 2*

PBS: *Phosphate Buffer Saline*, tampón fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehído

PLP: *ProteoLipid Protein*

QO: Quiasma óptico

qPCR: PCR cuantitativa/a tiempo real

RT: Retrotranscripción

SF: Segmentos de los fotorreceptores

Shh: *Sonic hedgehog*

SIO: Segmento intraocular

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

Sox10: *Sex determining region Y-box 10, SRY-box*

Sox2: *Sex determining region Y-box 2, SRY-box*

TA: Temperatura ambiente

TO: Techo óptico

TR: Tracto óptico

UV: Ultravioleta

ZO1: Zónula occludens-1

ZPG: Zona periférica germinal

*Hace mucho tiempo,
en una galaxia muy, muy lejana....*

Introducción

1. La retina de teleósteos

La retina es una fina capa neural ($\approx 0,2$ mm de grosor) que tapiza el fondo del ojo. Se origina a partir de una evaginación del prosencéfalo durante el desarrollo embrionario, y por tanto pertenece al sistema nervioso central (SNC). La retina se encarga de capturar y transformar la información visual que, posteriormente, será enviada a diversos centros encefálicos a través del nervio óptico (NO).

Debido a su gran similitud entre los vertebrados y su fácil acceso, la retina constituye una porción del SNC de gran interés para su estudio (Ramón y Cajal, 1893).

1.1 Organización de la retina

La retina tiene una organización estratificada, muy similar en todos los vertebrados, en la que alternan capas de somas celulares con capas de neuropilo (Ramón y Cajal, 1893). De la porción más escleral a la más vitreal, se distinguen las siguientes capas (Figura 1):

- Epitelio pigmentario (EP). Es la capa más externa de la retina y un componente no neuronal de la misma. Está constituida por células epiteliales estrechamente unidas, y con gran cantidad de pigmento en su interior, que forman parte de la barrera hematorretiniana.
- Segmentos de los fotorreceptores (SF). Formada por los segmentos externos e internos de los fotorreceptores. En el pez cebra, los distintos tipos de conos y bastones se disponen en esta capa formando un mosaico (Gestri *et al.*, 2012; Hoon *et al.*, 2014; Tarboush *et al.*, 2012).
- Membrana limitante externa (MLE). Es una capa muy fina constituida por las prolongaciones más esclerales de las células de Müller que se unen entre ellas y con los fotorreceptores mediante uniones especializadas de tipo adherente, incluyendo la proteína ZO1 (Herranz, 2009; Itoh *et al.*, 1999; Paffenholz *et al.*, 1999). En los teleósteos también se expresan citoqueratinas (ck) (Koke *et al.*, 2010).
- Capa nuclear externa (CNE). Está formada por los somas de los fotorreceptores: conos y bastones. En el pez cebra existen 4 tipos de conos

INTRODUCCIÓN

que absorben distintas longitudes de onda, incluida parte de la UV (Gestri *et al.*, 2012).

- Capa plexiforme externa (CPE). Es una capa de neuropilo donde realizan sinapsis los fotorreceptores con las células bipolares, horizontales e interplexiformes.
- Capa nuclear interna (CNI). Contiene los somas de células bipolares, horizontales, amacrinas, interplexiformes y células de Müller.
- Capa plexiforme interna (CPI). Es otra lámina de neuropilo, en la que establecen sinapsis las células bipolares, interplexiformes, células ganglionares y amacrinas.
- Capa de las células ganglionares (CCG). Es una capa donde se sitúan los somas de las células ganglionares y algunas células amacrinas desplazadas.
- Capa de las fibras del nervio óptico (CFNO). Está formada por los axones de las células ganglionares que se disponen paralelamente a la superficie de la retina, y que convergen en el disco óptico (DO) para formar el NO (Ramón y Cajal, 1893). En esta capa también encontramos células gliales como los oligodendrocitos, que están presentes en la retina de los teleósteos (Easter Jr. *et al.*, 1984; Parrilla *et al.*, 2016), ya que sus axones se encuentran mielinizados .
- Membrana limitante interna (MLI). Es la capa más vitreal, constituida por la unión de los procesos vitreales de las células de Müller.

Así, la luz entra en el ojo y atraviesa todas las capas de la retina hasta alcanzar los segmentos de los fotorreceptores, donde tiene lugar la fototransducción (conversión de la energía luminosa en cambios de potencial de membrana). La información visual, ya convertida en señales nerviosas, es transmitida desde los fotorreceptores a células bipolares y de éstas a las ganglionares, que proyectan sus axones a los distintos centros encefálicos. Esta vía vertical de transmisión es modulada por las células horizontales y las amacrinas, en lo que se llama vía horizontal de transmisión de la información visual (Kolb, 2003).

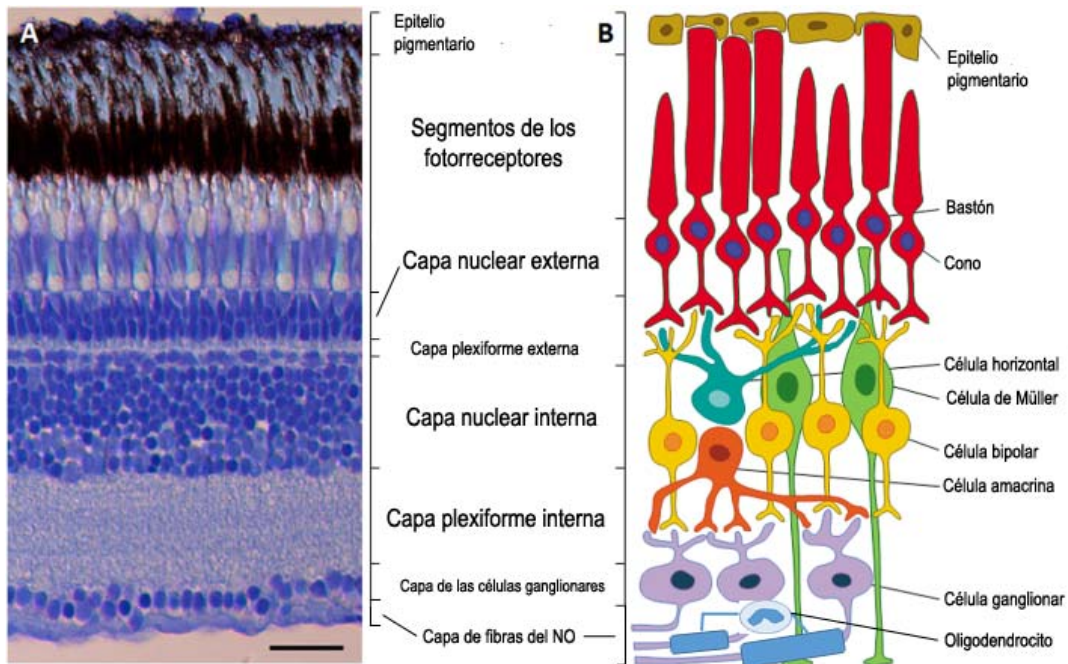


Figura 1. Esquema de una retina de pez cebra. **A)** Micrografía de una sección de la retina de un pez cebra adulto, mostrando sus distintas capas. **B)** Diagrama de las conexiones neuronales en la retina, mostrando los diferentes tipos celulares. Barra de escala: 25 μm (Modificado de Gramage *et al.*, 2014).

1.2 Células de la retina

Epitelio pigmentario

Es un estrato de células epiteliales cúbicas asociadas entre sí, que se sitúa entre la coroides y la retina neural. Las funciones que realizan son variadas: regulan la concentración de iones y agua en el espacio subretinal e intervienen en la fototransducción, fagocitan los segmentos externos de los fotorreceptores permitiendo su continua renovación y aportan retinal que forma parte de los fotorretinos (Young y Bok, 1969). Además, contienen abundantes gránulos de melanina, cuya función parece ser la absorción de fotones extraviados que degradarían la imagen (Douglas y Wagner, 1982).

Fotorreceptores

Constituidos por conos y bastones. Los conos son de tamaño corto y de forma cónica, funcionalmente son los encargados de la visión en color. Los bastones, son de forma cilíndrica y se encargan de la visión escotópica (Kolb *et al.*, 2000).

INTRODUCCIÓN

En el pez cebra hay cuatro tipos distintos de conos, que se diferencian por la región del espectro de luz que absorben sus pigmentos, incluido parte del UV (Gestri *et al.*, 2012; Tarboush *et al.*, 2012). Su soma se localiza en la CNE, y son células muy polarizadas: el segmento externo contiene cientos de discos de membrana, orientados de forma transversal, en los que se insertan los pigmentos fotosensibles, mientras que en el segmento interno se disponen los orgánulos celulares. Además, los peces presentan una estructura denominada megamitocondria en el elipsoide del segmento interno (Kim *et al.*, 2005), que se visualiza con tinciones nucleares tipo DAPI.

Células horizontales

Son células de gran tamaño, cuyos núcleos se sitúan en la parte más externa de la CNI en disposición horizontal. Realizan sinapsis con las células bipolares, con los fotorreceptores y con las células interplexiformes, en la CPE. Modulan la información que se transmite de los fotorreceptores a las células bipolares (Bear *et al.*, 1998).

Células bipolares

El soma de estas células se localiza en la zona intermedia de la CNI. Sus procesos contactan con los fotorreceptores, las células horizontales y las interplexiformes en la CPE. Su axón se dirige hacia la CPI, donde realiza sinapsis con células ganglionares, células amacrinas y con las células interplexiformes (Bear *et al.*, 1998).

Células amacrinas

Las células amacrinas tienen su cuerpo celular en la parte más vitreal de la CNI y envían prolongaciones que se extienden por la CPI. También existen las denominadas células amacrinas desplazadas, cuyo soma se sitúa en la CCG (Hughes y Wieniawa-Narkiewicz, 1980). No reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sino sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y retroalimentando a las células bipolares (Kolb *et al.*, 2000).

Células ganglionares

Son las neuronas de proyección de la retina y las primeras en diferenciarse durante el desarrollo (Schmitt y Dowling, 1994). Su función es llevar la información visual desde la retina hasta la siguiente estación de relevo, el núcleo geniculado lateral del tálamo en los mamíferos y el techo óptico en peces (Burrill y Easter Jr., 1994; Stuermer, 1988). Sus dendritas establecen conexiones en la CPI con células bipolares y amacrinas (Sakai *et al.*, 1986), y sus axones discurren paralelos a la superficie retiniana formando la CFNO. Dichos axones, que en los peces se encuentran mielinizados por oligodendrocitos (Easter Jr. *et al.*, 1984; Schweitzer *et al.*, 2007; Wolburg, 1980), alcanzan el DO en el centro de la retina. En ese punto, todos los axones atraviesan todas las capas de la retina y salen del globo ocular formando el NO.

Células de Müller

Las células de Müller fueron descritas en 1851 por Heinrich Müller. Son células de la glía radial y constituyen el elemento glial predominante en la retina (Müller, 1851; Ramón y Cajal, 1893). Se originan a partir del neuroepitelio que produce todas las neuronas retinianas (Turner y Cepko, 1987). Su soma es poligonal y se sitúa en la parte central o vitreal de la CNI. De él parten dos prolongaciones principales en direcciones opuestas que abarcan casi todo el grosor de la retina. Los procesos esclerales forman parte de la MLE, donde establecen uniones de tipo adherente (zónulas adherentes y desmosomas) con los fotorreceptores y otras células de Müller, (Geneser, 1993; Kolb *et al.*, 2000; Reichenbach y Robinson, 1995). Los procesos vitreales, se expanden en su extremo y se unen a los “pies” de otras células de Müller. Los procesos principales se ramifican, envolviendo somas de otras células, además de infiltrarse en las sinapsis y organizar los axones de la CCG en la CFNO (Reichenbach *et al.*, 1989; Reichenbach y Bringmann, 2015).

Las funciones que realizan las células de Müller son múltiples y fundamentales, desde encargarse del soporte nutritivo de la retina, formar parte de la barrera hematorretiniana, controlar el pH y la concentración de iones, así como retirar el exceso de neurotransmisores para evitar procesos de excitotoxicidad (Reichenbach y Bringmann, 2015).

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, su papel como células madre neurales adultas en la retina de peces ha sido probado ampliamente, siendo las encargadas de generar todas las células de la retina tras una lesión (Bernardos *et al.*, 2007; Gorsuch y Hyde, 2014; Lenkowski y Raymond, 2014; Thummel *et al.*, 2008). Durante el desarrollo embrionario y en procesos de crecimiento continuado, las células de Müller participan en la guía de los axones jóvenes a través de la CFNO hacia el NO, mediante moléculas que favorecen su crecimiento a nivel de sus pies y moléculas de repulsión en sus somas (Stuermer y Bastmeyer, 2000).

Además de las células de Müller, se encuentran astrocitos y oligodendrocitos como componentes gliales mayoritarios del sistema visual. Las características de estas células, debido a su importancia, se describen en sus respectivos apartados.

1.3 Crecimiento continuado

A diferencia del SNC de mamíferos, donde la neurogénesis termina en la etapa del desarrollo y en los adultos permanece restringida a cuatro regiones (epitelio olfatorio, zona subependimal, el giro dentado y el cuerpo ciliar del ojo) (Álvarez-Buylla *et al.*, 2002; Calof *et al.*, 2002; Gould *et al.*, 2000; Martínez-Navarrete *et al.*, 2008), en el pez cebra nos encontramos hasta 16 zonas neurogénicas en los animales adultos (Grandel *et al.*, 2006; Than-Trong y Bally-Cuif, 2015).

Dos de estos nichos neurogénicos los encontramos en la retina. Así, las células de Müller son capaces de generar todas las neuronas de la retina tras una lesión (Bernardos *et al.*, 2007; Goldman, 2014; Raymond *et al.*, 2006; Thummel *et al.*, 2008; Wan y Goldman, 2016), además de ser los progenitores que generan los bastones, que son las únicas células que no produce la zona periférica germinal (ZPG) de la retina (Bernardos *et al.*, 2007; Johns, 1982; Raymond *et al.*, 2006) (Figura 2).

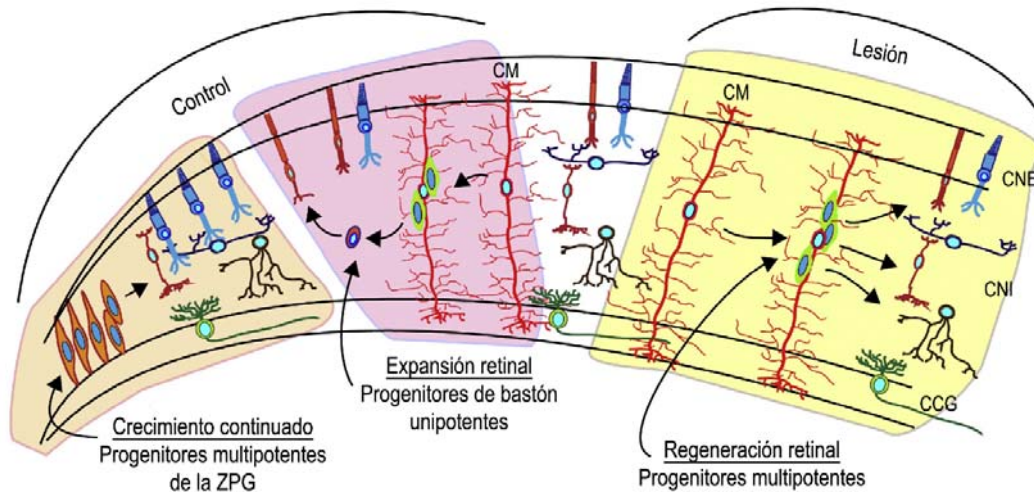


Figura 2. Progenitores retinales. La ZPG es la responsable de producir todas las neuronas excepto los bastones durante el crecimiento continuado de la retina. Éstos provienen de progenitores de bastón que se generan a partir de las células de Müller (CM). Tras una lesión, las células de Müller son las encargadas de generar progenitores multipotentes que regeneran todas las células retinales (Modificado de Wan y Goldman, 2016).

Precisamente el otro gran nicho neurogénico de la retina es la ZPG. Esta zona está formada por un conjunto de células proliferativas remanentes de la copa óptica, con morfología neuroepitelial típica (Raymond y Rivlin, 1987) y que forman un círculo continuo en el margen de la retina (Grun, 1975; Johns, 1977; Müller, 1952).

Así, la retina es capaz de crecer de forma continua desde que se especifica durante el desarrollo y a lo largo de la vida de los peces. Como se dijo anteriormente, la ZPG es capaz de generar todos los tipos celulares de la retina, incluyendo las células de Müller, excepto los bastones (Otteson y Hitchcock, 2003). De esta forma, las células que se diferencian de la ZPG forman anillos concéntricos de nuevo tejido retinal, quedando las células más jóvenes en la zona más periférica (Easter Jr., 1992; Johns, 1977; Scholes, 1979). Además, se genera una zona de transición entre la ZPG y la retina madura donde la laminación todavía no está bien establecida y las células continúan diferenciándose (Lillo, 2001; Olson *et al.*, 1999) (Figura 3).

Es por esto que se afirma que hay un crecimiento continuado de la retina y, como consecuencia, siempre se pueden visualizar axones en crecimiento de las nuevas células ganglionares a lo largo del sistema visual (Bunt, 1982; Easter Jr. *et al.*, 1984, 1981; Stuermer y Bastmeyer, 2000).

INTRODUCCIÓN

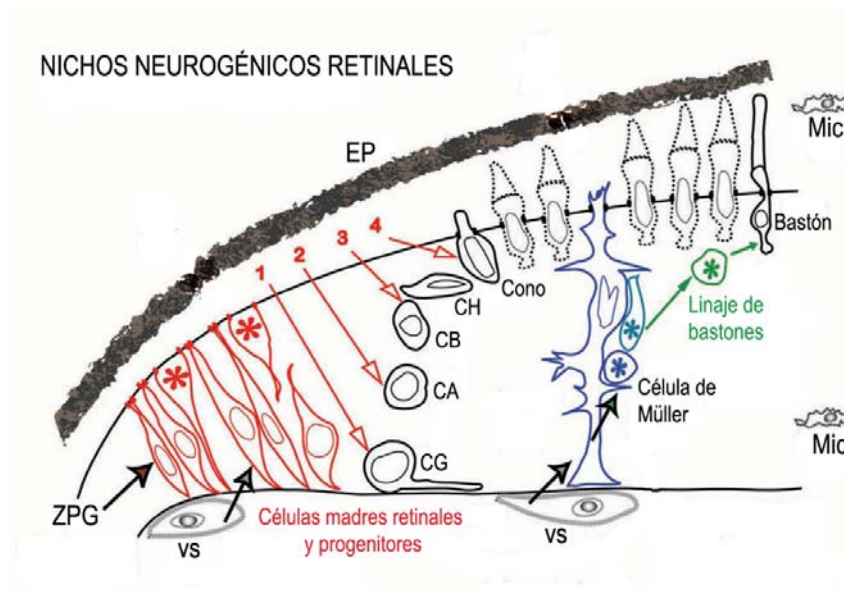


Figura 3. Nichos neurogénicos retinales en la retina de teleosteos. La ZPG contiene células madre retinales y progenitoras que son capaces de generar células ganglionares (CG), células amacrinas (CA), células bipolares (CB), células horizontales (CH) y conos. Los bastones provienen de progenitores de su propio linaje, generados a partir de las células de Müller. EP: epitelio pigmentario; Mic: microglía; VS: vaso sanguíneo (Modificado de Raymond *et al.*, 2006).

2. La cabeza del nervio óptico (CNO)

La CNO es la zona de transición entre la retina y el NO. Es una estructura imprescindible tanto en el desarrollo del sistema visual como durante el crecimiento continuado y la regeneración (Parrilla, 2010).

2.1 Estructura y organización

Está compuesta únicamente por axones de las células ganglionares y células gliales, aunque también discurren por ella los vasos sanguíneos que irrigan la retina (Figura 4). Su organización y características varían en cada grupo de vertebrados. En mamíferos, los astrocitos se disponen separando el NO del vítreo, la retina, la coroides y la esclera. También se encuentran empaquetando y organizando los axones de las células ganglionares junto con elementos de tejido conjuntivo en la parte posterior de la CNO, formando una estructura característica tanto de mamíferos como de aves denominada **lámina cribosa**

(Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996).

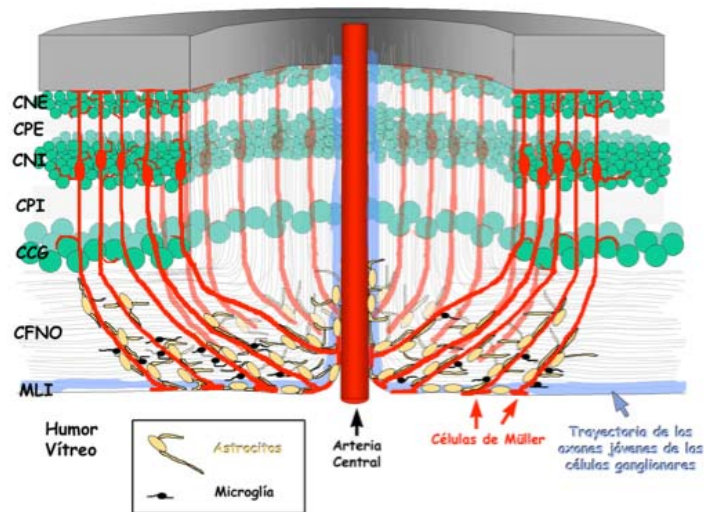


Figura 4. Esquema de la CNO de la tenca (*Tinca tinca* L. 1758). En ella, las células de Müller tabican y separan la retina de los axones de las células ganglionares, que formarán el NO a su salida (Tomado de Lillo *et al.*, 2002).

- La lámina cribosa

La lámina cribosa es una estructura que se dispone, como hemos descrito, entre la CNO y el NO. Posee una organización característica, con astrocitos formando columnas junto con elementos del tejido conjuntivo (Figura 5). La función de esta estructura parece estar relacionada con la ausencia de la mielinización de la retina de mamíferos, incluidos los humanos, ya que los axones de las células ganglionares no aparecen mielinizados hasta la parte posterior de la lámina cribosa, que es el inicio del NO (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009).

En los murinos se encuentra una estructura similar denominada *lámina glial* (Balaratnasingam *et al.*, 2014). Sin embargo, en otros grupos animales como los reptiles, no encontramos una lámina cribosa como tal, aunque los astrocitos localizados en la zona equivalente se organizan perpendiculares al NO y presentan gruesos procesos que acompañan a los axones de las células ganglionares (Dávila *et al.*, 1987). Tanto en aves como en reptiles se ha descrito la presencia de oligodendrocitos y de mielinización de los axones de las células

INTRODUCCIÓN

ganglionares, en zonas anteriores a la lámina cribosa e incluso en la CFNO (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000, 2001; Morcos y Chan-Ling, 2000).

En teleósteos no existe lámina cribosa en la parte posterior de la CNO (Fujita *et al.*, 2000) y son las células de Müller las que se encuentran limitando el NO

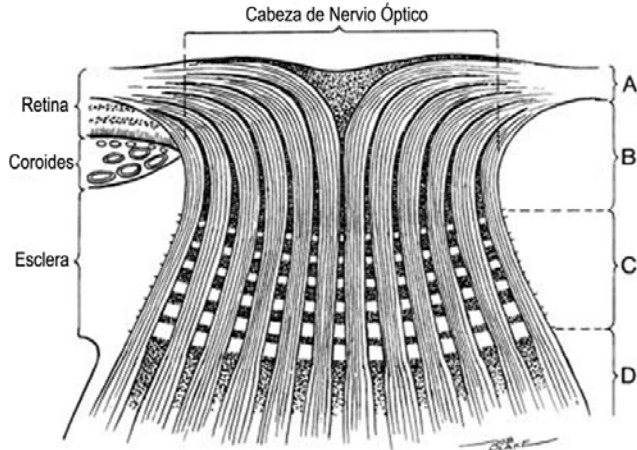


Figura 5. Esquema de la CNO de un mamífero. **A)** Axones de las células ganglionares. **B)** Región preliminar. **C)** Lámina cribosa. **D)** Región postlamina. Modificado de <http://entokey.com/4-2/>

con la retina y el vítreo (Lillo *et al.*, 2002). Estas células de Müller presentan unos procesos vitreales más gruesos que en el resto de la retina, y están íntimamente asociadas a astrocitos y células de microglía (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla, 2010). Sin embargo, a pesar de no existir una lámina cribosa como tal, se ha descrito la presencia de

un anillo de astrocitos GFAP⁺ que aparece en la parte posterior de la CNO, formando la limitante glial (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009), desapareciendo este marcaje GFAP en el resto del NO. Esta estructura también se observa en otros grupos animales (Balaratnasingam *et al.*, 2014; Morcos y Chan-Ling, 2000).

Por lo tanto, debido a la ausencia de una lámina cribosa como tal existen oligodendrocitos y axones mielinizados en la CNO y CFNO de la retina de los teleósteos (Lillo *et al.*, 1998; Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2016; Schweitzer *et al.*, 2007). Al sufrir procesos de crecimiento continuado y regeneración, se han descrito axones de nueva generación y precursores gliales inmaduros en su CNO (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla, 2010). Así, los axones de las células ganglionares presentan una ordenación por edad, que conservan desde la retina hasta el NO. En la retina, los axones jóvenes discurren por la región más vitreal de la CFNO, se introducen junto a la arteria central (AC) por la parte central de la CNO y pasan a una localización ventral junto a la AC cuando alcanzan el NO (Bunt, 1982; Easter Jr. *et al.*, 1984, 1981).

3. El nervio óptico

El NO es el componente del sistema visual que se encarga de transmitir la información desde la retina neural hacia los centros superiores del SNC: mesencéfalo, diencéfalo y telencéfalo. En vertebrados está formado, normalmente, por los axones de las células ganglionares, células gliales y vasos sanguíneos, y está recubierto por las meninges (Bunt, 1982; Levine, 1989; Maggs y Scholes, 1986, 1990; Tapp, 1973; Wolburg, 1981a). Dado que no posee somas neuronales, es una estructura ideal para estudiar procesos regenerativos en los que intervienen las células gliales.

En los distintos grupos de vertebrados, el NO se divide en distintas partes que reciben diferentes nombres. En los teleósteos nos encontramos dos grandes regiones: el segmento prequiasmático y el segmento postquiasmático o tracto óptico (TR), ambos separados por el quiasma óptico (QO), donde los axones decusan contralateralmente. A su vez, el segmento prequiasmático se puede dividir en un segmento intraocular o CNO y el segmento extraocular o intraorbital (SIO) (Easter Jr. *et al.*, 1981; Levine, 1989; Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986) (Figura 6).

En la presente Tesis Doctoral nos referiremos al SIO como NO.

3.1 Estructura y organización

El SIO/NO en teleósteos se dispone formando una lámina plegada, cuyo grado de plegamiento varía en función de la especie (Bunt, 1982; Diekmann *et al.*, 2015; Easter Jr. *et al.*, 1981; Lillo *et al.*, 1998; Mack y Wolburg, 2006; Tapp, 1973; Vanegas y Ito, 1983) (Figura 6B, C). Los axones de las células ganglionares discurren paralelos a los pliegues de dicha lámina (Maggs y Scholes, 1986). En el NO se conserva el ordenamiento por edad de los axones y de esta manera se distingue una zona madura y un borde en crecimiento donde se encuentran los axones amielínicos (Easter Jr. *et al.*, 1981; Mack y Wolburg, 2006; Maggs y Scholes, 1990) (Figura 7).

INTRODUCCIÓN

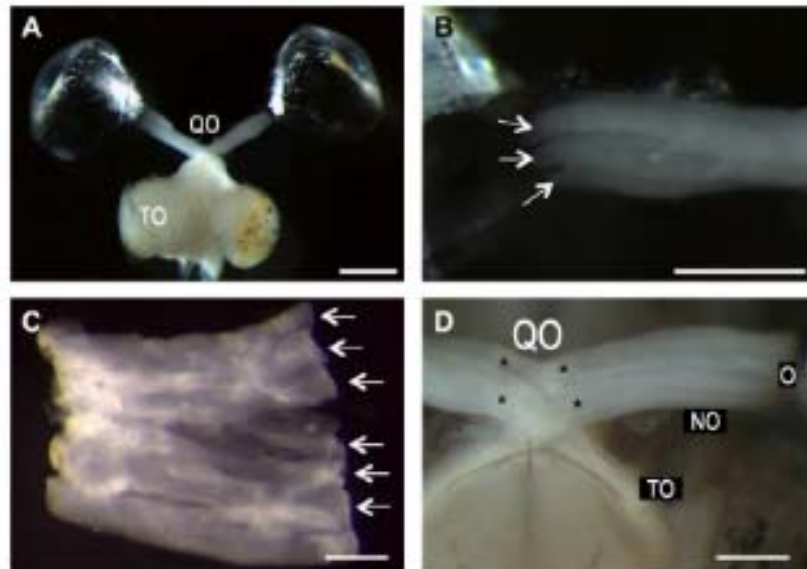


Figura 6. Anatomía del sistema visual del pez cebra. **A)** Vista dorsal del sistema visual, desde los ojos hasta el techo óptico (TO). **B)** Fascículos del NO, visibles desde su comienzo. **C)** Detalle de los fascículos (flechas) en un NO aplastado tras su disección. **D)** Vista ventral del QO. Los NO se dividen en dos fascículos (asteriscos *) que se entrelazan en el QO y continúan al TO contralateral. Barras de escala: A: 1mm; B: 500 μ m; C: 200 μ m; D: 250 μ m (Modificado de Diekmann *et al.*, 2015).

Así, nos encontramos por un lado una zona madura, donde se encuentran los axones mielinizados y estrechamente empaquetados por los procesos de los denominados astrocitos reticulares (Maggs y Scholes, 1990). Los somas de dichos astrocitos se disponen entre fascículos y sus procesos forman un entramado separando los axones en fascículos (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986, 1990) (Figura 7).

Los oligodendrocitos son muy numerosos (Ankerhold y Stuermer, 1999; Schweitzer *et al.*, 2007) y también aparecen gran cantidad de vasos sanguíneos de pequeño tamaño situados endoneuralmente (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986). Rodeando al NO están los astrocitos que forman la limitante glial. Esta limitante glial está constituida por una agrupación de numerosos procesos astrocíticos y cuerpos celulares que se unen entre sí mediante desmosomas y por su superficie externa están cubiertos por una lámina basal (Peters *et al.*, 1991). Dichos astrocitos presentan diferencias con los astrocitos reticulares del resto del NO. Son células de mayor tamaño con procesos citoplasmáticos muy

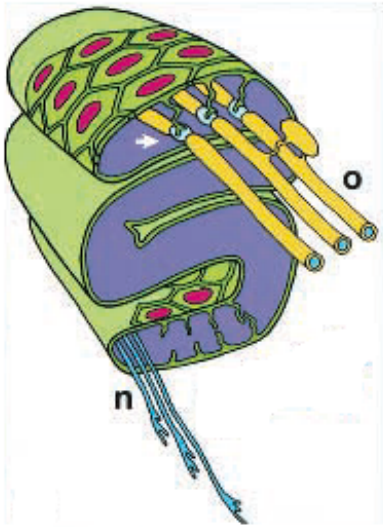


Figura 7. Estructura del NO, formando una lámina plegada, rodeada de astrocitos reticulares (núcleo rojo). Los axones mielinizados por oligodendrocitos (o) se disponen lejos del borde en crecimiento, donde permanecen sin mielinizarse (n) (Modificado de Macdonald *et al.*, 1997).

gruesos y no forman fascículos de axones ya que se dedican a organizar la limitante glial.

Por otro lado, el borde en crecimiento es de tamaño muy limitado y, en general, se sitúa en posición ventral a la lámina plegada (Figura 7). Contiene muy pocos fascículos formados únicamente por fibras no mielinizadas, siendo la mayoría fascículos mixtos con fibras mielinizadas y no mielinizadas (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1986). En esta zona, aparecen astrocitos que presentan distintos grados de madurez (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1990), de forma que se establece un gradiente de maduración. Las células más inmaduras se sitúan en la zona donde se localizan los fascículos no mielinizados, y al alejarse de la zona de crecimiento aumenta la maduración (Maggs y Scholes, 1990) (Figura 8). El tejido conectivo que envuelve el borde en crecimiento es rico en capilares y se encuentra en íntimo contacto con la glía limitante (Lillo *et al.*, 1998; Scholes, 1979).



Figura 8. Esquema de la maduración de los astrocitos reticulares desde el borde en crecimiento (1). Los distintos estadios se corresponden con células indiferenciadas (2); comienzo de la reticulación (3) y finalmente astrocitos maduros (4) (Modificado de Maggs y Scholes, 1990).

4. Regeneración del sistema visual

A pesar de que se asume que el SNC de mamíferos es incapaz de regenerar las neuronas tras una lesión, hoy sabemos que hay zonas tales como el giro dentado del hipocampo, los ventrículos laterales del cerebro y el epitelio olfatorio, en las que continúan produciéndose procesos neurogénicos (Álvarez-Buylla *et al.*, 2002; Calof *et al.*, 2002; Fleisch *et al.*, 2011; Gould *et al.*, 2000; Martínez-Navarrete *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que tras un daño al SNC se produce la proliferación de estos progenitores, aunque la mayoría de veces estas células no sobreviven, no migran correctamente o no se integran en los circuitos dañados (Fleisch *et al.*, 2011).

Sin embargo, en los anamniotas (peces y anfibios) esta capacidad regenerativa está muy bien conservada (Becker y Becker, 2007), en parte porque, como habíamos detallado antes, existen hasta 16 zonas neurogénicas activas en el SNC del pez cebra adulto (Grandel *et al.*, 2006; Than-Trong y Bally-Cuif, 2015; Zupanc, 2006).

El sistema visual no es una excepción a esta norma. El pez cebra es capaz de regenerar tanto tejido retinal (Goldman, 2014; Lenkowski y Raymond, 2014; Thummel *et al.*, 2008) como los axones del NO (Becker y Becker, 2007, 2008).

4.1 Regeneración en la retina

Se han diseñado múltiples paradigmas de lesión de la retina: fotodestrucción de los fotorreceptores (Kassen *et al.*, 2007; Lenkowski *et al.*, 2013; Thummel *et al.*, 2008), daño mecánico con agujas (Ramachandran *et al.*, 2010), ablación química mediante ouabina, que destruye toda la retina (Fimbel *et al.*, 2007) y ablación celular específica mediante toxinas (Morris *et al.*, 2008). Una última forma de daño es a través de la expresión celular específica del gen de la nitrorreductasa (*nfsB*) de *Escherichia coli*. Este gen hace que las células que lo expresan mueran cuando se añade un compuesto, el metronidazol (MTZ), ya que lo convierte en una citotoxina que provoca daño al ADN (Curado *et al.*, 2008). Por otra parte, también se ha estudiado la destrucción de la ZPG mediante criolesión (Jimeno *et al.*, 2003; Parrilla *et al.*, 2012), tras la cual la ZPG se reestablece y genera nuevas células retinales.

En cualquier caso, las células de Müller son capaces de responder a la lesión y regenerar efectivamente la retina (Wan y Goldman, 2016). Sin embargo, lo único que no se restaura a su condición original es el mosaico celular de los fotorreceptores, que se disponen siempre con un orden específico (Cameron y Easter Jr., 1995; Hitchcock y Raymond, 2004). En mamíferos adultos no hay regeneración retiniana y, tras una lesión se produce una gliosis reactiva mediada por las células de Müller, resultando en una cicatriz glial (Bringmann y Reichenbach, 2001; Dyer y Cepko, 2000).

4.2 Regeneración en el NO

Los procesos regenerativos en el NO tras una axotomía o pinzamiento son conocidos desde hace tiempo (Sperry, 1948; Wolburg, 1981a). Debido a su fácil acceso, y a estar compuesto únicamente por axones de las células ganglionares y por células gliales, el NO de los peces constituye un modelo especialmente útil a la hora de estudiar procesos de regeneración axonal y remielinización (Becker y Becker, 2007; Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2013, 2016; Schweitzer *et al.*, 2007).

Mientras que en los mamíferos un daño en el NO causa la muerte de las células ganglionares (Berry *et al.*, 1988; Quigley *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 1994; Vidal-Sanz *et al.*, 1987), éstas sobreviven en la retina del pez cebra (Zou *et al.*, 2013). Además, el proceso regenerativo se produce muy rápidamente, ya que concluye hacia las 4 semanas post-lesión, cuando el techo óptico ya ha sido reinervado correctamente, aunque el refinamiento de las conexiones sinápticas puede extenderse otras 4 semanas más (Becker *et al.*, 2000; Meyer, 1980).

El proceso regenerativo parece ser desencadenado por un primer episodio inflamatorio, tanto en mamíferos como en peces (Kyritsis *et al.*, 2012, 2014). Se ha comprobado que se produce una invasión de macrófagos y activación de la microglía (Münzel *et al.*, 2014; Parrilla, 2010). Los macrófagos parecen favorecer la regeneración debido a que eliminan los desechos que tienen señales inhibitorias del crecimiento (Bastmeyer *et al.*, 1991; Colavincenzo y Levine, 2000; Sivron y Schwartz, 1994), liberan moléculas de crecimiento (Kolb *et al.*, 2000) y favorecen el crecimiento de los axones regenerantes (Dunlop *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha comprobado que la administración de moléculas proinflamatorias genera una mejor respuesta tras el pinzamiento del NO (Fischer

INTRODUCCIÓN

et al., 2000; Leon *et al.*, 2000; Lorber *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2013). Además, en estudios de desmielinización con lisofosfatidilcolina (LPC) en el NO del pez cebra, se ha comprobado la invasión de macrófagos/microglía como paso previo a la remielinización (Münzel *et al.*, 2014).

De esta forma, tras un primer momento de neuroinflamación, se activan genes como *gap43* (Diekmann *et al.*, 2015; Udvadia *et al.*, 2001) o *tub1a* (Goldman *et al.*, 2001; Ramachandran *et al.*, 2010); este último regulado por KLF6/7 (Veldman *et al.*, 2010). Todos ellos promueven el crecimiento axonal. También se produce un incremento en el AMPc (Li *et al.*, 2003), además de IGF-1 (Koriyama *et al.*, 2007). El NO se va recuperando poco a poco hasta adquirir su organización original. De manera que disminuye la cantidad de macrófagos de la zona dañada y esta se llena de axones regenerantes (Nona *et al.*, 1998). Así, cuando la zona pinzada ya está limpia de restos celulares en degeneración, la zona distal muestra gran cantidad de restos de mielina que son fagocitados por los astrocitos (Colavincenzo y Levine, 2000; Nona *et al.*, 1998; Parrilla *et al.*, 2016). Así mismo, los astrocitos *pax2*⁺ se encargan del guiado de los nuevos axones regenerantes (Parrilla, 2010). Es importante destacar que la mielinización no comienza hasta que apenas quedan deshechos de mielina y la citoarquitectura del NO comienza a parecerse al NO normal (Battisti *et al.*, 1995; Nona *et al.*, 2000; Wolburg, 1981b).

En peces, la mielinización del NO tras su lesión ha sido objeto de debate a lo largo de los años. Los primeros estudios ultraestructurales señalaron que la remielinización se producía a partir de oligodendrocitos con características similares a las células de Schwann (Ankerhold y Stuermer, 1999; Nona, 1995; Nona *et al.*, 1992, 2000; Nona y Stafford, 1995). Sin embargo, estudios recientes los han caracterizado plenamente como oligodendrocitos (Münzel *et al.*, 2012, 2014; Parrilla *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2013). Porque, si bien es cierto que en un primer momento exhiben una morfología más simple que los oligodendrocitos maduros (Ankerhold y Stuermer, 1999), se ha comprobado que no expresan marcadores específicos de células de Schwann como *foxD3* (Münzel *et al.*, 2014).

Se piensa que la mielinización se desencadena cuando los axones pasan por un periodo de refinamiento de sus conexiones, de forma que aquellos que han

llegado a la diana correcta en el techo óptico (TO) se mielinizarían antes que aquellos que todavía no han alcanzado su meta (García y Koke, 2009; Nona *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha comprobado que moléculas asociadas a la mielina de los peces como Nogo son capaces de permitir la regeneración axonal (Abdeselem *et al.*, 2009; Diekmann *et al.*, 2005; Filbin, 2003; Pinzón-Olejua *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2009), mientras que la impiden en mamíferos (Fawcett, 2006).

De esta forma, existe una respuesta exitosa en la regeneración axonal, favorecida por procesos inflamatorios y por un ambiente mielinizado permisivo. No obstante, también existen otros factores que contribuyen a dicha regeneración, como moléculas de la matriz extracelular como las CAM y L1, (Becker, Lieberoth, *et al.*, 2004; Bernhardt, 1999), además de otras como la Gelsolina (proteína que interacciona con la actina) (Roth *et al.*, 1999), moléculas de reconocimiento zfNLRR (Bormann *et al.*, 1999), CNPasas (Ballesteros *et al.*, 1999), las hormonas tiroideas (Bhumika *et al.*, 2015) y la Contactina1a (Schweitzer *et al.*, 2007).

Moléculas de guía axonal como la Netrina-1 (Petrausch *et al.*, 2000), la Tenascina-R (Becker *et al.*, 2003; Becker, Schweitzer, *et al.*, 2004) o algunas Efrinas (Becker *et al.*, 2000; King *et al.*, 2003; Rodger *et al.*, 2004) también se encuentran involucradas en el proceso de regeneración; así como la recientemente descrita Purpurina (molécula de unión al retinol) que, mediante la inducción de formación de ácido retinoico, favorece la regeneración (T. Matsukawa *et al.*, 2004; Nagashima *et al.*, 2009).

Finalmente, los astrocitos pax2⁺ de la CNO y del NO muestran una gran plasticidad en respuesta a una lesión, siendo los encargados de organizar los axones regenerantes (Parrilla, 2010; Parrilla *et al.*, 2016).

5. Células gliales del sistema visual

5.1 Astrocitos

Los astrocitos son células gliales que se encuentran en el SNC de mamíferos tanto en la retina como en el NO. En la retina madura de vertebrados, en general, se sitúan en la CFNO (Ogden, 1978; Reichenbach y Bringmann, 2015; Schnitzer, 1985; Vecino *et al.*, 1997), se marcan con anticuerpos anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y se clasifican como astrocitos fibrosos (Kolb *et al.*, 2000; Ramón y Cajal, 1913; Schnitzer, 1988). En los teleosteos, los astrocitos intrarretinales expresan la proteína ligante de calcio S100 (Vecino *et al.*, 1997). Sin embargo, la identidad de estos astrocitos S100⁺ todavía no está del todo clara, pues no disponemos de estudios ni modelos animales transgénicos o mutantes que los describan de forma inequívoca. Además, la expresión de S100 también se ha descrito en oligodendrocitos, incluidos los de peces (Clemente *et al.*, 2008; Isobe *et al.*, 1984; Ludwin *et al.*, 1976; Parrilla, 2010; Tabuchi *et al.*, 1983), así como en células de Schwann (Nona *et al.*, 1992, 2000). En el pez cebra, la proteína S100 se detecta en el cerebro de ejemplares adultos, aunque no se ha comprobado su distribución en el sistema visual (Germanà *et al.*, 2008).

En el NO de mamíferos se distingue, en cuanto a organización, entre los astrocitos de la CNO y los del resto del NO. En la CNO los astrocitos son fibrosos y positivos a GFAP (Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996), y según su localización

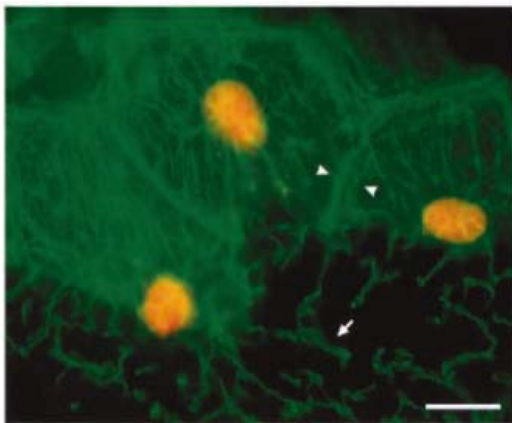


Figura 9. Astrocitos reticulares del NO del pez cebra. En verde, marcaje para ck. En rojo, marcaje para pax2. La flecha indica los procesos que se intercalan a lo largo del NO. Su morfología es hexagonal (puntas de flecha). Barra de escala: 10µm (Modificado de Macdonald *et al.*, 1997).

en la CNO presentan mayor o menor cantidad de filamentos intermedios en su citoplasma. Cumplen un papel fundamental tanto en la guía como en el empaquetamiento de los axones en esta zona, así como proporcionan rigidez a la estructura. En el resto del NO de mamíferos hay astrocitos fibrosos, que conservan su marcaje positivo a GFAP y aparecen ordenados en hileras empaquetando los axones (Sun *et al.*, 2009).

Sin embargo, los astrocitos entendidos como células que expresan GFAP y de morfología estrellada no existen como tales en teleósteos (Cuoghi y Mola, 2009; Lyons y Talbot, 2015). A pesar de esto, en el NO de teleósteos nos encontramos con una población de células “astrocitarias” denominadas astrocitos reticulares (Maggs y Scholes, 1990) (Figura 7) y que presentan características diferenciales: no expresan GFAP en condiciones normales (Blaugrund *et al.*, 1991; Dahl y Bignami, 1973; Levine, 1989; Markl y Franke, 1988); expresan citoqueratinas (ck) (filamento intermedio característico de la astrogliá inmadura en mamíferos) (Giordano *et al.*, 1989; Maggs y Scholes, 1990) y pax2 (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009) (Figura 9); se asocian entre ellos mediante uniones en hendidura (gap) (Wolburg *et al.*, 1983) y desmosomas (Maggs y Scholes, 1990; Parrilla, 2010); y se encargan de formar la limitante glial y de fascicular los paquetes de axones (Maggs y Scholes, 1990).

Estos astrocitos reticulares son capaces de responder ante una lesión tanto del NO (Parrilla *et al.*, 2013) como en la retina (Parrilla *et al.*, 2012). Contribuyen en el guiado y empaquetado de los axones en crecimiento de las células ganglionares (Parrilla, 2010) y se extienden desde la CNO hasta el QO (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009).

- Origen de los astrocitos

Gran parte del conocimiento sobre el origen del linaje de astrocitos en los mamíferos proviene de estudios de cultivos de NO de ratas (French-Constant *et al.*, 1988; Raff *et al.*, 1987) (Figura 10), que describieron tres grandes tipos celulares: los oligodendrocitos, los astrocitos tipo-1 (A2B5⁻) y los astrocitos tipo-2 (A2B5⁺). *In vitro*, estas tres poblaciones provienen de dos linajes diferenciados que aparecen en distintos estadios embrionarios. Por una parte, las APCs (del inglés *Astrocyte Progenitor Cells*, “Células progenitoras de astrocitos”) Pax2⁺/A2B5⁺, que derivan del neuroepitelio del tallo óptico (ver apartado 6. Desarrollo del sistema visual), generan los astrocitos tipo-1 (Mi y Barres, 1999; Mi *et al.*, 2001), que migran a la retina antes de que comience la angiogénesis (Ling *et al.*, 1989; Ling y Stone, 1988; Watanabe y Raff, 1988). Por otra parte, las OPCs (del inglés *Oligodendrocyte Progenitor Cells*, “Células progenitoras de oligodendrocitos”) aparecen posteriormente, y generan tanto los oligodendrocitos del NO como los astrocitos tipo-2, quedando ambos tipos excluidos de las retinas

INTRODUCCIÓN

de los mamíferos (French-Constant *et al.*, 1988). Sin embargo, la existencia de estas células, denominadas también O-2A, ha sido cuestionada, ya que no ha podido ser demostrada *in vivo* (Butt y Ransom, 1989; Fulton *et al.*, 1992; Skoff y Knapp, 1991). Por otra parte, estudios recientes en la retina del pollo han identificado células progenitoras que generan tanto astrocitos retinales como oligodendrocitos. Estas células se han denominado *diacitos*, o células NIRG (*Non-astrocytic Inner Retinal Glia-like cell*) (Fischer *et al.*, 2010; Rompani y Cepko, 2010).

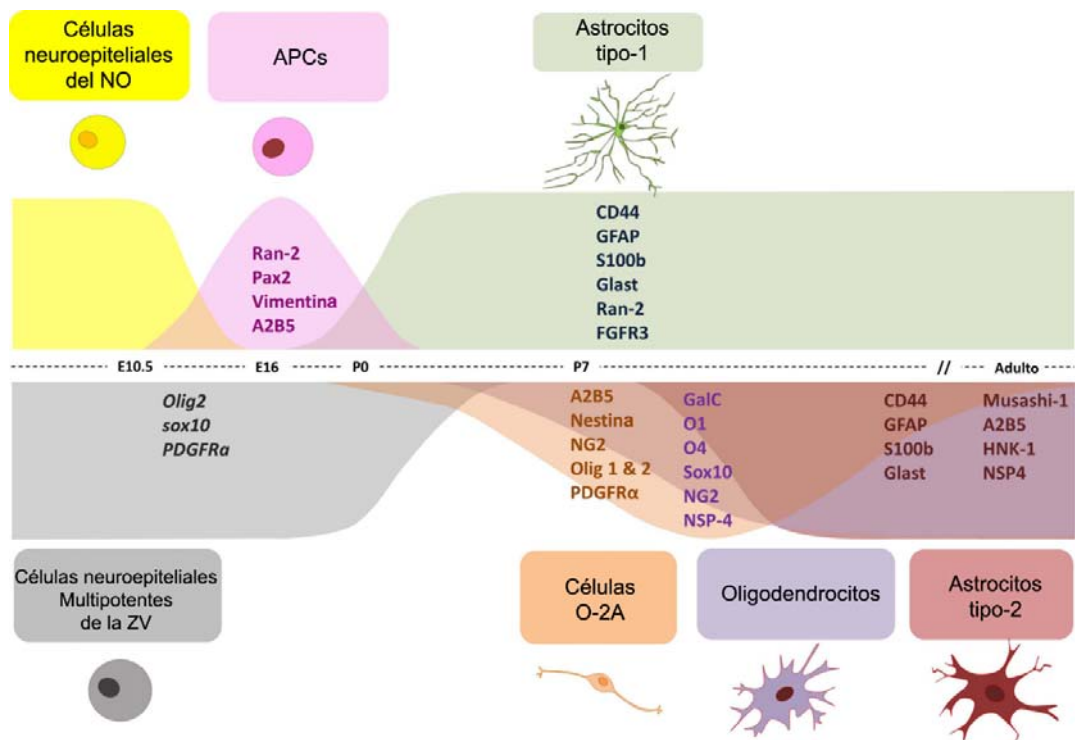


Figura 10. Linaje de los astrocitos en el NO de la rata. Se muestran los tipos celulares y los marcadores que los caracterizan. La línea de puntos muestra los distintos estadios embrionarios (E) y postnatales (P) (Modificado de Tao y Zhang, 2014).

Según avanza el desarrollo, los astrocitos tipo-1 migran hacia la retina y maduran, van expresando GFAP y perdiendo progresivamente la expresión de Pax2⁺, excepto aquellos que se disponen en el DO (Mi y Barres, 1999; Morcillo *et al.*, 2006). En las especies con retina vascularizada, esta entrada de astrocitos se ve continuada por los procesos de angiogénesis, que a su vez promueven la maduración de los astrocitos intrarretinales (Chan-Ling *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2001; Mi y Barres, 1999). Sin embargo, las OPCs y astrocitos tipo-2 (O-2A) no penetran en la retina debido a la lámina cribosa de la CNO (French-Constant

et al., 1988; Morcos y Chan-Ling, 2000). En este proceso de migración parece que está implicada la Semaforina 3a, que funciona como un quimiorrepelente de las APCs desde el QO haciendo que avancen hacia la retina (Sugimoto *et al.*, 2001; Tsai y Miller, 2002) (Figura 18).

Por otra parte, en los peces, que poseen una retina avascularizada, no se detectan astrocitos en la retina (Lyons y Talbot, 2015; Reichenbach y Bringmann, 2015). Sin embargo, el origen de los astrocitos reticulares del NO es similar al de mamíferos, ya que provienen de células del neuroepitelio del tallo óptico que expresan pax2 (Macdonald *et al.*, 1997; Maggs y Scholes, 1990). Estos astrocitos pax2⁺ migran desde el NO hacia el QO, donde la expresión de pax2 desaparece (Macdonald *et al.*, 1997). En peces adultos, se observan resultados similares, ya que los astrocitos reticulares se caracterizan por ser pax2⁺/ck⁺/ZO1⁺ (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009), quedando la expresión de pax2 y de la ck excluidas del tracto óptico (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009).

Finalmente, hay estudios en mamíferos que han identificado una zona donde se dispone una población de APCs durante el desarrollo del NO. Estas células generan astrocitos Pax2⁺/GFAP⁺, que quedan restringidos a un anillo alrededor de la CNO (Chan-Ling *et al.*, 2009). Esta fuente ha sido también identificada en humanos (Chu *et al.*, 2001) y, más recientemente, en peces (Parrilla, 2010), donde se establece una fuerte reacción astrogliar de las células S100⁺/GFAP⁺/GS⁺ presentes tras procesos de crioeeliminación de la ZPG (Parrilla *et al.*, 2012) como tras el pinzamiento del NO (Parrilla *et al.*, 2013), generando nuevos astrocitos pax2⁺.

- Genes implicados en el linaje astrogliar

- **Pax2**

Pax2 (*Paired box gene 2*) es un factor de transcripción englobado en una familia cuya característica principal es la presencia de un dominio *paired domain* (PD) de 128 aminoácidos, que codifica un único motivo de unión al ADN (Chalepakis *et al.*, 1991). Las proteínas Pax se encuentran altamente conservadas en la evolución (Chalepakis *et al.*, 1991; Czerny *et al.*, 1993), y se clasifican en 4 grupos según sus características estructurales (Balczarek *et al.*, 1997), perteneciendo pax2 al grupo 2 (Dörfler y Busslinger, 1996; Goode y Elgar,

INTRODUCCIÓN

2009; Lun y Brand, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998; Wehr y Gruss, 1996). En pez cebra, se han descrito dos genes *pax2*: *pax2a* y *pax2b*, resultado de un fenómeno de duplicación génica. Ambos co-ortólogos participan en la formación del NO; sin embargo, *pax2b* se empieza a expresar más tarde en el desarrollo (Goode y Elgar, 2009; Pfeffer *et al.*, 1998).

Pax2 es fundamental en la formación del nervio óptico (Czerny *et al.*, 1993; Dressler *et al.*, 1990). Durante el desarrollo del sistema visual del pez cebra, al igual que en otros vertebrados, *pax2* se expresa en la región ventral de la vesícula óptica y, tras la formación de la copa óptica, su expresión se restringe a las células gliales del tallo óptico (Macdonald *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1996). Dichas células intervienen en la correcta guía y empaquetamiento de los axones de las células ganglionares de la retina (Macdonald *et al.*, 1997). También se ha descrito la expresión de *pax2* en el organizador ístmico o MHB (*Midbrain-Hindbrain-Boundary*), que es la región que limita el mesencéfalo y el rombencéfalo, en el rombencéfalo y en la médula espinal (Arenzana, 2006; Hyatt *et al.*, 1996; Krauss *et al.*, 1991). La expresión de *pax2* es necesaria para el cierre de la fisura coroidea y la correcta diferenciación de las células gliales del NO. Además, está involucrado en la formación del QO, concretamente en las proyecciones contralaterales (Macdonald *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1996).

En teleósteos adultos, *pax2* se conserva en una población de astrogliá perteneciente a los astrocitos reticulares y a la glía limitante del NO y la CNO (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009). Esta población astrogliá *pax2*⁺ está involucrada no solo en los procesos de crecimiento continuado en la retina sino también en los procesos regenerativos que suceden tras una lesión en el sistema visual (Parrilla *et al.*, 2012, 2013). También se ha descrito la expresión de *pax2* en células de Müller de la retina central del pez cebra (Boije *et al.*, 2010), así como de otras especies de vertebrados (Stanke *et al.*, 2010).

- **Sox2**

Sox2 (*Sex determining region Y-box 2*, *SRY-box*) es un factor de transcripción cuya familia está formada por 9 grupos de genes que codifican proteínas que se unen al surco menor del ADN, lo que provoca que el ADN se curve (Ferrari *et al.*, 1992). *Sox2* pertenece al grupo B1 (Okuda *et al.*, 2006), está situado en el

cromosoma 22 del pez cebra y al igual que la mayoría de los otros genes de la familia (Pevny y Lovell-Badge, 1997) carece de intrones. La proteína posee un grupo de alta movilidad (HMG, de sus siglas en inglés), que es el encargado de interaccionar con el ADN (Kamachi *et al.*, 1999; Wißmüller *et al.*, 2006), aunque debido a su poca estabilidad, esta unión tiene que darse junto a otras proteínas (Scaffidi y Bianchi, 2001; Wilson y Koopman, 2002).

Sox2 se expresa en células troncales multipotentes del neuroepitelio embrionario, y se encarga de mantener su capacidad proliferativa, compitiendo con los factores proneurogénicos (Bylund *et al.*, 2003). Es uno de los factores que intervienen en la inducción de células troncales pluripotentes a partir de otros tejidos, tanto en animales (Takahashi y Yamanaka, 2006) como en humanos (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Está implicado en la diferenciación de células amacrinas en la retina del pollo (Le Rouëdec *et al.*, 2002) y de ratón (Lin *et al.*, 2009). En las células de Müller se encarga de mantener su estado quiescente como progenitores neuronales (Bhatia *et al.*, 2011; Surzenko *et al.*, 2013); y mutaciones en el gen *SOX2* causan microftalmia y anoftalmia (Taranova *et al.*, 2006). Durante el desarrollo del NO de ratones, Sox2 se expresa junto a Pax2 en los precursores de astrocitos (Tiwari *et al.*, 2014).

En el ratón, Sox2 y Sox3 se expresan en los oligodendrocitos durante el desarrollo, y actúan en su diferenciación terminal influyendo en la expresión de miR145 (Hoffmann *et al.*, 2014). Además, Sox2 es capaz de unirse y activar *in vivo* la expresión de Mbp, aunque de forma inferior a Sox10 (Hoffmann *et al.*, 2014), ya que Sox2 es capaz de unirse a numerosas proteínas, como HDAC1 (Cox *et al.*, 2010). Sox2 también influye en el proceso de diferenciación de las células de Schwann (Lang *et al.*, 2011; Parrinello *et al.*, 2010; Svaren y Meijer, 2008). Además, Sox2 se expresa en precursores de oligodendrocitos y microglía reprogramados y diferenciados en células madre neurales (Zhang *et al.*, 2014).

Durante el desarrollo del pez cebra, *sox2* también se expresa alrededor de los ventrículos diencefálicos, en el techo óptico y en el núcleo preóptico (Germanà *et al.*, 2010), además de en la ZPG (Stephens *et al.*, 2010). En la retina adulta Sox2 se expresa en las células de Müller y en células amacrinas y amacrinas desplazadas (Gorsuch *et al.*, 2017; Jusuf y Harris, 2009; Lin *et al.*, 2009). También se ha descrito la expresión de *sox2* en el resto de las áreas neurogénicas del cerebro (Alunni y Bally-Cuif, 2016; Germanà *et al.*, 2010).

INTRODUCCIÓN

Finalmente, se ha comprobado que tras una lesión del SNC los niveles de *Sox2* aumentan, detectándose en células oligodendrogiales y ependimales (Hui *et al.*, 2014; Lang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013).

5.2 Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son células gliales descubiertas por Pío del Río Hortega (Río Hortega, 1928) gracias a una modificación de la técnica cromo-argéntica de Golgi. Son células que presentan una gran variabilidad morfológica en cuanto a su orientación y a la ramificación de sus procesos (Figura 11). Poseen un soma pequeño y redondeado del que derivan varios procesos que posteriormente se ramifican (Butt y Ransom, 1989). La función principal y característica de los oligodendrocitos es la formación de la vaina de mielina de los axones; aunque también realizan funciones metabólicas, aportando el lactato que producen mediante glucólisis a partir de la glucosa como sustrato energético para los axones que mielinizan (Fünfschilling *et al.*, 2012; Y. Lee *et al.*, 2012; Rinholm *et al.*, 2011).

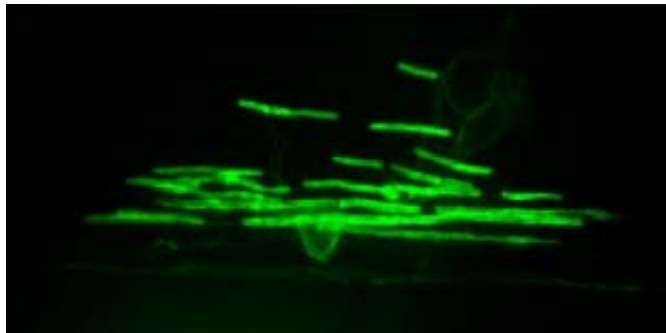


Figura 11. Oligodendrocito en la médula de una larva en desarrollo de pez cebra. Se muestran las distintas vainas de mielina que produce y que engloban a distintos axones. (Modificado de Mathews *et al.*, 2014).

En el sistema visual de mamíferos se encuentran únicamente en el NO, aunque en teleósteos, incluyendo el pez cebra (Lillo *et al.*, 1998; Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2016; Schweitzer *et al.*, 2007; Wolburg, 1980), en conejo (Morcos y Chan-Ling, 1997; Reichenbach *et al.*, 1988; Schnitzer, 1985), en reptiles (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2000) y en aves (Cho *et al.*, 1999; Nakazawa *et al.*, 1993; Won *et al.*, 2000) aparecen también en la CFNO de la retina. Dentro de la retina se encargan de mielinizar los axones de las células ganglionares en la CFNO (Wolburg, 1980). En estudios realizados en carpín

(*Carassius auratus*), se ha propuesto que los axones no mielinizados, que son los más superficiales, corresponden a células ganglionares jóvenes, y los mielinizados a ganglionares más antiguas (Easter Jr. *et al.*, 1984). En el pez cebra se ha descrito la presencia de abundantes oligodendrocitos en el sistema visual, desde la retina hasta el techo óptico (Münzel *et al.*, 2012; Schweitzer *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2013). Además, en estudios de pinzamiento del NO y regeneración de la ZPG en el carpín se ha demostrado que los oligodendrocitos de la CNO responden de manera diferencial a la destrucción de los axones en crecimiento sin mielinizar o a los maduros y mielinizados (Parrilla *et al.*, 2016).

En el pez cebra, estas células se caracterizan por la expresión de distintos factores de transcripción, como **olig1** (Schebesta y Serluca, 2009), **olig2** (Park *et al.*, 2002, 2007), **sox10** (Kuhlbrodt *et al.*, 1998; Stolt *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2010) y **nkx2.2a** (Kucenas *et al.*, 2009). Sin embargo, no expresan otros marcadores como **PDGFR α** (Bergles y Richardson, 2016; Park *et al.*, 2002).

Además, expresan distintas proteínas de la mielina como **mbpa** (Brösamle y Halpern, 2002; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017) y su ortólogo **mbpb** (Nawaz *et al.*, 2013); **mpz** (el equivalente a la proteína P₀ de mamíferos) (Bai *et al.*, 2011; Schweitzer *et al.*, 2003), **plp1/DM20** (Brösamle, 2010; Schweitzer *et al.*, 2006; Yoshida y Macklin, 2005), la proteína **36K** (Morris *et al.*, 2004); **Zwilling-A** y **Zwilling-B** (Schaefer y Brösamle, 2008) y **claudina κ** (Münzel *et al.*, 2012; Takada y Appel, 2010).

- El proceso de mielinización

El término “mielina” fue introducido por Virchow en 1858, antes de que se conociera su origen y función. Hoy sabemos que la vaina de mielina es una lámina membranosa aislante, compuesta en un 70% por lípidos y un 30% de proteínas, que provee de una alta resistencia eléctrica y una baja capacitancia que es esencial para la conducción saltatoria del impulso eléctrico (Buckley *et al.*, 2008; Simons y Nave, 2015) (Figura 12).

Los oligodendrocitos son las células encargadas de formar la vaina de mielina en el SNC. Se puede decir que la mielinización es una capacidad “innata” a los oligodendrocitos, puesto que *in vitro* son capaces de mielinizar axones fijados con paraformaldehído e incluso fibras de poliestireno (S. Lee *et al.*, 2012;

INTRODUCCIÓN

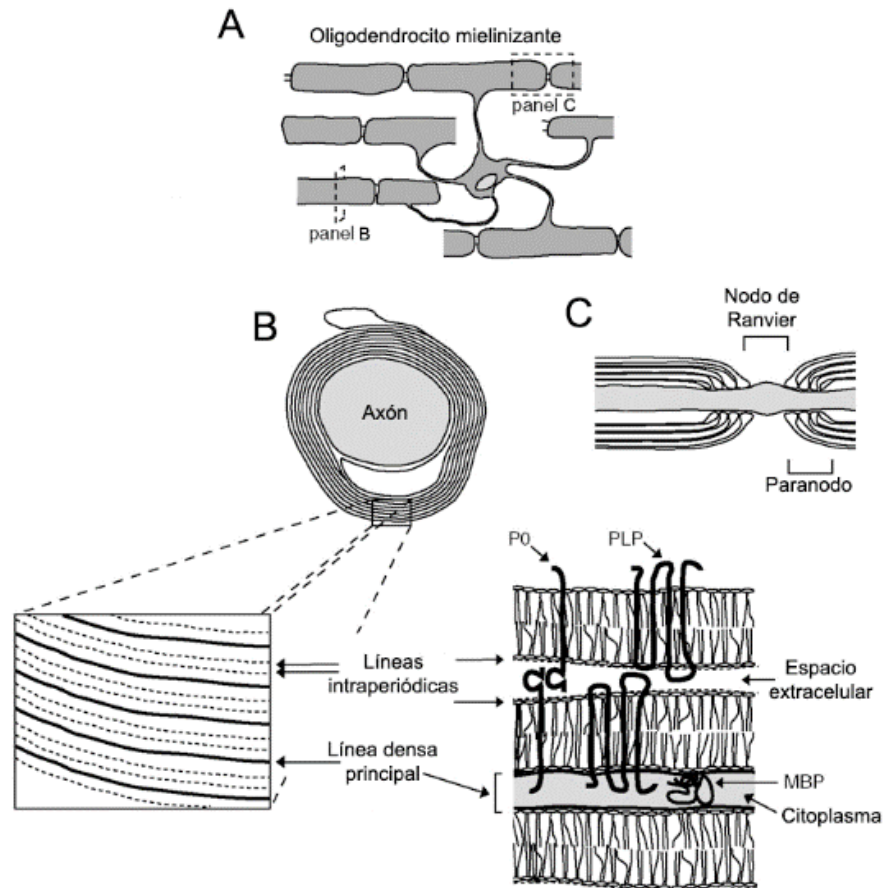


Figura 12. Estructura de la vaina de mielina. En los oligodendrocitos mielinizantes (A), podemos observar distintas estructuras de la mielina en una sección transversal de un internodo. (B): las líneas intraperiódicas, compuestas por las hemimembranas externas, y las líneas densas principales, compuestas por los citoplasmas y las hemimembranas internas. Además, es la región donde se acumula la mbp, implicada en la compactación de la mielina. Por otra parte, entre los internodos se disponen los nodos de Ranvier (C), flanqueados por los paranodos. (Modificado de Czopka y Lyons, 2011).

Rosenberg *et al.*, 2008); y el único condicionante para mielinizar un axón parece ser que este tenga un calibre mínimo (unos 400 nm) (S. Lee *et al.*, 2012; Simons y Nave, 2015). No obstante, la mielinización parece ser un proceso muy parecido a la formación de las sinapsis neuronales, puesto que *in vivo* existe una selección axonal que parece condicionada a la propia actividad sináptica del axón a mielinizar (Almeida y Lyons, 2014; Chen *et al.*, 2016; Hines *et al.*, 2015; Koudelka *et al.*, 2016). A pesar de esto, los oligodendrocitos son células muy plásticas capaces de mielinizar axones extra o de diferente calibre que le son presentados (Almeida *et al.*, 2011).

Así, el proceso de mielinización comienza con el reconocimiento oligodendrocito-axón (Figura 13). A continuación, la membrana se extiende por el axón, rodeándolo, y finalmente expandiéndose en longitud (Snaidero *et al.*, 2014). A lo largo de este proceso, las proteínas que permiten la compactación de la mielina, como mbpa, son sintetizadas en la propia vaina de mielina. Esto es debido a que el mensajero de la mbpa y el de la proteína 36K son transportados por medio de una kinesina (kif1b) por los microtúbulos (Lyons *et al.*, 2009) a través de canales citoplasmáticos (Simons y Nave, 2015), para evitar la formación de la mielina en otras regiones. Finalmente, otras proteínas como mpz y plp1a se van agregando y se forma la mielina compacta al irse añadiendo capas y capas de membrana (Snaidero *et al.*, 2014). La vaina de mielina, no obstante, puede ser discontinua a lo largo del axón, dejando partes sin mielinizar (Tomassy *et al.*, 2014). Por otra parte, además de ir acumulando capas de mielina sobre el axón, los canales de sodio se van organizando en los nodos de Ranvier (Baumann y Pham-Dinh, 2001), necesarios para la transmisión saltatoria del impulso nervioso (Figura 14).

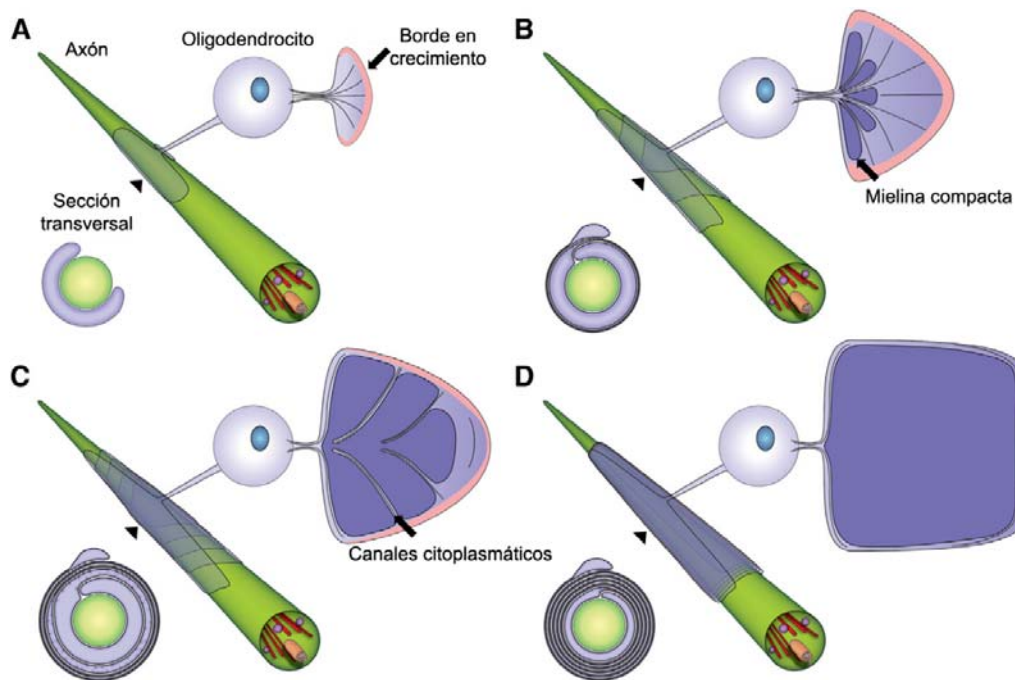


Figura 13. Mielinización en el SNC. La vaina de mielina comienza a envolver el axón (A). Se van generando más capas y se produce la mielina compacta (B). Posteriormente, la mielina compacta se extiende y aparecen los canales citoplasmáticos (C), que finalmente desaparecen con el final de la mielinización (D) (Modificado de Snaidero *et al.*, 2014).

INTRODUCCIÓN

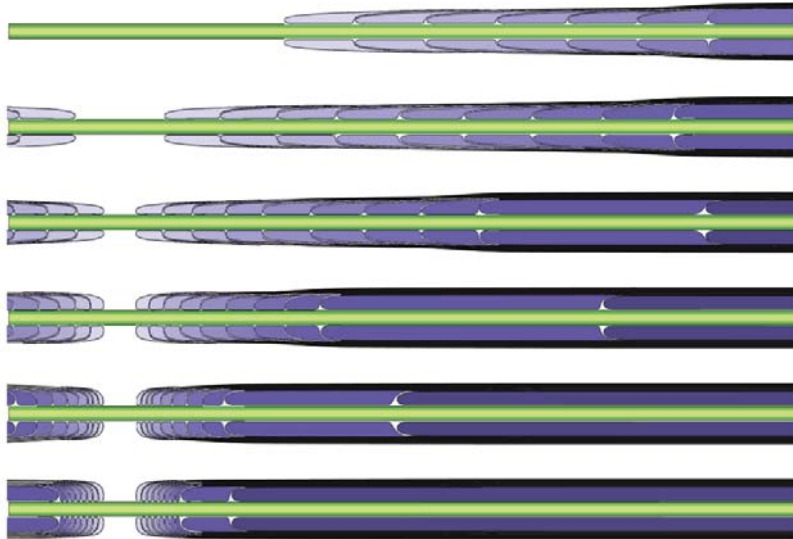


Figura 14. Modelo de formación de los Nodos de Ranvier. En orden descendente, las capas de mielina se van compactando y extendiendo hacia los laterales, hasta que coinciden con otra vaina de mielina y se forman los nodos de Ranvier, donde se disponen los canales de sodio y otras proteínas específicas (Modificado de Snaidero *et al.*, 2014).

- Genes implicados en la mielinización

El establecimiento del linaje oligodendroglial y la mielinización son procesos altamente controlados. A continuación, describimos algunos de los más importantes. En la Figura 15 se muestra un resumen de los principales genes implicados en la mielinización en el pez cebra y las interacciones existentes entre ellos.

• **Olig2**

Olig2 (*Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*) es un factor de transcripción con un dominio bHLH que es esencial en la especificación del linaje de los oligodendrocitos, tanto en mamíferos como en el pez cebra (Park *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001). En la médula espinal, los progenitores pMN *olig2*⁺ generan secuencialmente motoneuronas y oligodendrocitos (Park *et al.*, 2002; Ravanelli y Appel, 2015), aunque su fosforilación promueve el cambio de producción de un tipo celular a otro (Li *et al.*, 2011). Su patrón de expresión viene determinado por la expresión de *shh* (Esain *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2002).

La electroporación de *olig2* en la médula espinal del pollo induce tanto la expresión de *nkx2.2* (Liu *et al.*, 2007) como de *sox10* (Liu *et al.*, 2007; Zhou *et al.*,

2001). Además, en mamíferos *Olig2* determina la expresión de *Sox10* a través de su unión a regiones reguladoras de su promotor (Küspert *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013), aunque en el pez cebra *olig2* y *sox10* no interaccionan (Li *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo, *olig2* se expresa en las OPCs en la médula espinal (Park *et al.*, 2007), además de en zonas ventrales mesencefálicas, junto a *olig1* (Schebesta y Serluca, 2009). En el rombencéfalo, determina la expresión tanto de OPCs como de neuronas (Zannino y Appel, 2009). En el ratón, las OPCs que colonizan el NO expresan *Olig2* en sus nichos subventriculares y en su migración hacia el NO (Ono *et al.*, 2017).

Finalmente, la expresión de *olig2* se mantiene en el linaje oligodendroglial tras el desarrollo (März *et al.*, 2010; Münzel *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2013).

- **Sox10**

Sox10 (*Sex determining region Y-box 10*, *SRY-box*) es un factor de transcripción caracterizado por la presencia de un dominio HMG (grupo de alta movilidad) de unión al DNA al cual es capaz de unirse como un monómero o dímero, con consecuencias funcionales distintas (Peirano y Wegner, 2000). Se expresa en células oligodendrogliales (Kuhlbrodt *et al.*, 1998) y, junto a *Sox8* y *Sox9* forman la familia SoxE, y promueven la formación, diferenciación y supervivencia de las células pertenecientes al linaje de los oligodendrocitos (Wegner, 2008; Wegner y Stolt, 2005). Por otra parte, la familia SoxE se expresa en derivados de las crestas neurales, generando tejidos como el cartílago, melanocitos, ciertos tipos de neuronas sensoriales o tejido cardíaco (Haldin y LaBonne, 2010).

Sox10 también es necesario en la diferenciación de los oligodendrocitos (Stolt *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2010). Promueve la expresión de algunos genes de la mielina como la *mbpa* (Li *et al.*, 2007; Wegner, 2008; Wegner y Stolt, 2005) y *mpz* (Peirano *et al.*, 2000). Además, se piensa que promueve la expresión de genes que codifican factores que median las interacciones entre axones y oligodendrocitos, necesarias para la supervivencia de los últimos (Takada *et al.*, 2010). El factor de transcripción *Sox10* también está involucrado en el desarrollo del sistema nervioso periférico y en la mielinización del mismo (Wegner y Stolt,

INTRODUCCIÓN

2005). En el sistema nervioso adulto, la proteína Sox10 continúa presente y mantiene el fenotipo de los oligodendrocitos diferenciados (Parrilla *et al.*, 2016; Wegner y Stolt, 2005).

Los peces cebra mutantes de *sox10*, denominados *colourless (cls)*, presentan un fenotipo similar al de los ratones mutantes para *Sox10*, incluyendo una menor cantidad de melanocitos, además de una ausencia de oligodendrocitos mielinizantes (Carney *et al.*, 2006; Dutton *et al.*, 2001; Takada *et al.*, 2010). Además, las mutaciones de *SOX10* en humanos se asocian al síndrome de Waardenburg-Shah, caracterizado por defectos en el sistema nervioso entérico y en la pigmentación (Pingault *et al.*, 1998; Southard-Smith *et al.*, 1998); también causan síndromes desmielinizantes graves (Inoue *et al.*, 1999; Pingault *et al.*, 2000; Touraine *et al.*, 2000), así como tumores de células de Schwann en el SNP (Doddrell *et al.*, 2013).

- **Mbpa**

La mbp (del inglés *myelin basic protein*, “proteína básica de la mielina”) es la segunda proteína más abundante del SNC, constituyendo un 8% de las proteínas totales de la mielina del SNC y SNP (Jahn *et al.*, 2009; De Monasterio-Schrader *et al.*, 2012; Patzig *et al.*, 2011). La mbp es una proteína pequeña, altamente catiónica (Carnegie, 1971; Readhead *et al.*, 1987; Shine *et al.*, 1992) con un punto isoeléctrico teórico de 12,7 (Brösamle y Halpern, 2002). Es responsable de la adhesión de las superficies citosólicas en los axones que presentan mielina compacta, formando la línea densa principal (Boggs *et al.*, 2006; Brösamle y Halpern, 2002; Jung *et al.*, 2010). Es la única proteína indispensable para la mielinización del SNC (Popko *et al.*, 1987; Readhead *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 2013), y su transcrito, junto al de la proteína 36K, es transportado por kinesinas (*kif1b*) por el citoplasma hasta el lugar de mielinización (Lyons *et al.*, 2009).

La secuencia de la mbp de peces y mamíferos está bastante conservada, poseyendo un 40% de semejanza en su secuencia de aminoácidos respecto al ratón (Brösamle y Halpern, 2002; Buckley *et al.*, 2008; Nawaz *et al.*, 2013). En el pez cebra existen dos isoformas: mbpa y mbpb (Nawaz *et al.*, 2013). Así, mientras *mbpa* posee 6 exones, *mbpb* posee 5 exones (Nawaz *et al.*, 2013). Tanto *mbpa* como *mbpb* producen varios transcritos por *splicing* alternativo

(Nawaz *et al.*, 2013); y, además, *mbpb* está codificada en un único gen que produce tanto el transcrito de *mbpb* como el de *golli* (*gene of oligodendrocyte lineage*). Sin embargo, la expresión de *mbpa* y *mbpb* en células oligodendrogiales es similar durante el desarrollo (Nawaz *et al.*, 2013)

Durante el desarrollo embrionario del pez cebra, la mbp es la primera proteína de la mielina en expresarse, hacia los 3 días post-fecundación (dpf), en oligodendrocitos en la médula espinal (Buckley *et al.*, 2010), aunque su transcrito (*mbpa*) se detecta a los 2dpf en el rombencéfalo ventral (Brösamle y Halpern, 2002). Tras el desarrollo, la *mbpa* continúa expresándose (Jung *et al.*, 2010), y se detecta por todo el SNC de peces adultos, incluido el sistema visual (Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2016; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2013).

- **Mpz**

La mpz (del inglés *myelin protein zero* o P₀ en mamíferos), es una glicoproteína transmembrana tipo 1 con un dominio extracelular N-terminal tipo Ig (inmunoglobulina), de unos 23,5 kDa (Bai *et al.*, 2011). A diferencia de mamíferos, donde únicamente se expresa en el SNP, en el pez cebra la mpz se expresa tanto en el SNC como en el SNP (Bai *et al.*, 2011; Brösamle y Halpern, 2002; Schweitzer *et al.*, 2003); y de forma similar en la trucha, generando las proteínas ortólogas IP1 e IP2 (Brösamle y Halpern, 2002).

La proteína mpz del pez cebra posee un 46% de homología respecto al ratón, aunque su dominio extracelular tipo Ig está mucho más conservado que los dominios intracelulares (Brösamle y Halpern, 2002; Schweitzer *et al.*, 2003). Además, el promotor del gen de la mpz de peces muestra un mayor grado de homología con el promotor de la Plp de ratones, en vez de la P₀ (Jeserich *et al.*, 2008). El transcrito de la *mpz* también sufre procesos de *splicing* alternativo generando dos variantes (TV1 y TV2) que se diferencian en el extremo 3' (Bai *et al.*, 2011).

La mpz interviene en la compactación de las vainas de mielina en el SNP de mamíferos, mediante mecanismos de unión homofílica (D'Urso *et al.*, 1990; Filbin *et al.*, 1990; Schneider-Schaulies *et al.*, 1990; Shapiro *et al.*, 1996). Sin embargo, en peces esta función parece recaer sobre la Plp/DM20 (Schweitzer *et al.*, 2006).

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, ratones mutantes para *Mpz* muestran nervios gravemente hipomielinizados durante el desarrollo (Giese *et al.*, 1992)

Durante el desarrollo, la expresión de *mpz* se detecta sobre las 16-24 horas post-fecundación (hpf) en la médula espinal rostral y en el rombencéfalo ventral, aumentando secuencialmente hasta que a las 96 hpf se detecta en la mayor parte del SNC en desarrollo (Brösamle y Halpern, 2002; Schweitzer *et al.*, 2003). Sin embargo, la proteína no se detecta hasta las 72-96 hpf (Bai *et al.*, 2011; Brösamle y Halpern, 2002; Buckley *et al.*, 2010).

En el sistema visual, la *mpz* se detecta a los 7dpf en el NO, QO y en los TR, aunque su mensajero es detectable ya a los 5dpf en el QO (Schweitzer *et al.*, 2003). Sin embargo, no se detecta en el techo óptico hasta los 28 dpf (Bai *et al.*, 2011). Su expresión se mantiene en los oligodendrocitos hasta estadios adultos, detectándose en el sistema visual desde el NO hasta los TO, pero excluyendo a la CNO (Bai *et al.*, 2011; Münzel *et al.*, 2012; Schweitzer *et al.*, 2003).

Por último, la expresión de la *mpz* en peces cebra adultos aumenta significativamente tras una lesión del SNC, incluido el pinzamiento del NO (Bai *et al.*, 2014; Schweitzer *et al.*, 2003). Sin embargo, el aumento de la expresión no es dependiente de la regeneración axonal, sugiriendo que la señal desencadenante debe ser el daño axonal o tal vez pueda deberse a la activación de la microglía (Bai *et al.*, 2014).

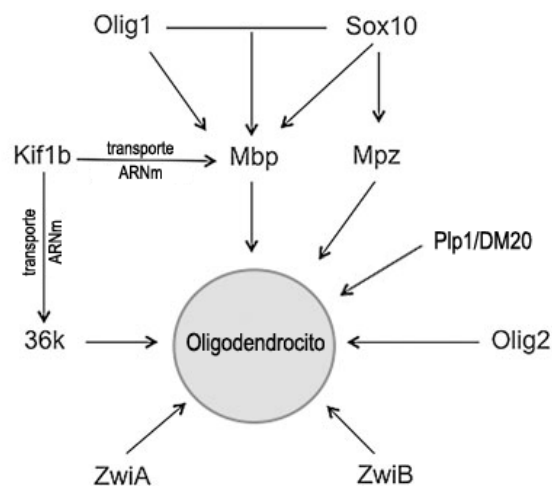


Figura 15. Esquema de la regulación transcripcional en los oligodendrocitos del pez cebra (Modificado de Zhao *et al.*, 2014).

- **Glutamina Sintetasa (GS)**

La GS es una enzima (EC 6.3.1.2) que se encarga de sintetizar glutamina a partir de glutamato y NH_3 , consumiendo ATP en el proceso (Suárez *et al.*, 2002). Se expresa en distintos órganos (Lie-Venema *et al.*, 1998), entre ellos el cerebro, donde su actividad es bastante alta (Wright *et al.*, 2007). Su gen, *glul*, está considerado uno de los genes funcionales más antiguos (Kumada *et al.*, 1993), y los mamíferos (humanos incluidos) poseen una isoforma y varios pseudogenes (Kuo y Darnell, 1989; Wang *et al.*, 1996).

En los peces también han sido caracterizadas varias isoformas en la trucha (Murray *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2007), y en el pez cebra se han encontrado tres parálogos, *glula*, *glulb* y *glulc* (Dhanasiri *et al.*, 2012). Según las bases de datos genómicas, cada uno de estos tres parálogos posee varios transcritos, pero no todos ellos producen una proteína (Dhanasiri *et al.*, 2012). Filogenéticamente, *glula* y *glulb* se encuentran mucho más relacionados evolutivamente entre ellos y con los de otros peces que con *glulc*, que se encuentra mucho más cerca de los genes *glul* de tetrápodos (Dhanasiri *et al.*, 2012). De forma similar, en la trucha también existen dos grandes ramas evolutivas en sus genes *glul* (Murray *et al.*, 2003). Por otra parte, estudios de la expresión de los distintos transcritos de los tres parálogos en cerebro, hígado y riñón tras un aumento de los niveles de amonio en el agua revelaron una respuesta diferencial de todos ellos (Dhanasiri *et al.*, 2012). Esta respuesta diferencial también se ha observado en el cerebro de la trucha (Wright *et al.*, 2007).

La regulación de la GS es compleja. A nivel génico se produce, entre otros, a través del promotor del gen *glul*, que contiene elementos de respuesta a glucocorticoides no solo en mamíferos (Eid *et al.*, 2013) sino también en peces (Dhanasiri *et al.*, 2012). Los propios niveles de amonio son capaces de producir un incremento en la expresión de *glul* en astrocitos (Suárez *et al.*, 2002) así como en el cerebro de la trucha (Wright *et al.*, 2007). Además, existen otros factores que regulan la expresión de la GS en astrocitos, entre otros: el glutamato (Suárez *et al.*, 2002), BDNF (Dai *et al.*, 2012), la insulina, el óxido nítrico (NO) (Kosenko *et al.*, 2003) y componentes de la matriz extracelular (Moreno *et al.*, 2005).

INTRODUCCIÓN

También se ha sugerido que transcritos no traducidos de los distintos parálogos de *glul* en el pez cebra pueden regular su traducción (Dhanasiri *et al.*, 2012).

La principal función de la GS en el SNC es convertir el glutamato en glutamina, evitando los procesos de excitotoxicidad glutamatérgica (Ishikawa, 2013; Zou *et al.*, 2010), aunque también interviene en la producción de GABA a través de la síntesis de glutamina, así como indirectamente en el ciclo de Krebs (Albrecht *et al.*, 2007).

La presencia de la GS en los oligodendrocitos ha sido ampliamente descrita en mamíferos, tanto en estudios *in vitro* (Baas *et al.*, 1998; Fressinaud *et al.*, 1991) como en secciones de tejido (Anlauf y Derouiche, 2013; Bernstein *et al.*, 2014; D'Amelio *et al.*, 1990; Miyake y Kitamura, 1992; Rai *et al.*, 2013; Tansey *et al.*, 1991), incluso en el NO de mamíferos (Domercq *et al.*, 1999; Jennings *et al.*, 2002; Kawano, 2015). También ha sido descrita su expresión en las células de Schwann en el SNP (Miller *et al.*, 2002; Saitoh y Araki, 2010), donde la expresión y degradación proteasomal de la GS determinan su diferenciación (Saitoh y Araki, 2010). En trabajos anteriores de nuestro grupo, detectamos oligodendrocitos GS⁺ en el NO del carpín dorado (Parrilla *et al.*, 2009; Parrilla, 2010), así como GS en el NO mediante *western blot* (Parrilla *et al.*, 2009).

Existen numerosos estudios que describen la variación de los niveles de expresión de *glul* en oligodendrocitos con enfermedades como la esclerosis múltiple (Werner *et al.*, 2001), y también se ha comprobado que un metabolismo anormal del glutamato está implicado en ciertos tipos de epilepsia (Eid *et al.*, 2013). Además, la GS contribuye al funcionamiento de los oligodendrocitos (Fressinaud *et al.*, 1991; Kugler y Beyer, 2003). De hecho, una actividad deficiente de la GS en la sustancia blanca afecta a la actividad de la corteza cerebral y del NO (Hardin-Pouzet *et al.*, 1997; Marignier *et al.*, 2010). La GS de los oligodendrocitos del NO de rata también disminuye, junto con la mielinización, cuando se expone a metales pesados (Rai *et al.*, 2013).

- Origen de los oligodendrocitos

Los oligodendrocitos proceden de las denominadas OPC (del inglés *Oligodendrocyte Progenitor Cells*, “Células progenitoras de oligodendrocitos”), que se generan en distintas partes de las zonas germinales ventriculares del tubo neural embrionario (Bergles y Richardson, 2016). En el pez cebra, los primeros oligodendrocitos aparecen alrededor de los 2dpf en la médula espinal (Park *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003), aunque el comienzo de la mielinización se produce a los

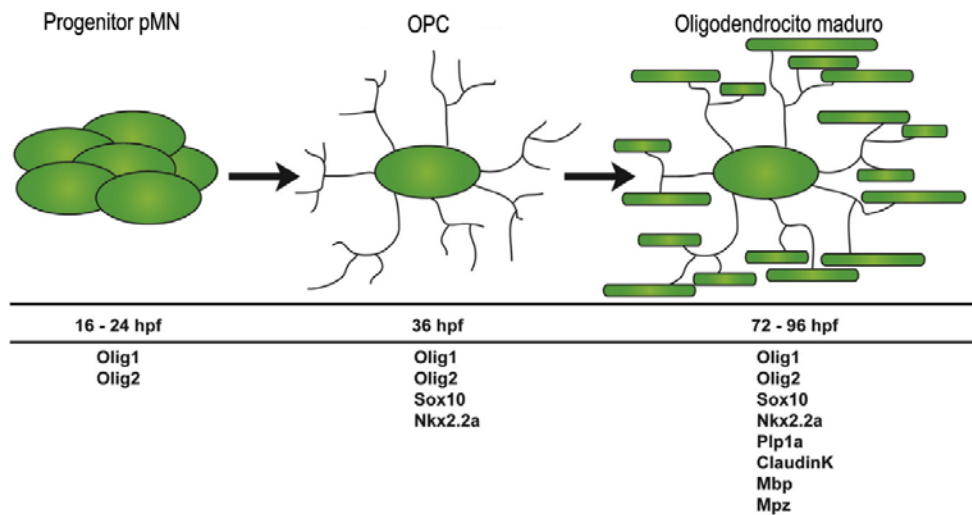


Figura 16. Linaje de los oligodendrocitos en el pez cebra. Se muestra la expresión de los distintos genes en cada uno de los estadios de maduración del linaje oligodendrogial (Modificado de Mathews y Appel, 2016).

3dpf (Buckley *et al.*, 2010), y posteriormente en zonas encefálicas (Brösamle y Halpern, 2002). Estos oligodendrocitos de la médula espinal son los primeros en formarse (16-24 hpf), y provienen de precursores situados ventralmente (denominados pMN), que expresan *olig1* y *olig2* y que son capaces de generar motoneuronas primero y oligodendrocitos después (Park *et al.*, 2002; Ravanelli y Appel, 2015) (Figura 16). Una vez especificados hacia el linaje oligodendrogial, estos precursores de oligodendrocitos u OPCs expresan *sox10* (Takada *et al.*, 2010), y se dividen y migran a lo largo de la médula espinal para mielinizar los axones (Miller, 2002; Takada *et al.*, 2010), en un proceso altamente refinado (Kirby *et al.*, 2006). A continuación, en un periodo únicamente de 5 horas (Czopka *et al.*, 2013), las OPCs comienzan a formar sus vainas de mielina alrededor de los axones y comienzan a expresar *mbp*, *mpz* y otras proteínas estructurales de la mielina (Buckley *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2010). Este proceso

INTRODUCCIÓN

de mielinización se extiende a lo largo del tiempo (Jung *et al.*, 2010); y, por ejemplo, en el caso de los humanos continúa durante varios años tras el nacimiento (Miller *et al.*, 2012). Se muestra un resumen de todo el proceso en la Figura 17.

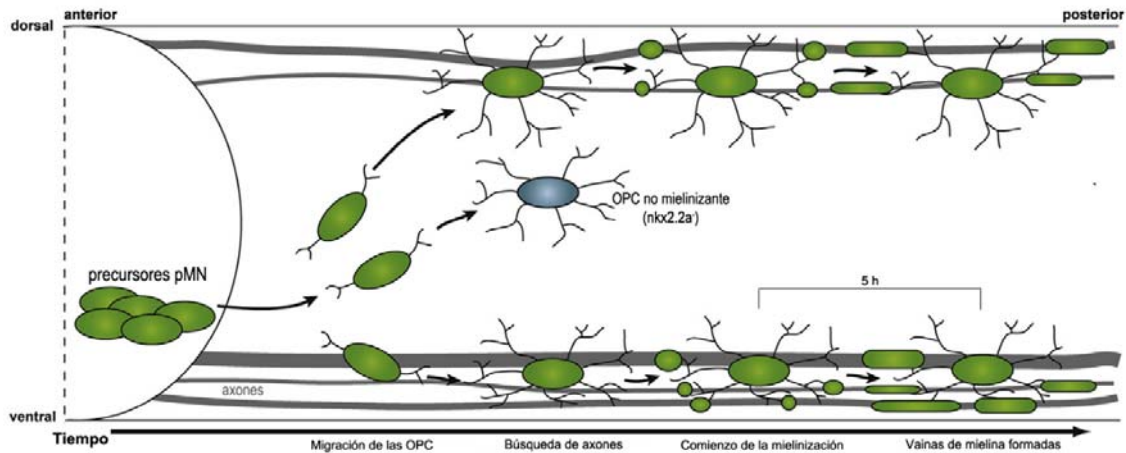


Figura 17. Especificación de los oligodendrocitos en la médula espinal del pez cebra. Las OPCs generadas a partir de precursores pMN migran dorsal y ventralmente hasta llegar a los axones que van a mielinizar. Tras la migración, extienden sus procesos hasta contactar con los axones, los envuelven y generan las vainas de mielina. El proceso de mielinización desde el contacto con los axones hasta el establecimiento de la mielina se produce en una ventana de 5 h. No todas las OPCs se diferencian a oligodendrocitos maduros, quedando una parte de ellas como OPCs no mielinizantes (Modificado de Mathews y Appel, 2016).

Durante el proceso de la especificación de los precursores pMN hacia oligodendrocitos mielinizantes, tanto en mamíferos como en peces, resulta clave la expresión coordinada de *sonic hedgehog (shh)* (Chung *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2004; Schebesta y Serluca, 2009), **Wnt** (Azim y Butt, 2011), **Notch** (Kearns *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2005; Snyder *et al.*, 2012) y **Erb/EGF** (Lyons *et al.*, 2005; Pruvot *et al.*, 2014).

Por otra parte, los oligodendrocitos del sistema visual de mamíferos y aves provienen de múltiples focos reducidos del neuroepitelio germinal (Spassky *et al.*, 1998), concretamente del área preóptica, situada en la zona ventral del tercer ventrículo del cerebro y caudalmente al QO (Gao y Miller, 2006; Merchán *et al.*, 2007; Miller, 2002; Ono *et al.*, 1997, 2017). Estas OPCs comienzan a migrar hacia el NO y la retina cuando los axones de las células ganglionares han llegado al prosencéfalo (Ono *et al.*, 1997, 1998; Tsai y Miller, 2002), y expresan *olig2* (Ono *et al.*, 2017). En mamíferos se detienen en la lámina cribosa (ffrench-

Constant *et al.*, 1988; Perry y Lund, 1990; Tsai y Miller, 2002), y no son detectados en la retina. Sin embargo, en los peces los oligodendrocitos intrarretinales penetran a través del NO, detectándose en la retina alrededor de los 28 dpf (Tian *et al.*, 2016).

El proceso de migración de las OPCs hacia el NO está influenciado por Shh (Gao y Miller, 2006; Merchán *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 1997). Además, existen distintas señales quimioatrayentes o quimiorepelentes que modulan este proceso (Sugimoto *et al.*, 2001), como la Netrina-1, que atrae primero a las OPCs por el NO y luego evita su entrada en la retina (Bribián y de Castro, 2007; Sugimoto *et al.*, 2001). Hay también otras moléculas implicadas, como las semaforinas, FGF-2 y el anteriormente citado shh (Bribián *et al.*, 2006; Bribián y de Castro, 2007; Merchán *et al.*, 2007; Spassky *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2001).

A pesar de lo anterior, no se conocen con exactitud los factores que evitan la entrada de los oligodendrocitos en la retina de mamíferos, aunque parecen estar implicadas la Netrina-1, BMPs y determinadas moléculas de la matriz extracelular (Deiner *et al.*, 1997; Gao y Miller, 2006; Kiernan *et al.*, 1996; Tsai y Miller, 2002), así como la anosmina-1 (Bribián *et al.*, 2008) (Figura 18).

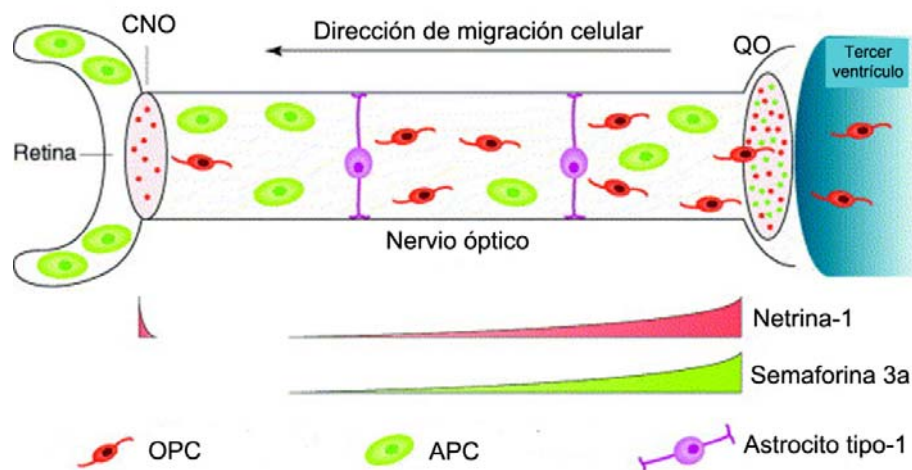


Figura 18. Esquema que representa la migración de los precursores gliales: APCs y OPCs a lo largo del NO de rata. APCs y OPCs son guiados por gradientes difusibles de Semaforina 3a y Netrina-1 respectivamente, originados en la región del QO. La migración de los OPCs es inhibida en la CNO en parte por la expresión local de Netrina-1. Las APCs atraviesan la CNO y llegan a la retina (Modificado de Tsai y Miller, 2002).

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, no existen estudios sobre el origen concreto de los oligodendrocitos del NO de los peces. Sin embargo, mediante estudios de hibridación *in situ* se ha detallado la expresión de *plp1/DM20* en el NO a los 4dp; aunque, con microscopía electrónica, en el mismo estudio no se detectaron axones mielinizados hasta los 7dpf (Brösamle y Halpern, 2002). De acuerdo con estas observaciones, la expresión de *mpz* no se detecta en el NO hasta los 7dpf (Bai *et al.*, 2011).

5.3 Microglía

Las células de la microglía son células fagocíticas altamente especializadas, dedicadas a la defensa del SNC (Ransohoff y Cardona, 2010). A diferencia de las células macrogliales del SNC, poseen un origen mesodérmico (Navascués *et al.*, 2000; Stoll y Jander, 1999), y derivan de macrófagos primitivos que migran desde el saco vitelino hacia el SNC (Herbomel *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2012) para luego diferenciarse en microglía residente (Ginhoux *et al.*, 2010; Herbomel *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2012; Sieger y Peri, 2013; Svahn *et al.*, 2013). Así, los primeros macrófagos en el pez cebra se generan a partir de células mesodérmicas de la parte anterior y comienzan a migrar hacia las 24hpf por todo el embrión (Le Guyader *et al.*, 2008; Herbomel *et al.*, 1999, 2001), incluido el SNC. Estos macrófagos primitivos del SNC comienzan a diferenciarse en microglía sobre las 60hpf (Herbomel *et al.*, 2001; Peri y Nüsslein-Volhard, 2008).

Las células de microglía se encuentran por tanto en la retina y en el NO de teleósteos. Existen dos tipos de microglía según su estado de activación: la microglía residente o ramificada, que permanece en estado latente hasta que se activa ante situaciones patológicas transformándose en microglía ameboide o reactiva, con alta capacidad de migración y encargada de la fagocitosis de los desechos del sistema nervioso (Fulcrand y Privat, 1977; Lillo *et al.*, 2001; Springer y Wilson, 1989; Thanos *et al.*, 1992). La función principal de la microglía es responder ante situaciones patológicas. Así, ante lesiones, inflamaciones o infecciones del SNC actúan como macrófagos (Perry y Gordon, 1988; Río Hortega, 1932; Streit *et al.*, 1988) y modulan el grado de la respuesta inmune liberando citoquinas (Frei *et al.*, 1987), factores neuroprotectores y neurotoxinas (Barron, 1995; Giulian, 1987; Giulian y Baker, 1986; Giulian y Corpuz, 1993; Giulian y Young, 1986).

Se han realizado estudios en los que tras el pinzamiento del NO del pez cebra se aprecia un incremento en la cantidad de microglía en la retina tras la lesión (Zou *et al.*, 2013). De forma similar, los niveles de microglía aumentan al inyectar sustancias proinflamatorias en la retina, no sólo en pez cebra sino también en mamíferos (Fischer *et al.*, 2000; Leon *et al.*, 2000; Lorber *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2013). También se ha comprobado que la superfamilia de la IL-6 estimula la regeneración axonal de forma autocrina/paracrina, especialmente a través de LIF (Factor Inhibidor de la Leucemia) (Elsaeidi *et al.*, 2014; Ogai *et al.*, 2014).

Todos estos datos sugieren que el desencadenante de todo el proceso regenerativo es un primer proceso inflamatorio, tanto en mamíferos como en los peces (Kyritsis *et al.*, 2012, 2014). En lesiones desmielinizantes en el NO del pez cebra, se ha comprobado que el proceso inflamatorio es necesario para una remielinización correcta (Münzel *et al.*, 2014). Sin embargo, dicho proceso no se lleva a cabo de forma tan rápida y efectiva en animales envejecidos, ya que no se recluta tan efectivamente a la microglía (Münzel *et al.*, 2014). De forma similar, el sistema inmune también envejece (Salminen *et al.*, 2012; Streit y Xue, 2013; Wong, 2013), y se ha comprobado que los procesos regenerativos no son tan eficientes en animales envejecidos (Becker *et al.*, 1997; Bernstein, 1964; Van houcke *et al.*, 2015; Münzel *et al.*, 2014). A la reducción en la regeneración según aumenta la edad se le ha denominado *inflammaging* (del inglés *inflammation* y *aging*; inflamación y envejecimiento) (Bollaerts *et al.*, 2017).

INTRODUCCIÓN

6. Desarrollo del sistema visual

- Formación de la copa óptica

La especificación de la región del embrión a partir de la cual se originará la retina, comienza en la gastrulación cuando se forma el **campo morfogénético del ojo** en la región más anterior de la placa neural (Li *et al.*, 1997). Entre las 11 y las 13 hpf se produce la migración lateral de las células del campo del ojo, de manera que se originan los **primordios ópticos** como dos expansiones bilaterales que permanecen unidas al encéfalo por los llamados **tallos ópticos**, situados en la región más anterior del embrión (Li *et al.*, 1997; Schmitt y Dowling, 1994). El lumen de los primordios se desarrolla a las 13 hpf, y la unión de este lumen con los ventrículos se produce a las 16 hpf (Hyatt *et al.*, 1992). Los primordios ya cavitados se denominan **vesículas ópticas** (Figura 19).

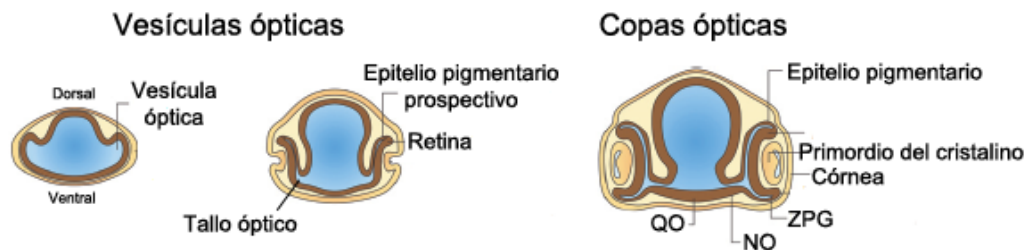


Figura 19. Esquema de la formación de las copas ópticas a partir de las vesículas ópticas (Modificado de Graw, 2010).

A medida que avanza el desarrollo, las vesículas ópticas experimentan una rotación según su eje naso-temporal, de forma que la superficie ventral de las mismas se dirige hacia el encéfalo y la dorsal hacia el exterior (Schmitt y Dowling, 1994). Simultáneamente se invagina la superficie externa de cada vesícula óptica, a la vez que el ectodermo cutáneo adyacente se engrosa para constituir los **primordios de los cristalinos**. A medida que la invaginación continúa, la vesícula óptica va dando lugar a la **copa óptica** (Figura 19), cuya conexión con el encéfalo se reduce a una estrecha abertura en posición nasal que se continúa por el tallo óptico, y se conoce como **fisura coroidea** (Schmitt y Dowling, 1994). A las 24 hpf la copa óptica ya está formada (Schmitt y Dowling, 1994) y se encuentra organizada en dos regiones: la región distal, que es un neuroepitelio indiferenciado que dará lugar a la retina neural, y la región proximal, que es un

estrato de células que dará lugar al epitelio pigmentario (Figura 19). Ambas regiones están separadas por el **lumen óptico**, que desaparecerá más adelante en el desarrollo.

- Formación de la retina y el nervio óptico

La formación de la retina o retinogénesis es el conjunto de procesos mediante los cuales el neuroepitelio indiferenciado y el epitelio pigmentario, que constituyen la copa óptica, se fusionan y dan lugar a la retina, con sus diferentes capas y tipos celulares. La neurogénesis y la diferenciación celular comienzan en la región ventro-nasal de la copa óptica, adyacente a la fisura coroidea y el tallo óptico, en respuesta a señales procedentes del tallo óptico del embrión (Masai *et al.*, 2000). Las primeras células postmitóticas se encuentran en esa región a partir de las 24 hpf y se diferencian a células ganglionares. La formación de estas células progresa hacia la región dorsal de la copa óptica y de ahí se extiende hacia la región ventro-temporal, describiendo un círculo en el sentido de las agujas del reloj (Hu y Easter Jr., 1999; Kljavin, 1987; Schmitt y Dowling, 1999).

Los diferentes tipos celulares son generados secuencialmente y la retina se forma capa a capa, desde la región vitreal hacia la parte escleral, siguiendo el mismo patrón, en el sentido de las agujas del reloj (Hu y Easter Jr., 1999). Los precursores de las células ganglionares sufren sus mitosis finales entre las 24 y las 36 hpf y las células de la capa nuclear interna entre las 36 y las 48 hpf.

Los axones de las células ganglionares comienzan a crecer a las 30 hpf, se adentran en el tallo óptico a través de la fisura coroidea y alcanzan la línea media del embrión, donde pocas horas después formarán el **quiasma óptico** (Burrill y Easter Jr., 1995; Hu y Easter Jr., 1999). A la vez que los axones avanzan, las células del tallo óptico se diferencian a células gliales $pax2^+$, que delimitan la fisura coroidea y están directamente involucradas en su cierre (Macdonald *et al.*, 1995, 1997). Estas células participan en la guía de los axones de las células ganglionares de la retina (Stuermer y Bastmeyer, 2000), sintetizando moléculas quimioatrayentes como Netrina-1 (Figura 21). Mientras los axones van creciendo y saliendo de la copa óptica, el tallo óptico va desapareciendo y en su lugar quedan los axones, células gliales y vasos sanguíneos, que en conjunto

INTRODUCCIÓN

constituyen el NO. Los axones del NO alcanzan la región anterior del techo óptico a las 48 hpf (Burrill y Easter Jr., 1995; Stuermer, 1988).

A los 3 dpf, se han diferenciado las células de Müller y los fotorreceptores. A partir de ese estadio los axones del nervio óptico inervan también la región posterior del techo óptico y la retina ya tiene sus capas organizadas. Además, en el margen de la retina se distingue la ZPG. De esta manera, la retina crece en anillos concéntricos a partir de la ZPG de manera indefinida desde el estadio de larva de 3 dpf. A partir del estadio de 5 dpf, la retina presenta una organización histológica con todas las capas nucleares y plexiformes que se reconocen en el animal adulto, además de la ZPG (Figura 20).

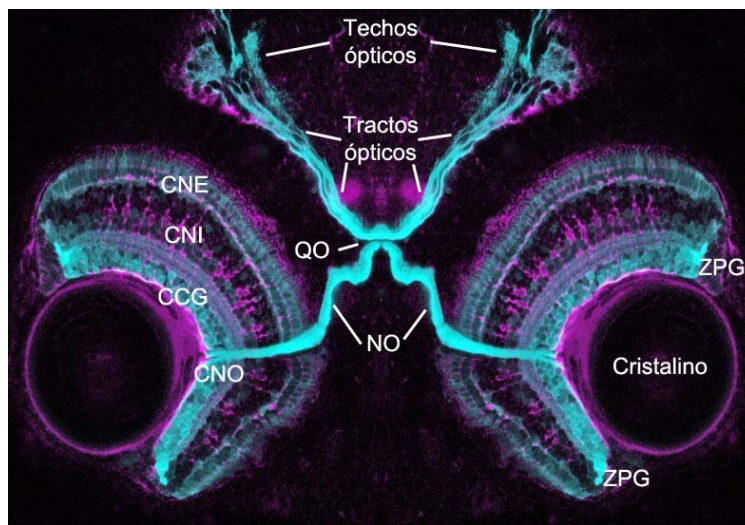


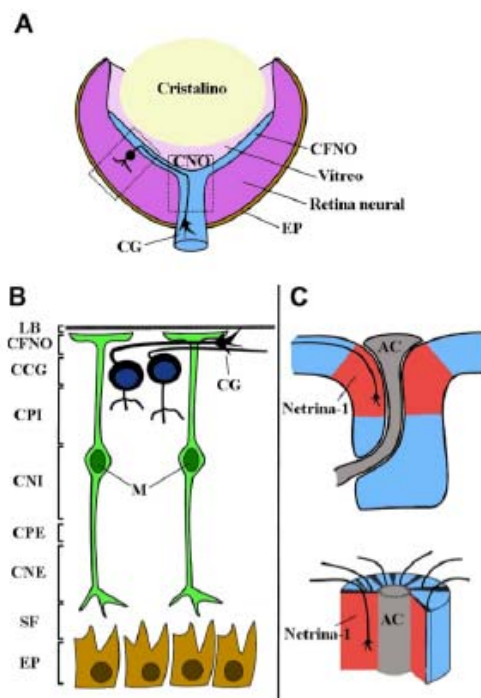
Figura 20. Larva de 4dpf de pez cebra mostrando la retina completamente formada. En azul se marcan los axones de las células ganglionares, que se proyectan hasta los techos ópticos contralaterales. Modificado de: <https://wellcomeimages.org> Ref. B0007779 (K. L. Cerveny y S. W. Wilson)

- Formación de la CNO

Como hemos visto, cuando los primeros axones de las células ganglionares salen del ojo, la retina está todavía conectada al cerebro anterior por el **tallo óptico**, estructura que presenta características neuroepiteliales y que constituye el sustrato para que los axones se extiendan desde el ojo hacia el diencefalo. La ruta de salida de los conos de crecimiento se mantiene por la **fisura coroidea**, que permite su acceso desde la CNO hacia el tallo óptico. Posteriormente, cuando la fisura coroidea se cierra, los axones en crecimiento pasan a formar parte de una estructura circular denominada **disco óptico** (DO). A la vez que

estos axones avanzan, células epiteliales del tallo óptico se diferencian a las primeras células gliales, que se localizan delimitando la fisura y se encuentran directamente involucradas en su cierre (Macdonald *et al.*, 1995). Cuando la fisura se está cerrando, estas células se retienen alrededor del DO, y se extienden hacia la CNO, contribuyendo a la guía de axones hacia el NO (Stuermer y Bastmeyer, 2000).

Durante el periodo de salida de los axones desde la retina, el tallo óptico es reemplazado gradualmente por el NO, y las células epiteliales del tallo óptico mueren o se diferencian a células gliales del NO maduro. Como se ha descrito en el apartado anterior, las primeras células ganglionares diferenciadas aparecen sobre las 30hpf y se localizan en la región ventro-nasal de la retina próxima a la CNO recién formada. Estos axones pioneros no tienen axones previos que actúen como guía. Por otro lado, las células que se originen más tarde se irán añadiendo hacia la periferia, de manera que los axones tienen que encontrar su camino hacia el NO en diferentes momentos durante el desarrollo y, cada vez, deben recorrer distancias mayores desde su lugar de origen (Figura 21) (Oster *et al.*, 2004; Stuermer y Bastmeyer, 2000). Todos los axones de las células ganglionares proyectan hacia la parte vitreal de la capa de neuroepitelio, donde contactan con los pies de las células neuroepiteliales y, posteriormente,



INTRODUCCIÓN

con los pies de las células de Müller que se van diferenciando durante la retinogénesis (Figura 21) (Stuermer y Bastmeyer, 2000).

*“Afirmaciones extraordinarias requieren siempre de
evidencia extraordinaria”*

Carl Sagan
Cosmos, episodio
"Enciclopedia Galáctica"

Justificación y objetivos

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, el SNC de los peces es capaz de regenerarse tras ser lesionado (Sperry, 1948; Wolburg, 1981a). El sistema visual de los teleósteos, que forma parte del SNC, ha sido ampliamente utilizado en estudios experimentales de lesión/regeneración debido a su fácil acceso y manipulación (Becker y Becker, 2008; Toru Matsukawa *et al.*, 2004), realizándose todo tipo de manipulaciones, desde pinzamiento del NO (Parrilla *et al.*, 2013; Velasco *et al.*, 1995) hasta lesiones en los fotorreceptores de la retina (Thummel *et al.*, 2008). También al contrario de los mamíferos, la retina de los peces presenta mielinización (Wolburg, 1980), lo que posibilita que en estos animales podamos estudiar la respuesta de los oligodendrocitos en un entorno regenerante (Ankerhold y Stuermer, 1999; Parrilla *et al.*, 2016; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios que existen sobre los oligodendrocitos en el sistema visual de peces adultos (Ankerhold y Stuermer, 1999; Münzel *et al.*, 2012, 2014; Nona, 1995; Nona *et al.*, 1992, 2000; Parrilla *et al.*, 2016; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017; Schweitzer *et al.*, 2003), no encontramos ninguno que se haya centrado en la caracterización inmunohistoquímica completa y rigurosa de los oligodendrocitos de la CNO, una estructura que nuestro grupo de investigación ha demostrado que es clave en los procesos de regeneración del sistema visual (Lillo *et al.*, 1998, 2002; Parrilla, 2010). Por otra parte, disponemos de numerosos estudios que muestran la expresión de la GS en los oligodendrocitos de mamíferos (Anlauf y Derouiche, 2013; Baas *et al.*, 1998; Bernstein *et al.*, 2014; Domercq *et al.*, 1999; Fressinaud *et al.*, 1991; Jennings *et al.*, 2002; Kawano, 2015) o en las células de Schwann (Miller *et al.*, 2002; Saitoh y Araki, 2010), donde incluso la expresión de la GS determina la diferenciación de estas células (Saitoh y Araki, 2010). A pesar de esto, no existen estudios publicados sobre peces en los que se demuestre su presencia en los oligodendrocitos, aunque en trabajos previos en nuestro laboratorio ya habíamos evidenciado la presencia de la GS en el NO del carpín (Parrilla *et al.*, 2009). Finalmente, y aunque disponemos de un amplio conocimiento sobre el origen de los oligodendrocitos del sistema visual en aves y mamíferos (Merchán *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 1997, 2017), no se conoce con exactitud su origen en los peces, a pesar de que su especificación en la médula espinal ha sido muy bien

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

documentada (Buckley *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2003; Takada *et al.*, 2010).

Así, decidimos utilizar el pez cebra ya que en los últimos años se ha convertido en un modelo muy versátil para el estudio de los oligodendrocitos y del proceso de mielinización (Brösamle y Halpern, 2002; Buckley *et al.*, 2010; Kirby *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Lyons *et al.*, 2009; Monk y Talbot, 2009; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017; Pogoda *et al.*, 2006; Takada *et al.*, 2010). Una de sus características, de gran utilidad práctica, es su rápido desarrollo, ya que en tan sólo 3 días podemos disponer de una larva completamente desarrollada (Westerfield, 2000) que presenta comportamientos complejos hacia los 5 dpf (Czopka, 2015). Además, mientras que en los mamíferos los procesos de mielinización ocurren en los primeros días tras el nacimiento, en el pez cebra las OPCs se originan hacia las 48 hpf, expresando genes de la mielina hacia las 60 hpf (Brösamle y Halpern, 2002; Buckley *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2002). Por otra parte, se generan nuevos oligodendrocitos hasta al menos un mes post-fertilización (Park *et al.*, 2007), aunque la mielinización prosigue hasta alcanzar la edad adulta (Jung *et al.*, 2010).

Por último, el genoma del pez cebra es fácilmente manipulable, por lo que existen numerosos modelos transgénicos y/o mutantes disponibles para el estudio de los procesos de mielinización (Dutton *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2010; Münzel *et al.*, 2012; Schebesta y Serluca, 2009; Shin *et al.*, 2003; Takada *et al.*, 2010).

De esta forma, nuestra hipótesis de trabajo fue que los oligodendrocitos del sistema visual del pez cebra juegan un papel clave en los procesos de crecimiento continuado y regeneración; que su linaje parece presentar una gran complejidad bioquímica y que pueden estar interrelacionados de forma íntima con el linaje astrogial. Por otra parte, nos planteamos que el posible origen de los oligodendrocitos de la vía visual durante el desarrollo embrionario se podría situar en áreas encefálicas similares a las observadas en otros grupos animales.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Para comprobar estas hipótesis nos marcamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar inmunohistoquímicamente los oligodendrocitos de la vía visual del pez cebra, tanto en animales control como tras el pinzamiento del NO, prestando un especial interés a la CNO.
2. Analizar la respuesta de la GS y otros genes implicados tanto en el linaje oligo y astrogial y en la mielinización a lo largo del proceso regenerativo.
3. Caracterizar los oligodendrocitos de la vía visual durante el desarrollo del SNC del pez cebra e intentar determinar su posible origen

“Dadme un punto de apoyo y moveré el mundo”

Arquímedes de Siracusa

Material y Métodos

1. Animal de experimentación

El animal de experimentación utilizado para la realización de esta Tesis Doctoral ha sido el pez cebra *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Figura 22). Los ejemplares utilizados fueron machos y hembras adultos (3-5 cm longitud) de la estirpe AB, mantenidos en el acuario del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL).



Figura 22. Ejemplar de pez cebra adulto similar a los utilizados en el presente trabajo.

Además, se utilizaron ejemplares transgénicos que fueron obtenidos a partir de animales reproductores disponibles en las instalaciones de la *University of Colorado Denver* (EE.UU.) y en las del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), y cuyo uso fue amablemente autorizado por el Profesor Bruce Appel y el Dr. Juan Ramón Martínez Morales respectivamente. Las líneas transgénicas utilizadas se detallan en la Tabla 1.

Denominación	Tipo de transgén	Referencia
Tg(sox10:EGFP)	Expresión de GFP bajo el promotor de <i>sox10</i>	(Dutton <i>et al.</i> , 2008)
Tg(sox10:TagRFPT)	Expresión de RFP bajo el promotor de <i>sox10</i>	(Blasky <i>et al.</i> , 2014)
Tg(olig2:EGFP)	Expresión de GFP bajo el promotor de <i>olig2</i>	(Shin <i>et al.</i> , 2003)
Tg(gfap:EGFP)	Expresión de GFP bajo el promotor de <i>gfap</i>	(Bernardos y Raymond, 2006)
Tg(mbpa:TagRFPT)	Expresión de RFP bajo el promotor de <i>mbpa</i>	Prof. Appel

Tabla 1. Animales transgénicos utilizados en la presente Tesis Doctoral.

Los animales fueron manipulados siguiendo las directivas de la Unión Europea (2010/63/UE) y la legislación española (RD 53/2013, Ley 32/2007, Orden ECC/566/2015), vigentes para el uso y cuidado de animales de experimentación, y bajo la supervisión del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Así mismo, los animales utilizados en las instalaciones de la *University of Colorado Denver* fueron manipulados según las directrices de su IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*) y del NIH (*National Institutes of Health*). Para la realización de todos los experimentos de esta Tesis utilizamos un total de 120 animales adultos.

MATERIAL Y MÉTODOS

2. Mantenimiento y reproducción del pez cebra

Los ejemplares adultos se mantuvieron en tanques (*Aquaneering Inc*, San Diego, CA) a una temperatura de 28°C con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, como ha sido establecido previamente (Westerfield, 2000). El sistema fue controlado diariamente para mantener los parámetros adecuados (Tabla 2).

Parámetro	Valores óptimos
pH	6-7,5
Conductividad	250-500 μ S
Amonio (NH ₄ ⁺)	0-5 ppm
Nitritos (NO ₂ ⁻)	0 ppm
Nitratos (NO ₃ ⁻)	0-10 ppm
Renovación de agua	10% volumen/día

Tabla 2. Parámetros controlados en el acuario y sus valores óptimos de funcionamiento.

Para su cría, parejas simples o dobles de machos y hembras de los adultos reproductores se depositaron en parideras, con agua suficiente y a la temperatura del sistema (28°C) la tarde anterior al día de la puesta. El estímulo luminoso tras la noche induce la liberación de los gametos o freza. El uso de dichas parideras permite la recolección de los huevos al quedar estos depositados en una cámara separada de los adultos.

Tras la recolección, los huevos fueron analizados bajo una lupa binocular (Leica Zoom 2000) para eliminar todos aquellos que no estaban fecundados o que presentaban anomalías morfológicas. Los embriones fueron dispuestos en placas Petri (entre 50 y 100 embriones por placa) con solución E3 1x (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM, MgSO₄ 0,33 mM, azul de metileno fenicado 0,001% v/v), donde se desarrollaban en un incubador a 28,5°C hasta los 5 días post fecundación (dpf). A partir de ese momento, las larvas fueron transferidas a tanques del sistema, pero con un volumen de agua adecuado a la edad de las mismas. Los tanques permanecieron sin flujo de agua, al “baño maría”, hasta que los alevines pudieron nadar en la corriente, momento en el cual eran transferidos al sistema.

Los adultos y alevines fueron alimentados 1 o 2 veces al día, empleando distintos piensos comerciales (BioMar Iberia, S.A.) o artemia salina (Sera GmbH) eclosionada en el laboratorio. Las larvas fueron alimentadas con una suspensión

MATERIAL Y MÉTODOS

de yema de huevo cocido hasta que alcanzaron un tamaño suficiente para que pudieran alimentarse de comida para adultos.

En el caso de los cruces entre animales transgénicos, los ejemplares reproductores se dispusieron junto a ejemplares silvestres AB u otros transgénicos en las parideras. Los huevos obtenidos de estos cruces fueron examinados a las 24 horas post fecundación (hpf) o posteriormente bajo una lupa equipada con una lámpara de fluorescencia (Leica M165 FC). Los embriones fueron separados atendiendo a su fluorescencia, utilizando los que expresaban GFP, RFP o ambas (según el caso) y descartando los otros (Figura 23).

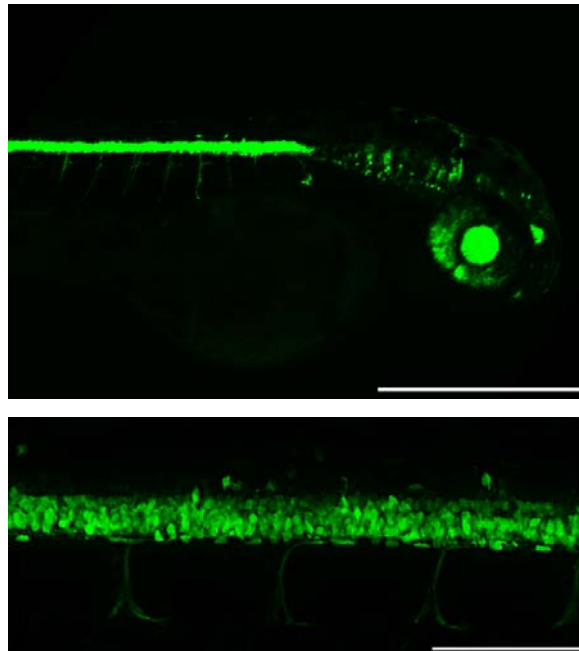


Figura 23. Larvas de 24hpf de animales olig2:GFP. **A:** cabeza y comienzo de la médula espinal. **B:** células olig2⁺ en la médula espinal. Barras de escala: A, B: 500 μ m.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. Pinzamiento del NO

En todas las técnicas aplicadas en animales adultos en esta Tesis Doctoral, se estudiaron individuos AB o transgénicos control, a los que no se les realizó ningún tipo de cirugía previa al sacrificio, e individuos únicamente de la estirpe AB lesionados mediante pinzamiento del NO derecho. Esta técnica ha sido ampliamente usada y estandarizada (Becker *et al.*, 2000; Nona *et al.*, 1992) y perfeccionada en nuestro laboratorio (Ogueta, 2013; Parrilla *et al.*, 2013, 2016; Parrilla, 2010; Velasco *et al.*, 1995). Al pinzar el NO se produce una degeneración temporal de los axones y su posterior regeneración. De esta manera podemos estudiar el efecto que produce en la glía de la CNO la entrada masiva de axones en crecimiento.

El procedimiento para pinzar el NO fue el siguiente: se anestesió profundamente a los animales en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222, Sigma) a una concentración de 0,3 g/L en agua del sistema. Cuando cesó el movimiento de las branquias, junto con la ausencia de reflejos de sobresalto, los animales se dispusieron en una esponja humedecida y bajo una lupa. Con ayuda de unas pinzas (Dumont #5), se retiró el tejido conjuntivo circundante, tras lo cual se expuso el NO derecho extrayendo levemente el ojo de la cavidad ocular. A continuación, se rotó el conjunto del NO y de la arteria ocular, para dejar en primer plano el nervio y evitar dañar la arteria. Con las mismas pinzas, se pinzó durante 3 s el NO, a una distancia aproximada de 2-3 mm del globo ocular (Figura 24). Se comprobó el pinzamiento visualizando la marca del mismo, que se aprecia como una banda translúcida en el NO. Finalmente, el ojo se devolvió a su posición original y el animal fue transferido a un tanque aireado donde se recuperó en pocos minutos.

Los animales lesionados fueron sacrificados, previa anestesia, a los 2, 7, 15, 21 o 60 días post-lesión (dp).

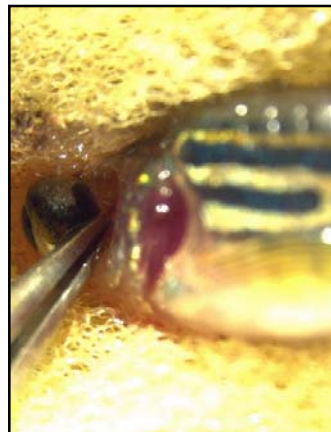


Figura 24. Pinzamiento del NO de un pez cebra adulto.

4. Estudio de los oligodendrocitos durante el desarrollo

Para estudiar el origen y desarrollo de los oligodendrocitos en el sistema visual, utilizamos larvas de los diferentes animales transgénicos, simples o dobles, descritos en la Tabla 1, que fueron sacrificados a distintos tiempos: 48 hpf y 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 y 14 dpf.

5. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica de detección de proteínas que aprovecha la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo (Figura 26). Mediante esta técnica pueden diferenciarse tipos celulares en base a las proteínas que expresan en un momento y lugar determinados, tal y como se describe a continuación.

Obtención de las muestras

- Animales adultos

Las muestras se extrajeron y fijaron de diferente manera dependiendo del tipo de IHQ que se iba a realizar. Para IHQ en secciones, los animales fueron sacrificados mediante inmersión en agua helada (4°C) y posterior decapitación, y a continuación se extrajeron el cerebro y los ojos (unidos mediante el NO) (Figura 25). Tras realizar una incisión en la córnea para favorecer la entrada del fijador, se depositaron en una solución de paraformaldehído (PFA, Panreac) al 2% en PBS (tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffer Saline*) 0,1M pH 7,4 durante 2 h a 4°C. Tras esto, se lavaron profusamente en PBS para eliminar los restos de fijador y se introdujeron en una solución de sacarosa al 30% p/v (Panreac) en PBS, permaneciendo al menos durante una noche a 4°C. Mediante este procedimiento se evita la posterior formación de cristales de hielo al congelar las muestras para su seccionamiento en un criostato. Finalmente, se separaron los ojos con sus respectivos NOs unidos, se extrajeron los cristalinos



Figura 25. Conjunto de globos oculares, NO y techos ópticos de un pez cebra. (Modificado de Diekmann *et al* 2015)

MATERIAL Y MÉTODOS

y se colocaron en moldes con medio OCT® (Sakura), donde fueron orientados y congelados con nitrógeno líquido, para ser seccionados a continuación en un criostato o guardarse a -20°C para hacerlo posteriormente.

En el caso de las IHQ *in toto*, los animales se depositaron en un tanque en oscuridad al menos 2h antes de su sacrificio. Esto provoca que los procesos de las células del epitelio pigmentario se retraigan, favoreciendo su separación de la retina. Tras ser sacrificados por inmersión en agua helada y decapitación, se extrajeron los ojos y se diseccionaron las retinas con ayuda de unas pinzas. A continuación, se depositaron en PFA 4% en PBS durante 4h a temperatura ambiente (TA), o toda la noche a 4°C. Finalmente, fueron lavadas en PBS para eliminar el fijador y se procedió a realizar la IHQ.

- Animales en desarrollo

En la presente Tesis Doctoral utilizamos animales en distintos estadios de desarrollo. En todos los casos, los animales fueron sacrificados por sobredosis en una solución de metanosulfonato de tricaína (MS-222, Sigma) antes de ser fijados. La fijación se llevó a cabo por inmersión en PFA 4% toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, los animales fueron lavados varias veces en PBS para eliminar los restos de fijador. A continuación, fueron encastrados en una solución de agar (Panreac) al 1,5% p/v y sacarosa (Panreac) al 10% p/v en PBS. Esta mezcla se llevó a ebullición en el microondas hasta que el agar quedó completamente disuelto. Tras alcanzar una temperatura óptima, se vertió en moldes de plástico donde se dispusieron de 4 a 6 larvas orientadas para obtener secciones horizontales. Cuando la mezcla se hubo solidificado, se extrajeron los bloques de los moldes, se recortaron con la ayuda de una cuchilla, y se introdujeron en una solución de sacarosa al 30% p/v en PBS durante al menos 12h o hasta que los bloques se hundieron en la solución.

Seccionamiento.

Tanto las secciones de animales adultos como de las larvas se obtuvieron mediante un criostato (Microm HM 560, Thermo Scientific) a 10µm de grosor, depositándose sobre portaobjetos tratados (Polysine slides, Thermo Scientific)

para evitar que se despegaran en tratamientos posteriores. Las secciones fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Protocolo inmunohistoquímico en secciones

Las secciones se descongelaron a TA durante al menos 30 min y se lavaron en PBS con *Triton X-100* (Sigma) al 0,02% v/v (PBSTx), para eliminar los restos de OCT® y rehidratar el tejido. Todos los lavados se realizaron 3 veces durante 10 min cada uno en agitación en una jarra *Copling*. A continuación, se trataron durante 10 min en metanol 100% v/v helado (-20°C) en agitación. Este paso es necesario para poder visualizar los marcajes de los anticuerpos anti Sox10 y Olig2. En caso de utilizar animales transgénicos, no se realizó el lavado en metanol ya que elimina la fluorescencia de la GFP o RFP.

Tras lavar de nuevo en PBSTx, se realizó un bloqueo de al menos 1 h a TA con suero no inmune al 5% en PBSTx. En cada IHQ se utilizó suero procedente de la misma especie animal que los anticuerpos secundarios. El

objetivo de este bloqueo es facilitar

la penetración de los anticuerpos y reducir las uniones inespecíficas de los mismos al tejido.

A continuación, las secciones se incubaron toda la noche a TA en el medio de bloqueo, añadiendo dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) al 1% v/v y el anticuerpo primario cuyas especificaciones y diluciones de uso están indicadas en la Tabla 3. Posteriormente, los cortes se lavaron con PBS y se incubaron en oscuridad durante 1 h a TA con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes (Tabla 4), diluidos en el medio de bloqueo sin Triton X-100 para evitar fluorescencia de fondo. A esta incubación se añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) diluido 1:10.000, para poder visualizar todos los núcleos celulares en la sección ya que se une selectivamente al ADN de las células.

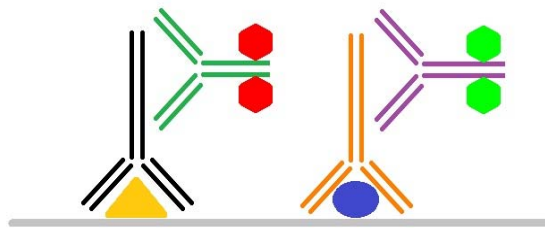


Figura 26. Esquema de una inmunohistoquímica indirecta como las realizadas en esta Tesis Doctoral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para finalizar, las secciones se lavaron en oscuridad con PBS y se montaron con un medio protector de fluorescencia comercial: *Fluoromount*® (Sigma) o *Vectashield*® (Vector), en el caso de los animales transgénicos.

Antígeno	Casa comercial	Referencia	Tipo anticuerpo	Dilución de uso
Citoqueratina	Sigma	C2562	IgG monoclonal de ratón	1:100
GFAP	Sigma	G6171	IgG monoclonal de ratón	1:500
GS	Millipore	MAB302	IgG monoclonal de ratón	1:1000
MBP	Cedido por Dr. Appel	(Takada <i>et al.</i> , 2010)	IgG policlonal de conejo	1:1000
Neurolina	DSHB	zn8	IgG monoclonal de ratón	1:300
Olig2	Anaspec	AS-55636	IgG policlonal de conejo	1:500
Pax2	Covance	PRB-276P	IgG policlonal de conejo	1:500
PCNA	Santa Cruz Biotech	sc-56	IgG monoclonal de ratón	1:500
Sox10-CT	Anaspec	AS-55650	IgG policlonal de conejo	1:500
Sox10-IN	Anaspec	AS-55651	IgG policlonal de conejo	1:500
Sox2	Abcam	Ab-97959	IgG policlonal de conejo	1:500
ZO1	Zymed	33-9100	IgG monoclonal de ratón	1:100
zrf1 (GFAP)	ZIRC	zrf1	IgG monoclonal de ratón	1:500

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en el presente trabajo.

Antígeno	Casa comercial	Conjugado	Tipo anticuerpo	Dilución de uso
IgG de conejo	Jackson	Cy2/Alexa Fluor 488 Cy3 Cy5	IgG policlonal de cabra	1:250
IgG de ratón	Jackson	Cy2/Alexa Fluor 488 Cy3 Cy5	IgG policlonal de cabra	1:250

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en el presente trabajo.

Protocolo inmunohistoquímica in toto

La IHQ *in toto* se realizó de forma similar que en secciones. En este caso, los lavados en tampón fueron más numerosos y frecuentes.

En primer lugar, las retinas se postfijaron con metanol 100% v/v 5 min. Tras lavar en PBSTx, se eliminó la autofluorescencia del tejido con borohidruro sódico (NaBH₄) 2,5 g/L en PBS durante 30 min a TA. A continuación, se lavó con PBSTx y se procedió a realizar el bloqueo utilizando para ello el mismo medio que el descrito anteriormente en secciones, sólo que ahora se incubó durante al menos 2 h. Tras esto, se incubaron los anticuerpos primarios (Tabla 3) en el medio de bloqueo con DMSO 1% v/v durante 4 días a 4°C y en agitación. Después de lavar en PBS, las retinas se incubaron en el medio de bloqueo con los anticuerpos secundarios respectivos (Tabla 4) y DAPI 1:10.000, en oscuridad toda la noche a 4°C y agitando. Por último, las retinas se lavaron con PBS en oscuridad y se montaron en portaobjetos sin tratar, añadiendo unas gotas de medio *ProLong Gold*® (Invitrogen) antes de depositar el cubreobjetos, para conservar la fluorescencia.

En todos los casos, se llevaron a cabo controles tanto negativos como positivos para confirmar que los marcajes obtenidos eran correctos, especialmente en el caso de los anticuerpos anti Sox10 y Olig2.

6. Obtención de imágenes y análisis

Algunas de las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con un microscopio *Olympus PROVIS AX70*; otras con un microscopio láser confocal *Leica SP2* o con un microscopio *Zeiss Axio Observer Z1* equipado con dispositivo *Apotome.2*®. En el caso de las imágenes obtenidas en el laboratorio del Prof. Appel, se utilizó el mismo microscopio *Zeiss*, pero equipado con un sistema de láser con *spinning disk* (Perkin Elmer). El tratamiento posterior de las imágenes digitales se realizó con el programa *Adobe Photoshop CS5*®, y los ajustes se limitaron a recortar o rotar las imágenes y ajustar el brillo y contraste de las mismas para una mejor visualización.

Para realizar los correspondientes recuentos se utilizó el software *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) o su variante *Fiji* (<https://fiji.sc/>), utilizando las

MATERIAL Y MÉTODOS

imágenes sin tratar digitalmente. Tanto en los recuentos de células en la CNO como en el NO se midió el área de interés, obteniendo la densidad celular, expresada como células en $1.000 \mu\text{m}^2$. Estos valores fueron comparados posteriormente para comprobar si existían diferencias entre los distintos grupos experimentales.

7. Análisis estadístico

Para analizar si existían diferencias estadísticamente significativas, comparamos los valores de las densidades celulares con el programa *Prism 5* (GraphPad). Para ello, primero se comprobó la normalidad y homocedasticidad de las muestras. A continuación, si las muestras superaban los test se realizó un análisis ANOVA de una vía, con un post-test *Dunnet* para comparar los grupos experimentales respecto al control, o un test de *Kruskal-Wallis* si las muestras no seguían una distribución normal.

En todos los casos, se obtuvo un valor p que se consideró estadísticamente significativo si $p < 0,05$ (*), muy significativo si $p < 0,01$ (**) o altamente significativo si $p < 0,001$ (***).

8. qPCR

Para comprobar la expresión en la retina y NO de los tres parálogos de la GS (*glula*, *glulb* y *glulc*), junto a los distintos genes (Tabla 5) estudiados en esta Tesis Doctoral, utilizamos la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) precedida de retrotranscripción (RT). Posteriormente, mediante la PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR), analizamos la variación en la expresión génica de los mismos a lo largo de todo el proceso.

Para cada grupo experimental se utilizaron por triplicado muestras de al menos 6 animales.

Obtención de las muestras

Para extraer el ARN total de las retinas y de los NOs hubo que aislarlos previamente. En este procedimiento, como en todos aquellos en los que el ARN está involucrado, se evitó su degradación por ARNasas utilizando en todas las disoluciones agua *Milli-Q* libre de ARNasas, y todo el material plástico o de vidrio

fue convenientemente esterilizado en el autoclave o tratándolo con etanol al 70% v/v.

El procedimiento para aislar las retinas fue similar al utilizado para obtener las preparaciones *in toto* o para extraer proteínas. Brevemente, los animales fueron sacrificados por inmersión en agua helada tras permanecer al menos 2h en oscuridad. Se extrajeron los ojos y NOs, y a continuación se separaron las retinas del resto de tejidos en una placa con PBS estéril. Tras esto, las muestras se depositaron en tubos que se sumergieron en nitrógeno líquido para congelarlas y evitar la degradación del ARN. Los tubos se mantuvieron al menos una noche a -80°C, o se guardaron para su posterior extracción.

Extracción de ARN

Para extraer el ARN de las muestras, se utilizó *TRIzol LS Reagent* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, tras descongelar las muestras en hielo, se añadió 1mL de *TRIzol* y se procedió a su homogeneización. Para ello se utilizó un *Polytron* (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX), que fue previamente lavado con cloroformo y agua *Milli-Q*. A continuación, se añadieron 200 μ L de cloroformo (Panreac) a cada muestra, se agitó vigorosamente con la ayuda de un *Vortex* durante 30 s, y se dejó reposar durante 10 min a TA. Las muestras se centrifugaron a 12.000·g durante 15 min a 4°C, y se recogió la fase acuosa superior, donde se encontraba el ARN. Esta fase acuosa se mezcló con 500 μ L de isopropanol (2-propanol, Panreac), se agitó y se dejó reposar 10 min a TA. Tras esto, se centrifugó a 12.000·g 10 min a 4°C para sedimentar el ARN precipitado. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol 70% v/v al precipitado para lavarlo. Se centrifugó a 7.000·g 5 min a 4°C, tras lo que se descartó de nuevo el sobrenadante. El ARN precipitado en los tubos, visible en forma de pellet blanquecino, se dejó secar completamente de etanol durante 15 min, tras lo que se añadieron 20 μ L de agua *Milli-Q*. Se resuspendió la solución de ARN en un termobloque precalentado a 60°C (Eppendorf ThermoStat Plus) durante 10 min, tras lo cual se procedió a cuantificar el ARN extraído en un nanofotómetro (Implen), basándose en la absorción del ARN puro a 260nm.

MATERIAL Y MÉTODOS

Retrotranscripción

Una vez extraído el ARN total, se obtuvo del ADN copia (ADNc) de todos los tipos de ARN presentes en la célula, aunque mediante este procedimiento se obtienen mayoritariamente los correspondientes a los ARN ribosómicos y mensajeros (ARNr y ARNm).

Para ello se utilizó un kit de retrotranscripción (*High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, Applied Biosystems) que utiliza cebadores aleatorios (*random primers*) que permiten la retrotranscripción de todo el ARN presente. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante: para un volumen final de reacción de 20 μL se utilizaron 2 μL de tampón RT 10x; 2 μL de cebadores aleatorios 10x; 0,8 μL de mezcla de desoxinucleótidos 25x; 4,2 μL de agua *Milli-Q*; 1 μL de retro-transcriptasa y 10 μL de una solución de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del ARN obtenido anteriormente.

El programa de retrotranscripción utilizado consta de tres pasos: incubación a 25°C durante 10 min, retrotranscripción a 37°C durante 2 h e incubación final a 85°C durante 5 min (para inhibir la enzima) utilizando para ello un termociclador *Veriti* (Applied Biosystems) o *Primus* (MWG-Biotech). En cada experimento se realizó un control negativo con agua, para comprobar que el producto de retrotranscripción de ADNc no se debiera a contaminación accidental.

El ADNc obtenido fue el material de partida para realizar PCR convencional o qPCR.

Diseño de cebadores (primers)

Algunos de los primers utilizados en la presente Tesis Doctoral fueron obtenidos de la bibliografía disponible (Dhanasiri *et al.*, 2012) o a través de la herramienta online *Universal Probe Library Assay Design Center* de Roche (<https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>).

Otros fueron diseñados con la herramienta *online* Primer3 a partir de las secuencias conocidas de los genes de interés.

Además, se siguieron las siguientes normas para adaptarlos al protocolo de qPCR: interexónicos, tamaño entre 15 y 25 nucleótidos, índice GC entre 50% y 60% y temperatura de fusión (T_m) entre 56°C y 60°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se prestó especial atención a que las características antes descritas fueran lo más parecidas entre ambos cebadores.

Estas características fueron comprobadas mediante el programa *The Sequence Manipulation Suite Version 2*, disponible en internet (<http://www.protocolonline.org/tools/sms2/>). Con este programa también comprobamos que los cebadores no formaran horquillas, ni que hibridaran consigo mismo ni con el otro cebador. En ninguna de las parejas se detectaron estos fenómenos.

Por último, con la aplicación informática BLASTn se comprobó que los cebadores sólo hibridaran con una secuencia del genoma del pez cebra (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>).

En la Tabla 5 se recogen todos los cebadores utilizados y sus características.

Gen	Cebador <i>left</i> (5'-3')	Cebador <i>right</i> (5'-3')	Amplicón (nt)	Referencia ENSEMBL
ef1α	GAGGAAATCACCAAGG AAGTCAG	TTGAACCAGCCCATG TTTGAG	134	ENSDARG00000020850
glula	ATGGTGGACTGAAATG TATTGAGG	AATGTTGGAGGTTTC ATGGTGG	137	ENSDARG00000099776
glulb	GCCCGCTTCCTCCTAC ACA	CTCCTCAATATGCTT CAAACCTCC	156	ENSDARG00000100003
glulc	GGAATTGAGCACATTG AGAAAGC	CGGAGAAATCGTGGA TGCTG	145	ENSDARG00000013227
mbpa	GGCTGGGCAGAAAGAA GAA	GGAAGAGTGGTGGGG TCTCT	137	ENSDARG00000036186
mpz	GGCTAAGGACGCAATC TCAA	AATGGGCCTTTATTA GCTGGA	69	ENSDARG00000038609
olig2	TCAATTCTGCAAAGCC ACAC	CGCCTTCAGGAGAAG AAGGT	142	ENSDARG00000040946
sox10	AAGAGCCTGCACCTGG AG	CTCGCCTGATTTTCC TCCCT	150	ENSDARG00000077467
sox2	TGGACCAACGGAGGCT AC	CGTTCAAACCTCGGGT GCT	67	ENSDARG00000070913

Tabla 5. Genes y secuencias de los cebadores utilizados en el presente trabajo. Se incluye el tamaño de amplicón obtenido y la referencia del gen en la web ENSEMBL.

MATERIAL Y MÉTODOS

PCR convencional

Para comprobar la expresión de los genes estudiados (Tabla 5) en retina y NO, se empleó ADNc de animales control. A cada reacción se añadieron 50 ng de ADNc, tampón Green GoTaq® Flexi Buffer 5X, MgCl₂ 25mM, dNTPs Mix 10mM cada tipo, cebadores *left* y *right* 10mM cada uno y la enzima GoTaq® DNA Polymerase (5U/μl), todos ellos de *Promega*, y se completó con agua libre de ribonucleasas hasta un volumen final de 25 μL.

El programa de amplificación empleado en el termociclador fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 min; 30 ciclos de amplificación de 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 30 s; extensión final a 72°C durante 3 min y conservación a 4°C. Los productos de PCR se almacenaron congelados a -20°C. En cada experimento se realizó un control negativo con agua, para comprobar que el producto de amplificación de PCR no se debe a una contaminación. También se utilizaron como controles positivos muestras de ADNc procedentes de larvas de pez cebra de 5dpf y de cerebros adultos.

Electroforesis en agarosa

Para visualizar el producto amplificado, este se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Agarose MS8, Pronadisa) de una concentración del 2% p/v en TBE 0,5x. Como tampón de electroforesis se empleó también TBE 0,5x (TBE 1X: TRIS base 1,08% p/v, ácido bórico 0,55% p/v y EDTA 2 mM pH 8). En el gel se añadieron 5 μL/100mL de *Red Safe™* (iNtRON Biotechnology), para poder visualizar los fragmentos de ADN amplificado con un transiluminador UV (BioRad). Como marcador de peso molecular se emplearon 3 μL de *PerfectSize DNA Molecular Weight Ladder* (5Prime). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 110 V durante 30 min. Una vez resuelto el gel, las imágenes se adquirieron en un transiluminador (BioRad Gel Doc XR+).

qPCR

Los experimentos de qPCR permitieron determinar los niveles de expresión de los genes estudiados en la retina y NO durante los distintos tiempos de regeneración analizados tras la lesión por pinzamiento del NO.

MATERIAL Y MÉTODOS

Al realizar un análisis cuantitativo relativo de las qPCRs, tanto para experimentos control como para cada tiempo de supervivencia, se compararon los niveles de expresión de cada gen estudiado con el nivel de expresión de los genes de referencia *ef1 α* (Tabla 5).

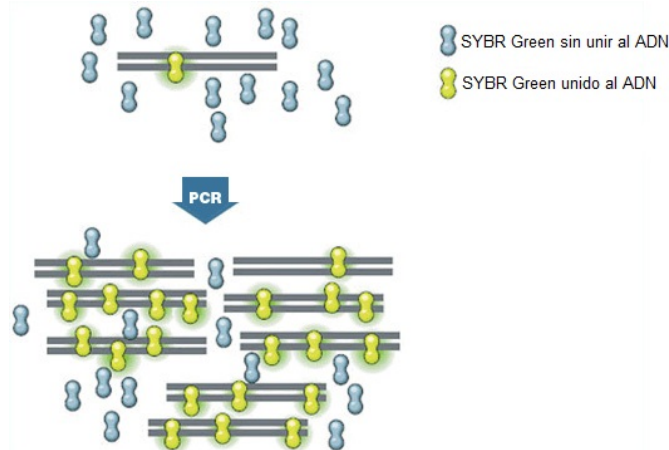


Figura 27. Esquema de reacción de qPCR utilizando SYBR Green. A medida que la reacción de PCR transcurre, más moléculas de SYBR Green se incorporan a las dobles cadenas de ADN generadas. Modificado de: www.bio-rad.com

El método de cuantificación a tiempo real que hemos empleado se basa en la detección continua del producto de PCR mediante el fluoróforo SYBR Green (Applied Biosystems). Esta molécula se intercala en el surco menor de la doble hélice del ADN, emitiendo un pico de fluorescencia máxima a 520nm (Figura 27). La

intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena generado, dado que la unión es estequiométrica. Se utilizó un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección de fluorescencia y recoge la señal de fluorescencia emitida al final de cada ciclo de PCR (*Quantstudio 7*, Thermo Fisher).

Para poner a punto esta técnica, fue necesario la realización previa de una recta de calibrado. En la recta de calibrado se expresa la concentración de ADNc utilizado y el ciclo en el cual el termociclador empieza a detectar fluorescencia. El paquete informático empleado para analizar los resultados establece una línea umbral, a partir de la cual la cantidad de producto amplificado es suficientemente alta como para que el termociclador detecte la fluorescencia producida por el SYBR Green al unirse al ADN de doble cadena. El ciclo en el cual la reacción cruza este umbral se denomina valor Ct. El valor Ct de las diluciones 1:10 a partir de las cuales se diseña la recta patrón para cada gen debe diferenciarse en 3,3 ciclos, y por ello se considera este número como pendiente perfecta de la recta de calibrado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para poner a punto la recta de calibrado de cada uno de los genes estudiados, realizamos una PCR básica con un termociclador *Veriti* (Applied Biosystems), sometiendo 5µl del producto final de la reacción a electroforesis en un gel con 2% p/v de agarosa (Pronadisa). Una vez comprobado que la banda resultante se correspondiera al tamaño de amplicón previsto, el resto de la reacción se purificó con el kit *QIAquick PCR purification Kit* (Qiagen). Después se midió la concentración del producto purificado mediante un nanofotómetro (Implen) y se realizaron 7 diluciones seriadas 1:10, con el fin de cubrir un amplio espectro de concentraciones y que los datos obtenidos a partir de la recta de calibrado fueran de mayor fiabilidad.

Finalmente se realizaron las qPCRs, tal y como se indica en el siguiente apartado, utilizando como muestras las distintas concentraciones: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} ng. Según los resultados obtenidos se diseñó una recta de calibrado óptima para cada marcador, utilizando las 3 diluciones consecutivas que mejor pendiente proporcionaban (Figura 28).

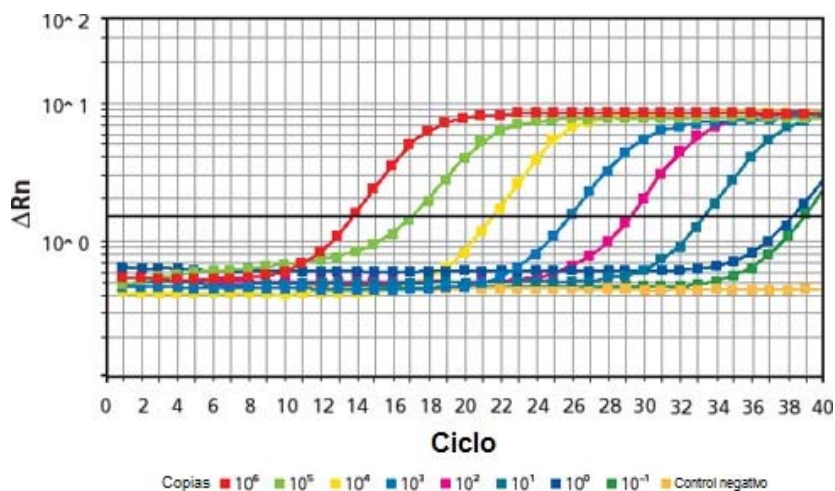


Figura 28. Gráfico obtenido tras realizar una qPCR. Se muestra la variación en la fluorescencia normalizada frente al ciclo de la reacción. Modificado de: www.sigmaaldrich.com

Para la realización de la PCR cuantitativa se utilizó el kit *SYBR Green Power Mix* (Applied Biosystems), que incluye Taq polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato, tampón de reacción, MgCl₂ y agua, todo en una concentración final 2x. Así, a cada reacción se añadieron 10 µL de SYBR-Green Power Mix, 1 µL de ADNc, 1 µL de cebador *left*, 1 µL de cebador *right* y 7 µL de agua libre de nucleasas. El programa de amplificación que se utilizó, tanto con las muestras

MATERIAL Y MÉTODOS

de estudio como con las rectas patrón en el termociclador *Quantstudio 7* (Thermo Fisher), fue el siguiente: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Al final del programa se realizó además un último paso de desnaturalización de los productos de PCR obtenidos o *melt curve*, para comprobar si había existido algún tipo de amplificación inespecífica.

Las qPCRs se realizaron por triplicado en cada experimento y el número de grupos para cada tiempo estudiado fue mayor o igual a 3.

El programa informático incorporado de *Thermo Fisher* (Quantstudio Real-Time PCR Software v1.2) proporciona el valor Ct, así como las eficiencias del producto PCR de los genes de interés y el gen de referencia estudiados. Estos valores fueron exportados posteriormente al programa informático Microsoft Excel. Mediante este, se efectuó el análisis de la expresión génica de todos los genes utilizados, en donde la expresión de un gen o genes de interés fue normalizada con el gen de referencia.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el programa *Prism 5* (GraphPad), estableciendo las diferencias como estadísticamente significativas si $p < 0,05$ (*), muy significativas si $p < 0,01$ (**) o altamente significativas si $p < 0,001$ (***) .

$$E=mc^2$$

Albert Einstein

Resultados

1. Caracterización inmunocitoquímica

Para conocer la morfología, distribución y cantidad de oligodendrocitos y otras células gliales presentes en la retina, la CNO y el NO realizamos un análisis inmunohistoquímico tanto en condiciones control como tras el pinzamiento del NO. Dicho estudio lo llevamos a cabo utilizando todos los marcadores celulares descritos en la sección 5 de Material y Métodos.

Para organizar esta sección, la hemos subdividido según el marcador característico de un linaje celular (*sox10*, *sox2*, *pax2*, *olig2* y *mbp*), especificando en cada uno de estos apartados los cambios observados según los diferentes tiempos de lesión estudiados.

- **Sox10**

Para estudiar los oligodendrocitos presentes desde la retina hasta el NO, utilizamos dos anticuerpos comerciales distintos que reconocen la proteína *sox10* del pez cebra, y que se diferencian únicamente en la región utilizada como epítipo para su producción (*CT* o carboxi terminal e *IN* o intermedia). Tras realizar varias pruebas y comprobar la especificidad en el marcaje de cada uno de ellos, utilizamos preferentemente el que reconoce la región intermedia (*IN*), porque junto con el protocolo de fijación utilizado reveló los mejores resultados en cuanto a intensidad de marcaje y menor fondo en las preparaciones.

- *Oligodendrocitos sox10 en condiciones control*

Encontramos oligodendrocitos *sox10*⁺ tanto en la retina, como en la CNO y en el NO (Figura 29A). Estas células, en comparación a otras que se describirán más adelante, resultaron ser las más numerosas de las observadas a lo largo de la vía visual (Figura 29A, B; Figura 33). En la retina se localizan en la CCG, si bien se extienden hasta la CFNO según nos acercamos a la CNO, donde son más abundantes respecto a la periferia de la retina (Figura 29C), en donde se observan a continuación de la ZPG.

Los oligodendrocitos *sox10*⁺ se disponen en filas o grupos de varios elementos (Figura 29A, B, D), sobre todo en la retina y CNO. Esta disposición resultó ser más clara en preparaciones *in toto*, donde se aprecia la cantidad y la organización de estas células con mejor detalle (Figura 29B). Con respecto a su

RESULTADOS

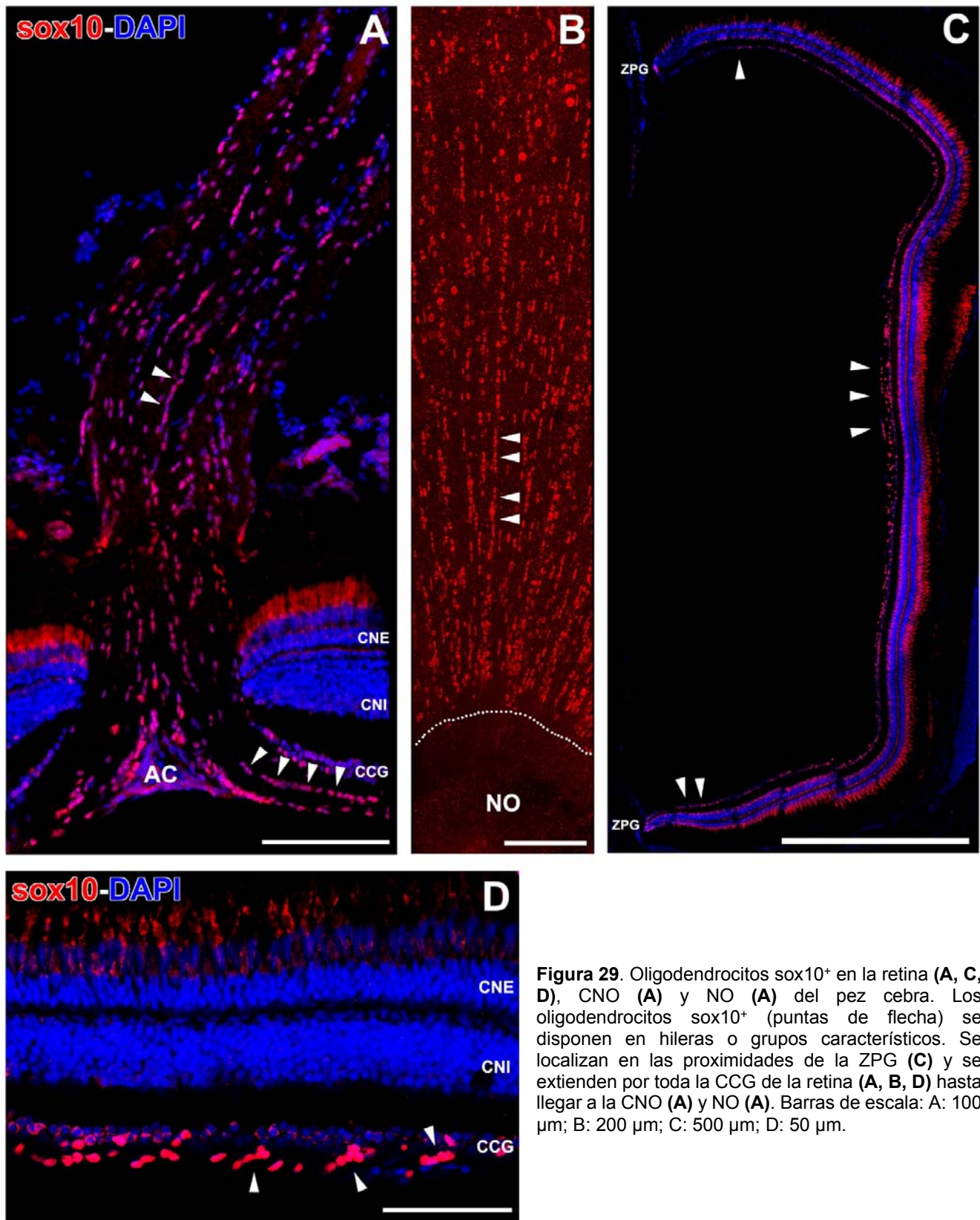


Figura 29. Oligodendrocitos $sox10^+$ en la retina (A, C, D), CNO (A) y NO (A) del pez cebra. Los oligodendrocitos $sox10^+$ (puntas de flecha) se disponen en hileras o grupos característicos. Se localizan en las proximidades de la ZPG (C) y se extienden por toda la CCG de la retina (A, B, D) hasta llegar a la CNO (A) y NO (A). Barras de escala: A: 100 μm ; B: 200 μm ; C: 500 μm ; D: 50 μm .

morfología celular, presentan un núcleo redondeado-ovalado, con una indentación característica observable simplemente con la tinción nuclear DAPI

(Figura 30E). Estas características de morfología y organización fueron de gran utilidad a la hora de identificarlos en preparaciones en las que no se había utilizado una tinción específica contra oligodendrocitos.

Al analizar los oligodendrocitos con un marcador astroglial bien definido, como es la GS, nos encontramos con varias características reseñables (Figura 30). Así, por una parte observamos marcaje de GS de las células de Müller en la retina (Figura 30A, B), extendiéndose desde la MLE hasta la MLI, y excluyendo la CNO (Figura 30A). Sin embargo, al analizar los oligodendrocitos presentes en la CNO y NO nos encontramos que colocalizan con GS (Figura 30A). Esta colocalización resultó difícil de observar en la retina, ya que los abundantes procesos GS⁺ de las células de Müller que se extienden por la CCG y CFNO dificultan la observación precisa de la posible expresión de GS por parte de los oligodendrocitos retinales (Figura 30A, B). Sin embargo, en preparaciones *in toto* es posible distinguir cómo al menos los gruesos procesos vitrales de las células de Müller parecen rodear los oligodendrocitos (Figura 30C). Por otra parte, el marcaje de GS de los oligodendrocitos en la CNO y en el NO resultó similar, observándose en el citoplasma celular (Figura 30D, E), rodeando al núcleo y adentrándose en la indentación antes descrita. Este marcaje se aprecia no solo en oligodendrocitos que aparecen aparentemente aislados sino también en los que se disponen en grupos o filas (Figura 30E). Además, los procesos de los oligodendrocitos del NO son también positivos para GS (Figura 30D, E).

También analizamos el marcador ZO1, que marca las uniones adherentes entre células. Así, detectamos la presencia de este marcaje en la MLE de la retina (Figura 31A). Además, comprobamos la coexistencia de este marcaje junto al de los oligodendrocitos sox10⁺, tanto en la CNO (Figura 31A) como en el NO (Figura 31B). En el NO, observamos que los oligodendrocitos que expresan ZO1 se encontraban preferentemente formando parte de la limitante glial (Figura 31B). Pero además, aquellos que no formaban parte de dicha limitante también parecían expresarlo aunque con menor intensidad. Esto es difícil de confirmar ya que se observa un marcaje puntiforme de ZO1 que se extiende por toda la superficie del NO (Figura 31B).

RESULTADOS

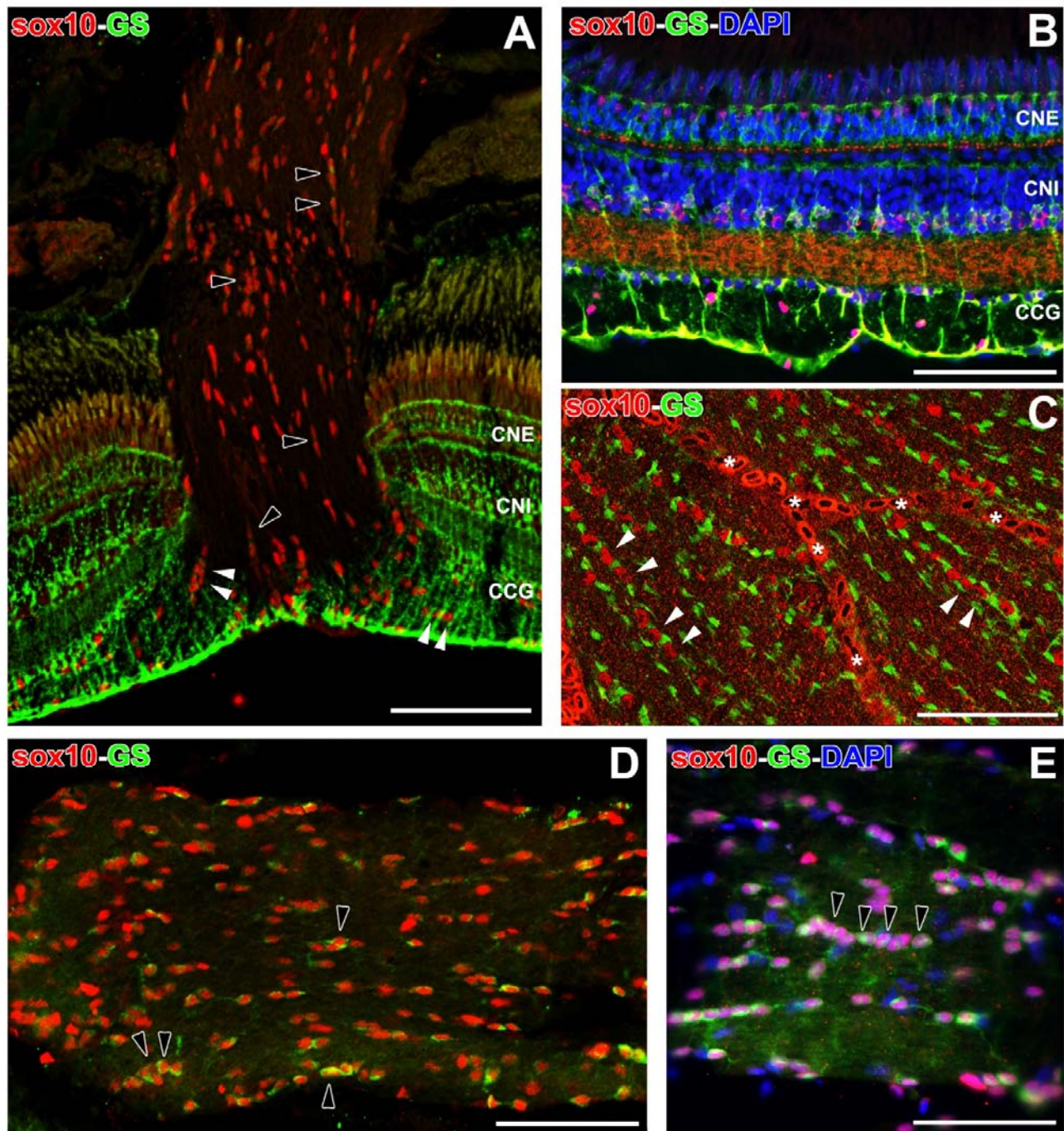


Figura 30. Inmunolocalización de GS y sox10 desde la retina al NO del pez cebra. Oligodendrocitos sox10⁺ (puntas de flecha blancas) en íntimo contacto con los procesos GS⁺ de las células de Müller en la retina (**A**, **C**). Células de Müller GS⁺ en la retina (**B**), y en los oligodendrocitos sox10⁺ en la CNO (**A**) y NO (**A**, **D**, **E**) (puntas de flecha negras). Expresión de GS en el citoplasma y en los procesos de oligodendrocitos sox10⁺, adentrándose en la indentación nuclear que presentan (**E**). Vasos sanguíneos de la retina (*). Barras de escala: A: 200 μ m; B-D: 50 μ m.

Respecto a GFAP, utilizamos dos anticuerpos comerciales, uno de ellos específico contra la proteína del pez cebra y que en adelante denominaremos

RESULTADOS

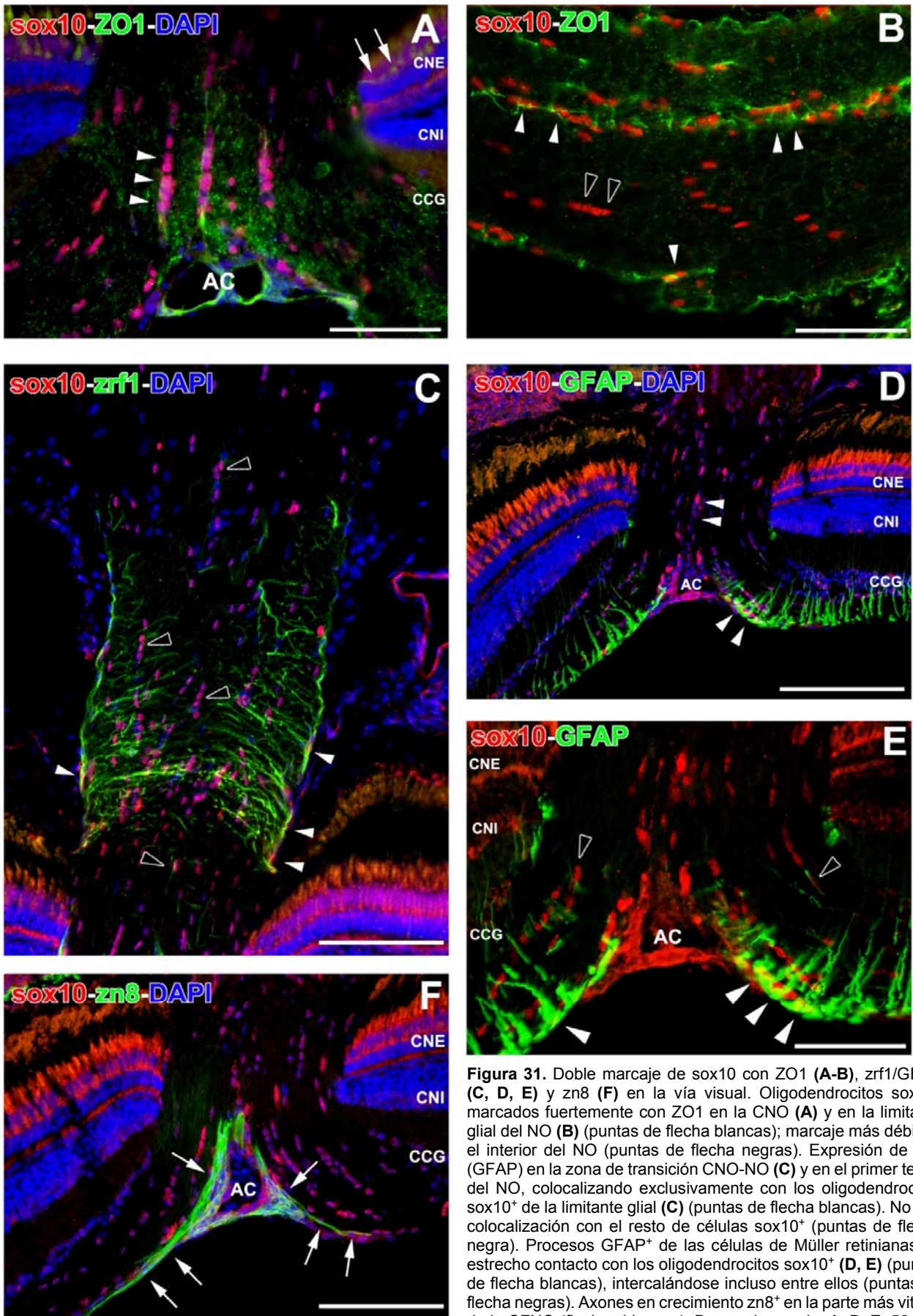


Figura 31. Doble marcaje de *sox10* con ZO1 (A-B), *zrf1*/GFAP (C, D, E) y *zn8* (F) en la vía visual. Oligodendrocitos *sox10*⁺ marcados fuertemente con ZO1 en la CNO (A) y en la limitante glial del NO (B) (puntas de flecha blancas); marcaje más débil en el interior del NO (puntas de flecha negras). Expresión de *zrf1* (GFAP) en la zona de transición CNO-NO (C) y en el primer tercio del NO, colocalizando exclusivamente con los oligodendrocitos *sox10*⁺ de la limitante glial (C) (puntas de flecha blancas). No hay colocalización con el resto de células *sox10*⁺ (puntas de flecha negra). Procesos GFAP⁺ de las células de Müller retinianas en estrecho contacto con los oligodendrocitos *sox10*⁺ (D, E) (puntas de flecha blancas), intercalándose incluso entre ellos (puntas de flecha negras). Axones en crecimiento *zn8*⁺ en la parte más vitreal de la CFNO (flechas blancas). Barras de escala: A, B, E: 50 μ m; C, D, F: 200 μ m.

RESULTADOS

zrf1. El anticuerpo que denominaremos anti GFAP (no específico de pez cebra) reconoció los procesos de las células de Müller en la retina (Figura 31D). Estos procesos se extienden desde la CNE, donde se encuentra el núcleo de las células de Müller, hasta la parte más vitreal de la MLI. Al observar la CNO en más detalle, se aprecia cómo los procesos delimitan esta región, y aparecen en algunas ocasiones intercalados con los oligodendrocitos $sox10^+$ (Figura 31E). Al utilizar el anticuerpo específico de pez cebra zrf1, nos encontramos el mismo marcaje en la retina aunque las diferencias más notables se observaron en la zona de transición de la CNO al NO (Figura 31C). En esta zona localizamos numerosos procesos $zrf1^+$, que se extienden desde la limitante glial hasta las partes más profundas del NO. Estos procesos parecen, en algunos casos, intercalarse con las filas de los oligodendrocitos del NO (Figura 31C). Este marcaje $zrf1^+$ desaparece tras el primer tercio del NO, antes del QO.

Para observar los axones jóvenes que se están formando continuamente en la retina del pez cebra utilizamos el anticuerpo zn8, que reconoce específicamente la neurolina. Los axones $zn8^+$ se localizan en la parte más vitreal de la CFNO en la retina (Figura 31F), hasta que llegan a la CNO donde quedan dispuestos en torno a la arteria central. En esta zona dichos axones se pueden observar casi perfectamente paralelos a grupos de oligodendrocitos $sox10^+$ dispuestos más lateralmente a la arteria central (Figura 31F).

Por último, analizamos la expresión de citoqueratina (ck), un marcador que reconoce los astrocitos reticulados del NO de teleósteos. En la retina encontramos un fuerte marcaje en la MLE (Figura 32A), y también observamos una leve inmunorreactividad en las paredes de los vasos sanguíneos, especialmente en la arteria central. Por otra parte, observamos una tinción muy débil en la CNO (Figura 32A). Sin embargo, en el NO detectamos un fuerte marcaje ck^+ desde la zona de transición CNO-NO (Figura 32A). Al observar esta transición en detalle, se aprecia cómo los procesos ck^+ envuelven tanto a los oligodendrocitos $sox10^+$ presentes en la limitante glial como a los que se encuentran en el interior del NO (Figura 32B), organización que se repite en el NO (Figura 32C) y que detallaremos con otros marcadores más adelante.

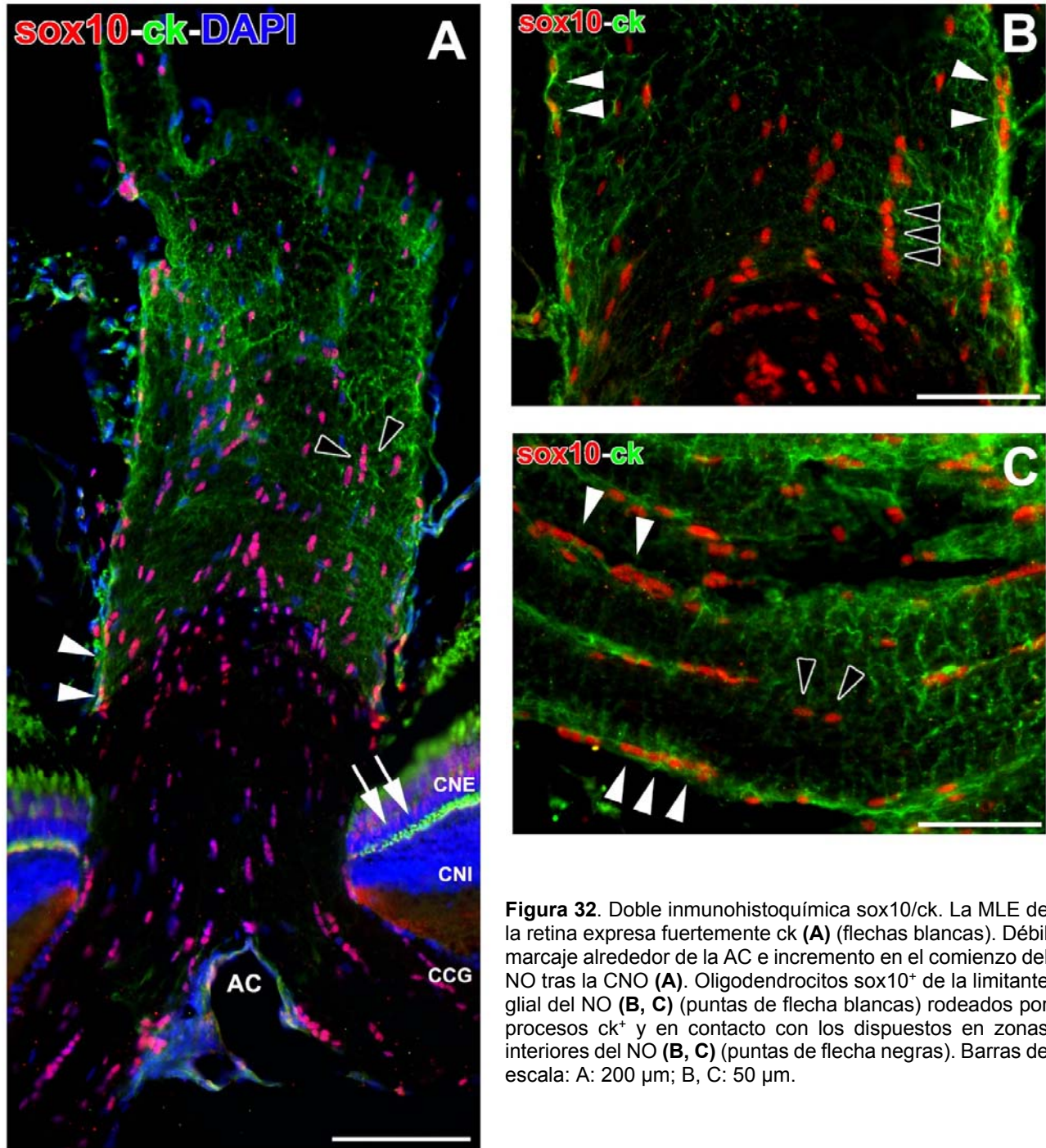


Figura 32. Doble inmunohistoquímica sox10/ck. La MLE de la retina expresa fuertemente ck (A) (flechas blancas). Débil marcaje alrededor de la AC e incremento en el comienzo del NO tras la CNO (A). Oligodendrocitos sox10⁺ de la limitante glial del NO (B, C) (puntas de flecha blancas) rodeados por procesos ck⁺ y en contacto con los dispuestos en zonas interiores del NO (B, C) (puntas de flecha negras). Barras de escala: A: 200 μ m; B, C: 50 μ m.

RESULTADOS

- *Oligodendrocitos sox10 tras el pinzamiento del NO*

Para comprobar la respuesta de los oligodendrocitos tras el pinzamiento del NO derecho, utilizamos los mismos marcadores que en el grupo control. Hemos cuantificado estadísticamente la existencia de diferencias entre los animales pinzados (sacrificados a diferentes tiempos de supervivencia) y los controles. También analizamos las modificaciones morfológicas y de disposición que presentaron a lo largo de los tiempos estudiados.

- 2dp

El primer grupo que analizamos tras el pinzamiento fue a los 2dp. Nos encontramos con un aumento altamente significativo ($p < 0,001$) en la densidad celular tanto en la retina, CNO y NO (Figura 33, Figura 34). Al analizar estas estructuras, los cambios más reseñables se observan en el NO, especialmente en la zona del pinzamiento. En el marcaje con GS, no encontramos diferencias de expresión en la retina (Figura 34A), aunque seguimos observando oligodendrocitos $sox10^+$ en la CNO, en grupos más numerosos que en los

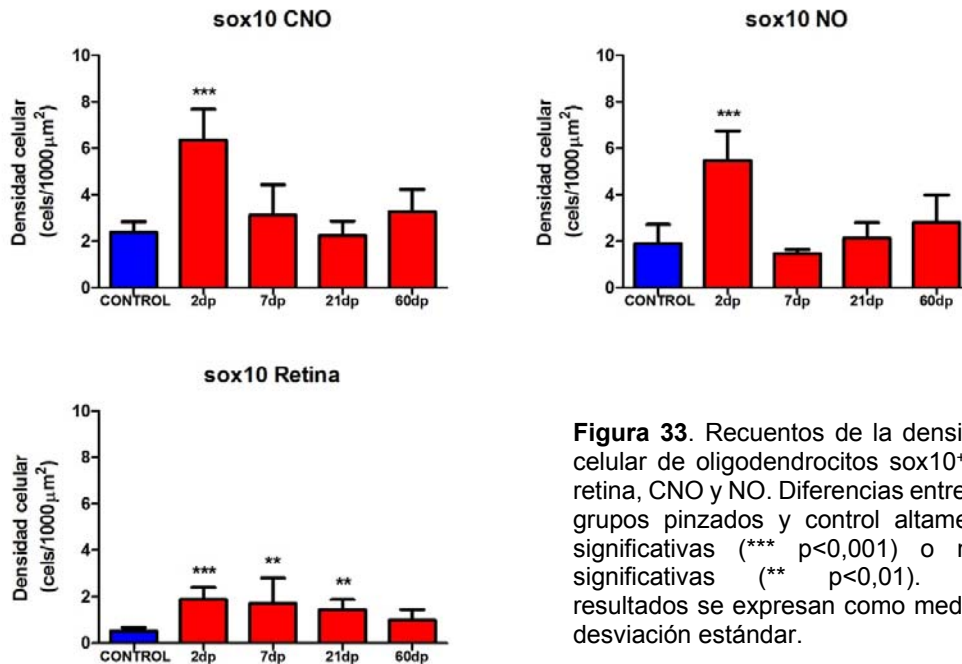


Figura 33. Recuentos de la densidad celular de oligodendrocitos $sox10^+$ en retina, CNO y NO. Diferencias entre los grupos pinzados y control altamente significativas (***) $p < 0,001$) o muy significativas (** $p < 0,01$). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

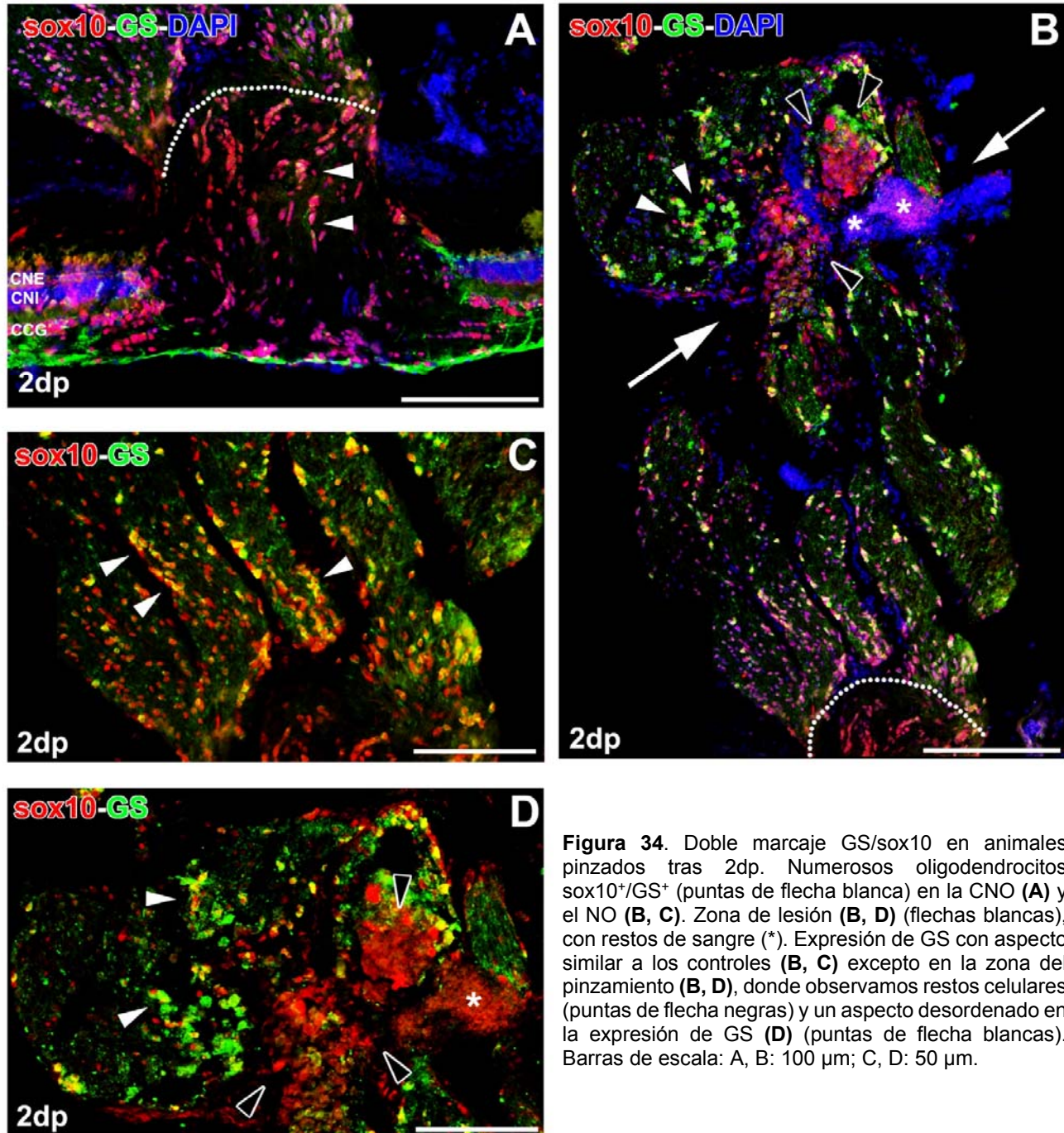


Figura 34. Doble marcaje GS/sox10 en animales pinzados tras 2dp. Numerosos oligodendrocitos $sox10^+/GS^+$ (puntas de flecha blanca) en la CNO (**A**) y el NO (**B, C**). Zona de lesión (**B, D**) (flechas blancas), con restos de sangre (*). Expresión de GS con aspecto similar a los controles (**B, C**) excepto en la zona del pinzamiento (**B, D**), donde observamos restos celulares (puntas de flecha negras) y un aspecto desordenado en la expresión de GS (**D**) (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, B: 100 μm ; C, D: 50 μm .

controles. Las mayores variaciones, tanto en la expresión de GS como de otros marcadores las encontramos en el NO, en el que detectamos una gran densidad de células GS^+ en la zona posterior a la lesión (Figura 34B). Este marcaje apareció desordenado, como el de $sox10$ (Figura 34B). La zona del pinzamiento se diferencia por una disminución en el grosor del NO, así como por la presencia de restos de sangre, perfectamente reconocible por los núcleos marcados

RESULTADOS

únicamente por DAPI, alrededor de la zona de lesión (Figura 34B). Por otra parte, en zonas más proximales a la CNO, nos encontramos con abundantes oligodendrocitos GS⁺ (Figura 34B), con la estructura y características descritas en los animales control, aunque en mayor cantidad (Figura 34B, C). A mayor detalle, se observa que mientras que las células GS⁺ se siguen disponiendo en hileras y grupos en zonas anteriores al pinzamiento (Figura 34C), en la zona

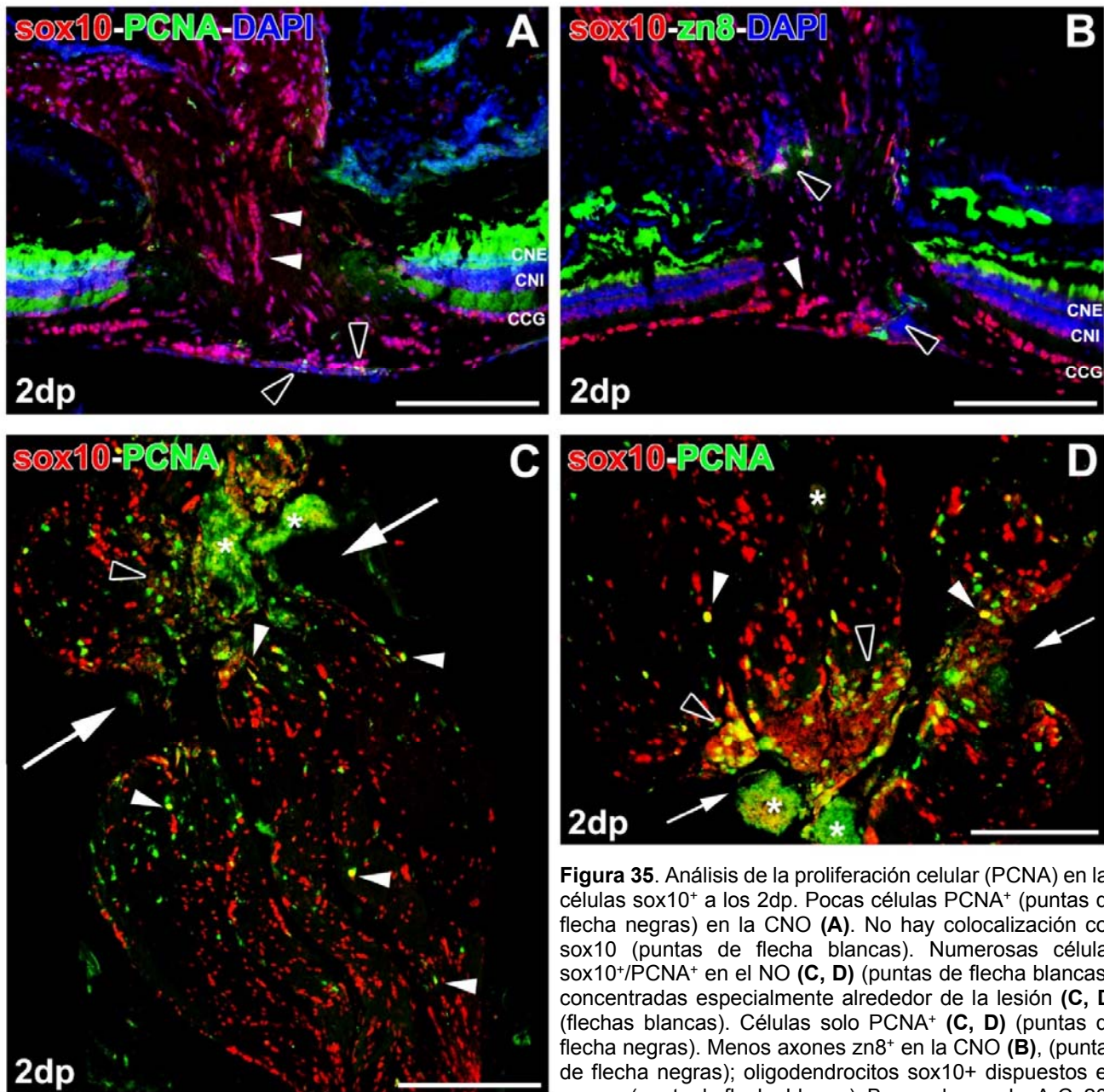


Figura 35. Análisis de la proliferación celular (PCNA) en las células *sox10*⁺ a los 2dp. Pocas células PCNA⁺ (puntas de flecha negras) en la CNO (**A**). No hay colocalización con *sox10* (puntas de flecha blancas). Numerosas células *sox10*⁺/PCNA⁺ en el NO (**C, D**) (puntas de flecha blancas), concentradas especialmente alrededor de la lesión (**C, D**) (flechas blancas). Células solo PCNA⁺ (**C, D**) (puntas de flecha negras). Menos axones *zn8*⁺ en la CNO (**B**), (puntas de flecha negras); oligodendrocitos *sox10*⁺ dispuestos en grupos (punta de flecha blanca). Barras de escala: A-C: 200 μm; D: 50 μm. El asterisco (*) indica restos de sangre en la zona lesionada.

posterior es difícil determinar si permanece alrededor del citoplasma de las

células $sox10^+$, ya que el marcaje aparece condensado en forma de grumos muy densos (Figura 34D).

Al analizar la proliferación celular, no encontramos grandes cambios ni en la retina ni en la CNO (Figura 35A); aunque sí encontramos algunas células $PCNA^+$ en la zona más vitreal de la CNO (Figura 35A). Sin embargo, es en el NO donde observamos las diferencias más notables (Figura 35C). Encontramos numerosos oligodendrocitos en proliferación $sox10^+/PCNA^+$, principalmente en las zonas anterior y posterior del pinzamiento (Figura 35C). Sin embargo, en zonas más próximas a la CNO, donde los oligodendrocitos se mantienen en fila o en grupos, localizamos algunos oligodendrocitos aislados que coexpresan $PCNA$. Al examinar en mayor detalle la zona del pinzamiento (Figura 35D), nos encontramos con una gran cantidad de células en proliferación, algunas de ellas $sox10^+$, aunque como en el caso de la GS, fue difícil diferenciar la naturaleza de las mismas por la presencia de sangre o de zonas dañadas por el pinzamiento (Figura 35D).

Por último, analizamos la expresión de $zn8$ (Figura 35B). En la CNO hemos encontrado una menor cantidad de axones e intensidad de marcaje que en condiciones control (Figura 35B), localizando algunos restos de marcaje en la zona de transición CNO-NO. En el NO, no observamos diferencias respecto a las condiciones control.

- 7dp

A continuación examinamos el grupo de animales sacrificados a los 7dp. A diferencia del grupo estudiado a los 2dp, no encontramos diferencias significativas en la cantidad de oligodendrocitos presentes en la CNO o NO (Figura 33), aunque los valores medios de la CNO eran ligeramente elevados con respecto al control y ligeramente inferiores en el NO (Figura 33). Sin embargo, en la retina sí que observamos un incremento muy significativo ($p < 0,01$) en la población de oligodendrocitos.

Al analizar nuevamente la expresión de GS, nos encontramos con un aparente aumento de la misma en la retina (Figura 36A), donde los procesos vitreales de las células de Müller aparecían mucho más gruesos y numerosos. Al contrario que en los animales control y los pinzados a los 2 días, no encontramos

RESULTADOS

oligodendrocitos que expresen GS en la CNO (Figura 36A), aunque los grupos de estas células parecían ser más numerosos. Algunos de estos grupos

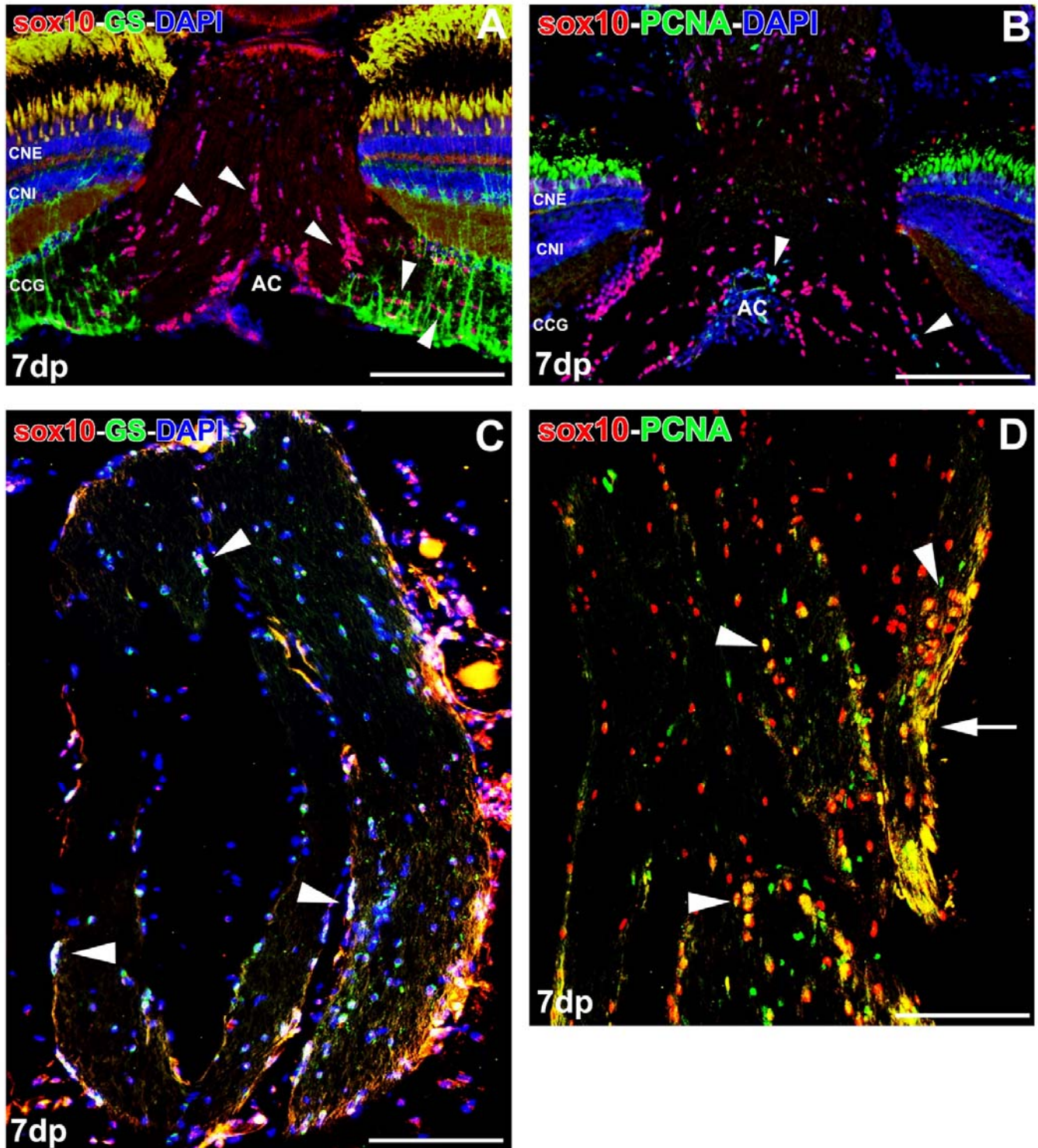


Figura 36. Doble marcaje de $sox10^+$ con GS y PCNA a los 7dp. Procesos GS^+ de células de Müller más marcados que en los controles (A), en estrecho contacto con células $sox10^+$ (puntas de flecha blancas). No observamos células $sox10^+/GS^+$ en la CNO (A), pero sí en el NO (C) (puntas de flecha blancas). Pocas células $PCNA^+$ en la CNO (B) (puntas de flecha blancas), pero abundantes células $sox10^+/PCNA^+$ en el NO (D) (puntas de flecha blancas), especialmente concentradas alrededor de la zona pinzada (flecha blanca). Barras de escala: A-D: 200 μ m.

RESULTADOS

aparecían en íntimo contacto con los procesos GS⁺ de las células de Müller, sobre todo en las zonas de la transición retina-CNO (Figura 36A). Al analizar el NO, ya no observamos la zona del pinzamiento tan marcada (Figura 36C), aunque sí se manifestaba al utilizar marcadores de proliferación (PCNA) (Figura 36D). Seguimos encontrando oligodendrocitos sox10⁺/GS⁺, aunque los grupos están formados por menos células y su orden no es tan característico como en otros estadios (Figura 36C). Por otra parte, al estudiar la proliferación celular detectamos resultados similares a los 2dp en la CNO (Figura 36B), donde se observan algunas células PCNA⁺ que se disponen también en los márgenes de

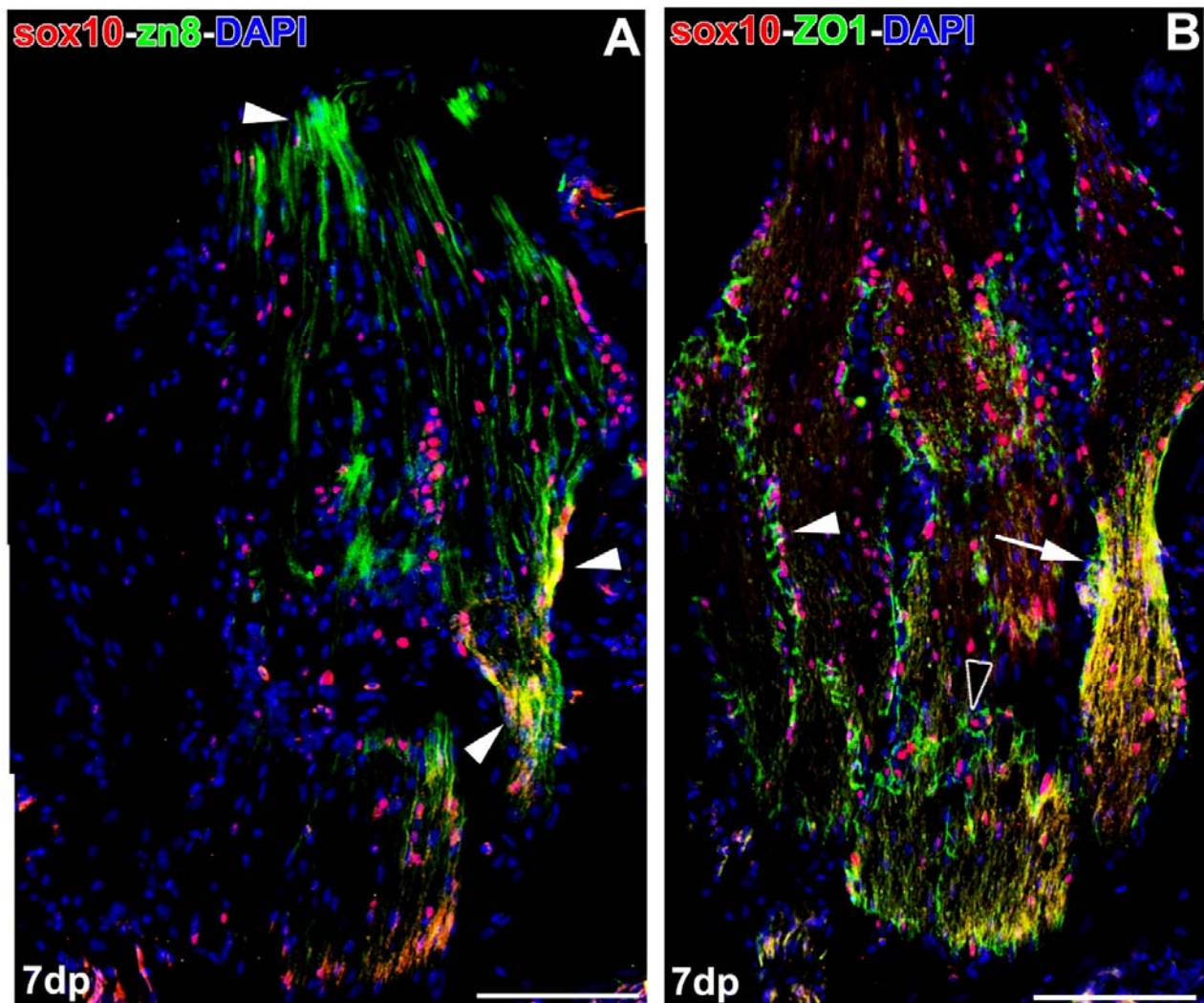


Figura 37. Análisis de la regeneración axonal (zn8), de las uniones adherentes (ZO1) y de los oligodendrocitos sox10⁺ a los 7dp. Numerosos axones en crecimiento zn8⁺ en el NO a los 7dp (**A**) (puntas de flecha blancas), dispuestos en algunas zonas en paralelo con oligodendrocitos sox10⁺. Marcaje desorganizado ZO1/sox10 en el NO, especialmente alrededor de la zona de lesión (**B**) (flecha blanca), aunque en otras zonas del NO observamos células sox10⁺/ZO1⁺ en la limitante glial (punta de flecha blanca), así como en el interior del NO (punta de flecha negra). Barras de escala: A, B: 200 μ m

RESULTADOS

la arteria central (Figura 36B), y tan sólo muy pocas de ellas son también $sox10^+$. Como a los 2dp, las diferencias aparecieron al observar el NO (Figura 36D), donde localizamos un mayor número de células en proliferación, especialmente en la zona del pinzamiento (Figura 36D), aunque también estaban presentes en mayor número en otras zonas en comparación a los 2dp. También encontramos que muchas de ellas colocalizan con $sox10$ (Figura 36D), especialmente cerca de la zona de lesión.

Otra diferencia notable que localizamos a los 7dp fue la presencia de numerosos axones $zn8^+$ en el NO (Figura 37A). Dichos axones discurren de forma centrífuga desde la zona de la lesión, disponiéndose en algunas partes en paralelo a oligodendrocitos $sox10$ (Figura 37A). Por otra parte, al estudiar las uniones celulares mediante el marcaje de ZO1 observamos oligodendrocitos ZO1 en las zonas limitantes del NO (Figura 37B), además de zonas con un marcaje ZO1 desorganizado alrededor de la zona pinzada (Figura 37B). En cualquier caso, la menor organización de los oligodendrocitos en el NO se reflejó en el marcaje de ZO1, apareciendo en general menos organizado que en animales control (Figura 31B).

- 21dp

A los 21dp nos encontramos en una situación parecida a los 7dp. Al analizar la expresión de GS en la CNO, observamos una disminución en la intensidad del marcaje de los procesos de las células de Müller (Figura 38A) respecto a los 7dp (Figura 36A). Observamos oligodendrocitos con una distribución muy similar a los controles, dispuestos en grupos y filas no muy numerosas. También seguimos encontrando hileras de oligodendrocitos en la transición retina-CNO que parecen estar en íntimo contacto con los procesos GS^+ de las células de Müller (Figura 38A) No detectamos diferencias significativas en la población de oligodendrocitos ni en la CNO ni en el NO (Figura 33), aunque nos volvemos a apreciar un aumento muy significativo de células $sox10^+$ en la retina ($p < 0,01$).

Sin embargo, en el NO observamos una mayor intensidad de marcaje de GS en este grupo experimental, sobre todo en la zona lesionada (Figura 38B). Esta zona es fácilmente reconocible precisamente por la mayor expresión de GS respecto a otras zonas del NO (Figura 38B). En todo caso, a ambos lados de la

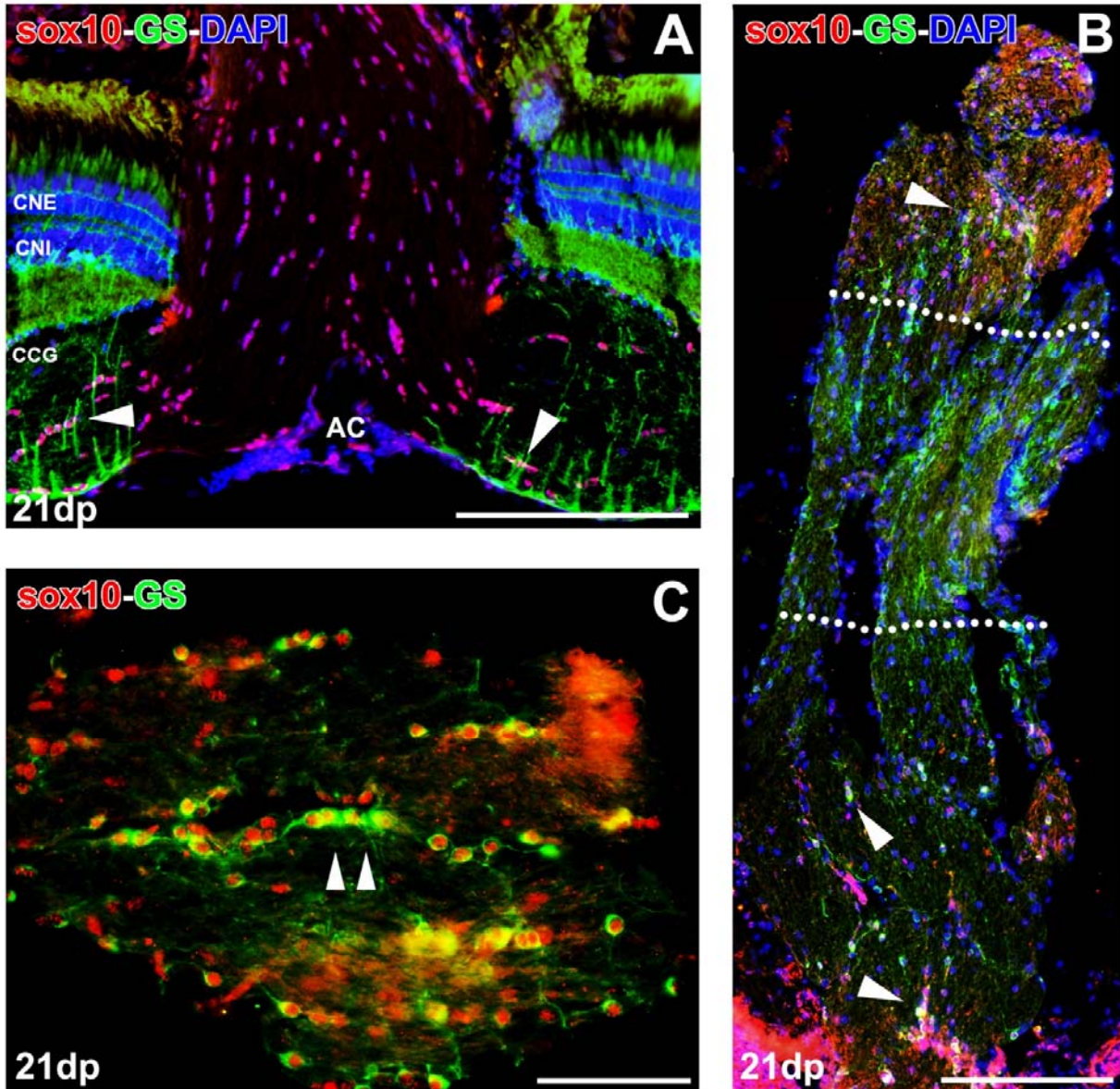


Figura 38. Doble inmunorreactividad *sox10*/*GS* a los 21dp. Menor intensidad de procesos *GS*⁺ de las células de Müller en la retina (**A**), en contacto con oligodendrocitos *sox10*⁺ (puntas de flecha blanca). No encontramos células *sox10*⁺/*GS*⁺ en la CNO (**A**), pero sí en el NO (**B, C**) (puntas de flecha blancas), donde apreciamos un incremento en la expresión de *GS* en la zona del pinzamiento (delimitada con líneas de puntos). Oligodendrocitos *sox10*⁺/*GS*⁺ del NO (**B, C**) con abundantes procesos *GS*⁺ en algunas zonas (**C**). Barras de escala: A, B: 200 μ m; C: 50 μ m.

zona del pinzamiento encontramos hileras de células *sox10*⁺/*GS*⁺, algunas de las cuales presentan procesos muy marcados y más llamativos que en el estado control (Figura 38C).

Respecto a la proliferación, a los 21dp observamos una tinción similar a las descritas anteriormente. Encontramos pocas células *PCNA*⁺ en la CNO (Figura 39A), y muy pocas marcadas con *sox10*. Dichas células *PCNA*⁺ se distribuyen

RESULTADOS

también cerca de la arteria central, aunque aparece alguna aislada en zonas algo más profundas de la CNO. En cambio, en el NO detectamos una notable disminución en la cantidad de células proliferativas que no se encontraban concentradas alrededor de la lesión (Figura 39B).

Por su parte, el marcaje para ZO1 presenta un aspecto mucho más organizado (Figura 41A) respecto a los tiempos anteriores. Así, observamos nuevamente un débil marcaje ZO1⁺ en la CNO junto con el ya localizado en la MLE de la retina (Figura 41A). También pudimos distinguir la zona de transición CNO-NO, ya que el marcaje de ZO1 aparece mucho más organizado en el NO que a los 7dp (Figura 41A). En el NO también detectamos oligodendrocitos ZO1 en las zonas marginales (Figura 41A), y no observamos una acumulación alrededor de la zona del pinzamiento.

Por último, localizamos un aumento en la intensidad del marcaje y la cantidad de axones zn8 en la CNO (Figura 41B), y un aumento en los axones zn8 detectados en la retina (Figura 41B) respecto a los 2dp (Figura 35B).

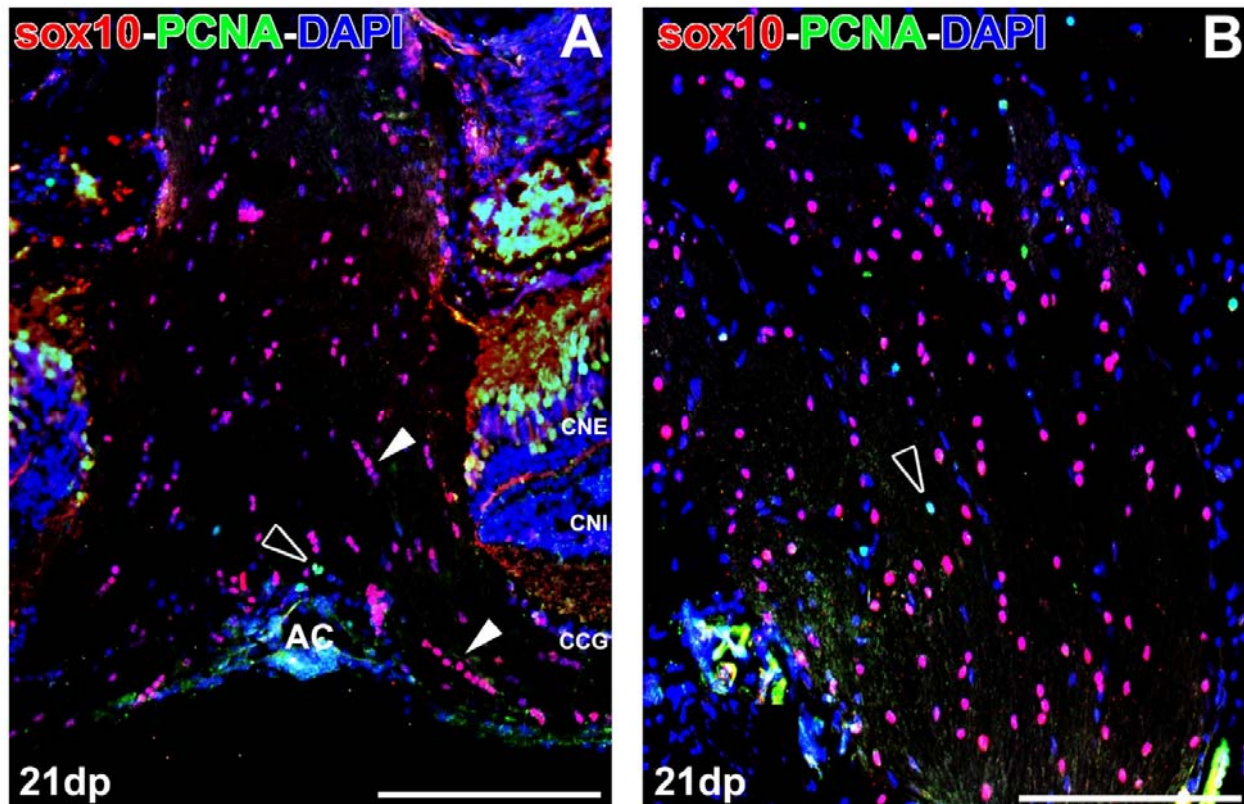


Figura 39. Análisis de la proliferación celular (PCNA) en oligodendrocitos $sox10^+$ a los 21dp. Pocas células PCNA⁺ en la CNO (A) (punta de flecha negra), que en pocos casos colocalizaron con oligodendrocitos $sox10^+$ (puntas de flecha blancas). Menor número de células proliferativas (punta de flecha negra) en el NO (B) respecto a los 7dp, y no concentradas alrededor de la zona de la lesión. Barras de escala: A, B: 200 μ m.

Es también importante reseñar que los oligodendrocitos sox10 marcados en el NO a los 21dp tampoco estaban dispuestos ni en filas ni grupos numerosos (Figura 39A, B; Figura 41A) como los observados en individuos control (Figura 30D, E).

- 60dp

A los 60dp no encontramos ninguna diferencia significativa en la densidad de oligodendrocitos, ni en la retina ni en la CNO o NO (Figura 33) con respecto a los animales control, a pesar de que los valores medios eran algo superiores en los lesionados.

Al analizar el marcaje de la GS, tampoco detectamos grandes diferencias en la CNO (Figura 40A), con oligodendrocitos formando hileras y grupos más o menos numerosos. En la retina tampoco encontramos diferencias en la intensidad del marcaje de las células de Müller respecto a los controles, como lo observado ya a los 21dp. En el NO, el marcaje de GS se observa distribuido mucho más uniformemente que a los 21dp (Figura 40C), sin encontrar diferencias reseñables en la zona del pinzamiento, cada vez menos visible salvo por un leve adelgazamiento en el NO (Figura 40C). Tampoco las células GS⁺ muestran diferencias en las zonas anterior o posterior al pinzamiento, formando hileras cortas como las observadas en condiciones control.

Respecto a la expresión de zn8, encontramos un marcaje más intenso en la zona de la arteria central en la CNO (Figura 40B), aunque no detectamos los grandes tractos zn8⁺ localizados a los 21dp ni en los animales control. En el NO, por el contrario, observamos tractos zn8⁺ discurriendo en zonas marginales (Figura 40D), al contrario de lo ocurrido en otros estadios tras el pinzamiento.

RESULTADOS

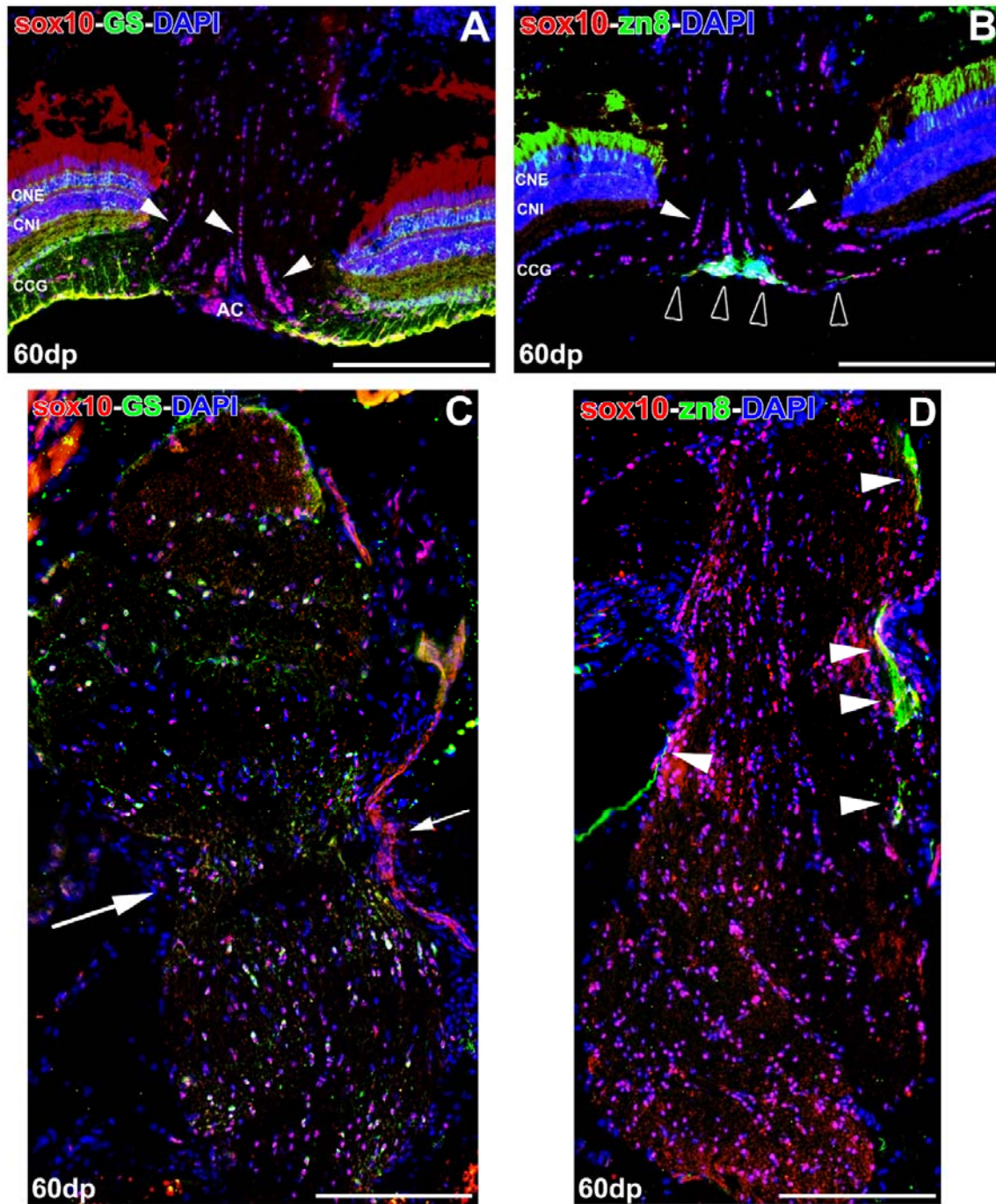


Figura 40. Doble marcaje de *sox10* con *GS* y *zn8* a los 60dp. Los procesos *GS*⁺ de las células de Müller (**A**) mostraron un aspecto similar a los controles. Los oligodendrocitos *sox10*⁺ (puntas de flecha blancas) se detectaron en filas o grupos similares a los controles. En el NO, numerosas células *sox10*⁺/*GS*⁺ (**C**), distribuidas en toda su extensión, sin concentrarse en la zona lesionada, cada vez menos detectable (flechas blancas). Distribución de axones *zn8*⁺ en la CNO similar a los controles (**B**) (puntas de flecha negras), al igual que los oligodendrocitos *sox10* (puntas de flecha blancas). Tractos *zn8*⁺ en las zonas marginales en del NO (**D**) (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A-D: 200 μ m.

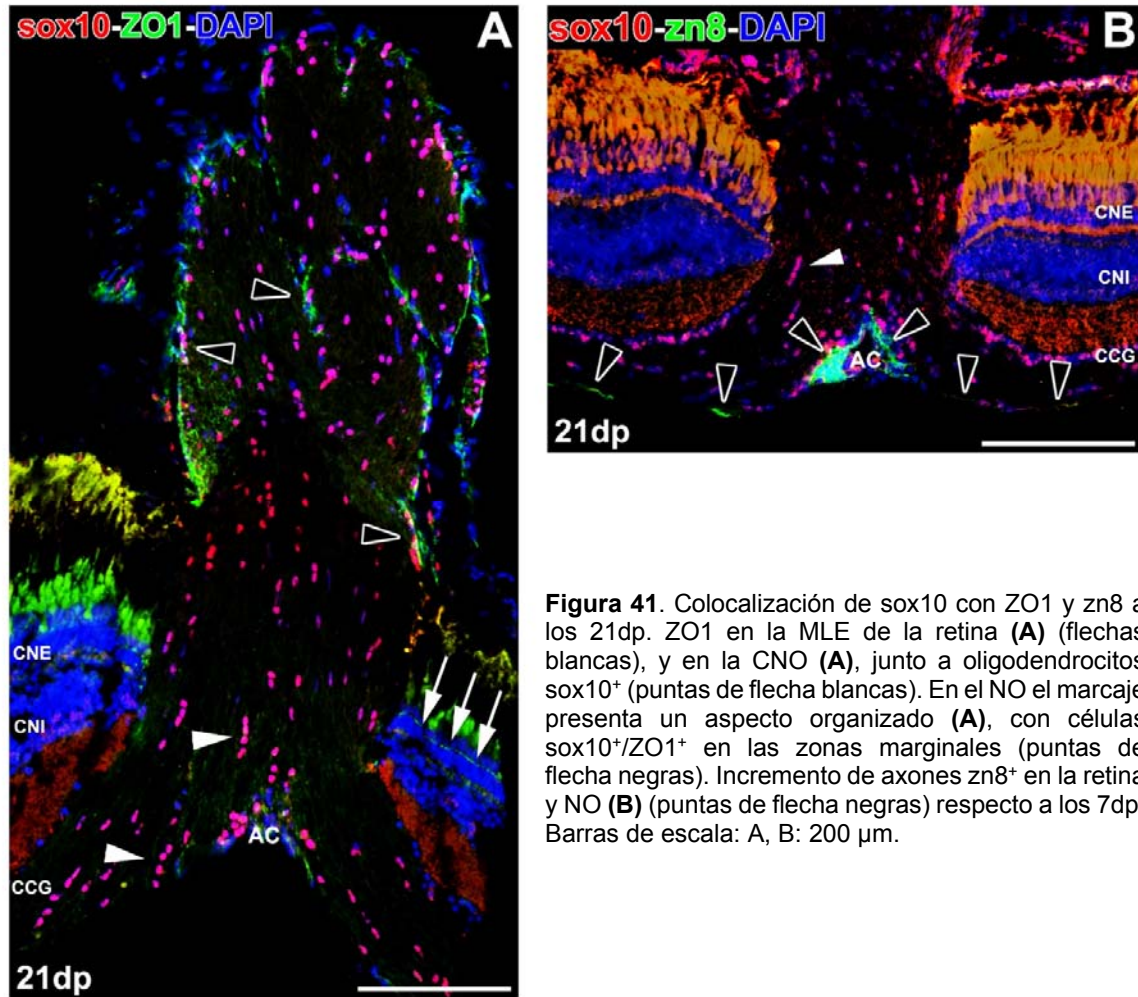


Figura 41. Colocalización de *sox10* con *ZO1* y *zn8* a los 21dp. *ZO1* en la MLE de la retina (**A**) (flechas blancas), y en la CNO (**A**), junto a oligodendrocitos *sox10*⁺ (puntas de flecha blancas). En el NO el marcaje presenta un aspecto organizado (**A**), con células *sox10*⁺/*ZO1*⁺ en las zonas marginales (puntas de flecha negras). Incremento de axones *zn8*⁺ en la retina y NO (**B**) (puntas de flecha negras) respecto a los 7dp. Barras de escala: A, B: 200 μ m.

RESULTADOS

- **Olig2**

En nuestro estudio hemos analizado también el marcador de oligodendrocitos olig2. Para ello utilizamos un anticuerpo comercial y tras poner a punto el protocolo de fijación, conseguimos identificar células olig2⁺ en nuestros preparados. Cabe destacar que, a fecha de hoy, disponemos de muy pocos anticuerpos funcionales para olig2 en el pez cebra, y que es muy difícil conseguir un marcaje limpio.

- *olig2 en condiciones control*

Los resultados obtenidos en el grupo control con el anticuerpo para olig2 son similares a los mostrados para sox10. En ocasiones el marcaje es menos nítido que con sox10, pero se observan las mismas estructuras y colocalizaciones que las descritas anteriormente.

Así, detectamos marcadas con olig2 las mismas filas y grupos de células que en el caso de sox10 (Figura 42A, B). En la retina se localizaron células olig2⁺ en la CCG y en la CNO extendiéndose por toda su superficie (Figura 42A, B, C). Estas células olig2⁺ presentan núcleos redondeados e indentados (Figura 42D). También observamos colocalización con GS (Figura 42B). Las células de la parte más vitreal de la retina, cerca de la CNO, se intercalan con los procesos vitreales de las células de Müller (Figura 42B). En la CFNO de la retina se distribuyen por todo su grosor (Figura 42C). En el NO, encontramos células olig2⁺/GS⁺ dispuestas de forma similar a las células sox10⁺ descritas anteriormente (Figura 42D). Tomando todo esto en consideración, podemos afirmar que el anticuerpo anti-olig2 utilizado identifica también los oligodendrocitos sox10 en el sistema visual del pez cebra.

También analizamos si las células olig2⁺ proliferan en los individuos control. Tanto en la CNO como en el NO, hemos hallado algunas células olig2⁺/PCNA⁺ (Figura 42E, F).

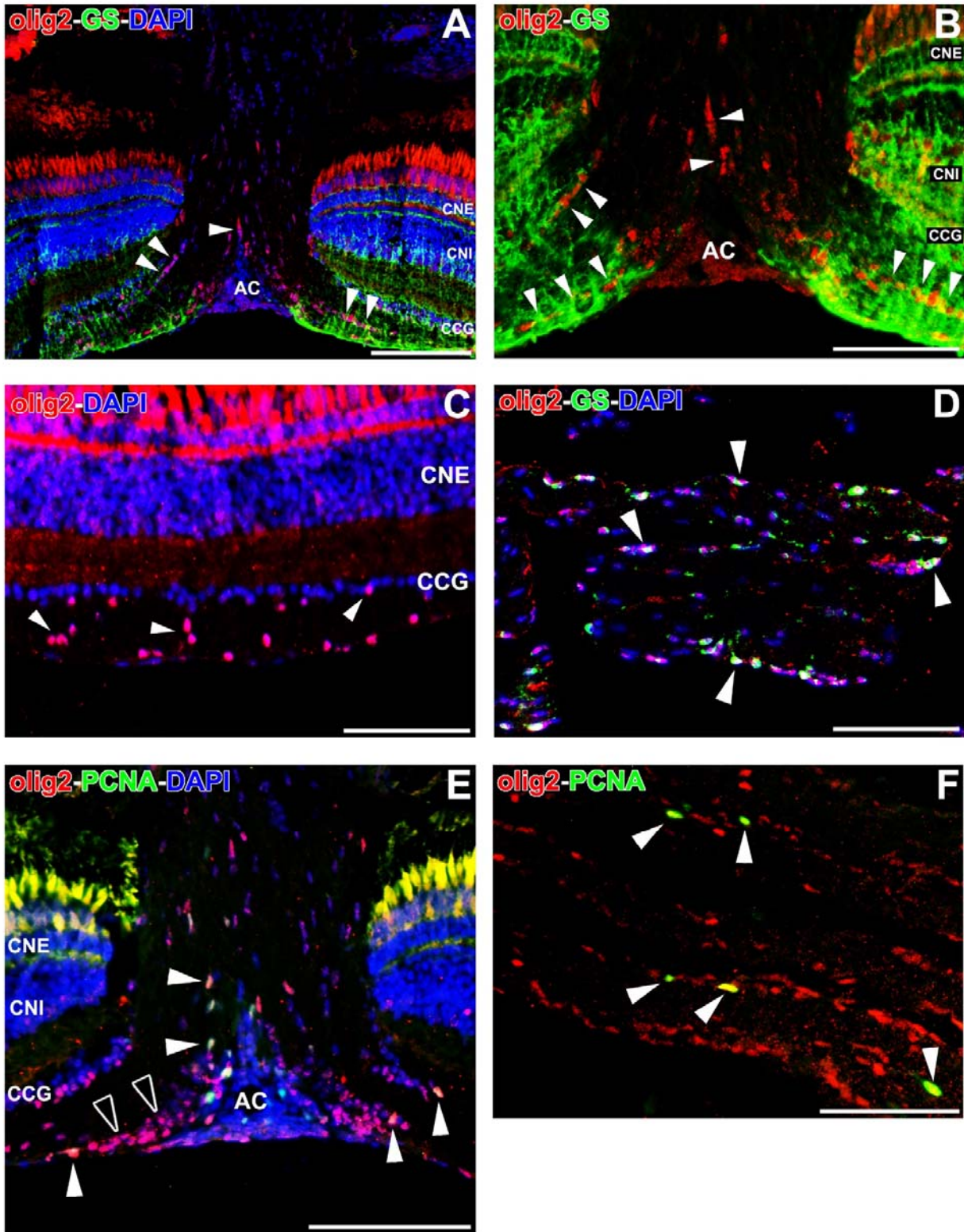


Figura 42. Dobles marcajes olig2 y GS/PCNA en animales control. Oligodendrocitos olig2⁺ en la CCG de la retina y CNO (**A, B, C**) formando hileras (puntas de flecha blancas). Similares resultados en el NO (**D**), con células olig2⁺/GS⁺. Pocas células dobles olig2⁺/PCNA⁺ en la CNO (**E**) (puntas de flecha blancas), la mayoría simples olig2⁺ (puntas de flecha negras). De forma similar, pocas células doblemente marcadas en el NO (**F**). Barras de escala: A, E: 200 μ m; B-D, F: 100 μ m.

RESULTADOS

- *olig2* tras el pinzamiento del NO

Al igual que para otros casos, hemos analizado y cuantificado la población de células *olig2*⁺ tras el pinzamiento del NO. Los animales fueron sacrificados tras periodos cortos (2, 5 y 7dp), con el fin de comprobar la evolución temprana con este marcador, del que no disponíamos de datos previos.

- 2dp

Al analizar la población *olig2* a los 2dp, no encontramos diferencias significativas ($p > 0,05$) en la CNO (Figura 43), aunque presenta valores medios algo superiores a los del grupo control. Tampoco encontramos diferencias en el NO (Figura 43). En la retina observamos un aumento en la intensidad del marcaje de la GS (Figura 44A), detectando filas de oligodendrocitos *olig2*⁺ intercalados con procesos GS⁺ de las células de Müller (Figura 44A). Detectamos también células *olig2*⁺/GS⁺ en la CNO (Figura 44A), al igual que en el NO (Figura 44A). Por otra parte, la expresión de PCNA en el NO se concentra fundamentalmente alrededor de la zona lesionada (Figura 44B), donde encontramos algunas células *olig2*⁺/PCNA⁺, aunque también observamos células en división en otras zonas del NO (Figura 44B).

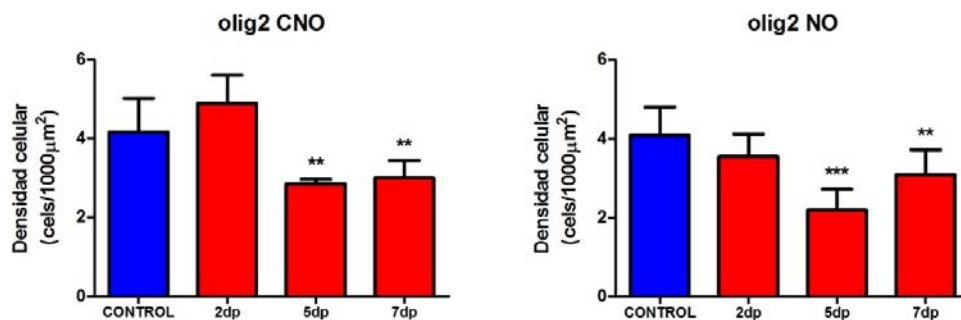


Figura 43. Variación de la densidad celular de oligodendrocitos *olig2*⁺ en la CNO y NO. Diferencias entre los grupos pinzados y control altamente significativas (***) $p < 0,001$) o muy significativas (** $p < 0,01$). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

- 5dp

En los animales sacrificados a los 5dp observamos una disminución muy significativa ($p < 0,01$) en la cantidad de células *olig2*⁺ en la CNO (Figura 43). En el

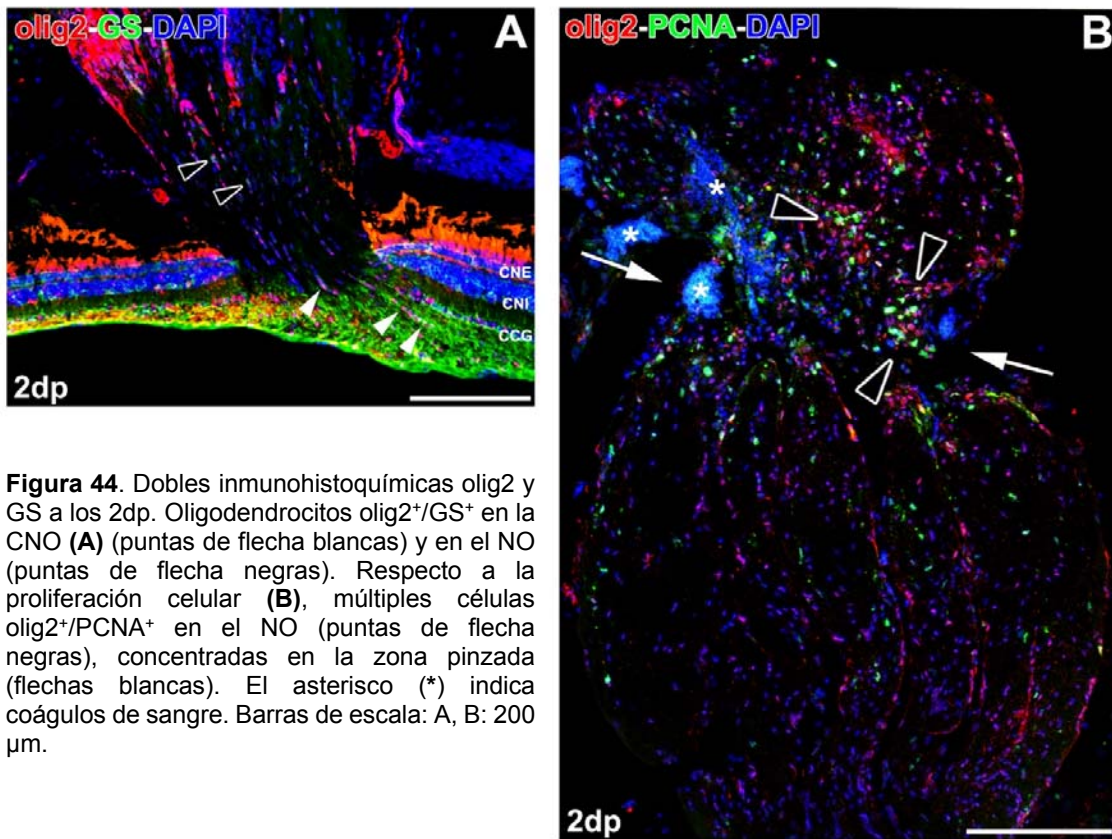


Figura 44. Dobles inmunohistoquímicas olig2 y GS a los 2dp. Oligodendrocitos olig2⁺/GS⁺ en la CNO (**A**) (puntas de flecha blancas) y en el NO (puntas de flecha negras). Respecto a la proliferación celular (**B**), múltiples células olig2⁺/PCNA⁺ en el NO (puntas de flecha negras), concentradas en la zona pinzada (flechas blancas). El asterisco (*) indica coágulos de sangre. Barras de escala: A, B: 200 μm.

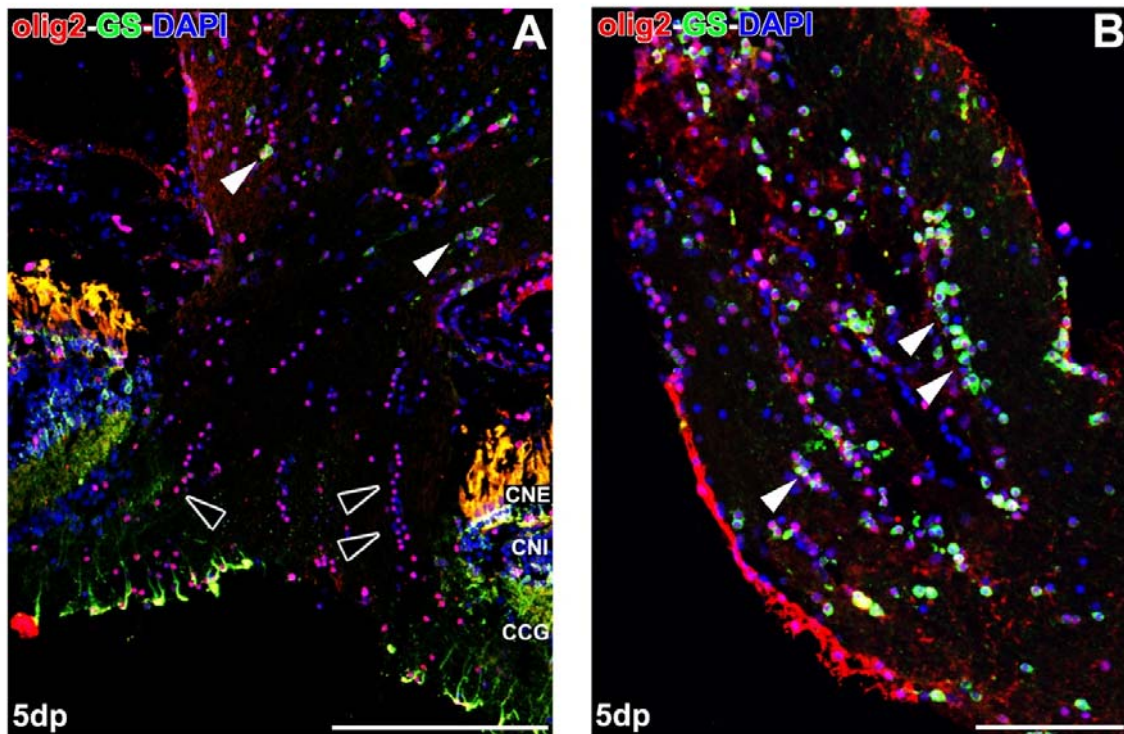


Figura 45. Expresión de olig2 y GS a los 5dp. Células olig2⁺/GS⁻ en la CNO (**A**) (puntas de flecha negras) y en el NO (puntas de flecha blancas). A mayor aumento (**B**), múltiples células olig2⁺/GS⁺ en el NO (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A: 200 μm; B: 100 μm.

RESULTADOS

NO también encontramos una disminución, aunque altamente significativa ($p < 0,001$) (Figura 43).

En este grupo no localizamos expresión de GS en la CNO (Figura 45A), aunque sí detectamos núcleos de oligodendrocitos $olig2^+$ formando filas en esta zona (Figura 45A). Por el contrario, sí que observamos expresión de GS tras la zona de transición CNO-NO (Figura 45A), y tanto en ella como en el resto del NO encontramos células $olig2^+/GS^+$ (Figura 45B).

- 7dp

A los 7dp continuamos encontrando una disminución muy significativa ($p < 0,01$) en la cantidad de células $olig2^+$ tanto en la CNO como en el NO (Figura 43). Detectamos un incremento en la intensidad de los procesos GS^+ de las células de Müller (Figura 46A, B). No observamos cambios en la disposición de las células $olig2^+$ en la retina (Figura 46B). Localizamos numerosos grupos de oligodendrocitos $olig2^+$ en la CNO (Figura 46A). Por su parte, en el NO detectamos un aumento en la expresión de GS^+ (Figura 46C) con respecto a los 5dp. Finalmente, encontramos células $PCNA^+$ cerca de la zona lesionada (Figura 46D), aunque también en otras localizaciones del NO. Algunas de ellas mostraron también expresión de $olig2$ (Figura 46D).

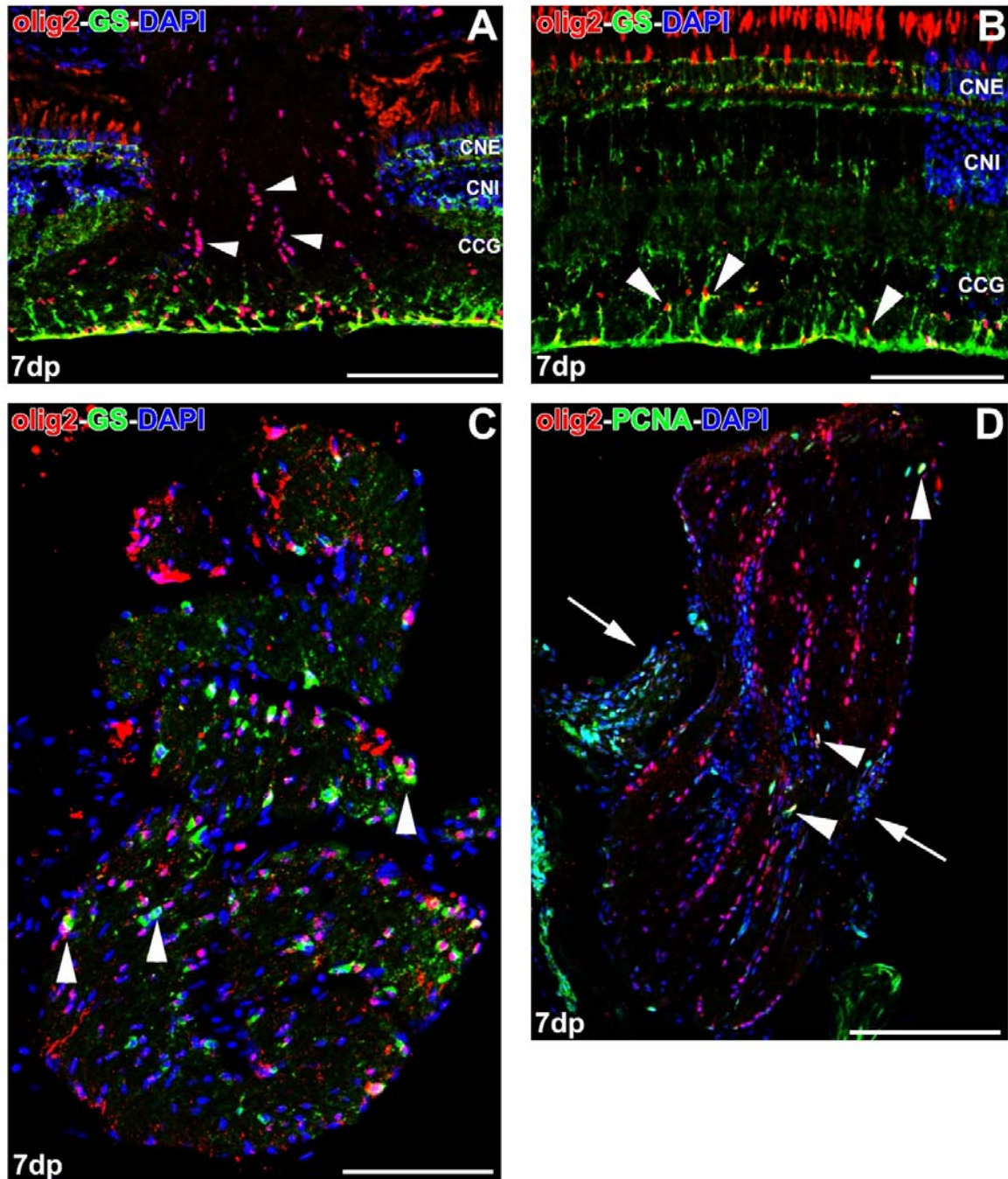


Figura 46. Dobles marcajes olig2 y GS/PCNA a los 7dp. Oligodendrocitos olig2⁺ en la CNO (**A**) dispuestos en filas y grupos (puntas de flecha blancas). En la retina (**B**), células olig2⁺ en estrecho contacto con procesos GS⁺ de las células de Müller (puntas de flecha blancas). Oligodendrocitos olig2⁺/GS⁺ en el NO (**C**) (puntas de flecha blancas). Escasas células proliferativas olig2⁺/PCNA⁺ en el NO (**D**) (puntas de flecha blancas), concentradas en la zona pinzada (flechas blancas). Barras de escala: A, D: 200 μ m; B, C: 100 μ m.

RESULTADOS

- **Mbp**

En este apartado de nuestro trabajo analizamos la mielinización en la vía visual del pez cebra, para lo cual utilizamos un anticuerpo anti mbp, o proteína básica de la mielina. Este anticuerpo está específicamente diseñado para reconocer la mbp del pez cebra, y fue cedido por el Profesor Bruce Appel, de la *University of Colorado Denver*. Estudiamos las variaciones en la expresión de esta proteína tanto en grupos control como en los animales pinzados, y realizamos también el análisis junto a otros marcadores inmunohistoquímicos utilizados anteriormente.

- *mbp en condiciones control*

En los animales del grupo control detectamos la expresión de mbp en todas las estructuras estudiadas, desde la retina hasta el NO (Figura 47). En la retina, observamos que el marcaje de mbp se extiende desde la proximidad de la ZPG (Figura 47A) hasta la CNO (Figura 47C). El marcaje para mbp se confina en la CFNO (Figura 47B, C), quedando delimitado en su parte más vitreal por los procesos GS⁺ de las células de Müller (Figura 47B). Cabe destacar que dichos procesos se intercalan con los axones mbp⁺, aunque debido a la gran cantidad e intensidad en el marcaje no hemos podido diferenciar con absoluta nitidez esta íntima relación. En la CNO, así como en la retina y el NO, detectamos grupos de axones mbp⁺ entre los que se pueden observar a modo de oquedades en las que se disponen los núcleos de los oligodendrocitos (Figura 47C). En la zona de transición de la retina-CNO los haces de axones mbp⁺ muestran un aspecto menos compacto (Figura 47C).

Observamos oligodendrocitos GS⁺ intercalados tanto en la CNO como en el NO (Figura 47D, E), aunque en mayor cantidad a partir de la zona de transición CNO-NO (Figura 47D). En esta zona apreciamos un cambio de apariencia e intensidad en el marcaje de mbp, que se acompaña con un incremento en la cantidad de células y de la expresión de la GS (Figura 47D, E).

Para analizar con más detalle la expresión de la mbp, recurrimos a preparaciones de retinas *in toto*, realizando dobles inmunohistoquímicas junto al marcador de axones en crecimiento zn8 (Figura 48). Así comprobamos que el marcaje de mbp se extendía desde la retina periférica hasta la CNO (Figura 48A),

RESULTADOS

al igual que los axones $zn8^+$, que son mucho menos numerosos y que no colocalizan con mbp. Al observar la ZPG con más detalle, pudimos comprobar

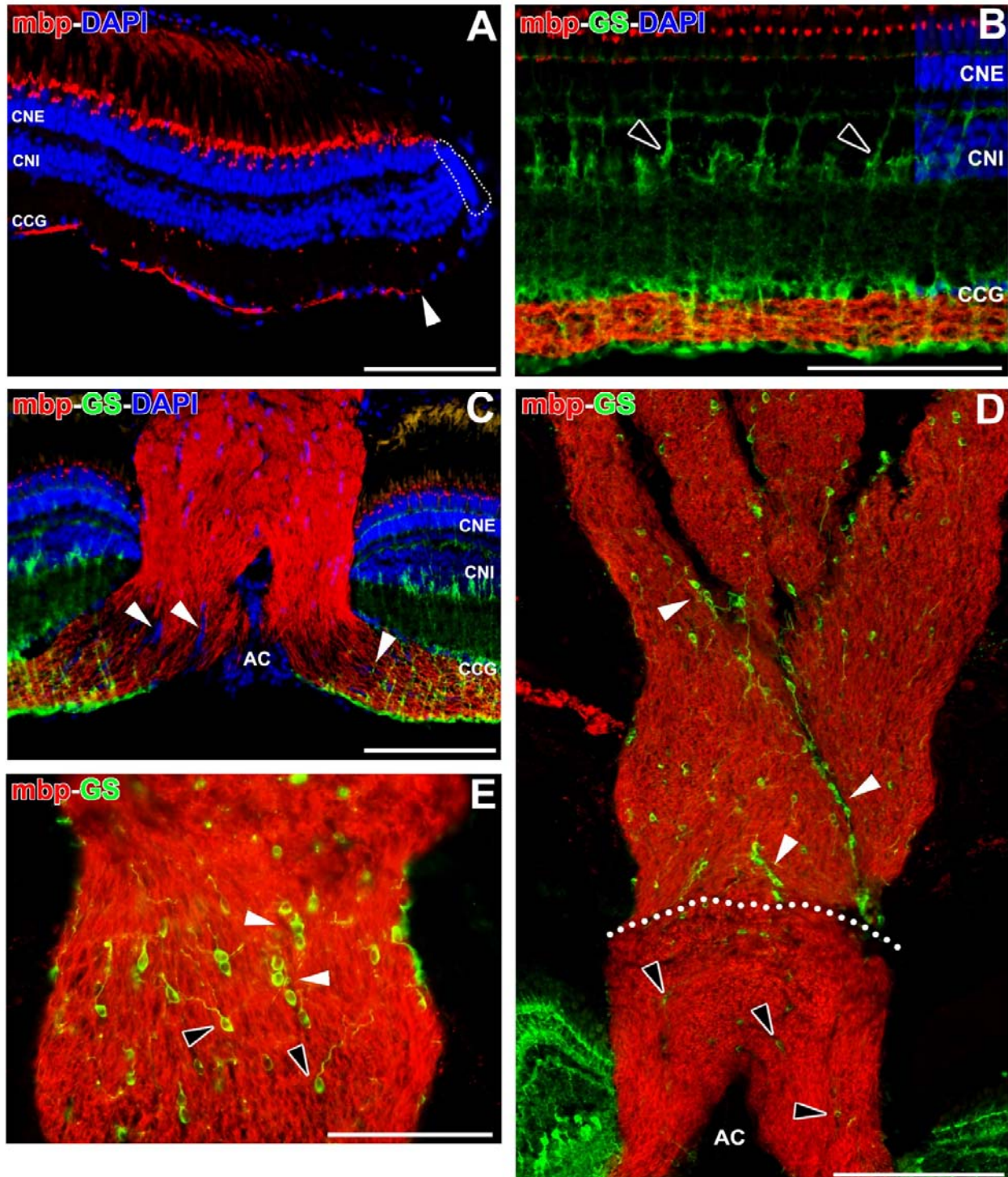


Figura 47. Expresión de mbp y GS en animales control. En la retina, el marcaje comienza desde las proximidades de la ZPG (línea de puntos) (A) (punta de flecha blanca), quedando confinado en la CFNO por las células de Müller (B) (puntas de flecha negras). En la CNO (C), núcleos de oligodendrocitos intercalados (puntas de flecha blancas). Muchos más oligodendrocitos GS⁺ (D) en el NO (puntas de flecha blancas) que en la CNO (puntas de flecha negras), tras la transición CNO-NO (línea de puntos). Estas células (E) (puntas de flecha blancas) presentaban largos procesos (puntas de flecha negras). Barras de escala: A, C, D: 200 μ m; B, E: 100 μ m.

RESULTADOS

cómo los axones $zn8^+$ surgen desde zonas inmediatamente adyacentes a la ZPG mientras que los axones mbp^+ aparecen en zonas más internas de la retina (Figura 48B), no observándose colocalización entre ambos. Al contrario que en la ZPG, en la CNO observamos una gran cantidad de haces mbp^+ , al igual que

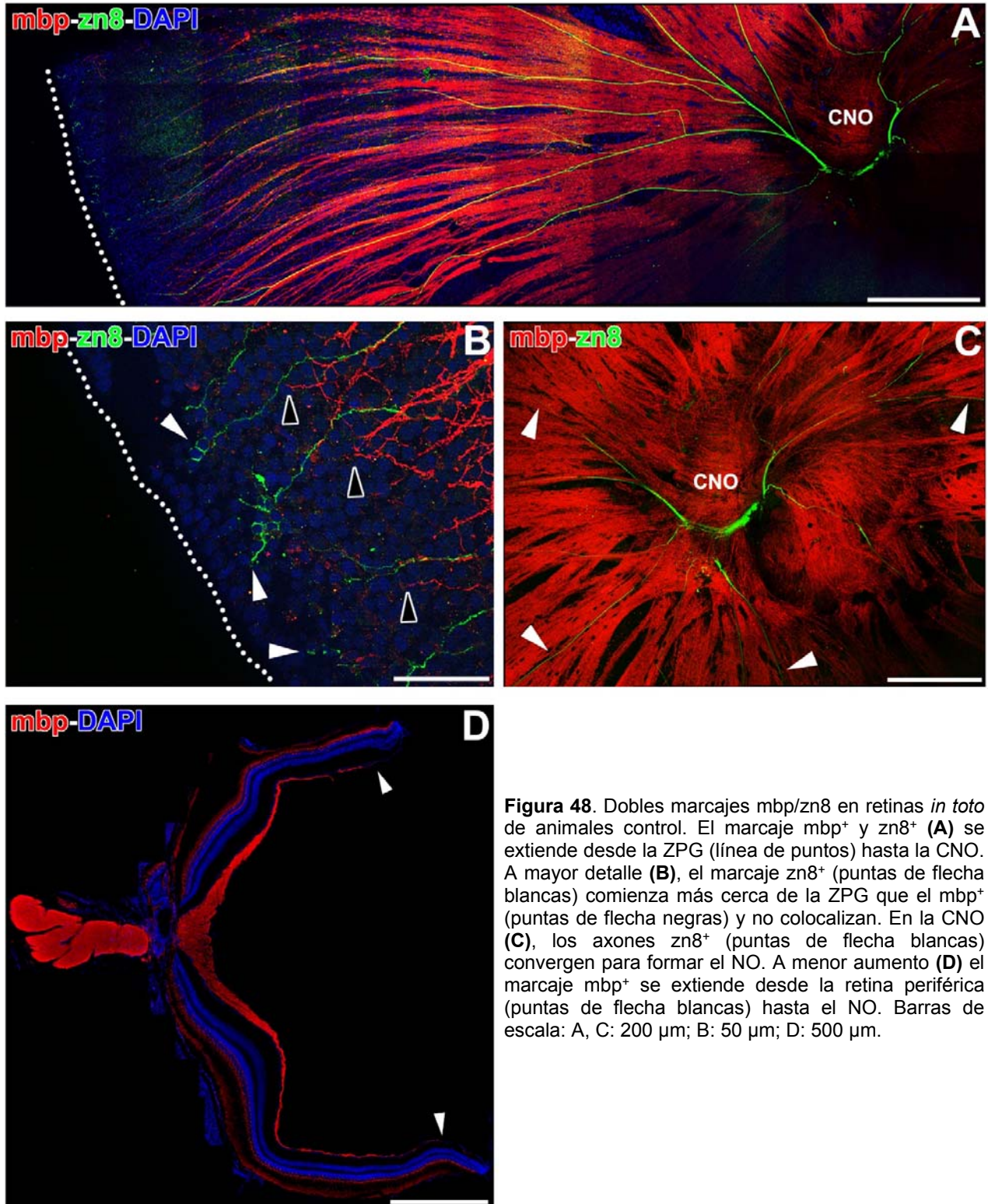


Figura 48. Dobles marcajes $mbp/zn8$ en retinas *in toto* de animales control. El marcaje mbp^+ y $zn8^+$ (A) se extiende desde la ZPG (línea de puntos) hasta la CNO. A mayor detalle (B), el marcaje $zn8^+$ (puntas de flecha blancas) comienza más cerca de la ZPG que el mbp^+ (puntas de flecha negras) y no colocalizan. En la CNO (C), los axones $zn8^+$ (puntas de flecha blancas) convergen para formar el NO. A menor aumento (D) el marcaje mbp^+ se extiende desde la retina periférica (puntas de flecha blancas) hasta el NO. Barras de escala: A, C: 200 μm ; B: 50 μm ; D: 500 μm .

RESULTADOS

axones $zn8^+$, que parecen concentrarse para atravesar la CNO hacia el NO (Figura 48C). Las fibras mbp^+ presentan un aspecto más compacto y ordenado en comparación con lo observado en la periferia de la retina, lo que posibilita distinguir las zonas donde se disponen los núcleos de las células, probablemente oligodendrocitos por su disposición en filas (Figura 48C). Finalmente, confirmamos los resultados de las preparaciones *in toto* en distintas microfotografías de secciones de tejido (Figura 48D), que fueron superpuestas para poder visualizar toda la extensión de la retina.

- *mbp* tras el pinzamiento del NO

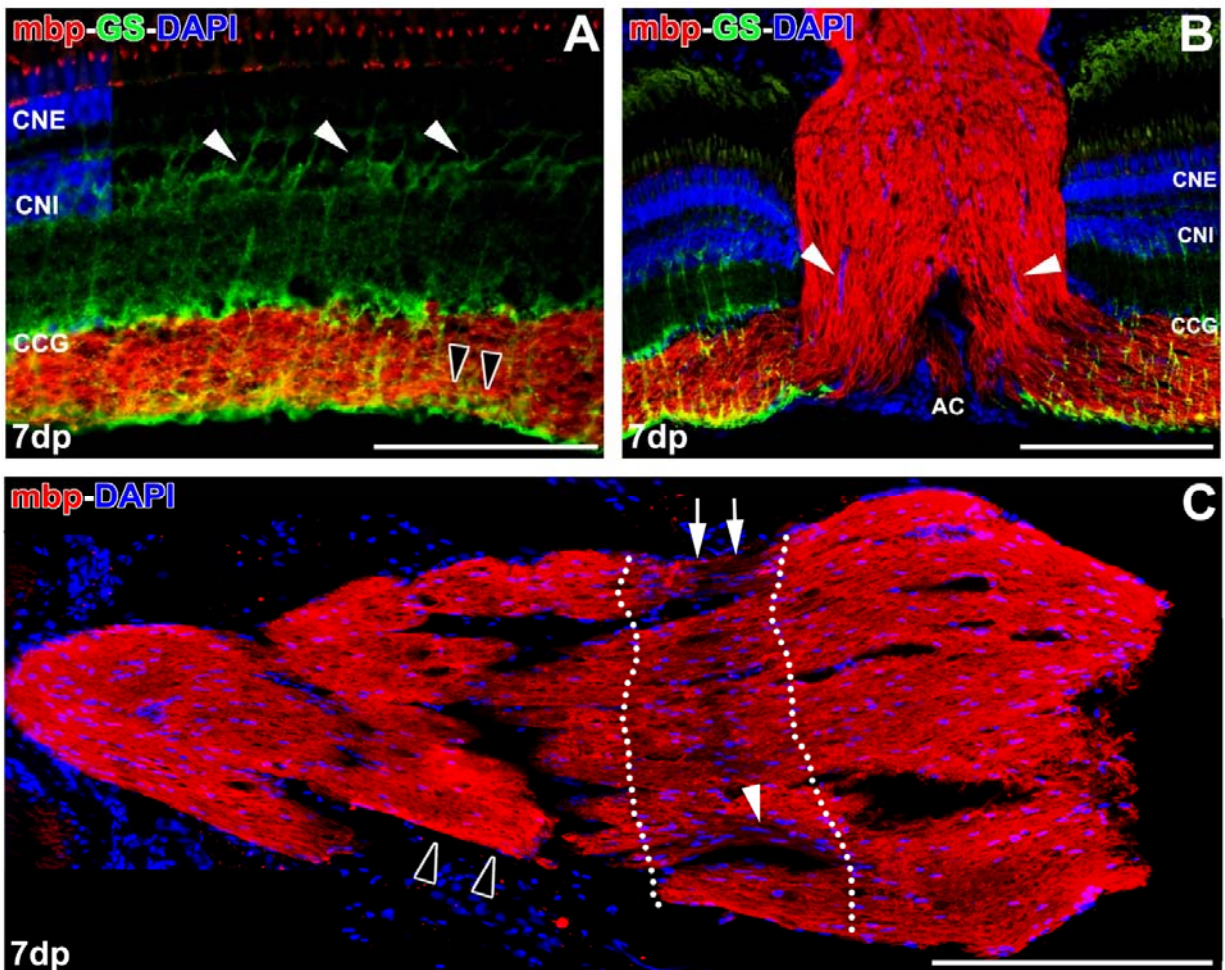


Figura 49. Dobles marcajes *mbp*/*GS* a los 7dp. En la retina (**A**), células de Müller (puntas de flecha blancas) delimitando el marcaje *mbp*⁺ y con sus procesos *GS*⁺ intercalados (puntas de flecha negras). Axones *mbp*⁺ desorganizados en la transición CNO-retina (**B**), con oligodendrocitos intercalados (puntas de flecha blancas). En el NO (**C**), disminución del marcaje *mbp*⁺ (flechas blancas) en la zona pinzada (líneas de puntos), con núcleos de mayor tamaño en ella (punta blanca). Fuera de esta zona, marcaje *mbp*⁺ de aspecto normal (puntas de flecha negras). Barras de escala: A: 100 μ m; B: 200 μ m; C: 500 μ m.

RESULTADOS

Para comprobar los posibles cambios en la expresión de la mbp, analizamos secciones de animales pinzados tras 7, 21 y 60 días en las que realizamos dobles inmunohistoquímicas con GS y zn8.

- 7dp

A los 7dp, no observamos en la retina diferencias con respecto a los controles (Figura 49A). Tampoco encontramos diferencias notables en la expresión de la mbp en la CNO (Figura 49B). Los axones mbp⁺ presentan un aspecto desordenado similar al observado en los controles (Figura 49B), y seguimos encontrando filas de oligodendrocitos intercaladas entre los axones (Figura 49B). En cambio, en el NO es donde observamos las diferencias más evidentes, sobre

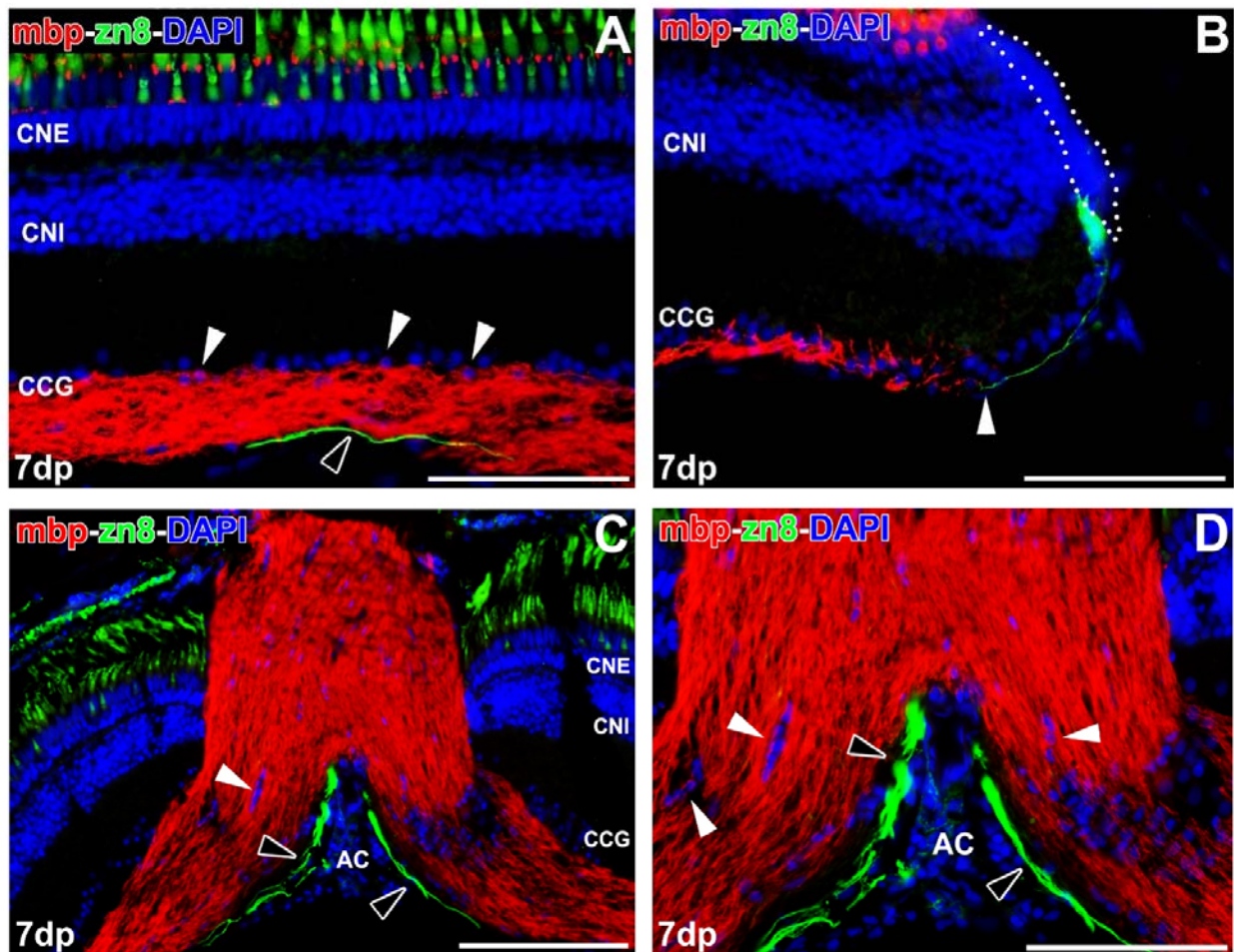


Figura 50. Inmunorreactividad mbp/zn8 a los 7dp. En la retina (**A**), axones zn8⁺ más vitrealmente al marcaje mbp⁺. Células en la CCG rodeadas por marcaje mbp⁺ (puntas de flecha blancas). En la ZPG (**B**) (línea de puntos), el marcaje zn8⁺ se detecta más periféricamente y tampoco colocaliza con mbp (punta de flecha blanca). En la CNO (**C**, **D**), detectamos axones zn8⁺/mbp⁻ (puntas de flecha negras) pegados a la AC, sin contactar con oligodendrocitos (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, B, D: 100 μ m; C: 200 μ m.

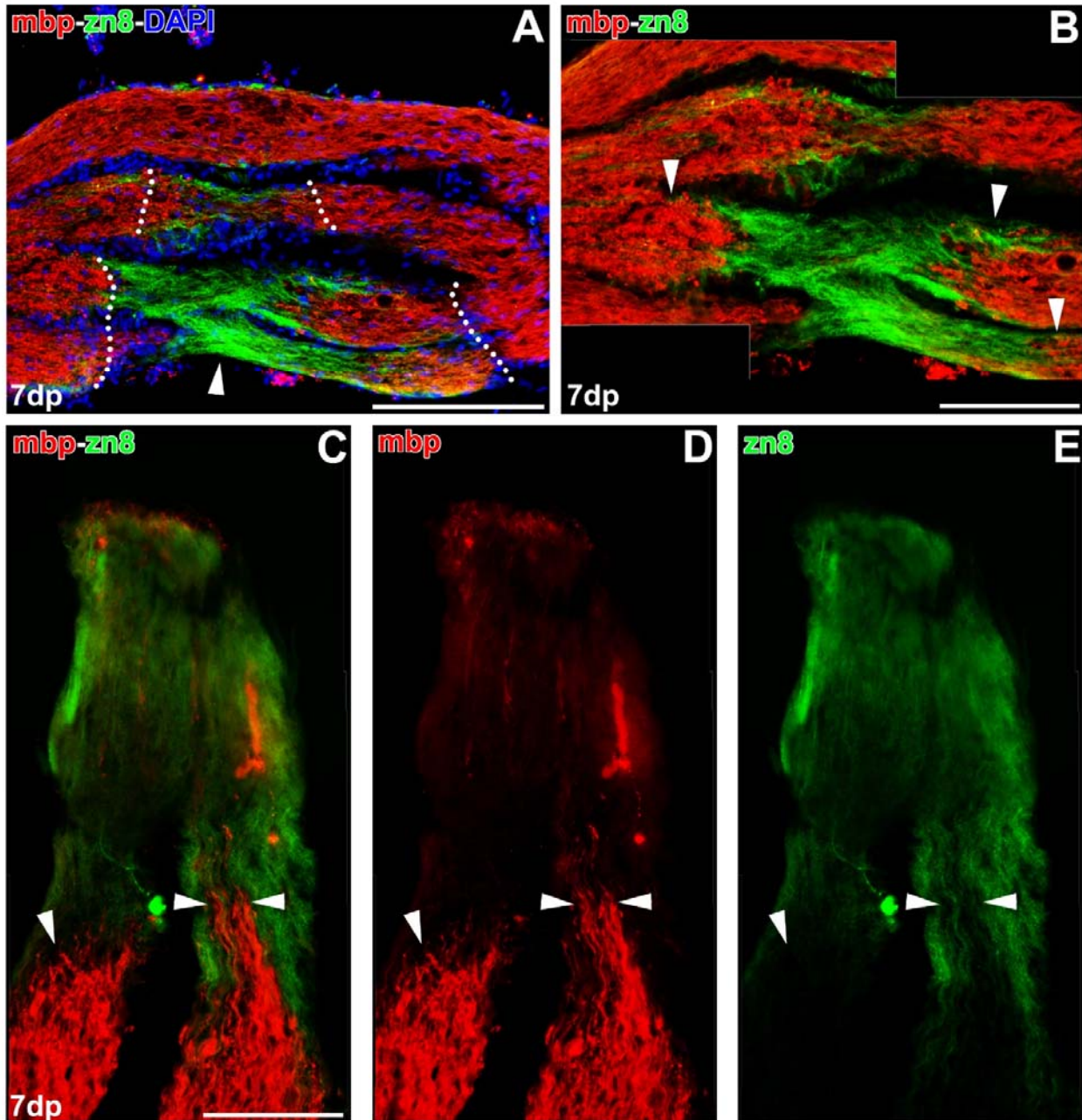


Figura 51. Marcaje mbp/zn8 en el NO a los 7dp. **(A)** Axones zn8⁺ (punta de flecha blanca) en la zona pinzada (línea de puntos). A mayor aumento **(B)**, los axones zn8⁺/mbp⁻ (puntas de flecha blancas) se extienden de un lado a otro en la zona pinzada. Los axones mbp⁺ y zn8⁺ **(C-E)** no colocalizan (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A: 200 μ m; B: 100 μ m; C-E: 50 μ m.

todo en la zona donde se produjo el pinzamiento (Figura 49C), en la que se distingue una banda de menor intensidad de mbp, con zonas en las que se adelgaza y disminuye considerablemente su intensidad (Figura 49C).

El análisis de los axones zn8 a los 7dp nos mostró haces de axones en crecimiento en la retina (Figura 50A), que se localizan en la parte más vitreal, en

RESULTADOS

contacto con la capa de axones mbp^+ (Figura 50A) pero sin solapar el marcaje. De forma similar a los controles, en la ZPG los axones $zn8^+$ se detectan inmediatamente después de la ZPG mientras que el marcaje para mbp comienza a localizarse en zonas más centrales de la retina (Figura 50B). En la CNO observamos la misma situación de la retina (Figura 50C, D), con axones $zn8^+$ que discurren vitrealmente en relación a los axones mbp^+ (Figura 50D).

En el NO encontramos las mayores diferencias. Así, detectamos una gran cantidad de axones $zn8^+$ en las zonas dañadas por el pinzamiento (Figura 51A, B), en las que, como mostramos anteriormente (Figura 49C), el marcaje de mbp disminuye considerablemente. Al utilizar $zn8$ pudimos comprobar que este marcaje y el de mbp se excluyen mutuamente en la zona lesionada (Figura 51B, C-E; Figura 52), de tal modo que en el tramo lesionado se encuentran únicamente axones $zn8^+$ (Figura 51C-E; Figura 52), mientras que en las zonas adyacentes se intercalan los $zn8^+$ y los mbp^+ (Figura 52).

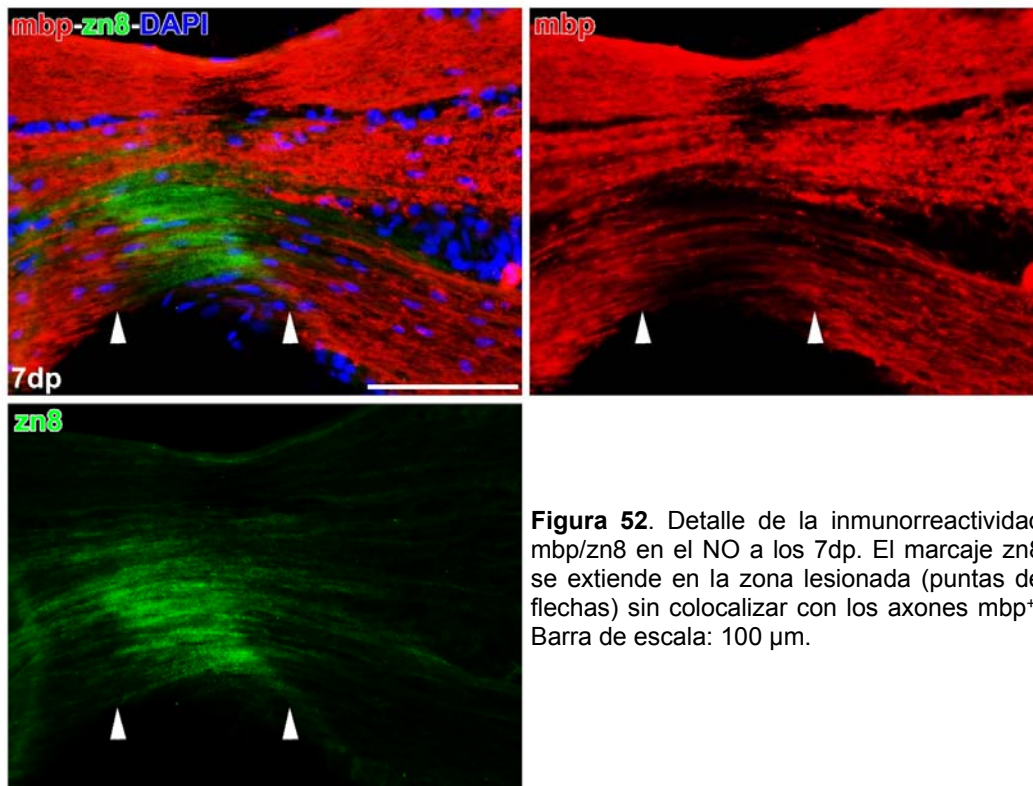


Figura 52. Detalle de la inmunorreactividad $mbp/zn8$ en el NO a los 7dp. El marcaje $zn8$ se extiende en la zona lesionada (puntas de flechas) sin colocalizar con los axones mbp^+ . Barra de escala: 100 μ m.

- 21dp

A los 21dp no apreciamos diferencias en el marcaje de la GS en la retina (Figura 53A), donde se pueden observar los axones mbp⁺ con un aspecto menos

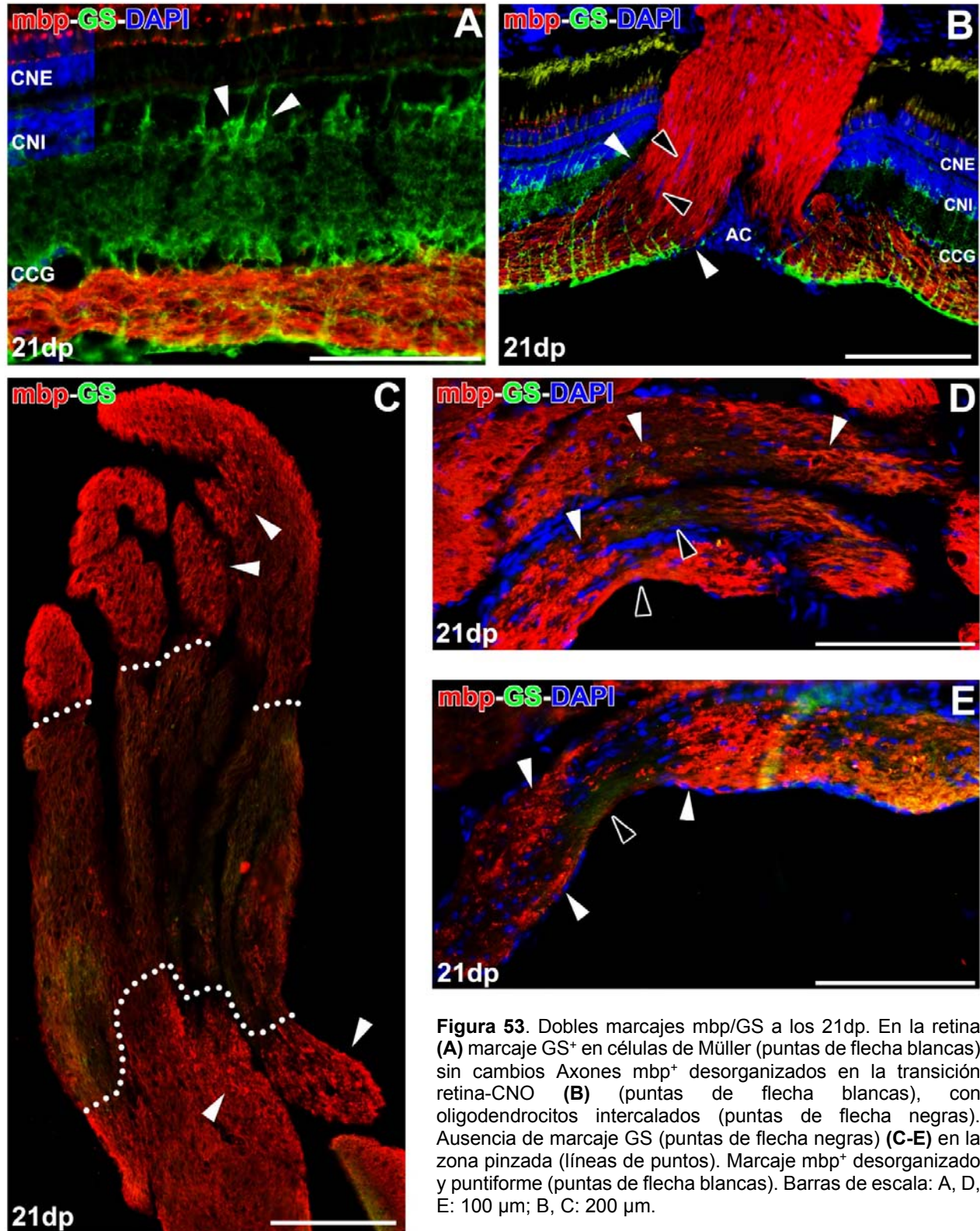


Figura 53. Dobles marcajes mbp/GS a los 21dp. En la retina (A) marcaje GS⁺ en células de Müller (puntas de flecha blancas) sin cambios Axones mbp⁺ desorganizados en la transición retina-CNO (B) (puntas de flecha blancas), con oligodendrocitos intercalados (puntas de flecha negras). Ausencia de marcaje GS (puntas de flecha negras) (C-E) en la zona pinzada (líneas de puntos). Marcaje mbp⁺ desorganizado y puntiforme (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, D, E: 100 μ m; B, C: 200 μ m.

RESULTADOS

compacto que a los 7dp (Figura 53A). No encontramos tampoco grandes variaciones en la CNO (Figura 53B), aunque sí observamos una leve disminución en los axones mbp^+ en la transición retina-CNO (Figura 53B). Las mayores diferencias, una vez más, las encontramos en el NO (Figura 53C), especialmente en la zona dañada por el pinzamiento (Figura 53C), en la que encontramos un leve marcaje para GS, aunque muy difuso y poco definido (Figura 53D, E). Además, se pueden observar acúmulos de mbp en las zonas lesionadas y adyacentes (Figura 53D, E).

No observamos diferencias notables en la expresión de $zn8$ en la CNO (Figura 54A). En cambio, en el NO, donde el marcaje $zn8^+$ es débil, (Figura 54B, C), detectamos axones mbp^+ también mucho más débiles en las zonas pinzadas

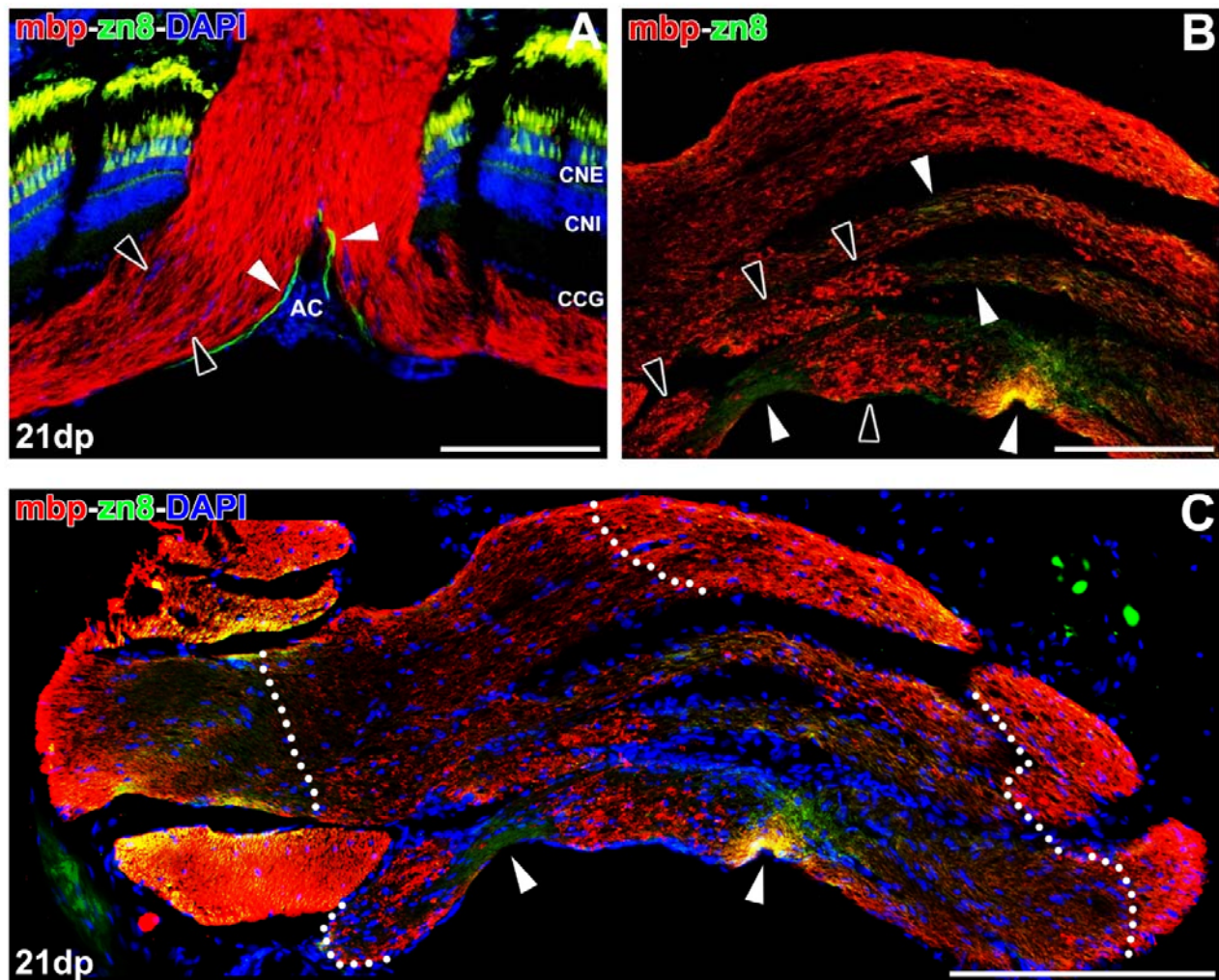


Figura 54. Inmunorreactividad $mbp/zn8$ a los 21dp. Axones $zn8^+/mbp^-$ en la CNO (**A**) (puntas de flecha blancas), marcaje mbp^+ desorganizado en la retina (puntas de flecha negras). En el NO (**B, C**), marcaje mbp desorganizado (puntas de flecha negras) en la zona lesionada (líneas de puntos). Marcaje $zn8^+$ menos intenso que a los 7dp (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, B: 200 μm ; C: 500 μm .

(Figura 54B, C), y en forma de acúmulos de aspecto irregular (Figura 54B). Por el contrario, en las zonas que no están afectadas por la lesión, el aspecto es más regular y el marcaje mucho más intenso (Figura 54C).

- 60dp

A los 60dp tampoco encontramos grandes cambios en la retina, donde los axones mbp⁺ ofrecen un aspecto similar al observado en los controles (Figura 55A). No detectamos ninguna diferencia en la CNO, aunque no observamos los axones mbp⁺ con el aspecto desorganizado de grupos anteriores (Figura 55B). En el NO volvemos a encontrar múltiples células GS⁺ en toda su extensión (Figura 55C, D), y aunque localizamos zonas con un menor marcaje de mbp, que indican el lugar de la lesión (Figura 55C), su aspecto es más organizado e intenso que en grupos anteriores (Figura 55C, D). También detectamos axones zn8⁺ en la CNO (Figura 56A), aunque menos numerosos y formando haces menos gruesos que en otros grupos estudiados. Estos axones zn8⁺ continúan expresándose en la ZPG (Figura 56B), aunque en menor cantidad que en otros estadios, seguidos de la expresión de mbp en zonas adyacentes (Figura 56B). Por último, no observamos axones zn8⁺ en la zona lesionada del NO (Figura 56C), que todavía a este tiempo es visible, aunque sí que los encontramos en otras zonas distales a la lesión (Figura 56C), mostrando un aspecto similar a los controles.

RESULTADOS

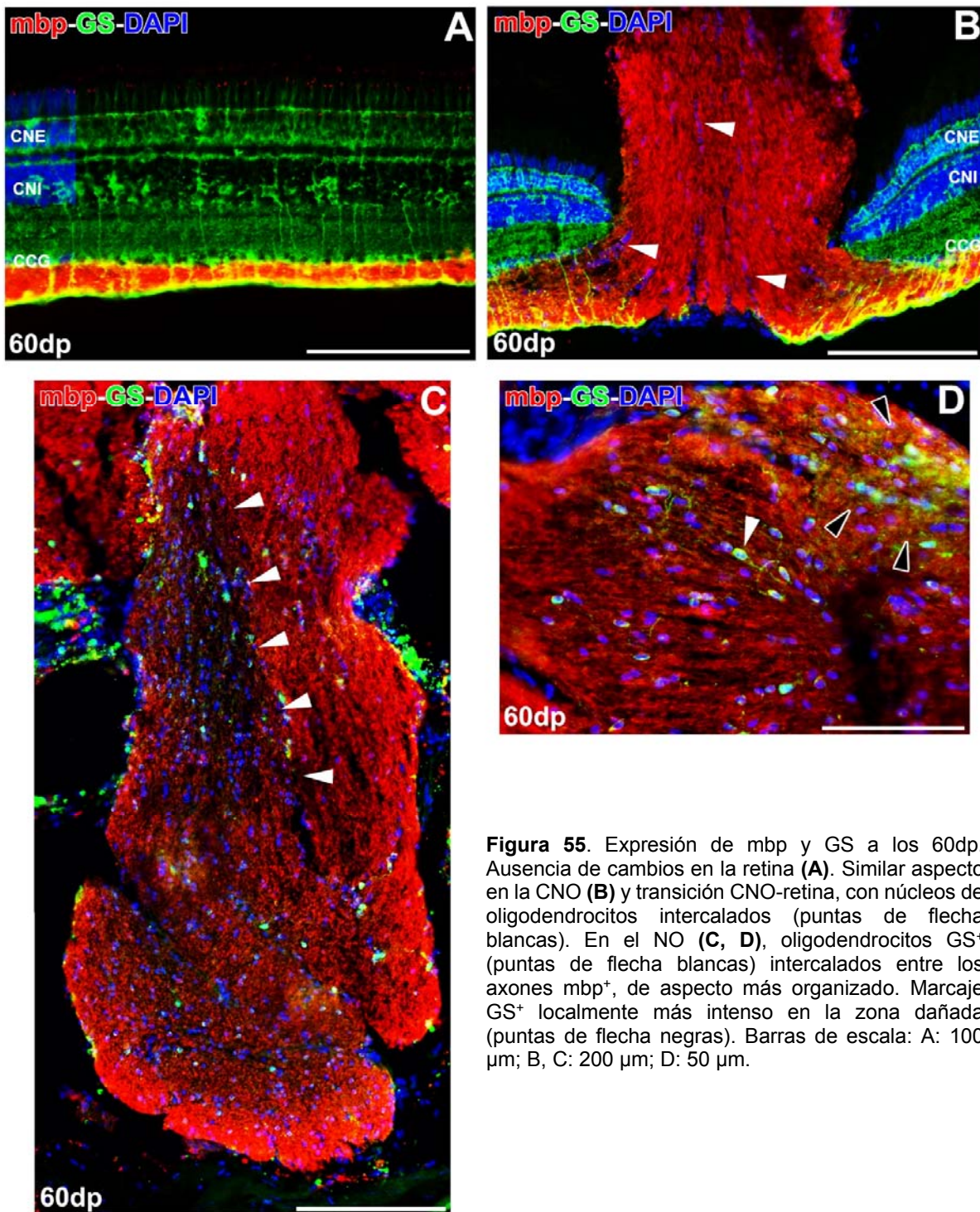


Figura 55. Expresión de mbp y GS a los 60dp. Ausencia de cambios en la retina (**A**). Similar aspecto en la CNO (**B**) y transición CNO-retina, con núcleos de oligodendrocitos intercalados (puntas de flecha blancas). En el NO (**C**, **D**), oligodendrocitos GS⁺ (puntas de flecha blancas) intercalados entre los axones mbp⁺, de aspecto más organizado. Marcaje GS⁺ localmente más intenso en la zona dañada (puntas de flecha negras). Barras de escala: A: 100 μm; B, C: 200 μm; D: 50 μm.

RESULTADOS

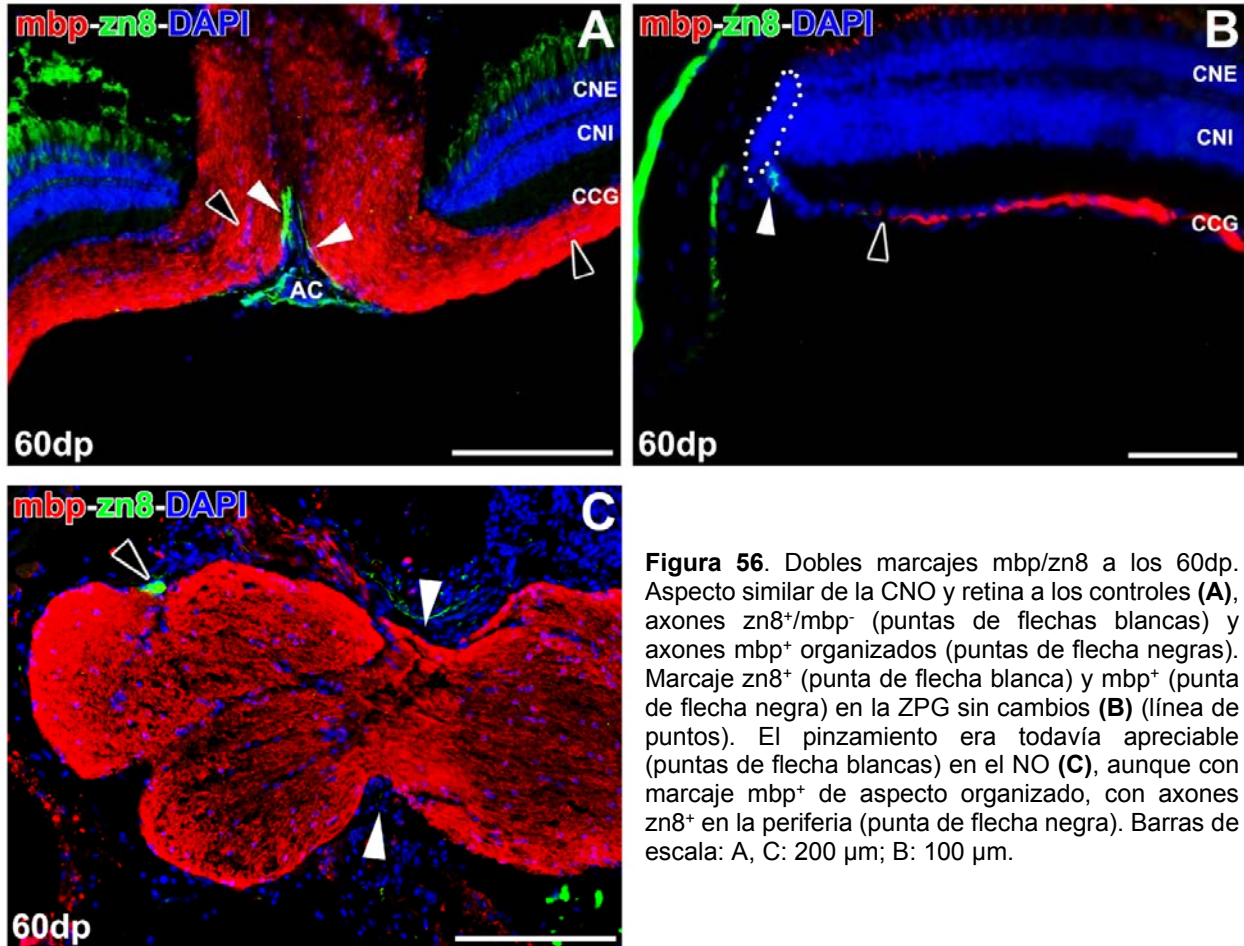


Figura 56. Dobles marcajes mbp/zn8 a los 60dp. Aspecto similar de la CNO y retina a los controles (**A**), axones zn8⁺/mbp⁻ (puntas de flechas blancas) y axones mbp⁺ organizados (puntas de flecha negras). Marcaje zn8⁺ (punta de flecha blanca) y mbp⁺ (punta de flecha negra) en la ZPG sin cambios (**B**) (línea de puntos). El pinzamiento era todavía apreciable (puntas de flecha blancas) en el NO (**C**), aunque con marcaje mbp⁺ de aspecto organizado, con axones zn8⁺ en la periferia (punta de flecha negra). Barras de escala: A, C: 200 μ m; B: 100 μ m.

RESULTADOS

- **Sox2**

Para estudiar las células progenitoras presentes en nuestro modelo experimental, utilizamos un anticuerpo contra el factor de transcripción sox2. Como hemos indicado en la introducción, las células adultas que expresan esta proteína mantienen ciertas características embrionarias, poseen capacidad mitótica y pueden conservar cierto grado de indiferenciación. Hemos caracterizado las diferentes poblaciones de células sox2⁺ mediante la combinación con otros marcadores desde la retina al NO del pez cebra, tanto en condiciones control como tras el pinzamiento del NO derecho y hemos cuantificado sus variaciones en número.

- *sox2 en condiciones control*

Encontramos células sox2⁺ desde la retina hasta el NO, aunque sus características y distribución varían notablemente de una zona a otra (Figura 57A). Así, en la retina nos encontramos con abundantes células sox2⁺ presentes tanto en la CNI como en la CCG (Figura 57A), mientras que en la CNO control observamos pocas células en comparación a los oligodendrocitos sox10⁺ en el mismo grupo experimental (Figura 57A, Figura 29). Estas células presentan núcleos ovalados o redondeados, y no muestran indentaciones u otras características morfológicas reseñables (Figura 57A, B).

En la retina, observamos que las células presentes en la CNI se disponen a dos alturas diferentes (Figura 57B). Un grupo de células sox2⁺ se localizan formando una subcapa de células más esclerales, con núcleos ovoides, alargados a veces y algo menos intensos en su marcaje, y otro grupo de células aparece como una subcapa en contacto con la CPI, con núcleos redondeados y mucho más marcados (Figura 57B). La primera subcapa de núcleos se corresponde, como mostraremos a continuación, a las células de Müller, y la otra subcapa más vitreal a células amacrinas. Por otra parte, las células situadas en la CCG presentan los mismos núcleos redondeados de la CNI, con la misma intensidad de marcaje y en contacto también con la CPI. Estas células se han descrito como células amacrinas desplazadas. No obstante lo anterior, en algunos casos observamos células con soma alargado, dispuestas más vitrealmente en la CFNO (Figura 57B).

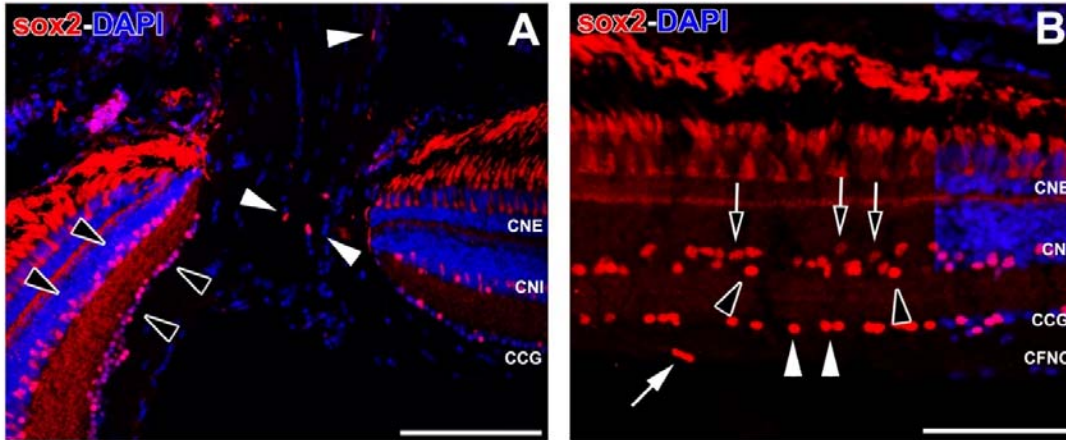


Figura 57. Expresión de *sox2* en la retina (A, B), CNO y NO (A) del pez cebra control. Células *sox2*⁺ en la CNI y en la CCG de la retina (A) (puntas de flecha negras). Células *sox2*⁺ en la CNO y NO (A) (puntas de flecha blancas). B: Células *sox2*⁺ de la CNI de la retina en dos niveles, una subcapa de núcleos alargados (flechas negras) y otra de núcleos redondeados en contacto con la CPI (puntas de flecha negras). Células redondeadas de la CCG en contacto con la CPI (puntas de flecha blancas) y de soma alargado (flecha blanca) en la CFNO. Barras de escala: A: 200 μ m; B: 50 μ m.

Así, en la retina el marcaje de *sox2* se extiende desde la ZPG, donde se expresa en gran cantidad, delimitando la propia ZPG y mostrando que todas las células de esta región son *sox2*⁺ (Figura 58), hasta la transición con la CNO. El marcaje de *sox2* en la ZPG colocaliza en gran parte con el de PCNA (Figura 58), aunque en la retina madura la PCNA se expresa también en la CNI y CNE sin colocalizar siempre con *sox2*, mostrando toda la variedad de progenitores en distintos grados de maduración que se van diferenciando según crece la retina.

Para caracterizar esta población tan heterogénea de células *sox2*⁺ utilizamos otros marcadores como la GS (Figura 59). En la retina, algunos de los núcleos presentes en la CNI son *sox2*⁺/*GS*⁺, mientras que no encontramos ninguna célula doblemente marcada en la CNO (Figura 59A), aunque alguna célula *sox2*⁺ parece intercalarse entre los grupos de núcleos dispuestos en filas característicos de oligodendrocitos. Al analizar la retina en mayor detalle, observamos cómo los núcleos *sox2*⁺ más alargados dispuestos escleralmente en la CNI se corresponden con las células de Müller *GS*⁺ (Figura 59C, D). El resto de núcleos tanto de la CNE como de la CCG o CFNO no son *GS*⁺ (Figura 59C, D), aunque parecen intercalarse con los procesos *GS* de las células de Müller (Figura 59D). Algunos de los núcleos alargados que aparecían con menor

RESULTADOS

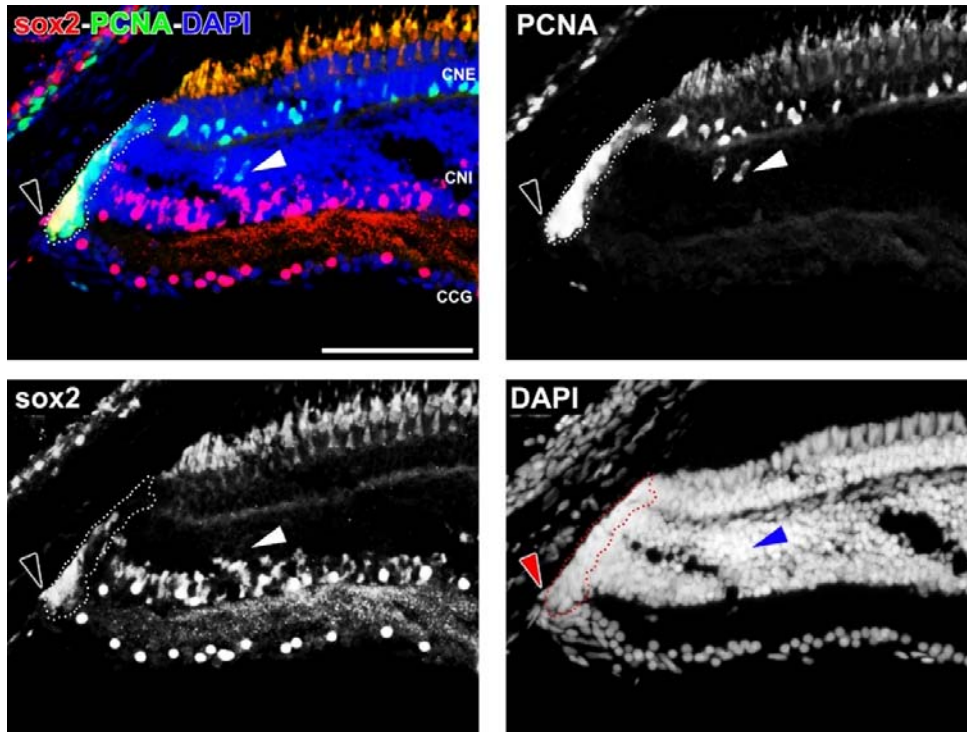


Figura 58. Expresión de *sox2* y PCNA en la ZPG de la retina control. Células *sox2*⁺/*PCNA*⁺ (puntas de flecha negra y roja) en la ZPG (línea de puntos). Células *PCNA*⁺ en zonas más centrales de la retina (puntas de flecha blanca y azul). Barra de escala: 100 μ m.

frecuencia en la parte más vitreal de la CCG también parecían estar en íntimo contacto con los procesos vitreales *GS*⁺ (Figura 59C).

Por otra parte, en el NO nos encontramos con numerosas células *sox2*⁺, aunque no tan abundantes como los oligodendrocitos *sox10* (Figura 59B). No localizamos células doblemente marcadas con *GS* (Figura 59B, D). Las células *sox2*⁺ presentan un núcleo alargado, sin indentaciones u otras marcas características, y se extienden por todo el NO (Figura 59E, F). En algunas ocasiones, encontramos una disposición muy característica, en la que aparece organizada una hilera de células *GS*⁺ donde se intercalan núcleos *sox2*⁺ (Figura 59F). Esta disposición reveló un grado íntimo de asociación entre estos dos tipos celulares en el NO.

También estudiamos la relación de las células *sox2*⁺ con la ck (Figura 60). Encontramos que las células *sox2*⁺ presentes en la CNO colocalizan con procesos *ck*⁺ (Figura 60A, B). Dichas células se disponen tanto en la zona central de la CNO como en las zonas periféricas en contacto con la retina (Figura 60B).

Otra zona en la que encontramos una íntima relación de procesos ck⁺ con células

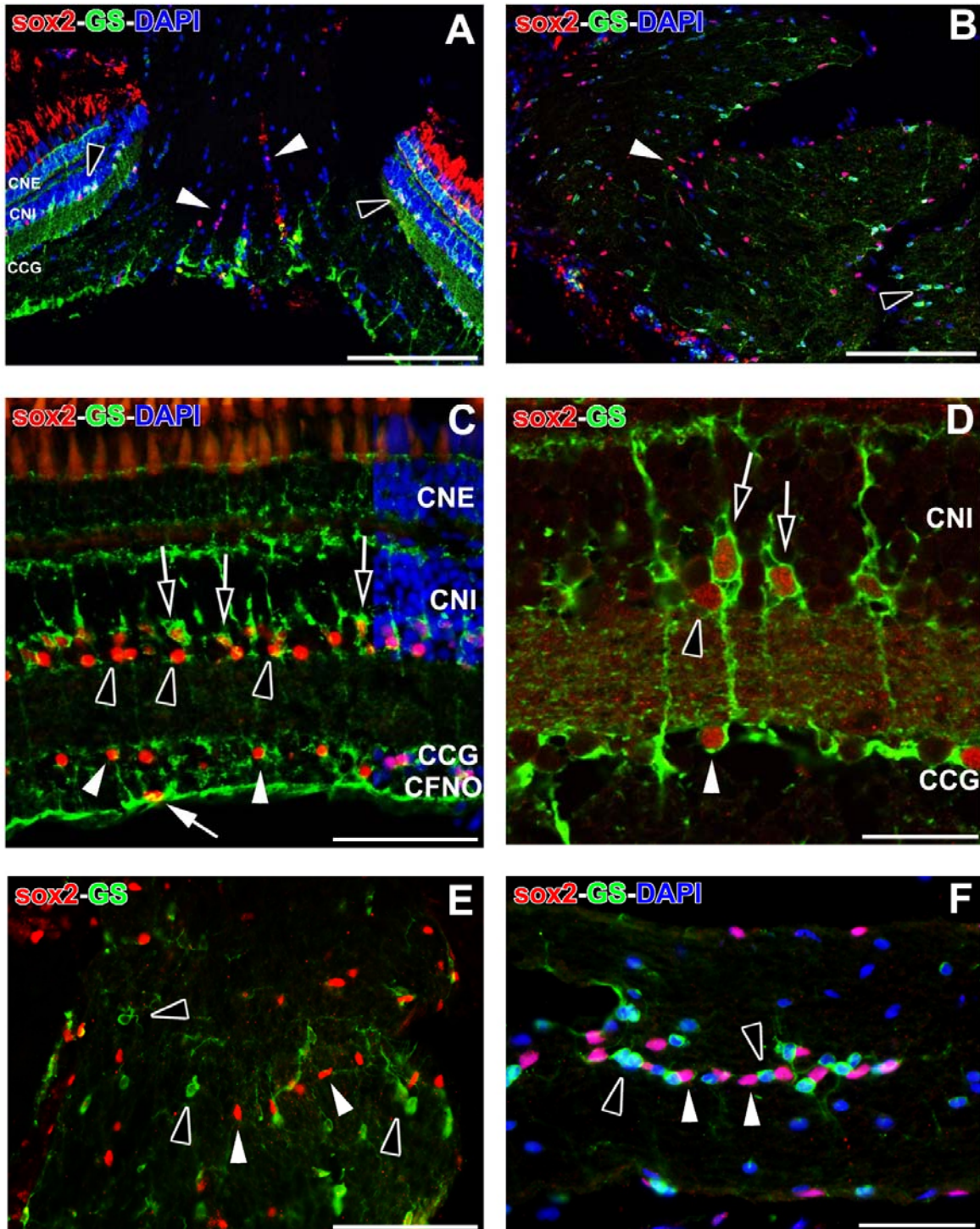


Figura 59. Análisis de la expresión de sox2 y GS en animales control. Células dobles sox2⁺/GS⁺ en la retina (A) (puntas de flecha negras), pero no en la CNO (A) (puntas de flecha blancas). Células de Müller sox2⁺/GS⁺ (flechas negras) en la retina (C, D). Células amacrinax sox2⁺/GS⁻ (puntas de flecha negras) en la CNI y células amacrinax desplazadas en la CCG (puntas de flecha blancas). Células sox2⁺/GS⁻ de núcleo alargado de la CFNO (C) (flecha blanca). Células sox2⁺ (punta de flecha blanca) y GS⁺ (punta de flecha negra) en el NO (B, E). Células sox2⁺ intercaladas con células GS⁺ (F). Barras de escala: A, B: 200 µm; C, E, F: 100 µm; D: 50 µm.

RESULTADOS

sox2⁺ fue en la transición CNO-NO (Figura 60A, C). En este caso, las células que mostraron una colocación clara se disponen en las zonas marginales del NO, en la limitante glial (Figura 60C). Debido al tipo de marcaje de la ck, no fue posible determinar con exactitud si las células sox2⁺ de la zona interna del NO eran también ck⁺ (Figura 60C). En zonas más distales del NO observamos el mismo patrón de tinción (Figura 60D), con células doblemente marcadas con sox2 y ck dispuestas en la limitante del NO y células sox2⁺ dispuestas en la matriz del NO que no expresaban ck (Figura 60D).

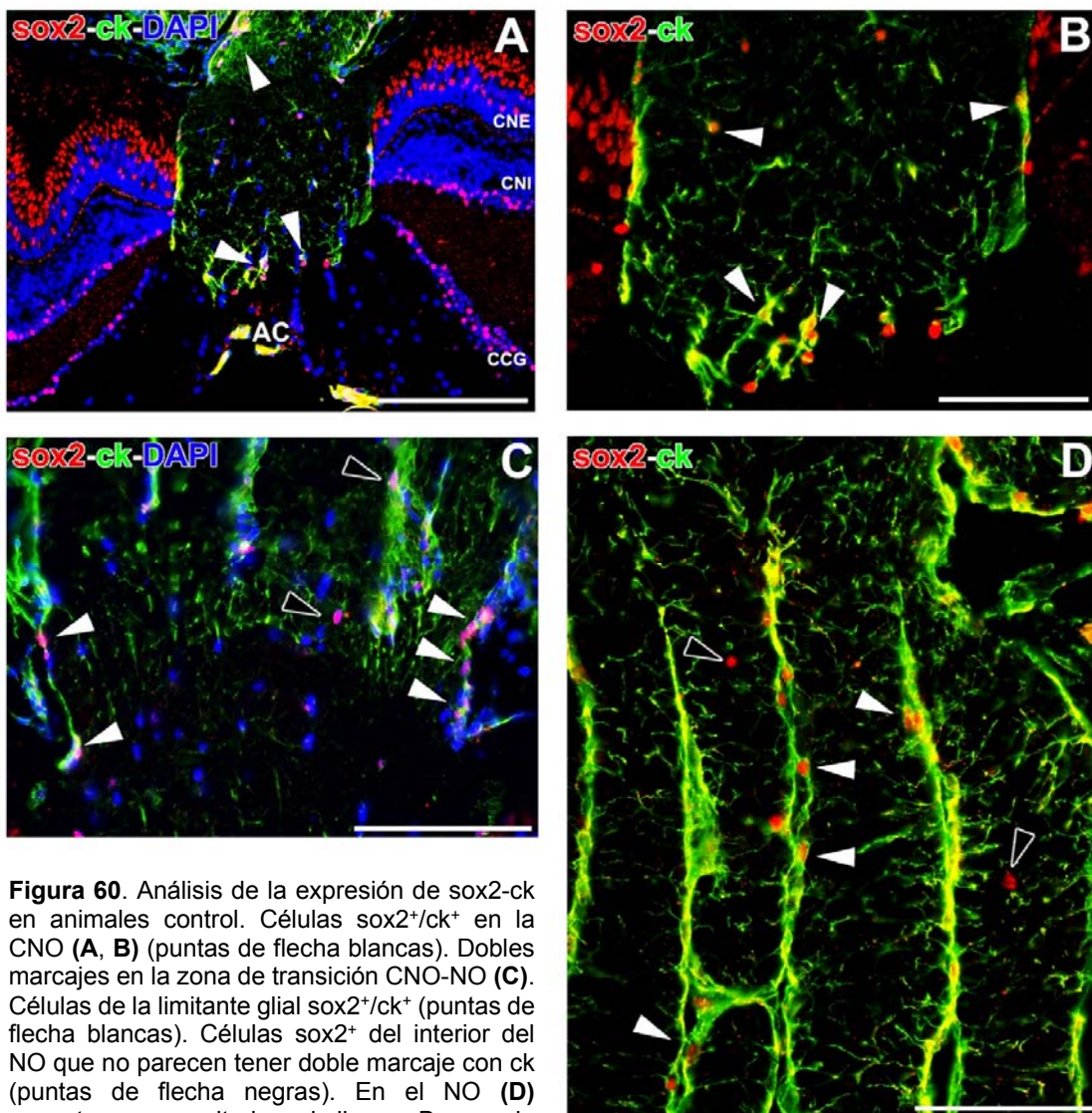


Figura 60. Análisis de la expresión de sox2-ck en animales control. Células sox2⁺/ck⁺ en la CNO (**A**, **B**) (puntas de flecha blancas). Dobles marcajes en la zona de transición CNO-NO (**C**). Células de la limitante glial sox2⁺/ck⁺ (puntas de flecha blancas). Células sox2⁺ del interior del NO que no parecen tener doble marcaje con ck (puntas de flecha negras). En el NO (**D**) encontramos resultados similares. Barras de escala: A: 200 μm; B-D: 100 μm.

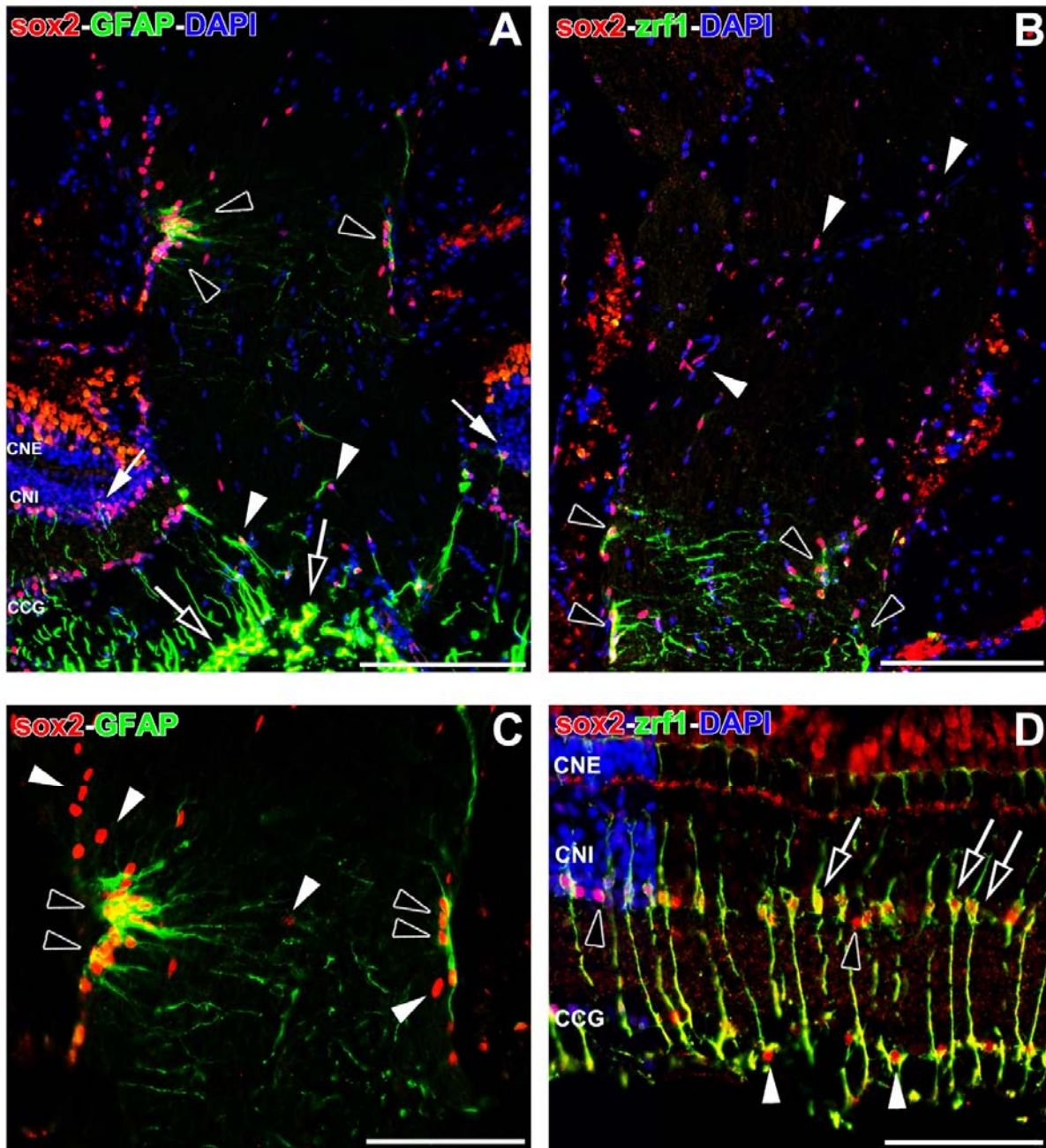


Figura 61. Expresión de *sox2* y *zrf1*/GFAP en la vía visual del pez cebra control. Células de Müller $sox2^+$ /GFAP $^+$ (flechas blancas) en la retina (A) con sus procesos vitreales fuertemente marcados (flechas negras). Células doblemente marcadas en la CNO (puntas de flecha blancas) y en la limitante glial de la zona de transición CNO-NO (puntas de flecha negras) (A-C). Células $sox2^+$ en el resto del NO (B, C) (puntas de flecha blancas). Resultados similares con el anticuerpo *zpr1* en la retina (D) respecto al marcaje para la GS: células de Müller $sox2^+$ /*zpr1* $^+$ (flechas negras), y células amacrinas (puntas de flecha negras) o amacrinas desplazadas (puntas de flecha blancas) únicamente $sox2^+$. Barras de escala: A, B: 200 μ m; C, D: 100 μ m.

Respecto a la expresión de GFAP/*zrf1*, nos encontramos con que en la retina los núcleos $sox2^+$ de las células de Müller también colocalizan con GFAP/*zrf1* (Figura 61A, D), y que en la CNO algunos de los procesos GFAP $^+$ de las células

RESULTADOS

de Müller engloban a células $sox2^+$ (Figura 61A). Al estudiar la zona de transición CNO-NO, donde se expresa GFAP, observamos que las células $sox2^+$ presentes

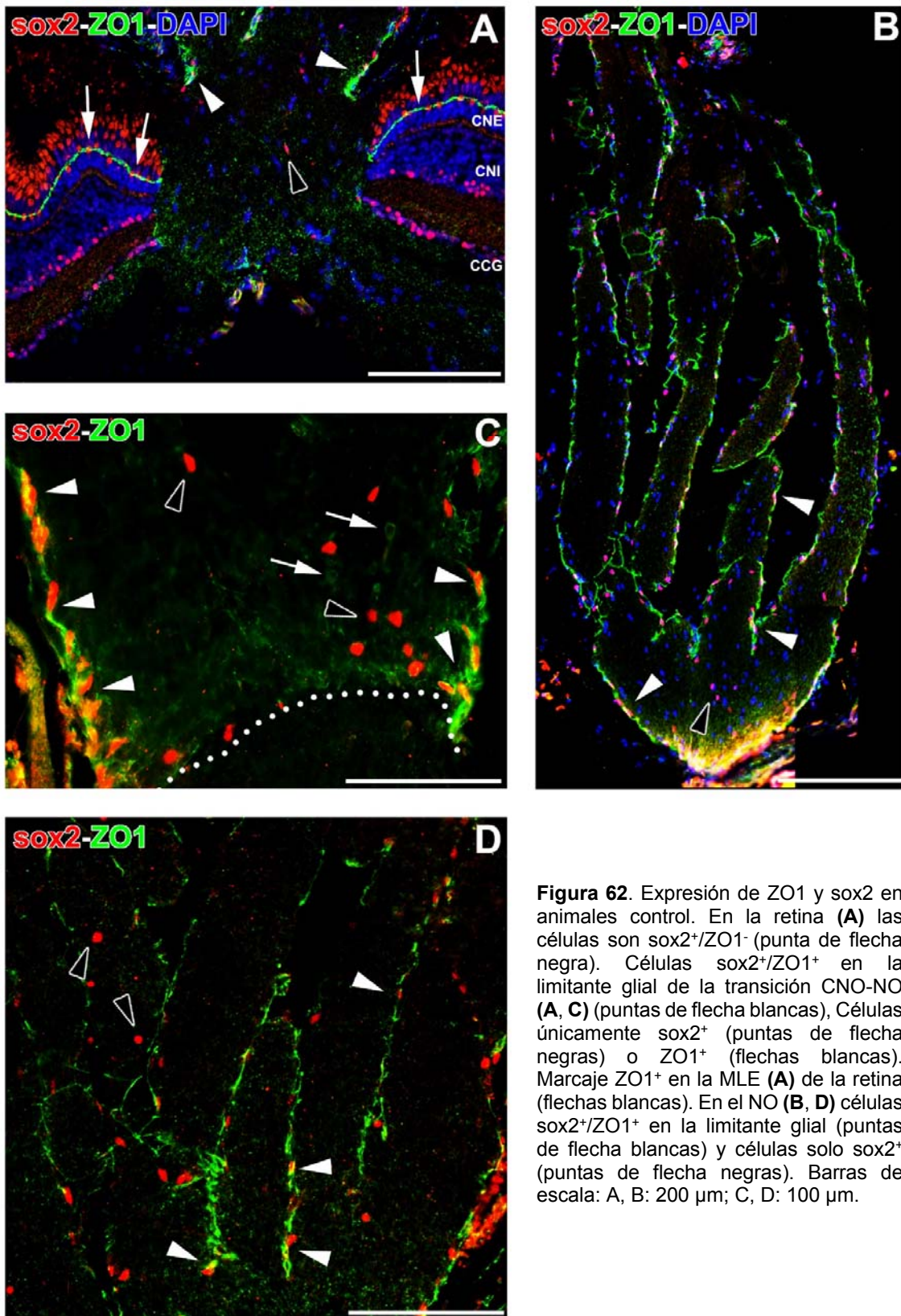


Figura 62. Expresión de ZO1 y $sox2$ en animales control. En la retina (A) las células son $sox2^+/ZO1^-$ (punta de flecha negra). Células $sox2^+/ZO1^+$ en la limitante glial de la transición CNO-NO (A, C) (puntas de flecha blancas), Células únicamente $sox2^+$ (puntas de flecha negras) o $ZO1^+$ (flechas blancas). Marcaje $ZO1^+$ en la MLE (A) de la retina (flechas blancas). En el NO (B, D) células $sox2^+/ZO1^+$ en la limitante glial (puntas de flecha blancas) y células solo $sox2^+$ (puntas de flecha negras). Barras de escala: A, B: 200 μm ; C, D: 100 μm .

RESULTADOS

en la limitante glial eran GFAP⁺ (Figura 61A, C). Los mismos resultados se obtuvieron con el anticuerpo zrf1 en esta zona (Figura 61B). Tras esta región, no observamos más células GFAP o zrf1 en el NO (Figura 61B).

Al estudiar la expresión de ZO1, nos encontramos con resultados similares a los obtenidos con la ck. Debido a su apariencia puntiforme, no observamos con suficiente nitidez células doblemente marcadas en la CNO (Figura 62A), pero sí en la zona de transición CNO-NO (Figura 62A, C) conformando la limitante glial en esta zona. No hemos podido distinguir el marcaje de ZO1 en células sox2⁺ en el interior del NO (Figura 62B, C). También observamos contornos de células ZO1⁺ pero sin expresión de sox2 (Figura 62C). En el resto del NO obtuvimos resultados similares (Figura 62B, D): las células sox2 presentes en la limitante glial colocalizan con ZO1 mientras que las dispuestas en el interior del NO no lo hacen o, al menos, no de forma clara (Figura 62D).

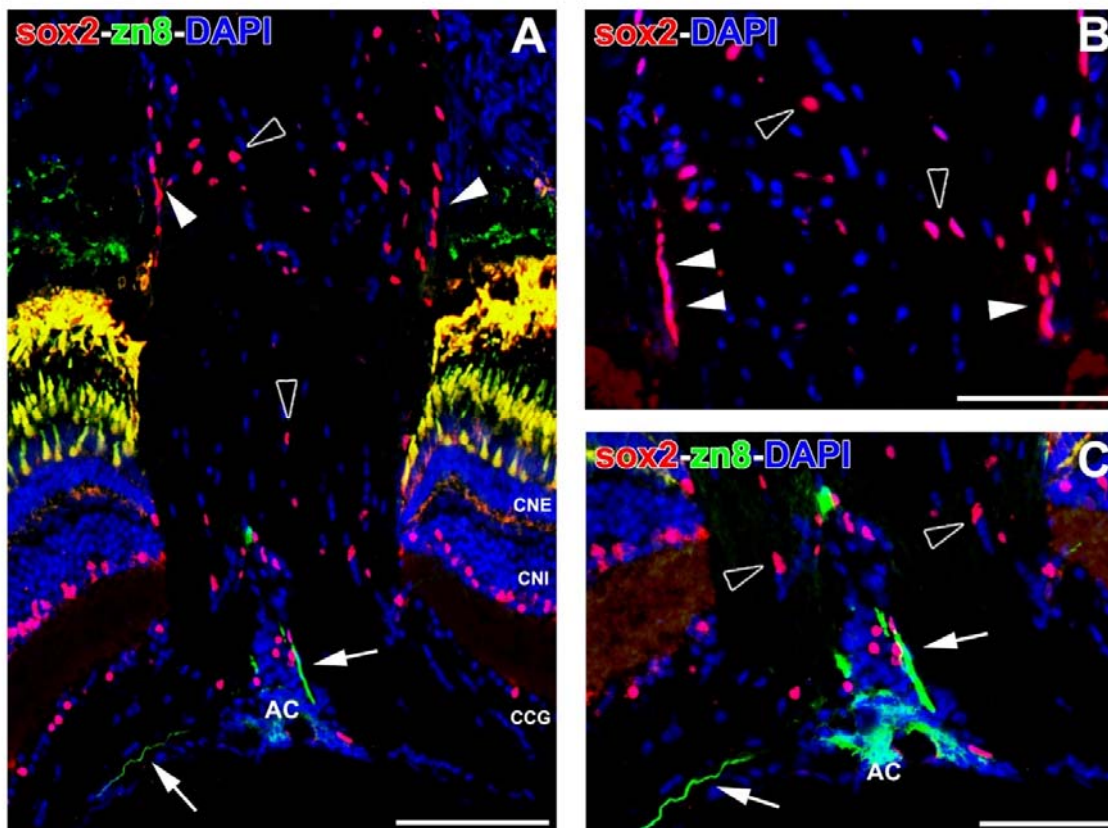


Figura 63. Axones en crecimiento zn8⁺ en la retina y CNO en animales control (**A, C**) (flechas blancas), en contacto con la AC y con células sox2⁺ en la CNO. Células sox2⁺ (**C**) intercaladas entre núcleos indentados (puntas de flecha negras). Células sox2⁺ en la limitante glial de la transición CNO-NO (**A, B**), (puntas de flecha blancas), además de otras sox2⁺ aisladas por el NO (puntas de flecha negras). Barras de escala: A: 200 μ m; B, C: 100 μ m.

RESULTADOS

Por último, al estudiar los axones en crecimiento $zn8^+$, en la CNO nos encontramos con células $sox2^+$ alrededor de la arteria central y próximas y paralelas a los axones $zn8^+$ (Figura 63A, C). También hemos podido observar, como hemos descrito anteriormente, células $sox2^+$ intercaladas en columnas de núcleos indentados (Figura 63C).

- *sox2 tras el pinzamiento del NO*

También hemos analizado la respuesta de las poblaciones celulares $sox2^+$ tras la lesión del NO derecho, y hemos cuantificado la variación en la densidad de células en estos animales respecto a los controles. En la retina, a la hora de cuantificar las células $sox2^+$, hemos distinguido entre las poblaciones de la CNI y de la CCG, puesto que, como mostraremos a continuación, las principales diferencias se produjeron en esta última. También analizamos el resto de parámetros morfológicos con los marcadores utilizados en los grupos control.

- 2dp

A los 2dp encontramos un aumento altamente significativo ($p < 0,001$) en la densidad de células $sox2^+$ presentes en la CNO y en el NO (Figura 64), mientras que la retina sólo detectamos este aumento ($p < 0,001$) en la población $sox2^+$ de la CCG (Figura 64), permaneciendo invariante la CNI. En este periodo es donde encontramos los valores más altos de densidad celular en la retina, CNO y el NO de todos los grupos estudiados.

El estudio morfológico de la CNO y de la zona de transición CNO-NO nos mostró células $sox2^+$ con núcleos alargados, de tamaño mayor con respecto a los individuos control, y escasas células $PCNA^+$ que no colocalizan con $sox2$. Parte de estas células $PCNA^+$ se disponen alrededor de la arteria central (Figura 65A). Por el contrario, localizamos numerosas células $PCNA^+$ en el NO (Figura 65B), especialmente alrededor de la zona del pinzamiento. Al contrario que en la CNO, sí observamos células dobles $sox2^+/PCNA^+$ distribuidas tanto cerca de la zona del pinzamiento como en zonas anteriores del NO (Figura 65B). Las células $sox2^+$ del NO también presentan morfología alargada y un tamaño mayor, aunque también encontramos numerosas células de soma redondeado similar a los controles (Figura 65B).

RESULTADOS

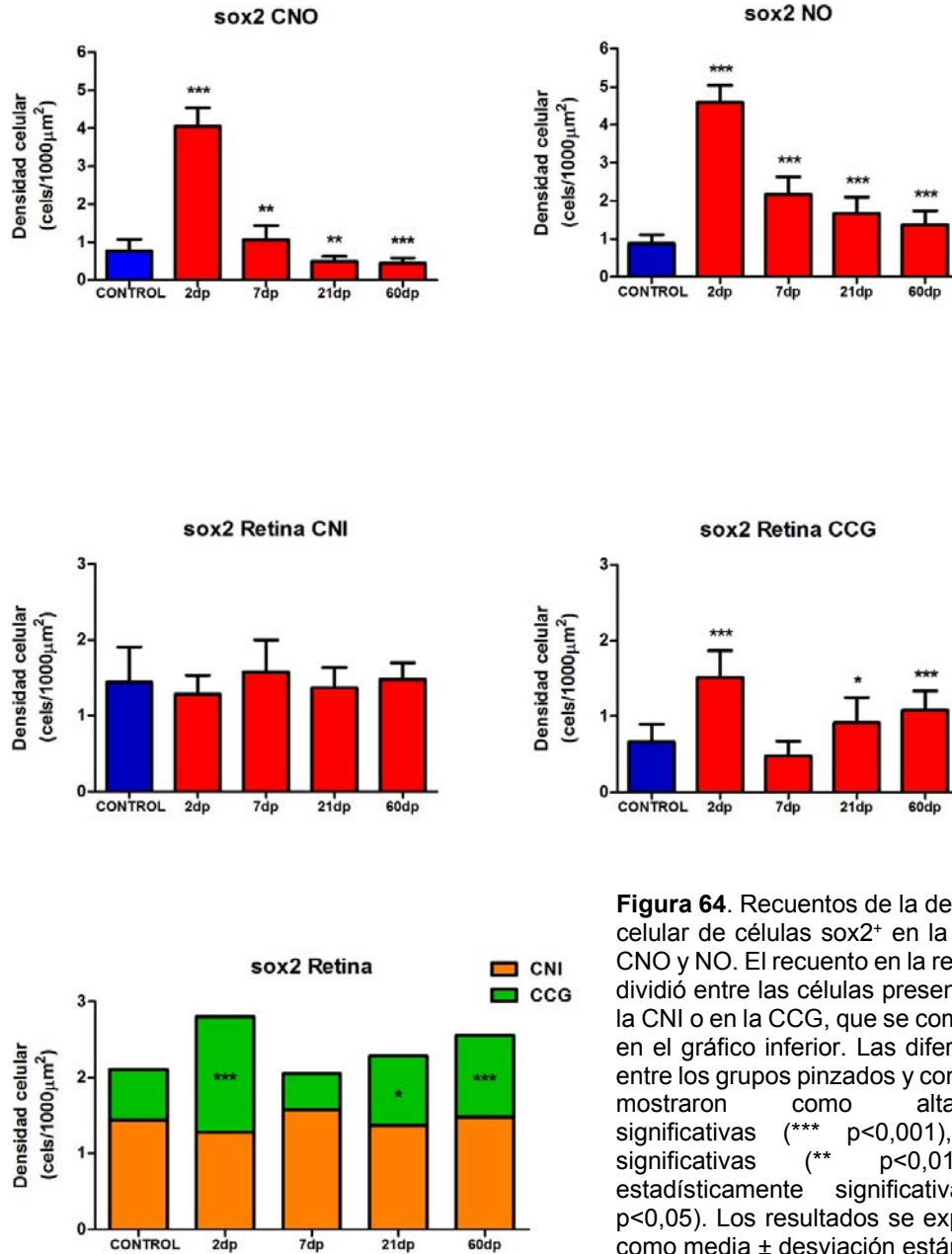


Figura 64. Recuentos de la densidad celular de células $sox2^+$ en la retina, CNO y NO. El recuento en la retina se dividió entre las células presentes en la CNI o en la CCG, que se comparan en el gráfico inferior. Las diferencias entre los grupos pinzados y control se mostraron como altamente significativas (***) $p < 0,001$, muy significativas (**) $p < 0,01$ o estadísticamente significativas (*) $p < 0,05$. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

- 7dp

Encontramos un aumento muy significativo ($p < 0,01$) en la densidad celular de $sox2$ en la CNO a los 7dp (Figura 64), aunque no tan espectacular como el detectado a los 2dp. El aumento en la densidad celular en el NO fue altamente significativo ($p < 0,001$), y los valores medios de densidad fueron algo menores que a los 2dp. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la retina

RESULTADOS

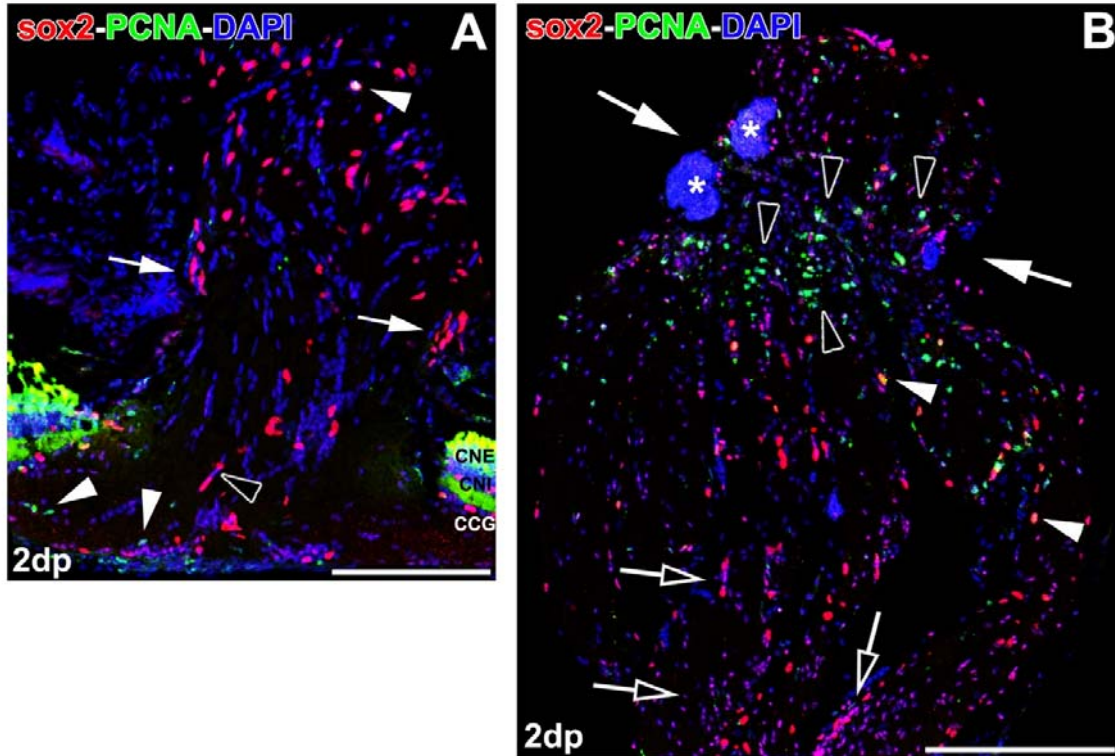


Figura 65. Análisis de la proliferación celular (PCNA) en células *sox2* a los 2dp. Pocas células *sox2*⁺/PCNA⁺ (A) (puntas de flecha blancas) en la CNO. Células solo *sox2*⁺ de núcleos similares a los animales control en la CNO y NO (A) (puntas de flecha negras). Células *sox2*⁺ con somas mayores y alargados (A) (flechas blancas). Numerosas células *sox2*⁺/PCNA⁺ (puntas de flechas blancas) en el NO (B), numerosas células PCNA⁺ (puntas de flecha negras) alrededor de la zona pinzada (flechas blancas). Células *sox2*⁺ de soma más grande y alargado que los controles (flechas negras). El asterisco (*) indica restos de sangre en la zona lesionada. Barras de escala: A, B: 200 μ m.

(Figura 64), ni en la CNI ni en la CCG. De hecho, los valores medios de densidad en la CCG son algo inferiores a los controles (Figura 64). Es el único grupo estudiado en el que un aumento en el resto de estructuras no se correlaciona con un incremento de células en la retina.

Por otra parte, a los 7dp detectamos en la retina procesos GS⁺ de las células de Müller con un marcaje más intenso que en los individuos control (Figura 66A, B), especialmente en los procesos vitreales que delimitan la retina (Figura 66B). En la CNO detectamos los mismos núcleos *sox2*⁺ de forma alargada y de mayor tamaño (Figura 66A) que a los 2dp, y que tampoco expresaban GS. Como en el caso de los oligodendrocitos, encontramos las diferencias más reseñables en el NO. La distribución de los núcleos *sox2*⁺ se concentra sobre todo en los márgenes del NO (Figura 66C), en la limitante glial. También observamos gran

RESULTADOS

cantidad de células $sox2^+$ en la zona del pinzamiento (Figura 66C), que queda

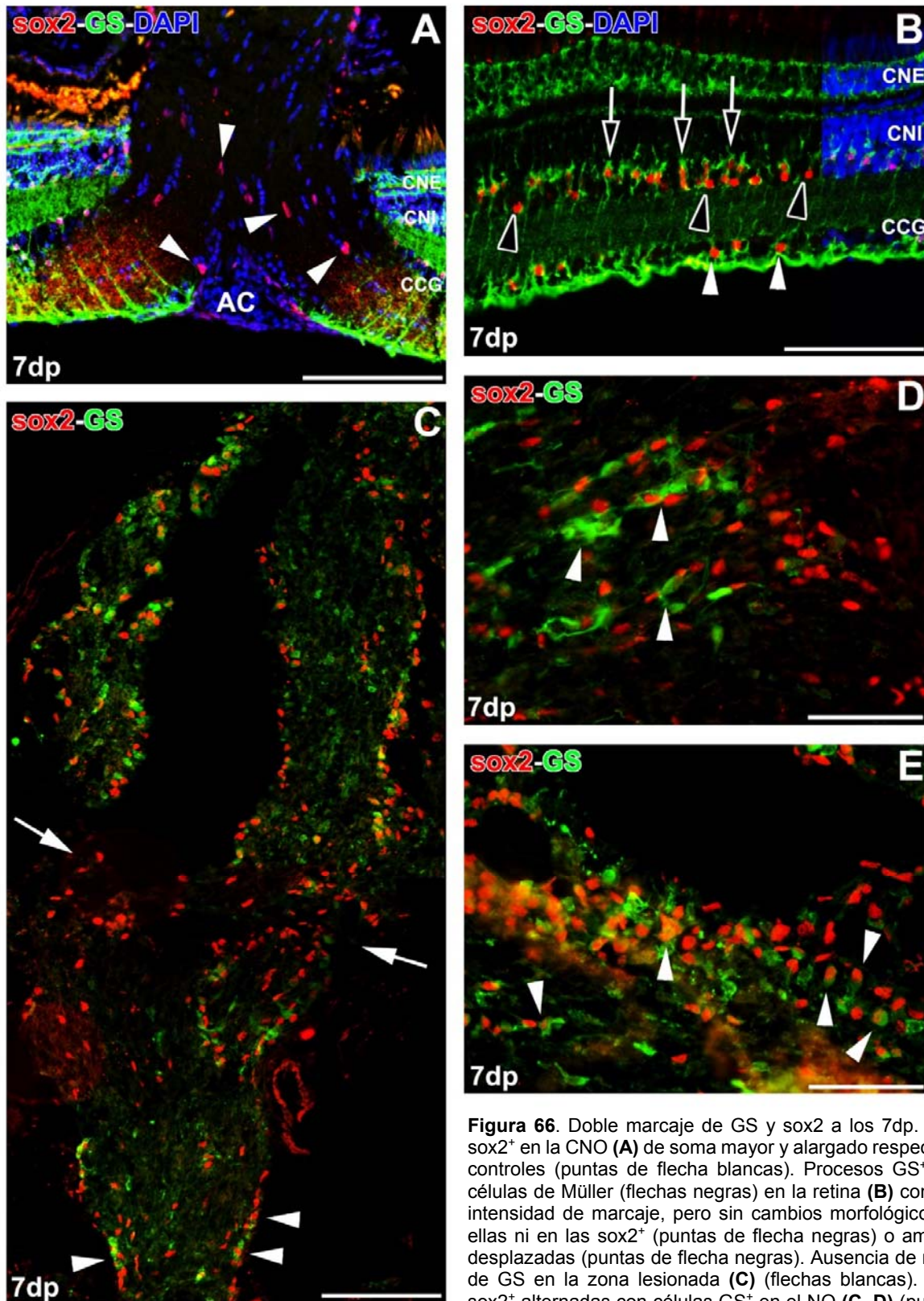


Figura 66. Doble marcaje de GS y sox2 a los 7dp. Células $sox2^+$ en la CNO (A) de soma mayor y alargado respecto a los controles (puntas de flecha blancas). Procesos GS^+ de las células de Müller (flechas negras) en la retina (B) con mayor intensidad de marcaje, pero sin cambios morfológicos ni en ellas ni en las $sox2^+$ (puntas de flecha negras) o amacrinas desplazadas (puntas de flecha negras). Ausencia de marcaje de GS en la zona lesionada (C) (flechas blancas). Células $sox2^+$ alternadas con células GS^+ en el NO (C, D) (puntas de flecha blancas). Células dobles $sox2^+/GS^+$ en la zona de la lesión (E) (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, C: 200 μm ; B: 100 μm ; D, E: 50 μm .

RESULTADOS

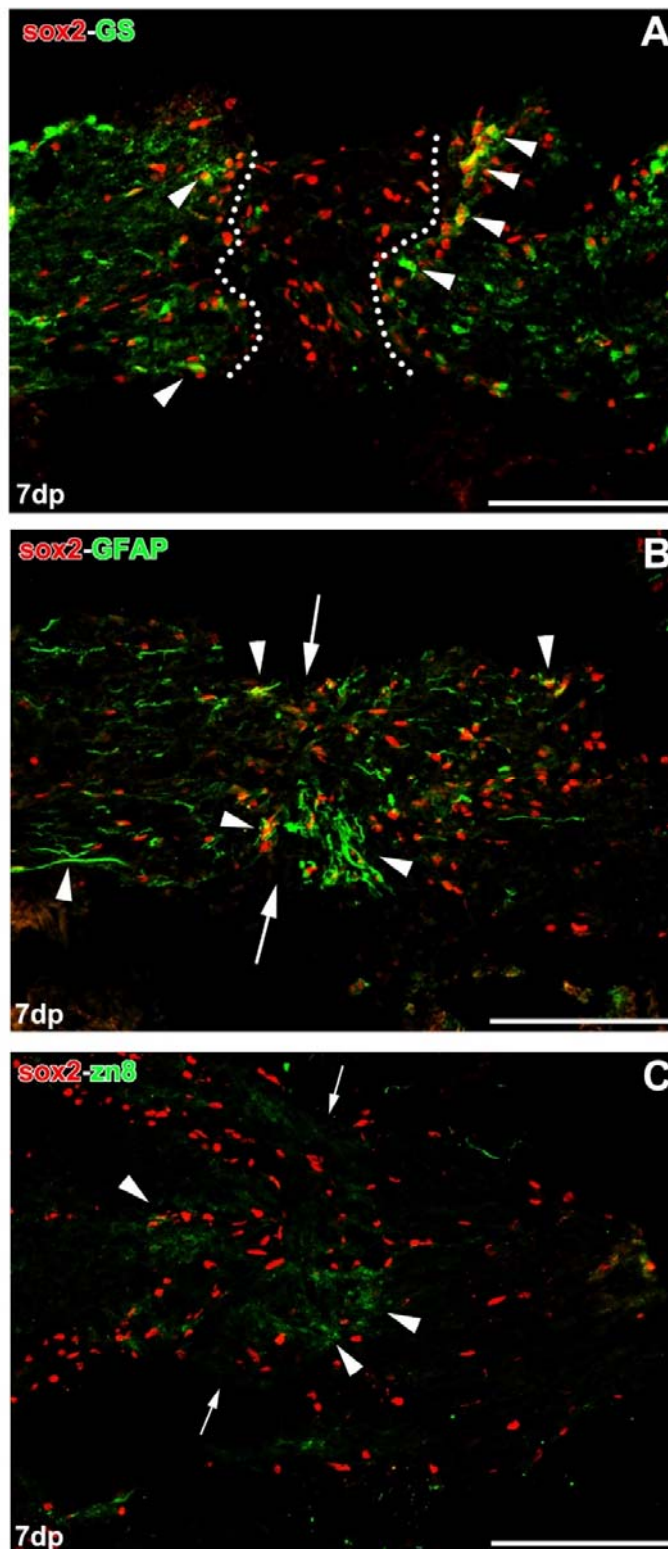


Figura 67. Expresión de GS, GFAP y zn8 en la zona de lesión a los 7dp. Células $sox2^+/GS^+$ alrededor de la zona de lesión (**A**) (puntas de flecha blancas). El marcaje para GS desapareció de la zona pinzada (líneas de puntos). Expresión de GFAP en la zona lesionada (**B**) (flechas blancas). Algunas células $sox2^+$ aparecieron asociadas a filamentos $GFAP^+$ (puntas de flecha blancas). Marcaje difuso para zn8 (**C**) en la zona de lesión (flechas blancas). Algunas células $sox2^+$ parecían asociarse a los axones zn8 (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A-C: 200 μm .

delimitada por la ausencia de marcaje GS. Seguimos encontrando estructuras

en filas de células GS⁺ alternando sus núcleos con células sox2⁺ (Figura 66D), y en algunos casos, cerca de la limitante glial y de la zona de lesión, detectamos células GS⁺ con núcleos sox2⁺ (Figura 66E), aunque el marcaje de sox2 se mostraba más tenue en comparación con las células que no expresaban GS (Figura 66E).

Al realizar un estudio más detallado de la zona de la lesión, se comprobó la ausencia de marcaje con GS en esta región (Figura 67A), aunque sí observamos núcleos sox2⁺ dentro de ella. También comprobamos la presencia de células sox2⁺/GS⁺ en las regiones adyacentes a la lesión (Figura 67A). En el caso de la GFAP sí observamos numerosos procesos GFAP⁺ en la zona de lesión y en los alrededores de la zona dañada (Figura 67B). Sin embargo, sólo pudimos observar algunas células sox2⁺ que parecían expresar GFAP (Figura 67B), aunque el resto estaban relacionadas íntimamente con filamentos GFAP⁺. La expresión de GFAP desaparece al alejarnos de la lesión.

Por último, en la zona de la lesión encontramos un marcaje difuso para zn8 (Figura 67C), que en algunas regiones aparece en contacto con células sox2⁺ (Figura 67C), aunque no con la misma apariencia que lo observado con el marcaje de GFAP.

Además, estudiamos la expresión de PCNA para evaluar la proliferación celular. En la retina encontramos, a veces, en la CNI estructuras PCNA⁺ (Figura 68C), que también expresaban sox2, y que mostraban típicas Fig.s de núcleos de células de Müller proliferando y generando progenitores alrededor de ellas. Estos núcleos migran hacia otras capas de la retina, como la CNE, donde a su vez siguen proliferando (Figura 68C). En la CNO, encontramos colocalización con algunos núcleos sox2⁺ (Figura 68A), aunque también observamos núcleos solo PCNA⁺ dispuestos tanto en las proximidades de la arteria central como en otros lugares de la CNO. Queremos destacar el hecho de que en ocasiones observamos en la CNO células sox2⁺ con núcleos alargados delimitando la zona de transición retina-CNO (Figura 68A), y que más adelante comentaremos.

En el NO, una vez más, encontramos en este grupo experimental la mayor cantidad de células PCNA⁺ (Figura 68B), distribuidas en la zona de pinzamiento pero también en otras partes del NO. Muchas de ellas expresan también sox2 (Figura 68B). También hemos localizado una acumulación de núcleos sox2⁺ en la limitante glial en la zona cercana al pinzamiento (Figura 68B). En la propia

RESULTADOS

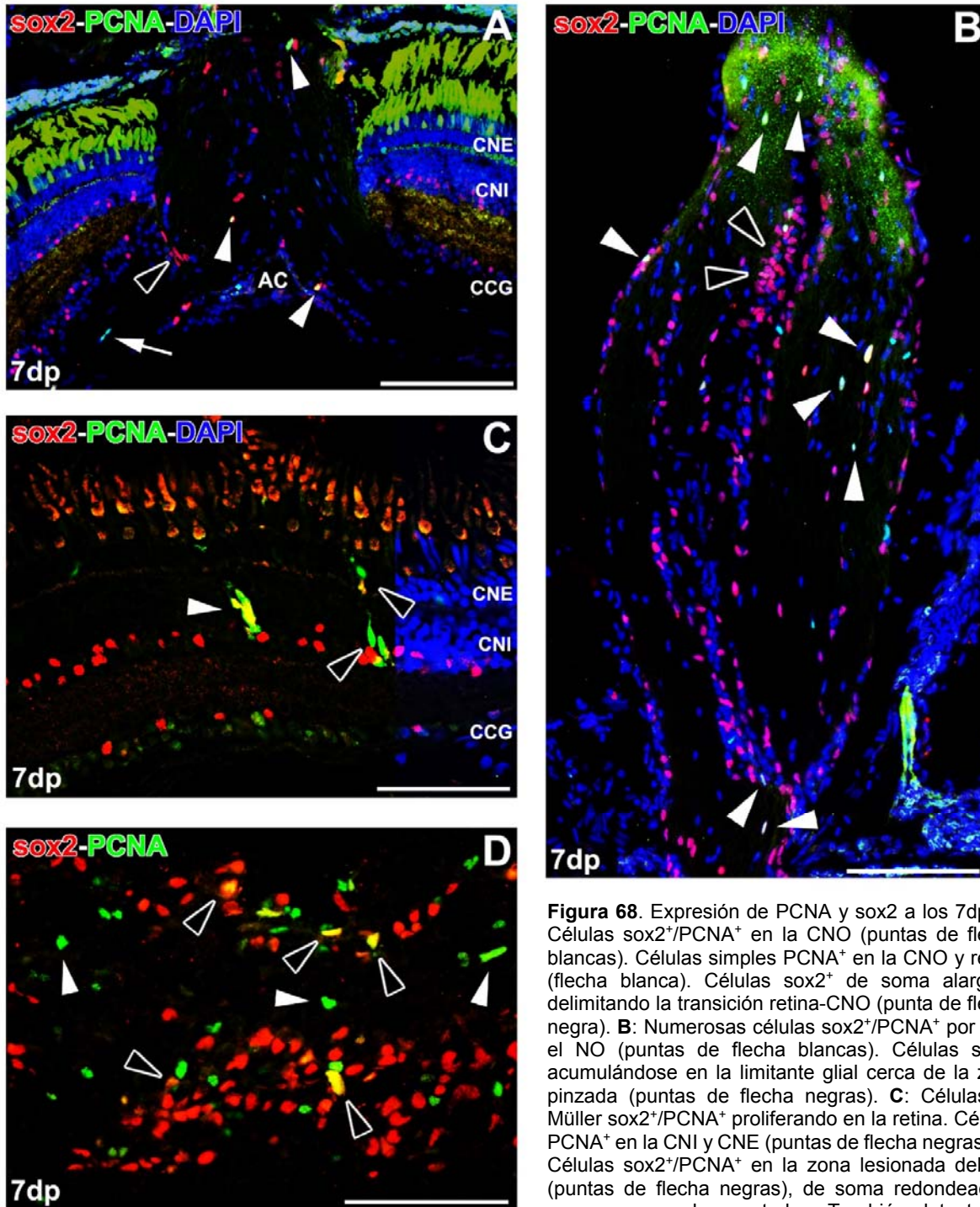


Figura 68. Expresión de PCNA y *sox2* a los 7dp. **A:** Células *sox2*⁺/*PCNA*⁺ en la CNO (puntas de flecha blancas). Células simples *PCNA*⁺ en la CNO y retina (flecha blanca). Células *sox2*⁺ de soma alargado delimitando la transición retina-CNO (punta de flecha negra). **B:** Numerosas células *sox2*⁺/*PCNA*⁺ por todo el NO (puntas de flecha blancas). Células *sox2*⁺ acumulándose en la limitante glial cerca de la zona pinzada (puntas de flecha negras). **C:** Células de Müller *sox2*⁺/*PCNA*⁺ proliferando en la retina. Células *PCNA*⁺ en la CNI y CNE (puntas de flecha negras). **D:** Células *sox2*⁺/*PCNA*⁺ en la zona lesionada del NO (puntas de flecha negras), de soma redondeado y mayor que en los controles. También detectamos otras células *PCNA*⁺ (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, B: 200 μ m; C, D: 100 μ m.

zona del pinzamiento observamos abundantes núcleos *sox2*⁺/*PCNA*⁺ (Figura 68D), de morfología redondeada u ovalada y de tamaño similar a los observados en otras regiones en este grupo experimental.

- 21dp

A los 21dp, detectamos una reducción muy significativa ($p < 0,01$) en la densidad de células $sox2^+$ en la CNO con respecto a los valores control (Figura 64). Sin embargo, en el NO seguimos encontrando un aumento altamente significativo ($p < 0,001$) (Figura 64). En este grupo, los valores medios de la

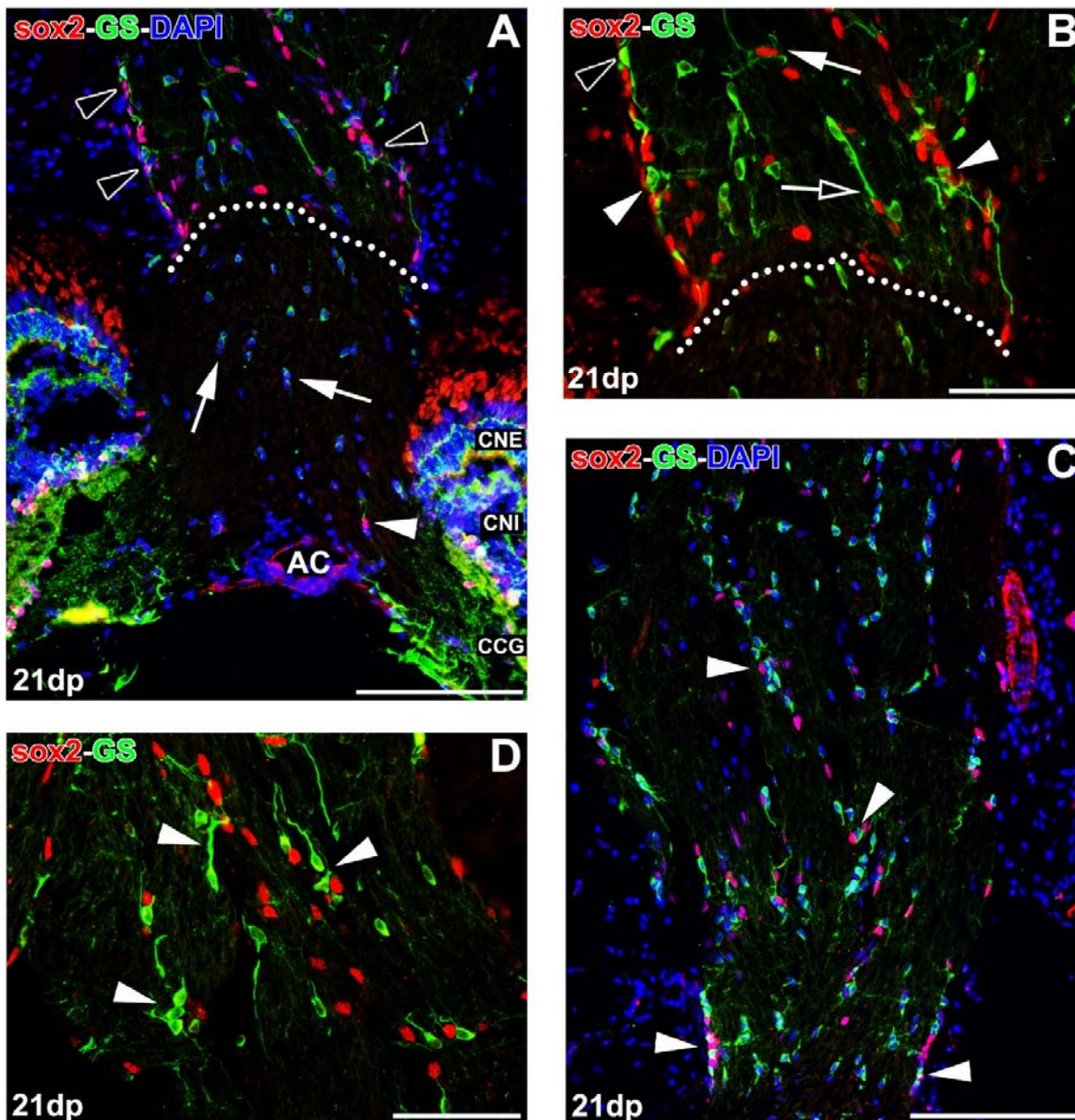


Figura 69. Doble marcaje de GS y $sox2$ a los 21dp. Pocas células $sox2^+$ en la CNO a los 21dp (A) (puntas de flecha blancas). Células GS^+ en la CNO (flechas negras). Numerosas células $sox2^+/GS^-$ de soma alargado (puntas de flecha negras) tras el límite CNO-NO (línea de puntos). **B:** Detalle de la zona de transición CNO-NO mostrada en **A**. Células $sox2^+$ en la limitante glial (puntas de flecha blancas) y en el interior del NO (flecha blanca). Células GS^+ (punta de flecha negra) con procesos alargados y gruesos (flecha negra). Similares resultados en el NO (**C-D**), con células GS^+ intercaladas entre núcleos $sox2^+$ (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, C: 200 μm ; B, D: 100 μm .

RESULTADOS

densidad de células $sox2^+$ en el NO continuaron bajando, siendo inferiores a los cuantificados a los 7dp; mientras que en la CNO observamos un cambio de tendencia, pasando del aumento registrado a los 2 y 7dp, respectivamente, a la disminución en este grupo de 21dp (Figura 64). En la retina observamos un aumento significativo ($p < 0,05$) en los valores cuantificados en la CCG, mientras que no apreciamos ninguna variación de los valores en la CNI respecto al control (Figura 64).

Al analizar la CNO, observamos la citada reducción de células $sox2$ (Figura 69A), sin variaciones morfológicas con respecto a los controles (Figura 69A). Encontramos algunas células GS^+ en la CNO pero ninguna de ellas es $sox2^+$ (Figura 69A). En la zona de transición CNO-NO, marcada por una mayor expresión de GS con respecto a la CNO, observamos numerosas células $sox2^+$, de soma redondeado/alargado y algo mayores que las presentes en la CNO (Figura 69A) y rodeadas de células GS^+ . A mayor aumento, distinguimos las estructuras en fila con células $sox2^+$ y GS^+ alternadas (Figura 69B),

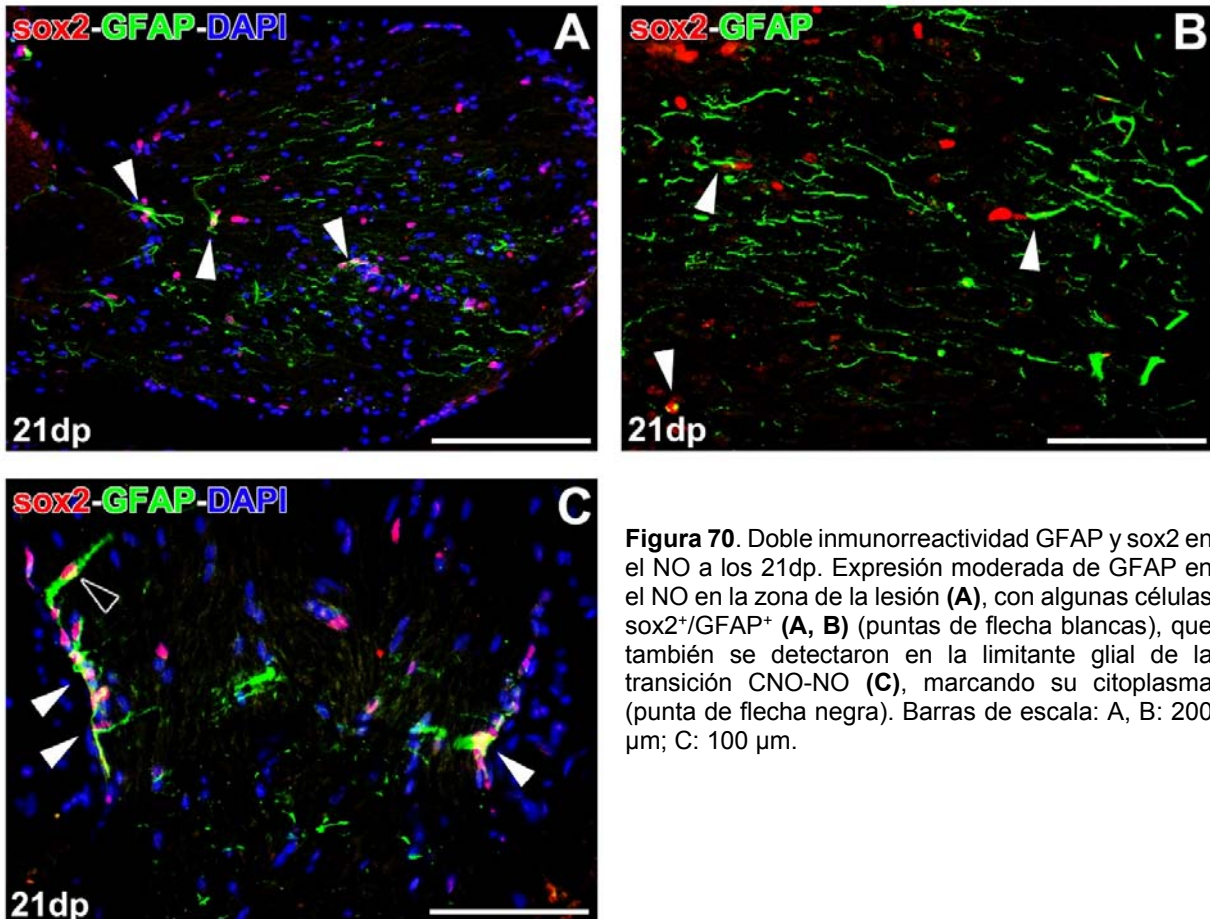


Figura 70. Doble inmunorreactividad GFAP y $sox2$ en el NO a los 21dp. Expresión moderada de GFAP en el NO en la zona de la lesión (A), con algunas células $sox2^+/GFAP^+$ (A, B) (puntas de flecha blancas), que también se detectaron en la limitante glial de la transición CNO-NO (C), marcando su citoplasma (punta de flecha negra). Barras de escala: A, B: 200 μ m; C: 100 μ m.

especialmente en la zona de la limitante glial. Las células GS⁺ presentaban una gran intensidad en su marcaje y en sus prolongaciones (Figura 69B). Obtuvimos resultados similares en el resto del NO (Figura 69C), con células GS⁺ con procesos marcados intensamente y en estrecho contacto con células sox2⁺ (Figura 69D). A diferencia de lo observado a los 7dp, no detectamos células sox2⁺/GS⁺ en la zona lesionada.

También encontramos en el NO una expresión moderada de GFAP en torno a la zona lesionada (Figura 70A, B), con filamentos cruzando el NO y mostrando en algunas ocasiones células sox2⁺ con GFAP localizado alrededor de su núcleo (Figura 70A, B). Estas estructuras se encontraron también en la transición CNO-NO (Figura 70C), donde las células sox2⁺ presentes en la limitante glial expresan GFAP (Figura 70C) en su citoplasma.

RESULTADOS

Al analizar la proliferación, detectamos pocas células PCNA⁺ en la CNO (Figura 71A), que se disponen cerca de la arteria central, y no encontramos células doblemente marcadas con sox2 (Figura 71A). La situación resultó distinta

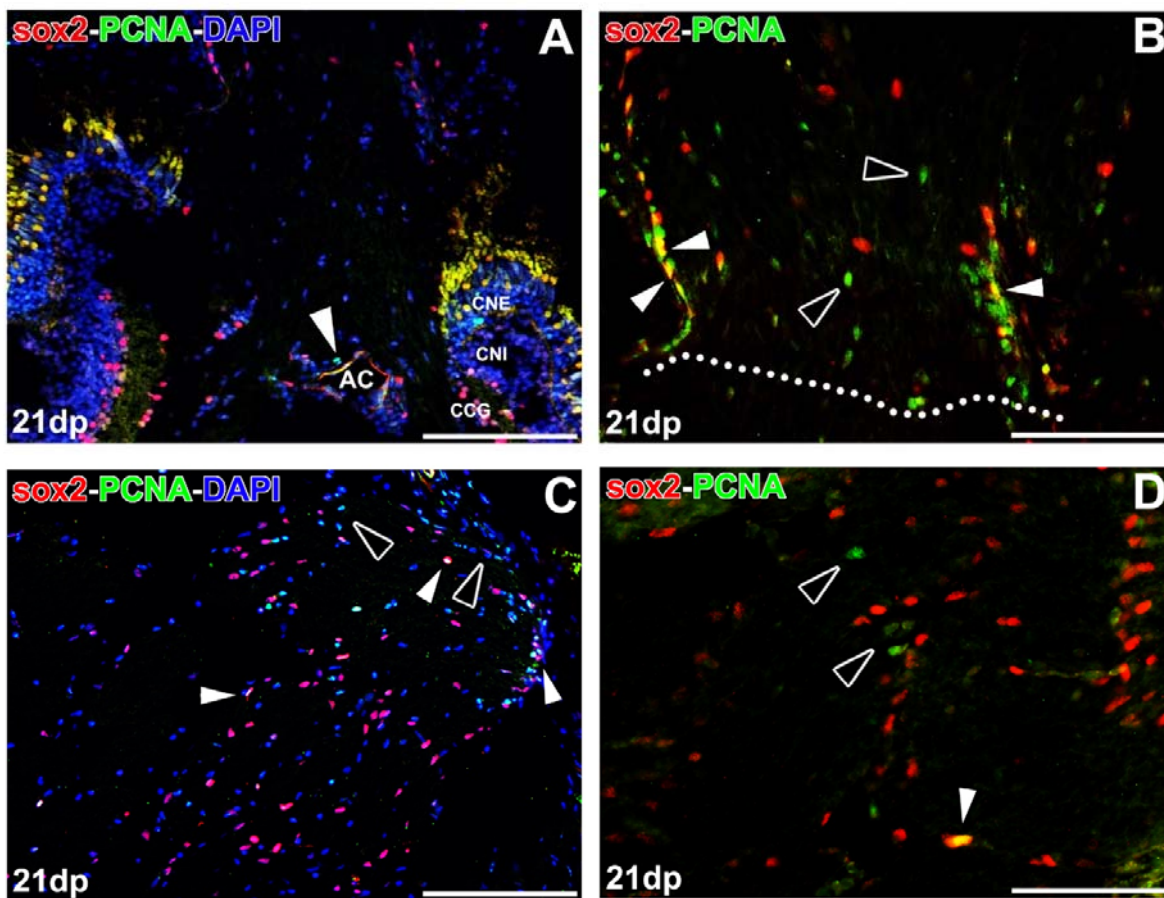


Figura 71. Análisis de la proliferación celular (PCNA) en células *sox2*⁺ a los 21dp. Pocas células PCNA⁺ en la CNO (A) (punta de flecha blanca). Numerosas células *sox2*⁺/PCNA⁺ en la limitante glial (B) (puntas de flecha blancas) y células únicamente PCNA⁺ (puntas de flecha negras). Resultados similares en el NO (C, D), con menos células PCNA⁺ que a los 7dp. Barras de escala: A, C: 200 μ m; B, D: 100 μ m.

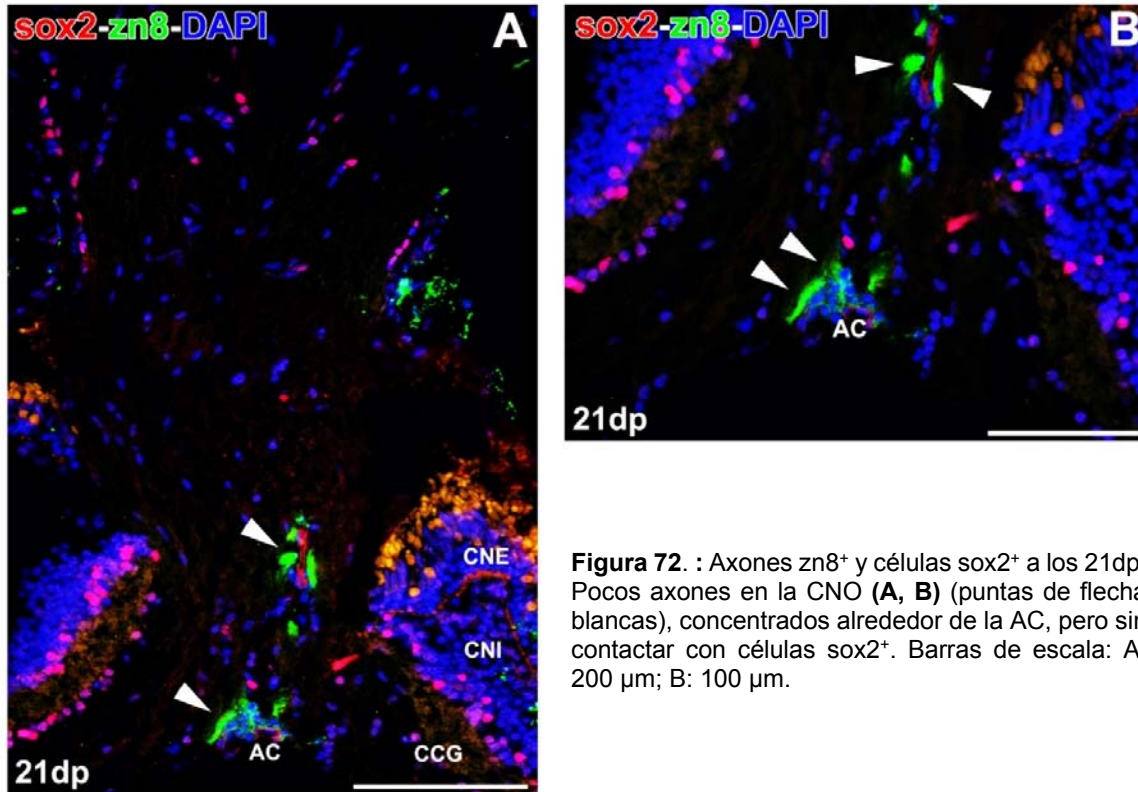


Figura 72. : Axones zn8⁺ y células sox2⁺ a los 21dp. Pocos axones en la CNO (**A, B**) (puntas de flecha blancas), concentrados alrededor de la AC, pero sin contactar con células sox2⁺. Barras de escala: A: 200 μ m; B: 100 μ m.

en el NO, pero especialmente en la zona de transición CNO-NO (Figura 71B), donde observamos numerosas células sox2⁺/PCNA⁺ en la limitante glial, además de células PCNA⁺ en zonas más internas (Figura 71B). En este grupo detectamos también algunas células sox2⁺/PCNA⁺ tanto en la zona de la lesión como en otras partes del NO (Figura 71C). Estas células presentan núcleos de tamaño más reducido que a los 7dp (Figura 71D, Figura 68D) y de morfología predominantemente alargada.

Finalmente, analizamos los axones zn8⁺, detectando algunos haces más o menos gruesos en la CNO (Figura 72A), alrededor de la arteria central. Sin embargo, no encontramos células sox2⁺ en contacto con los axones (Figura 72A, B).

- **60dp**

En los animales sacrificados a los 60dp, encontramos una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) en la densidad de células sox2⁺ de la CNO con respecto al control (Figura 64), con valores medios similares a los obtenidos a los 21dp. En el NO seguimos detectando un aumento también altamente

RESULTADOS

significativo ($p < 0,001$) (Figura 64), aunque sus valores medios siguieron la tendencia a la baja mostrada en grupos experimentales anteriormente descritos, pero sin llegar a ser similares a los control. Respecto a la retina, observamos un incremento en la densidad de células $sox2^+$ en la CCG pero, al igual que en grupos anteriores, no observamos ningún cambio en la CNI (Figura 64).

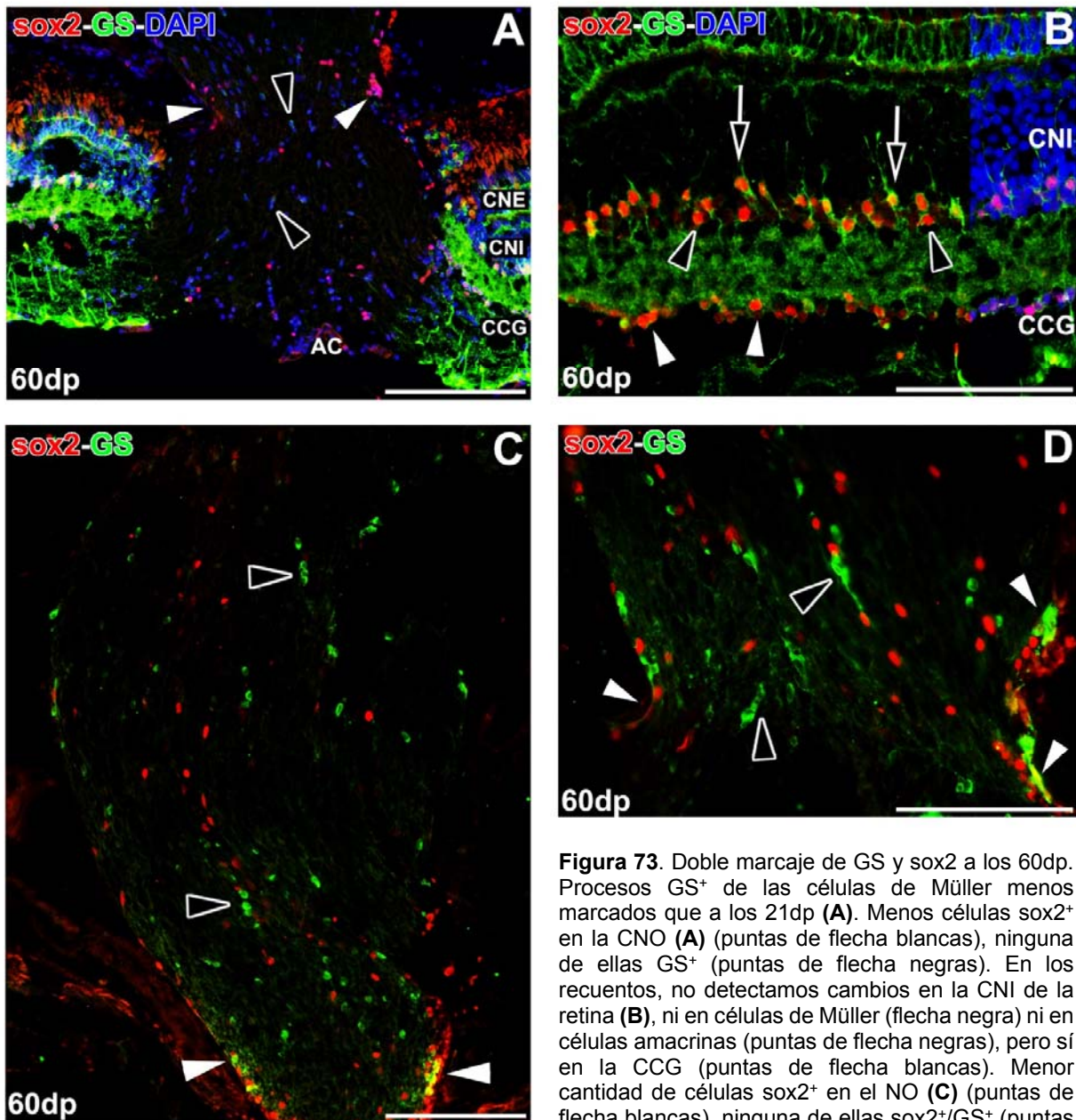


Figura 73. Doble marcaje de GS y sox2 a los 60dp. Procesos GS^+ de las células de Müller menos marcados que a los 21dp (**A**). Menos células $sox2^+$ en la CNO (**A**) (puntas de flecha blancas), ninguna de ellas GS^+ (puntas de flecha negras). En los recuentos, no detectamos cambios en la CNI de la retina (**B**), ni en células de Müller (flecha negra) ni en células amacrinas (puntas de flecha negras), pero sí en la CCG (puntas de flecha blancas). Menor cantidad de células $sox2^+$ en el NO (**C**) (puntas de flecha blancas), ninguna de ellas $sox2^+/GS^+$ (puntas de flecha negras). Células $sox2^+$ (puntas de flecha blancas) y células GS^+ (puntas de flecha negras) en la transición CNO-NO (**D**). Barras de escala: A, C: 200 μm ; B, D: 100 μm .

RESULTADOS

En la retina observamos que el grosor e intensidad de las prolongaciones GS⁺ de las células de Müller eran inferiores a los 21dp (Figura 73B), aunque en la parte más vitreal parecían expresar ligeramente una mayor cantidad de GS (Figura 73A). Observamos la disminución en la cantidad de células sox2⁺ en la CNO, donde presentan núcleos pequeños y redondeados (Figura 73A). Detectamos también células GS⁺ en la CNO (Figura 73A), aunque no son sox2⁺. En el NO encontramos abundantes células sox2⁺ (Figura 73C), de morfología alargada y dispuestas a lo largo del NO, tanto en la limitante glial como en su interior (Figura 73C). En la transición CNO-NO seguimos observando las células sox2⁺ de la limitante en estrecho contacto con células GS⁺ (Figura 73D). Estas últimas presentan numerosas prolongaciones aunque aparentemente no teñidas tan intensamente como en otros grupos experimentales (Figura 73D).

También detectamos una expresión menor de GFAP en la CNO (Figura 74A), donde pudimos observar algunas células sox2⁺ en contacto con filamentos GFAP⁺ en la zona límite entre la retina y la CNO (Figura 74A). En la retina, las prolongaciones GFAP⁺ de las células de Müller muestran un aspecto similar al de los controles (Figura 74B).

Al analizar la proliferación celular, en la retina no observamos una gran cantidad de células PCNA⁺, y las halladas que se distribuyen tanto en la CNI como en la CCG, presentan núcleos redondeados (Figura 75B) y no colocalizan con sox2. Encontramos muy pocas células en división en la CNO (Figura 75A),

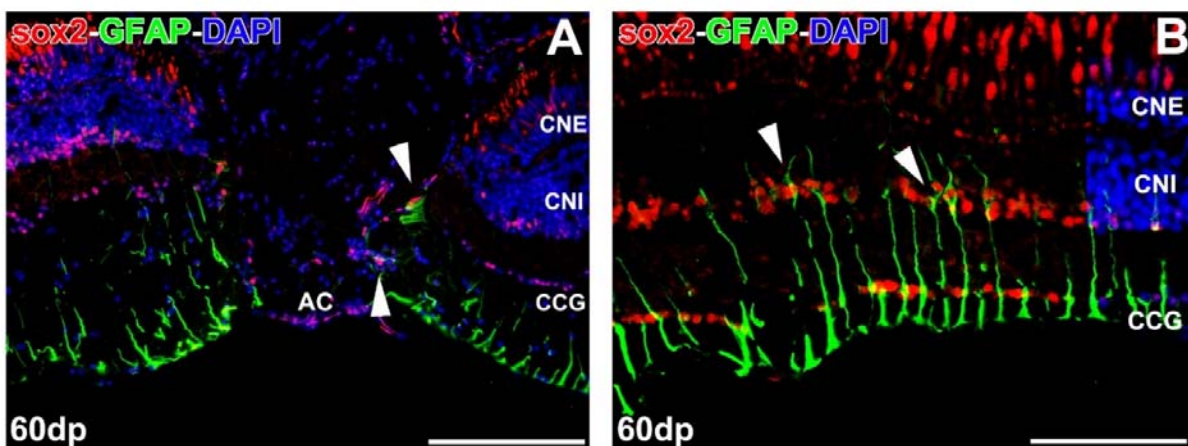


Figura 74. Expresión de GFAP y sox2 a los 60dp. Menor expresión que en los animales control de GFAP en las células de Müller de la retina (**B**) (puntas de flecha blancas) y CNO (**A**), con alguna célula sox2⁺ en contacto con procesos GFAP⁺ (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A: 200 μ m; B: 100 μ m.

RESULTADOS

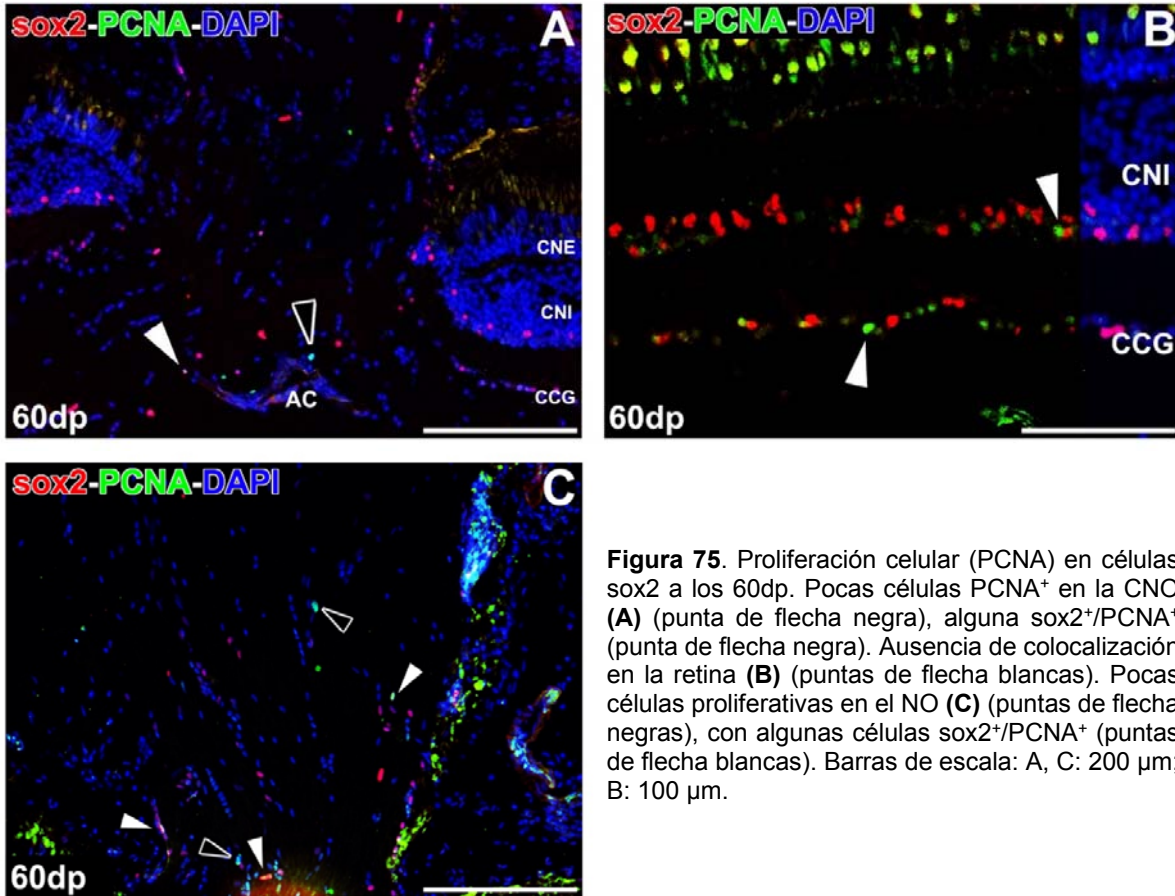


Figura 75. Proliferación celular (PCNA) en células *sox2* a los 60dp. Pocas células PCNA⁺ en la CNO (**A**) (punta de flecha negra), alguna *sox2*⁺/PCNA⁺ (punta de flecha negra). Ausencia de colocalización en la retina (**B**) (puntas de flecha blancas). Pocas células proliferativas en el NO (**C**) (puntas de flecha negras), con algunas células *sox2*⁺/PCNA⁺ (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, C: 200 μ m; B: 100 μ m.

y éstas se localizan en los alrededores de la arteria central. Tan sólo una pequeña parte de estas células resultó ser *sox2*⁺ (Figura 75A). Un resultado similar observamos en el NO, con células PCNA⁺ cerca de la transición CNO-NO (Figura 75C). Como en la CNO, una pequeña parte de las células en división se caracterizó como *sox2*⁺ (Figura 75C).

Por último, al estudiar los axones *zn8*⁺, los detectamos en la CNO discurriendo paralelos a la arteria central (Figura 76A) y en algunos lugares en contacto con núcleos *sox2*⁺ alargados y situados en paralelo a los axones (Figura 76A). Una disposición parecida la encontramos en el NO (Figura 76B), donde los haces *zn8*⁺ que discurren por la limitante glial aparecen en estrecho contacto con células *sox2*⁺ (Figura 76B), de modo similar a lo observado en los controles.

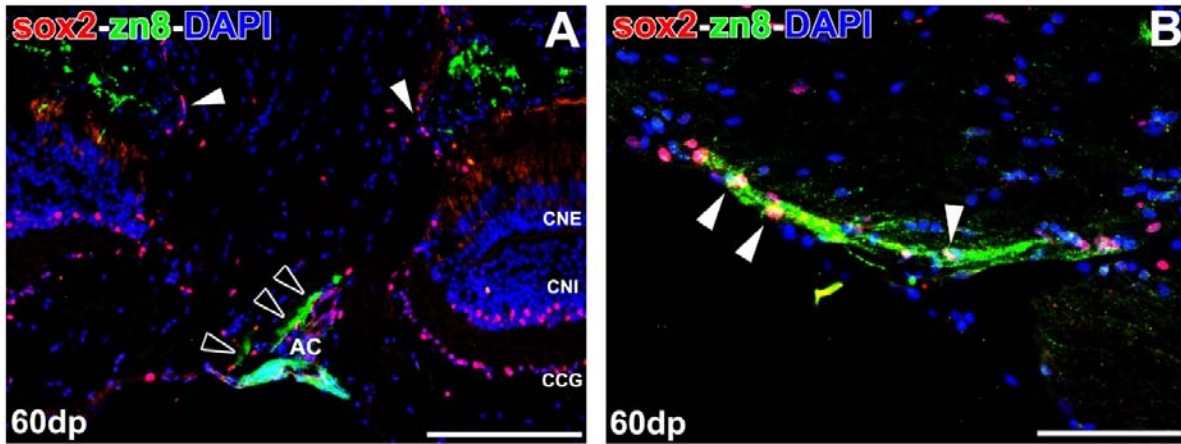


Figura 76. Axones en crecimiento zn8 a los 60dp. Axones zn8⁺ en la CNO, en paralelo a la AC (**A**) (puntas de flecha negras), sin contactar con células sox2⁺. En el NO (**B**), detectamos células sox2⁺ (puntas de flecha blancas) en contacto con los axones marginales zn8⁺. Barras de escala: A: 200 μ m; B: 100 μ m.

RESULTADOS

- **Pax2**

Hemos estudiado la expresión del factor de transcripción pax2. Este factor de transcripción se expresa en células de linaje astrogial en teleosteos, y junto a los anteriormente estudiados completa la visión de las células macrogliales en el sistema visual. Describimos tanto las variaciones cuantitativas en la retina, la CNO y el NO en condiciones control y tras el pinzamiento del NO, como la caracterización de estas células con distintos marcadores inmunohistoquímicos.

- *pax2 en condiciones control*

La expresión de pax2 en condiciones control se asemeja mucho a la descrita para sox2. En la CNO encontramos células pax2⁺ distribuidas por toda su extensión (Figura 77A), aunque la mayoría de ellas concentradas en torno a la arteria central. Estas células presentan núcleos redondeados o alargados (Figura 77A), y en algunos casos se observaron intercalándose en filas de núcleos típicas de oligodendrocitos (Figura 77A). También observamos numerosos núcleos pax2⁺ en la zona de transición CNO-NO (Figura 77A, B), formando principalmente parte de la limitante glial (Figura 77B) aunque también los localizamos en el interior del NO. Estas células poseen núcleos redondos o alargados pero es más raro que en la CNO observarlas intercaladas entre filas de oligodendrocitos (Figura 77B).

Como en el caso de sox2, detectamos células pax2⁺ de soma alargado y marcaje no muy intenso en la CNI de la retina (Figura 77D) que también expresaban GS en su citoplasma, y que caracterizamos como células de Müller. En otras inmunohistoquímicas, como veremos más adelante, encontramos núcleos pax2⁺ situados en la CNI y en la CCG, ambos en contacto con la CPI, recordando el marcaje de sox2 en la retina. Sin embargo, no encontramos en la CNO células pax2⁺ que expresaran GS (Figura 77C)

Al examinar la expresión de ck, también obtuvimos resultados muy similares a los de sox2. Así, detectamos ck en las células pax2⁺ de la CNO (Figura 78A), tanto en las distribuidas alrededor de la arteria central como en las más interiores. Estas células pax2⁺/ck⁺ aparecen en la limitante glial de la transición CNO-NO (Figura 78A). En el NO encontramos células pax2⁺ dispuestas en la limitante glial y en la zona interior del NO (Figura 78B). En ambos casos

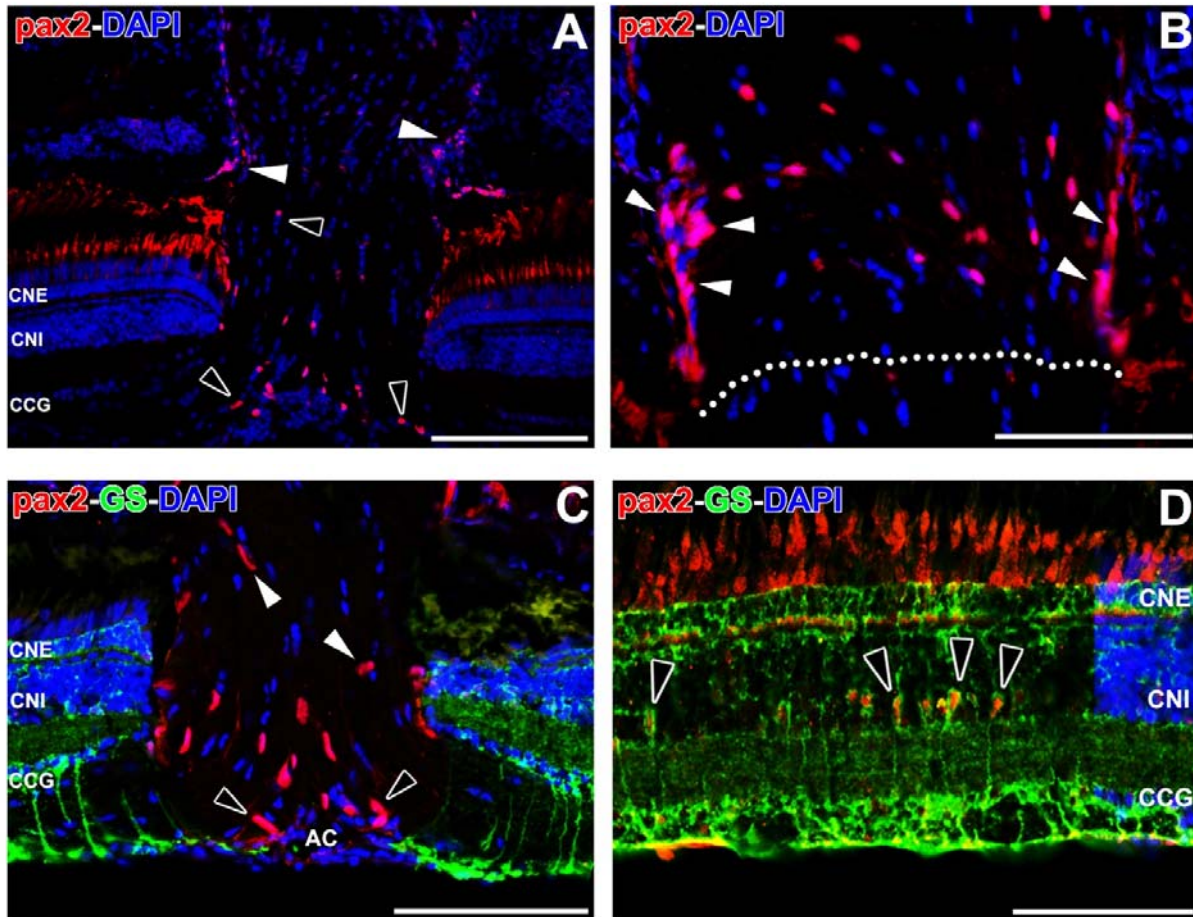


Figura 77. Expresión de pax2 y GS en animales control. Células pax2⁺ en la CNO (**A**) (puntas de flecha negras) y en la limitante glial de la transición CNO-NO (**A, B**) (puntas de flecha blancas). Ninguna célula pax2⁺/GS⁺ en la CNO (**C**) (puntas de flecha blancas), algunas células pax2⁺ cerca de la AC (puntas de flecha negras) y el resto dispersas por la CNO (puntas de flecha blancas). En la retina (**D**) células de Müller pax2⁺/GS⁺ (puntas de flecha negras). Barras de escala: A, C: 200 μ m; B, D: 100 μ m.

resultaron ser ck⁺, con un marcaje mucho más claro en las distribuidas en la limitante glial (Figura 78B). A mayor aumento podemos visualizar la compleja red de filamentos ck que delimitan y engloban la estructura del NO (Figura 78C).

La expresión de PCNA en la CNO se limitó a unas pocas células cerca de la arteria central, y no encontramos células doblemente marcadas pax2⁺/PCNA⁺ en este grupo experimental (Figura 78D).

En la zona en la que discurren paralelos a la arteria central los axones jóvenes zn8⁺, pudimos observar algunas células pax2⁺ en estrecho contacto con dichos axones (Figura 79A, B). También pudimos observar núcleos pax2⁺ intercalados en filas de núcleos indentados de oligodendrocitos (Figura 79B), de modo similar a lo observado para las células sox2⁺.

RESULTADOS

Como hemos mencionado antes, encontramos en algunas ocasiones una expresión más amplia de pax2 en la retina (Figura 79A, C). En estos casos, observamos expresión en la CNI, tanto en núcleos redondeados dispuestos en contacto con la CPI como en núcleos más tenues, alargados y situados más vitrealmente. También encontramos expresión en núcleos redondeados de la

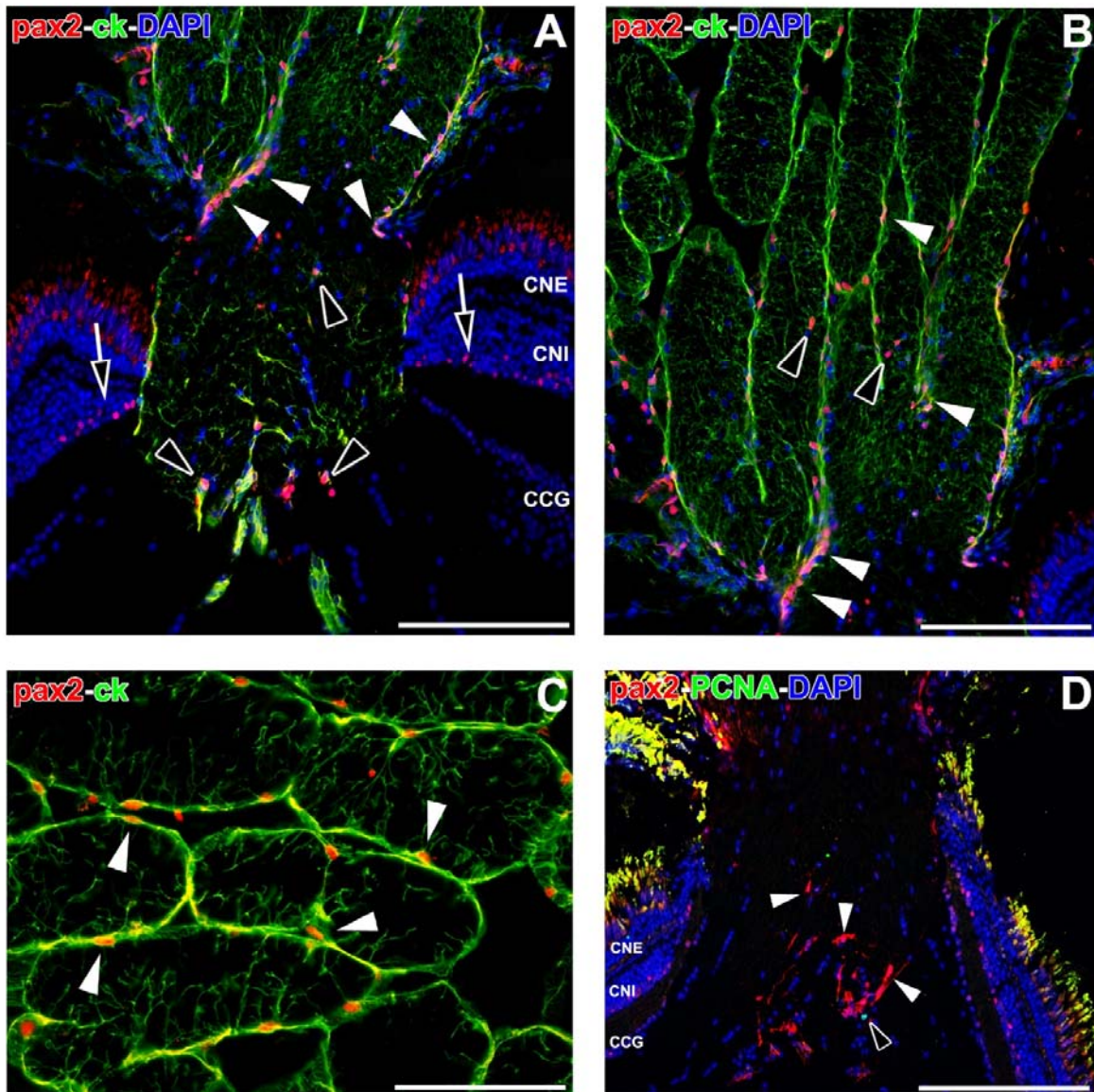


Figura 78. Análisis de expresión de citoqueratina (ck) y proliferación celular (PCNA) en células pax2 de animales control. Células pax2⁺ en la CNI de la retina (**A**) (flechas negras) y pax2⁺/ck⁺ en la CNO (puntas de flecha negras) y en la limitante glial de la transición CNO-NO (puntas de flecha blancas). Células dobles pax2⁺/ck⁺ en la limitante del NO (**B**, **C**) (puntas de flecha blancas), también en partes internas del NO (puntas de flecha negras). Pocas células PCNA⁺ en la CNO (**D**) (punta de flecha negra), pero ninguna pax2⁺ (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, B, D: 200 μ m; C: 100 μ m.

RESULTADOS

CCG, también en contacto con la CPI (Figura 79C). En esta capa, en su parte más vitreal, es donde localizamos los axones $zn8^+$ (Figura 79C).

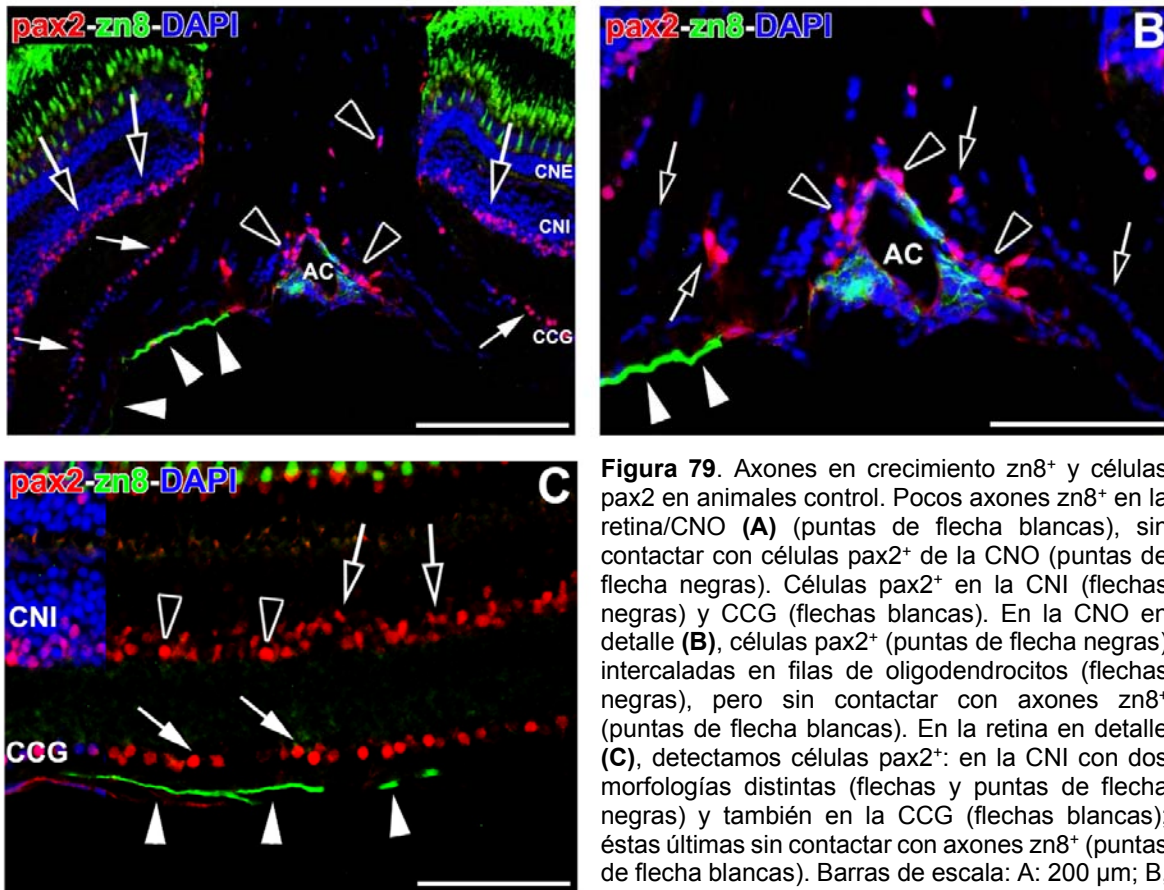


Figura 79. Axones en crecimiento $zn8^+$ y células $pax2$ en animales control. Pocos axones $zn8^+$ en la retina/CNO (A) (puntas de flecha blancas), sin contactar con células $pax2^+$ de la CNO (puntas de flecha negras). Células $pax2^+$ en la CNI (flechas negras) y CCG (flechas blancas). En la CNO en detalle (B), células $pax2^+$ (puntas de flecha negras) intercaladas en filas de oligodendrocitos (flechas negras), pero sin contactar con axones $zn8^+$ (puntas de flecha blancas). En la retina en detalle (C), detectamos células $pax2^+$: en la CNI con dos morfologías distintas (flechas y puntas de flecha negras) y también en la CCG (flechas blancas); éstas últimas sin contactar con axones $zn8^+$ (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A: 200 μm ; B, C: 100 μm .

- *pax2* tras el pinzamiento del NO

Como en anteriores grupos, cuantificamos la variación del número de células en la CNO y NO, y analizamos las posibles diferencias entre el grupo control y los grupos pinzados. Los resultados más reseñables, que se desarrollarán a continuación, mostraron los mayores cambios en las poblaciones del NO, mientras que en la CNO no encontramos diferencias salvo a los 60dp.

- **2dp y 7dp**

Los recuentos de células $pax2^+$ en la CNO a los 2 y 7dp no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) respecto al grupo control (Figura 80). Sin embargo, sí observamos un aumento muy significativo ($p < 0,01$) a los 2dp y altamente significativo ($p < 0,001$) a los 7dp en el NO (Figura 80). Al

RESULTADOS

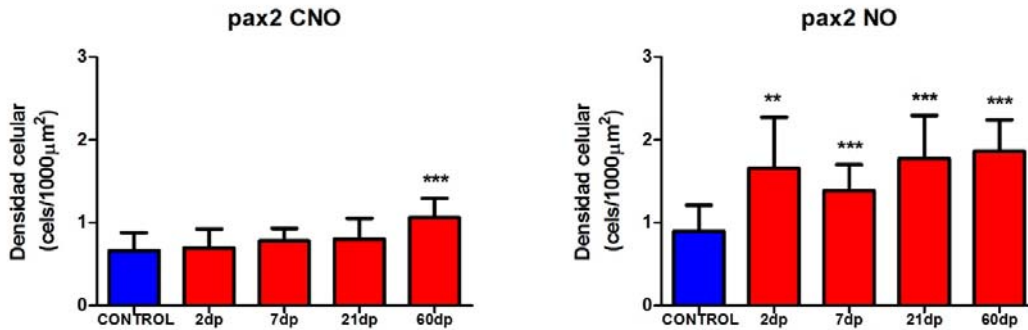


Figura 80. Recuentos de la densidad celular de células pax2⁺ en la CNO y NO. Diferencias entre los grupos pinzados y control altamente significativas (***) $p < 0,001$) o muy significativas (**) $p < 0,01$). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

analizar la expresión de GS junto a pax2 a los 2dp no encontramos ninguna colocalización entre ambos (Figura 81A), y las células pax2⁺ no presentaron ninguna variación morfológica respecto a los controles.

Sin embargo, a los 7dp nos encontramos con células pax2⁺ en la CNO y en el NO con morfología alargada y de un tamaño mayor que las observadas en controles o a los 2dp (Figura 81B). Incluso a veces observamos marcaje en el citoplasma de las células de la CNO (Figura 81D). No detectamos expresión de GS en la CNO (Figura 81B), y en la retina seguimos observando núcleos de células de Müller GS⁺/pax2⁺ (Figura 81C), si bien con débil intensidad en su marcaje para pax2.

Tampoco encontramos expresión de ck en la CNO a los 7dp (Figura 81D), aunque pudimos detectar un marcaje muy débil en la MLE de la retina (Figura 81D). En la CNO observamos cómo en algunas células pax2⁺ el marcaje se extiende por su citoplasma, revelando células estrelladas que parecen delimitar con sus procesos la CNO (Figura 81D). Por el contrario, pudimos observar un leve marcaje de ck en el NO (Figura 81E), que parece concentrarse en la limitante glial, colocalizando con células pax2⁺ (Figura 81E). Estas células presentan núcleos alargados y de mayor tamaño respecto al NO control (Figura 81E).

Al analizar la proliferación celular no encontramos diferencias en la CNO con respecto a los controles (Figura 82A). En la retina también detectamos Fig.s de grupos de núcleos mitóticos de células de Müller (Figura 82B), aunque en este

RESULTADOS

caso sólo las células situadas en la parte basal del grupo expresan pax2, y de

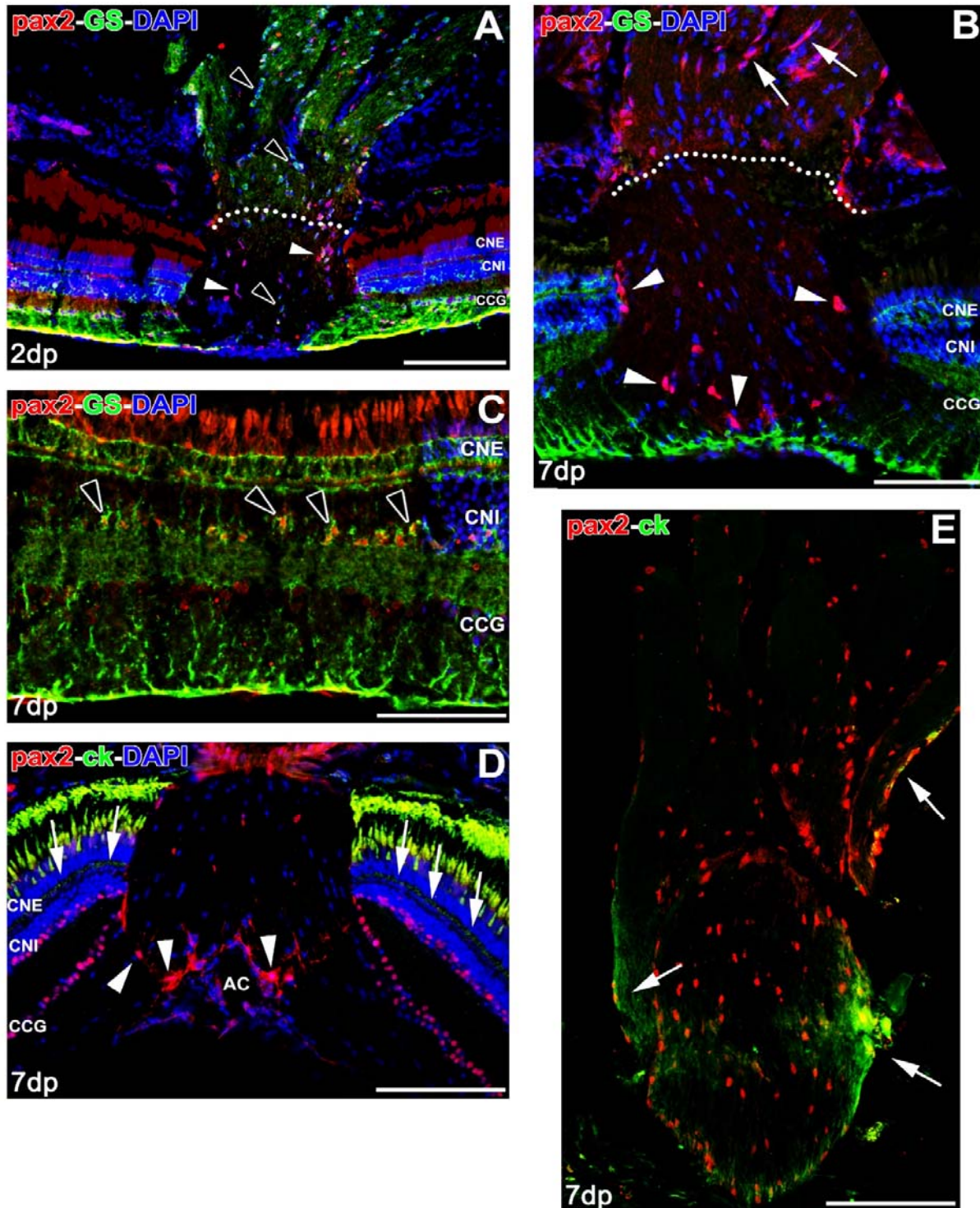


Figura 81. Dobles marcajes de GS/ck y pax2 a los 7dp. Células pax2⁺ en la CNO (**A**, **B**), de mayor tamaño (puntas de flecha blancas), pero sin colocalizar con GS (puntas de flecha negras). En el NO, (**B**) células pax2⁺ con marcaje invadiendo el citoplasma (flechas blancas). Procesos GS⁺ más intensos de las células de Müller pax2⁺/GS⁺ en la retina (**C**) (puntas de flecha negras). Escaso marcaje ck⁺ en la MLE de la retina (**D**) (flechas blancas), y tampoco en la CNO marcando células pax2⁺ (puntas de flecha blancas), con el marcaje extendido en el citoplasma. En el NO (**E**), marcaje reducido de la ck, con pocas células dobles pax2⁺/ck⁺ (flechas blancas). Barras de escala: A, D, E: 200 µm; B, C: 100 µm.

RESULTADOS

forma débil (Figura 82B). Al analizar el NO es donde encontramos la mayor cantidad de células PCNA⁺, que se distribuyen por todo el NO, aunque las células pax2⁺/PCNA⁺ las localizamos alrededor de la zona de la lesión (Figura 82C), y observamos acumulaciones de núcleos pax2⁺ grandes en la zona de la lesión (Figura 82C, D), aunque estos agrupamientos no revelaron expresión de PCNA a mayor aumento (Figura 82D).

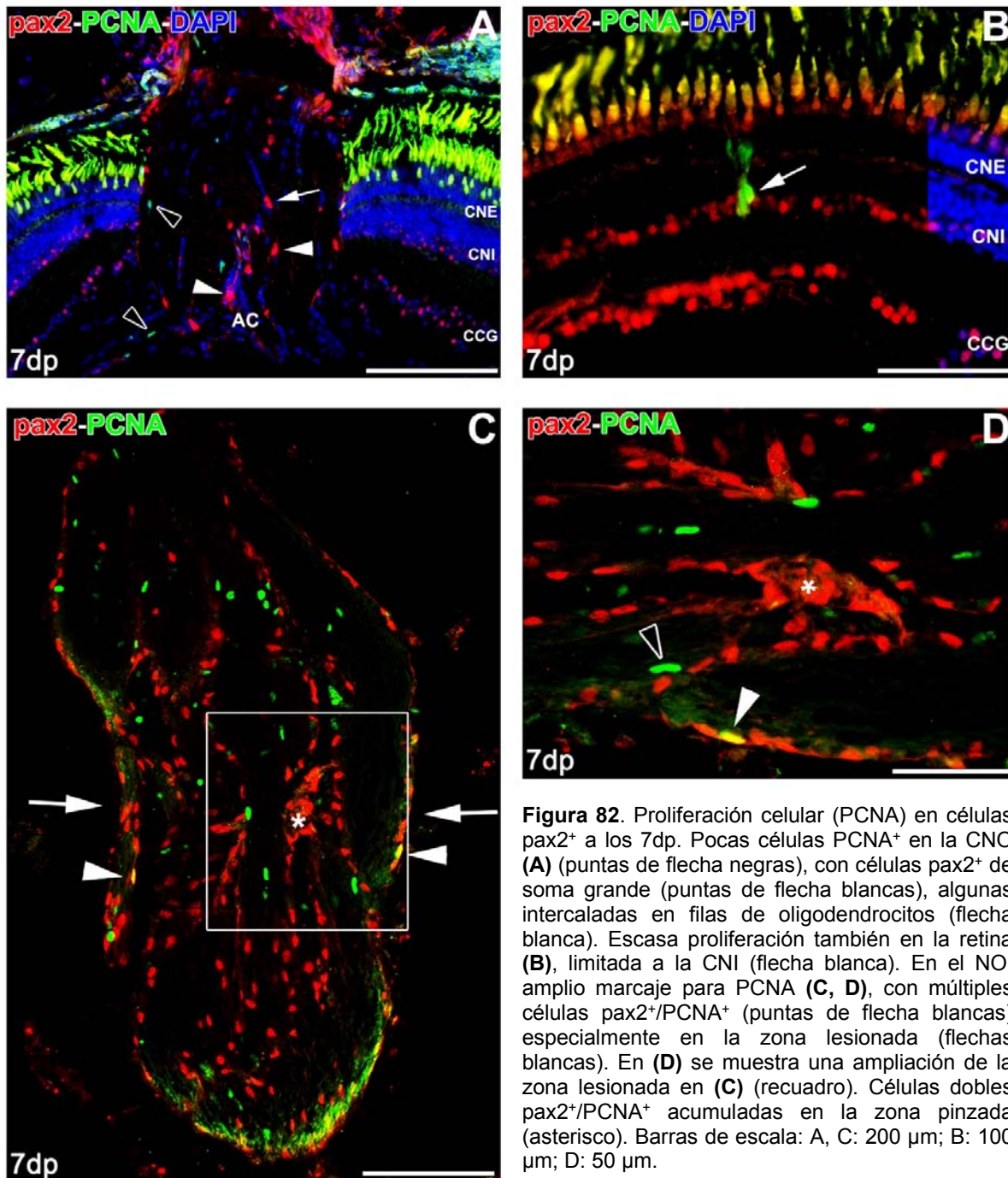


Figura 82. Proliferación celular (PCNA) en células pax2⁺ a los 7dp. Pocas células PCNA⁺ en la CNO (A) (puntas de flecha negras), con células pax2⁺ de soma grande (puntas de flecha blancas), algunas intercaladas en filas de oligodendrocitos (flecha blanca). Escasa proliferación también en la retina (B), limitada a la CNI (flecha blanca). En el NO, amplio marcaje para PCNA (C, D), con múltiples células pax2⁺/PCNA⁺ (puntas de flecha blancas) especialmente en la zona lesionada (flechas blancas). En (D) se muestra una ampliación de la zona lesionada en (C) (recuadro). Células dobles pax2⁺/PCNA⁺ acumuladas en la zona pinzada (asterisco). Barras de escala: A, C: 200 μ m; B: 100 μ m; D: 50 μ m.

RESULTADOS

Tampoco detectamos cambios en los axones $zn8^+$ alrededor de la AC (Figura 83A), cerca de la cual observamos células $pax2^+$ (Figura 83A, B). Estas células extienden sus citoplasmas hasta contactar con la limitante glial en la zona de la arteria central, y sus somas se disponen en el límite retina-CNO (Figura 83A). Encontramos un gran marcaje de axones $zn8$ en el NO (Figura 83C), especialmente en la zona de la lesión, donde se acumularon numerosos haces $zn8^+$ en las zonas anterior y posterior del pinzamiento (Figura 83C, D). También detectamos una gran acumulación de células $pax2^+$ a ambos lados de la lesión (Figura 83C, D), que a mayor aumento se mostraron en estrecho contacto con los axones $zn8^+$ (Figura 83D).

En este grupo experimental hemos descrito anteriormente agrupaciones de células $pax2^+$ en las que se marcaba su citoplasma y podíamos comprobar su

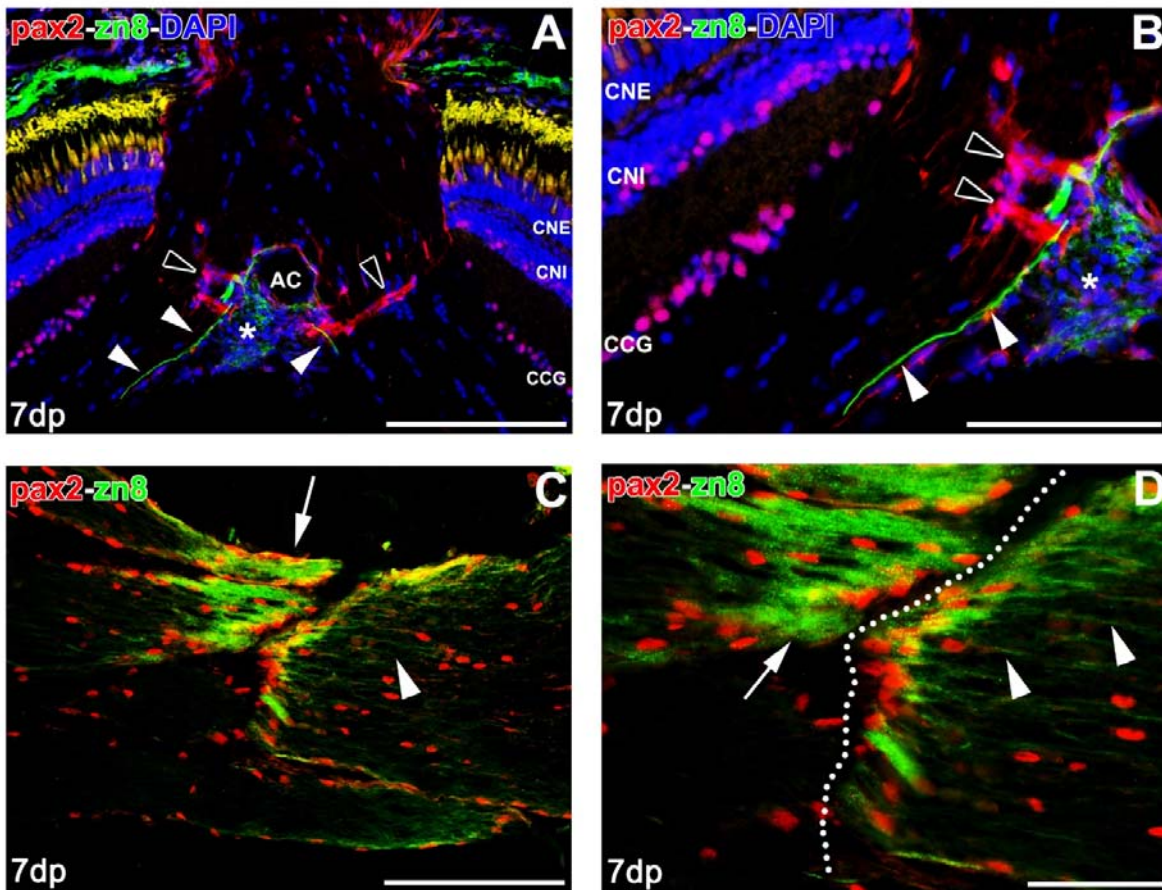


Figura 83. Axones regenerantes $zn8^+$ y células $pax2^+$ a los 7dp. Pocos axones $zn8^+$ en la CNO (A) (puntas de flecha blancas), en contacto con células $pax2^+$ (puntas de flecha negras) en torno a la AC. A mayor aumento (B), marcaje $pax2^+$ en núcleo y citoplasma (puntas de flecha negras). Gran acumulación de axones $zn8^+$ en el NO (C, D), en la zona pinzada (flecha blanca). A mayor aumento (D), células $pax2^+$ intercaladas entre los axones regenerantes (puntas de flecha blancas) en la zona lesionada (flecha blanca). El asterisco (*) indica coágulos de sangre. Barras de escala: A, C: 200 μm ; B: 100 μm ; D: 50 μm .

RESULTADOS

morfología estrellada, delimitando la separación retina-CNO. En la Figura 84A se muestra una CNO donde se observan claramente estas células, con sus procesos extendiéndose desde la limitante glial de la parte más vitreal de la retina hasta contactar con la CNE. Incluso sus citoplasmas parecen estar conectados entre sí. Por otra parte, también se muestra en la Figura 84B la gran concentración de núcleos pax2⁺ alrededor de la zona del pinzamiento en el NO.

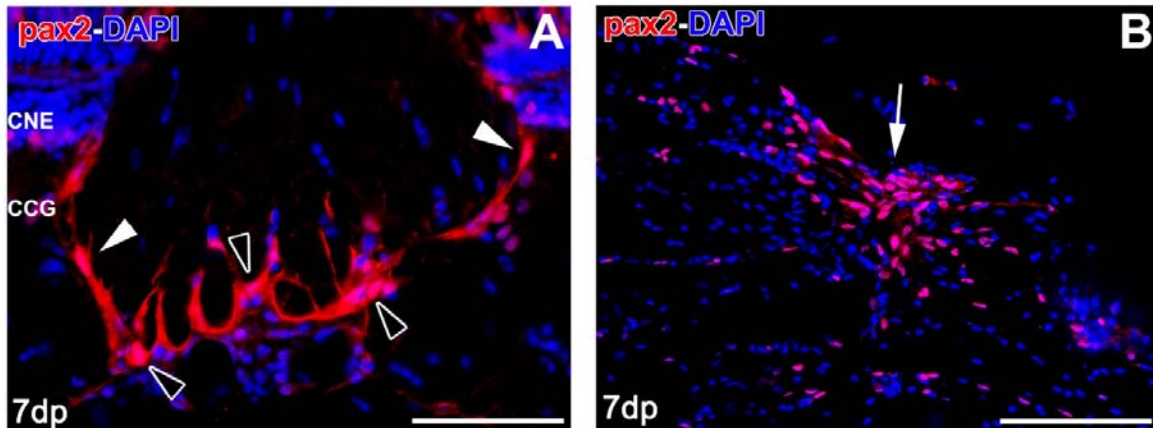


Figura 84. Detalle del marcaje pax2 a los 7dp. En la CNO (**A**), núcleos pax2⁺ (puntas de flecha negras) y marcaje citoplasmático (puntas de flecha blancas) en células separando la retina de la CNO. En el NO (**B**), células pax2⁺ concentradas en la zona pinzada (flecha blanca). Barras de escala: A: 100 μ m; B: 200 μ m.

- 21dp

No encontramos variaciones en la cantidad de células pax2⁺ en la CNO (Figura 80) a los 21dp; pero, por el contrario, seguimos detectando un aumento altamente significativo de las mismas ($p < 0,001$) en el NO (Figura 80).

Uno de los principales cambios observados en este grupo experimental es la expresión, de nuevo, de ck (Figura 85A) tanto en la CNO como en el NO, que había desaparecido a los 7dp (Figura 81D, E). Así, volvimos a observar células pax2⁺/ck⁺ en la CNO (Figura 85A) cerca de la arteria central, así como las presentes en la limitante glial de la transición CNO-NO (Figura 85A, C). Las células pax2⁺ muestran núcleos alargados y de menor tamaño que a los 7dp (Figura 85A). En el NO se detectan nuevamente células pax2⁺/ck⁺ (Figura 85B), tanto en la limitante glial como en el interior del NO. De hecho, la expresión de ck se mostró con mayor intensidad que en el grupo control (Figura 85C), con numerosos filamentos envolviendo a las células pax2⁺, especialmente en la limitante glial (Figura 85C).

RESULTADOS

La expresión de PCNA en el NO disminuye considerablemente (Figura 85D), quedando restringidas las células $pax2^+/PCNA^+$ a las proximidades de la zona

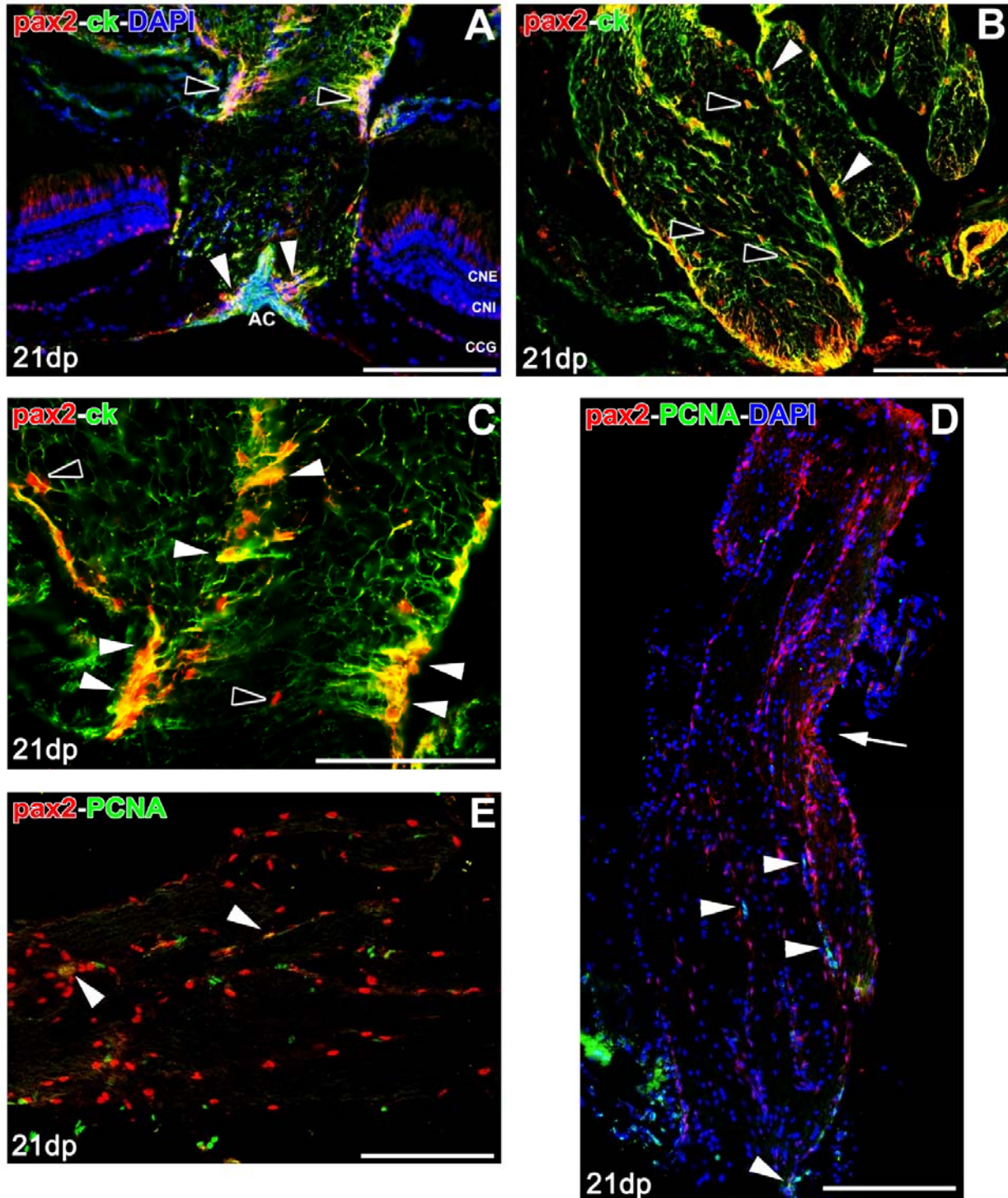


Figura 85. Expresión de ck y PCNA en células $pax2$ a los 21dp. El marcaje ck^+ reapareció en la CNO y transición CNO-NO (A), detectamos células $pax2^+/ck^+$ en ambos sitios (puntas de flecha blancas y negras). Similares resultados en el NO (B), tanto en la limitante (puntas de flecha blancas) como en zonas más interiores (puntas de flecha negras); y en la transición CNO-NO (C). Menos células proliferativas $PCNA^+$ en el NO (D, E), algunas de ellas $pax2^+/PCNA^+$ (puntas de flecha blancas), no concentradas en la zona lesionada (flecha blanca). Barras de escala: A, B, D: 200 μm ; C, E: 100 μm .

RESULTADOS

pinzada (Figura 85E). Los núcleos $pax2^+$ también son de menor tamaño y con morfología ovalada (Figura 85E), observándose todavía grupos de células $pax2^+$ acumuladas cerca de la zona pinzada (Figura 85D), pero sin constituir grupos como lo que observamos a los 7dp.

Detectamos también numerosos axones $zn8^+$ en la CNO (Figura 86A), alrededor de la arteria central. En la retina pudimos distinguir células $pax2^+$ tanto en la CNI como en la CCG (Figura 86B).

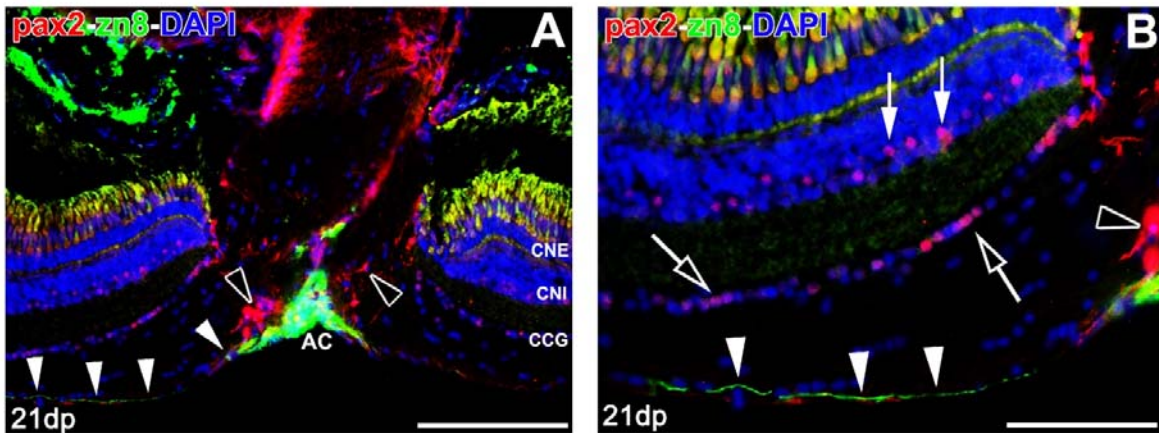


Figura 86. Axones $zn8^+$ y células $pax2$ a los 21dp. Pocos axones $zn8^+$ en la retina y CNO (A, B) (puntas de flecha blancas). Células $pax2^+$ de menor tamaño, con marcaje en citoplasma (puntas de flecha negras). A mayor detalle (B), seguimos detectando marcaje en la CNI (flechas blancas) y en la CCG (flechas negras). Barras de escala: A: 200 μm ; B: 100 μm .

- 60dp

A los 60dp encontramos un aumento altamente significativo ($p < 0,001$) en la cantidad de células $pax2$ (Figura 80) tanto en la CNO como en el NO. El cambio más llamativo corresponde a la CNO ya que en ella no habíamos detectado variaciones en ninguno de los grupos anteriores; por su parte, el NO continúa mostrando todavía diferencias con respecto al control (Figura 80).

En este último grupo experimental encontramos que la expresión de ck parece haber recuperado los niveles mostrados en los controles (Figura 87A, Figura 78A), tanto en la CNO como en el NO (Figura 87A). Las células $pax2^+$ de la CNO muestran núcleos redondeados u ovalados y de tamaño similar a los controles (Figura 87A). Las células más próximas a la arteria central todavía expresan marcaje en su citoplasma (Figura 87B), aunque más tenue que en grupos anteriores. También tenemos que destacar que encontramos marcaje para

RESULTADOS

pax2⁺, aunque débil, únicamente en la CNI de la retina (Figura 87A, B), sin que se aprecie en la CCG.

Al analizar la proliferación celular encontramos pocas células en división en la CNO (Figura 87B), y ninguna de ellas es pax2⁺. No encontramos células PCNA⁺ en zonas del NO (Figura 87B).

Por último, observamos numerosos axones zn8⁺ en la CNO (Figura 87C), alrededor de la arteria central, aunque sin conformar los gruesos haces observados a los 21dp (Figura 86A).

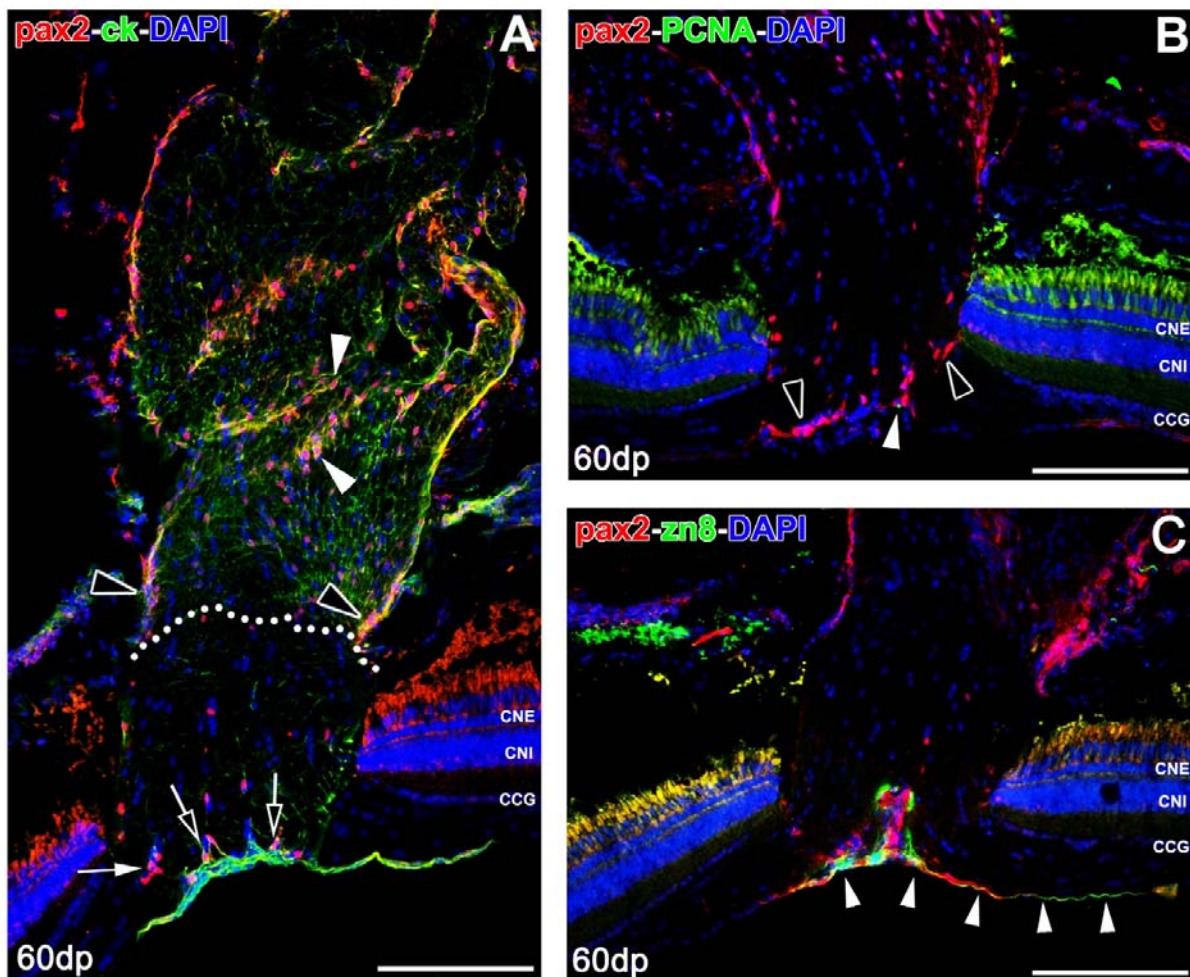


Figura 87. Análisis de ck, PCNA y zn8 a los 60dp. Marcaje pax2⁺/ck⁺ (A) en la CNO (flechas negras), algunas intercaladas entre oligodendrocitos (flecha blanca); en la limitante CNO-NO (puntas de flecha negra) y en el NO (puntas de flecha blanca). Pocas células PCNA⁺ en la CNO (B) (punta de flecha blanca), y el resto pax2⁺ con restos de marcaje citoplasmático (puntas de flecha negra). Axones zn8⁺ en la retina y CNO (C) (puntas de flecha blanca), de aspecto similar a los controles. Barras de escala: A-C: 200 μm.

RESULTADOS

2. Caracterización inmunocitoquímica en animales transgénicos

Una vez caracterizadas las poblaciones de oligodendrocitos y células astrogliales mediante técnicas inmunohistoquímicas, y dado que hemos utilizado anticuerpos comerciales anti sox10 y olig2 de los que no existían datos previos en la bibliografía, recurrimos a distintos animales transgénicos (detallados en Material y Métodos) a los que realizamos las mismas tinciones inmunohistoquímicas para comprobar la especificidad de las mismas, además de poder realizar dobles marcajes que, debido a la naturaleza de los anticuerpos, no podíamos llevar a cabo en los animales silvestres.

Casi todos los experimentos realizados con animales transgénicos adultos fueron realizados durante la estancia realizada en el laboratorio del profesor Bruce Appel, en la *University of Colorado Denver*, en Denver, CO (EE.UU.).

Para analizar estos resultados, los hemos agrupado según el modelo transgénico utilizado.

- **olig2:GFP**

Para comprobar que nuestros anticuerpos para sox10 y olig2 reconocían correctamente los oligodendrocitos del sistema visual, utilizamos un transgénico usado ampliamente para el estudio de los oligodendrocitos en el pez cebra. Esta construcción, Tg(olig2:GFP), determina la expresión de GFP bajo el promotor de olig2. Su uso ha sido probado y respaldado en numerosos estudios, y se trata del transgénico de elección en estudios de especificación y diferenciación de oligodendrocitos en desarrollo.

Realizamos distintas preparaciones para determinar el grado de expresión de la construcción en los individuos adultos. Así, hicimos preparaciones de retinas *in toto* (Figura. 88A, B, D), en las que pudimos observar células GFP⁺ por toda la superficie de la retina, de la ZPG a la CNO (Figura. 88A), mostrando un incremento hacia la retina central. Este marcaje no sólo se expresa en el citoplasma rodeando a los núcleos, sino que se extiende por las ramificaciones de los oligodendrocitos (Figura. 88B, D). Al estudiarlos a mayor aumento, pudimos distinguir las características filamentosas que habíamos descrito previamente (Figura. 88B), y la gran complejidad de las ramificaciones de estas células (Figura. 88D), que se extienden como una red por toda la CFNO, y parecen

interrelacionar distintos grupos de oligodendrocitos (Figura. 88C, D). En secciones obtenidas con el criostato, comprobamos la expresión de GFP en la

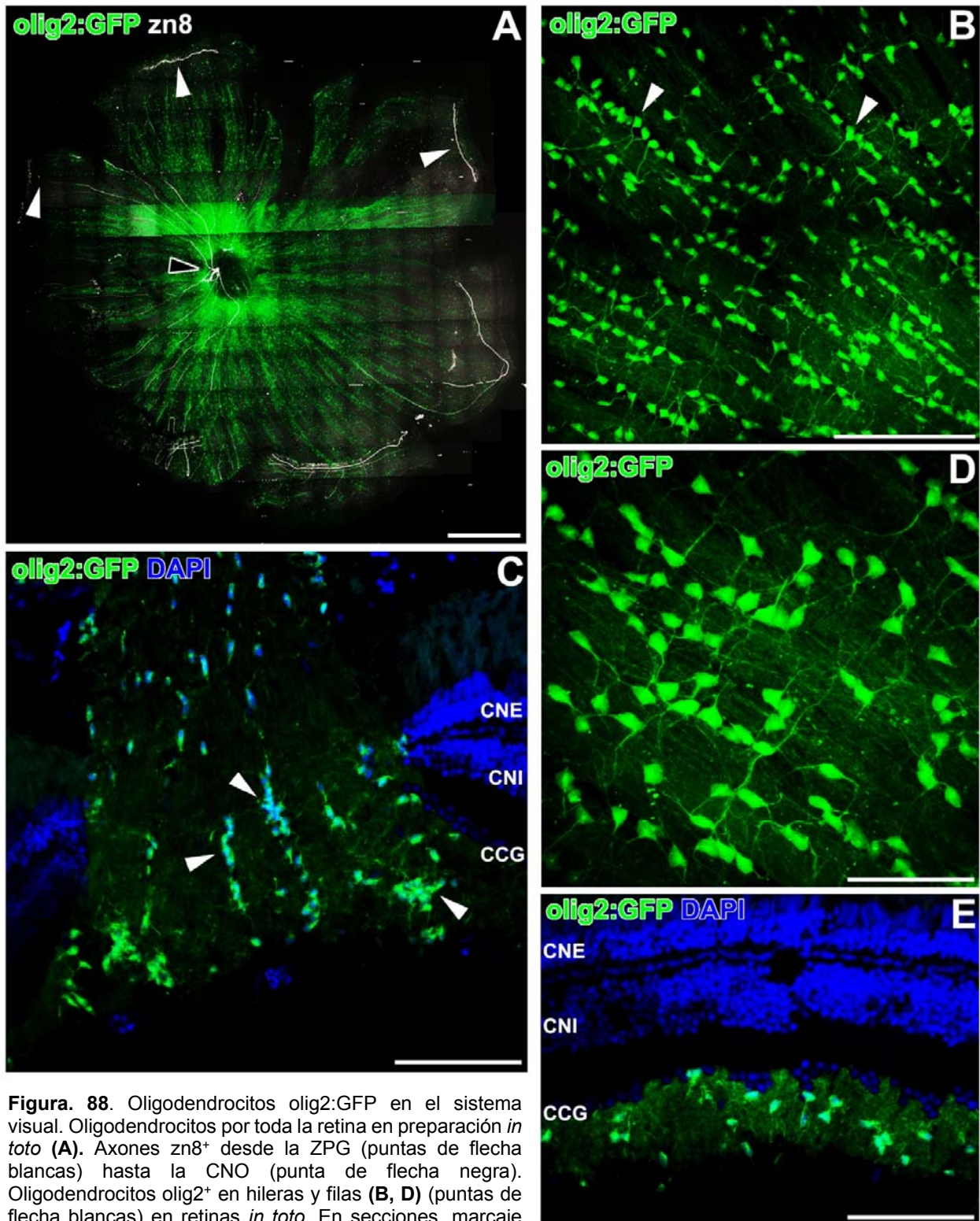


Figura. 88. Oligodendrocitos olig2:GFP en el sistema visual. Oligodendrocitos por toda la retina en preparación *in toto* (A). Axones zn8⁺ desde la ZPG (puntas de flecha blancas) hasta la CNO (punta de flecha negra). Oligodendrocitos olig2⁺ en hileras y filas (B, D) (puntas de flecha blancas) en retinas *in toto*. En secciones, marcaje similar en la CNO (puntas de flecha blancas) (C) y en la retina (E). Barras de escala: A: 500 μ m; B, C, E: 100 μ m; D: 50 μ m.

RESULTADOS

retina (Figura. 88E), observamos que los oligodendrocitos GFP⁺ se disponen por toda la CCG, ocupando con sus procesos la CFNO (Figura. 88E). Al examinar la CNO y el NO (Figura. 88C) detectamos grupos y filas de oligodendrocitos GFP⁺ como los descritos en las preparaciones *in toto*.

Realizamos a continuación técnicas inmunohistoquímicas para comprobar la expresión de *sox10* en los animales *olig2:GFP* (Figura 89) y encontramos que todas las células GFP⁺ eran también *sox10*⁺ en la retina (Figura 89B), la CNO

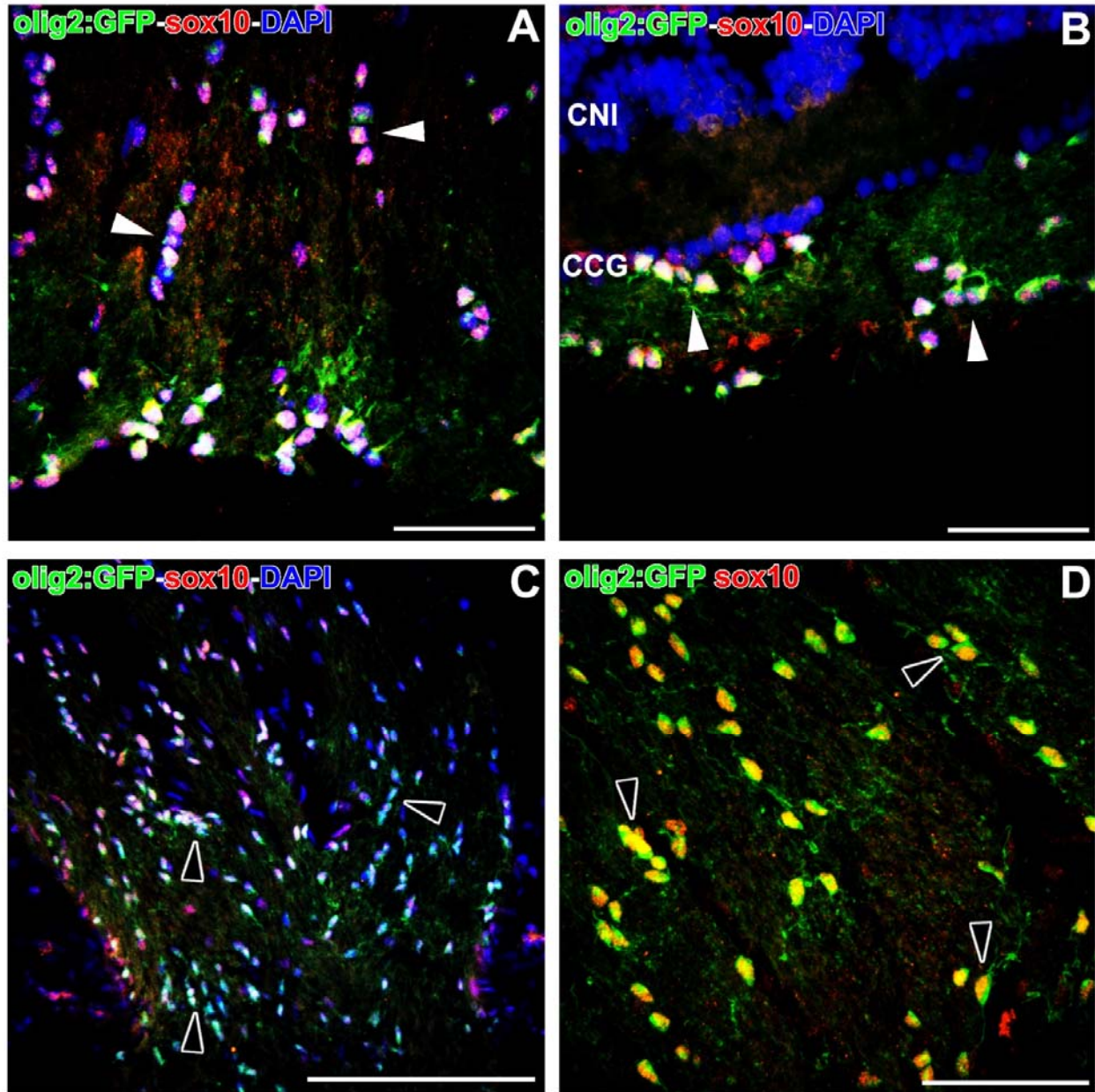


Figura 89. Marcaje *sox10* en animales *olig2:GFP*. Colocalización de oligodendrocitos *olig2*⁺/*sox10*⁺ (puntas de flecha blancas) en la CNO (A) y en la retina (B). Resultados similares en el NO (C, D), con dobles marcajes *olig2*⁺/*sox10*⁺ (puntas de flecha negras). Barras de escala: A, B: 50 μ m; C: 200 μ m; D: 100 μ m.

RESULTADOS

(Figura 89A) y el NO (Figura 89C, D). Observamos que el marcaje para *sox10* se restringe al núcleo, mientras que el marcaje de GFP se extiende por el citoplasma y las prolongaciones de los oligodendrocitos (Figura 89B, D). También pudimos distinguir cómo el marcaje de la GFP se extiende por el citoplasma de los oligodendrocitos hasta la indentación nuclear que hemos descrito anteriormente (Figura 89D).

A continuación analizamos la expresión de GS (Figura 90) en los ejemplares *olig2:GFP*. En la CNO detectamos oligodendrocitos *GFP*⁺ en contacto con los procesos vitreales *GS*⁺ de las células de Müller (Figura 90A), aunque al

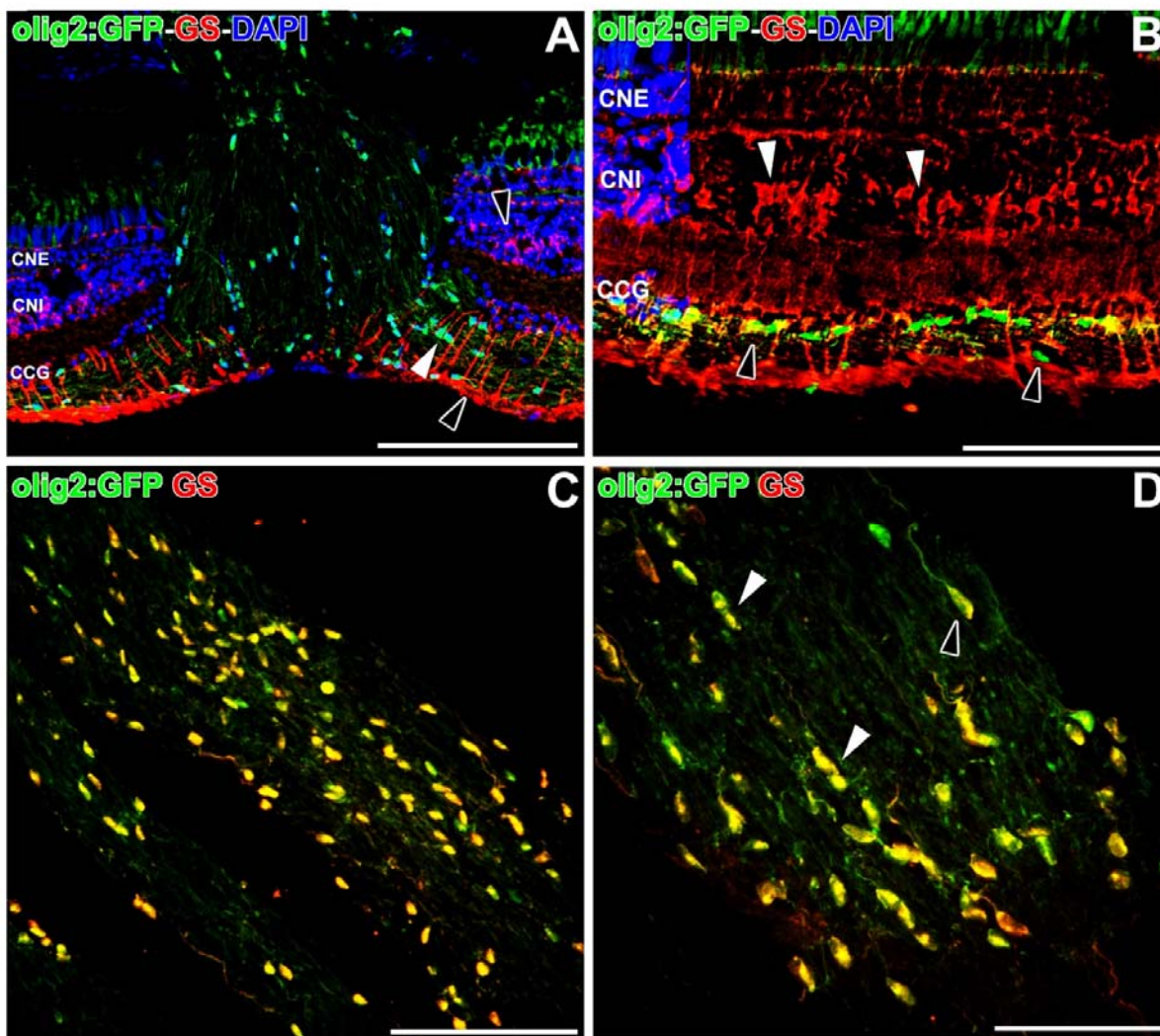


Figura 90. Dobles marcajes *olig2:GFP* y *GS*. **(A)** Los procesos *GS*⁺ de las células de Müller (puntas de flecha negras) engloban a los oligodendrocitos *olig2*⁺ (punta de flecha blanca). Aspecto similar a mayor aumento **(B)**. Pies *GS*⁺ de las células de Müller (puntas de flecha blancas) englobando a las células *olig2*⁺ (puntas de flecha negras). En el NO **(C, D)**, dobles marcajes *olig2*⁺/*GS*⁺ (puntas de flecha blancas). Marcaje *olig2*⁺ y *GS*⁺ incluso en las indentaciones nucleares de los oligodendrocitos (punta de flecha negra). Barras de escala: A: 200 μ m; B, C: 100 μ m; D: 50 μ m.

RESULTADOS

observarlos a mayor aumento en la retina (Figura 90B) no conseguimos distinguir con claridad si existe un doble marcaje GFP^+/GS^+ o si los procesos GS^+ de las células de Müller envuelven a los oligodendrocitos (Figura 90B). Por el contrario, al observar el NO encontramos claramente células que coexpresan GFP y GS (Figura 90C, D), pudiendo encontrar dicha colocalización incluso en las indentaciones nucleares (Figura 90D). También detectamos este doble marcaje en parte de las prolongaciones de los oligodendrocitos (Figura 90C, D), aunque la señal de la GFP se extendía en mayor cantidad respecto a la GS (Figura 90D).

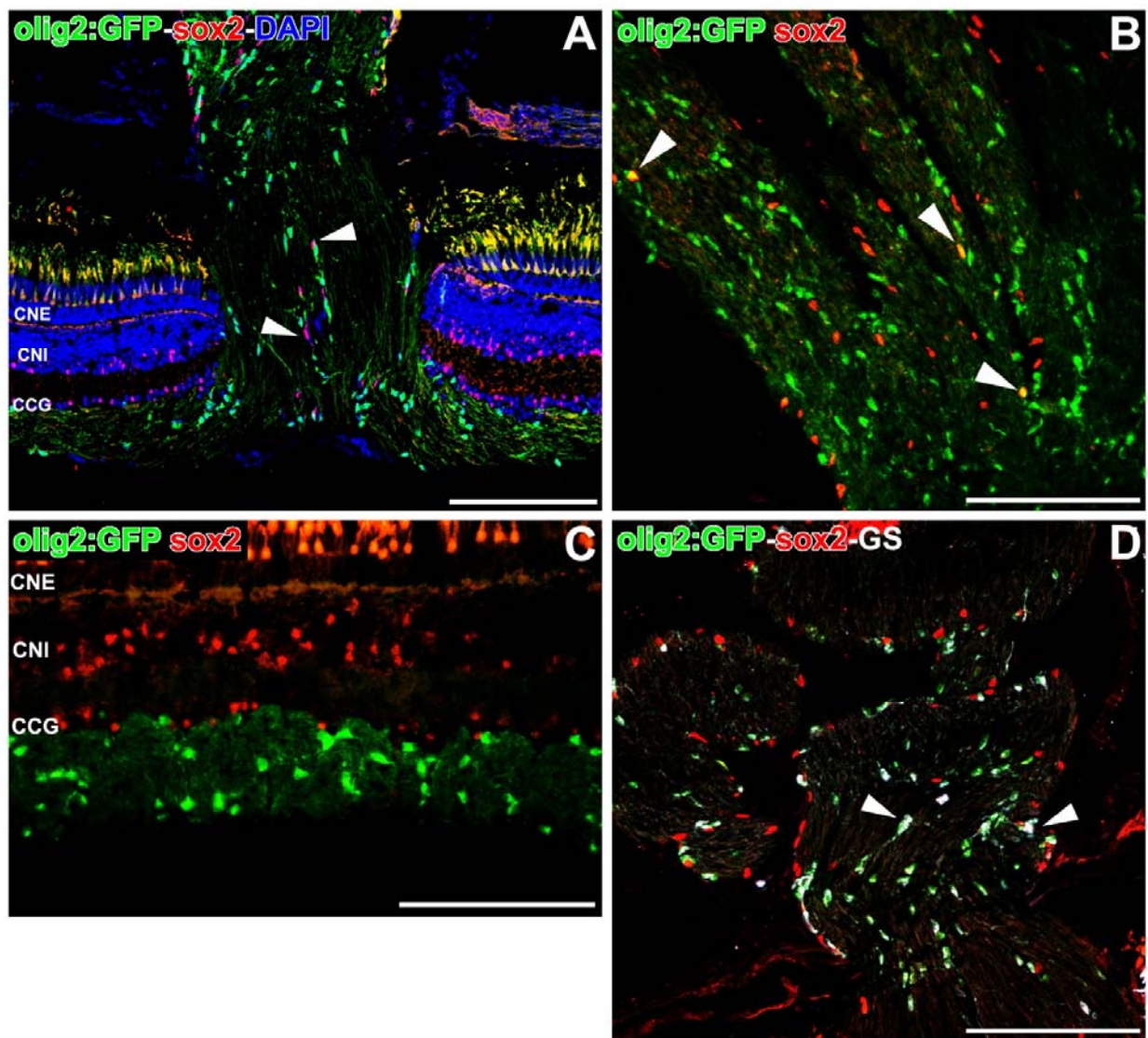


Figura 91. Inmunorreactividad para *sox2* en animales *olig2:GFP*. No se detectan dobles marcajes (puntas de flecha blancas) en la retina y CNO (**A**), aunque detectamos pocas células $olig2^+/sox2^+$ en el NO (**B**) (puntas de flecha blancas). En la retina, el marcaje *olig2* y *sox2* no se solapa (**C**). En triples marcajes *olig2/sox2/GS* (**D**) detectamos oligodendrocitos $olig2^+/GS^+$ y células $sox2^+$. Barras de escala: A, B, D: 200 μm ; C: 100 μm .

Al analizar la expresión de *sox2* en la retina no observamos ninguna célula doblemente marcada; y todas las células *sox2*⁺ se sitúan en la CNI y en la CCG (Figura 91C) mientras que las GFP⁺ lo hacen en la CCG y en la CFNO. En la CNO (Figura 91A), no encontramos ninguna célula doblemente marcada con GFP, aunque algunas de las células *sox2*⁺ se disponen intercaladas en filas de oligodendrocitos GFP⁺ (Figura 91A). Por el contrario, en el NO detectamos alguna célula *sox2*⁺/GFP⁺ (Figura 91B), aunque la casi totalidad de las células *sox2* no presentaban doble marcaje. Así, en una doble inmunohistoquímica para *sox2* y GS (Figura 91D), pudimos comprobar que la mayoría de los oligodendrocitos GFP⁺/GS⁺ no expresaban *sox2* (Figura 91D), aunque estas células se hallaban en estrecho contacto con los oligodendrocitos (Figura 91D).

Por último, realizamos inmunohistoquímicas contra *olig2*, *pax2* y *ck* (Figura 92), donde detectamos nuestro anticuerpo anti-*olig2* en los oligodendrocitos *olig2*:GFP (Figura 92A), formando sus característicos grupos. Encontramos también una estrecha relación entre los procesos *ck*⁺ y los oligodendrocitos GFP⁺ en la CNO (Figura 92C) especialmente en la limitante glial del NO y en la transición CNO-NO (Figura 92C), en contraposición a zonas más internas del NO (Figura 92C). Finalmente, el estudio de la expresión de *pax2* reveló la ausencia de dobles marcajes con GFP en la CNO (Figura 92B), aunque sí detectamos células *pax2*⁺ entre oligodendrocitos GFP⁺ (Figura 92B). Esta disposición la localizamos con mucha más frecuencia en el NO (Figura 92D), y también la observamos mucho más en detalle en la limitante glial de la transición CNO-NO (Figura 92E), aunque no encontramos colocalizaciones claras ni en esta zona ni en el resto del NO (Figura 92D).

RESULTADOS

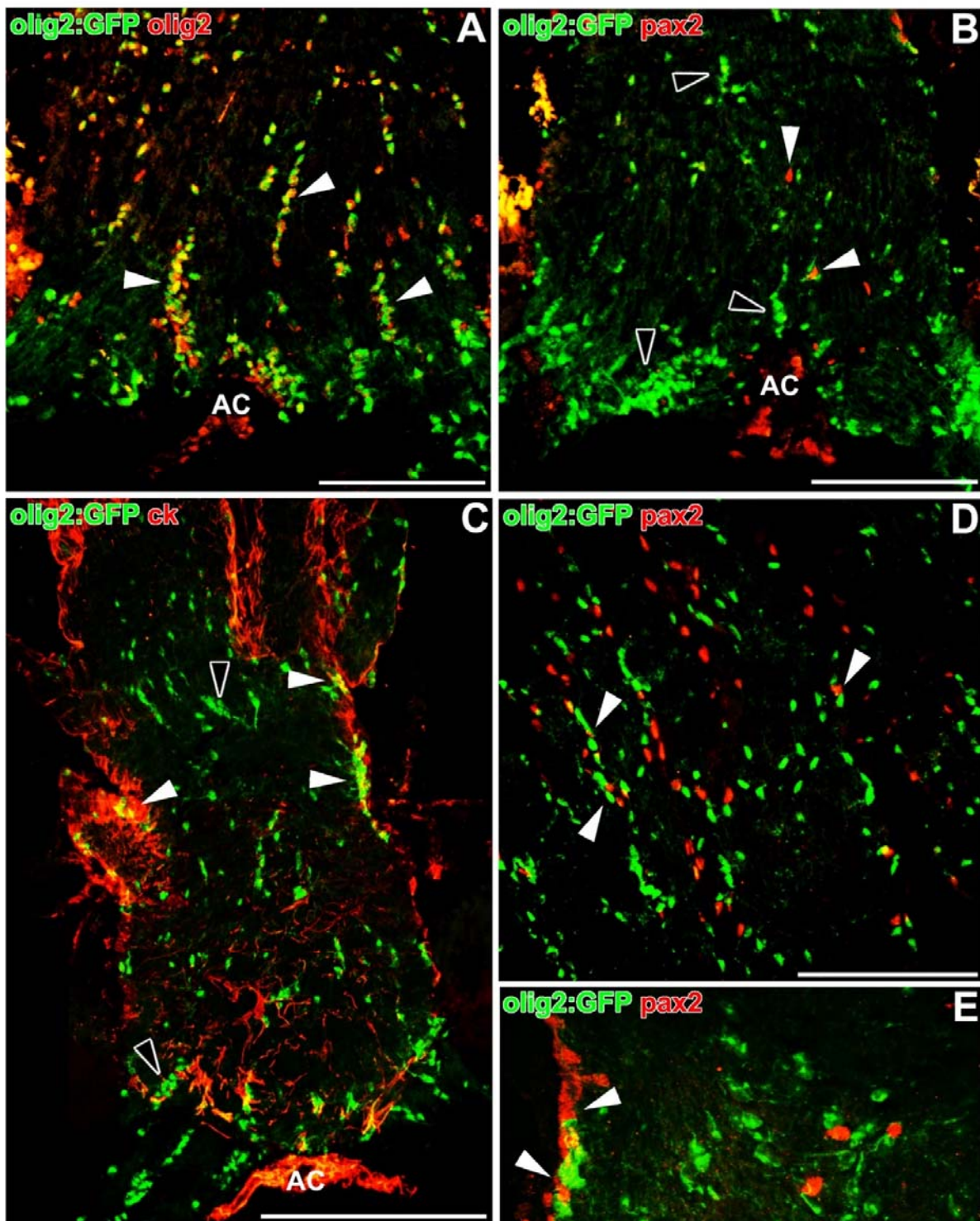


Figura 92. Animales olig2:GFP con distintos marcadores. Dobles colocalizaciones olig2:GFP con el anticuerpo anti-olig2 (puntas de flecha blancas) en la CNO (**A**). Ausencia de dobles marcajes olig2⁺ y pax2⁺ en la CNO (**B**), NO (**D**), y la limitante glial (**E**); células pax2⁺ (puntas de flecha blancas) intercaladas entre oligodendrocitos olig2⁺ (puntas de flecha negras). Marcaje ck⁺ (**C**) intercalado (puntas de flecha blancas) con oligodendrocitos olig2 (puntas de flecha negras). Barras de escala: A, B, D: 100 μ m; C: 200 μ m; E: 50 μ m.

olig2:GFP mbpa:RFP

Utilizamos también ejemplares dobles transgénicos Tg(olig2:GFP mbpa:tagRFP), que expresaban tanto GFP bajo el promotor de olig2 como RFP bajo el promotor de la mbpa. Al analizar estos ejemplares encontramos que no todos los oligodendrocitos GFP⁺ son también RFP⁺ (Figura 93). De hecho, el número de oligodendrocitos GFP⁺/RFP⁺ es mucho menor en la CNO (Figura 93A,

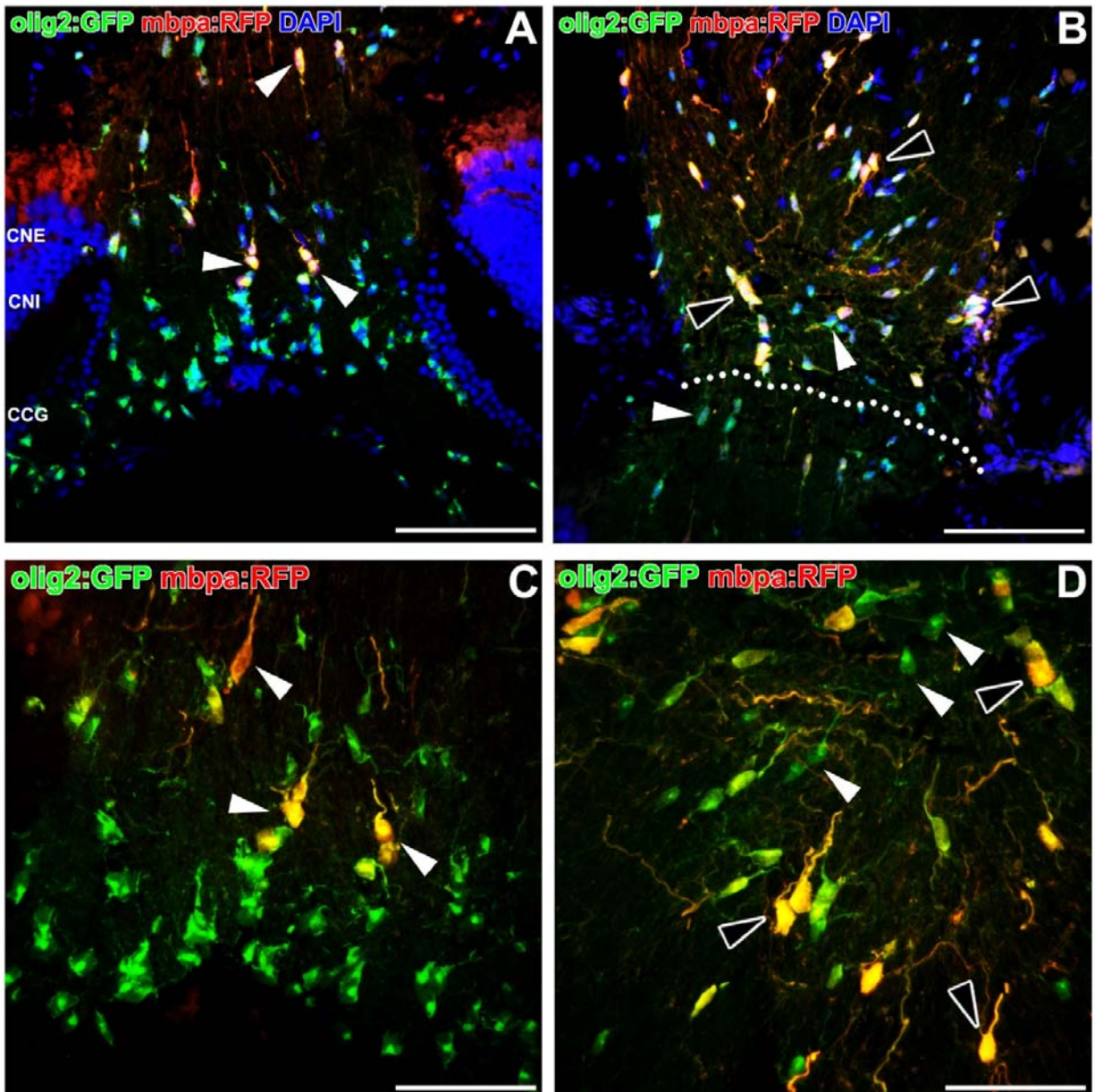


Figura 93. Oligodendrocitos olig2:GFP-mbpa:RFP en el sistema visual. Escasos dobles marcajes olig2⁺/mbpa⁺ en la CNO (A) (puntas de flecha blancas). Similares resultados en el NO (B) (puntas de flecha negras), con oligodendrocitos únicamente olig2 (puntas de flecha blancas). A mayor aumento, se marcan tanto los procesos como somas en la CNO (C) (puntas de flecha blancas) como en el NO (D) (puntas de flecha negras), distinguiéndose de los olig2⁺/mbp⁻ (puntas de flecha blancas). Barras de escala: A, B: 100 μ m; C, D: 50 μ m.

RESULTADOS

C) que en el NO (Figura 93B, D). Así, en la CNO detectamos pocas células doblemente marcadas, en las que la colocalización se extiende por su citoplasma y por parte de sus prolongaciones (Figura 93C), mientras que a partir de la zona de transición CNO-NO (Figura 93B) encontramos más células GFP⁺/RFP⁺, cuyos procesos también muestran el doble marcaje (Figura 93D). Además, tenemos que destacar que estos oligodendrocitos olig2⁺/mbpa⁺ se disponen en la CNO y NO tanto formando parte de filas de oligodendrocitos olig2⁺ como aislados de ellas (Figura 93C, D).

- **gfap:GFP**

Por último, utilizamos ejemplares Tg(gfap:GFP), en los que la expresión de la GFP se produce bajo el promotor de la GFAP. Este transgénico nos ha servido para poder analizar más en profundidad las poblaciones astrogliales en la vía visual.

Así, detectamos en la retina de los ejemplares transgénicos células de Müller intensamente marcadas con GFP (Figura 94A). Este marcaje GFP⁺ se extiende desde su soma hasta sus prolongaciones, llegando hasta las más esclerales y vitreales (Figura 94A). Al realizar una inmunohistoquímica para GS, observamos colocalización entre las células de Müller GFP⁺ y la GS (Figura 94C), mostrando tanto su soma rodeado por la GS como colocalización de ambas señales en las prolongaciones de estas células (Figura 94C), y de forma más intensa en sus procesos vitreales.

En el NO, detectamos también células GFP⁺ únicamente en la limitante glial de la transición CNO-NO (Figura 94B, C). Al examinar la expresión de ck, estas células GFP⁺, que no hemos encontrado en ninguna otra parte del NO, presentaron un fuerte marcaje ck⁺ (Figura 94B). En cambio, no encontramos expresión de GS en estas células GFP⁺ (Figura 94D), aunque aparecen en estrecha relación con las GS⁺ existentes.

En las inmunohistoquímicas de pax2 (Figura 95A) también detectamos células pax2⁺/GFP⁺ en la limitante glial (Figura 95A), además de otras células pax2⁺ tanto en la CNO como en el NO en las que no localizamos la señal de la GFP. Finalmente, detectamos células sox2⁺ en la retina (Figura 95C), colocalizando algunas de ellas con los núcleos GFP⁺ de las células de Müller (Figura 95C).

RESULTADOS

Además, encontramos células $sox2^+/GFP^+$ en la limitante glial de la transición CNO-NO (Figura 95B, D). Como en el caso de $pax2$, estas fueron las únicas células marcadas doblemente con GFP, observándose otras células $sox2^+/GFP^-$ dispersas por la CNO y NO (Figura 95B, D).

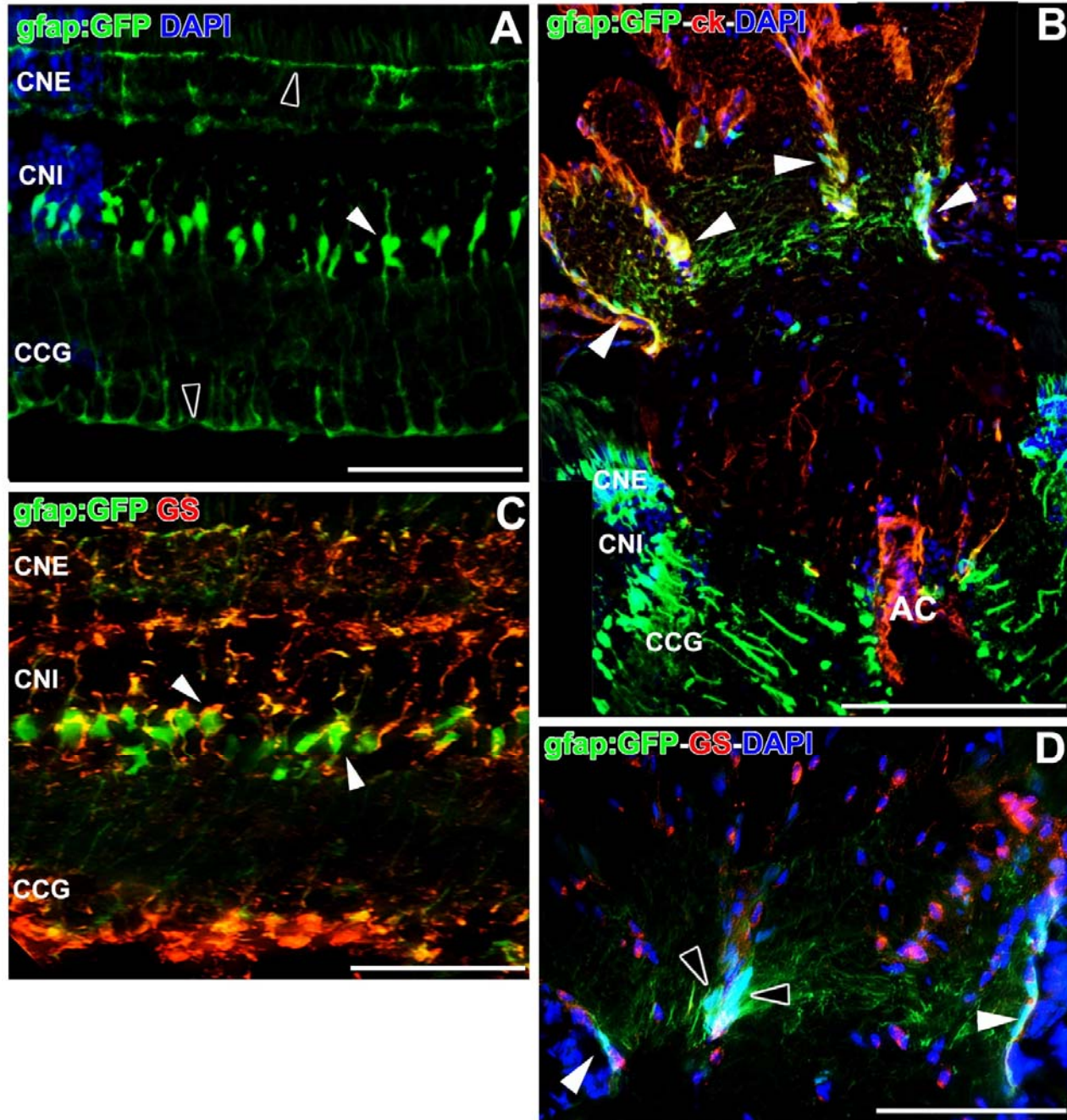


Figura 94. Dobles marcajes ck/GS en animales $gfap:GFP$. Células de Müller $gfap:GFP$ en la retina (A). Se marca su soma (punta de flecha blanca) y procesos vitreales y esclerales (puntas de flecha negras). Colocalización $gfap^+/ck^+$ únicamente en la limitante glial del límite CNO-NO (B) (puntas de flecha blancas). Células de Müller $gfap^+/GS^+$ en la retina (C) (puntas de flecha blancas). Ausencia de colocalización $gfap/GS$ en la limitante glial (D) (puntas de flechas blancas). Se distinguen células $gfap:GFP$ (puntas de flecha negras), a veces intercaladas con células GS^+ . Barras de escala: A, C, D: 100 μm ; B: 200 μm .

RESULTADOS

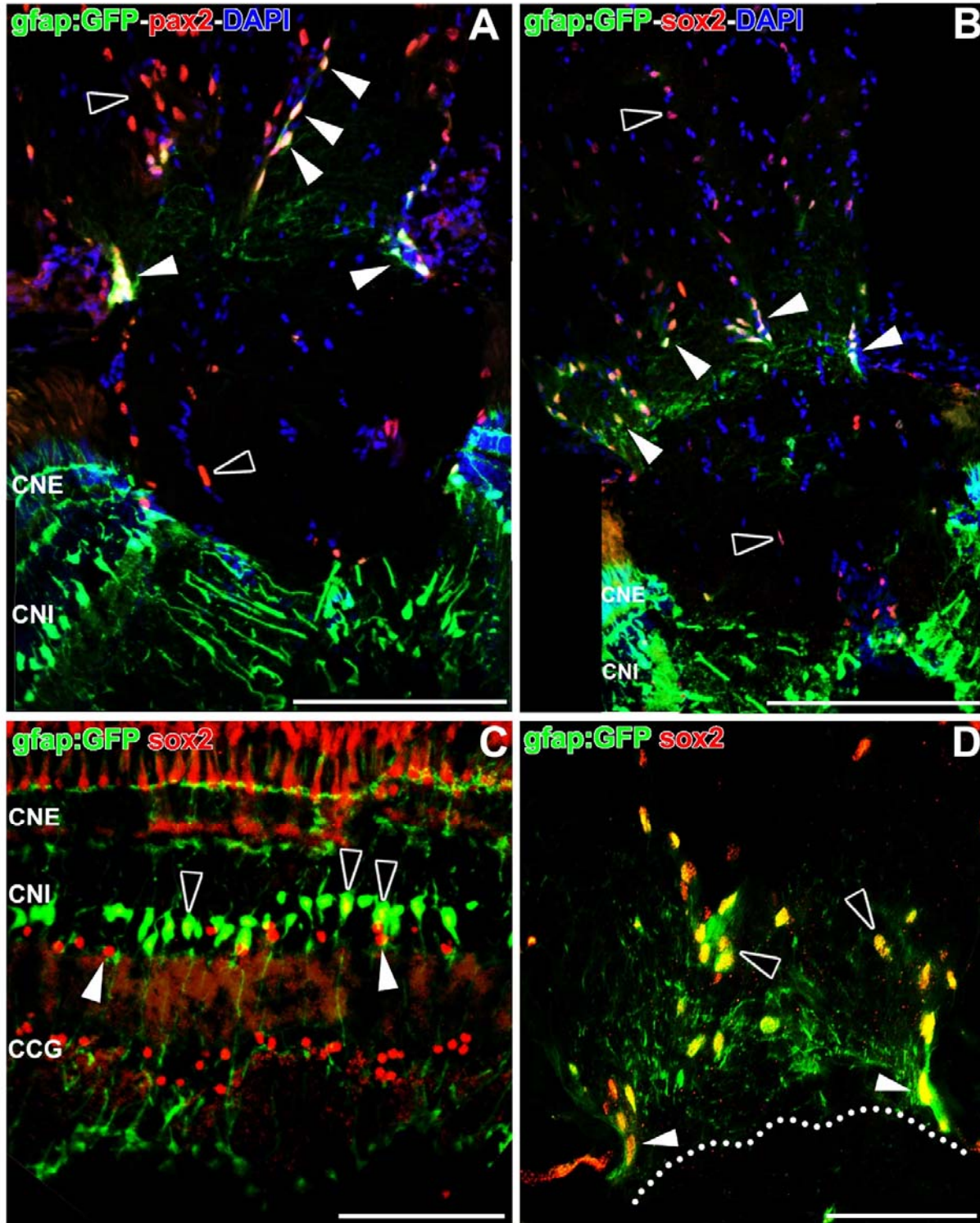


Figura 95. Inmunorreactividad pax2/sox2 en animales gfap:GFP. Dobles marcajes gfap⁺/pax2⁺ en la limitante glial en la transición CNO-NO (**A**) (puntas de flecha blancas). Células pax2⁺ simples (puntas de flecha negras). Del mismo modo, células gfap⁺/sox2⁺ en la limitante glial (**B**) (puntas de flecha blancas), además de células únicamente sox2⁺ (puntas de flecha negras). Células de Müller gfap⁺/sox2⁺ en la retina (**C**) (puntas de flecha negras). Células amacrininas sox2⁺ (puntas de flecha blancas). Transición CNO-NO a mayor aumento (**D**) (línea de puntos). Células dobles gfap⁺/sox2⁺ de la limitante glial (puntas de flecha blancas), también en zonas más internas del NO (puntas de flecha negras). Barras de escala: A, B: 200 μ m; C, D: 100 μ m.

RESULTADOS

Por último, también estudiamos la expresión de *sox10* (Figura 96) en nuestros ejemplares *gfap:GFP*. En ellos encontramos células *sox10*⁺ tanto en la retina como en la CNO y en el NO (Figura 96A). En la retina no detectamos dobles marcajes con GFP, pero pudimos observar los procesos vitreales GFP⁺ de las células de Müller interaccionando con los oligodendrocitos *sox10* (Figura 96B). Además, al igual que en el caso de la GS no encontramos dobles marcajes *sox10* y GFP en la limitante glial (Figura 96A), aunque sí que pudimos distinguir células *sox10*⁺ intercaladas entre las GFP⁺ (Figura 96A).

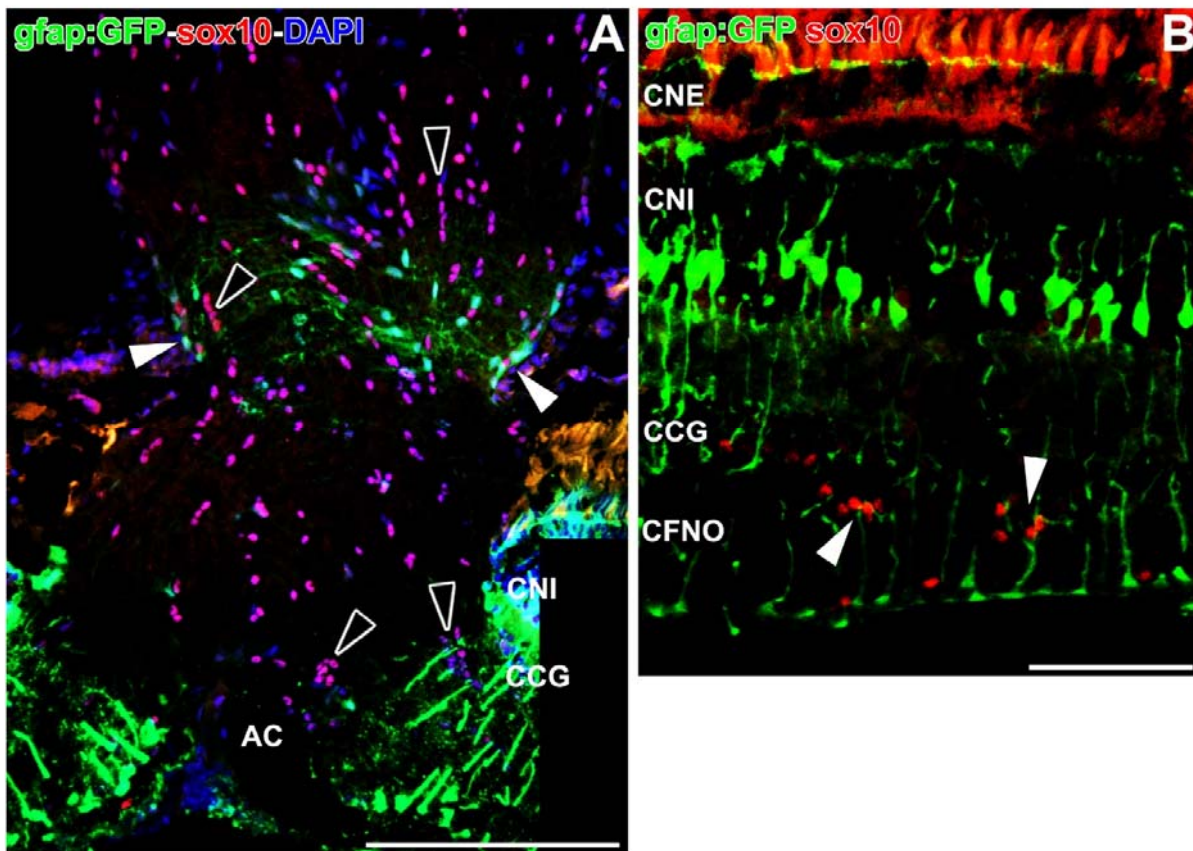


Figura 96. Marcaje *sox10* en animales *gfap:GFP*. Ausencia de colocalización *sox10* y *gfap* en la CNO y NO (A). Oligodendrocitos *sox10*⁺ (puntas de flecha negras) y células *gfap*⁺ (puntas de flecha blancas). En la retina (B), oligodendrocitos *sox10*⁺ (puntas de flecha blancas) en la CCG y CFNO. Barras de escala: A: 200 μ m; B: 50 μ m.

En resumen, hemos observado que la población de células *gfap:GFP* de la limitante glial también coexpresa *ck* (Figura 94B), *sox2* (Figura 95B, D) y *pax2* (Figura 95A), como hemos visto en sus correspondientes dobles inmunohistoquímicas, mientras que no expresaban ni GS (Figura 94D) ni *sox10* (Figura 96A).

RESULTADOS

3. Análisis de expresión génica mediante qPCR

Además de la cuantificación celular en secciones de tejido, quisimos valorar los posibles cambios en la expresión de distintos genes, tanto en los animales con NOs pinzados como en sus correspondientes retinas. Mediante qPCR hemos analizado los genes:

- implicados en el mantenimiento del linaje de oligodendrocitos (*sox10*, *olig2*),
- de la expresión de mielina (*mbpa*, *mpz*),
- de progenitores (*sox2*) y
- de tres parálogos de la glutamina sintetasa (*glula*, *glulb*, *glulc*).

En líneas generales, se observa un comportamiento opuesto entre los resultados en retina y NO. Así, mientras que en la retina tras el pinzamiento se produce una disminución en la expresión de todos los genes estudiados, en el NO la tendencia es a un incremento en la expresión tras una bajada en los primeros días de lesión.

Respecto a la expresión en la retina (Figura 97), los genes implicados en el establecimiento y mantenimiento del linaje de oligodendrocitos, *sox10* y *olig2*, se produce una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) desde los 2dp hasta los 7dp con respecto a los valores control. Sin embargo, a los 21dp no se observaron diferencias en los valores de expresión relativa de ambos respecto a sus controles. Resultados similares se obtuvieron en el caso de *sox2*, con valores que disminuyen desde los 2dp a los 7dp pero no mostrando diferencias a los 21dp (Figura 97).

Los resultados de la expresión de *mbpa* y *mpz* muestran también una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) desde los 2dp hasta los 7dp (Figura 97). Dicha disminución continuó siendo altamente significativa a los 21dp en el caso de *mpz*, aunque en el caso de *mbpa* la disminución pasó a ser muy significativa ($p < 0,01$).

Por último, la expresión de los tres parálogos de la GS se comportó de manera similar a lo largo del tiempo tras el pinzamiento: los valores de expresión de todos ellos disminuyen de forma muy o altamente significativa desde los 2dp y hasta los 7dp (Figura 97). Sin embargo, los valores de *glula* y *glulb* continuaron mostrando una disminución a los 21dp ($p < 0,05$ y $0,001$ respectivamente), mientras que *glulc* no mostró diferencias significativas en ese punto con respecto

a los valores control. Además, cabe destacar que mientras que los valores medios de *glula* no variaron excesivamente de 2dp a 7dp, los valores medios de

RETINA

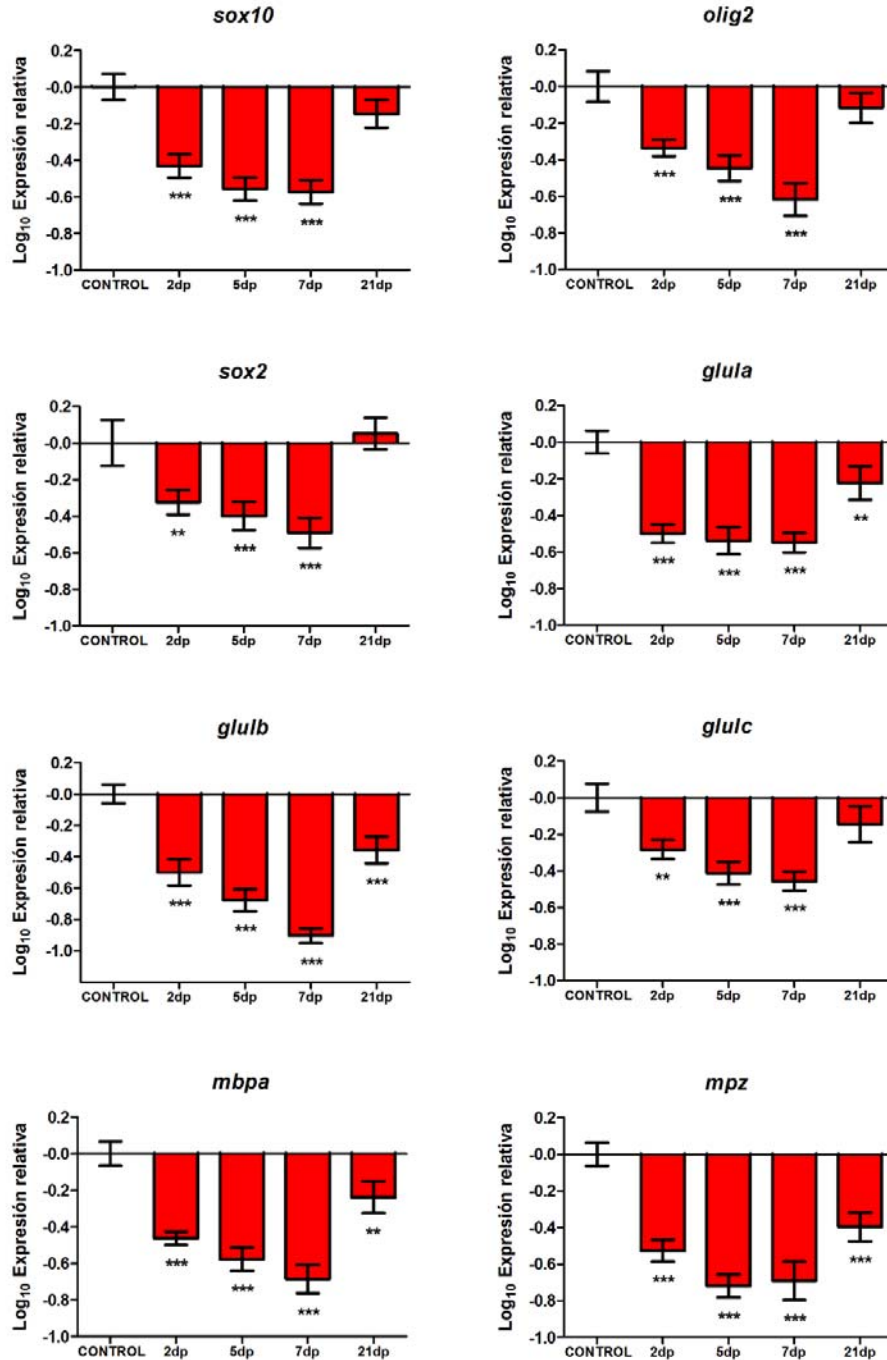


Figura 97. Análisis de la expresión génica en la retina de animales control y pinzados. La escala empleada es logarítmica. Las diferencias tras un análisis ANOVA y un post test de Dunnett son mostradas como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar.

RESULTADOS

glulb fueron bajando escalonadamente hasta que a los 7dp mostraron la disminución más importante de todos los genes y puntos estudiados en la retina (Figura 97). Por su parte, *glulc* no disminuyó de forma tan notoria como sus otros parálogos aunque la disminución fue también significativa.

Los resultados obtenidos en la expresión génica en el NO (Figura 98) muestran una mayor variabilidad. En general, se aprecia una disminución en los primeros días tras el pinzamiento seguida de un aumento, en algunos casos extraordinario, en los días posteriores. En el caso de *sox10*, a los 2dp se produce una disminución significativa ($p < 0,05$) en los valores de su expresión relativa (Figura 98). A continuación, sus valores aumentan respecto a los controles, siendo la diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) hasta los 21dp. En el caso de *olig2*, no observamos ninguna diferencia en los valores de su expresión relativa hasta los 7dp, momento en el que aumentó significativamente su expresión ($p < 0,05$). Estos valores pasaron a ser altamente significativos ($p < 0,001$) a los 21dp (Figura 98).

La expresión de *sox2* en el NO disminuye a los 2dp ($p < 0,001$), pero a partir de ese momento sus valores aumentan progresivamente de forma casi exponencial, siendo este aumento altamente significativo ($p < 0,001$) desde los 7dp. Los valores de expresión a los 21dp llegaron incluso a ser 200 veces mayores que en la situación control. Este hecho deja a *sox2* como el gen que más varía su expresión de entre los estudiados en el NO (Figura 98).

Respecto a *mbpa* y *mpz*, ambos presentaron valores que disminuyen de forma altamente significativa ($p < 0,001$) desde los 2dp y hasta los 5dp. A partir de los 7dp, se produce un cambio en la tendencia y ambos aumentan su expresión con respecto a sus valores control ($p < 0,001$). Sin embargo, no se observaron diferencias en los valores de expresión de *mbpa* a los 21dp mientras que *mpz* mostró un nivel estadísticamente menor de expresión respecto a la situación control ($p < 0,05$) (Figura 98).

RESULTADOS

Por último, los tres parálogos de la GS presentan cada uno de ellos un comportamiento distinto a lo largo de los distintos tiempos estudiados. Así, *glula* disminuyó su expresión ya a los 2dp ($p < 0,01$), manteniéndose por debajo de los

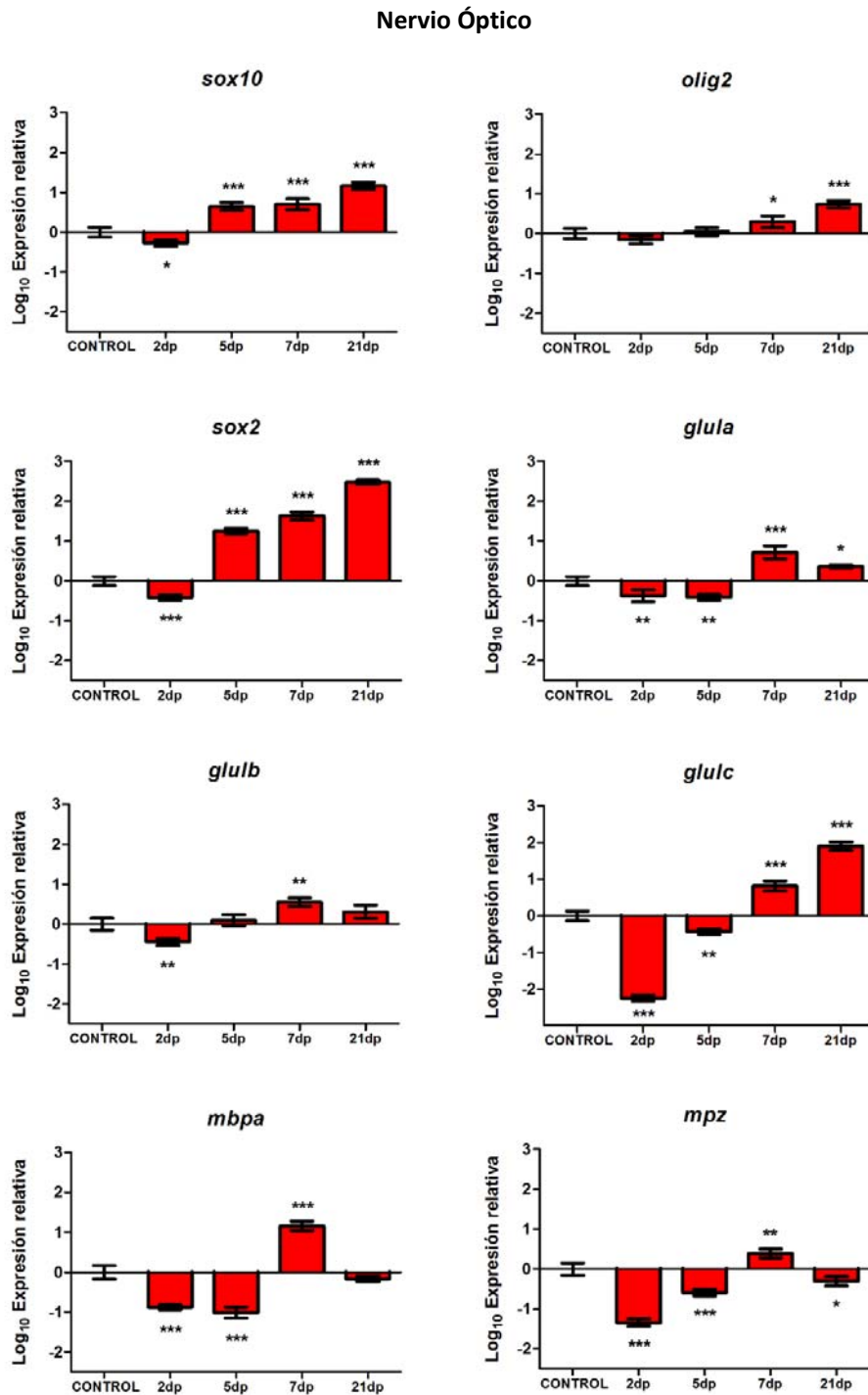


Figura 98. Análisis de la expresión génica en el nervio óptico de animales control y pinzados. La escala empleada es logarítmica. Las diferencias tras un análisis ANOVA y un post test de Dunnett son mostradas como * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar.

RESULTADOS

valores control hasta los 5dp. Sin embargo, a los 7dp sus valores pasan a ser superiores ($p < 0,001$), situación que se mantiene hasta los 21dp, a pesar de que la diferencia era menor que en el punto anterior pero todavía significativa ($p < 0,05$). Por otra parte, *glulb* presentó también valores significativamente menores ($p < 0,01$) a los 2dp, pero a los 5dp no encontramos diferencias con respecto a sus valores control. A los 7dp sus valores vuelven a aumentar ($p < 0,01$), pero de nuevo a los 21dp no muestran diferencias significativas. Finalmente, *glulc* es el parólogo cuyo comportamiento más varió en todo el rango temporal y además de forma más acusada. A los 2dp su expresión disminuye fuertemente ($p < 0,001$), llegando a presentar valores 100 veces inferiores a la situación control. Sin embargo, a los 5dp su expresión, aunque todavía inferior al control ($p < 0,01$), no era tan manifiestamente baja. Esta situación se revirtió a los 7dp, momento en el que la expresión de *glulc* aumenta significativamente ($p < 0,001$), continuando en esta tendencia hasta los 21dp, donde los valores superaban 80 veces a los obtenidos en la situación control.

Para mostrar mejor esta variación en los valores de *glulc* respecto a los otros dos parólogos *glula* y *glulb*, y las diferencias manifiestas que existen entre retina y NO, realizamos una comparación entre la diferencia entre el ciclo umbral (Ct) de cada uno de ellos con respecto al ciclo umbral del gen de referencia, *ef1 α* .

En la Figura 99 se muestran las diferencias de los ciclos umbrales (ΔCt). A modo orientativo, una ΔCt de cero implica que el gen estudiado tiene un nivel de expresión similar al de *ef1 α* en cada punto representado. Así, se muestra que mientras en la retina los niveles de expresión de los tres genes siguen una tendencia y una relación en la que en todos los puntos estudiados la expresión de *glula* es menor que la de *glulb* y ésta menor que la de *glulc* ($glula < glulb < glulc$), en el NO la situación es bien distinta. Además, la expresión de *glula* en la retina es muy alta, llegando a ser incluso superior a la de *ef1 α* en la situación control. Este dato contrasta con la expresión de *glulc*, que presenta una ΔCt muy elevada y, por tanto, muestra una expresión muy baja en comparación con la de los otros dos parólogos de *glul* en la retina.

Por el contrario, en el NO en la situación control *glulc* se expresa en mayor medida que *glulb*, y la expresión de cualquiera de ellos no llega a ser tan elevada como *glula* en la retina control. Conforme avanzan los días tras el pinzamiento,

los niveles de *glula* y *glulb* mantienen entre ellos una relación más o menos continua, siendo *glula* mayor que *glulb* excepto a los 5dp, donde su expresión es similar. Sin embargo, *glulc* presenta una drástica bajada en sus niveles de expresión a los 2dp con relación a los otros dos parálogos, igualándose la expresión de los tres a los 5dp. A partir de este momento, la expresión de *glulc* se incrementa notablemente, siendo a los 21dp muy superior a *glula* y *glulb* e incluso a *ef1α*.

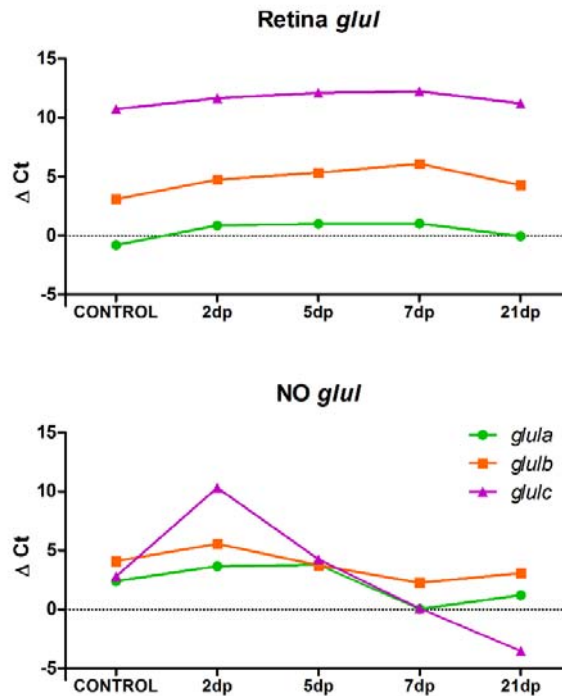


Figura 99. Expresión relativa de los tres parálogos de la glutamina sintetasa en la retina y en el NO. Se muestran las diferencias de las medias de los Ct de cada gen con respecto al valor medio del Ct de *ef1α* (Δ Ct) para cada punto experimental. A mayor valor de Δ Ct, menor es la expresión de un gen con respecto a *ef1α* y viceversa.

Otros de los genes que presentaron diferencias importantes en sus niveles de expresión en retina y en NO fueron *mbpa* y *mpz*. En el caso de la retina (Figura 100) los niveles de *mbpa* fueron bastante superiores a *mpz*, no sólo en la situación control sino también en los distintos puntos estudiados. Mientras, en el NO la expresión de *mbpa* y *mpz* es incluso superior a la de *ef1α* en la situación control. Además, a lo largo de los distintos puntos estudiados, los niveles de *mbpa* se mantienen por encima de los de *mpz*, excepto a los 5dp donde presentan valores similares. De hecho, los niveles relativos tan bajos de *mpz* en

RESULTADOS

la retina concuerdan con que, a diferencia de *mbpa*, no se haya observado su expresión mediante técnicas inmunocitoquímicas en esta región, mientras que en NO sí se ha demostrado la expresión de *mpz*.

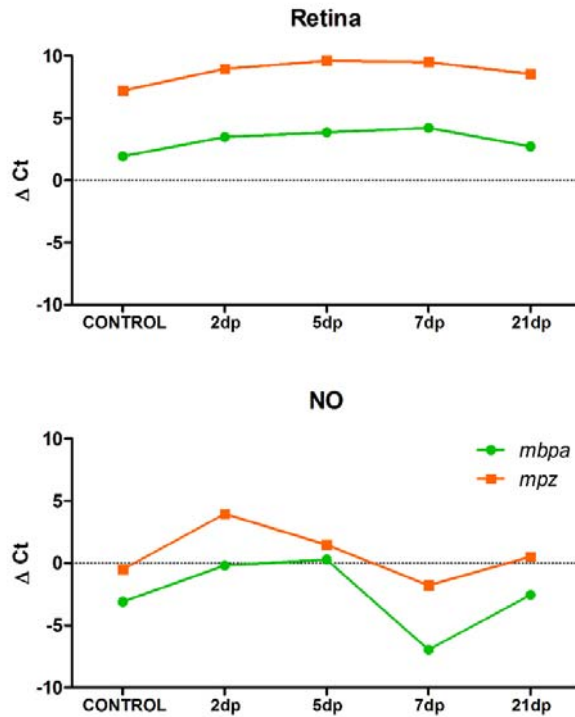


Figura 100. Expresión relativa de *mbpa* y *mpz* en la retina y en NO. Se muestran las diferencias de las medias de los Ct de cada gen con respecto al valor medio del Ct de *ef1 α* (ΔCt) para cada punto experimental. A mayor valor de ΔCt , menor es la expresión de un gen con respecto a *ef1 α* y viceversa.

9. Oligodendrocitos durante el desarrollo del sistema visual

Una vez que caracterizamos los oligodendrocitos y las poblaciones astrogliales presentes en la retina, la CNO y el NO del pez cebra adulto, y tras comprobar la bibliografía existente hasta el momento, no hallamos más que un artículo que hacía referencia directa al desarrollo de los oligodendrocitos en el sistema visual del pez cebra (Tian *et al.*, 2016). A la vista de esta situación, nos planteamos analizar, mediante técnicas inmunohistoquímicas, las características de estas células durante el desarrollo en ejemplares transgénicos para distintos genes asociados al linaje oligodendrogial. Así, estudiamos su morfología, disposición y número, y comprobamos su coexpresión con otros marcadores estudiados en peces adultos. Los resultados obtenidos los hemos agrupado según las horas o días de desarrollo (hpf/dpf) de las larvas, teniendo así grupos desde las 48 hpf/2dpf, y hasta un tiempo máximo de 14dpf.

- **48hpf**

El primer grupo estudiado fue el compuesto por larvas de 48hpf. En este momento del desarrollo se ha producido la especificación del sistema visual, aunque todavía no está del todo formado. Aun así, quisimos comprobar la posible existencia en este estadio de una población de oligodendrocitos.

A las 48hpf aparecen perfectamente definidos el ojo y el NO (Figura 101A), y observamos una gran cantidad de células olig2:GFP en la retina, aunque la laminación no se ha producido todavía y no podemos, por tanto, especificar las capas de la misma. También encontramos que estas células expresaban el marcador *sox2* (Figura 101A). Observando secciones en las que obtuvimos ambos NO (Figura 101B), quedó patente que la expresión de *sox2* era casi ubicua en regiones encefálicas (Figura 101B), a la vez que observamos poblaciones celulares olig2 en la región del quiasma óptico (Figura 101B). También detectamos la expresión de *sox10*, no sólo en el encéfalo colocalizando con células olig2⁺, sino también ventralmente en zonas de cartilago de la placa etmoidea (Figura 101C). Por último, en secciones más caudales del encéfalo

RESULTADOS

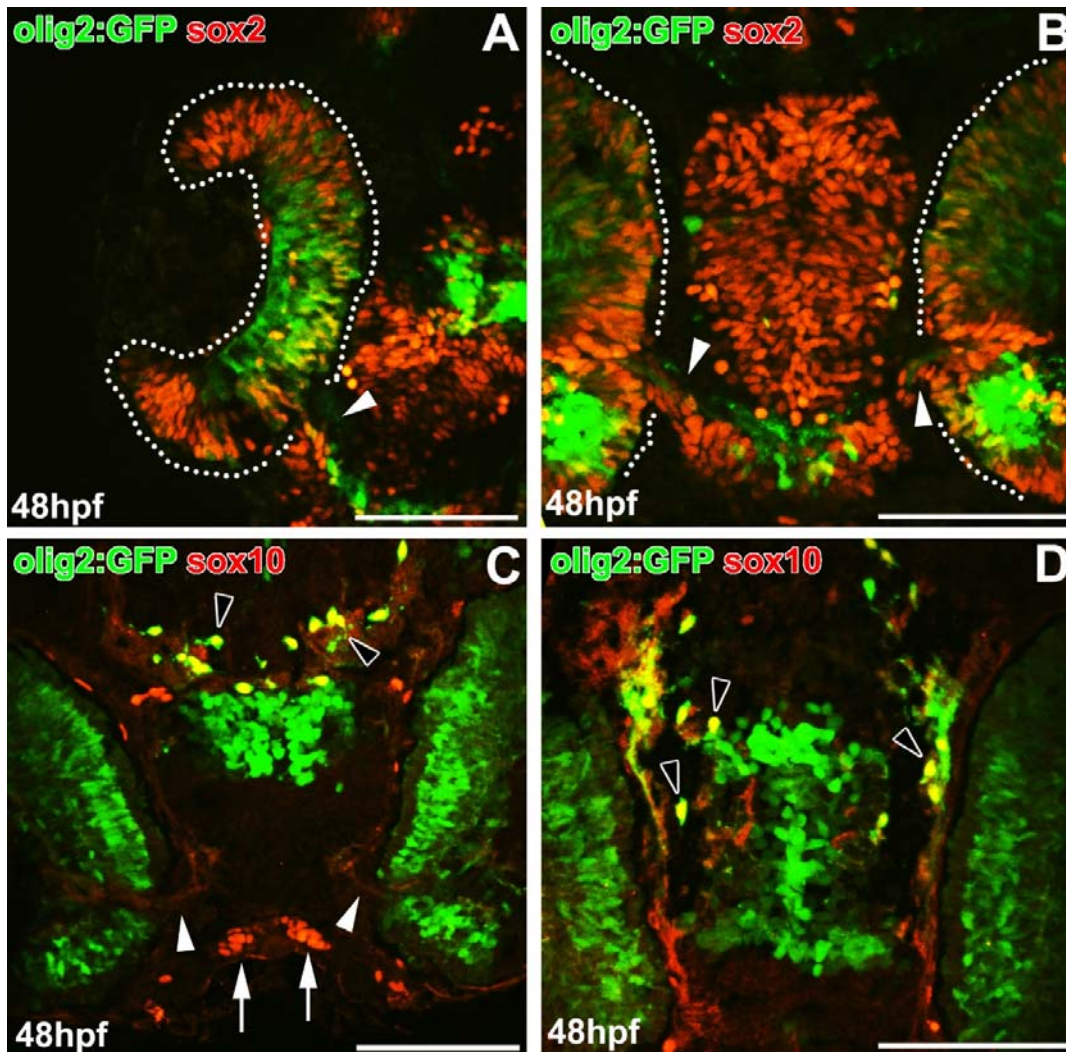


Figura 101. Expresión de sox2 y sox10 en animales olig2:GFP a las 48hpf. Marcaje extenso tanto de sox2 como de olig2 en la retina (**A**) (línea de puntos). NO recién formado (punta de flecha blanca), sin aparición de oligodendrocitos. Resultado similar en zonas más caudales del cerebro (**B**), con marcaje sox2 y olig2 muy amplio, sin marcaje en los NO (puntas de flechas blancas). Oligodendrocitos olig2⁺/sox10⁺ en el tegmentum (**C**) (puntas de flechas negras). Ausencia de marcaje en el NO (puntas de flecha blancas). Cartílago hialoideo sox10⁺ (flechas blancas). Células olig2⁺/sox10⁺ en regiones más caudales (**D**) (puntas de flecha negras), que parecen migrar desde la línea media. Barras de escala: A-D: 100 μm.

observamos células olig2⁺/sox10⁺ en la periferia de la zona encefálica (Figura 101D), algunas de ellas más cerca de la zona central, en donde aparece una gran acumulación de células olig2⁺ alrededor de la zona ventricular (Figura 101D).

- **3dpf**

A los 3dpf la retina y demás centros encefálicos han completado su especificación y laminación (Figura 102). En la retina de estos animales

RESULTADOS

detectamos un leve marcaje de células olig2 dispuestas a lo largo de toda la CNI (Figura 102A), pero no encontramos marcaje ni en la CCG (Figura 102A, B, E), ni tampoco en el NO (Figura 102B). Sin embargo, localizamos un leve marcaje de sox10 en la CNI, similar al observado en tinciones contra sox2 (Figura 102A-

RESULTADOS

C). Por el contrario, encontramos numerosas células olig2⁺, y con una expresión intensa de GFP, en el encéfalo (Figura 102A-E). Algunas de estas células coexpresan sox10 (Figura 102A, B, C), localizándose en zonas ventrales y marginales del cerebro (Figura 102A, B, C), zonas que se corresponden a los

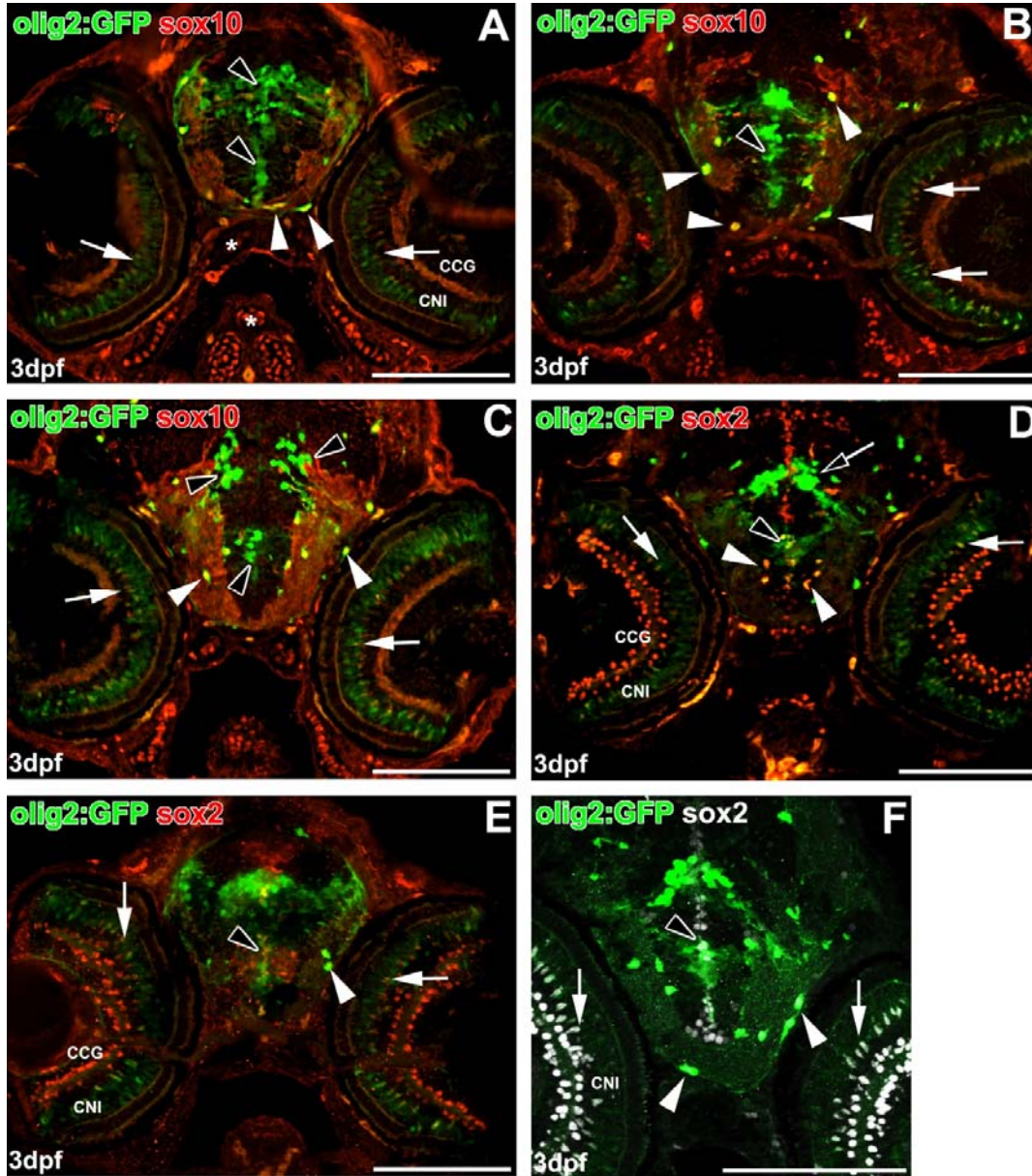


Figura 102. Larvas olig2:GFP a los 3 dpf. **A:** Oligodendrocitos olig2⁺/sox10⁺ en el área preóptica (puntas de flecha blancas). Progenitores olig2⁺ en la línea media (puntas de flecha negras) y en la retina (flechas blancas). **B:** Resultados similares en el hipotálamo ventral y lateral (puntas de flecha blancas) en zonas más caudales. **C:** Células olig2⁺/sox10⁺ más abundantes en los tractos ópticos (puntas de flecha blancas) y células olig2⁺ en el mesencéfalo dorsal (puntas de flecha negras). **D:** Células olig2⁺/sox2⁺ (puntas de flecha blancas) en el mesencéfalo dorsomedial y en la línea media (punta de flecha negra). Algunas células olig2⁺/sox2⁺ en la retina (flechas blancas). **E:** Resultados similares en secciones más rostrales. **F:** A mayor aumento, células olig2⁺/sox2⁺ en los tractos ópticos (puntas de flecha blancas), línea media (punta de flecha negra) y en la retina (flechas blancas), con apariencia de células de Müller. El asterisco (*) indica cartilago sox10⁺. Barras de escala: A-F: 100 μ m.

tractos visuales. Sus somas presentan una forma redondeada o alargada, encontrándose esta última más frecuentemente en las zonas marginales de los tractos.

También localizamos una gran acumulación de células olig2⁺ a lo largo de la línea media (Figura 102A, B, C), alrededor de las zonas ventriculares. Estas células aparecen como en una hilera de núcleos apilados, y parecen extender sus prolongaciones y contactar con la superficie pial del encéfalo (Figura 102A, B). En algunas zonas, principalmente dorsales, estos núcleos olig2⁺ se acumulan y se extienden a zonas laterales (Figura 102A), aunque en zonas más caudales del cerebro se pueden reconocer núcleos diferenciados de células olig2⁺ a ambos lados de la línea media (Figura 102C, D, F). En ningún caso hemos observado que estas células expresen sox10.

Por otra parte, la expresión de sox2 en estos animales ya aparece mucho más localizada con respecto a las 48hpf. En la retina observamos células sox2⁺ tanto en la CNI como en la CCG (Figura 102D-F), en un patrón similar al observado en animales adultos. Algunas de las células de la CNI colocalizan parcialmente con el marcaje residual de olig2 (Figura 102D, E). Estas células con doble marcaje se disponen en zonas más esclerales de la CNI y sus núcleos presentan una morfología alargada (Figura 102F), lo que indica que podrían ser células de Müller. Por otra parte, no encontramos ninguna célula sox2⁺ en el NO.

Con respecto al encéfalo, observamos una gran acumulación de células sox2⁺ en la línea media (Figura 102D-F), que en algunos casos colocalizan claramente con la población olig2⁺ anteriormente descrita (Figura 102D-F). Este marcaje sox2⁺ también colocaliza en la mayoría de las olig2 dispuestas en las zonas del tracto óptico (Figura 102D, F). En secciones más caudales del encéfalo, en el comienzo del techo óptico, es donde mejor pudimos observar estas células alargadas, sox2⁺/olig2⁺, dispuestas en el tracto óptico (Figura 102F).

Para estudiar en mayor profundidad estas células presentes en el encéfalo, utilizamos animales dobles transgénicos gfap:GFP-sox10:RFP (Figura 103). La expresión de GFAP en el sistema nervioso aparece asociada a células astrogliales, especialmente a la glía radial. Encontramos una abundante expresión de GFAP el cerebro de estos animales (Figura 103A, C, D), así como

RESULTADOS

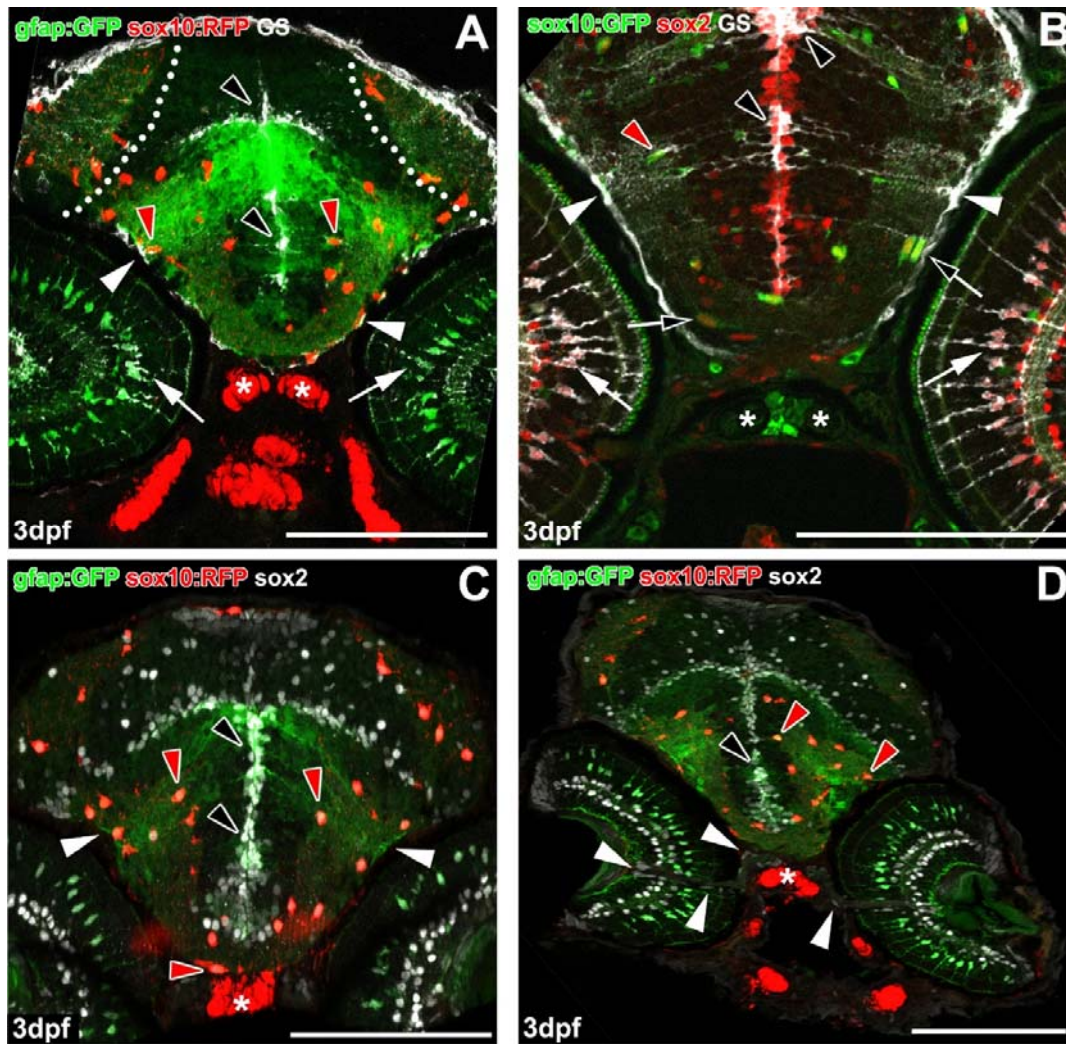


Figura 103. Larvas *gfap:GFP-sox10:RFP* y *sox10:GFP* a los 3 dpf. **A:** Oligodendrocitos *sox10*⁺ (puntas de flecha rojas) en los tractos y techo ópticos (línea de puntos). Células *gfap*⁺/*GS*⁺ en la línea media (puntas de flecha negras). Sus procesos se extienden hasta la superficie lateral del encéfalo (puntas de flecha blancas). Células de Müller *gfap*⁺/*GS*⁺ (flechas blancas). **B:** En animales *sox10:GFP*, oligodendrocitos *sox10*⁺ (flechas negras), algunos rodeados por procesos *GS*⁺ (punta de flecha rojas). Células *sox2*⁺/*GS*⁺ en la línea media (puntas de flecha negras); sus procesos *GS*⁺ se extienden hasta el lateral del encéfalo (puntas de flecha blancas). Células de Müller *GS*⁺/*sox2*⁺ (flechas blancas). En inmunohistoquímicas contra *sox2* (**C, D**), oligodendrocitos *sox10*⁺/*sox2*⁺ en los tractos y techo ópticos (puntas de flecha rojas). Células *gfap*⁺/*sox2* en la línea media (puntas de flecha negras), que se extienden hasta la superficie lateral (puntas de flecha blancas). En la retina (**D**), células *sox2*⁺ en la CNO y salida del NO (puntas de flecha blancas). El asterisco (*) indica cartílago *sox10*⁺. Barras de escala: A-D: 100 μ m.

en la retina. En el cerebro, la expresión de GFAP se localiza en células cuyos somas se sitúan a lo largo de la línea media (Figura 103A, C, D), y sus prolongaciones también contenían marcaje GFP. Estas células colocalizaron con GS (Figura 103A), y pudimos observar que tanto el marcaje de GFP como el de GS se extiende desde la línea media hasta las zonas más externas o piales del cerebro (Figura 103A). En ningún caso, sin embargo, observamos colocalización

RESULTADOS

de GFAP o GS con *sox10* (Figura 103A, B). Realizamos también inmunohistoquímicas contra *sox2* (Figura 103C-D), donde confirmamos que las células de la línea media GFAP⁺ expresan también *sox2*⁺ (Figura 103B-D). Al observar dobles inmunohistoquímicas para GS y *sox2* (Figura 103B), encontramos colocalización de estos dos marcadores en las células de la línea media (Figura 103B). Por lo tanto, podríamos definir a estas células mediales como GFAP⁺/GS⁺/*sox2*⁺, y algunas de ellas también *olig2*⁺ (Figura 102F).

Por otra parte, observamos el marcaje de células *sox10* por todo el encéfalo, tanto si utilizamos el transgénico *sox10*:GFP (Figura 103B) como en el caso del *sox10*:RFP (Figura 103A, C, D). En cualquier caso, las células *sox10*⁺ se localizaron en los tractos ópticos y en el techo óptico, y presentan núcleos ovalados o redondeados (Figura 103A). En algunos casos, parecían estar dispuestas a lo largo de los procesos radiales GS⁺ (Figura 103B), aunque no detectamos colocalización. Al estudiar las inmunohistoquímicas contra *sox2*, pudimos observar que casi todas las células *sox10*⁺ expresan también *sox2* (Figura 103B-D).

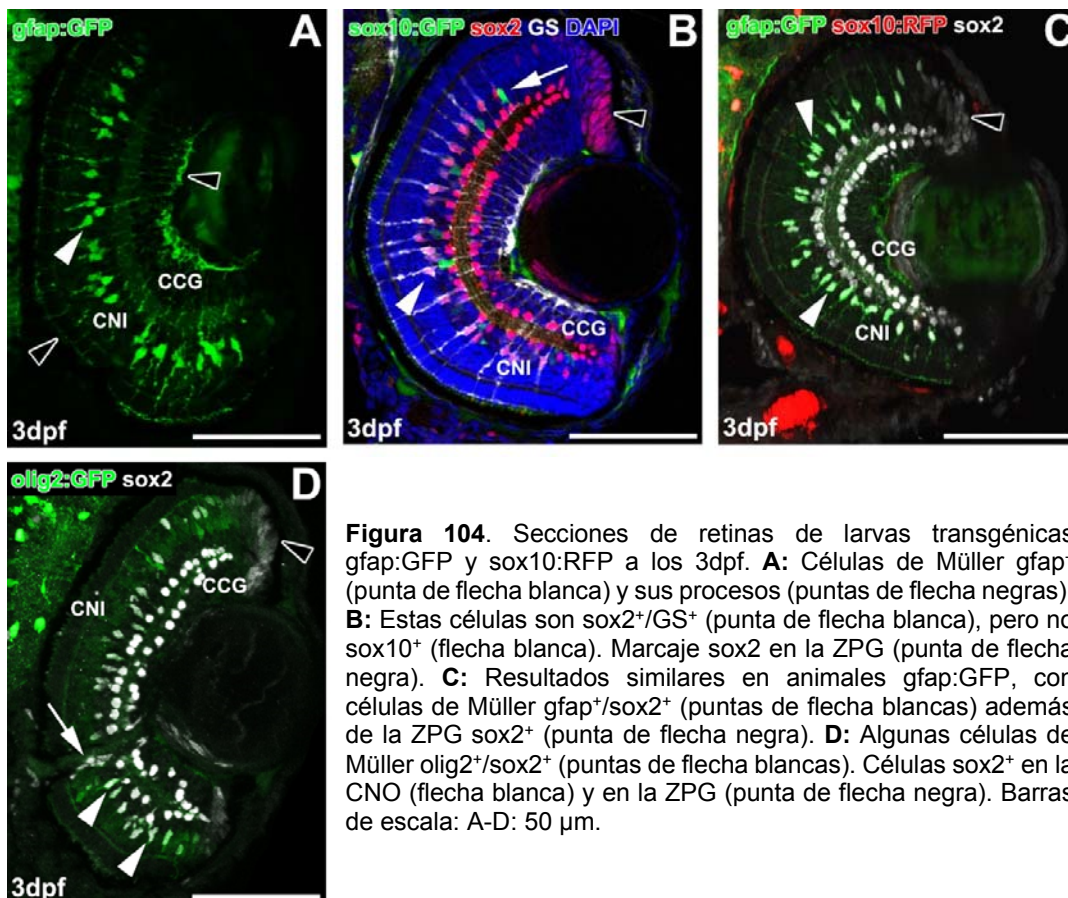


Figura 104. Secciones de retinas de larvas transgénicas *gfap*:GFP y *sox10*:RFP a los 3dpf. **A:** Células de Müller *gfap*⁺ (punta de flecha blanca) y sus procesos (puntas de flecha negras). **B:** Estas células son *sox2*⁺/GS⁺ (punta de flecha blanca), pero no *sox10*⁺ (flecha blanca). Marcaje *sox2* en la ZPG (punta de flecha negra). **C:** Resultados similares en animales *gfap*:GFP, con células de Müller *gfap*⁺/*sox2*⁺ (puntas de flecha blancas) además de la ZPG *sox2*⁺ (punta de flecha negra). **D:** Algunas células de Müller *olig2*⁺/*sox2*⁺ (puntas de flecha blancas). Células *sox2*⁺ en la CNO (flecha blanca) y en la ZPG (punta de flecha negra). Barras de escala: A-D: 50 μ m.

RESULTADOS

Finalmente, estudiamos la retina en estos animales. Observamos que existía una fuerte expresión de GFAP (Figura 103A, C-D; Figura 104A), y que los núcleos marcados se situaban en la CNI (Figura 104A), extendiendo sus prolongaciones hasta los límites de la retina. La naturaleza de estos elementos, que en principio parecían ser células de Müller, quedó confirmada al realizar inmunohistoquímicas contra *sox2* y GS (Figura 103A, Figura 104B, C), encontrándonos con que había colocalización entre la GFAP y estos marcadores. Al utilizar animales *olig2:GFP* también observamos que algunas de las células *olig2*⁺ que se disponen en la CNI también expresan *sox2* (Figura 102F, Figura 104D), aunque también encontramos células únicamente *sox2*⁺ en la ZPG (Figura 104B-D). También pudimos distinguir alguna célula *sox10*⁺ en la CNI (Figura 104B), aunque de soma redondeado y en contacto con la CPI.

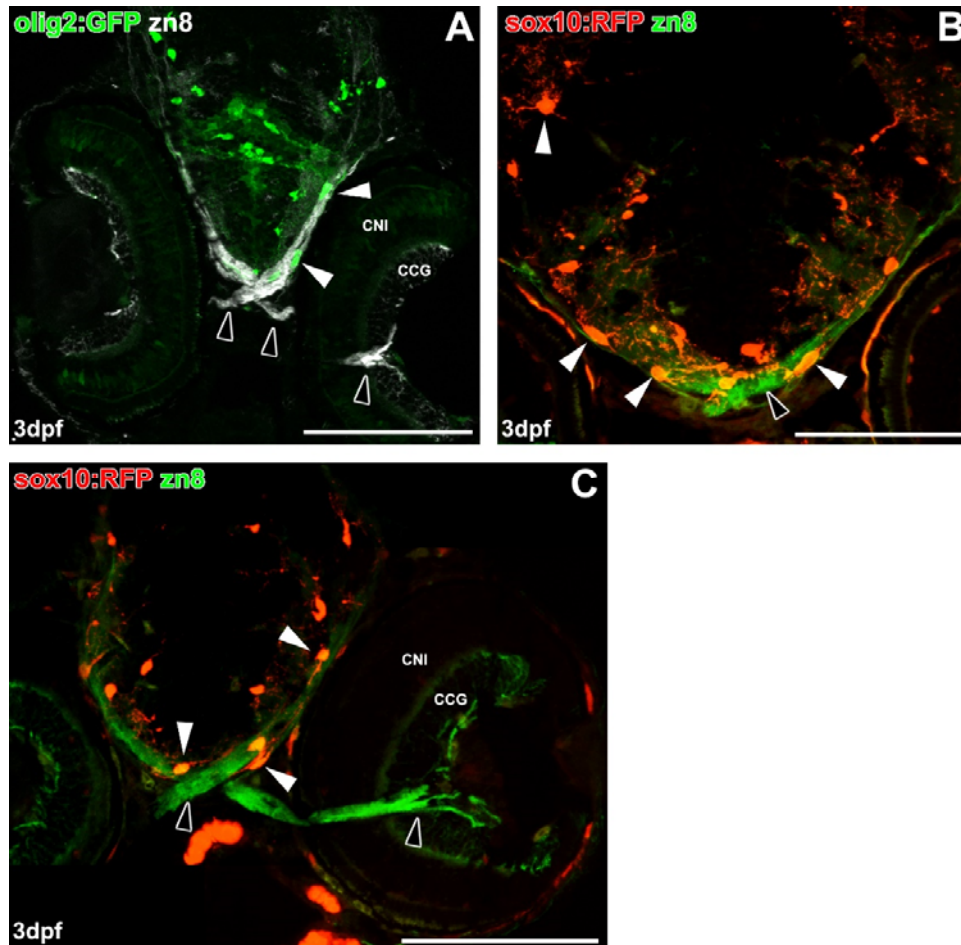


Figura 105. Inmunorreactividad *zn8*⁺ a los 3dpf en animales transgénicos *olig2:GFP* y *sox10:RFP*. **A:** Células *olig2*⁺ en los tractos ópticos (puntas de flecha blancas), junto a los tractos *zn8*⁺ que se extienden desde la retina (puntas de flecha negras). **B y C:** Similares resultados con animales *sox10:RFP* (puntas de flecha blancas), en contacto con los axones en crecimiento (punta de flecha negra) desde la retina. Barras de escala: A, C: 100 μ m; B: 50 μ m.

Finalmente, observamos algunas células $sox2^+$ en la CNO y en la salida del NO de la retina (Figura 103D, Figura 104D), de morfología alargada y que no expresan ninguno de los marcadores anteriormente descritos.

Por otra parte, también nos planteamos estudiar la relación de los oligodendrocitos con los axones. Para ello realizamos marcajes con el anticuerpo anti neuropilina (zn8), con el fin de evidenciar los axones en crecimiento del sistema visual. Así, a los 3dpf detectamos gruesos haces de axones tanto en el NO, como en el quiasma óptico y en los tractos ópticos (Figura 105). Encontramos células $olig2^+$ a lo largo del tracto óptico (Figura 105A) y al borde del quiasma óptico, pero no en el NO ni en la retina (Figura 105A). Resultados similares obtuvimos al estudiar los transgénicos para $sox10$ (Figura 105B, C), en los que observamos oligodendrocitos en estrecho contacto con los axones a lo largo del tracto y hasta el quiasma óptico. En secciones más caudales del cerebro también observamos células $sox10^+$ en el techo óptico (Figura 105B), como habíamos detallado anteriormente (Figura 103A). Respecto al marcaje de zn8, lo detectamos en la retina, donde una débil inmunotinción se extiende por las zonas más vitreales hasta casi contactar con la CNI (Figura 105C). Estos axones convergen en la CNO y a partir de ahí forman gruesos haces hasta el tracto óptico (Figura 105C).

- **4dpf**

A los 4dpf encontramos resultados similares a los observados a los 3dpf. Continuamos observando oligodendrocitos $sox10^+$ en el cerebro, en zonas desde el quiasma óptico (Figura 106A, B, D), pasando por el tracto óptico (Figura 106D) y hasta el techo óptico (Figura 106E-F). Del mismo modo, la mayoría de los oligodendrocitos coexpresaba $sox2$ (Figura 106A-D, F), pero en ningún caso GS, aunque sí que los pudimos visualizar en estrecho contacto con los procesos GS^+ (Figura 106C, E). Como a los 3dpf, en algunos casos también localizamos alguna célula $sox10^+$ en la CNI de la retina (Figura 106A).

El marcaje para $sox2$ se mantiene sin variaciones, detectándose en la línea media (Figura 106A-D, F) y junto a $sox2$, GFAP y GS. En la retina tampoco encontramos variaciones, visualizando células $sox2^+$ tanto en la CNI y en la CCG

RESULTADOS

como en la ZPG (Figura 106A-F). Mención especial requieren las células $sox2^+$ localizadas en la CNO y en el comienzo del NO (Figura 106B, C, F) ya que se

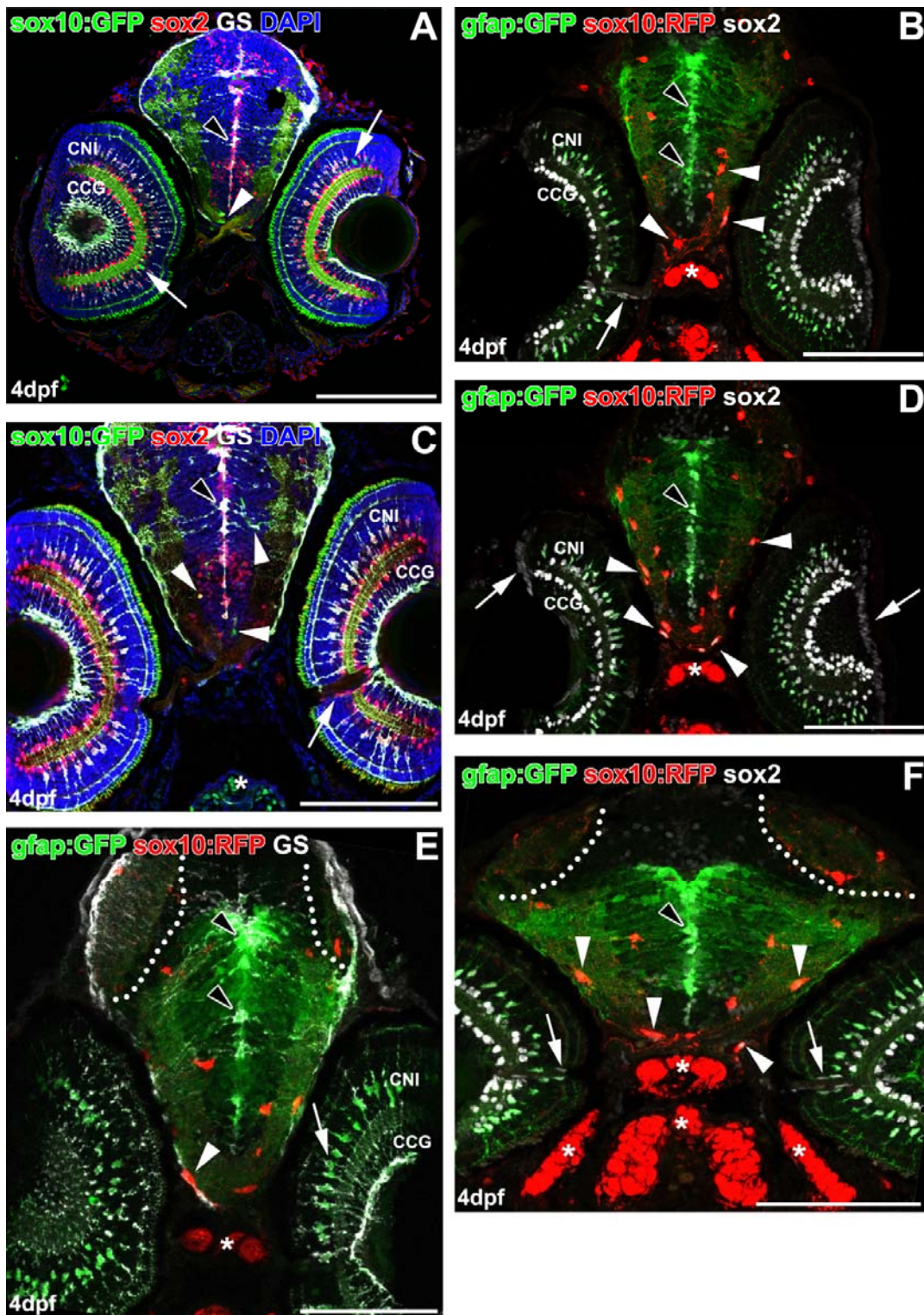


Figura 106. Larvas transgénicas a los 4dpf. **A:** Oligodendrocitos *sox10*⁺ (punta de flecha blanca), células *sox2*⁺/*GS*⁺ en la línea media (punta de flecha negra). Células *sox10*⁺ en la CNI de la retina (flechas blancas). **B:** Resultado similar en animales *gfap:GFP-sox10:RFP*. **C:** Células *sox2*⁺ en el NO (flecha blanca), que también detectamos en animales *sox10:RFP* (**F**), además de células *sox2* en la ZPG (**D**) (flechas blancas). **E** y **F:** En regiones más caudales, oligodendrocitos *sox10*⁺/*sox2*⁺ (puntas de flecha blancas), células *gfap*⁺/*GS*⁺/*sox2*⁺ en la línea media (puntas de flecha negras) y células de Müller *GS*⁺ y de la CNO *sox2*⁺ (flechas blancas). Barras de escala: A-F: 100 μ m.

RESULTADOS

observan en mayor número que a los 3dpf y parecen extenderse centrifugamente desde el NO.

Al estudiar animales olig2:GFP también encontramos resultados similares. Continuamos detectando células olig2⁺ en la línea media (Figura 107A-D), algunas de las cuales coexpresan sox2 (Figura 107A-C). Respecto a los oligodendrocitos olig2⁺, los detectamos desde el quiasma óptico hasta los tractos ópticos (Figura 107A-D), colocalizando la gran mayoría tanto con sox2 (Figura 107A-C) como con sox10 (Figura 107D). También observamos un leve marcaje en la CNI de la retina (Figura 107A, B), con células olig2⁺/sox2⁺. Por último, las

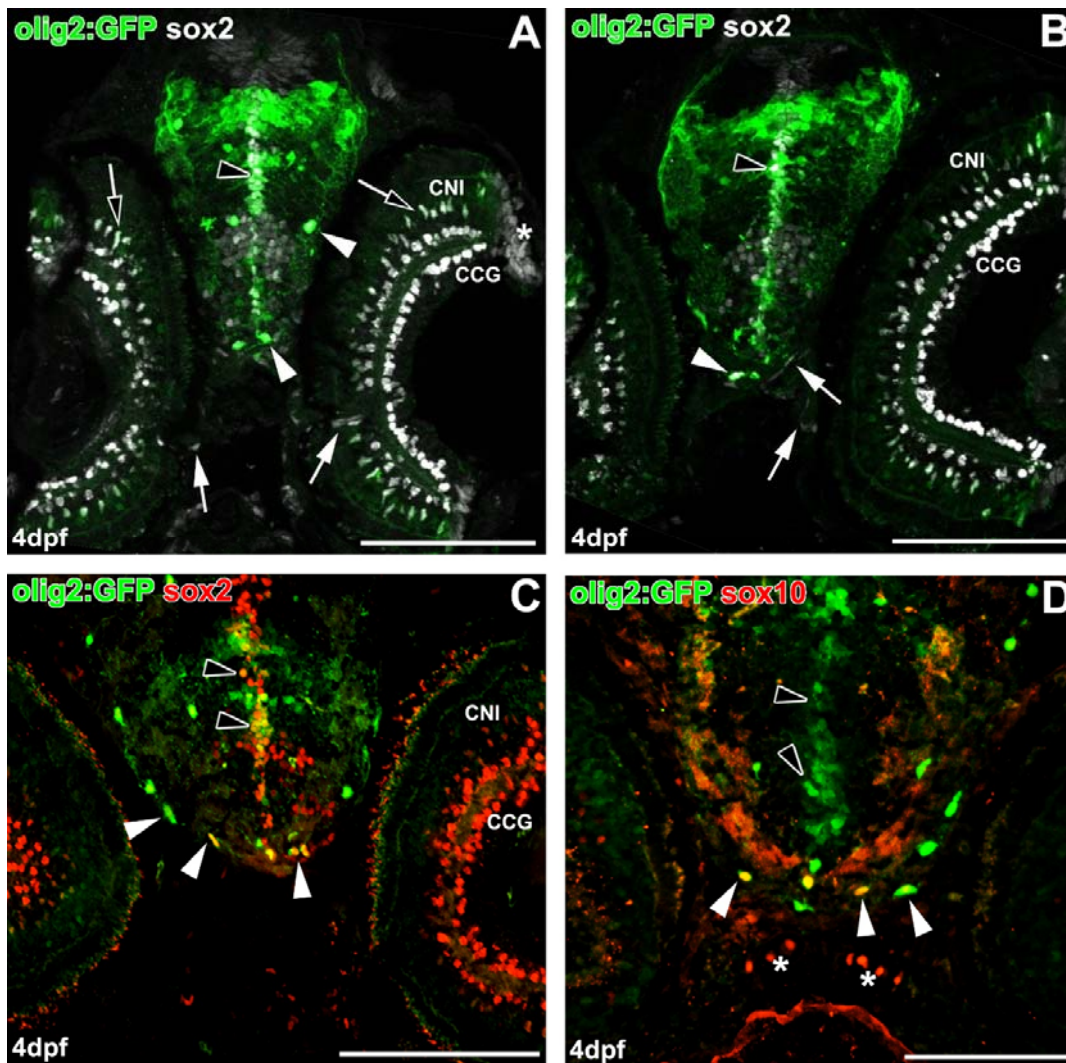


Figura 107. Larvas olig2:GFP a los 4dpf. **A:** Oligodendrocitos olig2⁺/sox2⁺ (puntas de flecha blancas); células olig2⁺/sox2⁺ en la línea media (punta de flecha negra); células de Müller olig2⁺/sox2⁺ en la retina (flechas negras). Células sox2⁺ en la CNO y NO (flechas blancas). **B y C:** Resultados similares en secciones más ventrales, con oligodendrocitos olig2⁺/sox2⁺ en las zonas marginales de los tractos ópticos (puntas de flecha blancas). **D:** Dobles marcajes olig2⁺/sox10⁺ en la misma región (puntas de flecha blancas). Las células olig2⁺ de la línea media no expresan sox10 (puntas de flecha negras). Barras de escala: A-C: 100 μ m; D: 50 μ m.

células $sox2^+$ de la CNO y del NO también se detectan, aunque con una expresión débil, en partes proximales del NO (Figura 107B).

Finalmente, al analizar la expresión de axones $zn8$ encontramos gruesos haces desde la CNO hasta el tracto óptico (Figura 108A, B), aunque a diferencia de lo observado a los 3dpf el marcaje intrarretinal se concentra fundamentalmente en la zona más vitreal de la retina (Figura 108B). También seguimos localizando numerosos oligodendrocitos $olig2^+$ a lo largo del tracto óptico (Figura 108B), extendiéndose más allá del quiasma óptico (Figura 108A).

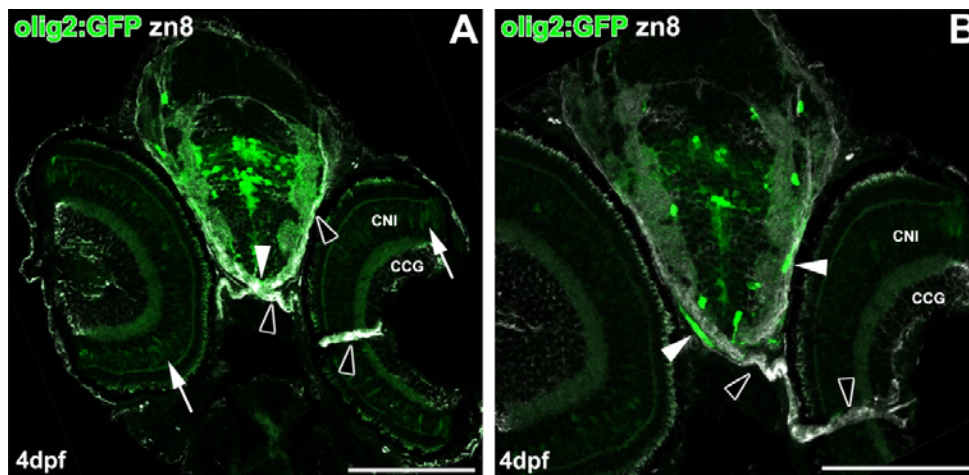


Figura 108. Axones $zn8$ en larvas $olig2:GFP$ a los 4dpf. **A y B:** Oligodendrocitos $olig2^+$ (puntas de flecha blancas) en contacto con los axones $zn8^+$ (puntas de flecha negras). Células $olig2^+$ en la CNI de la retina (flechas blancas). Barras de escala: A, B: 100 μ m.

- **5dpf**

En el grupo de larvas estudiadas a los 5dpf encontramos resultados similares a los observados a los 4dpf, aunque también localizamos importantes novedades como la aparición de oligodendrocitos en el NO.

Así, detectamos tanto en animales $olig2:GFP$ como en los $sox10:RFP$ la presencia de oligodendrocitos en el NO (Figura 109A, B, D). Estos oligodendrocitos se sitúan en zonas cercanas al quiasma óptico, y normalmente sólo hallamos un oligodendrocito en todo el recorrido del NO (Figura 109A, D), aunque en algunos casos se localizaron hasta dos (Figura 109B). También pudimos distinguir sus prolongaciones invadiendo el NO (Figura 109A), aunque son escasas y poco ramificadas. Sin embargo, utilizando la tinción nuclear DAPI pudimos comprobar

RESULTADOS

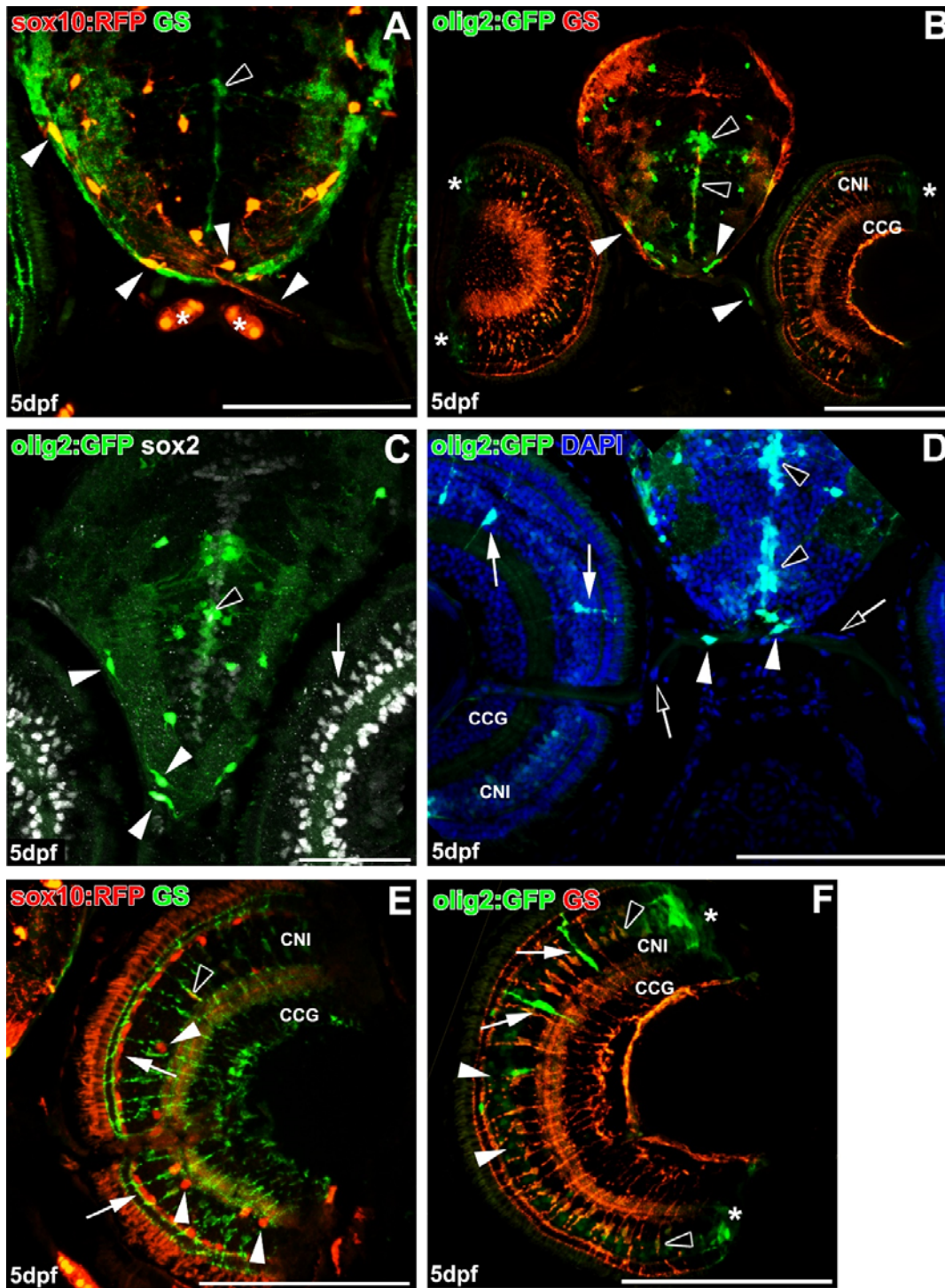


Figura 109. Larvas *sox10:RFP* y *olig2:GFP* a los 5dpf. Oligodendrocitos *sox10* (A) (puntas de flecha blancas) en el tracto óptico; sus procesos penetran en el NO. Células *GS*⁺ en la línea media (punta de flecha negra). El asterisco (*) indica cartílago *sox10*⁺. Similares resultados en animales *olig2:GFP* (B, C, D), células *olig2*⁺ en los tractos y NO (B) (puntas de flecha blancas) y en la línea media (puntas de flecha negras). Células de Müller *olig2*⁺/*sox2*⁺ en la retina (C) (flecha blanca). En el NO (D), presencia de células *olig2*⁺ (flechas negras). En la retina (E) células *sox10*⁺/*GS*⁻ en la CNI (puntas de flecha blancas), alguna en contacto con la CNE (flechas blancas) y alguna célula *sox10*⁺/*GS*⁺ (punta de flecha negra). En retinas de animales *olig2:GFP* (F), células de Müller *olig2*⁺/*GS*⁺ (puntas de flecha negras). Células *olig2*⁺ desde la ZPG (asteriscos) y por toda la CNI (puntas de flecha blancas), algunas de ellas muy marcadas (flechas blancas). Barras de escala: A, B, D-F: 100 μ m; C: 50 μ m.

RESULTADOS

que en el NO se encuentran más células (Figura 109D), aunque no son de naturaleza oligodendroglial. Por otra parte, continuamos observando oligodendrocitos en el tracto óptico (Figura 109A-C), algunos en estrecho contacto los procesos GS⁺ (Figura 109A, B) de las células presentes en la línea media que también son olig2⁺ (Figura 109B-D). Con respecto a la retina, seguimos encontrando células olig2⁺ de soma alargado y dispuesto en la CNI (Figura 109D, F), que en algunas ocasiones colocalizan con GS (Figura 109F),

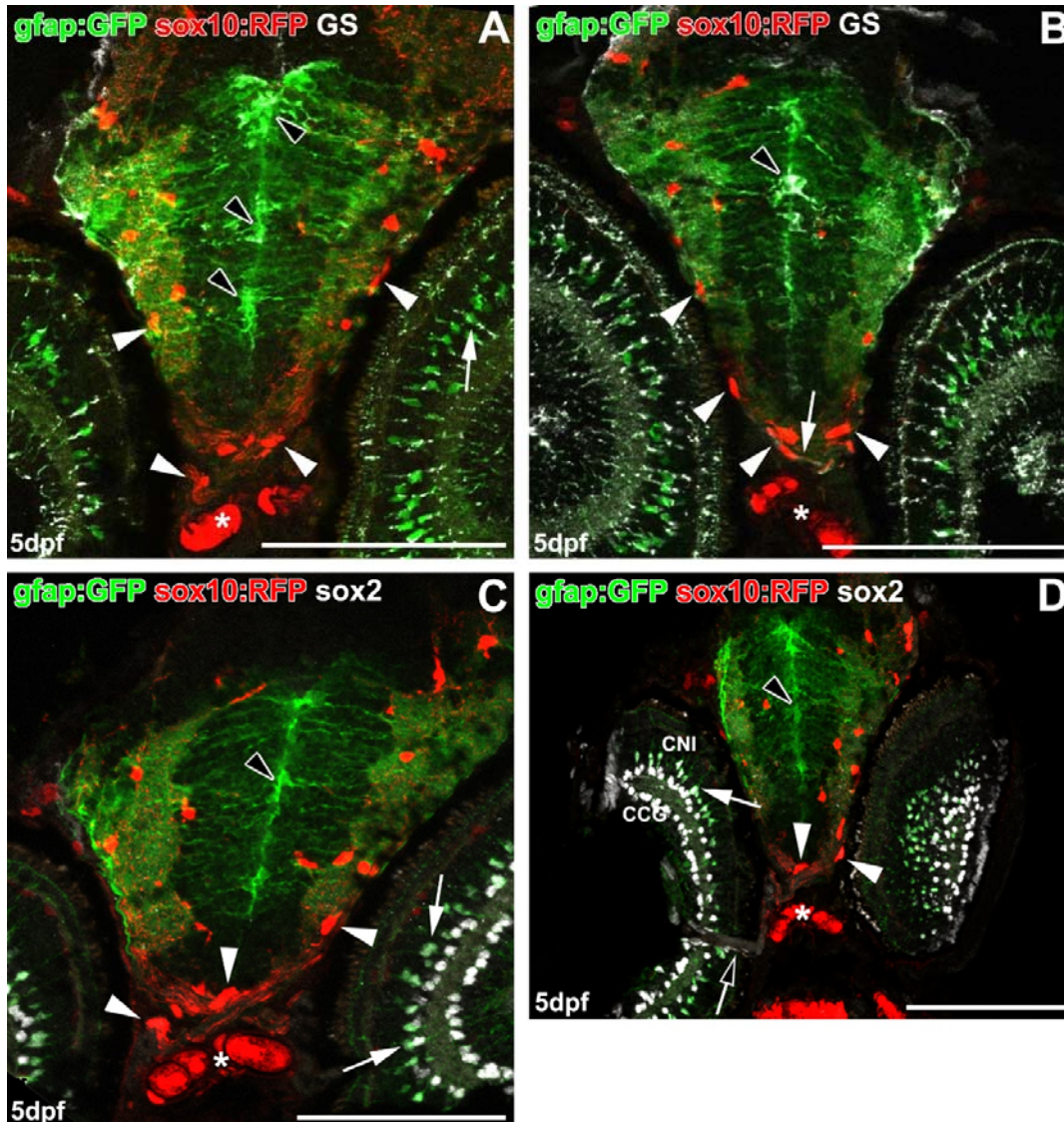


Figura 110. Marcaje GS y sox2 en larvas *gfap:GFP-sox10:RFP* a los 5dpf. Oligodendrocitos *sox10*⁺ en los tractos y NO ópticos (**A, B**) (puntas de flecha blancas); células *gfap*⁺/*GS*⁺ en la línea media (puntas de flecha negras). Células de Müller *gfap*⁺/*GS*⁺ (**A**) (flecha blanca). Procesos *GS*⁺ envolviendo oligodendrocitos *sox10*⁺ (**B**) (flecha blanca). Resultados similares en inmunohistoquímicas anti-*sox2* (**C, D**); células de Müller *gfap*⁺/*sox2*⁺ (flechas blancas), algunos oligodendrocitos *sox10*⁺/*sox2*⁺ (puntas de flecha blancas). Células únicamente *sox2*⁺ en el NO (**D**) (flecha negra). El asterisco (*) indica cartilago *sox10*⁺. Barras de escala: A-D: 100 μ m.

RESULTADOS

por lo que podrían tratarse de células de Müller. Sin embargo, también hallamos células olig2⁺ concentradas en torno a la ZPG de la retina (Figura 109F), donde la expresión de la GS es prácticamente inexistente. Por último, encontramos células sox10⁺ en la retina, aunque por su localización en la parte más escleral o más vitreal de la CNI (Figura 109E) quedaron descartadas como oligodendrocitos. En raras ocasiones las encontramos expresando también GS (Figura 109E).

También estudiamos larvas de 5dpf de dobles transgénicos *gfap:GFP-sox10:RFP*, en las cuales seguimos detectando múltiples oligodendrocitos tanto

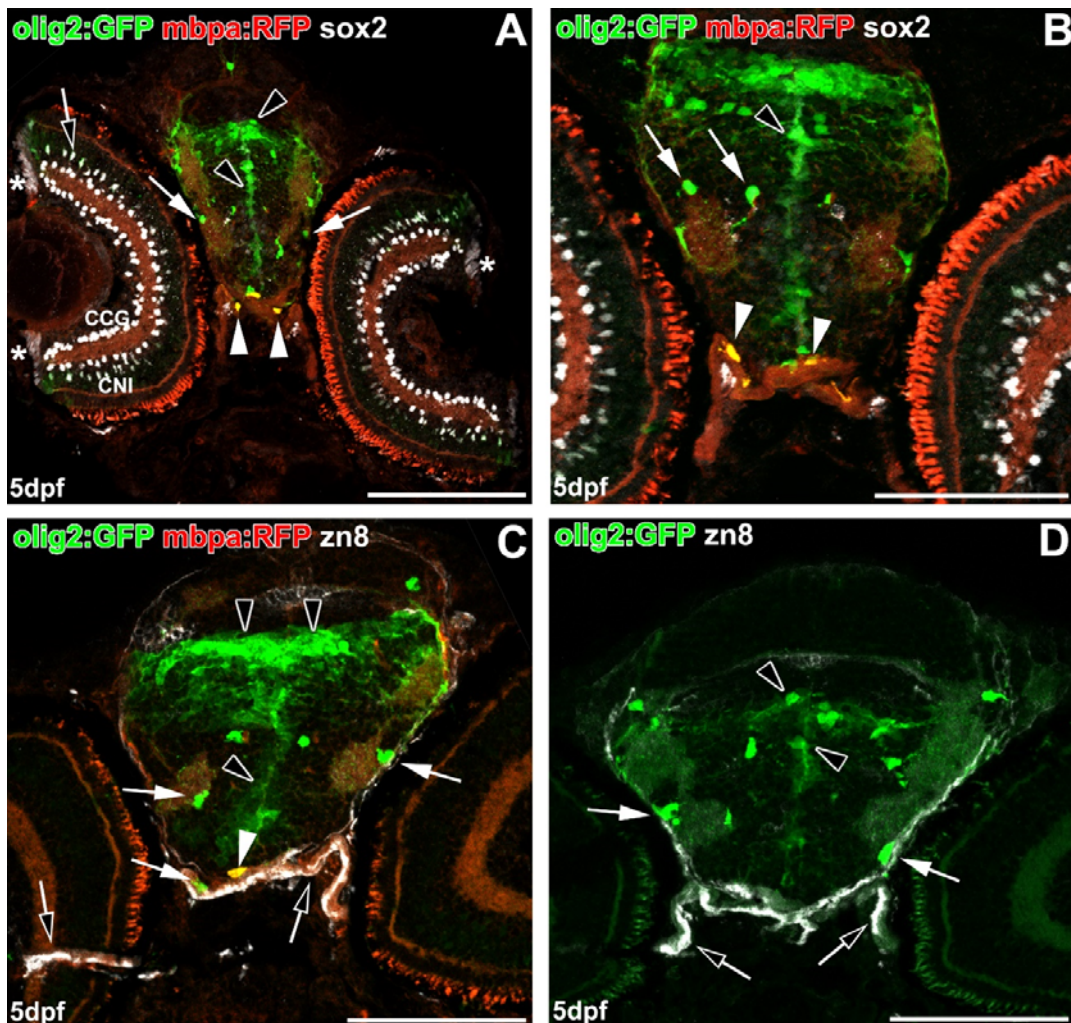


Figura. 111. Dobles transgénicos *olig2:GFP-mbpa:RFP* a los 5dpf. Oligodendrocitos mielinizantes olig2⁺/*mbpa*⁺ en el NO (A, B) (puntas de flecha blancas). Oligodendrocitos simples olig2⁺ (A, B) (flechas blancas). Células olig2⁺/*sox2*⁺ en la línea media (puntas de flecha negras) y células de Müller olig2⁺/*sox2*⁺ en la retina (A) (flecha negra). En inmunohistoquímicas con *zn8* (C, D), oligodendrocitos olig2⁺/*mbpa*⁺ (punta de flecha blanca) y oligodendrocitos olig2⁺ (flechas blancas) cerca de los axones *zn8*⁺ (flechas negras). Células olig2⁺ en la línea media (C, D) (puntas de flecha negras). El asterisco (*) muestra la ZPG. Barras de escala: A-D: 100 μm.

en los tractos ópticos (Figura 110A-D) como en el quiasma óptico. Entre estos últimos destaca la presencia de prolongaciones más o menos largas y que se adentran en el NO (Figura 110A, C), junto con algunos oligodendrocitos (como hemos descrito anteriormente). No encontramos otras diferencias, aunque seguimos observando células de Müller GFAP⁺ (reconocibles por la expresión de GS y sox2), y células únicamente sox2⁺ en el comienzo del NO en la retina (Figura 110D).

Por último, analizamos larvas olig2:GFP-mbpa:RFP a partir de este grupo. Este transgénico no mostraba expresión de mbpa en los estadios anteriores, pero sí que encontramos células RFP⁺ a partir de los 5dpf (Figura. 111). A diferencia de otros transgénicos para sox10, únicamente localizamos células mbpa⁺ en la zona más ventral del encéfalo, donde se sitúa el quiasma óptico (Figura. 111A, C). También encontramos células mbpa⁺ en el NO (Figura. 111B), pero al igual que lo mostrado anteriormente, se observan próximas al quiasma óptico. En todos los casos, estas células mbpa⁺ coexpresaban olig2 (Figura. 111A-C), aunque también localizamos oligodendrocitos únicamente olig2⁺ en el quiasma y en el NO (Figura. 111A-B). Por el contrario, en ningún caso observamos la expresión de sox2 en estos oligodendrocitos olig2⁺/mbpa⁺ (Figura. 111A-C), aunque encontramos algunas de estas células sox2⁺ en el NO (Figura. 111A, B). Finalmente, pudimos observar la interacción de estas células con los axones zn8⁺ (Figura. 111C), que a partir de este día del desarrollo muestran haces más finos desde la CNO aunque no ocupan la totalidad del NO (Figura. 111C, D), encontrándose tanto los oligodendrocitos olig2⁺ como los mbpa⁺ en la zona no ocupada por los axones zn8⁺ (Figura. 111C).

- **6dpf**

A los 6dpf volvimos a examinar los transgénicos olig2:GFP-mbpa:RFP para comprobar el desarrollo de los oligodendrocitos mbpa (Figura 112A-B). En este caso, los encontramos tanto en la zona posterior del quiasma óptico (Figura 112A) como ya en el tracto óptico (Figura 112B). En este último los detectamos desde las zonas más ventrolaterales hasta casi la mitad del encéfalo (Figura 112B), con núcleos de forma alargada y en contacto con oligodendrocitos olig2⁺

RESULTADOS

(Figura 112B). En ningún caso encontramos oligodendrocitos mbpa⁺ que coexpresaran sox2 (Figura 112A, B).

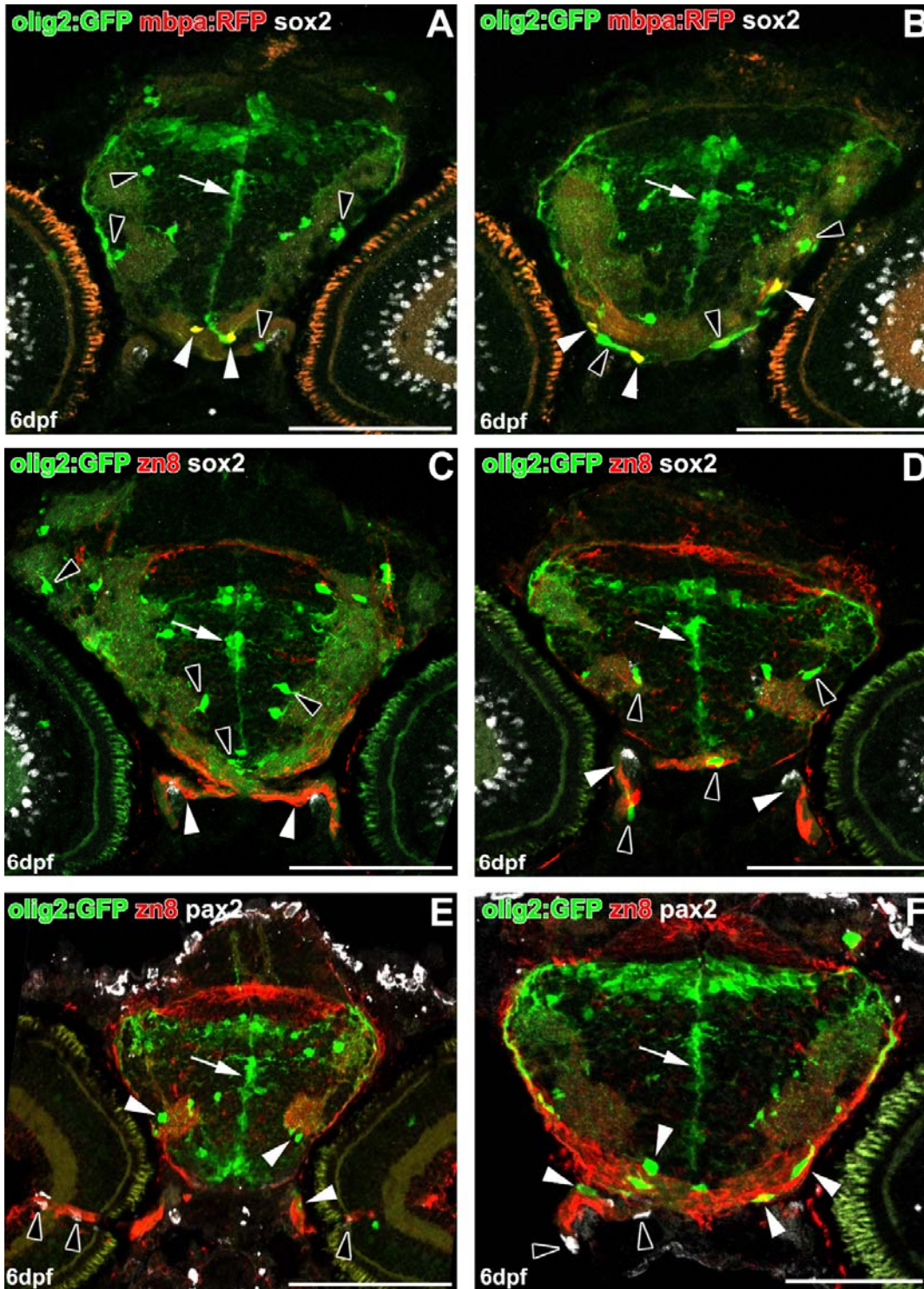


Figura 112. Larvas simples y dobles transgénicas olig2:GFP-mbpa:RFP a los 6dpf. Oligodendrocitos olig2⁺/mbpa⁺ (**A, B**) (puntas de flecha blancas), a veces intercalados con oligodendrocitos olig2⁺ (**B**) (puntas de flecha negras). Células olig2⁺ en la línea media (**A, B**) (flechas blancas). En inmunohistoquímicas contra zn8 y sox2 (**C, D**), oligodendrocitos olig2⁺ desde los tractos ópticos (**C**) hasta el NO (**D**) (puntas de flecha negras), en contacto con los axones zn8⁺ (**C, D**) (puntas de flecha blancas). Resultados similares en inmunohistoquímicas contra zn8 y pax2 (**E, F**). Células pax2⁺ en la CNO y NO (**E, F**) (puntas de flecha negras). Células olig2⁺ en la línea media (**C-F**) (flechas blancas). Barras de escala: A-E: 100 μ m; F: 50 μ m.

RESULTADOS

Detectamos también oligodendrocitos olig2⁺ con numerosos procesos cerca del límite quiasma óptico-NO (Figura 112C, F), y también los detectamos en el NO (Figura 112D), junto con células únicamente sox2⁺ (Figura 112C, D). En la línea media del cerebro seguimos encontrando células olig2⁺ (Figura 112A-F). Por otra parte, al analizar los axones zn8⁺ (Figura 112C-F), encontramos una distribución similar a la observada a 5dpf, con haces menos gruesos que en estadios iniciales y que no ocupan la totalidad del NO (Figura 112C-E). También estudiamos la distribución de células pax2⁺ (Figura 112E-F), observándolas tanto en la CNO y comienzo del NO con una apariencia similar a las sox2 detectadas anteriormente (Figura 110D, Figura 112E) como en el NO (Figura 112F), en este caso muy similares también a las sox2⁺ (Figura 112C, D).

- **7dpf**

Como en estadios anteriores, encontramos oligodendrocitos mbpa⁺ tanto en zonas del tracto óptico (Figura 113A, E), como en el quiasma óptico (Figura 113B, C) y en el NO (Figura 113D). En este último caso, localizamos oligodendrocitos en zonas más posteriores del NO (Figura 113D), en torno a la zona media de su recorrido. Como en anteriores ocasiones, no encontramos oligodendrocitos mbpa⁺ que expresaran sox2 (Figura 113A-B), y el análisis de los axones zn8⁺ no reveló ninguna diferencia respecto a los 6dpf (Figura 113C-D). Observamos también oligodendrocitos olig2⁺ a lo largo de la vía óptica (Figura 113A-E), así como células olig2⁺ mediales (Figura 113A, B, E).

Como hemos mencionado anteriormente, en este grupo encontramos oligodendrocitos en zonas mucho más próximas a la retina que en grupos anteriores (Figura 114A, C, D), distinguiéndose sus prolongaciones que se extienden por el NO (Figura 114A, C, D). En algunos casos, se observa incluso oligodendrocitos cuyo soma se sitúa en el cerebro extienden sus procesos por todo el NO (Figura 114A). También encontramos múltiples oligodendrocitos en zonas ventrolaterales del tracto óptico (Figura 114B), que expresaban también sox10, además de otros oligodendrocitos en zonas más dorsales del cerebro (Figura 114B). Al analizar la expresión de sox2 en estos animales, observamos algunos oligodendrocitos olig2⁺ coexpresando sox2 (Figura 114C), aunque la mayor parte de dobles marcajes los encontramos en las células de la línea media

RESULTADOS

(Figura 114A, C). En el caso del NO, localizamos múltiples células $sox2^+$, con núcleos alargados y planos, que no expresaban $sox10$ ni $olig2$ (Figura 114C). Por último, analizamos la relación con los axones $zn8^+$ (Figura 115), encontrando numerosos oligodendrocitos $sox10^+$ en contacto con los haces de axones, desde el NO hasta el techo óptico (Figura 115A, C, D). En el NO, pudimos ver cómo las

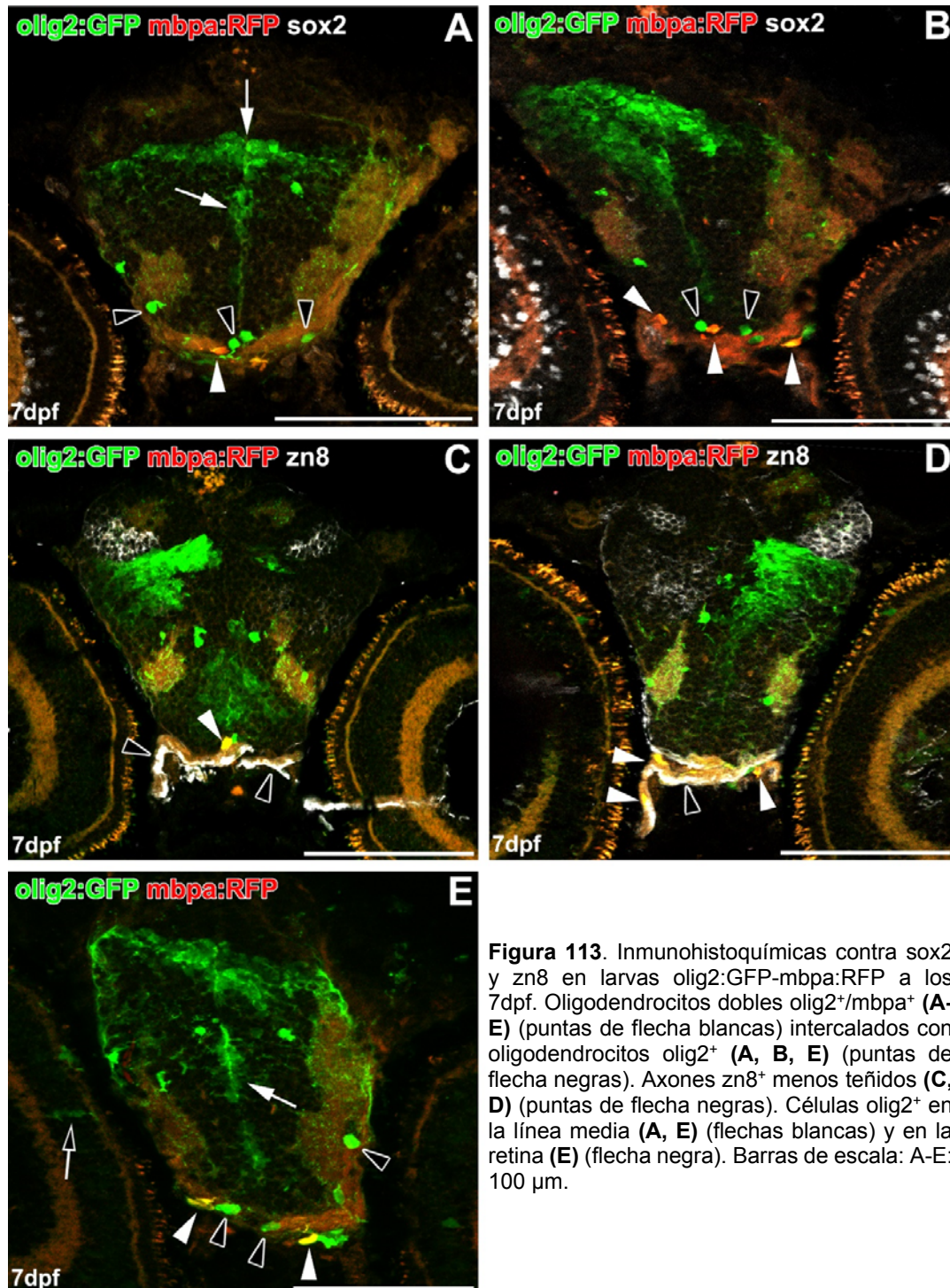


Figura 113. Inmunohistoquímicas contra $sox2$ y $zn8$ en larvas $olig2$:GFP- $mbpa$:RFP a los 7dpf. Oligodendrocitos dobles $olig2^+/mbpa^+$ (A-E) (puntas de flecha blancas) intercalados con oligodendrocitos $olig2^+$ (A, B, E) (puntas de flecha negras). Axones $zn8^+$ menos teñidos (C, D) (puntas de flecha negras). Células $olig2^+$ en la línea media (A, E) (flechas blancas) y en la retina (E) (flecha negra). Barras de escala: A-E: 100 μm .

RESULTADOS

prolongaciones de los oligodendrocitos ocupan aparentemente un dominio distinto al ocupado por los axones $zn8^+$ (Figura 115A, B), aunque en otras zonas parecen intercalar sus núcleos entre los axones (Figura 115A). En todo caso, los encontramos a lo largo del NO (Figura 115A, C) pero no en la retina. En la retina pudimos distinguir, como en grupos anteriores, células $sox10^+$ situadas en las zonas más vitreales y más esclerales de la CNI (Figura 115C, D), pero en ningún caso en contacto con los axones $zn8^+$ o la CCG. También encontramos numerosas células $pax2^+$ en los NO (Figura 115B), con núcleos alargados y planos similares a los descritos con $sox2$ (Figura 114C), que pudimos detectar en el comienzo del NO en la retina (Figura 115D).

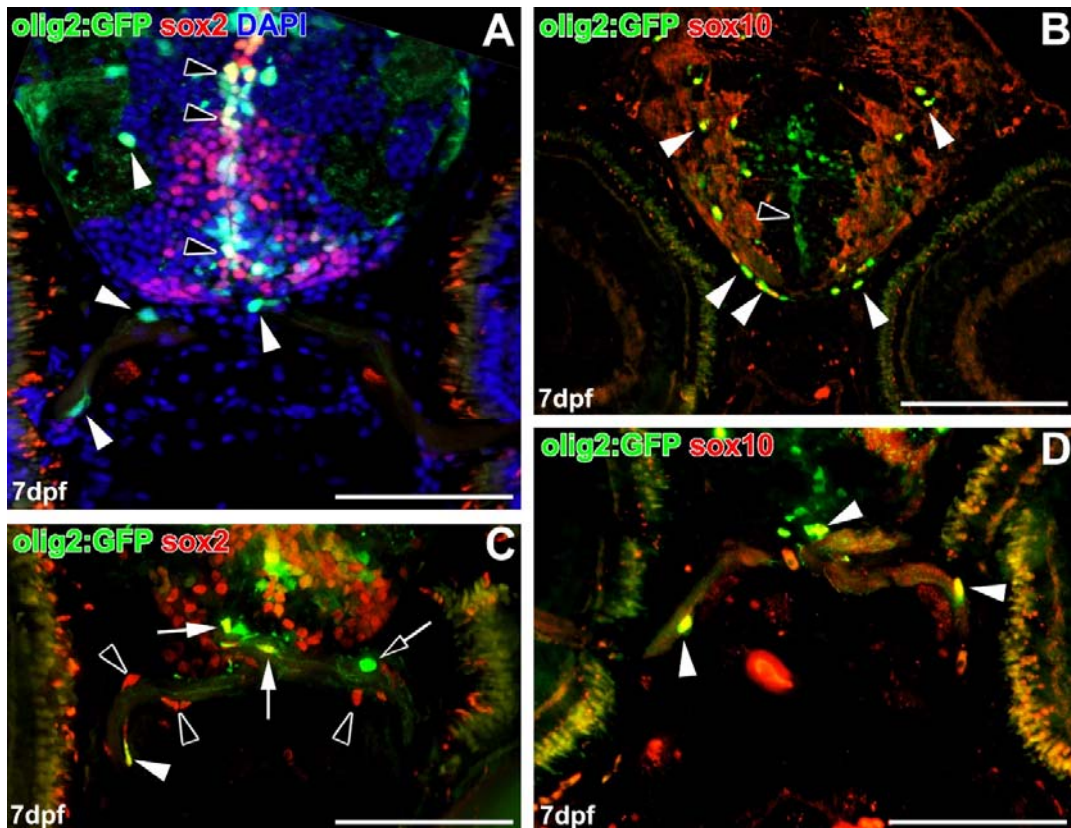


Figura 114. Dobles marcajes $sox2$ y $sox10$ en larvas $olig2:GFP$ a los 7dpf. Oligodendrocitos $olig2^+$ (A) (puntas de flecha blancas) en el NO y tractos ópticos. Algunos de ellos doblemente marcados $olig2^+/sox2^+$ en el NO (C) (punta de flecha blanca) y en el QO (flechas blancas); otros $olig2^+/sox10^+$ (B, D) (puntas de flecha blancas) a lo largo de la vía visual; oligodendrocitos únicamente $olig2^+$ en el NO (C) (flecha negra). Células $olig2^+/sox2^+$ en la línea media (A, B) (puntas de flecha negras). Barras de escala: A, C, D: 50 μm ; B: 100 μm .

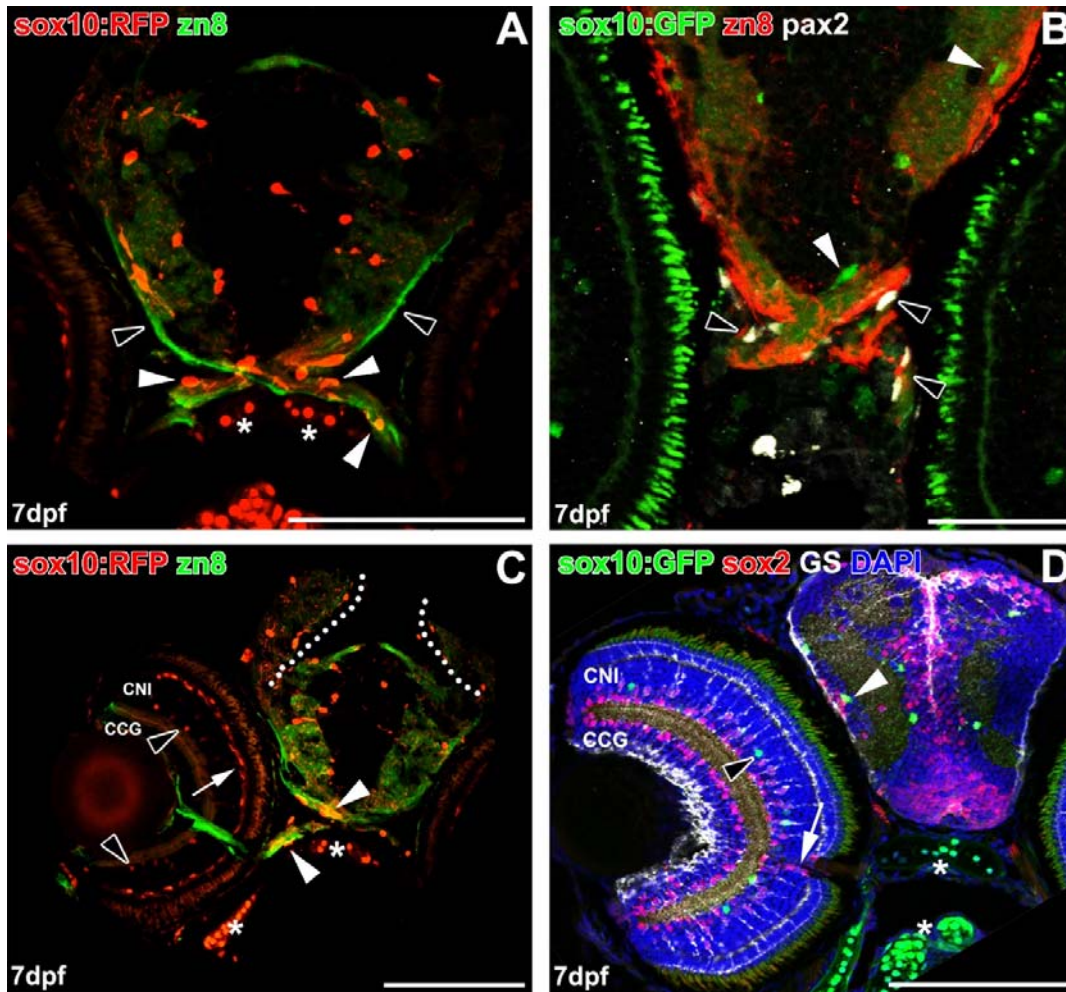


Figura 115. Larvas *sox10:GFP* o *sox10:RFP* a los 7dpf. Oligodendrocitos *sox10*⁺ en el NO (**A**, **B**, **C**) (puntas de flecha blancas) y en el techo óptico (**C**) (línea de puntos). Sus procesos se intercalan con axones *zn8*⁺ (**A**) (puntas de flecha negras). Células *pax2*⁺ en el NO (**B**) (puntas de flecha negras), de morfología similar a las *sox2*⁺ (**D**) (flecha blanca). Células *sox10*⁺ en la CNI de la retina (**C**, **D**), de soma redondeado (puntas de flecha negras) o en contacto con la CNE (flecha blanca). El asterisco (*) indica cartilago *sox10*⁺. Barras de escala: A, C, D: 100 μ m; B: 50 μ m.

- **10dpf**

El siguiente grupo que analizamos fue a los 10dpf. La mayor diferencia observada con respecto a los anteriores grupos es que detectamos oligodendrocitos en mayor número en el NO, así como sus prolongaciones en mayor número y complejidad (Figura 116A-D). Utilizamos ejemplares dobles transgénicos *olig2:GFP-sox10:RFP*, en los que encontramos oligodendrocitos *olig2*⁺/*sox10*⁺ desde el NO (Figura 116A, B), con núcleos redondeados u ovalados y con numerosas prolongaciones que se adentran a lo largo del NO (Figura 116A, B). También los detectamos en zonas caudales del quiasma óptico

RESULTADOS

(Figura 116C), donde sus núcleos adquieren una forma alargada y a veces se disponen en parejas (Figura 116C). Tras el quiasma, continúan por el tracto óptico (Figura 116C, D) donde nuevamente observamos una morfología alargada. Finalmente, también los localizamos en el techo óptico (Figura 116D). Como en anteriores estadios, observamos células olig2⁺ en la línea media del cerebro (Figura 116). En algunos casos, pudimos observar células olig2⁺ que parecen separarse de la línea media (Figura 116A, C; Figura 117A, B), algunas de las cuales incluso expresan sox10 (Figura 117C, E).

También realizamos inmunohistoquímicas contra GS en estos animales (Figura 117A, B), encontrando oligodendrocitos en estrecho contacto con

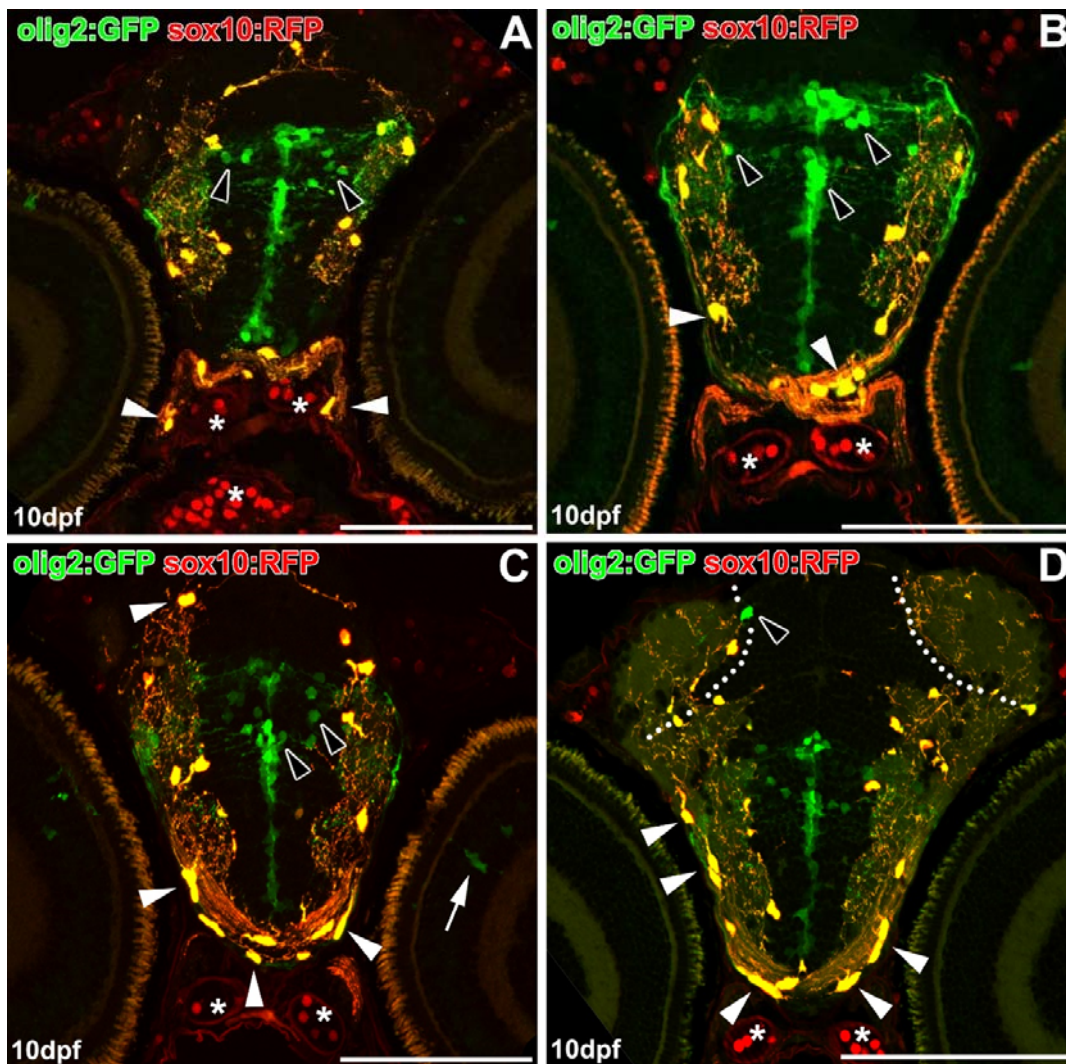


Figura 116. Larvas dobles transgénicas olig2:GFP-sox10:RFP a los 10dpf. Oligodendrocitos dobles olig2⁺/sox10⁺, desde el NO (A), QO (B) y tractos ópticos (C, D) (puntas de flecha blancas) hasta el techo óptico (D) (línea de puntos). Células olig2⁺ tanto en la línea media como aparentemente migrando desde ella (A-C) (puntas de flecha negras). Oligodendrocitos olig2⁺ en el techo óptico (D) (punta de flecha negra). El asterisco (*) indica cartilago sox10⁺. Barras de escala: A-D: 100 μ m.

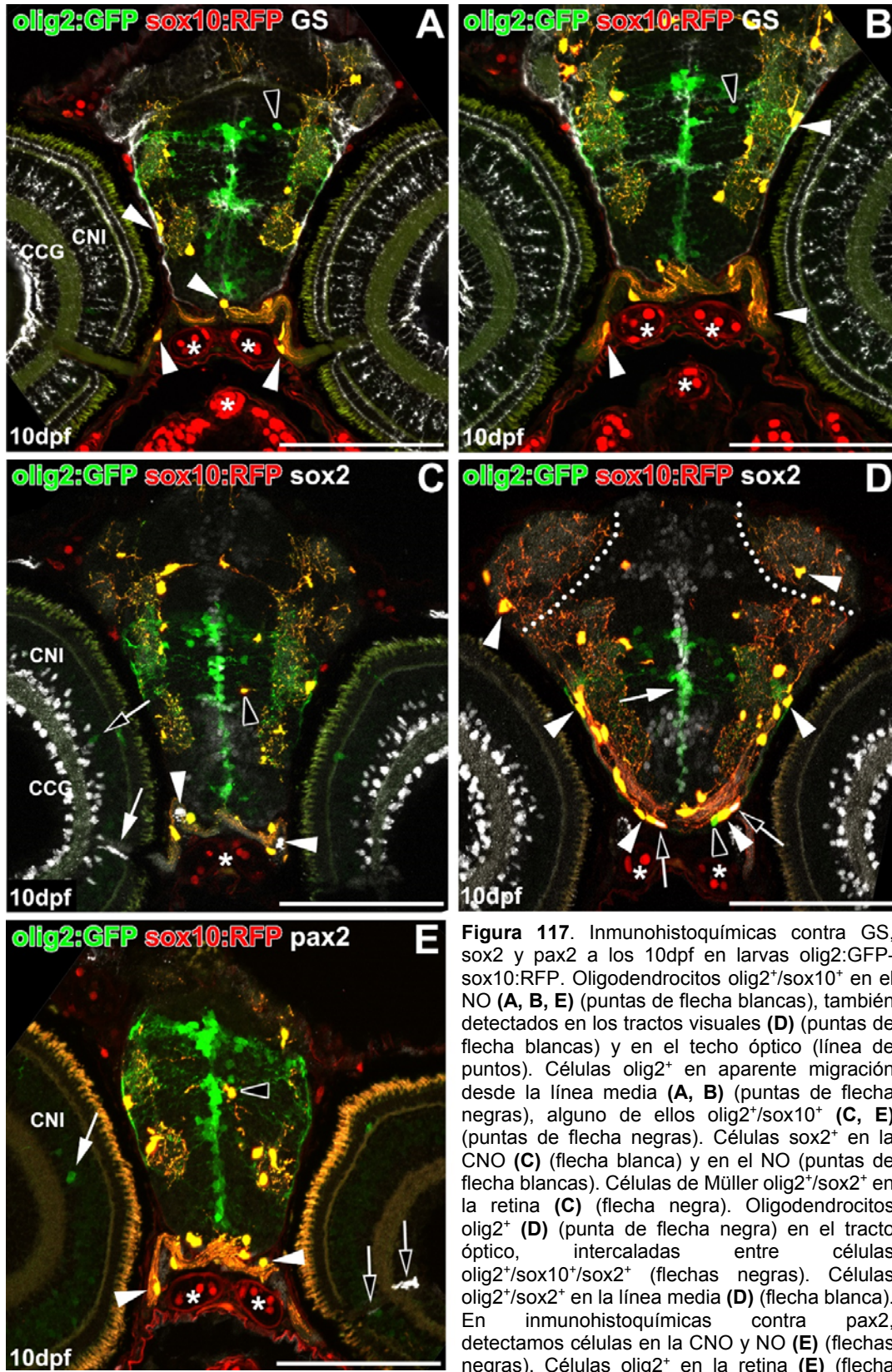


Figura 117. Inmunohistoquímicas contra GS, sox2 y pax2 a los 10dpf en larvas olig2:GFP-sox10:RFP. Oligodendrocitos olig2⁺/sox10⁺ en el NO (**A, B, E**) (puntas de flecha blancas), también detectados en los tractos visuales (**D**) (puntas de flecha blancas) y en el techo óptico (línea de puntos). Células olig2⁺ en aparente migración desde la línea media (**A, B**) (puntas de flecha negras), alguno de ellos olig2⁺/sox10⁺ (**C, E**) (puntas de flecha negras). Células sox2⁺ en la CNO (**C**) (flecha blanca) y en el NO (puntas de flecha blancas). Células de Müller olig2⁺/sox2⁺ en la retina (**C**) (flecha negra). Oligodendrocitos olig2⁺ (**D**) (punta de flecha negra) en el tracto óptico, intercaladas entre células olig2⁺/sox10⁺/sox2⁺ (flechas negras). Células olig2⁺/sox2⁺ en la línea media (**D**) (flecha blanca). En inmunohistoquímicas contra pax2, detectamos células en la CNO y NO (**E**) (flechas negras). Células olig2⁺ en la retina (**E**) (flecha blanca). El asterisco (*) indica cartilago sox10⁺. Barras de escala: A-E: 100 μm.

RESULTADOS

procesos GS⁺ en los márgenes del tracto óptico (Figura 117A, B), pero no distinguimos triples marcajes en ninguna localización. Con el marcaje para sox2 no observamos oligodendrocitos triplemente marcados en el NO (Figura 117C), donde en cambio sí que detectamos células únicamente sox2⁺. Sin embargo, sí que observamos oligodendrocitos sox2⁺ en la zona más ventral del tracto óptico, junto a oligodendrocitos olig2⁺/sox10⁺ e incluso únicamente olig2⁺ (Figura 117D).

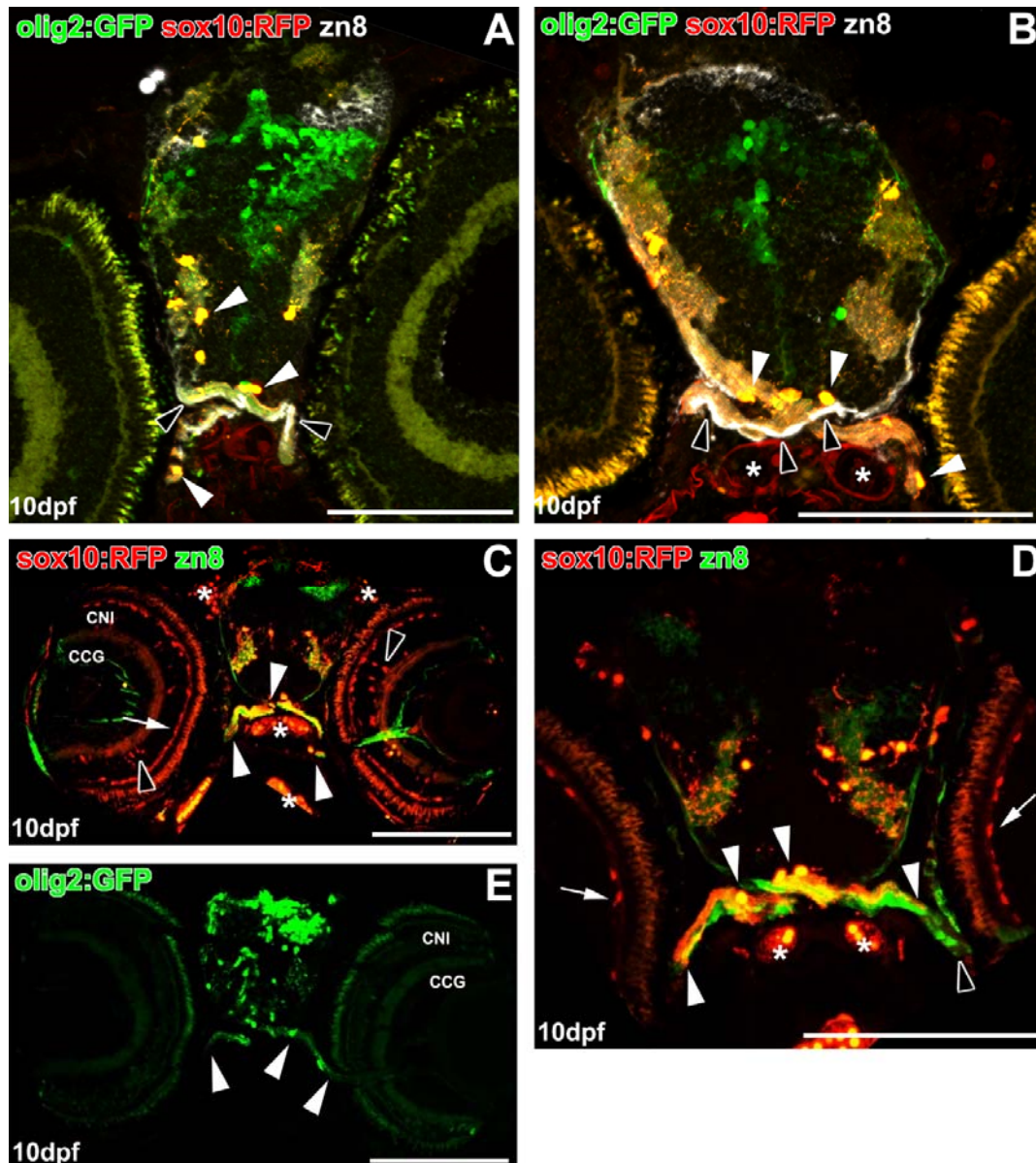


Figura 118. Inmunohistoquímica anti-zn8 en larvas olig2:GFP-sox10:RFP a los 10dpf. Oligodendrocitos olig2⁺/sox10⁺ (A, B) (puntas de flecha blancas) sin colocalizar con los axones zn8⁺ (puntas de flecha negras). Resultados similares (C, D), donde los procesos sox10⁺ (puntas de flecha blancas) y los axones zn8 (D) (puntas de flecha negras) no se solapan. Células sox10⁺ en la CNI de la retina (C) (puntas de flecha negras), algunas en posición más escleral (D) (flechas blancas). Oligodendrocitos próximos a la entrada de la retina (E) (puntas de flecha blancas). El asterisco (*) indica cartilago sox10⁺. Barras de escala: A-E: 100 μ m.

Finalmente, al analizar la expresión de *pax2* encontramos células marcadas en la CNO y en el comienzo del NO (Figura 117E), con igual morfología y localización que los encontrados en las inmunohistoquímicas para *sox2* (Figura 117C).

Por último, estudiamos los oligodendrocitos junto a los axones *zn8*⁺ (Figura 118A-D), donde volvimos a comprobar cómo la extensión del marcaje de *zn8* era menor respecto al NO (Figura 118A, B, D), y que no se solapa con los procesos de los oligodendrocitos (Figura 118B, D), que se extendían por casi toda la longitud del NO. En algunas ocasiones pudimos visualizar oligodendrocitos en el NO en el límite con la retina (Figura 118E), pero sus procesos no se extendían más allá de este límite. También seguimos observando células *sox10*⁺ en la CNI de la retina (Figura 118C), sin contacto con los axones *zn8*.

- **11dpf**

El penúltimo grupo de larvas que estudiamos fue a los 11dpf. Analizamos dobles transgénicos *olig2:GFP-mbpa:RFP*. En líneas generales, las mayores diferencias observadas con respecto a los 7dpf fueron el mayor número de oligodendrocitos *mbpa*⁺ presentes a lo largo de la vía visual, así como un mayor número y complejidad en sus prolongaciones, aunque, como a los 10dpf, no localizamos ningún oligodendrocito en la retina.

Así, en el NO observamos de dos a tres oligodendrocitos *olig2*⁺/*mbpa*⁺ (Figura 119A, C, D) por sección, pudiendo detectar fácilmente sus prolongaciones, que se extienden por casi toda la longitud del NO (Figura 119A, C, D). También encontramos muchos más oligodendrocitos en el quiasma y en los tractos ópticos (Figura 119B, E), con núcleos alargados o redondeados y en estrecho contacto con oligodendrocitos únicamente *olig2*⁺ (Figura 119B, E). En ningún caso detectamos oligodendrocitos en la retina, aunque sí localizamos células *olig2*⁺ en la CNI (Figura 119A, C, D, F), que, al menos en algunos casos, son células de Müller (Figura 119A). También continuamos observando células *olig2*⁺ en la línea media del cerebro (Figura 119B, D, E), lo mismo que células *olig2*⁺ que parecen migrar desde la zona medial hacia zonas laterales (Figura 119E).

RESULTADOS

También realizamos inmunohistoquímicas contra sox2 (Figura 119A, B), pero no observamos células triplemente teñidas ni en el NO ni en las vías ópticas (Figura 119A, B). En el caso de pax2 (Figura 119C, D, F), detectamos múltiples

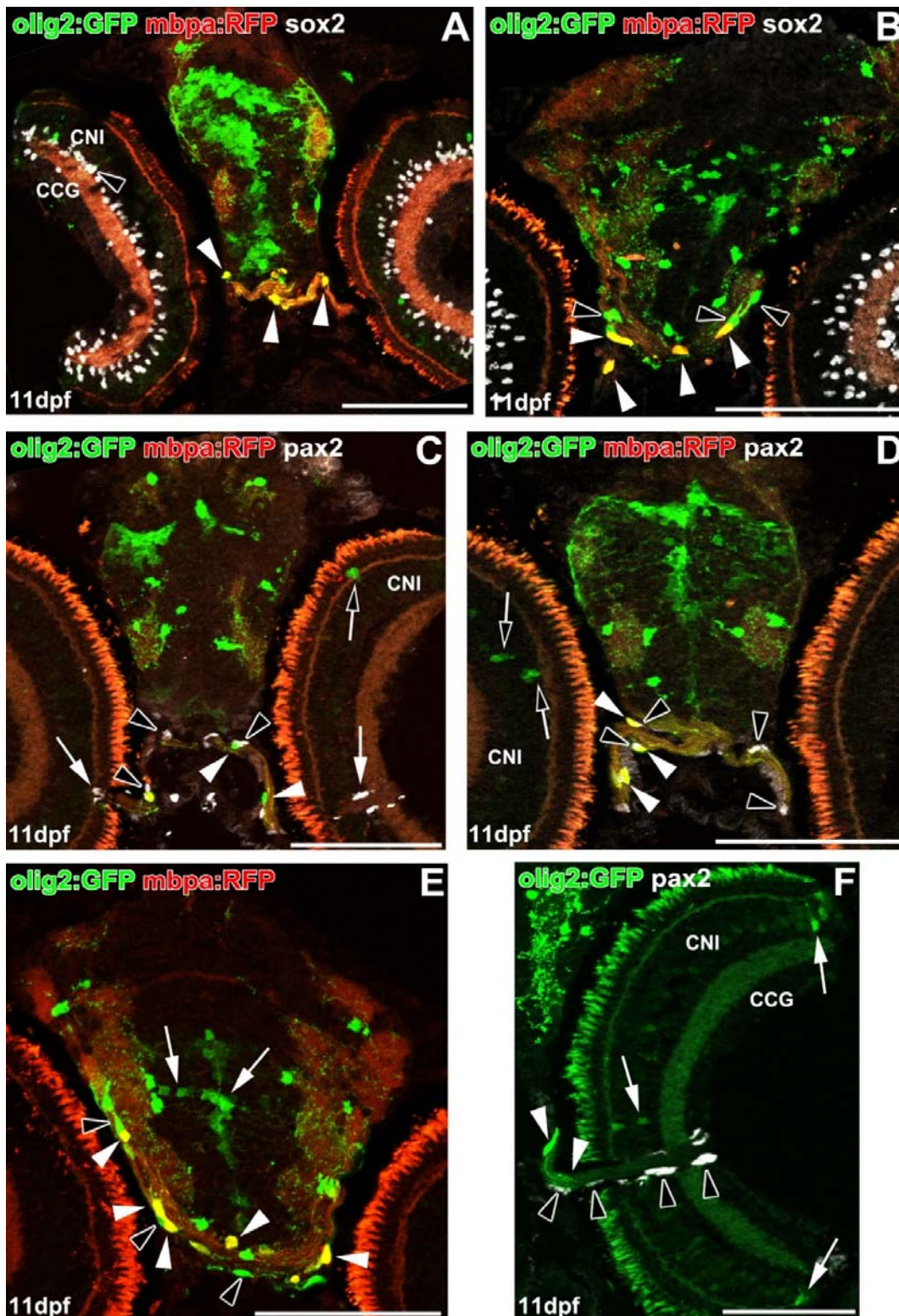


Figura 119. Inmunohistoquímicas contra *sox2* y *pax2* en animales *olig2:GFP-mbpa:RFP* a los 11dpf. Oligodendrocitos *olig2*⁺/*mbpa*⁺ en el NO (**A**, **D**), tractos ópticos (**B**, **E**) (puntas de flecha blancas), además de oligodendrocitos únicamente *olig2*⁺ (**B**) (puntas de flecha negras), (**C**) (puntas de flecha blancas). Células *sox2*⁺ en la retina (**A**) (punta de flecha negra). Células *pax2*⁺ en el NO (**C**, **D**, **F**) y CNO (**C**) (flechas blancas). Como en anteriores estadios, células *olig2*⁺ en la retina (**C**, **D**) (flechas negras), en la línea media (**E**) (flechas blancas) y en la ZPG (**F**) (flechas blancas). Detectamos oligodendrocitos en el NO (**F**) (puntas de flecha blancas) extendiendo sus procesos hacia la retina pero sin entrar en ella. Barras de escala: A-E: 100 μ m; F: 50 μ m.

RESULTADOS

células $pax2^+$, con núcleos aplanados, en el NO (Figura 119C, D), a veces en estrecho contacto con los oligodendrocitos (Figura 119D). También encontramos células $pax2^+$ en la CNO y en el comienzo del NO (Figura 119C, F), donde pudimos observar

cómo los procesos de los oligodendrocitos presentes en el NO no llegan a penetrar en la retina (Figura 119F).

- **14dpf**

El último grupo de larvas que estudiamos fue a los 14dpf. Utilizamos ejemplares $olig2:GFP$, a los que realizamos inmunohistoquímicas contra $sox2$. En estas

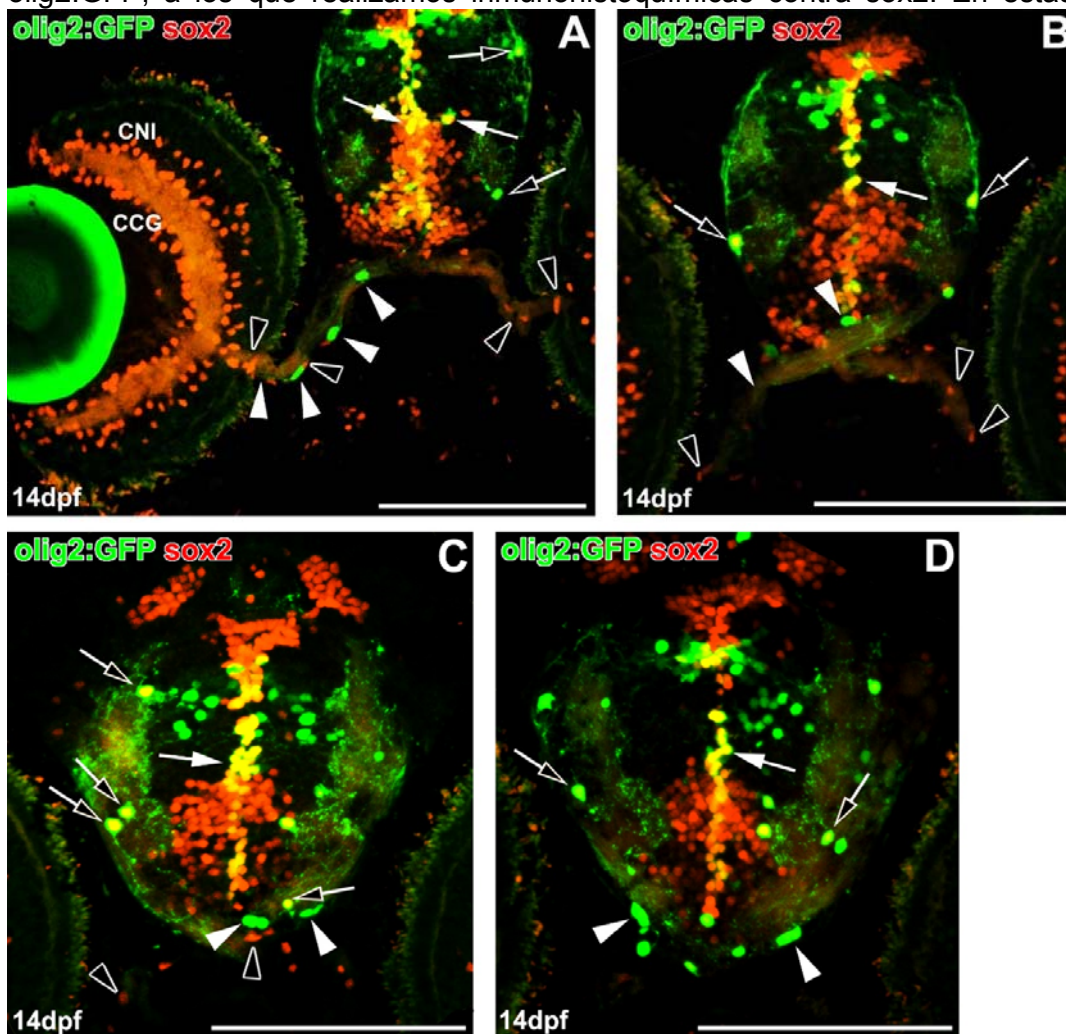


Figura 120. Inmunohistoquímicas para $sox2$ en larvas $olig2:GFP$ de 14dpf. Oligodendrocitos $olig2^+$ en el NO (**A, B**) (puntas de flecha blancas), pero sin entrar en la retina. Sus procesos se extienden desde el cerebro hasta el NO (**B**) (puntas de flecha blancas). También los detectamos en el tracto óptico (**C, D**) (puntas de flecha blancas). Algunos de ellos expresaban $sox2$ (**A-D**) (flechas negras), aunque en la línea media también observamos células $olig2^+/sox2^+$ (**A-D**) (flechas blancas). En el NO detectamos células únicamente $sox2^+$ (**A-C**) (puntas de flecha negras). Barras de escala: A-D: 100 μm .

RESULTADOS

larvas detectamos algunos oligodendrocitos en el NO (Figura 120A), cuyos procesos se extienden por toda su longitud, y que quedan excluidos de la retina (Figura 120A), aunque parecen emitir algunos de ellos hacia su interior. También encontramos oligodendrocitos con procesos ramificados en el quiasma óptico (Figura 120B), así como en zonas más caudales (Figura 120C) y en los tractos ópticos (Figura 120C, D). En algunos casos, observamos colocación con *sox2* (Figura 120A-D), aunque no en todos los oligodendrocitos. Localizamos células únicamente marcadas con *sox2* en el NO (Figura 120A, B, C), además de en otras zonas del cerebro (Figura 120A-D), aunque las células *olig2*⁺ de la línea media colocación, en su mayor parte, con *sox2* (Figura 120A-D). De estas células, una vez más, pudimos observar algunas *olig2*⁺ en aparente migración (Figura 120A, C, D), que en ocasiones también expresaban *sox2* (Figura 120A).

*“How often have I said to you that
when you have eliminated the impossible,
whatever remains, however improbable,
must be the truth?”*

Sherlock Holmes
El signo de los 4
Sir Arthur Conan Doyle

Discusión

En la presente Tesis Doctoral hemos caracterizado inmunohistoquímicamente los oligodendrocitos y analizado su papel en el sistema visual del pez cebra en condiciones control y tras el pinzamiento del NO. Para ello hemos utilizado, entre otros, ejemplares transgénicos que nos permitieron identificar los oligodendrocitos sin necesidad de realizar técnicas inmunohistoquímicas contra sus proteínas específicas. Realizamos, además, un análisis de la expresión génica a lo largo del proceso de regeneración que nos permitió identificar genes que parecen contribuir en gran medida a este fin. También hemos analizado la aparición y evolución de los oligodendrocitos en el sistema visual, estudiando larvas de distintos estadios de desarrollo de ejemplares transgénicos, además de caracterizar las poblaciones gliales presentes en la vía óptica durante el desarrollo.

En los últimos años los trabajos publicados sobre el sistema nervioso del pez cebra han aumentado considerablemente, publicándose una media de casi 300 al año. Su pequeño tamaño, su fácil cría y reproducción, junto a su facilidad de manipulación genética lo han convertido en un modelo ideal no sólo para estudios del desarrollo del sistema nervioso sino también como modelo de estudio de patologías de individuos adultos.

Así, en nuestro trabajo de Tesis Doctoral quisimos utilizar este modelo animal para estudiar una de las poblaciones macrogliales más importantes del sistema nervioso: los oligodendrocitos. Para ello, utilizamos ejemplares adultos de la estirpe AB y líneas transgénicas (olig2:GFP; sox10:GFP; sox10:RFP; mbpa:RFP; gfap:GFP) que nos permitieron caracterizar estas células, responsables de la formación de las vainas de mielina en el sistema visual, desde la retina hasta el NO.

1. Caracterización inmunohistoquímica. Los oligodendrocitos de la vía visual en condiciones control.

El primer estudio que realizamos fue una caracterización inmunohistoquímica. Trabajos previos en nuestro laboratorio con ejemplares de carpín dorado habían demostrado la presencia de oligodendrocitos sox10⁺ en la vía visual (Parrilla, 2010; Parrilla *et al.*, 2016). En nuestro caso, en vez de utilizar un anticuerpo anti-sox10 no comercial como el que se usó en los citados trabajos, utilizamos un

DISCUSIÓN

anticuerpo comercial específico de pez cebra del que, hasta el momento del comienzo de la presente Tesis, no existían referencias en la bibliografía. Al realizar las inmunotinciones, comprobamos que los resultados obtenidos se correspondían a lo observado en el carpín, en cuanto a la abundancia, morfología y disposición de estas células. Es más, utilizamos dos de los anticuerpos disponibles, que se diferenciaban en la región que reconocían de la proteína (ver Material y Métodos), eligiendo finalmente el que mejores prestaciones nos garantizaba.

Para comprobar que nuestro anticuerpo marcaba realmente los oligodendrocitos, utilizamos ejemplares transgénicos *olig2:GFP* (Shin *et al.*, 2003). El estudio de estos animales se realizó durante la estancia en el laboratorio del Prof. Bruce Appel. Comprobamos que la totalidad de las células $sox10^+$ que marcaba nuestro anticuerpo eran oligodendrocitos *olig2:GFP*, cuya presencia en el sistema visual del pez cebra ha sido ampliamente descrita (Münzel *et al.*, 2012, 2014; Tian *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2013). Además, el estudio comparado de tinciones inmunohistoquímicas de estos animales junto con las realizadas con el anticuerpo anti- $sox10$ nos mostró los mismos resultados, detectando los oligodendrocitos $olig2^+/sox10^+$ como células GS^+ (ver *Oligodendrocitos GS^+ en la vía visual*). Por lo tanto podemos concluir que nuestro anticuerpo anti- $sox10$ comercial reconoce los oligodendrocitos del sistema visual del pez cebra.

Por lo tanto, comprobamos la presencia de numerosos oligodendrocitos $sox10^+$ en la retina, CNO y el NO. Estos oligodendrocitos se disponían formando hileras o filas, componiendo a veces grupos de células de mayor o menor complejidad. Esta disposición se hacía cada vez más compleja en la retina conforme nos encontramos en las proximidades de la CNO.

La presencia de oligodendrocitos intrarretinales en los peces no es una cuestión desconocida. Existen trabajos que describen estas células en diversos grupos animales, como aves (Won *et al.*, 2000), reptiles (Fujita *et al.*, 2000), anfibios (Kalinina, 1983) y peces (Lillo *et al.*, 1998; Münzel *et al.*, 2012, 2014; Parrilla *et al.*, 2016; Wolburg, 1980). También se ha descrito su disposición en filas y columnas (Ankerhold y Stuermer, 1999; Parrilla, 2010; Parrilla *et al.*, 2016). Esta disposición, junto a la presencia de una indentación nuclear característica, nos ayudó a diferenciar los núcleos de los oligodendrocitos en preparaciones en

las que no los podíamos marcar debido a limitaciones de la técnica inmunohistoquímica.

Tras comprobar la especificidad de nuestro marcaje, y de que nuestras observaciones se sustentaban en lo descrito previamente en la bibliografía, realizamos distintas tinciones inmunohistoquímicas para caracterizar los oligodendrocitos sox10⁺. Así, detectamos oligodendrocitos sox10⁺/GS⁺ en la CNO y en el NO. En la retina, debido a la presencia de los abundantes procesos GS⁺ de las células de Müller, fue difícil distinguir este doble marcaje. Sin embargo, en preparaciones *in toto* pudimos observar cómo los procesos vitreales de estas células se intercalaban con los oligodendrocitos sox10⁺. Además, localizamos únicamente el marcaje de la GS en los oligodendrocitos sox10⁺, no detectándolo ni en los astrocitos pax2 ni en las células sox2, salvo en las proximidades de la zona pinzada del NO a los 7dp. También confirmamos este marcaje GS⁺ al utilizar ejemplares olig2:GFP, donde observamos células olig2⁺/GS⁺ en la CNO y NO. Por otra parte, detectamos ARNm correspondiente a tres parálogos del gen específico de la GS del pez cebra, *glula*, *glulb* y *glulc* (Dhanasiri *et al.*, 2012), tanto en la retina (que en el caso de las qPCR incluía la CNO) como en el NO.

- *Oligodendrocitos GS⁺ en la vía visual.*

La presencia de la GS en los oligodendrocitos ha sido ampliamente descrita en mamíferos, tanto en estudios *in vitro* (Baas *et al.*, 1998; Fressinaud *et al.*, 1991) como en secciones de tejido (Anlauf y Derouiche, 2013; Bernstein *et al.*, 2014; D'Amelio *et al.*, 1990; Miyake y Kitamura, 1992; Rai *et al.*, 2013; Tansey *et al.*, 1991), incluso en el NO de mamíferos (Domercq *et al.*, 1999; Jennings *et al.*, 2002; Kawano, 2015). En trabajos anteriores de nuestro grupo, detectamos oligodendrocitos GS⁺ en el NO del carpín dorado (Parrilla *et al.*, 2009; Parrilla, 2010), a pesar de que los resultados variaban según la fijación utilizada. No obstante, también mediante *western blot* observamos la proteína GS en el NO tanto del carpín como del pez cebra (Parrilla *et al.*, 2009). En la presente tesis doctoral hemos utilizado el mismo anticuerpo, y el protocolo de fijación fue más ligero que el utilizado anteriormente (Parrilla, 2010). Así conseguimos detectar siempre la GS en la CNO y NO, y la inmunorreactividad del resto de marcadores

DISCUSIÓN

no resultó afectada (ver discusión de cada marcador más adelante). Además, empleamos ejemplares olig2:GFP donde encontramos que todas las células GFP⁺ coexpresaban GS. Por último, existen también artículos en los que se describe la expresión de GS en las células mielinizantes del SNP, las células de Schwann (Miller *et al.*, 2002; Saitoh y Araki, 2010). Así, todos los datos parecen apuntar a que verdaderamente los oligodendrocitos sox10 de la CNO y el NO del pez cebra son células GS⁺.

Por otra parte, para comprobar la especificidad del marcaje de sox10 y GS, y descartar algún fallo en la inmunorreactividad del tejido, tanto en ejemplares AB como en los ejemplares olig2:GFP, decidimos probar un anticuerpo comercial anti-olig2 específico de pez cebra del que tampoco existían registros en la bibliografía. Así, con nuestro protocolo de fijación suave, pudimos observar oligodendrocitos olig2⁺ en la retina, CNO y NO, con la misma disposición que lo descrito para el anticuerpo anti-sox10, y que también expresaron GS⁺ en la CNO y NO. Por último, probamos el anticuerpo anti-olig2 con ejemplares olig2:GFP, donde encontramos una total colocalización en retina, CNO y NO.

- *Oligodendrocitos ZO1⁺*

Por otra parte, encontramos que los oligodendrocitos en la CNO y NO expresan el marcador de uniones celulares ZO1. Sin embargo, no encontramos colocalización con GFAP ni con el marcador de axones en crecimiento, zn8. Al utilizar el marcador de astrocitos reticulares, la ck, observamos los procesos ck⁺, que aparecían a partir de la transición CNO-NO, en estrecho contacto con los oligodendrocitos. Detectamos resultados similares con el anticuerpo zrf1, que marca específicamente la GFAP del pez cebra.

También observamos células sox2⁺ y pax2⁺ que colocalizaron con los procesos ck⁺. Además, encontramos células sox2⁺/ZO1⁺ en el NO, junto con células sox2⁺/GFAP⁺ o zrf1⁺. La coincidencia en estos dobles marcajes de sox2 y pax2 con la ck se discutirá más adelante.

La proteína ZO1 (zónula occludens 1) ha sido descrita en células que presentan este tipo de uniones celulares (Willott *et al.*, 1992), así como en las uniones adherentes de las células de Müller (Herranz, 2009), formando la MLE. En el caso del NO de teleósteos, se ha descrito en los astrocitos reticulares del

NO (Mack y Wolburg, 2006; Maggs y Scholes, 1990; Parrilla *et al.*, 2013). Sin embargo, en mamíferos también se expresa en oligodendrocitos (Boggs *et al.*, 2014; van Meeteren *et al.*, 2006; Penes *et al.*, 2005) y en células de Schwann (Alanne *et al.*, 2009). En el pez cebra se ha descrito la expresión de ZO1 en oligodendrocitos de la médula espinal (Münzel *et al.*, 2012) y también en distintas estructuras del SNC durante el desarrollo (Hudish *et al.*, 2013; Santos-Ledo *et al.*, 2013). Así, la expresión de ZO1 en los oligodendrocitos de la CNO y NO no parece ser un hecho aislado. Por último, la interacción con los procesos ck^+ de los astrocitos reticulares muestra la íntima relación que parece existir entre ambos tipos de glía en el NO de los teleósteos. Cabe destacar que, hasta la fecha, no hemos encontrado estudios en los que se detalle la expresión de ck en oligodendrocitos en teleósteos (Koke *et al.*, 2010), aunque se ha descrito la presencia de estos filamentos intermedios en líneas celulares de oligodendrocitos de mamíferos (Campagnoni *et al.*, 2001; Kashima *et al.*, 1993).

2. Oligodendrocitos *sox10* y *olig2* tras el pinzamiento del NO.

Tras caracterizar los oligodendrocitos $sox10^+$ en condiciones control, realizamos el pinzamiento del NO derecho para comprobar la respuesta de estas células. Como en el pez cebra las células ganglionares no mueren tras una lesión del NO (Zou *et al.*, 2013), es posible estudiar la regeneración y remielinización de éstas en un entorno estable.

- *Sox10*

Encontramos un fuerte aumento en la densidad celular de los oligodendrocitos $sox10^+$ en la retina, CNO y NO ya desde los 2dp. Sin embargo, a lo largo del tiempo no encontramos diferencias en la densidad celular en la CNO y NO, mientras que en la retina este aumento se mantuvo hasta los 60dp, momento en el que recuperamos los valores control. Estas variaciones, sin embargo, contrastan con lo observado en el análisis mediante qPCR. Así, en la retina (que incluye la CNO en este caso, al no ser posible disociarlas manualmente) la expresión de *sox10* disminuyó drásticamente desde los 2dp hasta los 21dp, donde los valores no resultaron diferentes estadísticamente. Por el contrario, la expresión de *sox10* en el NO disminuyó a los 2dp pero aumentó en el resto de

DISCUSIÓN

tiempos estudiados, hasta los 21dp. Este comportamiento opuesto entre la retina y NO se comprobó también al analizar la expresión de otros genes, como *olig2*.

Estos resultados contrastan en parte con los que habíamos observado previamente en el carpín dorado (Parrilla *et al.*, 2016), donde existía una disminución de la densidad de oligodendrocitos *sox10* en la CNO desde los 7d hasta los 21dp, mientras que no existían cambios en la retina. Por lo tanto, en el caso del carpín, la disminución en la densidad es similar a la que observamos en la expresión de *sox10* en la retina del pez cebra, aunque en nuestro caso la CNO tiene una mínima contribución tisular respecto a la retina total. Por otra parte, en el recuento celular, el estudio en carpín no encuentra diferencias en la retina mientras que nosotros encontramos un aumento en la densidad celular. Estas diferencias en la retina probablemente estén causadas por el método de recuento, que en el caso del carpín (Parrilla *et al.*, 2016) se realizó en retinas *in toto* mientras que nosotros lo hemos realizado en secciones de tejido.

Cabe destacar que no hemos encontrado ningún estudio sobre la expresión de *sox10* tras el pinzamiento del NO en peces. Sin embargo, sí hallamos un trabajo en *Xenopus* (Sekizar *et al.*, 2015) en el que analizan el papel de los oligodendrocitos *sox10*⁺ tras un tratamiento desmielinizante. En cualquier caso, *sox10* es un factor de transcripción necesario no solo para la diferenciación de los oligodendrocitos (Stolt *et al.*, 2002, 2005; Wegner, 2008) sino también para su supervivencia una vez que han comenzado a mielinizar axones del SNC (Takada *et al.*, 2010). Además, *sox10* determina la expresión de genes relacionados con la mielina, como *mbpa* (Li *et al.*, 2007) en los oligodendrocitos, y *mpz* en las células de Schwann (Peirano *et al.*, 2000). De esta forma, la disminución de la expresión en la retina puede estar relacionada con los procesos de regeneración axonal, impidiendo la expresión de genes de la mielina, ya que los axones en crecimiento en el sistema visual no se mielinizan hasta llegar al techo óptico (Becker y Becker, 2007; Ono *et al.*, 1997, 1998; Tsai y Miller, 2002). Sin embargo, en el NO puede que esté estimulando la supervivencia de los oligodendrocitos tras la lesión, ya que es donde se ha producido la desmielinización de los axones.

- *Olig2*

Al analizar la densidad celular de los oligodendrocitos marcados con el anticuerpo anti-*olig2*, encontramos que no existía el aumento detectado en los oligodendrocitos *sox10* a los 2dp en la CNO y NO, aunque sí que observamos una disminución en sus valores a los 5dp y 7dp. De forma similar a *sox10*, también encontramos una disminución en la expresión de *olig2* en la retina desde los 2dp hasta los 7dp, volviendo a la normalidad a los 21dp. Por el contrario, en el NO no observamos cambios en la expresión de *olig2* hasta los 7dp, donde se produjo un aumento que continuaba a los 21dp. Así, al igual que para *sox10*, nos encontramos una fuerte caída en la expresión en la retina hasta los 21dp, mientras que observamos un aumento en la expresión en el NO que todavía continuaba a los 21dp. Sin embargo, el recuento celular mostró una disminución en la cantidad de células *olig2*⁺.

Estos resultados habían sido previamente descritos utilizando animales *olig2:GFP* a los que se lesionó el NO (Münzel *et al.*, 2014), donde se produjo una disminución del marcaje *olig2:GFP* desde los 4dp hasta los 21dp. Por otra parte, otro estudio no encontró cambios en la expresión de *olig2* en la retina a los 7dp tras seccionar el NO (Zou *et al.*, 2013). *Olig2* es un gen que no mantiene el linaje oligodendroglial, como *sox10* (Takada *et al.*, 2010), sino que se expresa en distintos tipos celulares durante el desarrollo y en adultos (Park *et al.*, 2002; Zannino y Appel, 2009). En experimentos en los que se lesionaban cerebros adultos de pez cebra (März *et al.*, 2011), se encontró una rápida acumulación de células *olig2*⁺ en la zona lesionada, pero que no proliferaron abundantemente. Además, *olig2* es un inhibidor de la regeneración neuronal en mamíferos (Buffo *et al.*, 2005). Todo esto parece indicar que si bien *olig2* es un gen importante en el desarrollo y especificación, junto con otros factores, del linaje oligodendroglial (Park *et al.*, 2002; Ravanelli y Appel, 2015; Zannino y Appel, 2009), su importancia en la regeneración no parece comparable a *sox10*, cuya ausencia impide el mantenimiento de los oligodendrocitos recién formados (Takada *et al.*, 2010).

DISCUSIÓN

- *Expresión de mbpa y mpz tras el pinzamiento*

Resultó sorprendente comprobar cómo en la retina la disminución de los niveles de *sox10* se corresponde con una disminución en los niveles de *mbpa* y *mpz*. Sin embargo, no encontramos la misma correlación en el NO, donde los niveles de *mbpa* y *mpz* decrecen desde los 2dp a los 5dp. Sin embargo, ya a los 7dp encontramos un aumento en su expresión. Esta bajada inicial puede deberse a la propia lesión, en la que encontramos menor inmunorreactividad para mbp en la zona pinzada (ver Resultados: mbp). Por otra parte, la disminución en la expresión de *mpz* no se corresponde a lo observado en otros estudios, ya que se ha documentado que este gen se sobreexpresa cuando existe una lesión del SNC (Bai *et al.*, 2014; Schweitzer *et al.*, 2003). No obstante, a pesar de que los estudios se han realizado utilizando técnicas de hibridación *in situ* o inmunohistoquímicas, los tiempos en los que se produjo el aumento de la expresión de *mpz* fueron más tardíos que los analizados en la presente Tesis, con lo que es probable que no detectemos la elevación en los niveles de *mpz* hasta los 28 días (Schweitzer *et al.*, 2003) o en su pico máximo a los 14 días (Bai *et al.*, 2014). También es cierto que en ambos estudios se analiza todo el NO, desde la retina hasta el cerebro, mientras que nosotros nos hemos limitado al segmento prequiasmático. Una última posibilidad es que la técnica de pinzamiento varíe entre los grupos, ya que si bien es cierto que tras cierto entrenamiento el procedimiento se realiza siempre igual, pueden existir diferencias entre los distintos grupos que expliquen las variaciones observadas.

Por otra parte, tenemos que destacar que los distintos niveles de expresión relativa de *mbpa* y *mpz* resultaron muy distintos en la retina y NO. Así, en ambos la expresión de *mbpa* fue superior a la de *mpz*, aunque los niveles en la retina resultaron inferiores a los del NO. De hecho, encontrar expresión de *mpz* en la retina fue sorprendente, ya que los oligodendrocitos intrarretinales no expresan *mpz* (Münzel *et al.*, 2012), aunque sí *mbpa* (Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2016; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2013). A pesar de esto, los niveles fueron muy bajos, casi indetectables, e inferiores a lo detectado en el NO, donde sí existe la expresión de *mpz* (Bai *et al.*, 2014; Münzel *et al.*, 2012; Schweitzer *et al.*, 2003). Por otra parte, al analizar ejemplares dobles *olig2:GFP/mbpa:RFP*, no encontramos oligodendrocitos *mbpa*⁺ en la retina, y

localizamos pocos doblemente marcados en la CNO y NO. En la bibliografía no hemos encontrado una cuantificación que nos permita comparar directamente nuestros resultados, aunque comparando con publicaciones en las que utilizan ejemplares mbpa transgénicos (Pinzon-Olejua et al. 2017) nuestros resultados parecen similares, ya que los autores no encontraron oligodendrocitos mbpa⁺ en la retina, aunque sí en la CNO y NO. Resulta aparentemente contradictorio el detectar marcaje en axones mbp en la retina pero no observar oligodendrocitos mbpa⁺ en la misma. Esto puede ser debido a que el ARNm de la mbpa se transporta específicamente por los procesos de los oligodendrocitos hasta los lugares en los que ejerce su función (Lyons *et al.*, 2009), mientras que la RFP se acumula en el citosol alrededor del núcleo. También es posible que el promotor utilizado en nuestros animales (Jung *et al.*, 2010), que es el mismo utilizado en otros estudios (Pinzon-Olejua *et al.*, 2017), no contenga otras secuencias reguladoras de la expresión de mbp que sean específicamente activadas en los oligodendrocitos retinales. Dado que el descubrimiento de que el pez cebra realmente posee dos parálogos de la mbp, que además sufren procesos de *splicing* alternativo, es relativamente reciente (Nawaz *et al.*, 2013), no podemos descartar esta última posibilidad. Una última explicación puede ser que los niveles de expresión de *mbpa* en la retina sean bajos y no se detecte su expresión porque se está evitando una mielinización excesiva de los axones, lo que dificultaría el paso de la luz por la retina (Reichenbach y Bringmann, 2015).

- *GS. Análisis de la expresión génica de glul. Función de la GS en los oligodendrocitos.*

Al examinar inmunohistoquímicas para GS y los resultados de la expresión de los tres parálogos de *glul*, encontramos que los aumentos o disminuciones en la expresión no se correlacionaban, al menos aparentemente, con un incremento o decremento de la intensidad del marcaje en las inmunohistoquímicas. Además, mientras que en la retina los niveles de *glul* disminuyeron tras el pinzamiento, el comportamiento en el NO fue mucho más variable.

Así, a lo largo del proceso regenerativo encontramos diferencias notables entre la expresión de los tres parálogos del gen *glul*, tanto en entre ellos en los diferentes tiempos analizados como entre la retina y NO. Si observamos su

DISCUSIÓN

comportamiento en la retina, basándonos en los ΔCt de los tres respecto al tiempo, encontramos que siempre *glula* se expresa más que *glulb* y a su vez que *glulc*. De hecho, *glulc* resultó casi indetectable en la retina. Sin embargo, esta situación no se mantiene en el NO, donde de partida la expresión relativa de los tres parálogos es superior a la observada en la retina. Además, la expresión de *glula*, *glulb* y *gluc* es muy similar en los controles, y *glulc* resultó el gen cuyos niveles oscilaron más de entre los tres, experimentando un fuerte descenso entre los 2dp y 5dp para luego aumentar a los 7dp y 21dp.

La GS es una enzima (EC 6.3.1.2) que se encarga de sintetizar glutamina a partir de glutamato y NH_3 , consumiendo ATP en el proceso (Suárez *et al.*, 2002). Se expresa en distintos órganos (Lie-Venema *et al.*, 1998), entre ellos el cerebro, donde su actividad es bastante alta (Wright *et al.*, 2007). Su gen, *glul*, está considerado uno de los genes funcionales más antiguos (Kumada *et al.*, 1993), y los mamíferos (humanos incluidos), poseen una isoforma y varios pseudogenes (Kuo y Darnell, 1989; Wang *et al.*, 1996). En los peces también han sido caracterizadas varias isoformas en la trucha (Murray *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2007), y en el pez cebra se han encontrado tres parálogos, *glula*, *glulb* y *glulc* (Dhanasiri *et al.*, 2012). Según las bases de datos genómicas, cada uno de estos tres parálogos posee varios transcritos, pero no todos ellos producen una proteína (Dhanasiri *et al.*, 2012). Filogenéticamente, *glula* y *glulb* se encuentran mucho más relacionados evolutivamente entre ellos y a otros genes *glul* de peces que a *glulc*, que se encuentra mucho más cerca de los genes *glul* de tetrápodos (Dhanasiri *et al.*, 2012). De forma similar, en la trucha también existen dos grandes ramas evolutivas en sus genes *glul* (Murray *et al.*, 2003). A su vez, estudios de la expresión de los distintos transcritos de los tres parálogos en cerebro, hígado y riñón tras un aumento de los niveles de amonio en el agua revelaron una respuesta diferencial de todos ellos (Dhanasiri *et al.*, 2012). Esta respuesta diferencial también se ha observado en el cerebro de la trucha (Wright *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, no obstante, no hemos comprobado las variaciones de la expresión de todos los transcritos de los genes *glul*, sino aquellos que producen una proteína. Sin embargo, sí que hemos encontrado una expresión diferencial de los tres parálogos en la retina y en el NO. En este último, las variaciones extremas sufridas por *glulc* a lo largo del proceso regenerativo pueden indicar

que este parólogo tiene importancia en el restablecimiento del NO tras el pinzamiento. De hecho, existen numerosos estudios que relacionan la variación de los niveles de expresión de *glul* en oligodendrocitos en enfermedades como la esclerosis múltiple (Werner *et al.*, 2001), y también se ha comprobado que un metabolismo anormal del glutamato está implicado en ciertos tipos de epilepsia (Eid *et al.*, 2013).

La regulación de la GS es compleja. A nivel génico se produce, entre otros, a través del propio promotor del gen *glul*, que contiene elementos de respuesta a glucocorticoides no solo en mamíferos (Eid *et al.*, 2013) sino también en peces (Dhanasiri *et al.*, 2012). Los propios niveles de amonio son capaces de producir un incremento en la expresión de *glul* en astrocitos (Suárez *et al.*, 2002) así como en el cerebro de la trucha (Wright *et al.*, 2007). Además, existen otros factores que regulan la expresión de la GS en astrocitos, entre otros: el glutamato (Suárez *et al.*, 2002), BDNF (Dai *et al.*, 2012), la insulina, el óxido nítrico (NO) (Kosenko *et al.*, 2003) y componentes de la matriz extracelular (Moreno *et al.*, 2005). También se ha sugerido que transcritos no traducidos de los distintos parálogos de *glul* en el pez cebra pueden regular su traducción (Dhanasiri *et al.*, 2012).

La principal función de la GS en el SNC es convertir el glutamato en glutamina, evitando los procesos de excitotoxicidad glutamatérgica (Ishikawa, 2013; Zou *et al.*, 2010), aunque también interviene en la producción de GABA a través de la síntesis de glutamina, así como indirectamente en el ciclo de Krebs (Albrecht *et al.*, 2007). Las principales sinapsis verticales en la retina de teleósteos son glutamatérgicas (Kageyama y Meyer, 1989; Marc *et al.*, 1990; Marc y Cameron, 2002), y se ha demostrado la presencia de receptores de glutamato en oligodendrocitos del NO de rata (Domercq *et al.*, 1999). En nuestro trabajo, hemos encontrado únicamente la expresión de GS en los oligodendrocitos, y no en astrocitos reticulares.

Tras el pinzamiento del NO, se produce un incremento en las concentraciones de glutamato en las células ganglionares de la retina (Vorwerk *et al.*, 2004) y en el NO (Nishikawa *et al.*, 2016) de mamíferos. También se ha demostrado un cambio en la expresión del transportador de glutamato GLT-1 en la retina (Mawrin *et al.*, 2003). Sin embargo, en el carpín dorado se produce una disminución de la concentración de glutamato en la retina (Lima *et al.*, 1998), donde a diferencia de los mamíferos, las células ganglionares no mueren (Zou

DISCUSIÓN

et al., 2013). Además, se ha documentado que la expresión de la GS en zonas dañadas del SNC aumenta (Nishikawa *et al.*, 2016; Romero-Alemán *et al.*, 2004; Zupanc *et al.*, 2006).

En nuestro caso, en la retina detectamos una menor expresión de *glul* tras el pinzamiento del NO, aunque los procesos GS⁺ de las células de Müller se marcaron más intensamente, posiblemente reflejando una respuesta glial ante la inflamación y no ante el glutamato. De forma similar, en el NO encontramos un fuerte aumento en el marcaje de la GS y de *glulc* a los 21dp. Así, la expresión diferencial de la GS, o de sus distintos parálogos, durante el proceso regenerativo en los oligodendrocitos parece tener gran importancia. La mayor expresión de GS a partir de los 21dp, a través de *glulc*, coincide con el comienzo de la remielinización de los axones lesionados (nuestros resultados). Se ha descrito que un incremento en la expresión de la GS en las células de Schwann promueve la mielinización, mientras que el glutamato la inhibe (Saitoh y Araki, 2010). Por lo tanto, es posible que en un primer momento, cuando se produce el pinzamiento y los axones liberan glutamato, *glulc* disminuya para evitar favorecer la mielinización, mientras que los otros parálogos disminuyen menos su expresión relativa. Esta bajada, aunque contrasta con el hecho de que el glutamato incrementa la expresión de la GS, puede ser debida al daño producido por el pinzamiento. Como además las células ganglionares disminuyen su concentración de glutamato en la retina y no mueren, la excitotoxicidad parece ser minimizada en comparación a mamíferos. Tras esta etapa inicial, los procesos regenerativos comienzan y la expresión de *glulc* aumenta para favorecer la mielinización, junto con la expresión de *mbpa*, *sox10* y *olig2*. Finalmente, a los 60dp, no encontramos cambios en los oligodendrocitos *sox10*⁺, aunque todavía observamos cambios en las células *sox2*⁺ y *pax2*⁺ (ver discusión más adelante), indicando que al menos la respuesta de los oligodendrocitos al pinzamiento parece haber concluido.

- PCNA

Respecto a la proliferación celular, encontramos pocas células *sox10*⁺ u *olig2*⁺ proliferando en condiciones control, tanto en la CNO como en el NO, mientras que no encontramos ninguna en la retina. A los 2dp observamos células tanto

olig2⁺/PCNA⁺ como sox10⁺/PCNA⁺ en el NO, especialmente alrededor de la zona lesionada. Este aumento en la cantidad de oligodendrocitos se mantuvo a los 7dp en el NO, mientras que a los 21dp y 60dp los dobles marcajes con PCNA disminuyeron hasta retomar un aspecto similar a los controles.

Los resultados que hemos observado, aunque cualitativos, coinciden con la mayoría de publicaciones en las que se analiza la proliferación en la oligodendroglía. La población de los oligodendrocitos se incrementa a partir de la proliferación de las OPCs residentes en los mamíferos (Blakemore y Keirstead, 1999; Franklin y ffrench-Constant, 2008). Estas OPCs no son oligodendrocitos maduros, sino precursores que son capaces de proliferar y mielinizar axones. Por otra parte, en estudios realizados en el carpín dorado tras pinzar el NO, se encontraron pocas células proliferativas BrdU⁺ (Ankerhold y Stuermer, 1999), al igual que PCNA⁺ (Parrilla, 2010; Parrilla *et al.*, 2016). En el pez cebra, hay estudios que muestran que tan sólo un 25% de los oligodendrocitos proliferan tras el pinzamiento (Münzel *et al.*, 2012), mientras que en estudios de axotomía del NO no se encontraron diferencias en la cantidad de células olig2⁺ en la retina (Zou *et al.*, 2013). La diferencia de protocolos de administración de BrdU y marcadores hace difícil una comparación directa, aunque las pocas células sox10⁺/PCNA⁺ u olig2⁺/PCNA⁺ observadas parecen coincidir con el marco científico general en el que los oligodendrocitos exhiben una limitada proliferación.

- OPCs en el sistema visual del pez cebra

Como hemos citado, en mamíferos la principal población proliferativa de la oligodendroglía son las OPCs. Estas células abundan en la sustancia blanca (Franklin y ffrench-Constant, 2008), y se ha comprobado en distintos modelos experimentales de desmielinización que son capaces de revertir este proceso (Groves *et al.*, 1993; Warrington *et al.*, 1993). En los peces, las diferencias bioquímicas entre las OPCs y los oligodendrocitos no están claras, debido a que no se han caracterizado marcadores típicos de OPCs de mamíferos como PDGFR α (Cohen *et al.*, 1990; Lotan y Schwartz, 1992; Park *et al.*, 2002). A pesar de eso, los estudios en desarrollo distinguen las OPCs de oligodendrocitos maduros por la expresión de *mbpa*, o *mpz* (Brösamle y Halpern, 2002; Buckley

DISCUSIÓN

et al., 2010; Czopka, 2015; Jung *et al.*, 2010; Mathews y Appel, 2016; Preston y Macklin, 2015). Sí que está claro que existen oligodendrocitos en la retina y NO al igual que la expresión de *mbp* (Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2013), pero la ausencia de marcaje de *mbpa* en los somas de los oligodendrocitos intrarretinales (Pinzon-Olejua *et al.*, 2017), como hemos comprobado también nosotros en animales *mbpa*:RFP, deja abierta la posibilidad de si estos últimos son OPCs o simplemente la expresión de *mbpa* en la retina es menor. Esta última posibilidad se refuerza al examinar los axones de las células ganglionares, que en comparación al NO, presentan una única capa de mielina recubriéndolos (Easter Jr. *et al.*, 1984; Schweitzer *et al.*, 2007; Wolburg, 1980; Zou *et al.*, 2013), por lo que puede que simplemente la presencia de *mbpa* sea menor y más difícil de detectar mediante inmunohistoquímicas en los animales transgénicos. Además, en la presente tesis hemos demostrado que los niveles de expresión relativa de *mbpa* en la retina son mucho menores que en el NO, pero son detectables.

Finalmente, un marcador asociado a las OPCs remielinizantes de mamíferos es *sox2* (Franklin y ffrench-Constant, 2008; Shen *et al.*, 2008). Hoy en día se asume que en lesiones desmielinizantes del SNC las OPCs son las encargadas de activarse, migrar y remielinizar la zona lesionada (Franklin y Goldman, 2015; Shen *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2015). En nuestro trabajo hemos detectado células *sox2*⁺ que colocalizaron con *olig2*, pero fueron muy pocas y sólo disponemos de datos de ejemplares control. No obstante, observamos células *GS*⁺/*sox2*⁺ alrededor de la zona pinzada a los 7dp. Esto podría indicar que estas OPCs estén activándose alrededor de la zona dañada para comenzar la regeneración y remielinización.

A pesar de ello, en lo que se refiere a *sox2*, encontramos numerosas células *sox2*⁺ desde la retina al NO en condiciones control. Este hecho sugiere otra posible naturaleza de estas células, que discutiremos más adelante.

- ZO1

Tras el pinzamiento del NO, observamos a los 7dp una desorganización más o menos general del NO. No detectamos las largas filas y grupos de los oligodendrocitos *sox10*⁺, y tampoco localizamos el patrón más o menos

organizado de ZO1. Sin embargo, a partir de los 21dp volvimos a encontrar un marcaje mucho más organizado, con oligodendrocitos $sox10^+/ZO1^+$ en las zonas marginales del NO, además del aspecto punteado observado en la CNO y resto del NO en los controles.

Es interesante recalcar que encontramos un marcaje muy similar en las células $sox2^+$. Así, detectamos células $sox2^+/ZO1^+$ en la zona marginal de la transición CNO-NO, además de las zonas de la limitante glial del NO, mientras que la colocalización en las células $sox2^+$ presentes en el interior del NO no resultó tan evidente, como en el caso de $sox10$.

La posibilidad de que todas estas células $sox2$ fueran también $sox10$ quedó descartada al estudiar los ejemplares $olig2:GFP$, donde sólo encontramos una pequeña cantidad de células dobles $sox2^+/olig2^+$. Además, los recuentos que hemos realizado de la densidad celular de $sox2^+$ en los controles mostraron que es mucho menor que la de $sox10$ u $olig2$, aunque resultó mucho más parecida a los resultados de $pax2$. Sin embargo, tras el pinzamiento, las células $sox2^+$ aumentaron considerablemente, sólo siendo superadas por los oligodendrocitos $sox10^+$. Por lo tanto, es bastante probable que ambos tipos celulares compartan la expresión de ZO1, aunque no tengan, al menos en los controles, un origen o características comunes.

Este hecho se refuerza al analizar la naturaleza de la proteína ZO1. Como ya mencionamos antes, ZO1 se describe no sólo en células que presentan uniones ocluyentes (Willott *et al.*, 1992), sino también en uniones adherentes (Herranz, 2009). Además, ZO1 se expresa en los astrocitos reticulares del NO de peces (Mack y Wolburg, 2006; Parrilla *et al.*, 2013), así como en oligodendrocitos de su SNC (Münzel *et al.*, 2012). Así, parece que ZO1 puede expresarse tanto en la población $sox2^+$ del NO como en los oligodendrocitos $sox10^+$. Incluso puede que existan uniones heterotípicas en el NO entre estos tipos celulares en los que esté implicada ZO1. Estas uniones heterotípicas se dan entre astrocitos y OPCs en cultivo, a través de la Cx47 (Liu *et al.*, 2017).

Una última consideración, que será discutida más adelante, es que nuestra población $sox2^+$ colocalice con los astrocitos $pax2^+/ZO1^+$. Las notables similitudes del marcaje de $sox2$ y $pax2$ junto a ZO1 y ck (Parrilla *et al.*, 2013; Parrilla, 2010) nos hacen considerar que estas células sean astrocitos reticulares, como discutiremos más adelante.

DISCUSIÓN

3. Análisis de la mielinización. Axones mbp y zn8.

Además de estudiar las características de los oligodendrocitos del sistema visual del pez cebra, quisimos analizar una proteína, mbp, que es un componente estructural imprescindible de la vaina de mielina, y que constituye en torno al 8% de las proteínas totales del SNC y SNP (Nawaz *et al.*, 2013). Para ello, utilizamos un anticuerpo específicamente diseñado contra la mbp del pez cebra (Lyons *et al.*, 2005; Parrilla *et al.*, 2016; Takada *et al.*, 2010) y que fue amablemente cedido por el Prof. Bruce Appel.

Al estudiar los animales control, observamos que el marcaje de la mbp aumentaba desde la ZPG hasta la CNO y NO. Este aumento en la cantidad de axones mielinizados desde la retina periférica a la retina central ha sido anteriormente observado en la retina de teleósteos (Bunt, 1982; Easter Jr. *et al.*, 1984), así como la expresión de mbp en la retina del pez cebra (Münzel *et al.*, 2012; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2013).

Respecto a la apariencia del marcaje de mbp en la retina, no observamos diferencias significativas en cuanto a la intensidad del marcaje con respecto al NO, aunque sí es cierto que el aspecto de los axones mbp⁺ de la retina era algo más desorganizado que en el NO. Estas diferencias, cualitativas, entre la retina y el NO se hicieron patentes a partir de la zona de transición CNO-NO. Esta transición entre la retina-CNO y el NO se ha descrito a nivel de microscopía electrónica, y constituye el lugar donde los axones sufren una transformación en su envuelta de mielina. Así, pasan de tener una única capa de mielina recubriéndolos (denominada *loose myelin* o mielina laxa) en la retina y CNO a tener varias capas de mielina en el NO (*tight myelin* o mielina densa) (Lillo *et al.*, 1998; Münzel *et al.*, 2012; Schweitzer *et al.*, 2007; Wolburg, 1980; Zou *et al.*, 2013). Esta transición en la mielina se correlaciona con el comienzo de la expresión de mpz, una proteína asociada a mielina compacta (Münzel *et al.*, 2012; Schweitzer *et al.*, 2003, 2007).

Además, al observar los oligodendrocitos GS⁺ detectamos un aumento en su cantidad a partir de la zona de transición CNO-NO, sugiriendo que el cambio en la cantidad y calidad de los axones mielinizados está relacionado con la cantidad de oligodendrocitos GS⁺ presentes. Por otra parte, en la retina observamos cómo los axones mbp⁺ quedan perfectamente confinados a la CFNO, limitada a su vez

por los procesos vitreales de las células de Müller GS⁺. Debido a que el marcaje GS⁺ en la retina es muy intenso y abundante, no fue posible distinguir posibles oligodendrocitos GS⁺, pero sí que quedó patente la aparente interrelación de algunos procesos GS⁺ con los axones mbp. Previamente, hemos mostrado esta interacción de las células de Müller con los oligodendrocitos sox10⁺ en preparaciones *in toto* (ver Resultados: sox10).

Se ha descrito que las células de Müller del conejo y del pollo expresan MOSP, una proteína específica de oligodendrocitos y de mielina (Quesada *et al.*, 2011). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que el origen de los oligodendrocitos intrarretinales del pez cebra es externo (Tian *et al.*, 2016), con lo que un posible origen a partir de las células de Müller queda descartado. Sin embargo, todavía no se ha explicado el mecanismo por el cual se mantienen las vainas de mielina laxas en la retina. Así, es posible que las células de Müller tengan alguna implicación en este proceso, ya que la zona donde las vainas de mielina comienzan a compactarse coinciden con la CNO, una estructura que en peces queda perfectamente delimitada por estas células (Lillo *et al.*, 1998). Otra posibilidad es la presencia de una lámina cribosa, que en mamíferos explica la ausencia de oligodendrocitos en la retina (French-Constant *et al.*, 1988; Perry y Lund, 1990). Los peces no poseen esta estructura (Fujita *et al.*, 2000), sin embargo, presentan una organización particular de astrocitos pax2⁺ en la salida del NO de la retina (Parrilla *et al.*, 2013; Parrilla, 2010) que detallaremos y discutiremos más adelante.

- *Análisis de la mielinización tras el pinzamiento.*

Tras el pinzamiento del NO, volvimos a encontrar diferencias entre lo observado en las inmunohistoquímicas para mbp y los resultados de la qPCR. Especialmente llamativos fueron los resultados en la retina, donde observamos una disminución de *mbpa* pese a que en las inmunohistoquímicas no detectamos cambios apreciables.

Existen pocos estudios en los que se analice la evolución tras una lesión de la expresión de *mbpa* en el sistema visual de los peces. En un trabajo previo de nuestro grupo (Parrilla *et al.*, 2016) estudiamos el marcaje de mbp en el carpín dorado tras realizar dos tipos de lesión: la crioeeliminación de la ZPG y el

DISCUSIÓN

pinzamiento del NO. La crioeeliminación de la ZPG destruye el aporte continuo de axones al sistema visual (Jimeno *et al.*, 2003; Parrilla *et al.*, 2012), tras la cual no observamos diferencias en la CNO ni NO. Por el contrario, tras el pinzamiento del NO observamos una disminución en los axones mbp⁺ a los 7dp en la CNO, que se comenzó a recuperar a partir de los 21dp. En esta Tesis, sin embargo, no hemos detectado grandes cambios en el inmunomarcaje de mbp en la CNO, aunque sí hemos observado una importante disminución en la expresión de *mbpa* en la retina-CNO en los mismos periodos. De forma similar a nuestros trabajos previos, a los 21dp también observamos zonas donde el marcaje de mbp se acumulaba en forma de gránulos, indicando mielina en degeneración (Nona *et al.*, 1998; Parrilla *et al.*, 2016).

Nuestros resultados, a nivel proteico, son similares a los observados en otro estudio (Zou *et al.*, 2013), donde no detectaron variaciones en la cantidad de mbp por *western blot* en la retina tras dañar el NO. Además, los autores describen la ausencia de variaciones ultraestructurales en la mielinización de los axones de la CFNO a los 7dp tanto tras el pinzamiento o axotomía del NO. Por otra parte, la disminución en la mielinización del NO ha sido descrita en otro trabajo (Münzel *et al.*, 2012), donde observaron una bajada de la expresión de claudina κ en el NO ya desde 3dp. Esta menor mielinización se fue recuperando progresivamente, hasta no observar diferencias a los 28dp.

Así, parece que la fase crítica en los procesos de regeneración y remielinización comienza a partir de los 7dp. Es en este punto donde hemos observado un incremento en la expresión de *mbpa*. Existen resultados similares en estudios en los que se analizó la *contactina1a* (Schweitzer *et al.*, 2003), un gen de diferenciación temprana de oligodendrocitos, así como al analizar la proteína 36k tras una axotomía del NO (Ankerhold y Stuermer, 1999). Posteriormente, la expresión de otros genes como *mpz* va en aumento (Bai *et al.*, 2014; Schweitzer *et al.*, 2003), y el proceso regenerativo ya ha concluido hacia las 4 semanas post-lesión, cuando el techo óptico ya ha sido reinervado correctamente, aunque el refinamiento de las conexiones sinápticas puede extenderse otras 4 semanas más (Becker *et al.*, 2000; Meyer, 1980). Finalmente, en estudios en los que se produce únicamente una desmielinización focal del NO mediante lisofosfatidilcolina (LPC), la remielinización concluye hacia los 28 días (Münzel *et al.*, 2014).

4. Astrocitos reticulares pax2⁺ en el sistema visual del pez cebra.

Además de los oligodendrocitos del sistema visual del pez cebra, quisimos analizar la otra gran población glial existente en el sistema nervioso: los astrocitos. Estas células están presentes en la retina y NO de mamíferos, que están vascularizadas (Fischer *et al.*, 2010), pero en el caso de los peces y en otras retinas avascularizadas, salvo alguna excepción, no se detectan en la retina (Reichenbach y Bringmann, 2015).

Sin embargo, existen estudios en los que se ha asociado la expresión de la proteína S100 a astrocitos intrarretinales de la tenca (Lillo *et al.*, 2002; Vecino *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 1997) y del carpín dorado (Parrilla *et al.*, 2012); aunque en este último trabajo se sugiere que parte de las células S100⁺ detectadas pueden ser oligodendrocitos, al igual que en otros estudios (Clemente *et al.*, 2008; Isobe *et al.*, 1984; Ludwin *et al.*, 1976; Tabuchi *et al.*, 1983). También se ha asociado la expresión de S100 a células de Schwann en el NO del carpín (Nona *et al.*, 1992, 2000). En el pez cebra, la proteína S100 se detecta en el cerebro y vía visual de ejemplares adultos, aunque no se ha comprobado su distribución en la retina (Germanà *et al.*, 2008).

En la presente tesis doctoral no hemos comprobado la expresión de S100, aunque debido a la gran cantidad de oligodendrocitos sox10⁺ que hemos detectado en la retina, junto con el hecho de que en otros teleósteos existen células S100 que se disponen en las mismas localizaciones que éstos en la retina (Parrilla *et al.*, 2012), nos sugiere que esas células S100 son oligodendrocitos. Además, existen numerosos artículos en los que se detalla extensivamente el papel de las células de Müller como la única población de astrocitos intrarretinales y que, junto con la ZPG, actúan como nichos neurogénicos en los peces (Bernardos *et al.*, 2007; Goldman, 2014; Lenkowski y Raymond, 2014; Wan y Goldman, 2016), descartando la presencia de otras células gliales implicadas en la regeneración retinal.

En todo caso, actualmente se asume que la palabra *astrocito* en peces se asocia a células gliales que expresan o no, según el tejido y momento fisiológico, GFAP, vimentina, citoqueratinas, S100 o nestina; y que han sido denominadas, por comparación directa con los mamíferos, glía radial, endimocitos o tanicitos (Cuoghi y Mola, 2009; Grupp *et al.*, 2010; März *et al.*, 2011).

DISCUSIÓN

En el caso del sistema visual de teleósteos, en el NO existe una población denominada astrocitos “reticulares”, que no poseen características ni de glía radial ni de astrocitos “puros” (Macdonald *et al.*, 1997; Maggs y Scholes, 1990, 1986) y que expresan el factor de transcripción pax2 (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009, 2012). Estos astrocitos reticulares expresan citoqueratinas en lugar de GFAP y se encuentran unidos mediante desmosomas formando parte de la limitante glial del NO (Giordano *et al.*, 1989; Koke *et al.*, 2010; Macdonald *et al.*, 1997; Maggs y Scholes, 1990, 1986; Markl y Franke, 1988). Estos astrocitos reticulares son la principal población astrogliar en el NO de teleósteos (Maggs y Scholes, 1990), y en adelante la mención hacia los astrocitos del NO se refiere a ellos.

Así, utilizando el anticuerpo anti-pax2, caracterizamos la población de astrocitos reticulares del pez cebra. En los animales control, encontramos células con núcleos alargados pax2⁺ en la CNI de la retina, que colocalizaron con la GS caracterizándolas como células de Müller. En otras ocasiones, también detectamos el marcaje pax2⁺ en células de soma redondeado en la CNI y CCG. Estas células, por comparación con los resultados para sox2, creemos que son células amacrinas y amacrinas desplazadas, como veremos más adelante.

La presencia de estas células de Müller pax2⁺ ha sido descrita previamente en el pez cebra y en el pollo aunque únicamente en la retina central (Boije *et al.*, 2010; Stanke *et al.*, 2010). En trabajos previos en el carpín dorado, donde utilizamos el mismo anticuerpo, no fuimos capaces de inmunodetectar pax2 en la retina (Parrilla *et al.*, 2009; Parrilla, 2010), aunque sí detectamos su ARNm, cuya expresión fue muy inferior a la de la CNO (Parrilla *et al.*, 2012). Así, puede que el protocolo de fijación suave utilizado en la presente Tesis permita reconocer el epítipo del anticuerpo anti-pax2.

También detectamos células pax2⁺ en la CNO, algunas de ellas dispuestas en torno a la AC y en contacto con los axones zn8, y otras intercaladas entre núcleos identados de oligodendrocitos. En el NO encontramos múltiples células en la limitante glial de la transición CNO-NO, además de otras distribuidas en zonas más distales. En todos los casos, desde la CNO hasta el NO, estas células pax2⁺ colocalizaron con la ck, mostrando en el caso del NO la disposición tan característica de los anteriormente mencionados astrocitos reticulares.

- *Astrocitos pax2⁺ tras el pinzamiento.*

Nuestros resultados en la CNO se asemejan, en parte, a los observados con el carpín (Parrilla *et al.*, 2013), en los que también se produce un incremento de células pax2⁺ a los 60dp. Sin embargo, en el carpín la población de células pax2⁺ aumenta a los 7 y 15dp, aunque nosotros no lo hemos detectado. Respecto a los datos del NO, no podemos compararlos directamente con el estudio en carpín debido a que el NO no fue estudiado, aunque el incremento que observamos se mantiene a lo largo del proceso regenerativo de forma similar a la expresión de pax2 en la CNO (Parrilla *et al.*, 2013). En cualquier caso, no observamos una proliferación excesiva de astrocitos pax2⁺ salvo en las zonas lesionadas del NO.

Por otra parte, a los 7dp observamos que las células pax2⁺ presentaban un núcleo cualitativamente mayor. Incluso en las células pax2⁺ alrededor de la AC el marcaje se extendía por su citoplasma, revelando células estrelladas que parecían delimitar la CNO. Estos núcleos hipertrofiados y de mayor tamaño han sido descritos en astrocitos como respuesta al daño celular, en la gliosis reactiva (Neve *et al.*, 2012; Pekny *et al.*, 2007). También a los 7dp observamos un marcaje muy débil ck⁺ en la MLE, y una ausencia del mismo en la CNO. Esta disminución del marcaje ck⁺ había sido observada previamente tras el pinzamiento del NO en el carpín (Parrilla, 2010).

Finalmente, a los 60dp la expresión de la ck se asemejó a la del grupo control. Sin embargo, continuamos observando el marcaje citoplasmático en las células pax2⁺ alrededor de la AC. Esto puede ser debido a que, como muestran los recuentos, a este tiempo todavía la población pax2⁺ se encuentra activa, mediando en los procesos de regeneración axonal (Parrilla *et al.*, 2009, 2013), ya que el refinamiento de las sinapsis de los axones regenerados puede extenderse varios meses tras el pinzamiento (Becker y Becker, 2007; Becker *et al.*, 2000; Meyer, 1980).

Así, los resultados muestran que los astrocitos pax2 reaccionan ante la degeneración, como habíamos demostrado previamente (Parrilla *et al.*, 2013; Parrilla, 2010). Además, hemos demostrado la expresión de pax2 en la retina, que concuerda con lo observado en la bibliografía (Boije *et al.*, 2010; Parrilla *et al.*, 2012), a pesar de que nuestro marcaje no siempre se confinó a las células

DISCUSIÓN

de Müller. Estos datos, junto a nuestras observaciones con ejemplares olig2:GFP, nos confirman que en el pez cebra existen una población de astrocitos reticulares $pax2^+$, que expresan ck (Koke *et al.*, 2010; Maggs y Scholes, 1990; Parrilla *et al.*, 2013). Además, la expresión de ZO1 se ha observado tanto en astrocitos $pax2^+$ en el NO de carpín (Parrilla *et al.*, 2013) como en oligodendrocitos $sox10^+$ (nuestros datos). Todo esto, junto al hecho de que hemos detectado células $sox2^+/ZO1^+$ (ver siguiente sección), nos demuestra que existe una posible relación a nivel celular en el NO entre los astrocitos $pax2^+$, los oligodendrocitos $sox10^+$ y los progenitores $sox2^+$ que intentaremos aclarar en la siguiente sección.

5. Células progenitoras Sox2⁺.

Por último, en trabajos previos en nuestro laboratorio habíamos realizado inmunohistoquímicas contra el factor de transcripción $sox2$, revelando su presencia en la retina, CNO y NO de carpín, en poblaciones celulares cuya distribución y número se asemejaba bastante a la de los astrocitos $pax2$. Además, habíamos probado dicho anticuerpo con éxito en ejemplares adultos de pez cebra (Ogueta, 2013). Así, quisimos explorar su expresión en la vía visual del pez cebra tanto en condiciones control como tras el pinzamiento.

El marcaje de $sox2$ delimitaba perfectamente la ZPG, como ha sido descrito en el pez cebra en desarrollo (Stephens *et al.*, 2010). En la retina, detectamos las células $sox2^+$ tanto en la CNI como en la CCG. Al realizar dobles marcajes con GS y GFAP o $zrf1$, comprobamos que en la CNI parte de las células $sox2^+$ eran células de Müller (Bhatia *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2009). De hecho, a pesar de que la bibliografía afirma que el marcaje para GFAP de las células de Müller se detecta fundamentalmente en sus procesos vitreales y llega hasta la CNI (Bernardos y Raymond, 2006; Koke *et al.*, 2010; Nona *et al.*, 1989), nosotros la detectamos en toda su extensión, desde la MLE hasta la MLI, pero únicamente al utilizar el anticuerpo $zrf1$.

Así mismo, y dada la bibliografía existente, las restantes células de soma redondeado y en contacto con la CPI fueron caracterizadas como células amacrinas y amacrinas desplazadas (Fischer *et al.*, 2010; Jusuf y Harris, 2009;

Lin *et al.*, 2009). Sin embargo, no pudimos determinar la naturaleza de las células $sox2^+$ de soma alargado que se disponían más vitrealmente.

Respecto a la CNO y NO, pudimos comprobar la ausencia de células $sox2^+/GS^+$. Es más, en algunos puntos detectamos hileras de oligodendrocitos GS^+ donde se intercalaban núcleos $sox2$, de forma similar a lo observado con los núcleos $pax2^+$. De forma similar, también detectamos células $sox2^+/ck^+$ desde la CNO hasta el NO, disponiéndose en la limitante glial, aunque también observamos células $sox2^+$ en el interior del NO en las que no pudimos distinguir claramente el doble marcaje. También observamos un marcaje, tanto con el anticuerpo $zrf1$ como anti-GFAP en el primer tercio del NO, comenzando desde la zona de transición CNO-NO. En esta zona detectamos células $sox2^+/GFAP^+$ en la limitante glial, cuya disposición resultó similar a la observada para la ck . Una vez más, este marcaje de GFAP en el NO no se ha detectado en algunas publicaciones, donde sólo se halla en el tracto óptico (Koke *et al.*, 2010; Nona *et al.*, 1989). Sin embargo, sí encontramos un artículo en el que observaron la misma tinción para GFAP en el primer tercio del NO (Solin *et al.*, 2014). Finalmente, como hemos descrito en el apartado anterior, detectamos células $sox2^+/ZO1^+$ en la limitante glial del NO.

Por lo tanto, pudimos comprobar que el marcaje para $sox2$ se asemejaba mucho al observado para $pax2$. Así mismo, si comparamos las características descritas para sus dobles marcajes con ck , $ZO1$ y GFAP, encontramos que existe una íntima relación con los oligodendrocitos $sox10$, puesto que éstos compartieron la expresión de $ZO1$, además de detectar los núcleos GS^+ intercalados con núcleos $pax2^+$ o $sox2^+$, o con procesos $GFAP^+$ o ck^+ en la CNO y NO. Además, como discutiremos más adelante, la zona de transición CNO-NO parece ser el equivalente a la lámina cribosa de mamíferos, tanto por los resultados observados en la mielinización como en la composición celular que presenta, que ya había sido descrita en trabajos anteriores por nuestro grupo en el carpín dorado (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009, 2013).

- Células $sox2^+$ tras el pinzamiento.

Tras el pinzamiento del NO, nos encontramos una rápida respuesta en las células $sox2$. Al estudiar la retina, sólo observamos diferencias en la CCG a lo

DISCUSIÓN

largo de los distintos tiempos analizados, mientras que el número de células en la CNI no varió a lo largo del tiempo.

Estudios previos han demostrado que las células amacrinas colinérgicas de la CCG son menos abundantes que en la CNI, como demuestran nuestros recuentos (Whitney *et al.*, 2008, 2014). Además, dicho ratio se mantiene constante en las retinas de distintas cepas de ratones (Whitney *et al.*, 2008, 2014). Sox2 es necesario para especificar estas poblaciones, y la eliminación de Sox2 en retinas de ratones altera el ratio de estas células en la CCG y CNI (Whitney *et al.*, 2014), además de inducir cambios en su árbol dendrítico. De esta forma, las variaciones que observamos en la CCG de la retina pueden deberse a una reordenación de los árboles dendríticos de las células amacrinas como consecuencia del daño sufrido a las células ganglionares. Otra posibilidad es que la disminución de la expresión de *sox2* en la retina afecte especialmente a este estrato celular, por motivos que desconocemos.

Al comparar los datos de los recuentos con los de expresión de *sox2*, encontramos resultados bastante parecidos en casi todos los tiempos estudiados, a diferencia de lo observado anteriormente para *sox10*. Esto puede deberse a que la regulación de *sox2* debe ser muy estricta, puesto que es un gen que induce la reprogramación celular una vez se activa (Zhang *et al.*, 2014).

Nuestros resultados en la expresión de *sox2* tras el pinzamiento del NO son similares a los observados en estudios de pinzamiento de médula espinal de peces cebra adultos (Hui *et al.*, 2014) y en ratones (Lee *et al.*, 2013), donde tras una elevación inicial muy acusada, los niveles fueron bajando progresivamente a lo largo del tiempo. Sin embargo, nosotros hemos observado un incremento exponencial en la expresión hasta los 21dp, mientras que los recuentos van disminuyendo progresivamente hasta los 60dp. Es posible que también los valores de expresión a los 60dp sean menores, ya que en casi todos los genes estudiados en la presente Tesis hemos obtenido similares resultados.

Respecto al análisis inmunohistoquímico, las células *sox2*⁺ constituyen el tipo celular, junto a *pax2*, en el que más dobles marcajes con PCNA detectamos. Estudios previos en nuestro laboratorio habían probado la respuesta de los astrocitos *pax2*⁺ de la CNO al pinzamiento (Parrilla *et al.*, 2013), y nuestros resultados concuerdan con estas observaciones previas. La proliferación de las células *sox2* puede ser explicado por su naturaleza como células progenitoras

(Bylund *et al.*, 2003), las cuales estarían proliferando y diferenciándose ante el pinzamiento para generar distintas células. Debido a las limitaciones de los anticuerpos disponibles, no sabemos con certeza la naturaleza astrocítica u oligodendrocítica de la población $sox2^+$, aunque proponemos una explicación en el siguiente apartado.

Por otra parte, al igual que lo observado para $pax2$, detectamos los núcleos $sox2^+$ más grandes y alargados. Además, la zona pinzada se caracterizó por estar infiltrada de células $sox2$, dejando excluido el marcaje para GS pero no para GFAP o $zn8$. La presencia de procesos $GFAP^+$ en el interior de la lesión chocan con lo observado en el carpín, donde se detectan en las zonas contiguas (Stafford *et al.*, 1990). No obstante, el anticuerpo utilizado es distinto al nuestro, y es posible que los resultados difieran debido a una diferente inmunorreactividad. Otra posibilidad es que el proceso regenerativo esté menos avanzado en nuestros tiempos, con lo que estaríamos observando una fuerte reacción glial al pinzamiento que luego disminuye. Por otra parte, al igual que para $pax2$ (Parrilla *et al.*, 2013), encontramos múltiples células $sox2^+$ intercaladas con axones regenerantes $zn8^+$ en la zona lesionada, y más tarde en las zonas marginales del NO donde se localiza el borde en crecimiento (Maggs y Scholes, 1990; Parrilla, 2010).

6. Semejanzas entre las células $sox2^+$ y los astrocitos $pax2^+$

A la vista de los resultados, queda patente que las semejanzas morfológicas e inmunohistoquímicas entre las células $sox2$ y $pax2$ sugieren que se tratan de la misma población celular, o al menos de dos poblaciones muy parecidas. Debido a las limitaciones de los anticuerpos disponibles, no fue posible realizar dobles inmunohistoquímicas $sox2/pax2$. Sin embargo, sí que pudimos disponer de ejemplares transgénicos $gfap:GFP$ (Bernardos y Raymond, 2006) y comparar el marcaje obtenido para $pax2$ y $sox2$. Así pudimos observar células GFP^+ tanto en la retina (células de Müller) como en el NO, donde sólo las detectamos en la zona de transición CNO-NO. Estas células GFP^+ de la limitante glial colocalizaron con procesos ck^+ , pero no con células GS^+ . Estas últimas se dispusieron intercaladas con las células GFP^+ . Por último, al realizar las inmunohistoquímicas contra $sox2$ y $pax2$, encontramos dobles marcajes $sox2^+/GFP^+$ y $pax2^+/GFP^+$, que exhibieron las mismas características. Sin

DISCUSIÓN

embargo, no encontramos colocalizaciones con el anticuerpo anti-sox10. De esta forma, demostramos que las células de la transición CNO-NO, que expresan GFAP, son tanto sox2 como pax2. Sin embargo, no podemos asegurar lo mismo del resto de células marcadas por estos anticuerpos en la CNO y NO. Aun así, ambos tipos celulares comparten marcadores como la ck y ZO1. Aunque no hemos realizado dobles inmunohistoquímicas con pax2 y ZO1, en estudios previos en el carpín demostramos su expresión en los astrocitos pax2⁺ del NO (Parrilla *et al.*, 2012, 2013).

- *La zona de transición CNO-NO.*

Sox2 es un factor de transcripción que se utiliza como un marcador de células multipotentes en distintos tejidos (Avilion *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003), incluyendo el SNC (Lin *et al.*, 2009; Ogueta, 2013), y cuya expresión se ha caracterizado en el SNC del pez cebra, incluyendo la retina (Carreño *et al.*, 2013; Germanà *et al.*, 2010; Meyers *et al.*, 2012; Ogueta, 2013; Okuda *et al.*, 2006; Stephens *et al.*, 2010). En las células de Müller se encarga de mantener su estado quiescente como progenitores neuronales (Surzenko *et al.*, 2013), y mutaciones en el gen SOX2 causan microftalmia y anoftalmia (Taranova *et al.*, 2006). No obstante, su expresión también se ha asociado a procesos de diferenciación en el linaje oligodendroglial (Hoffmann *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015) y de las células de Schwann (Lang *et al.*, 2011; Parrinello *et al.*, 2010; Svaren y Meijer, 2008).

Pax2, por otra parte, es un factor de transcripción crítico en varios procesos en el ojo, definiendo durante el desarrollo la región ventral de la copa óptica (Boije *et al.*, 2010; Nornes *et al.*, 1990); su ausencia provoca un cierre anómalo de la fisura coroidea o coloboma (Chu *et al.*, 2001; Sanyanusin *et al.*, 1995) y es necesario para que los axones de la CCG crucen la línea media (Macdonald *et al.*, 1997). Además, se expresa en células precursoras de astrocitos y en astrocitos maduros de aves, reptiles y peces (Chan-Ling *et al.*, 2009; Parrilla *et al.*, 2009; Sehgal *et al.*, 2008).

Así pues, ambos factores contribuyen al mantenimiento de células precursoras, a pesar de que sox2 se expresa en un rango celular y tisular más amplio que pax2. En nuestro trabajo sugerimos la posibilidad de que las células

GFAP⁺ presentes en el límite CNO-NO sean pax2⁺/sox2⁺. Este doble marcaje ha sido previamente descrito en la población astrogial del NO murino en desarrollo (Tiwari *et al.*, 2014), donde los astrocitos tipo I pax2⁺ que se originan en el neuroepitelio del tallo óptico expresaban sox2 a lo largo del desarrollo. Así mismo, trabajos previos de nuestro grupo mostraron la expresión de GFAP en la zona de transición CNO-NO (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009).

En los teleósteos la principal población del NO son los astrocitos reticulares (Maggs y Scholes, 1990). Estos astrocitos se generan también en el neuroepitelio del tallo óptico (Macdonald *et al.*, 1997), y continúan expresando pax2 hasta estadios adultos (Parrilla *et al.*, 2009). Recientemente se ha descubierto que el origen de los oligodendrocitos intrarretinales del pez cebra es externo (Tian *et al.*, 2016), aunque en el citado trabajo no se detalla su posible origen. Nosotros proponemos que el origen de estas células se sitúa en el diencéfalo ventral, al igual que en los mamíferos (nuestros datos, ver discusión: *Origen de los oligodendrocitos del sistema visual*).

Los oligodendrocitos intrarretinales no se encuentran en los mamíferos (excepto el conejo) debido a la presencia de la anteriormente citada lámina cribosa (French-Constant *et al.*, 1988; Perry y Lund, 1990). Sin embargo, en los peces y en otras especies con retinas avasculares su ausencia permite la entrada de los oligodendrocitos a la retina (Dávila *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 2001; Morcos y Chan-Ling, 1997; Münzel *et al.*, 2012; Nakazawa *et al.*, 1993; Parrilla *et al.*, 2016; Reichenbach *et al.*, 1988; Santos *et al.*, 2006).

En los animales con lámina cribosa se describe una estructura con filamentos GFAP⁺ entre la retina y el NO que limita la entrada de los oligodendrocitos (Morcos y Chan-Ling, 2000). Nosotros, al igual que en trabajos previos en peces (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009; Parrilla, 2010), hemos detectado esta estructura, que parece formar un anillo GFAP⁺ en la transición CNO-NO. Además, hemos descrito la naturaleza de las células que la componen como GFAP⁺/sox2⁺/pax2⁺/ck⁺. Esta estructura, junto con el hecho de que es a partir de esta zona de transición donde comienza la expresión de mpz y de la aparición de axones con mielina compacta (Münzel *et al.*, 2012) parece ser el equivalente en el pez cebra a la lámina cribosa de mamíferos.

DISCUSIÓN

Sería interesante analizar qué moléculas o genes están implicados y actúan para impedir la aparición de la mielina compacta en la retina. Se ha especulado que la ausencia de mielina compacta viene dada porque se trata de un componente opaco y que no dejaría pasar correctamente la luz en la retina hacia los fotorreceptores (Ali *et al.*, 1994; Hunter *et al.*, 1997; Leys *et al.*, 1996; Straatsma *et al.*, 1979, 1981). Sin embargo, se ha comprobado que las células de Müller actúan como haces de fibra óptica, conduciendo la luz desde el vítreo hasta los fotorreceptores (Franze *et al.*, 2007). Incluso su núcleo se encuentra desviado del eje celular para no interferir en el paso de la luz (Uckermann *et al.*, 2004). Por otra parte, en estudios del gen *mpz* del pez cebra, se han detectado regiones *trans* en su promotor (Bai *et al.*, 2014) que podrían regular su expresión bajo la influencia de otros genes o factores de transcripción. Además, el transcrito de *mpz* puede sufrir procesos de *splicing*, generando distintos transcritos que podrían estar implicados en su expresión diferencial (Bai *et al.*, 2011).

Finalmente, este anillo de células progenitoras es capaz de proliferar tras el pinzamiento del NO. En estudios previos demostramos que estas células reaccionan ante el pinzamiento o la crioeliminación de la ZPG del carpín (Parrilla *et al.*, 2012, 2013). De esta forma, parece que podrían constituir un reservorio de progenitores gliales capaces de reaccionar, no solo ante un daño tisular, sino también intervenir en los procesos de crecimiento continuado que existen durante toda la vida de estos animales. De esta forma, podrían proveer de precursores de oligodendrocitos y astrocitos que irían añadiéndose conforme se van aportando nuevos axones al NO.

Con todos estos datos, creemos que el anillo GFAP⁺ presente en la transición CNO-NO constituye la “lámina cribosa” en peces, y que previene la mielinización compacta en la retina evitando la expresión de *mpz*, aunque no podemos descartar del todo el papel de las células de Müller, que delimitan la CNO en los teleósteos. Las células presentes en el límite CNO-NO se definen como sox2⁺/pax2⁺/ck⁺/ZO1⁺. Por otra parte, hemos comprobado la presencia de oligodendrocitos olig2⁺/sox10⁺/GS⁺, algunos de ellos también mbpa⁺. Finalmente, creemos que todos los astrocitos reticulares pax2⁺/ck⁺ también expresan sox2⁺, aunque puede que exista una subpoblación sox2⁺ que esté en

relación con las OPCs cuya existencia en el NO se ha especulado (Münzel *et al.*, 2012).

7. Regulación génica. Relación de *sox2* con el linaje oligodendroglial.

La expresión de *sox2* en la CNO y NO y la posibilidad de que parte de las células *sox2*⁺ provengan de una población celular distinta a la de los astrocitos reticulares surge del hecho de que *Sox2* aumenta su expresión y es clave en la activación y reclutamiento de las OPCs tras una lesión desmielinizante (Zhao *et al.*, 2015). En nuestro caso, el pinzamiento genera un daño axonal y desmielinizante pero de forma local. Sin embargo, existen modelos de desmielinización local del NO con LPC en pez cebra (Münzel *et al.*, 2014), aunque no se ha investigado el papel de *sox2*. Por nuestra parte, únicamente detectamos muy pocas células *olig2*⁺/*sox2*⁺ utilizando animales *olig2*:GFP control, aunque sería muy interesante estudiar ambos marcadores tras lesiones por pinzamiento o desmielinización con LPC.

Por otra parte, existen estudios en los que se asocia *Sox2* no sólo con la diferenciación terminal de oligodendrocitos sino con una posible expresión inicial de *Mbp* (Hoffmann *et al.*, 2014). Esta relación surge de la presencia de elementos de unión a factores Sox en el promotor de la *Mbp*, aunque el principal activador de su expresión es *Sox10* junto a *Olig1* (Li *et al.*, 2007; Stolt y Wegner, 2010). Además, existen varios estudios que relacionan a *Sox2* con la histona deacetilasa-1 (HDAC1), ya que *Sox2* es capaz de unirse a través de distintas regiones con múltiples proteínas, incluida esta última (Cox *et al.*, 2010).

Precisamente la relación de la HDAC1 y *Sox2* es la que entronca con el estudio de los oligodendrocitos. Se ha descrito que *hdac1* es una proteína esencial para la especificación de los oligodendrocitos en el SNC del pez cebra (Cunliffe y Casaccia-Bonnel, 2006), ya que determina la expresión de *olig2* y *nkx2.2a*, genes esenciales en la especificación y diferenciación de los oligodendrocitos durante el desarrollo (Kucenas *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001). Además, la ausencia de *hdac1* determina que los progenitores *sox2* sean incapaces de abandonar su estado multipotente y diferenciarse (Cunliffe y Casaccia-Bonnel, 2006). Precisamente, la acetilación o desacetilación de las histonas, estudiado a través del uso de inhibidores de las

DISCUSIÓN

Hdac, incrementa la expresión de *Gfap* o *S100* en OPCs de ratón trasplantadas a zonas desmielinizadas (Liu y Casaccia, 2010). Además, la expresión de genes de la mielina como *MBP* o *PLP* parece estar regulado por procesos de desacetilación (Conway *et al.*, 2012; Liu y Casaccia, 2010). Por último, se ha documentado que los procesos de acetilación son un componente intrínseco de la diferenciación de los astrocitos laminares del ratón (Tiwari *et al.*, 2014). Dado que la acetilación o desacetilación de las histonas nucleares condiciona el grado de empaquetamiento de la cromatina (Haberland *et al.*, 2009), esto explicaría la presencia de células oligo o astrogliales con núcleos más o menos electrodensos observados en distintos NO por nuestro grupo (Lillo *et al.*, 1998, 2002; Parrilla, 2010; Parrilla *et al.*, 2016). Estos núcleos estarían reflejando, a lo largo del proceso regenerativo, el estado transcripcional de la célula y la activación o represión de distintos genes.

Así pues, las modificaciones epigenéticas en los astrocitos, oligodendrocitos u OPCs alteran su transcriptoma, pasando de estadios pluripotentes caracterizados por la expresión de *sox2* a otros diferenciados, caracterizados por la expresión de genes de la mielina o marcadores astrogliales. Por último, la población *sox2⁺/pax2⁺* que se ha descrito en el NO murino en desarrollo también expresa HDAC1 (Tiwari *et al.*, 2014), de tal forma que podríamos encontrarnos con los progenitores O-2A comunes a oligodendrocitos y astrocitos descritos en mamíferos.

Con todos estos datos creemos que una parte la población *sox2⁺* que reacciona tras el pinzamiento puede constituir la población de OPCs que reaccionarían ante la desmielinización del NO. Ya que la proliferación en las células *sox2⁺* es cualitativamente más elevada que la que detectamos en los oligodendrocitos *sox10⁺*, junto al hecho de que en mamíferos son las OPCs las encargadas de estos procesos y que pasan por una fase de proliferación similar, no podemos descartar la contribución de estas células al proceso regenerativo. Sin embargo, en condiciones control no podemos descartar que el origen de estas OPCs se halle en las células *sox2⁺/pax2⁺* del límite CNO-NO.

- *Regulación génica tras el pinzamiento.*

Tras el pinzamiento del NO, hemos visto y documentado que se producen cambios fisiológicos y de expresión génica que intentan compensar y reparar el daño ocurrido en el sistema.

Hoy en día se asume que el desencadenante de todo el proceso regenerativo es un primer proceso inflamatorio, tanto en mamíferos como en los peces (Kyritsis *et al.*, 2012, 2014). De hecho, se ha comprobado que el número de macrófagos o microglía en la retina del pez cebra aumenta significativamente desde los 3dp aunque vuelve a niveles basales 3 semanas tras el pinzamiento (Zou *et al.*, 2013). Además, la inyección de *zymosan*, una molécula proinflamatoria, contribuye a una mejor respuesta de las células ganglionares tras el pinzamiento, no sólo en pez cebra sino también en mamíferos (Fischer *et al.*, 2000; Leon *et al.*, 2000; Lorber *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2013). También se ha comprobado que la superfamilia de la IL-6 estimula la regeneración axonal de forma autocrina/paracrina, especialmente a través de LIF (Factor Inhibidor de la Leucemia) (Elsaeidi *et al.*, 2014; Ogai *et al.*, 2014).

Por otra parte, en estudios de desmielinización con LPC en el NO del pez cebra se ha comprobado la invasión de macrófagos/microglía como paso previo a la remielinización (Münzel *et al.*, 2014). Sin embargo, es reseñable que en animales adultos no se reclutó un número de células microgliales tan altas como en ejemplares jóvenes, y que de hecho las vainas de mielina producidas por los oligodendrocitos eran más finas y cortas que en ejemplares jóvenes (Münzel *et al.*, 2014). El sistema inmune también envejece (Salminen *et al.*, 2012; Streit y Xue, 2013; Wong, 2013), y se ha comprobado que las OPCs de rata responden peor ante una lesión en animales envejecidos (Sim *et al.*, 2002). En el pez cebra se ha comprobado la respuesta de células olig2⁺ en lesiones del cerebro (März *et al.*, 2011). Sería interesante observar su respuesta en animales envejecidos o con un mal funcionamiento del sistema inmune. Esta relación entre una peor respuesta inflamatoria y regenerativa con la edad se ha denominado *inflammaging* (del inglés *inflammation* y *aging*; inflamación y envejecimiento).

Los ejemplares que hemos utilizado han sido adultos de un año de vida aproximadamente. Nuestros resultados demuestran que la vía visual se recupera tras el pinzamiento, y ya a los 60dp la estructura del NO se asemeja a los controles. Sería interesante analizar el pinzamiento y la respuesta en ejemplares

DISCUSIÓN

jóvenes olig2:GFP o sox10:RFP, sobre todo para analizar la función de las OPCs en la regeneración.

Así, tras un primer momento de neuroinflamación, se activan genes como *gap43* (Diekmann *et al.*, 2015; Udvadia *et al.*, 2001) o *tub1a* (Goldman *et al.*, 2001; Ramachandran *et al.*, 2010), que es regulado por *KLF6/7* (Veldman *et al.*, 2010). Todos ellos promueven el crecimiento axonal. Así mismo, los macrófagos infiltrados eliminan los restos de mielina (Parrilla *et al.*, 2013), y los astrocitos *pax2⁺* se encargan del guiado de los nuevos axones regenerantes (Parrilla, 2010), que gracias a la ausencia de una región inhibitoria del receptor Nogo-A son capaces de crecer a través de la zona dañada (Abdeselem *et al.*, 2009).

Tras esto, los oligodendrocitos u OPCs se dividen y aumenta la expresión de *sox10*, gen necesario para la supervivencia y mielinización (Takada *et al.*, 2010), así como *mpz* (Bai *et al.*, 2014) y *cntn1a* (Schweitzer *et al.*, 2007). Nosotros hemos corroborado esta respuesta tanto para *sox10* como *mpz*, a pesar de que la respuesta de *mpz* no ha sido tan intensa como lo esperado. Además, *sox2* aumenta desde los primeros momentos tras la lesión (Hui *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2013), como lo observado en nuestros resultados.

Además, hemos demostrado que la GS parece tener una gran relevancia en este proceso regenerativo, ya que hemos observado una respuesta diferencial en sus tres parálogos: *glula*, *glulb* y *glulc*; y de la cual, hasta la fecha, no hemos encontrado ninguna referencia en la bibliografía.

Finalmente, a los 60dp los oligodendrocitos vuelven a mielinizar los axones *zn8⁺* regenerantes y se recupera la expresión de *mbp* en el NO. Sin embargo, las poblaciones *pax2⁺* y *sox2⁺* todavía no presentan valores iguales a los controles (como hemos mostrado anteriormente). Esto puede ser debido a que el refinamiento en las sinapsis requiere todavía un periodo mayor de tiempo, y también existe la posibilidad de que en nuestros ejemplares de 1 año el proceso se alargue algo más por las consideraciones antes descritas. En cualquier caso, hemos probado que el pinzamiento del NO en ejemplares adultos de pez cebra constituye un modelo ideal para el estudio no sólo de los oligodendrocitos sino de procesos de regeneración axonal, inflamación, mielinización y envejecimiento.

8. Desarrollo de los oligodendrocitos en el sistema visual.

Tras estudiar los oligodendrocitos del sistema visual de adultos, comprobamos que a pesar de que la bibliografía sobre la aparición y desarrollo de estas células estaba bien documentada, no existía ningún artículo que explicara el origen en el sistema visual durante el desarrollo embrionario en peces. Así, decidimos investigar el posible origen y las características de estas células. Sin embargo, durante la realización de la presente Tesis Doctoral se publicó un artículo (Tian *et al.*, 2016) en el que se comprobaba que el origen de los oligodendrocitos intrarretinales es externo. A pesar de esto, el origen concreto de estas células no se aclaraba, ni tampoco su caracterización inmunohistoquímica, por lo que continuamos nuestro trabajo de caracterización hasta el momento presente.

- *Diferenciación de las OPCs en el sistema visual*

El primer tiempo que estudiamos fue a los 2dpf. En este momento ya son visibles mediante hibridación *in situ* oligodendrocitos *mbp*⁺ en el rombencéfalo ventral, cerca de la línea media (Brösamle y Halpern, 2002). Sin embargo, nosotros no detectamos células *mbpa*:RFP en el rombencéfalo y médula espinal hasta los 3dpf (datos no mostrados), y hasta los 5dpf en el sistema visual.

Sin embargo, a los 2dpf sí que encontramos células *olig2*:GFP en la retina y en el mesencéfalo, ya que la expresión de *olig2* es visible en estas zonas desde las 24hpf (Schebesta y Serluca, 2009; Shin *et al.*, 2003). Además, detectamos OPCs *olig2*⁺/*sox10*⁺ en regiones mesencefálicas, en el hipotálamo y tegmentum, la mayoría de ellas lejos de la línea media, aunque unas pocas permanecían cerca de ella, donde existía un gran número de células *olig2*⁺. Por último, nos encontramos una gran cantidad de progenitores *sox2*⁺ tanto en el ojo en desarrollo como en el encéfalo.

A los 3dpf la retina se encuentra completamente laminada y se han diferenciado las células de Müller, que son las últimas en especificarse (Morris y Fadool, 2005). El marcaje *olig2*:GFP se concentraba en la retina, donde se ha demostrado que su expresión, tanto en el desarrollo como en procesos regenerativos, se asocia a progenitores neurales (Fimbel *et al.*, 2007; Nakamura

DISCUSIÓN

et al., 2006; Shibasaki *et al.*, 2007; Thummel *et al.*, 2008). También lo detectamos en zonas dorsales y posteriores del mesencéfalo, en el tálamo ventral y en el área preóptica. En las secciones más ventrales distinguimos células olig2⁺ en el tegmentum, así como en los tractos ópticos.

Todas las células olig2⁺ que se disponían en las zonas laterales así como ventrales del encéfalo colocalizaron con sox10, demostrando que son OPCs (Stolt *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2010). Al analizar las dobles inmunohistoquímicas con sox2, encontramos el marcaje sox2 ya descrito en CNI y CCG de la retina de adultos, mientras que en el encéfalo detectamos células sox2⁺/olig2⁺ en la línea media. Ya que esta región es una zona neurogénica durante el desarrollo, las células olig2⁺/sox2⁺ parece ser progenitores neurales (Germanà *et al.*, 2010). Además también encontramos células doblemente marcadas cuya disposición era similar a las OPCs sox10⁺. Al utilizar ejemplares sox10:GFP o sox10:RFP pudimos comprobar que efectivamente estas OPCs expresan sox2 y son reconocibles porque se encuentran en tractos y no en núcleos nerviosos. De hecho, pudimos observar OPCs sox10⁺/sox2⁺ ya en el techo óptico, y también detectamos OPCs olig2⁺/sox10⁺ en los tractos zn8⁺ de los axones de las células ganglionares. Finalmente, al utilizar ejemplares gfap:GFP pudimos comprobar que las células que se disponían en la línea media del encéfalo, alrededor del tubérculo posterior y delimitando la zona ventricular, eran gfap⁺/olig2⁺/sox2⁺/GS⁺. Todos estos marcadores han sido descritos en células de glía radial que actúan como progenitores neurales (Grupp *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2016; Than-Trong y Bally-Cuif, 2015). Al analizar la retina, confirmamos la presencia de células de Müller gfap⁺/GS⁺/sox2⁺ (Bernardos y Raymond, 2006; Carreño *et al.*, 2013; Raymond *et al.*, 2006), aunque también encontramos células sox10⁺ en la CNI.

Estas células también son observadas en estadios más avanzados, y no hemos encontrado bibliografía en pez cebra que explique su presencia en esta capa retinal. Sin embargo, sí que existe un artículo en el que la expresión de Sox10 durante el desarrollo retinal del ratón se asocia a los pericitos de los vasos sanguíneos, que provienen de la cresta neural, que expresa Sox10 (Trost *et al.*, 2013). Sin embargo, ya que la retina del pez cebra es avascular, este origen queda descartado. No obstante, se sabe que sox9 y sox8, que forman parte junto a sox10 de la familia soxE, tienen funciones similares y a veces superpuestas en

la especificación celular y glial (Haldin y LaBonne, 2010; Kordes *et al.*, 2005; Stolt y Wegner, 2010; Wegner y Stolt, 2005), y *sox9* se expresa en la retina de varias especies de vertebrados (Fischer *et al.*, 2010). Ya que el origen de los oligodendrocitos intrarretinales es externo (Tian *et al.*, 2016), no podemos descartar que *sox10* en la retina tenga un papel todavía no identificado en su diferenciación. Por otra parte, en la CNI de la retina en desarrollo de las aves se ha detectado ARNm de varios genes relacionados con la mielina (Gotoh *et al.*, 2011), aunque se han descartado como oligodendrocitos.

A los 4dpf no encontramos variaciones significativas respecto a los 3dpf. Por una parte, encontramos el marcaje *olig2*⁺ de la retina algo más débil que a los 3dpf, restringiéndose más a la ZPG. También seguimos detectando OPCs *olig2*⁺/*sox10*⁺/*sox2*⁺ en las áreas preópticas, tractos y techo ópticos. Su disposición en zonas del quiasma óptico resultó más ventral, sugiriendo que estas células estarían migrando en esta dirección. Esta hipótesis se refuerza al examinar la morfología alargada de las OPCs, junto a su disposición alineada con los axones *zn8*⁺. Además, se ha comprobado que desde las zonas ventrales encefálicas se establece un gradiente de *shh*, que ejerce una acción quimioatrayente sobre las OPCs (Merchán *et al.*, 2007). Por último, como a los 3dpf, encontramos células *sox2*⁺ en la CNO y porción intrarretinal del NO, de morfología alargada y situadas rodeando al NO. Estas células, como mostraremos posteriormente, expresan *pax2* y creemos que se tratan de la misma población celular (ver discusión más adelante: Astrocitos reticulares *pax2*).

A los 5dpf ya encontramos OPCs *olig2*⁺/*sox10*⁺ en el NO, en su porción más distal desde la retina. Hallamos de 1 a 2 OPCs por NO, y pudimos visualizar sus procesos en aquellas que se encontraban en el QO pero no habían invadido el NO. Además, a partir de este estadio encontramos oligodendrocitos mielinizantes *mbpa*⁺, que se localizaron tanto en la parte más ventral del cerebro, en la región encefálica del QO, como invadiendo el NO. Estos oligodendrocitos presentaban la expresión de *olig2* pero no *sox2*. Esta situación fue similar con las OPCs, ya que sólo encontramos algunas de ellas *sox2*⁺. Esto puede ser debido a que conforme se van diferenciando y migrando, las OPCs van perdiendo la expresión de *sox2*⁺ para diferenciarse a oligodendrocitos

DISCUSIÓN

mielinizantes $mbpa^+$. Sin embargo, encontramos células $sox2^+$ en el NO junto a las OPCs. Estas células $sox2^+$ presentaron características morfológicas similares a las $pax2^+$, como veremos y discutiremos más adelante.

- *Comienzo de la mielinización del sistema visual*

Los primeros axones en ser mielinizados en peces son los axones de Mauthner, que sufren este proceso a los 3dpf (Buckley *et al.*, 2010). Por otra parte, a los 4dpf se ha descrito la expresión de *mbp* en zonas ventromediales del rombencéfalo, junto a la comisura posterior y en la rama supraorbital de la línea lateral (Brösamle y Halpern, 2002; Jung *et al.*, 2010; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017). Además, la expresión de *plp/DM20* se detectó en el NO desde el mismo estadio (Brösamle y Halpern, 2002; Yoshida y Macklin, 2005). Sin embargo, tras un análisis de microscopía electrónica, los mismos autores no encontraron los axones del NO mielinizados a los 4dpf, sino a partir de los 7dpf. De forma similar, otro grupo detectó la expresión de axones mpz^+ en el NO a los 7dpf (Bai *et al.*, 2011), aunque la expresión de *mpz* se localizó a los 5dpf en el QO (Schweitzer *et al.*, 2003). El hecho de que nosotros detectemos oligodendrocitos $mbpa^+$ a los 5dpf en el NO supone un nuevo dato en el proceso de mielinización del sistema visual, adelantando el estadio del desarrollo en el cual se observan axones mielinizados. Además, todos los estudios sobre el NO se han descrito a través de hibridaciones *in situ* realizadas en animales *in toto*, y no se han mostrado secciones del NO expresando *mbp*. Nuestro trabajo es el primero que muestra la presencia de estas células *in situ*. Por lo tanto, a partir de los 5dpf detectamos oligodendrocitos mielinizantes $mbpa^+$, que junto a la presencia de numerosos procesos observados en los oligodendrocitos $sox10^+$, nos indican que la mielinización de los axones del sistema visual ha comenzado.

A los 6dpf y 7dpf los oligodendrocitos $olig2^+/mbpa^+$ se detectaron no sólo en el QO sino también en zonas de los tractos ópticos, indicando o bien una diferenciación de OPCs o proliferación y división de oligodendrocitos $mbpa^+$ existentes. Dado que las OPCs son las células con capacidad proliferativa, es más probable que OPCs existentes comiencen a expresar *mbpa* y a mielinizar axones. Sin embargo, al no haber realizado inmunohistoquímicas contra marcadores de proliferación celular, no podemos excluir del todo esta

posibilidad. Por otra parte, y acorde con el comienzo de la mielinización (Brösamle y Halpern, 2002), el marcaje de los axones $zn8^+$ se mostró más débil respecto a estadios anteriores, junto a una progresiva reducción de su extensión en el NO. Conforme avanzaba el desarrollo observamos que las OPCs $olig2^+/sox10^+$ se localizan en zonas más anteriores del NO, encontrando algunas de ellas muy cerca de la retina. Sin embargo, y de acuerdo a la bibliografía (Tian *et al.*, 2016), no las localizamos en su interior.

Al analizar la expresión de $sox2$, detectamos algunas células $olig2^+/sox2^+$ situadas en posiciones más ventrales del NO. Dado que el marcaje de $mbpa$ se situaba todavía en zonas más dorsales del NO, y dado las características migratorias y proliferativas de las OPCs, lo más probable es que hubieran migrado a lo largo NO, sin descartar una posible proliferación de OPCs ya situadas en el NO. A pesar de no haber realizado estudios de proliferación, el doble marcaje $olig2^+/sox2^+$ en este estadio y en el lugar detectado sugieren que ha ocurrido este proceso.

- *Astrocitos reticulares $pax2^+$*

Por otra parte, detectamos células $pax2^+$ desde la CNO, disponiéndose a lo largo del NO. Estas células, de morfología aplanada y cuyos núcleos se disponían en la parte exterior del NO, se asemejaron en su forma y disposición a las $sox2^+$ que no expresaban ningún marcador de oligodendroglía. Este hecho resultó determinante en la porción intrarretinal del NO, donde sólo se encuentran unas pocas células y expresan tanto $sox2$ como $pax2$. Las células $pax2^+$ han sido caracterizadas como astrocitos reticulares ck^+ del NO, que se forman a partir del neuroepitelio del tallo óptico (Macdonald *et al.*, 1997). Dado que en los ejemplares adultos hemos observado que los astrocitos reticulares, especialmente los dispuestos en la transición CNO-NO, son $pax2^+/sox2^+$, podemos afirmar que este marcaje ya se observa desde estadios iniciales del desarrollo del NO, y que se mantiene en los adultos. Es cierto que no hemos realizado dobles marcajes como en el caso de los adultos, pero las pocas células presentes en las larvas, así como su disposición tan característica, nos conducen a nuestra afirmación. Por otra parte, en anteriores Tesis Doctorales de desarrollo

DISCUSIÓN

de nuestro grupo habíamos realizado las mismas inmunohistoquímicas y la conclusión había sido similar (Carreño 2013, comunicación personal).

- *Extensión de la mielinización del sistema visual*

Tras establecer el comienzo de la mielinización a los 5dpf, y como en la bibliografía se establecía la expresión de mpz a los 7dpf (Bai *et al.*, 2011), decidimos esperar hasta los 10dpf y 11dpf para analizar la evolución de los oligodendrocitos. Así, encontramos que los procesos de los oligodendrocitos/OPCs olig2⁺/sox10⁺ se extendían por todo el NO, así como en los tractos y techo ópticos. Incluso detectamos células olig2⁺ a los 11dpf prácticamente en la parte externa del globo ocular, aunque sus procesos no penetraban en la retina.

Puesto que la expresión de mbpa y mpz parece empezar desde el QO y extenderse tanto ventralmente hacia la retina (Bai *et al.*, 2011; Schweitzer *et al.*, 2003; nuestros resultados) como dorsalmente hacia el techo óptico (Bai *et al.*, 2011; Schweitzer *et al.*, 2003), parece que estas OPCs están migrando y extendiendo sus procesos para seleccionar axones que mielinizar, de forma similar a lo observado *in vivo* en la médula espinal (Czopka *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2010). Como en estadios anteriores, algunas de las OPCs que detectamos eran sox2⁺, especialmente las situadas en las regiones más ventrocaudales del QO. Por otra parte, los procesos de los oligodendrocitos mielinizantes olig2⁺/mbpa⁺ también se extendieron por el NO y tractos ópticos, donde su morfología alargada y aplanada sugiere que pueden encontrarse migrando para mielinizar los axones existentes. Esta morfología también se detectó en las OPCs olig2⁺/sox10⁺. Se ha documentado que las OPCs de la médula espinal son capaces de migrar hasta encontrar los axones diana que mielinizan (Kucenas *et al.*, 2009; Mathews *et al.*, 2014; Takada y Appel, 2010), por lo que no sería extraño encontrar este comportamiento en la vía visual. Así, observaríamos OPCs olig2⁺/sox10⁺ que estarían migrando por la vía visual, algunas de ellas sox2⁺, y el resto serían oligodendrocitos olig2⁺/sox10⁺/mbpa⁺ que estarían comenzando a mielinizar axones y cesando su proceso migratorio.

En este punto debemos aclarar que, a pesar de no mostrarlo por la imposibilidad de distinguir las señales RFP de sox10 o mbp, todos los

oligodendrocitos mbpa⁺ expresan tanto olig2 como sox10 (ver Introducción: Origen de los oligodendrocitos). Dado que sox10 es necesario para la diferenciación y supervivencia de los oligodendrocitos tras la mielinización (Takada *et al.*, 2010), todas las células del linaje oligodendroglial lo expresan. La única diferencia de un oligodendrocito mielinizante de uno que no lo es (OPC), es la expresión de mbpa o mpz, pero todos ellos comparten la expresión de olig2 y sox10.

Finalmente, el último estadio estudiado fue a los 14dpf. Dado que los oligodendrocitos no son detectados en la retina hasta los 28dpf (Tian *et al.*, 2016), quisimos ver cuál era la situación existente previa a su entrada en la retina. Así, observamos oligodendrocitos justo en el límite del NO con la retina, aunque no visualizamos sus procesos extendiéndose hacia la CNO. Además, observamos numerosas OPCs olig2⁺/sox2⁺ en regiones del tracto óptico. Dado que en la retina se están produciendo axones de forma continua gracias al aporte de la ZPG (Johns y Easter Jr., 1977), es lógico que sigamos detectando estas OPCs sox2⁺. Por otra parte, existen trabajos en los que se detalla que el periodo de selección axonal y mielinización en los oligodendrocitos de la médula espinal se limita a 5h (Czopka *et al.*, 2013), aunque la mielinización se mantiene hasta los individuos adultos (Jung *et al.*, 2010). De acuerdo con estos datos, los axones que se van generando en el sistema visual se irían mielinizando progresivamente, ya que los oligodendrocitos u OPCs siguen manteniendo su capacidad mielinizante. Sin embargo, el periodo crítico de selección axonal por parte de los oligodendrocitos es una ventana de tiempo muy pequeña, con lo que el proceso de mielinización se revela como muy selectivo y preciso (Almeida y Lyons, 2014, 2016; Czopka *et al.*, 2013; Hines *et al.*, 2015; Koudelka *et al.*, 2016). Además, existen pruebas de que los axones son mielinizados por tramos (Czopka *et al.*, 2013), de forma similar a lo que ocurre en neuronas piramidales de la corteza de ratones (Tomassy *et al.*, 2014), reforzando las similitudes entre nuestro modelo animal y el resto de vertebrados.

9. Origen de los oligodendrocitos del sistema visual

Existen muy pocos artículos sobre el origen de los oligodendrocitos en el sistema visual del pez cebra. Recientemente, en estudios con trasplantes

DISCUSIÓN

completos de globos oculares se ha comprobado que los oligodendrocitos intrarretinales tienen un origen externo (Tian *et al.*, 2016). Sin embargo, su procedencia exacta no ha sido estudiada.

Se conoce desde hace tiempo que los oligodendrocitos que mielinizan el NO de aves y ratones proceden de regiones ventriculares del cerebro (Gao y Miller, 2006; Merchán *et al.*, 2007; Miller, 2002; Ono *et al.*, 1997, 2017), concretamente del área preóptica. En nuestro trabajo, debido a las limitaciones de los propios transgénicos, así como la imposibilidad de realizar un experimento de *time-lapse*, no hemos podido realizar un seguimiento de estas poblaciones. Sin embargo, hemos podido identificar tanto a las 48hpf como a los 3dpf células olig2⁺/sox10⁺/sox2⁺ en el área preóptica y en regiones próximas al QO. Estas OPCs tendieron a disponerse ventralmente, y la morfología de sus núcleos nos indica que podrían estar migrando activamente. Además, la expresión de *olig1* y *olig2* ha sido demostrada desde las 24hpf en el área preóptica y en el rombencéfalo en el pez cebra (Schebesta y Serluca, 2009; Shin *et al.*, 2003; Zannino y Appel, 2009), junto con la expresión de *olig2* en las OPCs que migran el NO del pollo (Ono *et al.*, 2017). A pesar de que no hemos realizado experimentos de proliferación celular con BrdU, existen publicaciones en las que se demuestra que las OPCs proliferan en el parénquima cerebral una vez especificadas (Ono *et al.*, 2001). Así, el marcaje de nuestras OPCs con sox2 indicaría el mantenimiento de su capacidad proliferativa. Además, a lo largo de todo el desarrollo detectamos células olig2⁺ que parecían estar migrando desde la línea media, donde se localiza el ventrículo del prosencéfalo. Estas células expresan sox10⁺, con lo que es posible que conforme migran de la zona ventricular se especifiquen como OPCs y expresen sox10. Por último, el posible origen ventricular de las OPCs del NO se refuerza con el hecho de que observamos muchas menos OPCs en el techo óptico que en zonas ventrales o en el QO.

Hemos demostrado que las OPCs van incorporándose desde el QO hacia los NOs, extendiendo sus procesos desde los 4dpf para luego invadir el NO a los 5dpf. De acuerdo con nuestras observaciones, estudios en ratones han demostrado que la dispersión de las OPCs se produce del QO a la retina a través del NO (Garcion *et al.*, 2001). Además, las OPCs colonizan el NO una vez que

los axones de las células ganglionares han llegado al prosencéfalo (Ono *et al.*, 1997, 2001). En el pez cebra, los axones provenientes de la CCG de la retina se generan en torno a las 30hpf y llegan al techo óptico a las 44hpf (Burrill y Easter Jr., 1994), con lo que nuestros resultados se ajustan a lo observado previamente.

Según avanza el desarrollo, cada vez observamos más OPCs e incluso oligodendrocitos mielinizantes, pero incluso a los 14dpf no observamos oligodendrocitos en la retina, hecho que no ocurre hasta los 28dpf, aunque su aparición no ocurre en animales con un tamaño menor hasta algo más tarde (Tian *et al.*, 2016). La entrada de los oligodendrocitos en la retina de los mamíferos está limitada por la presencia de la lámina cribosa (French-Constant *et al.*, 1988; Perry y Lund, 1990). Es posible que el retraso en la entrada de los axones a la retina del pez cebra esté motivada también por el establecimiento de la “lámina cribosa” que hemos descrito en adultos. Ya que también hemos descrito la población de astrocitos reticulares $pax2^+/sox2^+$ en el NO durante el desarrollo (nuestros datos), no sería descartable que esta estructura estuviera impidiendo la entrada a la retina, al menos de forma temporal, quizá hasta el establecimiento de la expresión de mpz u otras proteínas de la vaina de mielina en todo el sistema visual (Schweitzer *et al.*, 2003).

Por último, existen numerosos artículos en los que se describen los distintos actores que regulan la migración de las OPCs por el NO, incluido shh (Gao y Miller, 2006; Merchán *et al.*, 2007; Spassky *et al.*, 2002), semaforina-3A y netrinas-1 (Bribián *et al.*, 2006; Spassky *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2001). De acuerdo con esto, la señal de shh es esencial para la especificación de los astrocitos $pax2^+$ en peces (Macdonald *et al.*, 1997), y contribuye a un gradiente de shh que puede seguir de guía, junto a la expresión de netrinas (Stuermer y Bastmeyer, 2000) para las OPCs que migran desde el QO. Sin embargo, deben existir muchos otros elementos implicados en la especificación de las OPCs, como notch (Park *et al.*, 2005), wnt (Azim y Butt, 2011), ácido retinoico (Carreño *et al.*, 2013), componentes de la matriz extracelular (Merchán *et al.*, 2007), etc.

Resumen

A continuación mostramos un resumen, junto a varios esquemas de las poblaciones gliales, tanto de la CNO como del NO en condiciones control como tras el pinzamiento.

Por una parte, mostramos los oligodendrocitos. Hemos caracterizado esta población celular como $olig2^+/sox10^+/ZO1^+/GS^+$. Sin embargo, el análisis con los ejemplares *mbpa:RFP* nos mostró que no todos los oligodendrocitos de la CNO y NO expresan *mbpa*, y no pudimos detectar células *mbpa*⁺ en la retina. Así mismo, en la retina tampoco distinguimos con claridad si los oligodendrocitos expresaban *GS*, y creemos que algunas de estas células pueden expresar *sox2*, constituyendo las OPCs retinales. Estas OPCs también se encuentran en la CNO y NO, donde comprobamos su existencia mediante el uso de peces *olig2:GFP*

Respecto a la mielinización, hemos comprobado que la expresión de *mbp* se extiende desde la retina hasta el NO, aunque la de la *mpz* se observa a partir de la transición CNO-NO (nuestros resultados, Münzel *et al.*, 2012). Además, detectamos axones en crecimiento $zn8^+$ (amielínicos) desde la retina al NO, que se producen como consecuencia de los procesos de crecimiento continuado.

La población de astrocitos reticulares ha sido caracterizada como células $pax2^+/sox2^+/ck^+/ZO1^+$. En la transición CNO-NO hemos caracterizado una subpoblación de estas células en la limitante glial que además expresaban GFAP.

Tras el pinzamiento del NO, ocurren varios cambios a lo largo del tiempo. En las figuras hemos intentado mostrar los más relevantes a nivel celular, que se complementan con los resultados obtenidos de expresión génica.

- **Retina**

En la retina observamos un aumento en la cantidad y grosor de los axones $zn8^+$. Este aumento se produce de los 7 a los 21dp, volviendo a niveles basales a los 60dp. Por otra parte, los procesos de las células de Müller, especialmente los vitreales, se engrosan, proliferando algunas de ellas. Además, las células amacrinas desplazadas $sox2^+$ de la CCG experimentan variaciones en su número, mientras que las de la CNI permanecen constantes. El marcaje *ck*⁺ de la MLE desapareció a los 7dp, recuperándose posteriormente. Finalmente,

RESUMEN

aumenta la cantidad de los oligodendrocitos, aunque a los 60dp no hay cambios respecto al control.

- **CNO**

Observamos un aumento tanto en la población de oligodendrocitos como en la de células sox2, aunque estas disminuyen en tiempos más avanzados de regeneración. Consecuentemente, detectamos células PCNA⁺ en ambos tipos celulares, además de en células pax2⁺, cuya población aumenta únicamente a los 60dp. Además, los núcleos de las células sox2/pax2 aumentaron de tamaño a los 7dp, mientras que no observamos cambios en los de los oligodendrocitos, aunque su disposición en filas y columnas se perdió en algunos de los tiempos estudiados, recuperándose a los 60dp. También el marcaje para la GS disminuyó en los oligodendrocitos de esta región.

Por otra parte, la expresión de la ck y de ZO1 desaparece a los 7dp, recuperándose progresivamente. Respecto a la mielinización, los axones mbp mostraron un aspecto desorganizado, especialmente en la transición retina-CNO. En esta zona también detectamos astrocitos pax2⁺ de morfología estrellada y con núcleos de mayor tamaño.

- **NO**

En la transición CNO-NO detectamos oligodendrocitos PCNA⁺ en distintos tiempos, también junto a astrocitos reactivos. La expresión de la GS se concentró alrededor de la lesión a los 7dp, mientras que a los 21dp observamos un incremento en una superficie más amplia. Por otra parte, en el NO también se perdió el marcaje de la ck y ZO1 a los 7dp, recuperándose posteriormente. Además, el marcaje de la mbp se vio afectado, primero en la zona pinzada y luego extendiéndose, aunque a los 60dp recuperó su aspecto inicial. De forma similar a la CNO, observamos oligodendrocitos y astrocitos proliferando, además de detectar núcleos de mayor tamaño sox2⁺/pax2⁺.

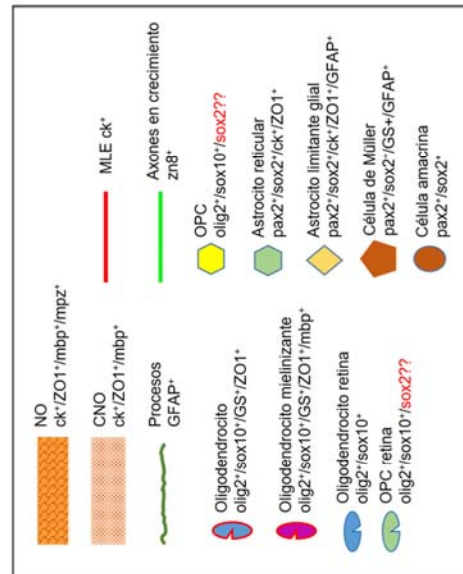
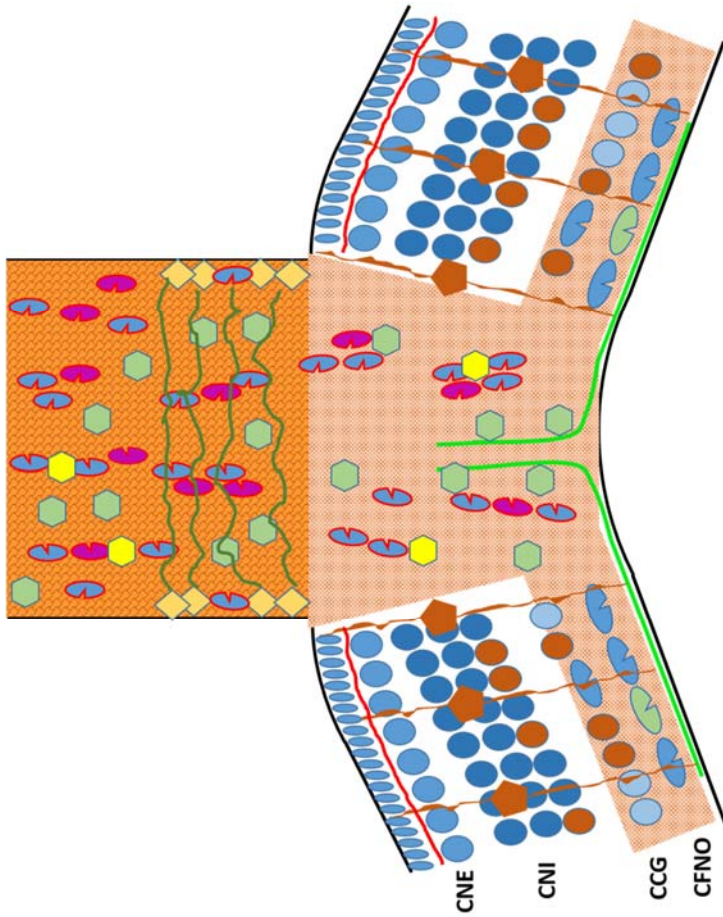
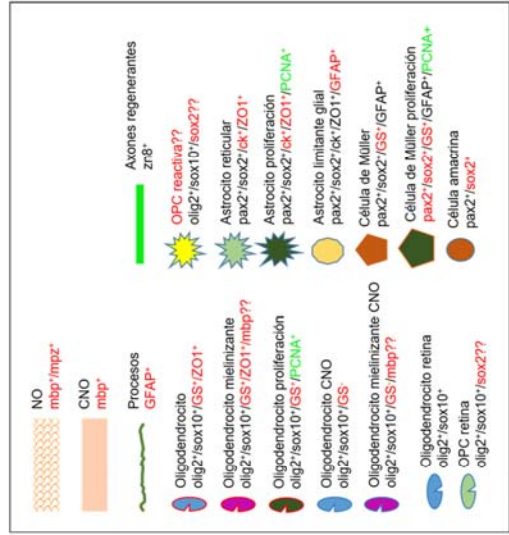
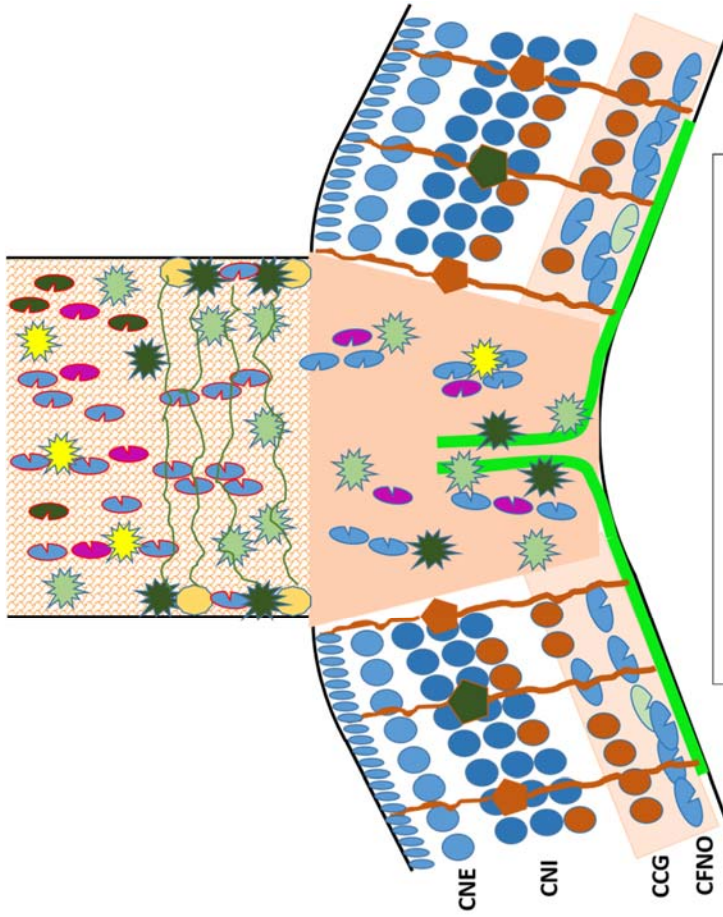
La zona del pinzamiento se caracterizó por la pérdida de mbp, la invasión de axones regenerantes zn8⁺ y la infiltración de células sox2⁺ y de procesos GFAP⁺. Además, a los 7dp observamos células sox2⁺/GS⁺, pudiendo representar OPCs respondiendo a la lesión.

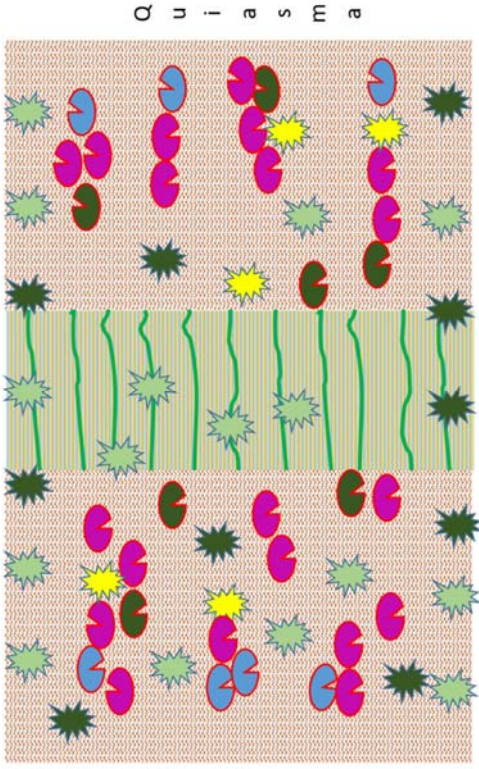
Por último, los axones zn8⁺ fueron disminuyendo y situándose en regiones externas del NO como en los controles, y la mielina recuperó progresivamente su aspecto.

Sin embargo, no hemos podido comprobar el papel de las posibles OPCs olig2⁺/sox10⁺/sox2⁺ durante el proceso regenerativo. Creemos que su estudio y evolución, junto a los oligodendrocitos mbpa⁺, puede terminar de completar este mosaico celular tan complejo que existe en el sistema visual del pez cebra.

En el esquema se muestran las principales poblaciones gliales presentes en la retina, CNO y NO del pez cebra adulto. Algunas figuras muestran signos de interrogación (??) indicando que no conocemos con seguridad la expresión del gen asociado. Tras el pinzamiento, los **marcadores en rojo** indican que se producen cambios en su expresión y/o apariencia a lo largo del proceso regenerativo.

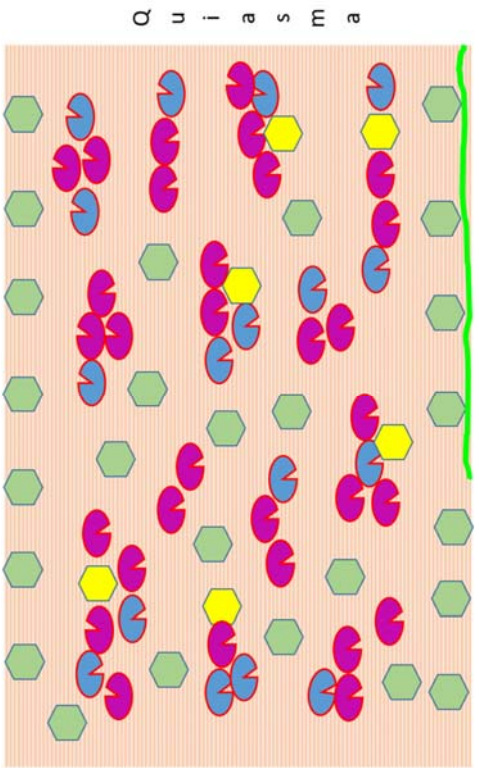
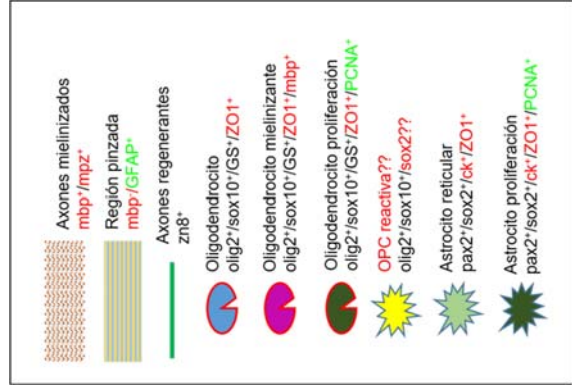
RESUMEN





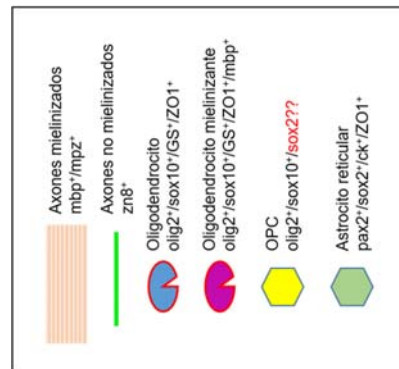
Q u i a s m a

R e t i n a



Q u i a s m a

R e t i n a



“Sólo sé que no sé nada”

Sócrates

Conclusiones

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral, y como consecuencia de los resultados obtenidos y de la discusión llevada a cabo, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. Los oligodendrocitos de la vía visual del pez cebra adulto expresan *olig2* y *sox10*, que son característicos de los oligodendrocitos de vertebrados, mientras que no todos ellos expresan *mbpa*. Sin embargo, los oligodendrocitos del pez cebra expresan además la proteína GS, que podría estar implicada en distintos procesos metabólicos.
2. En la vía visual del pez cebra, tanto en la retina como en el NO se detecta una expresión diferencial de los tres parálogos de la GS, destacando el posible papel de *glulc* en el proceso regenerativo.
3. Los oligodendrocitos del sistema visual responden ante el pinzamiento del NO, proliferando y remielinizando los axones dañados, por lo que favorecen la regeneración del nervio óptico.
4. Los astrocitos reticulares *pax2*⁺ del sistema visual expresan el factor de transcripción *sox2*. Esta población celular participa en los procesos de crecimiento continuado y responde tras el pinzamiento del NO, proliferando y generando nuevas células gliales que parecen estar implicadas en la capacidad regenerativa espontánea del sistema visual de peces.
5. En la transición CNO-NO hay una región que se asemeja a la lámina cribosa de mamíferos. En ella existe un anillo de células progenitoras *GFAP*⁺/*ck*⁺/*ZO1*⁺/*pax2*⁺/*sox2*⁺ que responde al pinzamiento del NO. Esta zona parece ser la responsable de evitar la formación de la mielina compacta en la retina.
6. Los genes estudiados muestran una respuesta diferencial entre la retina y NO durante el proceso de regeneración del nervio. Dichos genes tendrían un efecto antagónico, evitando la mielinización de los axones regenerantes en la retina mientras que favorecerían la mielinización en los axones del NO lesionado.
7. Los oligodendrocitos del sistema visual en desarrollo presentan la expresión de *olig2* y *sox10*, aunque no de GS. Hay una población *sox2*⁺ que podría constituir las OPCs del sistema visual.

CONCLUSIONES

8. El origen de los oligodendrocitos del sistema visual del pez cebra se inicia en el área preóptica y en regiones del hipotálamo ventral, de forma similar a lo observado en otros grupos animales, iniciándose la mielinización del mismo a los 5dpf.

English summary

The retina

The retina is a thin neural layer ($\approx 0,2$ mm) that covers the bottom part of the eye. Its origin during development is due to an evagination from the forebrain, which causes it to belong to the Central Nervous System (CNS). The retina both captures and transforms the visual information that is sent afterwards to the brain through the Optic Nerve (ON).

The retina constitutes a valuable part of the CNS to be studied, because of the high similarities given among the vertebrates (Ramón y Cajal, 1893).

Retinal organization

In vertebrates, the retina has a very similar stratified organization, combining nuclear and plexiform layers (Ramón y Cajal, 1893). From the esclera to the vitreous, the following layers can be distinguished (Figura 1):

- Retinal Pigmented Epithelium (RPE). Being the most external part of the retina, it is constituted by tightly attached epithelial cells containing melanin. It is the non-neuronal component of the retina.
- Photoreceptor Outer Segments. In zebrafish, outer and inner segments from rods and cones are disposed forming a photoreceptor mosaic (Gestri *et al.*, 2012; Hoon *et al.*, 2014; Tarboush *et al.*, 2012).
- Outer Limiting Membrane (OLM). Formed by the Müller cells' scleral processes, which are attached between them and to the photoreceptors. Several proteins are expressed, including ZO1 and cytokeratins (ck) (Herranz, 2009; Itoh *et al.*, 1999; Koke *et al.*, 2010; Paffenholz *et al.*, 1999).
- Outer Nuclear Layer (ONL). Containing rods and cones nuclei. In zebrafish, there are 4 types of cones, including UV cones (Gestri *et al.*, 2012).
- Outer Plexiform Layer (OPL). In this layer photoreceptors make synapses with bipolar, horizontal and interplexiform cells.
- Inner Nuclear Layer (INL). Containing bipolar, horizontal, amacrine, interplexiform and Müller cells nuclei.
- Inner Plexiform Layer (IPL). Where all the INL cells make synapses, excluding the Müller cells.
- Ganglion Cell Layer (GCL). In this layer retinal ganglion cells and some amacrine cells are found.

ENGLISH SUMMARY

- Optic Nerve Fiber Layer (ONFL). It is composed of the axons from the retinal ganglion cells, which converge in the optic disc so as to form the ON (Ramón y Cajal, 1893). In this layer we also find oligodendrocytes, which exist in the teleosts' retina (Easter Jr. *et al.*, 1984; Parrilla *et al.*, 2016).
- Inner Limiting Membrane (ILM). This is the most vitreal part of the retina. It is formed by the vitreal processes of the Müller cells.

Thus, light comes into the eye and traverses all the retinal layers until it reaches the photoreceptor outer segments. Light is phototransduced, converted into electric signals and transmitted to bipolar cells and then, to retinal ganglion cells, which project their axons to the brain. This vertical pathway is modulated by horizontal and amacrine cells, which constitute the horizontal pathway (Kolb, 2003).

Retinal cell types

Retinal Pigmented Epithelium

It is comprised of cubic epithelial cells which are placed between the choroid and the retina (Douglas y Wagner, 1982).

Photoreceptors

They are comprised of rods and cones; they are highly polarized and specialized cells that transform light into action potentials.

Horizontal cells

They modulate the synapses between photoreceptors and bipolar cells (Bear *et al.*, 1998).

Bipolar cells

They make synapses with photoreceptors and ganglion cells, as well as horizontal, amacrine and interplexiform cells (Bear *et al.*, 1998).

Amacrine cells

There are also displaced amacrine cells, whose soma is placed in the GCL (Hughes y Wieniawa-Narkiewicz, 1980).

Retinal Ganglion cells

They constitute the projection cells in the retina, being the first ones to be born during development (Schmitt y Dowling, 1994). They send the visual information through their axons to higher cephalic parts of the CNS. These axons run in

parallel to the retina, constituting the ONFL, until they reach the optic disc. Then, they exit the retina, forming the ON. They are myelinated by oligodendrocytes (Easter Jr. *et al.*, 1984; Schweitzer *et al.*, 2007; Wolburg, 1980).

Müller cells

They are radial glial cells and constitute the glial main component of the retina (Müller, 1952; Ramón y Cajal, 1893). Their soma is placed in the central or vitreal part of the INL, and they spread their processes, that comprise almost all the retina. They form the OLM (Geneser, 1993; Kolb *et al.*, 2000; Reichenbach y Robinson, 1995) and the ILM (Reichenbach y Bringmann, 2015).

The Müller cells have arisen as the retinal adult stem cells in the fish retina, given that they can generate all the retinal cells when a lesion is produced (Bernardos *et al.*, 2007; Gorsuch y Hyde, 2014; Lenkowski y Raymond, 2014; Thummel, S C Kassen, *et al.*, 2008). They also guide growing axons during the retinal continuous growth (Stuermer y Bastmeyer, 2000).

Continuous growth

The retina constitutes one of the 16 adult neurogenic niches in zebrafish (Grandel *et al.*, 2006; Than-Trong y Bally-Cuif, 2015). In fact, there are 2 structures that form this niche. On the one side the Müller cells (Figura 2), which are able to regenerate all neuronal cells, including rods, after a lesion in the retina (Bernardos *et al.*, 2007; Goldman, 2014; Raymond *et al.*, 2006; Thummel, S C Kassen, *et al.*, 2008; Wan y Goldman, 2016). On the other side, the Peripheral Growing Zone (PGZ) (Figura 3). This zone is formed by neuroepithelial cells that form a ring in the retina's margin (Grun, 1975; Johns, 1977; Müller, 1952). The PGZ generates new retinal layers throughout all life, including Müller cells, but they do not give rise to rods (Otterson y Hitchcock, 2003). Due to this continuous growth, it is possible to visualize growing axons from the emerging ganglion cells throughout the visual pathway (Bunt, 1982; Easter Jr. *et al.*, 1984, 1981; Stuermer y Bastmeyer, 2000).

ENGLISH SUMMARY

The Optic Nerve Head (ONH)

The ONH is the transition zone between the retina and the ON. It is an essential part during development as well as during continuous growth and regeneration in the visual system (Parrilla, 2010).

Structure and organization

The ONH is only composed of glial cells and by axons from the retinal ganglion cells. Besides, some blood vessels that irrigate the retina can be spotted (Figura 4). Its organization and characteristics vary among vertebrates. In mammals, astrocytes exclude the ON from the retina. These cells also organize the ganglion cell's axons in the posterior part of the ONH, forming a characteristic structure called *lamina cribosa* (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009; Triviño *et al.*, 1996).

- *The lamina cribosa*

The lamina cribosa is a structure that is interposed between the ONH and the ON. Is composed of column-forming astrocytes (Figura 5). Its function is related to the absence of myelination in the mammals' retina, including humans (Fujita *et al.*, 2000; Morcos y Chan-Ling, 2000; Sun *et al.*, 2009).

However, the lamina cribosa is absent from the posterior ONH in teleosts (Fujita *et al.*, 2000), and the Müller cells are limiting the ON from the retina (Lillo *et al.*, 2002). On the other side, some authors have described a GFAP⁺ astrocytic ring in the same location of the ONH, which constitutes the glial limiting (Lillo *et al.*, 2002; Parrilla *et al.*, 2009). This GFAP⁺ structure has also been described in other animals (Balaratnasingam *et al.*, 2014; Morcos y Chan-Ling, 2000).

As no lamina cribosa exists in teleosts, there are oligodendrocytes and myelinated axons in the ONH and the retina ONFL (Lillo *et al.*, 1998; Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2016; Schweitzer *et al.*, 2007). Despite this, the continuous growth processes in the retina generate new young, unmyelinated axons which run through the most vitreal part of the ONFL until they reach the ONH (Bunt, 1982; Easter Jr. *et al.*, 1984, 1981).

The ON

The ON transmits the visual information from the retina to the brain. It is composed of glial cells as well as of ganglion cells' axons and blood vessels (Bunt, 1982; Levine, 1989; Maggs y Scholes, 1986, 1990; Tapp, 1973; Wolburg, 1981).

The ON is divided into several parts. In teleosts, we find the prechiasmatic and the postchiasmatic tracts. In this Thesis, we will focus on the main component of the prechiasmatic tract, which is hereby named as ON.

Structure and organization

The ON is a folded sheet, where the ganglion cell axons run parallel to the foldings (Maggs y Scholes, 1986). We can distinguish a mature part with myelinated axons as well as a growing edge, containing young unmyelinated axons (Easter Jr. *et al.*, 1981; Mack y Wolburg, 2006; Maggs y Scholes, 1990) (Figura 7). We also find reticular astrocytes packing the axons (Maggs y Scholes, 1990), and lots of oligodendrocytes myelinating the mature axons (Ankerhold y Stuermer, 1999; Schweitzer *et al.*, 2007). Finally, the reticular axons show distinct maturation stages depending on their location in the growing edge (Lillo *et al.*, 1998; Maggs y Scholes, 1990) (Figura 8).

Visual system regeneration

Despite in mammals there is a lack of neuronal regeneration but in a few zones (Álvarez-Buylla *et al.*, 2002; Calof *et al.*, 2002; Fleisch *et al.*, 2011; Gould *et al.*, 2000; Martínez-Navarrete *et al.*, 2008), anamniotes like zebrafish retain highly regenerative abilities in the CNS (Becker y Becker, 2007). The visual system can also regenerate and recover from any kind of damage, from the retina to the ON (Becker y Becker, 2007, 2008; Goldman, 2014; Lenkowski y Raymond, 2014; Thummel, Sean C. Kassen, *et al.*, 2008).

ON regeneration

The regenerative characteristics of the ON have been largely studied (Sperry, 1948; Wolburg, 1981). While in mammals the ON crush causes the death of the ganglion cells in the retina (Berry *et al.*, 1988; Quigley *et al.*, 1995; Silveira *et al.*,

ENGLISH SUMMARY

1994; Vidal-Sanz *et al.*, 1987), in the zebrafish retina they do not only survive (Zou *et al.*, 2013) but also regrow rapidly, reaching the optic tectum in 4 weeks (Becker *et al.*, 2000; Meyer, 1980).

It has been proved that an initial inflammatory response is required (Kyritsis *et al.*, 2012, 2014), as well as macrophage and microglia invasion (Münzel *et al.*, 2014). After that, myelin and cell debris are cleaned up (Colavincenzo y Levine, 2000; Nona *et al.*, 1998; Parrilla *et al.*, 2016), and some genes are upregulated to promote the axonal regrowth (Goldman *et al.*, 2001; Ramachandran *et al.*, 2010); including the expression of several extracellular matrix proteins (Becker *et al.*, 2004; Bernhardt, 1999). Besides, the ONH and ON pax2⁺ astrocytes show a very plastic behavior to damage, organizing the regrowing axons (Parrilla, 2010; Parrilla *et al.*, 2016).

Glial cells in the visual system

Astrocytes

The astrocytes are the glial cells which are commonly characterized by the expression of GFAP (Kolb *et al.*, 2000; Ramón y Cajal, 1913; Schnitzer, 1988). However, in teleost, the expression of S100 has been associated with these cells in the retina (Vecino *et al.*, 1997), despite this population is not well-understood or further characterized.

In fact, astrocytes do not exist like the mammalian concept in teleosts (Cuoghi y Mola, 2009; Lyons y Talbot, 2015). Despite this, in the zebrafish ON we can find the so-called *reticular astrocytes* (Figura 7), which express cytokeratin instead of GFAP (Giordano *et al.*, 1989; Maggs y Scholes, 1990); they are joined by desmosomes (Maggs y Scholes, 1990; Parrilla, 2010) and they express pax2 (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009) (Figura 9). These astrocytes fasciculate the retinal axons in the ON (Maggs y Scholes, 1990) and they also reestablish the ON after a lesion (Parrilla *et al.*, 2012, 2013).

Astrocytes' origin

In mammals, the ON and retinal astrocytes are generated from APCs (Astrocyte Progenitor Cell), which derive from the neuroepithelium from the optic

stalk, which proliferate and migrate into the retina (Ling *et al.*, 1989; Ling y Stone, 1988; Mi y Barres, 1999; Mi *et al.*, 2001; Watanabe y Raff, 1988) (Figura 10).

However, fishes lack blood vessels in the retina, so there are no astrocytes inside (Lyons y Talbot, 2015; Reichenbach y Bringmann, 2015). Despite this, the embryonic origin of the reticular astrocytes is very similar to that of mammals. Thus, *pax2*⁺ cells in the optic stalk generate these astrocytes (Macdonald *et al.*, 1997; Maggs y Scholes, 1990), which then migrate and colonize the ON up to the optic chiasm, where *pax2* expression disappears (Macdonald *et al.*, 1997).

Finally, in adult mammals an APC remnant zone in the ON has been described, which generates *Pax2*⁺/*GFAP*⁺ astrocytes (Chan-Ling *et al.*, 2009). This source has also been described in humans (Chu *et al.*, 2001) and in fish (Parrilla, 2010), where a strong glial reaction is observed after the cryoelimination of the PGZ or ON crush (Parrilla *et al.*, 2012, 2013).

Genes involved in astrocyte's lineage

Pax2

Pax2 (*Paired box gene 2*) is a transcription factor characterized by the DNA union motif, called *paired domain* (Chalepakis *et al.*, 1991). *Pax2* is essential during ON formation (Czerny *et al.*, 1993; Dressler *et al.*, 1990), and during visual system's origin, where it is expressed in the glial cells of the optic stalk (Macdonald *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1996). *Pax2* expression is essential in the choroid fissure closing as well as for the ON glial population differentiation (Macdonald *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1996). In adult teleosts, *pax2* remains expressed in the reticular astrocytes of the ON, which are involved in axonal growth regulation (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009). Besides, it also remains expressed in Müller cells in the central retina (Boije *et al.*, 2010).

Sox2

Sox2 (*Sex determining region Y-box 2*, *SRY-box*) is a transcription factor which possesses a high mobility (HMG) group (Kamachi *et al.*, 1999; Wißmüller *et al.*, 2006). *Sox2* is expressed in multipotent stem cells (Bylund *et al.*, 2003); it is involved in the differentiation of amacrine cells in the retina (Lin *et al.*, 2009; Le Rouëdec *et al.*, 2002) and maintains Müller cells in a quiescent state as neural

ENGLISH SUMMARY

progenitors (Bhatia *et al.*, 2011; Surzenko *et al.*, 2013). During development, Sox2 is co-expressed along with Pax2 in the murine ON APCs (Tiwari *et al.*, 2014).

Sox2 also can drive the expression of Mbp (Hoffmann *et al.*, 2014); it also interacts with HDAC1 (Cox *et al.*, 2010) and it is expressed in reprogrammed OPCs and microglia (Zhang *et al.*, 2014).

During zebrafish development, sox2 is expressed in the optic tectum, the preoptic nucleus, the PGZ and around cephalic ventricles (Germanà *et al.*, 2010; Stephens *et al.*, 2010). In adult animals, it remains expressed in Müller and amacrine cells in the retina (Gorsuch *et al.*, 2017; Jusuf y Harris, 2009; Lin *et al.*, 2009). Finally, it is upregulated and it is detected in oligo and ependimoglia cells after a CNS lesion (Hui *et al.*, 2014; Lang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013).

Oligodendrocytes

The oligodendrocytes are glial cells which were discovered by Pío del Río Hortega (Río Hortega, 1928). They possess a small and rounded soma, with several and highly branched processes (Figura 11). Their main and characteristic function is forming the myelin sheath, despite they also perform important metabolic functions (Fünfschilling *et al.*, 2012; Y. Lee *et al.*, 2012; Rinholm *et al.*, 2011).

In the zebrafish visual system, they are found along the visual pathway, from the retina to the optic tectum (Lillo *et al.*, 1998; Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2016; Schweitzer *et al.*, 2007; Wolburg, 1980; Zou *et al.*, 2013). Thus, they express several transcription factors, including **olig1**, **olig2**, **sox10**, **nkx2.2a**, **mbpa** and **mbpb**, **mpz**, **plp1a/DM20**, **36K** protein, **Zwilling-A** and **Zwilling-B**, and **claudin k** (Bai *et al.*, 2011; Brösamle y Halpern, 2002; Kucenas *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2004; Münzel *et al.*, 2012; Nawaz *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2002; Schaefer y Brösamle, 2008; Schebesta y Serluca, 2009; Takada *et al.*, 2010; Yoshida y Macklin, 2005).

Myelination

Myelin is an insulating lipid sheath which is essential for the electric impulse transmission (Buckley *et al.*, 2008; Simons y Nave, 2015) (Figura 12). Myelination

is an innate characteristic to oligodendrocytes (S. Lee *et al.*, 2012; Rosenberg *et al.*, 2008), but it has recently shown to be a highly refined process, an axonal selection similar to neuronal synapses existing (Almeida y Lyons, 2014; Chen *et al.*, 2016; Hines *et al.*, 2015; Koudelka *et al.*, 2016).

Briefly, myelination consists in axonal recognition, membrane wrapping and myelin compaction (Snaidero *et al.*, 2014) (Figura 13). Besides, the sodium channels rearrange in the Ranvier nodes (Baumann y Pham-Dinh, 2001) (Figura 14).

Genes involved in oligodendrocyte's lineage

Olig2

Olig2 (*Oligodendrocyte lineage transcription factor 2*) is a bHLH domain transcription factor which specifies the oligodendrocyte lineage in mammals and zebrafish (Park *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001). During development, olig2 is expressed in OPCs in the spinal cord and in ventral mesencephalon (Park *et al.*, 2007; Schebesta y Serluca, 2009), and it is maintained in the adult oligodendroglial lineage of zebrafish (März *et al.*, 2010; Münzel *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2013).

Sox10

Sox10 (*Sex determining region Y-box 10, SRY-box*) is a transcription factor which promotes the formation, differentiation and survival of the oligodendrocyte lineage in mammals and zebrafish (Stolt *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2010; Wegner, 2008; Wegner y Stolt, 2005). It also promotes the expression of *mbpa* (Li *et al.*, 2007; Wegner, 2008; Wegner y Stolt, 2005) and *mpz* (Peirano *et al.*, 2000). In the adult zebrafish, sox10 remains expressed in the oligodendroglial lineage (Parrilla *et al.*, 2016; Wegner y Stolt, 2005).

Mbpa

The *myelin basic protein a* (*mbpa*) constitutes the second most abundant protein in the CNS (Jahn *et al.*, 2009; De Monasterio-Schrader *et al.*, 2012; Patzig *et al.*, 2011). It is responsible for the adhesion of the cytosolic surfaces in the myelin sheath, forming the major dense line (Boggs *et al.*, 2006; Brösamle y

ENGLISH SUMMARY

Halpern, 2002; Jung *et al.*, 2010). Mbp_a is the first protein to be expressed during zebrafish development (Buckley *et al.*, 2010) and remains expressed in the whole CNS of adult fish, including the visual system (Münzel *et al.*, 2012; Parrilla *et al.*, 2016; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2013).

Mpz

The *myelin protein zero* (P₀ in mammals) is a transmembrane glycoprotein which is expressed both in the CNS and PNS in zebrafish (Bai *et al.*, 2011; Brösamle y Halpern, 2002; Schweitzer *et al.*, 2003). Mpz mediates in the myelin sheath compaction, but in fish some of these functions may fall on plp1/DM20 (D'Urso *et al.*, 1990; Filbin *et al.*, 1990; Schneider-Schaulies *et al.*, 1990; Schweitzer *et al.*, 2006; Shapiro *et al.*, 1996). Mpz is expressed during development in the ON at 7dpf (Schweitzer *et al.*, 2003), and its maintained in adult oligodendrocytes but excluding retina and ONH (Bai *et al.*, 2011; Münzel *et al.*, 2012; Schweitzer *et al.*, 2003). It is also overexpressed after a lesion (Bai *et al.*, 2014; Schweitzer *et al.*, 2003).

Glutamine synthetase (GS)

The GS is an enzyme (EC 6.3.1.2) which synthesizes glutamine from glutamate and ammonia, with the expense of ATP (Suárez *et al.*, 2002). Its gene, *glul*, is considered to be one of the most antiquated functional genes (Kumada *et al.*, 1993). In zebrafish, 3 paralogs (*glula*, *glulb*, *gluc*) have been identified up to date (Dhanasiri *et al.*, 2012), being *gluc* more related to tetrapods than the others (Dhanasiri *et al.*, 2012). The *glul* gene regulation is complex, comprising gene response elements or substrate regulation (Dai *et al.*, 2012; Dhanasiri *et al.*, 2012; Eid *et al.*, 2013; Kosenko *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2005; Suárez *et al.*, 2002).

The expression of GS in oligodendrocytes has been largely reported, not only in cultured cells but also in the mammalian ON (Anlauf y Derouiche, 2013; Baas *et al.*, 1998; Bernstein *et al.*, 2014; D'Amelio *et al.*, 1990; Domercq *et al.*, 1999; Fressinaud *et al.*, 1991; Jennings *et al.*, 2002; Kawano, 2015; Miyake y Kitamura, 1992; Rai *et al.*, 2013; Tansey *et al.*, 1991). In the PNS, it is expressed in Schwann cells, and its degradation regulates their differentiation (Saitoh y Araki,

2010). In previous works, we have detected its expression in goldfish oligodendrocytes as well as in *western blots* (Parrilla *et al.*, 2009; Parrilla, 2010).

Numerous studies describe the variation of *glul* or the GS protein in oligodendrocytes in several conditions like multiple sclerosis (Werner *et al.*, 2001). Thus, the GS contributes to the normal function of oligodendrocytes (Fressinaud *et al.*, 1991; Kugler y Beyer, 2003), and it decreases along with myelination when exposed to heavy metals (Rai *et al.*, 2013).

A scheme of the complex gene regulation in oligodendrocytes is shown in Figura 15

Oligodendrocytes' origin

Oligodendrocytes are originated from the Oligodendrocyte Progenitor Cells (OPCs), which are generated in ventricular zones of the embryonic neural tube (Bergles y Richardson, 2016). In zebrafish, they are firstly detected at 2dpf in the spinal cord (Park *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003), and they come from the *olig2*⁺ pMN precursors (Park *et al.*, 2002; Ravanelli y Appel, 2015) (Figura 16). Then, the OPCs divide, migrate and search for their target axons, which are myelinated within 5h (Czopka *et al.*, 2013; Kirby *et al.*, 2006; Miller, 2002; Takada *et al.*, 2010).

In mammals' and birds' visual system, OPCs are specified in the preoptic area of the brain (Gao y Miller, 2006; Merchán *et al.*, 2007; Miller, 2002; Ono *et al.*, 1997, 2017). They migrate to the ON through the optic chiasm (Ono *et al.*, 1997, 1998; Tsai y Miller, 2002), expressing *olig2* (Ono *et al.*, 2017), until they reach the retina, where they stop migrating due to the lamina cribosa (French-Constant *et al.*, 1988; Perry y Lund, 1990; Tsai y Miller, 2002). The migration is influenced by *shh* (Gao y Miller, 2006; Merchán *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 1997) and semaphorins (Bribián *et al.*, 2006; Bribián y de Castro, 2007; Merchán *et al.*, 2007; Spassky *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2001). Despite this, it is not clear what prevents the entrance to the retina, but it seems some molecules like netrin-1 and anosmin are involved (Bribián *et al.*, 2008; Deiner *et al.*, 1997; Gao y Miller, 2006; Kiernan *et al.*, 1996; Tsai y Miller, 2002) (Figura 18).

ENGLISH SUMMARY

Microglia

Microglial cells are highly specialized phagocytic cells, committed to the CNS defense (Ransohoff y Cardona, 2010). They are originated in the mesoderm (Navascués *et al.*, 2000; Stoll y Jander, 1999), and they derive from macrophages that migrate from the yolk sac to the CNS (Herbomel *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2012). Microglia is involved in the defense of CNS against pathological situations (Perry y Gordon, 1988; Río Hortega, 1932; Streit *et al.*, 1988). Moreover, they seem to trigger the regenerative response in the CNS (Kyritsis *et al.*, 2012, 2014), since inflammation is firstly required to achieve the remyelination of the ON (Münzel *et al.*, 2014). However, this process fails with increasing age, in which has been termed *inflammaging* (Bollaerts *et al.*, 2017).

Visual system development

Optic cup formation

The retina is specified during gastrulation, when the eye morphogenetic field is formed (Li *et al.*, 1997). After that, the cells migrate so the optic primordia are originated, which are attached to the brain by the optic stalks (Li *et al.*, 1997; Schmitt y Dowling, 1994). These primordia evolve to the optic vesicles (Hyatt *et al.*, 1992), which rotate and invaginate to form the optic cup (Schmitt y Dowling, 1994) (Figura 19).

Retina and ON formation

The first cells to be specified in the retina are the retinal ganglion cells, which are formed from 24hpf onwards, from ventral to dorsal retina in a clockwise manner (Hu y Easter Jr., 1999; Kljavin, 1987; Schmitt y Dowling, 1999). The different cellular types of the retina are sequentially specified (Hu y Easter Jr., 1999). Along with this retinal specification, the ON is colonized by pax2⁺ cells from the optic stalk (Macdonald *et al.*, 1995, 1997). The ganglion cells' axons grow, form the optic chiasm and finally get to the optic tecta at 48 hpf (Burrill y Easter Jr., 1995; Stuermer, 1988). At 3dpf, the retina is completely laminated, and it starts growing from the PGZ at 5dpf (Figura 20).

ONH formation

The retinal axons are firstly driven to the ON through the choroid fissure, which is retained in the optic stalk. When the fissure closes, the growing axons form the optic disc or ONH, and the optic stalk is progressively replaced by the ON. The ONH then attracts and guides these axons to enter the ON and project to the optic tectum (Stuermer y Bastmeyer, 2000). In this process there are several molecules secreted by the astrocytes derived from the optic stalk (Macdonald *et al.*, 1995), like netrin 1 (Stuermer y Bastmeyer, 2000) (Figura 21).

ENGLISH SUMMARY

Objectives

As our hypothesis of work we propose that oligodendrocytes in the zebrafish visual system play a key role in the continuous growth and regeneration; that they exhibit a high biochemical complexity and that may be intimate associated with the astroglial lineage. Besides, we pose the possible origin of the visual pathway oligodendrocytes in similar cephalic areas as in other animal groups.

To prove this hypothesis, we planned to:

1. Immunohistochemically characterize the zebrafish visual pathway oligodendrocytes, both in control and after the ON crush, paying special attention to the ONH.
2. Analyze the response of GS and other genes involved in the oligo and astroglial lineages, as well as in myelination, during the regenerative process.
3. Characterize the visual pathway oligodendrocytes during zebrafish development, trying to track their origin.

Material and methods

Most of the experiments were carried out in adult male and female AB strain zebrafishes (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan 1822), which were maintained in the INCyL aquaria under standard conditions. We also employed adult AB transgenic zebrafishes, which were kindly provided by Professor Bruce Appel or Dr. Juan Ramón Martínez Morales, and which are detailed in the following chart.

Transgenic	Construction	Reference
Tg(sox10:EGFP)	GFP expression under <i>sox10</i> promoter	(Dutton <i>et al.</i> , 2008)
Tg(sox10:TagRFPT)	RFP expression under <i>sox10</i> promoter	(Blasky <i>et al.</i> , 2014)
Tg(olig2:EGFP)	GFP expression under <i>olig2</i> promoter	(Shin <i>et al.</i> , 2003)
Tg(gfap:EGFP)	GFP expression under <i>gfap</i> promoter	(Bernardos y Raymond, 2006)
Tg(mbpa:TagRFPT)	RFP expression under <i>mbpa</i> promoter	Prof. Appel

Adult animals were used as control fishes, either without any kind of manipulation, or its right ON was crushed and they were sacrificed at different time points (dp). All adult animals were deeply anesthetized before their sacrifice, according to Spanish and European laws (2010/63/UE; RD 53/2013; Ley 32/2007; Orden ECC/566/2015).

We also employed zebrafish larvae at different developmental stages (hpf; dpf), that were produced by natural matings of adult transgenic fishes. All specimens were also anesthetized before sacrifice.

To get the best results with our commercial antibodies against *sox10* and *olig2*, we performed a soft fixation protocol, which consisted in fixating the samples for 2h at room temperature in 2% paraformaldehyde. We also performed a post-fixation step prior to immunohistochemistry, consisting in rinsing the slides in ice-colded methanol for 5 min.

To assess the different objectives raised in this Thesis, we performed the following protocols and experiments:

1. Immunohistochemical sectioning and *whole mount* analyses in adult and larvae specimens.

ENGLISH SUMMARY

We used the following primary and secondary antibodies:

Antigen	Supplier	Reference	Antibody	Working dilution
Cytokeratin	Sigma	C2562	Mouse monoclonal IgG	1:100
GFAP	Sigma	G6171	Mouse monoclonal IgG	1:500
GS	Millipore	MAB302	Mouse monoclonal IgG	1:1000
MBP	Provided by Prof. Appel	(Takada <i>et al.</i> , 2010)	Rabbit polyclonal IgG	1:1000
Neurolin	DSHB	zn8	Mouse monoclonal IgG	1:300
Olig2	Anaspec	AS-55636	Rabbit polyclonal IgG	1:500
Pax2	Covance	PRB-276P	Rabbit polyclonal IgG	1:500
PCNA	Santa Cruz Biotech	sc-56	Mouse monoclonal IgG	1:500
Sox10-CT	Anaspec	AS-55650	Rabbit polyclonal IgG	1:500
Sox10-IN	Anaspec	AS-55651	Rabbit polyclonal IgG	1:500
Sox2	Abcam	Ab-97959	Rabbit polyclonal IgG	1:500
ZO1	Zymed	33-9100	Mouse monoclonal IgG	1:100
zrf1 (GFAP)	ZIRC	zrf1	Mouse monoclonal IgG	1:500

Antigen	Supplier	Conjugate	Antibody	Working dilution
Rabbit IgG	Jackson	Cy2/Alexa Fluor 488 Cy3 Cy5	Goat polyclonal IgG	1:250
Mouse IgG	Jackson	Cy2/Alexa Fluor 488 Cy3 Cy5	Goat polyclonal IgG	1:250

2. ON crush in adult zebrafish.

We employed a standard protocol in our lab. Briefly, right eye was removed; the ON and optic artery were rotated to expose the ON, where we performed the crush with fine forceps until a clear band was visible. We placed the eye into the eye socket and let the fish recover.

3. Image acquisition and statistical analysis.

We used both epifluorescence and confocal microscopes. Images were adjusted or cropped with *Adobe Photoshop CS5*. Cell counts were performed with *ImageJ* or *Fiji* software. Statistical analyses were carried out with *Graph Pad Prism 5* software.

4. RT-qPCR gene analyses of both control and crushed animals.

We analyzed by qPCR the following genes:

Gene	Left primer(5'-3')	Right primer(5'-3')	Amplicon (nt)	ENSEMBL reference
ef1α	GAGGAAATCACCAAGG AAGTCAG	TTGAACCAGCCCATG TTTGAG	134	ENSDARG00000020850
glula	ATGGTGGACTGAAATG TATTGAGG	AATGTTGGAGGTTTC ATGGTGG	137	ENSDARG00000099776
glulb	GCCCGCTTCCTCCTAC ACA	CTCCTCAATATGCTT CAAACCTCC	156	ENSDARG00000100003
glulc	GGAATTGAGCACATTG AGAAAGC	CGGAGAAATCGTGGA TGCTG	145	ENSDARG00000013227
mbpa	GGCTGGGCAGAAAGAA GAA	GGAAGAGTGGTGGGG TCTCT	137	ENSDARG00000036186
mpz	GGCTAAGGACGCAATC TCAA	AATGGGCCTTTATTA GCTGGA	69	ENSDARG00000038609
olig2	TCAATTCTGCAAAGCC ACAC	CGCCTTCAGGAGAAG AAGGT	142	ENSDARG00000040946
sox10	AAGAGCCTGCACCTGG AG	CTCGCCTGATTTTCC TCCCT	150	ENSDARG00000077467
sox2	TGGACCAACGGAGGCT AC	CGTTCAAACCTCGGGT GCT	67	ENSDARG00000070913

ENGLISH SUMMARY

RESULTS

We found that oligodendrocytes in the visual system express olig2 and sox10. These results were obtained by using our commercial antibodies that, to our knowledge, had never been described in any previous zebrafish work. These oligodendrocytes were detected from the ONFL in the retina, the ONH and throughout the ON. They had an oval nuclei, with a characteristic nuclear indentation. They were arranged in rows and groups from the retina to the ON. We also found that oligodendrocytes expressed the enzyme GS, but we could only distinguish its expression in the ONH and ON. However, in the retina, the GS⁺ and GFAP⁺ processes of the Müller cells appeared to englobe the oligodendrocytes. We also found that oligodendrocytes expressed the cell union marker ZO1. ZO1⁺ cells were found in the ONH and ON, where they were mostly disposed in the glial limit. We obtained similar results with cytokeratin (ck) labeling, which was found in the OLM in the retina and also in the ONH and ON. Oligodendrocytes were ck⁻, but they were intimately associated with ck⁺ processes.

On the other side, we characterized the pax2⁺ reticular astrocytes in the ONH and ON. We found pax2⁺/GS⁺ Müller cells in the retina, as well as pax2⁺ amacrine and displaced amacrine cells. In the ONH and ON the pax2⁺ astrocytes were also ck⁺, and they arranged close to the zn8⁺ growing axons in the ONH. Surprisingly, we found very similar results when we labeled our sections with sox2. In the retina, sox2 labeled the PGZ, Müller, amacrine and displaced amacrine cells. Besides, we observed sox2⁺/ck⁺/ZO1⁺ cells in the ONH and ON, resembling the pax2 labeling. Both in pax2 and sox2, cells in the ONH and ON had a small, round-shaped nuclei, and they were interposed between GS⁺ cells, which were presumed to be oligodendrocytes. We also detected the same location of sox2 cells in the glial limit between the ONH and ON as we have found with pax2 cells. When we examined proliferation (PCNA⁺ cells), we found very few proliferating oligo or astroglial cells, most of them arranged close to the central artery in the ONH.

Finally, we found mbp⁺ myelinated axons from close regions to the PGZ, which extended throughout the retina until they reached the ONH and ON. Zn8⁺

unmyelinated axons were not labeled by mbp, and we detected GS⁺ cells interspersed among the mbp⁺ fascicles.

To further confirm our findings, we employed olig2:GFP, mbpa:RFP and gfap:GFP transgenic fish. Olig2:GFP fish confirmed the GS⁺ labelling in oligodendrocytes, revealing some olig2⁺/sox2⁺ cells in the ON. We also found olig2⁺/mbpa⁺ myelinating oligodendrocytes in the ONH and ON, but not in the retina. On the other side, gfap:GFP fish revealed gfap⁺/sox2⁺/pax2⁺/ck⁺ cells in the glial limit between ONH and ON.

After crushing the ON, we analyzed the same markers during several time points, as well as we performed qPCR gene quantification. During the very first days after crushing the ON, we observed gene changes in retina and ON, that in summary behaved antagonistically along the whole process. At 2dp, we found more olig2⁺/sox10⁺ cells everywhere, like sox2⁺ cells, but we only detected changes in pax2 cells in the ON. Immunohistochemical analyses revealed the major changes around the crush in the ON, detecting numerous proliferating cells. At 7dp, the glial reaction had extended to the retina, where we didn't detect the ck and ZO1 labelling, as well as GS was disorganized in the ONH and ON. Proliferation had extended through the ONH and ON, and we did not find so many zn8⁺ axons. Remarkably, we found mbp degenerating areas in the crushed ON, that were occupied by zn8⁺ axons and GFAP⁺ processes. At 21dp, the demyelination was extended through wider parts in the ON; the ck and ZO1 labelling had recovered and proliferating cells had decayed, some of them remaining in the glial limit and the ON. However, we still found more sox2⁺ cells, which had bigger nuclei, like pax2⁺ cells. We detected greater amounts of zn8⁺ axons and GS was increased in the ON, where qPCR revealed strong *gluc* upregulation. At 60dp, the tissue seemed like controls. Despite this, we still detected the ON crush site, and the pax2 ONH population was increased. We found some PCNA⁺ cells, and zn8 axons regrowing in the ONH and ON.

We also analyzed transgenic larvae to find out the possible origin and evolution of oligodendrocytes during visual system development. We used several transgenic lines, which revealed the preoptic area and the ventral hypothalamus as the places where the first OPCs raised at 2dpf. In the following days, we found

ENGLISH SUMMARY

these olig2⁺/sox10⁺/sox2⁺ OPCs migrating from their ventral locations to the optic chiasm and ONs. We established the onset of myelination at 5dpf, and these mbpa⁺ oligodendrocytes further extended into more ventral and dorsal zones from the ONs. At the same time, pax2⁺ cells had emerged from the ONH and extended to the ON. We find very similar results in this locations with sox2, whose labelling decreased in the optic pathway as larvae developed. We detected sox10 cells in the INL of the retina, but although we could not establish its nature, they were not oligodendrocytes. Our studies finished at 14dpf, when we detected olig2⁺ cells in the retina's entrance, but they had not penetrated into the ONH.

DISCUSSION

Oligodendrocytes exist in the zebrafish visual system (Münzel *et al.*, 2012, 2014; Tian *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2013). However, no commercial antibodies have been available, so the use of transgenic lines has been, until now, the only way to characterize them. Our results show that our commercial antibodies label the oligodendrocyte population in the zebrafish visual system. Thus, we have checked our results with some of the transgenic lines used in these studies, including *olig2:GFP* and *mbpa:RFP* (Jung *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2003).

We found that the *sox10* and *olig2* labeling from our antibodies labeled the *olig2:GFP* fish. We could have these results because of the soft fixation protocol we have developed. This means that our commercial antibodies will further be used in addition to the existing transgenic lines.

When we characterized the oligodendrocyte population in the visual system, we found, like in previous works (Parrilla, 2010), that they expressed the typical astrocytic marker GS. The expression of GS in oligodendrocytes has been largely described, also in the ON (Domercq *et al.*, 1999; Jennings y Carroll, 2010; Kawano, 2015; Parrilla, 2010), as well as the arrange in rows and groups (Ankerhold y Stuermer, 1999; Parrilla, 2010; Parrilla *et al.*, 2016). Our results, in addition to our *glul* gene expression analyses, show that GS may be implied in the ON regeneration. Since GS variations or deletions are related to several conditions (Fressinaud *et al.*, 1991; Kugler y Beyer, 2003), this enzyme could be a key factor to myelination (Rai *et al.*, 2013). As we have found that the three paralogs of *glul* are differentially expressed in the retina and in the ON, and that they exhibit different behaviors during the regenerative process, this enzyme could be involved not only in the removal of the toxic glutamate but also could be fully implicated in the oligodendrocyte lineage specification. This has already been proved in Schwann cells (Saitoh y Araki, 2010), where GS expression stabilishes their differentiation.

We have also shown that ZO1 is expressed not only in oligodendrocytes but also in astrocytes in the visual system. Our results regarding ZO1 also had been previously described in oligodendrocytes (Boggs *et al.*, 2014; van Meeteren *et al.*, 2006; Münzel *et al.*, 2012; Penes *et al.*, 2005), as well as in the reticular astrocyte population (Parrilla *et al.*, 2012, 2013). Besides, we have found that *ck* is

ENGLISH SUMMARY

expressed in these astrocytes, as previously showed (Koke *et al.*, 2010; Parrilla *et al.*, 2012, 2013). Also, we have found that a highly degree of association exists between these two cellular types, since we have found GS⁺ oligodendrocytes and ck⁺ astrocytes disposed in rows, especially in the glial limit between the ONH and ON. This interrelation has been described in the goldfish ON (Macdonald *et al.*, 1997), but, up to date, it is the first time to be described in zebrafish.

After the ON crush, we found an increase in the levels of sox10⁺ oligodendrocytes at 2dp, but we did not notice any change after that but in the retina. However, *sox10* showed an inverse behavior in the ON and retina. We think this could be a result of the role of *sox10* as a myelin promoting gene (Li *et al.*, 2007). In this case, the downregulation in the retina could be preventing the myelination of the regenerated axons (Becker y Becker, 2007; Ono *et al.*, 1997, 1998; Tsai y Miller, 2002) but the upregulation in the ON could be promoting the survival of the damaged oligodendrocytes (Takada *et al.*, 2010).

We got similar results with *olig2*, showing opposite results between cell counts and gene expression. As *sox10*, *olig2* was downregulated in the retina but it was only upregulated in the ON in the regenerative stages. This may be showing the different functions that *olig2* and *sox10* have, since *olig2* establishes the oligodendroglial lineage but is not required in the expression of myelin genes or survival (Park *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2010; Zannino y Appel, 2009).

Regarding myelination, we found no changes in the loose myelin of the retina after the crush, like some other works (Zou *et al.*, 2013). However, the main changes were found in the ON, where some other authors have described similar modifications, including less myelin labeling in the first stages (Münzel *et al.*, 2012). According to that, gene expression results of *mbpa* and *mpz* show a downregulation in the first stages, but a latter upregulation. Despite we do not have a clear peak in the *mpz* levels, which should reveal a damage reaction (Bai *et al.*, 2014; Schweitzer *et al.*, 2003), we think that it could be reached in later time points.

When we studied cell proliferation, we found that the oligodendrocyte population did not proliferate as much as expected. However, this has been fully documented, since it has been proved that the oligodendrocytes expand from resident OPCs (Blakemore y Keirstead, 1999; Franklin y ffrench-Constant, 2008). In the zebrafish ON, some studies found no more than a 25% of oligodendrocytes

proliferating (Münzel *et al.*, 2012), so they must have arisen from an OPC population. We have tried to identify this population, and we think that some of the olig2⁺/sox2⁺ cells we have detected could constitute the oligodendrocyte niche in the visual system. This is reinforced by the detection of GS⁺/sox2⁺ cells close to the crush at 7dp, which could be representing this OPCs being activated after the lesion. However, more studies need to be performed to further confirm our findings.

After ON crush, we also found several differences, including the loss of ck and ZO1 labeling. This loss shows a glial reaction to the crush (Parrilla, 2010), and despite we have found and documented that ZO1 is expressed by oligodendrocytes and astrocytes, its expression only reveals the high degree of communication between glial cells in the ONH and ON. Even more, there could be some heterotypic unions between astrocytes and oligodendrocytes, which have been previously documented (Liu *et al.*, 2017).

On the other side, we characterized the pax2 population. As we have showed in Introduction, there are no typical astrocytes in the fish CNS; but in the visual system we can find the so-called reticular astrocytes (Macdonald *et al.*, 1997; Maggs y Scholes, 1990, 1986), which express ck, ZO1 and pax2 (Macdonald *et al.*, 1997; Parrilla *et al.*, 2009, 2012). Our results are similar to these characteristics, and we have also found pax2⁺ Müller cells, which had been already described only in the zebrafish central retina (Boije *et al.*, 2010; Stanke *et al.*, 2010). We also found pax2⁺ amacrine cells, which also expressed sox2. This co-labeling with pax2 in amacrine cells had never been described in zebrafish, although sox2 specifies and determines the differentiation of this neural type, which maintains a constant ratio between the INL and GCL (Whitney *et al.*, 2008, 2014). This is striking, since we found only differences in the GCL, and we cannot fully explain why that layer is specifically affected.

Pax2⁺ astrocytes reacted to the crush, enlarging their nuclei (Neve *et al.*, 2012; Pekny *et al.*, 2007), losing the ck labelling (Parrilla, 2010) and concentrating around the central artery in the ONH and in the crush zone in the ON. These places represent the pathway where zn8⁺ regenerating axons grow, showing the pax2⁺ astrocytes as the guiding cells in the visual system, as previously reported (Parrilla *et al.*, 2012, 2013). At 60dp, the pax2⁺ cell density grew, indicating its possible relationship with axonal synapses' refinement (Becker y Becker, 2007).

ENGLISH SUMMARY

Finally, we found a $pax2^+$ cell population in the glial limit between the ONH and ON. We characterized these cells by using the $gfap:GFP$ fish, discovering that they are $pax2^+/sox2^+/ck^+/ZO1^+$; that they are able to proliferate and that they also express GFAP, constituting a ring that physically splits the ONH and ON. These results have been previously showed in mammals and goldfish (Chan-Ling *et al.*, 2009; Lillo *et al.*, 2002; Parrilla, 2010), and we will explain later their possible functions.

We also analyzed the transcription factor $sox2$. Since there are a few papers describing the $sox2^+$ cell population in the visual system, we aimed to further characterize these cells and their behavior in the visual system. We found $sox2$ expression throughout the whole visual system, from the PGZ (Stephens *et al.*, 2010) to the ON. In the retina, we found $sox2^+$ cells that were characterized as Müller and amacrine cells (Bhatia *et al.*, 2011; Gorsuch *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2009). In the ONH and ON, we found them expressing ZO1 and ck , so they resembled the $pax2^+$ astrocytes. When we used the $gfap:GFP$ fish, we confirmed this colocalization in the glial limit between the ONH and ON.

After the ON crush, we found $sox2^+$ nuclei bigger and swollen in the ONH and ON, like the same results we had obtained with $pax2^+$. We also detected changes in the GCL of the retina, while we did not find variations in the INL. This has been already observed in mammal retinas, where the INL/GCL ratio becomes constant (Whitney *et al.*, 2008, 2014). However, we cannot fully explain why this layer is specifically affected. As $sox2$ interferes with the regulation of the dendritic branching in the amacrine cell population (Whitney *et al.*, 2014), the loss of contact or activity with the ganglion cells after the crush could change the synaptic contacts, making the $sox2$ levels vary. However, more experiments need to be done to further analyze this. We also found a high upregulation of $sox2$ levels in the ON after the crush. This has been reported in spinal cord crush experiments in zebrafish and mammals (Hui *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2013), and reflects the role of $sox2$ as promoting progenitor expansion and replenishment of lost cells. Finally, we found that $sox2^+$ cells constituted a highly proliferative population, detecting $sox2^+/PCNA^+$ cells in the retina, ON and ONH after the lesion. These results show again the role of the $sox2$ population as a cell progenitor reservoir, and give us some cues of why zebrafish has this striking ability to regenerate the

CNS. Despite this, we have not tracked the nature of the newborn cells, but could be replenishing some oligodendrocytes or astrocytes lost after the crush.

As we have introduced before, there is a striking coincidence between the *sox2* and *pax2* labelling. We have showed with the transgenic *gfap:GFP* fish that, especially in the transition between the ONH and ON, there is a population that shares a lot of markers. We think this zone is the equivalent to the lamina cribosa in mammals. That structure prevents the oligodendrocyte entrance to the retina (Morcos y Chan-Ling, 2000), and myelination starts after it. In zebrafish, oligodendrocytes migrate into the retina from the ON (Tian *et al.*, 2016), but they express a loose myelin sheath instead of a tight one (Schweitzer *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2013). According to that, *mpz* expression starts after the ONH (Münzel *et al.*, 2012), where we think this fish “lamina cribosa” is preventing the tight myelination in the retina, which could prevent a correct light transmission (Ali *et al.*, 1994; Hunter *et al.*, 1997; Leys *et al.*, 1996; Straatsma *et al.*, 1979, 1981), since myelin is an opaque component. Besides, the *mpz* promoter in zebrafish has several regulation sequences (Bai *et al.*, 2014), and it could be specifically silenced by some external factors.

We also propose a possible relationship between the *sox2* population and the oligodendrocyte lineage. It has been proved that the resident OPCs in mammals are in charge of the remyelination of the adult CNS, and *Sox2* is upregulated and it is a key factor to activate and recruit the OPCs (Zhao *et al.*, 2015). Moreover, *Sox2* is able to drive the expression of *Mbp* (Hoffmann *et al.*, 2014), and is also able to join to several transcription factors, including HDAC1 (Cox *et al.*, 2010). This enzyme, Hdac1, is a key factor in the oligodendrocyte lineage specification, not only in mammals but also in zebrafish (Cunliffe y Casaccia-Bonnet, 2006). The lack of *hdac1* determines the absence of *sox2* expression and oligodendrocyte death (Cunliffe y Casaccia-Bonnet, 2006). As acetylation or deacetylation seems to be a key step into the expression of some myelin genes like *MBP* or *PLP* (Conway *et al.*, 2012; Liu y Casaccia, 2010), it seems that *sox2* may be implied in the oligodendrocyte specification in the zebrafish visual system, at least promoting the activation of the resident OPCs or oligodendrocytes. However, with our current tools and results we cannot establish whether an OPC population exists or the oligodendrocytes are able to dedifferentiate and

ENGLISH SUMMARY

proliferate. Moreover, the $pax2^+/sox2^+$ population has already been described in the embryonic mouse ON (Tiwari *et al.*, 2014), where these cells also expressed HDAC1. This puzzling panorama shows a complex cell population, whose lineages are probably mixed and where we could find some common progenitors to astrocytes and oligodendrocytes. However, more studies and experiments need to be performed to clarify all these questions, so we can unravel the CNS regenerating abilities of zebrafish and to transfer this knowledge into human diseases.

We also studied the developing zebrafish visual system. As there are no papers describing the possible origin of this oligodendrocytes, we aimed to discover it. We already knew that the retinal oligodendrocytes come from an external source (Tian *et al.*, 2016). To address this, we used transgenic lines ($olig2:GFP$; $sox10:RFP$, $mbpa:RFP$ and $gfap:GFP$) which were analyzed in several time points during the CNS development.

Despite at 2dpf some mbp^+ cells are detected in the hindbrain, we did not find them in rostral sections, including the ON and eyes. However, we found $olig2^+$ and $sox10^+$ labelling in the mesencephalon, hypothalamus and tegmentum. Moreover, some of these cells seemed to arise from the so-called preoptic area, close to the ventral hypothalamus. Since this cells also expressed $sox2$ (Stolt *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2010), we think they are OPCs, and that they are the first ones to colonize the visual system by 3dpf.

The $olig2^+$ labelling had previously been reported in this regions (Schebesta y Serluca, 2009; Shin *et al.*, 2003), thus confirming the OPCs niche. As we got 3dpf, the $olig2^+/sox10^+$ labelling extended to the optic tracts and optic chiasm, and we found a $sox2^+$ labelling in the INL and GCL in the retina like in adult retinas (Bernardos y Raymond, 2006; Carreño *et al.*, 2013; Raymond *et al.*, 2006), as in other parts of the brain, which had already been documented (Germanà *et al.*, 2010). Finally, we found a $sox2^+$ cell population in the midline that expressed $gfap^+/olig2^+/sox2^+/GS^+$. All these markers have been described in radial glial cells that act as neural progenitors in the adult and developing brain (Grupp *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2016; Than-Trong y Bally-Cuif, 2015). We also found $sox10^+$ cells in the INL of the retina, which did not constitute an oligodendrocyte population. Sox10, together with $sox8$ and 9 , constitutes the $sox-E$ family and has

similar functions and sometimes superposed in glial specification (Haldin y LaBonne, 2010; Kordes *et al.*, 2005; Stolt y Wegner, 2010; Wegner y Stolt, 2005). As *sox9* is expressed in the retina of several vertebrates (Fischer *et al.*, 2010) and the *sox10* oligodendrocytes origin is external to the retina (Tian *et al.*, 2016), we think that these *sox10* inner cells may be differentiating into some of the retinal cells, in which case this would be the first report in zebrafish.

At 4dpf, OPCs seemed to have migrated into more ventral locations in the optic chiasm, almost entering the ON. It has been proven that OPCs migrate from the brain as they found some guidance cues like *shh* (Merchán *et al.*, 2007), so this could be happening in the zebrafish visual system. Thus, this could explain why at 5dpf we found OPCs inside the ONs, in their most dorsal parts. Also, they sent their processes into the ON, suggesting that they were migrating inside them. At 5dpf we also found the expression of *mbpa* in some *olig2⁺* oligodendrocytes. *Mbp* expression has been described at 4dpf in the hindbrain (Brösamle y Halpern, 2002; Jung *et al.*, 2010; Pinzon-Olejua *et al.*, 2017), and myelination in the ON axons does not start up to 7dpf (Brösamle y Halpern, 2002; Yoshida y Macklin, 2005). However, the expression of the *mpz* mRNA has been described at 5dpf (Schweitzer *et al.*, 2003). Thus, our results prove that myelination in the visual system starts previously than reported. According to this, at 7dpf we found *olig2⁺/mbpa⁺* oligodendrocytes in the optic tracts as well as in more ventral regions in the ONs. The most plausible explanation is that OPCs start to express *mbpa* and myelinate axons, but they proliferate and migrate before that. The other possibility is that the previous *mbpa⁺* cells proliferate but, as we have explained before, OPCs seem to be the proliferative cells. However, as we have not performed BrdU labelling experiments, we cannot definitely exclude this latter hypothesis. Finally, we found *olig2⁺/sox2⁺* OPCs in more ventral regions of the ON in this time points, which seem to reinforce the OPC origin of myelinating oligodendrocytes.

This myelination extends as development progress, finding *mbpa⁺* cells in ventral positions of the ON at 10 dpf. We also found oligodendrocytes' processes extending throughout the visual pathway. Since *mbpa* and *mpz* expression seems to extend from the optic chiasm to the retina (Bai *et al.*, 2011; Schweitzer *et al.*, 2003; our results) and to the optic tracts (Bai *et al.*, 2011; Schweitzer *et al.*, 2003), it seems that OPCs are migrating and selecting axons to myelinate, as it

ENGLISH SUMMARY

has been shown in the spinal cord (Czopka *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2002; Takada *et al.*, 2010). This is reinforced by the expression of *sox2* and the long shaped nuclei of these OPCs, as well as some studies that describe that OPCs are able to migrate long distances (Kucenas *et al.*, 2009; Mathews *et al.*, 2014; Takada y Appel, 2010).

Finally, at 14 dpf we found oligodendrocytes outside the retina, but not inside it. It has been described that oligodendrocytes colonize the retina by 28dpf (Tian *et al.*, 2016), and we keep on finding *sox2*⁺ OPCs in the ON, so myelination continues extending until they enter to the retina.

We have showed that OPCs seemed to migrate from the preoptic area. This encephalic region has been shown to produce the OPCs in mammals and birds (Gao y Miller, 2006; Merchán *et al.*, 2007; Miller, 2002; Ono *et al.*, 1997, 2017). We have identified *sox2*⁺/*olig2*⁺ cells in these regions, which lead us to think they are the visual system OPCs. What is more, visual OPCs in chick also express *olig2* (Ono *et al.*, 2017), and *olig2* and *olig1* expression has also been reported in zebrafish (Schebesta y Serluca, 2009; Shin *et al.*, 2003; Zannino y Appel, 2009), as well as *sox2* and *pax2* expression in the ON progenitors in mice (Tiwari *et al.*, 2014).

We have shown that these *pax2*⁺ cells also expressed *sox2* in adult fish. In our larvae we have detected in the ONH and ON *sox2*⁺ or *pax2*⁺ cells that coincide in their nuclei shape and position. Thus, we think they belong to the same kind of cell, in this case reticular astrocytes, which come from the developing optic stalk and express *pax2* (Macdonald *et al.*, 1997). It is true that we have not performed double co-label experiments as we did in adults, but the reduced number of cells, their specific location and characteristics and the absence of *olig2* expression lead us to think that they are the same cell population.

Conclusions

CONCLUSIONS

According to the objectives aimed in this Thesis, and provided the results obtained and their discussion, we can conclude that:

1. The oligodendrocytes in the adult zebrafish visual system express *olig2* and *sox10*, which are characteristics to vertebrate oligodendrocytes, while not all of them express *mbpa*. However, the zebrafish oligodendrocytes express the protein GS, which could be implied in several metabolic processes.
2. In the zebrafish visual pathway there is a differential expression of the three GS paralogs in the retina and the ON, where *glulc* could be standing out in the regenerative processes.
3. The zebrafish visual system oligodendrocytes react to the ON crush, proliferating and remyelinating the severed axons, thus boosting the ON regeneration.
4. The *pax2*⁺ reticular astrocytes in the visual system also express the transcription factor *sox2*. This cell population is involved in the continuous growth of the visual system and reacts after the ON crush, proliferating and generating new glial cells that seem to be implied in the spontaneous regenerative abilities of the zebrafish visual system.
5. There is a transition zone between the ONH and the ON which resembles the mammalian lamina cribosa. Within it, a *GFAP*⁺/*ck*⁺/*ZO1*⁺/*pax2*⁺/*sox2*⁺ progenitor cell ring exists, which also reacts to the ON crush. Besides, this zone seems to be preventing the compact myelin formation in the retina.
6. The studied genes show a differential response between the retina and the ON during the regenerative process. These genes could have an antagonistic effect, preventing myelination of the regenerating axons in the retina while they could be promoting myelination in the crushed ON.
7. The oligodendrocytes in the developing visual system express *olig2* and *sox10*, but not GS. There is a *sox2*⁺ population that could constitute the visual system OPCs.

CONCLUSIONS

8. The origin of the zebrafish visual system oligodendrocytes is located in the preoptic area and in the ventral hypothalamus, similar to the observations made in other animal groups, being myelinated from 5dpf onwards.

Amat victoria curam
(*La victoria ama la preparación*)

Bibliografía

- Abdesselem, H., Shypitsyna, A., Solis, G. P., Bodrikov, V. y Stuermer, C. A.** (2009) No Nogo66- and NgR-mediated inhibition of regenerating axons in the zebrafish optic nerve, *J Neurosci.* 2009/12/17, 29(49), pp. 15489-15498.
- Alanne, M. H., Pummi, K., Heape, A. M., Grønman, R., Peltonen, J. y Peltonen, S.** (2009) Tight Junction Proteins in Human Schwann Cell Autotypic Junctions, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57(6), pp. 523-529.
- Albrecht, J., Sonnewald, U., Waagepetersen, H. S. y Schousboe, A.** (2007) Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction., *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12, pp. 332-43.
- Ali, B. H., Logani, S., Kozlov, K. L., Arnold, A. C. y Bateman, B.** (1994) *Progression of retinal nerve fiber myelination in childhood.*, *American journal of ophthalmology.*
- Almeida, R. G., Czopka, T., Ffrench-Constant, C. y Lyons, D. a.** (2011) Individual axons regulate the myelinating potential of single oligodendrocytes in vivo, *Development*, 138(20), pp. 4443-4450.
- Almeida, R. G. y Lyons, D. A.** (2014) On the resemblance of synapse formation and CNS myelination, *Neuroscience*. IBRO, 276, pp. 98-108.
- Almeida, R. G. y Lyons, D. A.** (2016) Oligodendrocyte Development in the Absence of Their Target Axons In Vivo, *PLOS ONE*. Editado por K. Arai. Public Library of Science, 11(10), p. e0164432.
- Alunni, A. y Bally-Cuif, L.** (2016) A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates., *Development (Cambridge, England)*, 143(5), pp. 741-53.
- Álvarez-Buylla, A., Seri, B. y Doetsch, F.** (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain, *Brain Res Bull.* 2002/05/29, 57(6), pp. 751-758.
- Ankerhold, R. y Stuermer, C. A.** (1999) Fate of oligodendrocytes during retinal axon degeneration and regeneration in the goldfish visual pathway., *Journal of neurobiology.* 1999/12/10, 41(4), pp. 572-584.
- Anlauf, E. y Derouiche, A.** (2013) Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization., *Frontiers in endocrinology.* Frontiers, 4, p. 144.
- Arenzana, F. J.** (2006) *Caracterización neuroquímica de las áreas visuales primarias del pez cebra en condiciones normales y en ciclopiá inducida por etanol.* Universidad de Salamanca.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. y Lovell-Badge, R.** (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function, *Genes and Development*, 17(1), pp. 126-140.
- Azim, K. y Butt, A. M.** (2011) GSK3beta negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination in vivo, *GLIA*, 59(4), pp. 540-553.
- Baas, D., Dalençon, D., Fressinaud, C., Vitkovic, L. y Sarliève, L. L.** (1998) Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells express glutamine synthetase: developmental and cell type-specific regulation., *Molecular psychiatry*, 3(4), pp. 356-61.
- Bai, Q., Parris, R. S. y Burton, E. a.** (2014) Different Mechanisms Regulate Expression of Zebrafish Myelin Protein Zero (P0) in Myelinating Oligodendrocytes and Its Induction following Axonal Injury, *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), pp. 24114-24128.
- Bai, Q., Sun, M., Stolz, D. B. y Burton, E. a.** (2011) Major isoform of zebrafish P0 is a 23.5 kDa myelin glycoprotein expressed in selected white matter tracts of the central nervous system, *The Journal of Comparative Neurology*, 519(8), pp. 1580-1596.
- Balaratnasingam, C., Kang, M. H., Yu, P., Chan, G., Morgan, W. H., Cringle, S. J. y Yu, D.-Y.** (2014) Comparative quantitative study of astrocytes and capillary distribution in optic nerve laminar regions., *Experimental eye research*, 121, pp. 11-22.
- Balczarek, K. A., Lai, Z. C. y Kumar, S.** (1997) Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains, *Mol Biol Evol.* 1997/08/01, 14(8), pp. 829-842.
- Ballestero, R. P., Dybowski, J. A., Levy, G., Agranoff, B. W. y Uhler, M. D.** (1999) Cloning and characterization of zRICH, a 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase induced during zebrafish optic nerve regeneration, *J Neurochem*, 72(4), pp. 1362-1371.
- Barron, K. D.** (1995) The microglial cell. A historical review, *J Neurol Sci.* 1995/12/01,

BIBLIOGRAFÍA

134 Suppl, pp. 57-68.

Bastmeyer, M., Beckmann, M., Schwab, M. E. y Stuermer, C. A. (1991) Growth of regenerating goldfish axons is inhibited by rat oligodendrocytes and CNS myelin but not but not by goldfish optic nerve tract oligodendrocytelike cells and fish CNS myelin., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1991/03/01, 11(3), pp. 626-40.

Battisti, W. P., Wang, J., Bozek, K. y Murray, M. (1995) Macrophages, microglia, and astrocytes are rapidly activated after crush injury of the goldfish optic nerve: a light and electron microscopic analysis, *J Comp Neurol*. 1995/04/03, 354(2), pp. 306-320.

Baumann, N. y Pham-Dinh, D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system., *Physiological reviews*, 81(2), pp. 871-927.

Bear, M. F., Connors, B. W. y Paradiso, M. A. (1998) *Neurociencia. Explorando el cerebro*. Barcelona: Masson-Williams y Wikins.

Becker, C. G. y Becker, T. (2007) Growth and pathfinding of regenerating axons in the optic projection of adult fish, *J Neurosci Res*. 2006/11/30, 85(12), pp. 2793-2799.

Becker, C. G. y Becker, T. (2008) Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration, *Restorative neurology and neuroscience*. 2008/09/30, 26(2-3), pp. 71-80.

Becker, C. G., Lieberoth, B. C., Morellini, F., Feldner, J., Becker, T. y Schachner, M. (2004) L1.1 is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish, *J Neurosci*. 2004/09/10, 24(36), pp. 7837-7842.

Becker, C. G., Meyer, R. L. y Becker, T. (2000) Gradients of ephrin-A2 and ephrin-A5b mRNA during retinotopic regeneration of the optic projection in adult zebrafish, *J Comp Neurol*. 2000/10/31, 427(3), pp. 469-483.

Becker, C. G., Schweitzer, J., Feldner, J., Becker, T. y Schachner, M. (2003) Tenascin-R as a repellent guidance molecule for developing optic axons in zebrafish, *J Neurosci*. 2003/07/18, 23(15), pp. 6232-6237.

Becker, C. G., Schweitzer, J., Feldner, J., Schachner, M. y Becker, T. (2004) Tenascin-R as a repellent guidance molecule for newly growing and regenerating optic axons in adult zebrafish, *Mol Cell Neurosci*. 2004/07/06, 26(3), pp. 376-389.

Becker, T., Wullmann, M. F., Becker, C. G., Bernhardt, R. R. y Schachner, M. (1997) Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish, *Journal of Comparative Neurology*, 377(4), pp. 577-595.

Bergles, D. E. y Richardson, W. D. (2016) Oligodendrocyte Development and Plasticity, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(2), p. a020453.

Bernardos, R. L., Barthel, L. K., Meyers, J. R. y Raymond, P. A. (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells, *J Neurosci*. 2007/06/29, 27(26), pp. 7028-7040.

Bernardos, R. L. y Raymond, P. A. (2006) GFAP transgenic zebrafish, *Gene Expression Patterns*, 6(8), pp. 1007-1013.

Bernhardt, R. R. (1999) Cellular and molecular bases of axonal regeneration in the fish central nervous system, *Exp Neurol*. 1999/06/12, 157(2), pp. 223-240.

Bernstein, H.-G., Bannier, J., Meyer-Lotz, G., Steiner, J., Keilhoff, G., Dobrowolny, H., Walter, M. y Bogerts, B. (2014) Distribution of immunoreactive glutamine synthetase in the adult human and mouse brain. Qualitative and quantitative observations with special emphasis on extra-astroglial protein localization., *Journal of chemical neuroanatomy*, 61-62, pp. 33-50.

Bernstein, J. (1964) Relation of spinal cord regeneration to age in adult goldfish, *Experimental Neurology*, 9, pp. 161-174.

Berry, M., Hall, S., Follows, R., Rees, L., Gregson, N. y Sievers, J. (1988) Response of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular or acellular sciatic nerve grafts, *J Neurocytol*. 1988/12/01, 17(6), pp. 727-744.

Bhatia, B., Singhal, S., Tadman, D. N., Khaw, P. T. y Limb, G. A. (2011) SOX2 Is Required for Adult Human Müller Stem Cell Survival and Maintenance of Progenicity In Vitro, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(1), p. 136.

- Bhumika, S., Lemmens, K., Vancamp, P., Moons, L. y Darras, V. M.** (2015) Decreased thyroid hormone signaling accelerates the reinnervation of the optic tectum following optic nerve crush in adult zebrafish, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 68, pp. 92-102.
- Blakemore, W. F. y Keirstead, H. S.** (1999) The origin of remyelinating cells in the central nervous system., *Journal of neuroimmunology*, 98(1), pp. 69-76.
- Blasky, A. J., Pan, L., Moens, C. B. y Appel, B.** (2014) Pard3 regulates contact between neural crest cells and the timing of Schwann cell differentiation but is not essential for neural crest migration or myelination., *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 243(12), pp. 1511-23.
- Blaugrund, E., Cohen, I., Shani, Y. y Schwartz, M.** (1991) Glial fibrillary acidic protein in the fish optic nerve, *Glia*. 1991/01/01, 4(4), pp. 393-399.
- Boggs, J. M., Homchaudhuri, L., Ranagaraj, G., Liu, Y., Smith, G. S. y Harauz, G.** (2014) Interaction of myelin basic protein with cytoskeletal and signaling proteins in cultured primary oligodendrocytes and N19 oligodendroglial cells, *BMC Research Notes*, 7, p. 387.
- Boggs, J. M., Rangaraj, G., Gao, W. y Heng, Y. M.** (2006) Effect of phosphorylation of myelin basic protein by MAPK on its interactions with actin and actin binding to a lipid membrane in vitro, *Biochemistry*. 2006/01/13, 45(2), pp. 391-401.
- Boije, H., Ring, H., Lopez-Gallardo, M., Prada, C. y Hallbook, F.** (2010) Pax2 is expressed in a subpopulation of Müller cells in the central chick retina, *Developmental Dynamics*. 2010/05/27, 239(6), pp. 1858-1866.
- Bollaerts, I., Van Houcke, J., Andries, L., De Groef, L. y Moons, L.** (2017) Neuroinflammation as Fuel for Axonal Regeneration in the Injured Vertebrate Central Nervous System., *Mediators of inflammation*. Hindawi Publishing Corporation, 2017, p. 9478542.
- Bormann, P., Roth, L. W., Andel, D., Ackermann, M. y Reinhard, E.** (1999) zfNLRR, a novel leucine-rich repeat protein is preferentially expressed during regeneration in zebrafish, *Mol Cell Neurosci*. 1999/05/18, 13(3), pp. 167-179.
- Bribián, A., Barallobre, M. J., Soussi-Yanicostas, N. y de Castro, F.** (2006) Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve, *Mol Cell Neurosci*. 2006/08/01, 33(1), pp. 2-14.
- Bribián, A. y de Castro, F.** (2007) Oligodendrocytes: their embryonic origin, migration and therapeutic implications, *Rev Neurol*. 2007/11/06, 45(9), pp. 535-546.
- Bribián, A., Esteban, P. F., Clemente, D., Soussi-Yanicostas, N., Thomas, J. L., Zalc, B. y de Castro, F.** (2008) A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors, *Dev Neurobiol*. 2008/09/25, 68(13), pp. 1503-1516.
- Bringmann, A. y Reichenbach, A.** (2001) Role of Müller cells in retinal degenerations, *Front Biosci*. 2001/10/02, 6, pp. E72-92.
- Brösamle, C.** (2010) The myelin proteolipid DMalpha in fishes, *Neuron Glia Biology*, 6(2), pp. 109-112.
- Brösamle, C. y Halpern, M. E.** (2002) Characterization of myelination in the developing zebrafish, *Glia*. 2002/07/12, 39(1), pp. 47-57.
- Buckley, C. E., Goldsmith, P. y Franklin, R. J. M.** (2008) Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination?, *Disease Models and Mechanisms*, 1(4-5), pp. 221-228.
- Buckley, C. E., Marguerie, A., Alderton, W. K. y Franklin, R. J. M.** (2010) Temporal dynamics of myelination in the zebrafish spinal cord, *Glia*, 58, pp. 802-812.
- Buffo, A., Vosko, M. R., Ertürk, D., Hamann, G. F., Jucker, M., Rowitch, D. y Götz, M.** (2005) Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), pp. 18183-8.
- Bunt, S. M.** (1982) Retinotopic and temporal organization of the optic nerve and tracts in the adult goldfish, *J Comp Neurol*. 1982/04/10, 206(3), pp. 209-226.
- Burrill, J. D. y Easter Jr., S. S.** (1994) Development of the retinofugal projections in the

BIBLIOGRAFÍA

- embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*), *J Comp Neurol*. 1994/08/22, 346(4), pp. 583-600.
- Burrill, J. D. y Easter Jr., S. S.** (1995) The first retinal axons and their microenvironment in zebrafish: cryptic pioneers and the pretract., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(4), pp. 2935-47.
- Butt, A. M. y Ransom, B. R.** (1989) Visualization of oligodendrocytes and astrocytes in the intact rat optic nerve by intracellular injection of lucifer yellow and horseradish peroxidase, *Glia*. 1989/01/01, 2(6), pp. 470-475.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G. y Muhr, J.** (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity, *Nat Neurosci*, 6(11), pp. 1162-1168.
- Calof, A. L., Bonnin, A., Crocker, C., Kawachi, S., Murray, R. C., Shou, J. y Wu, H. H.** (2002) Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage, *Microsc Res Tech*. 2002/08/31, 58(3), pp. 176-188.
- Cameron, D. A. y Easter Jr., S. S.** (1995) Cone photoreceptor regeneration in adult fish retina: phenotypic determination and mosaic pattern formation, *J Neurosci*. 1995/03/01, 15(3 Pt 2), pp. 2255-2271.
- Campagnoni, C. W., Landry, C. F., Pribyl, T. M., Schonmann, V., Kampf, K., Handley, V. W., Watson, J. B., Bongarzone, E. R. y Campagnoni, A. T.** (2001) Identification of genes in the oligodendrocyte lineage through the analysis of conditionally immortalized cell lines, *Dev Neurosci*. 2002/03/02, 23(6), pp. 452-463.
- Carnegie, P. R.** (1971) Amino acid sequence of the encephalitogenic basic protein from human myelin., *The Biochemical journal*, 123, pp. 57-67.
- Carney, T. J., Dutton, K. a, Greenhill, E., Delfino-Machin, M., Dufourcq, P., Blader, P. y Kelsh, R. N.** (2006) A direct role for Sox10 in specification of neural crest-derived sensory neurons., *Development (Cambridge, England)*, 133(23), pp. 4619-4630.
- Carreño, H.** (2013) *El ácido retinoico y la retinogénesis del pez cebra*. Universidad de Salamanca.
- Carreño, H., Santos-Ledo, A., Velasco, A., Lara, J. M., Aijón, J. y Arévalo, R.** (2013) Effects of retinoic acid exposure during zebrafish retinogenesis., *Neurotoxicology and teratology*, 40, pp. 35-45.
- Chalepakis, G., Fritsch, R., Fickenscher, H., Deutsch, U., Goulding, M. y Gruss, P.** (1991) The molecular basis of the undulated/Pax-1 mutation, *Cell*. 1991/09/06, 66(5), pp. 873-884.
- Chan-Ling, T., Chu, Y., Baxter, L., Weible li, M. y Hughes, S.** (2009) In vivo characterization of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in developing rat retinae: differentiation, proliferation, and apoptosis, *Glia*. 2008/07/29, 57(1), pp. 39-53.
- Chen, M., Xu, Y., Huang, R., Huang, Y., Ge, S. y Hu, B.** (2016) N-Cadherin is Involved in Neuronal Activity-Dependent Regulation of Myelinating Capacity of Zebrafish Individual Oligodendrocytes In Vivo, *Molecular Neurobiology*.
- Cho, S. S., Lucas, J. J. y Hyndman, A. G.** (1999) Transferrin binding protein is expressed by oligodendrocytes in the avian retina, *Brain Res*. 1999/01/08, 816(1), pp. 229-233.
- Chu, Y., Hughes, S. y Chan-Ling, T.** (2001) Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma, *FASEB J*. 2001/08/21, 15(11), pp. 2013-2015.
- Chung, A.-Y., Kim, S., Kim, E., Kim, D., Jeong, I., Cha, Y. R., Bae, Y., Park, S. W., Lee, J. y Park, H.-C.** (2013) Indian hedgehog B function is required for the specification of oligodendrocyte progenitor cells in the zebrafish CNS., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(4), pp. 1728-33.
- Clemente, D., Porteros, A., Arenzana, F. J., Aijon, J., Parrilla, M., Santos-Ledo, A. y Arevalo, R.** (2008) Characterization of NADPH-diaphorase-positive glial cells of the tench optic nerve after axotomy, *Arch Ital Biol*. 2008/08/01, 146(1), pp. 35-52.
- Cohen, A., Sivron, T., Duvdevani, R. y Schwartz, M.** (1990) Oligodendrocyte cytotoxic factor associated with fish optic nerve regeneration: implications for mammalian CNS regeneration., *Brain research*, 537(1-2), pp. 24-32.

- Colavincenzo, J. y Levine, R. L.** (2000) Myelin debris clearance during Wallerian degeneration in the goldfish visual system, *J Neurosci Res.* 2000/02/05, 59(1), pp. 47-62.
- Conway, G. D., O'Bara, M. a., Vedia, B. H., Pol, S. U. y Sim, F. J.** (2012) Histone deacetylase activity is required for human oligodendrocyte progenitor differentiation, *Glia*, 60(12), pp. 1944-1953.
- Cox, J. L., Mallanna, S. K., Luo, X. y Rizzino, A.** (2010) Sox2 Uses Multiple Domains to Associate with Proteins Present in Sox2-Protein Complexes, *PLoS ONE*, 5(11), p. e15486.
- Cunliffe, V. T. y Casaccia-Bonnel, P.** (2006) Histone deacetylase 1 is essential for oligodendrocyte specification in the zebrafish CNS, *Mechanisms of Development*, 123(1), pp. 24-30.
- Cuoghi, B. y Mola, L.** (2009) Macroglial cells of the teleost central nervous system: a survey of the main types, *Cell Tissue Res.* 2009/10/30.
- Curado, S., Stainier, D. Y. R. y Anderson, R. M.** (2008) Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: a spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies., *Nature protocols*, 3(6), pp. 948-54.
- Czerny, T., Schaffner, G. y Busslinger, M.** (1993) DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site, *Genes Dev.* 1993/10/01, 7(10), pp. 2048-2061.
- Czopka, T.** (2015) Insights into mechanisms of central nervous system myelination using zebrafish, *Glia*, p. n/a-n/a.
- Czopka, T., French-Constant, C. y Lyons, D. A.** (2013) Individual Oligodendrocytes Have Only a Few Hours in which to Generate New Myelin Sheaths In Vivo, *Developmental Cell.* Elsevier Inc., 25(6), pp. 599-609.
- Czopka, T. y Lyons, D. a.** (2011) *Dissecting Mechanisms of Myelinated Axon Formation Using Zebrafish.* Third Edit, *Methods in Cell Biology.* Third Edit. Elsevier Inc.
- D'Amelio, F., Eng, L. F. y Gibbs, M. A.** (1990) Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system., *Glia*, 3(5), pp. 335-41.
- D'Urso, D., Brophy, P. J., Staugaitis, S. M., Stewart Gillespie, C., Frey, A. B., Stempak, J. G. y Colman, D. R.** (1990) Protein zero of peripheral nerve myelin: Biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homotypic interaction, *Neuron*, 4(3), pp. 449-460.
- Dahl, D. y Bignami, A.** (1973) Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates, *Brain Res.* 1973/10/26, 61, pp. 279-293.
- Dai, M., Xia, X. B. y Xiong, S. Q.** (2012) BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Müller cells, *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), pp. 596-603.
- Dávila, J. C., Guirado, S., de la Calle, A. y Marín-Girón, F.** (1987) The intra-ocular portion of the optic nerve in the turtle *Mauremys caspica*, *J Anat.* 1987/04/01, 151, pp. 189-198.
- Deiner, M. S., Kennedy, T. E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M. y Sretavan, D. W.** (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia, *Neuron.* 1997/10/23, 19(3), pp. 575-589.
- Dhanasiri, A. K. S., Fernandes, J. M. O. y Kiron, V.** (2012) Glutamine synthetase activity and the expression of three glul paralogues in zebrafish during transport, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* Elsevier Inc., 163(3-4), pp. 274-284.
- Diekmann, H., Kalbhen, P. y Fischer, D.** (2015) Characterization of optic nerve regeneration using transgenic zebrafish, *Frontiers in Cellular Neuroscience.* Frontiers, 9(118).
- Diekmann, H., Klinger, M., Oertle, T., Heinz, D., Pogoda, H. M., Schwab, M. E. y Stuermer, C. A.** (2005) Analysis of the reticulon gene family demonstrates the absence

BIBLIOGRAFÍA

- of the neurite growth inhibitor Nogo-A in fish, *Mol Biol Evol.* 2005/04/29, 22(8), pp. 1635-1648.
- Doddrell, R. D. S., Dun, X.-P., Shivane, a., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Wegner, M., Sock, E., Hanemann, C. O. y Parkinson, D. B.** (2013) Loss of SOX10 function contributes to the phenotype of human Merlin-null schwannoma cells, *Brain*, 136(2), pp. 549-563.
- Domercq, M., Sanchez-Gomez, M. V., Areso, P. y Matute, C.** (1999) Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes, *European Journal of Neuroscience.* 1999/06/26, 11(7), pp. 2226-2236.
- Dörfler, P. y Busslinger, M.** (1996) C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8, *EMBO J.* 1996/04/15, 15(8), pp. 1971-1982.
- Douglas, R. H. y Wagner, H. J.** (1982) Endogenous patterns of photomechanical movements in teleosts and their relation to activity rhythms, *Cell Tissue Res.* 1982/01/01, 226(1), pp. 133-144.
- Dressler, G. R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O. y Gruss, P.** (1990) Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system, *Development.* 1990/08/01, 109(4), pp. 787-795.
- Dunlop, S. A., Tennant, M. y Beazley, L. D.** (2002) Extent of retinal ganglion cell death in the frog *Litoria moorei* after optic nerve regeneration induced by lesions of different sizes, *J Comp Neurol.* 2002/04/05, 446(3), pp. 276-287.
- Dutton, J. R., Antonellis, A., Carney, T. J., Rodrigues, F. S., Pavan, W. J., Ward, A. y Kelsh, R. N.** (2008) An evolutionarily conserved intronic region controls the spatiotemporal expression of the transcription factor Sox10, *BMC Developmental Biology*, 8(1), p. 105.
- Dutton, K. A., Pauliny, A., Lopes, S. S., Elworthy, S., Carney, T. J., Rauch, J., Geisler, R., Haffter, P. y Kelsh, R. N.** (2001) Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates, *Development*, 128, pp. 4113-4125.
- Dyer, M. A. y Cepko, C. L.** (2000) Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury, *Nat Neurosci.* 2000/08/31, 3(9), pp. 873-880.
- Easter Jr., S. S.** (1992) Retinal growth in foveated teleosts: nasotemporal asymmetry keeps the fovea in temporal retina, *J Neurosci.* 1992/06/11, 12(6), pp. 2381-2392.
- Easter Jr., S. S., Bratton, B. y Scherer, S. S.** (1984) Growth-related order of the retinal fiber layer in goldfish, *Journal of Neuroscience.* 1984/08/01, 4(8), pp. 2173-2190.
- Easter Jr., S. S., Rusoff, A. C. y Kish, P. E.** (1981) The growth and organization of the optic nerve and tract in juvenile and adult goldfish, *Journal of Neuroscience.* 1981/08/01, 1(8), pp. 793-811.
- Eid, T., Tu, N., Lee, T.-S. W. y Lai, J. C. K.** (2013) Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy, *Neurochemistry International*, 63(7), pp. 670-681.
- Elsaedi, F., Bembem, M. a., Zhao, X.-F. X.-F. y Goldman, D.** (2014) Jak/Stat Signaling Stimulates Zebrafish Optic Nerve Regeneration and Overcomes the Inhibitory Actions of Socs3 and Sfpq, *Journal of Neuroscience*, 34(7), pp. 2632-2644.
- Esain, V., Postlethwait, J. H., Charnay, P. y Ghislain, J.** (2010) FGF-receptor signalling controls neural cell diversity in the zebrafish hindbrain by regulating olig2 and sox9, *Development*, 137(1), pp. 33-42.
- Fawcett, J. W.** (2006) Overcoming inhibition in the damaged spinal cord, *J Neurotrauma.* 2006/04/25, 23(3-4), pp. 371-383.
- Ferrari, S., Harley, V. R., Pontiggia, A., Goodfellow, P. N., Lovell-Badge, R. y Bianchi, M. E.** (1992) SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA, *Embo J*, 11(12), pp. 4497-4506.
- French-Constant, C., Miller, R. H., Burne, J. F. y Raff, M. C.** (1988) Evidence that migratory oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells are kept out of the rat retina by a barrier at the eye-end of the optic nerve, *J Neurocytol.* 1988/02/01, 17(1), pp. 13-25.
- Filbin, M. T.** (2003) Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult

- mammalian CNS, *Nat Rev Neurosci*. 2003/09/03, 4(9), pp. 703-713.
- Filbin, M. T., Walsh, F. S., Trapp, B. D., Pizzey, J. a y Tennekoon, G. I.** (1990) Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule., *Nature*, pp. 871-872.
- Fimbel, S. M., Montgomery, J. E., Burket, C. T. y Hyde, D. R.** (2007) Regeneration of Inner Retinal Neurons after Intravitreal Injection of Ouabain in Zebrafish, *Journal of Neuroscience*. 2007/02/16, 27(7), pp. 1712-1724.
- Fischer, A. J., Zelinka, C. y Scott, M. A.** (2010) Heterogeneity of glia in the retina and optic nerve of birds and mammals, *PLoS One*. 2010/06/23, 5(6), p. e10774.
- Fischer, D., Pavlidis, M. y Thanos, S.** (2000) Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(12), pp. 3943-3954.
- Fleisch, V. C., Fraser, B. y Allison, W. T.** (2011) Investigating regeneration and functional integration of CNS neurons: lessons from zebrafish genetics and other fish species., *Biochimica et biophysica acta*, 1812(3), pp. 364-80.
- Franklin, R. J. M. y ffrench-Constant, C.** (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy., *Nature reviews. Neuroscience*, 9(11), pp. 839-55.
- Franklin, R. J. M. y Goldman, S. A.** (2015) Glia Disease and Repair-Remyelination., *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(7).
- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S. N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A. y Guck, J.** (2007) Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007/05/09, 104(20), pp. 8287-8292.
- Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C. y Fontana, A.** (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells, *Eur J Immunol*. 1987/09/01, 17(9), pp. 1271-1278.
- Fressinaud, C., Weinrauder, H., Delaunoy, J. P., Tholey, G., Labourdette, G. y Sarliève, L. L.** (1991) Glutamine synthetase expression in rat oligodendrocytes in culture: regulation by hormones and growth factors., *Journal of cellular physiology*, 149(3), pp. 459-68.
- Fujita, Y., Imagawa, T. y Uehara, M.** (2000) Comparative study of the lamina cribrosa and the pial septa in the vertebrate optic nerve and their relationship to the myelinated axons, *Tissue Cell*. 2001/01/06, 32(4), pp. 293-301.
- Fujita, Y., Imagawa, T. y Uehara, M.** (2001) Fine structure of the retino-optic nerve junction in the chicken, *Tissue Cell*. 2001/06/08, 33(2), pp. 129-134.
- Fulcrand, J. y Privat, A.** (1977) Neuroglial reactions secondary to Wallerian degeneration in the optic nerve of the postnatal rat: ultrastructural and quantitative study, *J Comp Neurol*. 1977/11/15, 176(2), pp. 189-222.
- Fulton, B. P., Burne, J. F. y Raff, M. C.** (1992) Visualization of O-2A progenitor cells in developing and adult rat optic nerve by quisqualate-stimulated cobalt uptake, *J Neurosci*. 1992/12/01, 12(12), pp. 4816-4833.
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., Brinkmann, B. G., Kassmann, C. M., Tzvetanova, I. D., Möbius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M. W., Moraes, C. T., Frahm, J., Goebbels, S. y Nave, K.-A.** (2012) Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity., *Nature*, 485(7399), pp. 517-21.
- Gao, L. y Miller, R. H.** (2006) Specification of optic nerve oligodendrocyte precursors by retinal ganglion cell axons, *J Neurosci*. 2006/07/21, 26(29), pp. 7619-7628.
- García, D. M. y Koke, J. R.** (2009) Astrocytes as gate-keepers in optic nerve regeneration--a mini-review, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008/10/22, 152(2), pp. 135-138.
- Garcion, E., Faissner, A. y ffrench-Constant, C.** (2001) Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration., *Development (Cambridge, England)*, 128(13), pp. 2485-96.
- Geneser, F.** (1993) *Ojo. En: Histología*. Editado por F. Geneser. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

BIBLIOGRAFÍA

- Germanà, A., Marino, F., Guerrera, M. C., Campo, S., de Girolamo, P., Montalbano, G., Germanà, G. P., Ochoa-Erena, F. J., Ciriaco, E. y Vega, J. A.** (2008) Expression and distribution of S100 protein in the nervous system of the adult zebrafish (*Danio rerio*), *Microscopy Research and Technique*, 71(3), pp. 248-255.
- Germanà, A., Montalbano, G., Guerrera, M. C., Amato, V., Laurà, R., Magnoli, D., Campo, S., Suarez-Fernandez, E., Ciriaco, E. y Vega, J. a.** (2010) Developmental changes in the expression of sox2 in the zebrafish brain, *Microscopy Research and Technique*, 354, pp. 347-54.
- Gestri, G., Link, B. A. y Neuhauss, S. C. F.** (2012) The visual system of zebrafish and its use to model human ocular Diseases, *Developmental Neurobiology*, 72(3), pp. 302-327.
- Giese, K. P., Martini, R., Lemke, G., Soriano, P. y Schachner, M.** (1992) Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons, *Cell*, 71(4), pp. 565-576.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M. y Merad, M.** (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages., *Science*, 330(6005), pp. 841-5.
- Giordano, S., Glasgow, E., Tesser, P. y Schechter, N.** (1989) A type II keratin is expressed in glial cells of the goldfish visual pathway, *Neuron*. 1989/05/01, 2(5), pp. 1507-1516.
- Giulian, D.** (1987) Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system, *J Neurosci Res*. 1987/01/01, 18(1), pp. 132-133-171.
- Giulian, D. y Baker, T. J.** (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain, *J Neurosci*. 1986/08/01, 6(8), pp. 2163-2178.
- Giulian, D. y Corpuz, M.** (1993) Microglial secretion products and their impact on the nervous system, *Adv Neurol*. 1993/01/01, 59, pp. 315-320.
- Giulian, D. y Young, D. G.** (1986) Brain peptides and glial growth. II. Identification of cells that secrete glia-promoting factors, *J Cell Biol*. 1986/03/01, 102(3), pp. 812-820.
- Goldman, D.** (2014) Müller glial cell reprogramming and retina regeneration, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 431-442.
- Goldman, D., Hankin, M., Li, Z., Dai, X. y Ding, J.** (2001) Transgenic zebrafish for studying nervous system development and regeneration, *Transgenic Res*. 2001/03/17, 10(1), pp. 21-33.
- Goode, D. K. y Elgar, G.** (2009) The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective, *Dev Dyn*. 2009/11/20, 238(12), pp. 2951-2974.
- Gorsuch, R. a. y Hyde, D. R.** (2014) Regulation of Müller glial dependent neuronal regeneration in the damaged adult zebrafish retina, *Experimental Eye Research*, 123(July), pp. 131-140.
- Gorsuch, R. A., Lahne, M., Yarka, C. E., Petravick, M. E., Li, J. y Hyde, D. R.** (2017) Sox2 regulates Müller glia reprogramming and proliferation in the regenerating zebrafish retina via Lin28 and Ascl1a, *Experimental Eye Research*.
- Gotoh, H., Ueda, T., Uno, A., Ohuchi, H., Ikenaka, K. y Ono, K.** (2011) Expression of myelin genes in the developing chick retina., *Gene expression patterns : GEP*, 11(8), pp. 471-5.
- Gould, E., Tanapat, P., Rydel, T. y Hastings, N.** (2000) Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood, *Biol Psychiatry*. 2000/11/07, 48(8), pp. 715-720.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. y Pevny, L.** (2003) SOX2 functions to maintain neural progenitor identity, *Neuron*, 39(5), pp. 749-765.
- Gramage, E., Li, J. y Hitchcock, P.** (2014) The expression and function of midkine in the vertebrate retina, *British Journal of Pharmacology*, 171(4), pp. 913-923.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I. y Brand, M.** (2006) Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate., *Developmental biology*, 295(1), pp. 263-77.
- Graw, J.** (2010) Eye development, *Current topics in developmental biology*. 2010/08/10,

90, pp. 343-386.

- Groves, A. K., Barnett, S. C., Franklin, R. J., Crang, A. J., Mayer, M., Blakemore, W. F. y Noble, M.** (1993) Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitor cells., *Nature*, 362(6419), pp. 453-5.
- Grun, G.** (1975) Structural basis of the functional development of the retina in the cichlid *Tilapia leucosticta* (teleostei), *J Embryol Exp Morphol.* 1975/02/01, 33(1), pp. 243-257.
- Grupp, L., Wolburg, H. y Mack, A. F.** (2010) Astroglial structures in the zebrafish brain, *The Journal of Comparative Neurology.* 2010/09/21, 518(21), pp. 4277-4287.
- Le Guyader, D., Redd, M. J., Colucci-Guyon, E., Murayama, E., Kissa, K., Briolat, V., Mordélet, E., Zapata, A., Shinomiya, H. y Herbomel, P.** (2008) Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish, *Blood*, 111(1), pp. 132-141.
- Haberland, M., Montgomery, R. L. y Olson, E. N.** (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy., *Nature reviews. Genetics*, 10(1), pp. 32-42.
- Haldin, C. E. y LaBonne, C.** (2010) SoxE factors as multifunctional Neural Crest Regulatory Factors, *Int J Biochem Cell Biol*, 42(3), pp. 441-444.
- Hardin-Pouzet, H., Krakowski, M., Bourbonnière, L., Didier-Bazes, M., Tran, E. y Owens, T.** (1997) Glutamate metabolism is down-regulated in astrocytes during experimental allergic encephalomyelitis, *GLIA*, 20(1), pp. 79-85.
- Herbomel, P., Thisse, B. y Thisse, C.** (1999) Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo., *Development (Cambridge, England)*, 126(17), pp. 3735-45.
- Herbomel, P., Thisse, B. y Thisse, C.** (2001) Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process., *Developmental biology*, 238(2), pp. 274-88.
- Herranz, S.** (2009) *Expresión de las proteínas CRB1 y CRB3 en la retina de los murinos.*, *Departamento de Biología Celular y Patología.* Salamanca.
- Hines, J. H., Ravanelli, A. M., Schwindt, R., Scott, E. K. y Appel, B.** (2015) Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo, *Nature Neuroscience*, 18(5), pp. 683-689.
- Hitchcock, P. F. y Raymond, P. A.** (2004) The teleost retina as a model for developmental and regeneration biology, *Zebrafish.* 2008/02/06, 1(3), pp. 257-271.
- Hoffmann, S. a., Hos, D., Kuspert, M., Lang, R. a., Lovell-Badge, R., Wegner, M. y Reiprich, S.** (2014) Stem cell factor Sox2 and its close relative Sox3 have differentiation functions in oligodendrocytes, *Development*, 141(1), pp. 39-50.
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L. y Wong, R. O. L.** (2014) Functional architecture of the retina: Development and disease, *Progress in Retinal and Eye Research.* Elsevier Ltd, 42(July), pp. 44-84.
- Van houcke, J., De Groef, L., Dekeyster, E. y Moons, L.** (2015) The zebrafish as a gerontology model in nervous system aging, disease, and repair, *Ageing Research Reviews*, 24(Pt B), pp. 358-368.
- Hu, M. y Easter Jr., S. S.** (1999) Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells, *Dev Biol.* 1999/03/09, 207(2), pp. 309-321.
- Hudish, L. I., Blasky, A. J. y Appel, B.** (2013) miR-219 Regulates Neural Precursor Differentiation by Direct Inhibition of Apical Par Polarity Proteins, *Developmental Cell.* Elsevier Inc., 27(4), pp. 387-398.
- Hughes, A. y Wieniawa-Narkiewicz, E.** (1980) A newly identified population of presumptive microneurons in the cat retinal ganglion cell layer, *Nature.* 1980/04/03, 284(5755), pp. 468-470.
- Hui, S. P., Sengupta, D., Lee, S. G. P., Sen, T., Kundu, S., Mathavan, S. y Ghosh, S.** (2014) Genome Wide Expression Profiling during Spinal Cord Regeneration Identifies Comprehensive Cellular Responses in Zebrafish, *PLoS ONE*, 9(1), p. e84212.
- Hunter, S. F., Leavitt, J. A. y Rodriguez, M.** (1997) Direct observation of myelination in vivo in the mature human central nervous system. A model for the behaviour of

BIBLIOGRAFÍA

- oligodendrocyte progenitors and their progeny, *Brain*, 120(11), pp. 2071-2082.
- Hyatt, G. A., Schmitt, E. A., Marsh-Armstrong, N., McCaffery, P., Drager, U. C. y Dowling, J. E.** (1996) Retinoic acid establishes ventral retinal characteristics, *Development*. 1996/01/01, 122(1), pp. 195-204.
- Hyatt, G. a, Schmitt, E. a, Marsh-Armstrong, N. R. y Dowling, J. E.** (1992) Retinoic acid-induced duplication of the zebrafish retina, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17), pp. 8293-8297.
- Inoue, K., Tanabe, Y. y Lupski, J. R.** (1999) Myelin deficiencies in both the central and the peripheral nervous systems associated with a SOX10 mutation, *Annals of Neurology*, 46(3), pp. 313-318.
- Ishikawa, M.** (2013) Abnormalities in Glutamate Metabolism and Excitotoxicity in the Retinal Diseases, *Scientifica*, 2013, pp. 1-13.
- Isobe, T., Takahashi, K. y Okuyama, T.** (1984) S100a0 (α) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system, *Journal of neurochemistry*. 1984/11/01, 43(5), pp. 1494-6.
- Itoh, M., Morita, K. y Tsukita, S.** (1999) Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin, *J Biol Chem*. 1999/02/20, 274(9), pp. 5981-5986.
- Jahn, O., Tenzer, S. y Werner, H. B.** (2009) Myelin proteomics: Molecular anatomy of an insulating sheath, *Molecular Neurobiology*, pp. 55-72.
- Jennings, A. R., Kirilak, Y. y Carroll, W. M.** (2002) In situ characterisation of oligodendrocyte progenitor cells in adult mammalian optic nerve, *J.Neurocytol.* 2003/03/26, 31(1), pp. 27-39.
- Jeserich, G., Klempahn, K. y Pfeiffer, M.** (2008) Features and functions of oligodendrocytes and myelin proteins of lower vertebrate species., *Journal of molecular neuroscience : MN*, 35(1), pp. 117-26.
- Jimeno, D., Lillo, C., Cid, E., Aijón, J., Velasco, A. y Lara, J. M.** (2003) The degenerative and regenerative processes after the elimination of the proliferative peripheral retina of fish, *Exp Neurol*. 2003/03/06, 179(2), pp. 210-228.
- Johns, P. R.** (1977) Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cells, *J Comp Neurol*. 1977/12/01, 176(3), pp. 343-357.
- Johns, P. R.** (1982) Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish, *J Neurosci*. 1982/02/01, 2(2), pp. 178-198.
- Johns, P. R. y Easter Jr., S. S.** (1977) Growth of the adult goldfish eye. II. Increase in retinal cell number, *J Comp Neurol*. 1977/12/01, 176(3), pp. 331-341.
- Johnson, K., Barragan, J., Bashiruddin, S., Smith, C. J., Tyrrell, C., Parsons, M. J., Doris, R., Kucenas, S., Downes, G. B., Velez, C. M., Schneider, C., Sakai, C., Pathak, N., Anderson, K., Stein, R., Devoto, S. H., Mumm, J. S. y Barresi, M. J. F.** (2016) Gfap-positive radial glial cells are an essential progenitor population for later-born neurons and glia in the zebrafish spinal cord, *GLIA*, pp. 1170-1189.
- Jung, S.-H., Kim, S., Chung, A.-Y., Kim, H.-T., So, J.-H., Ryu, J., Park, H.-C. y Kim, C.-H.** (2010) Visualization of myelination in GFP-transgenic zebrafish, *Developmental Dynamics*, 239(2), pp. 592-597.
- Jusuf, P. R. y Harris, W. A.** (2009) Ptf1a is expressed transiently in all types of amacrine cells in the embryonic zebrafish retina., *Neural development*, 4(34).
- Kageyama, G. H. y Meyer, R. L.** (1989) Glutamate-immunoreactivity in the retina and optic tectum of goldfish., *Brain research*, 503(1), pp. 118-27.
- Kalinina, A. V** (1983) Glial cells of the retina in *Rana ridibunda* Pall., *Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii*, 84(4), pp. 33-8.
- Kamachi, Y., Cheah, K. S. y Kondoh, H.** (1999) Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9., *Molecular and cellular biology*, 19(1), pp. 107-120.
- Kashima, T., Tiu, S. N., Merrill, J. E., Vinters, H. V, Dawson, G. y Campagnoni, A. T.** (1993) Expression of oligodendrocyte-associated genes in cell lines derived from human gliomas and neuroblastomas, *Cancer Res*. 1993/01/01, 53(1), pp. 170-175.

- Kassen, S. C., Ramanan, V., Montgomery, J. E., Burket, C. T., Liu, C. G., Vihtelic, T. S. y Hyde, D. R.** (2007) Time course analysis of gene expression during light-induced photoreceptor cell death and regeneration in albino zebrafish, *Developmental Neurobiology*, 67(8), pp. 1009-1031.
- Kawano, J.** (2015) Chemoarchitecture of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase in the rat optic nerve: An immunohistochemical study, *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 92(1), pp. 11-30.
- Kearns, C. A., Ravanelli, A. M., Cooper, K. y Appel, B.** (2015) Fbxw7 Limits Myelination by Inhibiting mTOR Signaling., *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(44), pp. 14861-71.
- Kiernan, B. W., Gotz, B., Faissner, A. y French-Constant, C.** (1996) Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms, *Mol Cell Neurosci.* 1996/04/01, 7(4), pp. 322-335.
- Kim, H., Shin, J., Kim, S., Poling, J., Park, H. C. y Appel, B.** (2008) Notch-regulated oligodendrocyte specification from radial glia in the spinal cord of zebrafish embryos, *Developmental Dynamics*, 237(8), pp. 2081-2089.
- Kim, J., Lee, E., Chang, B. S., Oh, C. S., Mun, G. H., Chung, Y. H. y Shin, D. H.** (2005) The presence of megamitochondria in the ellipsoid of photoreceptor inner segment of the zebrafish retina, *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 34(6), pp. 339-342.
- King, C. E., Wallace, A., Rodger, J., Bartlett, C., Beazley, L. D. y Dunlop, S. A.** (2003) Transient up-regulation of retinal EphA3 and EphA5, but not ephrin-A2, coincides with re-establishment of a topographic map during optic nerve regeneration in goldfish, *Exp Neurol.* 2003/10/14, 183(2), pp. 593-599.
- Kirby, B. B., Takada, N., Latimer, A. J., Shin, J., Carney, T. J., Kelsh, R. N. y Appel, B.** (2006) In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development, *Nat Neurosci.* 2006/11/14, 9(12), pp. 1506-1511.
- Kljavin, I. J.** (1987) Early development of photoreceptors in the ventral retina of the zebrafish embryo, *J Comp Neurol.* 1987/06/15, 260(3), pp. 461-471.
- Koke, J. R., Mosier, A. L. y Garcia, D. M.** (2010) Intermediate filaments of zebrafish retinal and optic nerve astrocytes and Müller glia: differential distribution of cytokeratin and GFAP, *BMC Research Notes.* 2010/03/03, 3(50).
- Kolb, H.** (2003) How the retina works, *American Scientist*, 91, pp. 28-35.
- Kolb, H., Fernández, E. y Nelson, R.** (2000) *Webvision.*
- Kordes, U., Cheng, Y. C. y Scotting, P. J.** (2005) Sox group E gene expression distinguishes different types and maturational stages of glial cells in developing chick and mouse, *Brain Res Dev Brain Res.* 2005/05/10, 157(2), pp. 209-213.
- Koriyama, Y., Homma, K., Sugitani, K., Higuchi, Y., Matsukawa, T., Murayama, D. y Kato, S.** (2007) Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration, *Neurochem Int.* 2007/03/17, 50(5), pp. 749-756.
- Kosenko, E., Llansola, M., Montoliu, C., Monfort, P., Rodrigo, R., Hernandez-Viadel, M., Erceg, S., Sánchez-Perez, A. M. y Felipo, V.** (2003) Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: Modulation by NMDA receptors and nitric oxide, en *Neurochemistry International*, pp. 493-499.
- Koudelka, S., Voas, M. G., Almeida, R. G., Baraban, M., Soetaert, J., Meyer, M. P., Talbot, W. S. y Lyons, D. A.** (2016) Individual Neuronal Subtypes Exhibit Diversity in CNS Myelination Mediated by Synaptic Vesicle Release., *Current biology: CB.*
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. y Fjose, A.** (1991) Expression of the zebrafish paired box gene pax[zf-b] during early neurogenesis, *Development.* 1991/12/01, 113(4), pp. 1193-1206.
- Kucenas, S., Snell, H. y Appel, B.** (2009) nkx2.2a promotes specification and differentiation of a myelinating subset of oligodendrocyte lineage cells in zebrafish, *Neuron Glia Biology*, 4(2), p. 71.
- Kugler, P. y Beyer, A.** (2003) Expression of glutamate transporters in human and rat

BIBLIOGRAFÍA

- retina and rat optic nerve., *Histochemistry and cell biology*, 120(3), pp. 199-212.
- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I. y Wegner, M.** (1998) Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(1), pp. 237-50.
- Kumada, Y., Benson, D. R., Hillemann, D., Hosted, T. J., Rochefort, D. a, Thompson, C. J., Wohlleben, W. y Tateno, Y.** (1993) Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), pp. 3009-3013.
- Kuo, C. F. y Darnell, J. E.** (1989) Mouse glutamine synthetase is encoded by a single gene that can be expressed in a localized fashion, *Journal of Molecular Biology*, 208(1), pp. 45-56.
- Küspert, M., Hammer, A., Bösl, M. R. y Wegner, M.** (2011) Olig2 regulates Sox10 expression in oligodendrocyte precursors through an evolutionary conserved distal enhancer, *Nucleic Acids Research*, 39(4), pp. 1280-1293.
- Kyritsis, N., Kizil, C. y Brand, M.** (2014) Neuroinflammation and central nervous system regeneration in vertebrates, *Trends in Cell Biology*, pp. 128-135.
- Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., Iltzsch, A. y Brand, M.** (2012) Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain., *Science (New York, N.Y.)*, 338, pp. 1353-6.
- Lang, H., Li, M., Kilpatrick, L. a., Zhu, J., Samuvel, D. J., Krug, E. L. y Goddard, J. C.** (2011) Sox2 Up-regulation and Glial Cell Proliferation Following Degeneration of Spiral Ganglion Neurons in the Adult Mouse Inner Ear, *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 12(2), pp. 151-171.
- Lee, H. J., Wu, J., Chung, J. y Wrathall, J. R.** (2013) SOX2 expression is upregulated in adult spinal cord after contusion injury in both oligodendrocyte lineage and ependymal cells, *J Neurosci Res*, 91(2), pp. 196-210.
- Lee, S., Leach, M. K., Redmond, S. A., Chong, S. Y. C., Mellon, S. H., Tuck, S. J., Feng, Z.-Q., Corey, J. M. y Chan, J. R.** (2012) A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers., *Nature methods*, 9(9), pp. 917-22.
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P. W., Pellerin, L., Magistretti, P. J. y Rothstein, J. D.** (2012) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration, *Nature*, 487(7408), pp. 443-448.
- Lenkowski, J. R., Qin, Z., Sifuentes, C. J., Thummel, R., Soto, C. M., Moens, C. B. y Raymond, P. a.** (2013) Retinal regeneration in adult zebrafish requires regulation of TGF β signaling, *Glia*, 61(10), pp. 1687-1697.
- Lenkowski, J. R. y Raymond, P. a.** (2014) Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish, *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd, 40, pp. 94-123.
- Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N. y Benowitz, L. I.** (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(12), pp. 4615-4626.
- Levine, R. L.** (1989) Organization of astrocytes in the visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study, *J Comp Neurol*. 1989/07/08, 285(2), pp. 231-245.
- Leys, A. M., Leys, M. J., Hooymans, J. M., Craandijk, A., Malenfant, M., van Germeersch, D., Priem, H. y de Laey, J. J.** (1996) *Myelinated nerve fibers and retinal vascular abnormalities.*, *Retina (Philadelphia, Pa.)*.
- Li, H., Lu, Y., Smith, H. K. y Richardson, W. D.** (2007) Olig1 and Sox10 interact synergistically to drive myelin basic protein transcription in oligodendrocytes, *J Neurosci*. 2007/12/28, 27(52), pp. 14375-14382.
- Li, H., Paes de Faria, J., Andrew, P., Nitarska, J. y Richardson, W. D.** (2011) Phosphorylation Regulates OLIG2 Cofactor Choice and the Motor Neuron-Oligodendrocyte Fate Switch, *Neuron*, 69(5), pp. 918-929.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y. y Rao, Y.** (1997) A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate.,

- Development (Cambridge, England)*, 124(3), pp. 603-15.
- Li, Y., Irwin, N., Yin, Y., Lanser, M. y Benowitz, L. I.** (2003) Axon regeneration in goldfish and rat retinal ganglion cells: differential responsiveness to carbohydrates and cAMP., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(21), pp. 7830-8.
- Lie-Venema, H., Hakvoort, T. B., van Hemert, F. J., Moorman, A. F. y Lamers, W. H.** (1998) Regulation of the spatiotemporal pattern of expression of the glutamine synthetase gene., *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 61, pp. 243-308.
- Lillo, C.** (2001) *Estudio ultraestructural de la retina y el nervio óptico de un teleosteo (Tinca tinca L., 1758) en procesos de degeneración y regeneración*. Universidad de Salamanca.
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Aijón, J. y Lara, J. M.** (2001) Non-neuronal cells involved in the degeneration and regeneration of the fish retina, *J Neurocytol.* 2002/05/31, 30(6), pp. 475-491.
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Lara, J. M. y Aijón, J.** (2002) The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth, *J Histochem Cytochem.* 2002/10/05, 50(10), pp. 1289-1302.
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Lara, J. M. y Aijón, J.** (1998) Ultrastructural organization of the optic nerve of the tench (Cyprinidae, Teleostei), *J Neurocytol.* 1999/07/15, 27(8), pp. 593-604.
- Lima, L., Obregón, F. y Matus, P.** (1998) Taurine, glutamate and GABA modulate the outgrowth from goldfish retinal explants and its concentrations are affected by the crush of the optic nerve., *Amino acids*, 15(3), pp. 195-209.
- Lin, Y., Ouchi, Y., Satoh, S. y Watanabe, S.** (2009) Sox2 Plays a Role in the Induction of Amacrine and Müller Glial Cells in Mouse Retinal Progenitor Cells, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(1), pp. 68-74.
- Ling, T. L., Mitrofanis, J. y Stone, J.** (1989) Origin of retinal astrocytes in the rat: evidence of migration from the optic nerve, *J Comp Neurol.* 1989/08/15, 286(3), pp. 345-352.
- Ling, T. L. y Stone, J.** (1988) The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve, *Brain Res Dev Brain Res.* 1988/11/01, 44(1), pp. 73-85.
- Liu, J. y Casaccia, P.** (2010) Epigenetic regulation of oligodendrocyte identity, *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, 33(4), pp. 193-201.
- Liu, Z., Hu, X., Cai, J., Liu, B., Peng, X., Wegner, M. y Qiu, M.** (2007) Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: Evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms, *Developmental Biology*, 302(2), pp. 683-693.
- Liu, Z., Xu, D., Wang, S., Chen, Y., Li, Z., Gao, X., Jiang, L., Tang, Y. y Peng, Y.** (2017) Astrocytes induce proliferation of oligodendrocyte progenitor cells via connexin 47-mediated activation of the ERK/Id4 pathway, *Cell Cycle*, 16(7), pp. 714-722.
- Lorber, B., Berry, M. y Logan, A.** (2005) Lens injury stimulates adult mouse retinal ganglion cell axon regeneration via both macrophage- and lens-derived factors, *European Journal of Neuroscience*, 21(7), pp. 2029-2034.
- Lotan, M. y Schwartz, M.** (1992) Postinjury changes in platelet-derived growth factor-like activity in fish and rat optic nerves., *Journal of neurochemistry*, 58(5), pp. 1637-42.
- Ludwin, S. K., Kosek, J. C. y Eng, L. F.** (1976) The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies, *The Journal of comparative neurology.* 1976/01/15, 165(2), pp. 197-207.
- Lun, K. y Brand, M.** (1998) A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish pax2.1 gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary, *Development.* 1998/07/22, 125(16), pp. 3049-3062.
- Lyons, D. A., Pogoda, H. M., Voas, M. G., Woods, I. G., Diamond, B., Nix, R., Arana, N., Jacobs, J. y Talbot, W. S.** (2005) *erbb3* and *erbb2* are essential for Schwann cell

BIBLIOGRAFÍA

- migration and myelination in zebrafish, *Current Biology*, 15(6), pp. 513-524.
- Lyons, D. A. y Talbot, W. S.** (2015) Glial Cell Development and Function in Zebrafish, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), p. a020586.
- Lyons, D. a, Naylor, S. G., Scholze, A. y Talbot, W. S.** (2009) Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons, *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 41(7), pp. 854-858.
- Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I. y Wilson, S. W.** (1995) Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes, *Development*. 1995/10/01, 121(10), pp. 3267-3278.
- Macdonald, R., Scholes, J., Strahle, U., Brennan, C., Holder, N., Brand, M. y Wilson, S. W.** (1997) The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain, *Development*. 1997/06/01, 124(12), pp. 2397-2408.
- Mack, A. F. y Wolburg, H.** (2006) Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions, *Brain Res*. 2006/07/04, 1103(1), pp. 25-31.
- Maggs, A. y Scholes, J.** (1986) Glial domains and nerve fiber patterns in the fish retinotectal pathway., *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1986/02/01, 6(2), pp. 424-438.
- Maggs, A. y Scholes, J.** (1990) Reticular astrocytes in the fish optic nerve: macroglia with epithelial characteristics form an axially repeated lacework pattern, to which nodes of Ranvier are apposed., *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1990/05/01, 10(5), pp. 1600-1614.
- Marc, R. E. y Cameron, D.** (2002) A molecular phenotype atlas of the zebrafish retina., *Journal of neurocytology*, 30(7), pp. 593-654.
- Marc, R. E., Liu, W. L., Kalloniatis, M., Raiguel, S. F. y van Haesendonck, E.** (1990) Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina., *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(12), pp. 4006-34.
- Marignier, R., Nicolle, A., Watrin, C., Touret, M., Cavagna, S., Varrin-Doyer, M., Cavillon, G., Rogemond, V., Confavreux, C., Honnorat, J. y Giraudon, P.** (2010) Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury, *Brain*, 133(9), pp. 2578-2591.
- Markl, J. y Franke, W. W.** (1988) Localization of cytokeratins in tissues of the rainbow trout: fundamental differences in expression pattern between fish and higher vertebrates, *Differentiation*. 1988/12/01, 39(2), pp. 97-122.
- Martinez-Navarrete, G. C., Angulo, A., Martin-Nieto, J. y Cuenca, N.** (2008) Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans, *J Comp Neurol*. 2008/10/08, 511(4), pp. 557-580.
- März, M., Schmidt, R., Rastegar, S. y Strahle, U.** (2011) Regenerative response following stab injury in the adult zebrafish telencephalon, *Developmental Dynamics*, 240(9), pp. 2221-2231.
- März, M., Schmidt, R., Rastegar, S. y Strähle, U.** (2010) Expression of the transcription factor Olig2 in proliferating cells in the adult zebrafish telencephalon, *Developmental Dynamics*, 239(12), pp. 3336-3349.
- Masai, I., Stemple, D. L., Okamoto, H. y Wilson, S. W.** (2000) Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish., *Neuron*, 27(2), pp. 251-263.
- Mathews, E. S. y Appel, B.** (2016) Oligodendrocyte differentiation, *Methods in Cell Biology*, 134, pp. 69-96.
- Mathews, E. S., Mawdsley, D. J., Walker, M., Hines, J. H., Pozzoli, M. y Appel, B.** (2014) Mutation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Synthase I Reveals Requirements for Isoprenoid and Cholesterol Synthesis in Oligodendrocyte Migration Arrest, Axon Wrapping, and Myelin Gene Expression, *Journal of Neuroscience*, 34(9), pp. 3402-3412.
- Matsukawa, T., Arai, K., Koriyama, Y., Liu, Z. y Kato, S.** (2004) Axonal regeneration of fish optic nerve after injury., *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2004/04/02, 27(4), pp. 445-451.
- Matsukawa, T., Sugitani, K., Mawatari, K., Koriyama, Y., Liu, Z., Tanaka, M. y Kato,**

- S.** (2004) Role of purpurin as a retinol-binding protein in goldfish retina during the early stage of optic nerve regeneration: its priming action on neurite outgrowth, *Journal of Neuroscience*. 2004/09/24, 24(38), pp. 8346-8353.
- Mawrin, C., Pap, T., Pallas, M., Dietzmann, K., Behrens-Baumann, W. y Vorwerk, C. K.** (2003) Changes of retinal glutamate transporter GLT-1 mRNA levels following optic nerve damage., *Molecular vision*, 9, pp. 10-3.
- van Meeteren, M. E., Baron, W., Beermann, C., Dijkstra, C. D. y van Tol, E. A. F.** (2006) Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Stimulates Differentiation of Oligodendroglia Cells, *Developmental Neuroscience*, 28(3), pp. 196-208.
- Merchán, P., Bribián, A., Sanchez-Camacho, C., Lezameta, M., Bovolenta, P. y de Castro, F.** (2007) Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors, *Mol Cell Neurosci*. 2007/09/11, 36(3), pp. 355-368.
- Meyer, R. L.** (1980) Mapping the normal and regenerating retinotectal projection of goldfish with autoradiographic methods, *J Comp Neurol*. 1980/01/15, 189(2), pp. 273-289.
- Meyers, J. R., Hu, L., Moses, A., Kaboli, K., Papandrea, A. y Raymond, P. a** (2012) β -catenin/Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina, *Neural Development*. Neural Development, 7(1), p. 30.
- Mi, H. y Barres, B. A.** (1999) Purification and characterization of astrocyte precursor cells in the developing rat optic nerve, *J Neurosci*. 1999/01/27, 19(3), pp. 1049-1061.
- Mi, H., Haerberle, H. y Barres, B. A.** (2001) Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells, *J Neurosci*. 2001/02/27, 21(5), pp. 1538-1547.
- Miller, D. J., Duka, T., Stimpson, C. D., Schapiro, S. J., Baze, W. B., McArthur, M. J., Fobbs, A. J., Sousa, A. M. M., Sestan, N., Wildman, D. E., Lipovich, L., Kuzawa, C. W., Hof, P. R. y Sherwood, C. C.** (2012) Prolonged myelination in human neocortical evolution., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), pp. 16480-5.
- Miller, K. E., Richards, B. A. y Kriebel, R. M.** (2002) Glutamine-, glutamine synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase-immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve., *Brain research*, 945(2), pp. 202-211.
- Miller, R. H.** (2002) Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS., *Progress in neurobiology*, 67(6), pp. 451-67.
- Miyake, T. y Kitamura, T.** (1992) Glutamine synthetase immunoreactivity in two types of mouse brain glial cells., *Brain research*, 586(1), pp. 53-60.
- De Monasterio-Schrader, P., Jahn, O., Tenzer, S., Wichert, S. P., Patzig, J. y Werner, H. B.** (2012) Systematic approaches to central nervous system myelin, *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 2879-2894.
- Monk, K. R. y Talbot, W. S.** (2009) Genetic dissection of myelinated axons in zebrafish, *Current Opinion in Neurobiology*, 19(5), pp. 486-490.
- Morcillo, J., Martinez-Morales, J. R., Trousse, F., Fermin, Y., Sowden, J. C. y Bovolenta, P.** (2006) Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH, *Development*. 2006/07/21, 133(16), pp. 3179-3190.
- Morcos, Y. y Chan-Ling, T.** (1997) Identification of oligodendrocyte precursors in the myelinated streak of the adult rabbit retina in vivo, *Glia*. 1997/10/23, 21(2), pp. 163-182.
- Morcos, Y. y Chan-Ling, T.** (2000) Concentration of astrocytic filaments at the retinal optic nerve junction is coincident with the absence of intra-retinal myelination: comparative and developmental evidence, *Journal of neurocytology*. 2001/05/16, 29(9), pp. 665-678.
- Moreno, M. C., Sande, P., Marcos, H. A., de Zavalía, N., Keller Sarmiento, M. I. y Rosenstein, R. E.** (2005) Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity., *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(9), pp. 1161-2.
- Morris, A. C., Scholz, T. L., Brockerhoff, S. E. y Fadool, J. M.** (2008) Genetic dissection reveals two separate pathways for rod and cone regeneration in the teleost retina, *Dev Neurobiol*. 2008/02/12, 68(5), pp. 605-619.

BIBLIOGRAFÍA

- Morris, A. y Fadool, J.** (2005) Studying rod photoreceptor development in zebrafish, *Physiology & Behavior*, 86(3), pp. 306-313.
- Morris, J. K., Willard, B. B., Yin, X., Jeserich, G., Kinter, M. y Trapp, B. D.** (2004) The 36K Protein of Zebrafish CNS Myelin Is a Short-Chain Dehydrogenase, *GLIA*, 45(4), pp. 378-391.
- Müller, H.** (1851) Zur Histologie der Netzhaut, *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, 3, pp. 234-237.
- Müller, H.** (1952) Bau und wachstum der netzhaut des Guppy (Lebistes reticulates), *Zoo. Jb. Abt. Allg. Zool. Physiol.*, 63, pp. 275-324.
- Münzel, E. J., Becker, C. G., Becker, T. y Williams, A.** (2014) Zebrafish regenerate full thickness optic nerve myelin after demyelination, but this fails with increasing age, *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), p. 77.
- Münzel, E. J., Schaefer, K., Obirei, B., Kremmer, E., Burton, E. a., Kuscha, V., Becker, C. G., Brösamle, C., Williams, A. y Becker, T.** (2012) Claudin k is specifically expressed in cells that form myelin during development of the nervous system and regeneration of the optic nerve in adult zebrafish, *Glia*. 2011/10/25, 60(2), pp. 253-270.
- Murray, B. W., Busby, E. R., Mommsen, T. P. y Wright, P. A.** (2003) Evolution of glutamine synthetase in vertebrates: multiple glutamine synthetase genes expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)., *The Journal of experimental biology*, 206(Pt 9), pp. 1511-21.
- Nagashima, M., Sakurai, H., Mawatari, K., Koriyama, Y., Matsukawa, T. y Kato, S.** (2009) Involvement of retinoic acid signaling in goldfish optic nerve regeneration, *Neurochem Int.* 2008/12/31, 54(3-4), pp. 229-236.
- Nakamura, K., Harada, C., Namekata, K. y Harada, T.** (2006) Expression of olig2 in retinal progenitor cells, *Neuroreport*, 17(4), pp. 345-349.
- Nakazawa, T., Tachi, S., Aikawa, E. y Ihnuma, M.** (1993) Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina, *Glia*. 1993/06/01, 8(2), pp. 114-121.
- Navascués, J., Calvente, R., Marin-Teva, J. L. y Cuadros, M. A.** (2000) Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system, *An Acad Bras Cienc.* 2000/08/10, 72(1), pp. 91-102.
- Nawaz, S., Schweitzer, J., Jahn, O. y Werner, H. B.** (2013) Molecular evolution of myelin basic protein, an abundant structural myelin component, *Glia*, 61(8), pp. 1364-1377.
- Neve, L. D., Savage, A. a., Koke, J. R. y García, D. M.** (2012) Activating transcription factor 3 and reactive astrocytes following optic nerve injury in zebrafish., *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP.* Elsevier Inc., 155(2), pp. 213-8.
- Nishikawa, Y., Oku, H., Morishita, S., Horie, T., Kida, T., Mimura, M., Fukumoto, M., Kojima, S. y Ikeda, T.** (2016) Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve, *Experimental Eye Research*, 146, pp. 118-127.
- Nona, S. N.** (1995) *Repair by Schwann cells in the regenerating goldfish visual pathway.* In: *Neuron-Glia Interactions during Phylogeny.* Editado por A. and R. Vernadakis B. Totowa, New Jersey: Humana.
- Nona, S. N., Duncan, A., Stafford, C. A., Maggs, A., Jeserich, G. y Cronly-Dillon, J. R.** (1992) Myelination of regenerated axons in goldfish optic nerve by Schwann cells, *J. Neurocytol.* 1992/06/01, 21(0300-4864 (Print)), pp. 391-401.
- Nona, S. N., Shehab, S. A., Stafford, C. A. y Cronly-Dillon, J. R.** (1989) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) from goldfish: its localisation in visual pathway, *Glia*. 1989/01/01, 2(3), pp. 189-200.
- Nona, S. N. y Stafford, C. A.** (1995) Glial repair at the lesion site in regenerating goldfish spinal cord: an immunohistochemical study using species-specific antibodies, *J Neurosci Res.* 1995/10/15, 42(3), pp. 350-356.
- Nona, S. N., Thomlinson, A. M., Bartlett, C. A. y Scholes, J.** (2000) Schwann cells in the regenerating fish optic nerve: evidence that CNS axons, not the glia, determine when

- myelin formation begins, *J. Neurocytol.* 2001/03/29, 29(4), pp. 285-300.
- Nona, S. N., Thomlinson, A. M. y Stafford, C. A.** (1998) Temporary colonization of the site of lesion by macrophages is a prelude to the arrival of regenerated axons in injured goldfish optic nerve, *J Neurocytol.* 1999/08/18, 27(11), pp. 791-803.
- Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U. y Gruss, P.** (1990) Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis, *Development.* 1990/08/01, 109(4), pp. 797-809.
- Ogai, K., Kuwana, A., Hisano, S., Nagashima, M., Koriyama, Y., Sugitani, K., Mawatari, K., Nakashima, H. y Kato, S.** (2014) Upregulation of leukemia inhibitory factor (LIF) during the early stage of optic nerve regeneration in zebrafish., *PLoS one.* Editado por T. C. Badea, 9(8), p. e106010.
- Ogden, T. E.** (1978) Nerve fiber layer astrocytes of the primate retina: morphology, distribution, and density, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978/06/01, 17(6), pp. 499-510.
- Ogueta, M.** (2013) *Caracterización de los progenitores neurales de retina del pez cebra adulto.* Universidad de Salamanca.
- Okuda, Y., Yoda, H., Uchikawa, M., Furutani-Seiki, M., Takeda, H., Kondoh, H. y Kamachi, Y.** (2006) Comparative genomic and expression analysis of group B1 sox genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution, *Developmental Dynamics*, 235(3), pp. 811-825.
- Olson, A. J., Picones, A., Julian, D. y Korenbrot, J. I.** (1999) A developmental time line in a retinal slice from rainbow trout, *J Neurosci Methods.* 2000/01/14, 93(2), pp. 91-100.
- Ono, K., Tsumori, T., Kishi, T., Yokota, S. y Yasui, Y.** (1998) Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina, *J Comp Neurol.* 1998/08/26, 398(3), pp. 309-322.
- Ono, K., Tsumori, T., Yokota, S. y Yasui, Y.** (2001) Extensive Proliferation of Oligodendrocyte Precursors in the Parenchyma of the Embryonic Chick Central Nervous System, *Developmental Biology*, 231(1), pp. 77-86.
- Ono, K., Yasui, Y., Rutishauser, U. y Miller, R. H.** (1997) Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve, *Neuron.* 1997/08/01, 19(2), pp. 283-292.
- Ono, K., Yoshii, K., Tominaga, H., Gotoh, H., Nomura, T., Takebayashi, H. y Ikenaka, K.** (2017) Oligodendrocyte precursor cells in the mouse optic nerve originate in the preoptic area, *Brain Structure and Function.*
- Oster, S. F., Deiner, M., Birgbauer, E. y Sretavan, D. W.** (2004) Ganglion cell axon pathfinding in the retina and optic nerve, *Semin Cell Dev Biol.* 2004/03/24, 15(1), pp. 125-136.
- Otteson, D. C. y Hitchcock, P. F.** (2003) Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration, *Vision Res.* 2003/04/02, 43(8), pp. 927-936.
- Paffenholz, R., Kuhn, C., Grund, C., Stehr, S. y Franke, W. W.** (1999) The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction, *Exp Cell Res.* 1999/07/22, 250(2), pp. 452-464.
- Park, H.-C., Mehta, A., Richardson, J. S. y Appel, B.** (2002) olig2 is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development, *Developmental Biology.* 2002/08/09, 248(2), pp. 356-368.
- Park, H.-C., Shin, J. y Appel, B.** (2004) Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling, *Development (Cambridge, England)*, 131(23), pp. 5959-5969.
- Park, H.-C., Shin, J., Roberts, R. K. y Appel, B.** (2007) An olig2 reporter gene marks oligodendrocyte precursors in the postembryonic spinal cord of zebrafish, *Developmental Dynamics*, 236(12), pp. 3402-3407.
- Park, H. C., Boyce, J., Shin, J. y Appel, B.** (2005) Oligodendrocyte Specification in Zebrafish Requires Notch-Regulated Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Function,

BIBLIOGRAFÍA

Journal of Neuroscience. 2005/07/22, 25(29), pp. 6836-6844.

Parrilla, M. (2010) *Estudio de las interacciones axón-neuroglía en la cabeza de nervio óptico de teleosteos durante el crecimiento continuado y la regeneración*. Universidad de Salamanca.

Parrilla, M., León-Lobera, F., Lillo, C., Arévalo, R., Aijón, J., Lara, J. M. y Velasco, A. (2016) Sox10 Expression in Goldfish Retina and Optic Nerve Head in Controls and after the Application of Two Different Lesion Paradigms., *PloS one*. Public Library of Science, 11(5), p. e0154703.

Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrion, M. J., Arevalo, R., Aijon, J., Lara, J. M. y Velasco, A. (2012) Characterization of Pax2 expression in the goldfish optic nerve head during retina regeneration, *PLoS One*. 2012/03/03, 7(2), p. e32348.

Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrion, M. J., Arevalo, R., Aijon, J., Lara, J. M. y Velasco, A. (2013) Pax2+ astrocytes in the fish optic nerve head after optic nerve crush, *Brain research*. 2012/11/21, 1492, pp. 18-32.

Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrión, M. J., Arévalo, R., Lara, J. M., Aijón, J. y Velasco, A. (2009) Pax2 in the optic nerve of the goldfish, a model of continuous growth, *Brain Res*. 2008/12/27, 1255, pp. 75-88.

Parrinello, S., Napoli, I., Ribeiro, S., Digby, P. W., Fedorova, M., Parkinson, D. B., Doddrell, R. D. S., Nakayama, M., Adams, R. H. y Lloyd, A. C. (2010) EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell Sorting, *Cell*. Elsevier Inc., 143(1), pp. 145-155.

Patzig, J., Jahn, O., Tenzer, S., Wichert, S. P., de Monasterio-Schrader, P., Rosfa, S., Kuharev, J., Yan, K., Bormuth, I., Bremer, J., Aguzzi, A., Orfaniotou, F., Hesse, D., Schwab, M. H., Möbius, W., Nave, K. -a. K.-A., Werner, H. B., Mobius, W., Nave, K. -a. K.-A. y Werner, H. B. (2011) Quantitative and integrative proteome analysis of peripheral nerve myelin identifies novel myelin proteins and candidate neuropathy loci., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(45), pp. 16369-86.

Peirano, R. I., Goerich, D. E., Riethmacher, D. y Wegner, M. (2000) Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10., *Molecular and cellular biology*, 20(9), pp. 3198-209.

Peirano, R. I. y Wegner, M. (2000) The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences., *Nucleic acids research*, 28(16), pp. 3047-55.

Pekny, M., Wilhelmsson, U., Bogestål, Y. R. y Pekna, M. (2007) The Role of Astrocytes and Complement System in Neural Plasticity, en *International review of neurobiology*, pp. 95-111.

Penes, M. C., Li, X. y Nagy, J. I. (2005) Expression of zonula occludens-1 (ZO-1) and the transcription factor ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB)-MsY3 in glial cells and colocalization at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions in mouse brain, *European Journal of Neuroscience*. 2005/07/28, 22(2), pp. 404-418.

Peri, F. y Nüsslein-Volhard, C. (2008) Live Imaging of Neuronal Degradation by Microglia Reveals a Role for v0-ATPase a1 in Phagosomal Fusion In Vivo, *Cell*, 133(5), pp. 916-927.

Perry, V. H. y Gordon, S. (1988) Macrophages and microglia in the nervous system, *Trends Neurosci*. 1988/06/01, 11(6), pp. 273-277.

Perry, V. H. y Lund, R. D. (1990) Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons, *J Neurocytol*. 1990/04/01, 19(2), pp. 265-272.

Peters, A., Palay, S. L. y Webster, H. (1991) *The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells*. Oxford University Press.

Petrausch, B., Jung, M., Leppert, C. A. y Stuermer, C. A. (2000) Lesion-induced regulation of netrin receptors and modification of netrin-1 expression in the retina of fish and grafted rats, *Mol Cell Neurosci*. 2000/11/22, 16(4), pp. 350-364.

Pevny, L. H. y Lovell-Badge, R. (1997) Sox genes find their feet, *Current Opinion in Genetics and Development*, pp. 338-344.

- Pfeffer, P. L., Gerster, T., Lun, K., Brand, M. y Busslinger, M.** (1998) Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function, *Development*. 1998/07/22, 125(16), pp. 3063-3074.
- Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D. E., Préhu, M. O., Puliti, A., Herbarth, B., Hermans-Borgmeyer, I., Legius, E., Matthijs, G., Amiel, J., Lyonnet, S., Ceccherini, I., Romeo, G., Smith, J. C., Read, A. P., Wegner, M. y Goossens, M.** (1998) SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease., *Nature genetics*, 18(2), pp. 171-173.
- Pingault, V., Guiochon-Mantel, A., Bondurand, N., Faure, C., Lacroix, C., Lyonnet, S., Goossens, M. y Landrieu, P.** (2000) Peripheral neuropathy with chronic intestinal pseudo-obstruction and deafness: A developmental "neural crest syndrome" related to a SOX10 mutation, *Annals of Neurology*, 48(4), pp. 671-676.
- Pinzón-Olejua, A., Welte, C., Abdesslem, H., Málaga-Trillo, E. y Stuermer, C. A.** (2014) Essential roles of zebrafish rtn4/Nogo paralogues in embryonic development., *Neural development*, 9(8).
- Pinzon-Olejua, A., Welte, C., Chekuru, A., Bosak, V., Brand, M., Hans, S. y Stuermer, C. A. O.** (2017) Cre-inducible site-specific recombination in zebrafish oligodendrocytes, *Developmental Dynamics*, 246(1), pp. 41-49.
- Pogoda, H.-M., Sternheim, N., Lyons, D. a., Diamond, B., Hawkins, T. a., Woods, I. G., Bhatt, D. H., Franzini-Armstrong, C., Dominguez, C., Arana, N., Jacobs, J., Nix, R., Fetcho, J. R. y Talbot, W. S.** (2006) A genetic screen identifies genes essential for development of myelinated axons in zebrafish, *Developmental Biology*, 298(1), pp. 118-131.
- Popko, B., Puckett, C., Lai, E., Shine, H. D., Readhead, C., Takahashi, N., Hunt, S. W., Sidman, R. L. y Hood, L.** (1987) Myelin deficient mice: Expression of myelin basic protein and generation of mice with varying levels of myelin, *Cell*, 48(4), pp. 713-721.
- Preston, M. a. y Macklin, W. B.** (2015) Zebrafish as a model to investigate CNS myelination, *Glia*, 63(2), pp. 177-193.
- Pruvot, B., Curé, Y., Djiotsa, J., Voncken, A. y Muller, M.** (2014) Developmental defects in zebrafish for classification of EGF pathway inhibitors, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(2), pp. 339-349.
- Quesada, A., Aguilera, Y., Caparrós, R., Prada, F. A., Santano, C., López-López, R. y Prada, C.** (2011) Myelin oligodendrocyte-specific protein is expressed in Müller cells of myelinated vertebrate retinas, *Journal of Neuroscience Research*, 89(5), pp. 674-688.
- Quigley, H. A., Nickells, R. W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., Thibault, D. J. y Zack, D. J.** (1995) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995/04/01, 36(5), pp. 774-786.
- Raff, M. C., French-Constant, C. y Miller, R. H.** (1987) Glial cells in the rat optic nerve and some thoughts on remyelination in the mammalian CNS, *J Exp Biol*. 1987/09/01, 132, pp. 35-41.
- Rai, N. K., Ashok, A., Rai, A., Tripathi, S., Nagar, G. K., Mitra, K. y Bandyopadhyay, S.** (2013) Exposure to As, Cd and Pb-mixture impairs myelin and axon development in rat brain, optic nerve and retina, *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc., 273(2), pp. 242-258.
- Ramachandran, R., Reifler, A., Parent, J. M. y Goldman, D.** (2010) Conditional gene expression and lineage tracing of tuba1a expressing cells during zebrafish development and retina regeneration., *The Journal of comparative neurology*, 518(20), pp. 4196-212.
- Ramón y Cajal, S.** (1893) La retina des vertébrés, *Cellule*, 9, pp. 17-255.
- Ramón y Cajal, S.** (1913) Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano, *Trabajo de laboratorio de investigación en Biología*. Universidad de Madrid, 18, pp. 225-315.
- Ransohoff, R. M. y Cardona, A. E.** (2010) The myeloid cells of the central nervous system parenchyma., *Nature*, 468(7321), pp. 253-62.
- Ravanelli, A. M. y Appel, B.** (2015) Motor neurons and oligodendrocytes arise from

BIBLIOGRAFÍA

- distinct cell lineages by progenitor recruitment., *Genes & development*.
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L. y Perkowski, J. J.** (2006) Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish, *BMC Dev Biol.* 2006/07/29, 6(36).
- Raymond, P. A. y Rivlin, P. K.** (1987) Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors, *Dev Biol.* 1987/07/01, 122(1), pp. 120-138.
- Readhead, C., Popko, B., Takahashi, N., David Shine, H., Saavedra, R. A., Sidman, R. L. y Hood, L.** (1987) Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: Correction of the dysmyelinating phenotype, *Cell*, 48(4), pp. 703-712.
- Reichenbach, A. y Bringmann, A.** (2015) *Retinal glia, Encyclopedia of Neuroscience.* Editado por A. Vekhratsky y V. Parpura. Morgan & Claypool Life Sciences.
- Reichenbach, A. y Robinson, S. R.** (1995) *Ependymoglia and ependymoglia-like cells. En: Neuroglia.* Editado por H. y R. Kettenmann B.R. Oxford: University Press.
- Reichenbach, A., Schippel, K., Schumann, R. y Hagen, E.** (1988) Ultrastructure of rabbit retinal nerve fibre layer--neuro-glial relationships, myelination, and nerve fibre spectrum, *J Hirnforsch.* 1988/01/01, 29(5), pp. 481-491.
- Reichenbach, A., Schneider, H., Leibnitz, L., Reichelt, W., Schaaf, P. y Schumann, R.** (1989) The structure of rabbit retinal Müller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers, *Anat Embryol (Berl).* 1989/01/01, 180(1), pp. 71-79.
- Rinholm, J. E., Hamilton, N. B., Kessar, N., Richardson, W. D., Bergersen, L. H. y Attwell, D.** (2011) Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate, *J Neurosci*, 31(2), pp. 538-548.
- Río Hortega, P. D.** (1932) Cytology and cellular pathology of the nervous system, *Microglia. (Penfield, W.) New York*, pp. 481-584.
- Río Hortega, P. F.** (1928) Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía, *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 14, pp. 5-122.
- Rodger, J., Vitale, P. N., Tee, L. B., King, C. E., Bartlett, C. A., Fall, A., Brennan, C., O'Shea, J. E., Dunlop, S. A. y Beazley, L. D.** (2004) EphA/ephrin-A interactions during optic nerve regeneration: restoration of topography and regulation of ephrin-A2 expression, *Mol Cell Neurosci.* 2004/02/14, 25(1), pp. 56-68.
- Romero-Alemán, M. M., Monzón-Mayor, M., Yanes, C. y Lang, D.** (2004) Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to successful structural repair in the cerebral cortex of the lizard *Gallotia galloti*, *Experimental Neurology*, 188(1), pp. 74-85.
- Rompani, S. B. y Cepko, C. L.** (2010) A Common Progenitor for Retinal Astrocytes and Oligodendrocytes, *Journal of Neuroscience*, 30(14), pp. 4970-4980.
- Rosenberg, S. S., Kelland, E. E., Tokar, E., De la Torre, A. R. y Chan, J. R.** (2008) The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), pp. 14662-7.
- Roth, L. W., Bormann, P., Wiederkehr, C. y Reinhard, E.** (1999) Beta-thymosin, a modulator of the actin cytoskeleton is increased in regenerating retinal ganglion cells, *Eur J Neurosci.* 1999/11/17, 11(10), pp. 3488-3498.
- Le Rouëdec, D., Rayner, K., Rex, M., Wigmore, P. M. y Scotting, P. J.** (2002) The transcription factor cSox2 and neuropeptide Y define a novel subgroup of amacrine cells in the retina, *Journal of Anatomy*, 200(1), pp. 51-56.
- Saitoh, F. y Araki, T.** (2010) Proteasomal Degradation of Glutamine Synthetase Regulates Schwann Cell Differentiation, *Journal of Neuroscience*, 30(4), pp. 1204-1212.
- Sakai, H. M., Naka, K. y Dowling, J. E.** (1986) Ganglion cell dendrites are presynaptic in catfish retina, *Nature.* 1986/02/06, 319(6053), pp. 495-497.
- Salminen, A., Kaarniranta, K. y Kauppinen, A.** (2012) Inflammaging: Disturbed interplay between autophagy and inflammasomes, *Aging*, 4(3), pp. 166-175.
- Santos-Ledo, A., Cavodeassi, F., Carreño, H., Aijón, J. y Arévalo, R.** (2013) Ethanol alters gene expression and cell organization during optic vesicle evagination.,

- Neuroscience*. Elsevier, 250(100), pp. 493-506.
- Santos, E., Yanes, C. M., Monzon-Mayor, M. y del Mar Romero-Aleman, M.** (2006) Peculiar and typical oligodendrocytes are involved in an uneven myelination pattern during the ontogeny of the lizard visual pathway, *Journal of neurobiology*. 2006/08/25, 66(10), pp. 1115-1124.
- Sanyanusin, P., Schimmenti, L. A., McNoe, L. A., Ward, T. A., Pierpont, M. E., Sullivan, M. J., Dobyns, W. B. y Eccles, M. R.** (1995) Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux, *Nat Genet*. 1995/04/01, 9(4), pp. 358-364.
- Scaffidi, P. y Bianchi, M. E.** (2001) Spatially Precise DNA Bending Is an Essential Activity of the Sox2 Transcription Factor, *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp. 47296-47302.
- Schaefer, K. y Brösamle, C.** (2008) Zwilling-A and -B, Two Related Myelin Proteins of Teleosts, Which Originate from a Single Bicistronic Transcript, *Molecular Biology and Evolution*, 26(3), pp. 495-499.
- Schebesta, M. y Serluca, F. C.** (2009) Olig1 Expression Identifies Developing Oligodendrocytes in Zebrafish and Requires Hedgehog and Notch Signaling, *Developmental Dynamics*, 238(4), pp. 887-898.
- Schmitt, E. A. y Dowling, J. E.** (1994) Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*, *The Journal of Comparative Neurology*. 1994/06/22, 344(4), pp. 532-542.
- Schmitt, E. A. y Dowling, J. E.** (1999) Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses, *J Comp Neurol*. 1999/02/13, 404(4), pp. 515-536.
- Schneider-Schaulies, J., von Brunn, A. y Schachner, M.** (1990) Recombinant peripheral myelin protein Po confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties, *Journal of Neuroscience Research*, 27(3), pp. 286-297.
- Schnitzer, J.** (1985) Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit, *J Comp Neurol*. 1985/10/08, 240(2), pp. 128-142.
- Schnitzer, J.** (1988) Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels, *Glia*. 1988/01/01, 1(1), pp. 74-89.
- Scholes, J. H.** (1979) Nerve fibre topography in the retinal projection to the tectum, *Nature*. 1979/04/12, 278(5705), pp. 620-624.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E. W., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J. y Geissmann, F.** (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells., *Science*, 336(6077), pp. 86-90.
- Schweitzer, J., Becker, T., Becker, C. G. y Schachner, M.** (2003) Expression of protein zero is increased in lesioned axon pathways in the central nervous system of adult zebrafish, *Glia*. 2003/01/16, 41(3), pp. 301-317.
- Schweitzer, J., Becker, T., Schachner, M., Nave, K.-A. A. y Werner, H.** (2006) Evolution of myelin proteolipid proteins: gene duplication in teleosts and expression pattern divergence, *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2005/11/18, 31(1), pp. 161-177.
- Schweitzer, J., Gimnopoulos, D., Lieberoth, B. C., Pogoda, H.-M. M., Feldner, J., Ebert, A., Schachner, M., Becker, T. y Becker, C. G.** (2007) Contactin1a expression is associated with oligodendrocyte differentiation and axonal regeneration in the central nervous system of zebrafish, *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2007/04/12, 35(2), pp. 194-207.
- Sehgal, R., Karcavich, R., Carlson, S. y Belecky-Adams, T. L.** (2008) Ectopic Pax2 expression in chick ventral optic cup phenocopies loss of Pax2 expression, *Dev Biol*. 2008/05/20, 319(1), pp. 23-33.
- Sekizar, S., Mannioui, A., Azoyan, L., Colin, C., Thomas, J.-L., Du Pasquier, D., Mallat, M. y Zalc, B.** (2015) Remyelination by Resident Oligodendrocyte Precursor Cells

BIBLIOGRAFÍA

- in a *Xenopus laevis* Inducible Model of Demyelination, *Developmental Neuroscience*, 37(3), pp. 232-242.
- Shapiro, L., Doyle, J. P., Hensley, P., Colman, D. R. y Hendrickson, W. A.** (1996) Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin, *Neuron*, 17(3), pp. 435-449.
- Shen, S., Sandoval, J., Swiss, V. A., Li, J., Dupree, J., Franklin, R. J. M. y Casaccia-Bonnel, P.** (2008) Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency., *Nature neuroscience*, 11(9), pp. 1024-34.
- Shibasaki, K., Takebayashi, H., Ikenaka, K., Feng, L. y Gan, L.** (2007) Expression of the basic helix-loop-factor Olig2 in the developing retina: Olig2 as a new marker for retinal progenitors and late-born cells, *Gene Expression Patterns*, 7(1-2), pp. 57-65.
- Shin, J., Park, H.-C., Topczewska, J. M., Mawdsley, D. J. y Appel, B.** (2003) Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics., *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology*, 25(1-2), pp. 7-14.
- Shine, H. D., Readhead, C., Popko, B., Hood, L. y Sidman, R. L.** (1992) Morphometric analysis of normal, mutant, and transgenic CNS: correlation of myelin basic protein expression to myelinogenesis., *Journal of neurochemistry*, 58(1), pp. 342-9.
- Sieger, D. y Peri, F.** (2013) Animal models for studying microglia: The first, the popular, and the new, *GLIA*, 61(1), pp. 3-9.
- Silveira, L. C., Russelakis-Carneiro, M. y Perry, V. H.** (1994) The ganglion cell response to optic nerve injury in the cat: differential responses revealed by neurofibrillar staining, *J Neurocytol.* 1994/02/01, 23(2), pp. 75-86.
- Sim, F. J., Zhao, C., Penderis, J. y Franklin, R. J. M.** (2002) The age-related decrease in CNS remyelination efficiency is attributable to an impairment of both oligodendrocyte progenitor recruitment and differentiation., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(7), pp. 2451-9.
- Simons, M. y Nave, K.-A.** (2015) Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support., *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Sivron, T. y Schwartz, M.** (1994) Nonpermissive nature of fish optic nerves to axonal growth is due to presence of myelin-associated growth inhibitors, *Exp Neurol.* 1994/12/01, 130(2), pp. 411-413.
- Skoff, R. P. y Knapp, P. E.** (1991) Division of astroblasts and oligodendroblasts in postnatal rodent brain: evidence for separate astrocyte and oligodendrocyte lineages, *Glia*. 1991/01/01, 4(2), pp. 165-174.
- Smith, C. M., Cooksey, E. y Duncan, I. D.** (2013) Myelin loss does not lead to axonal degeneration in a long-lived model of chronic demyelination., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(6), pp. 2718-27.
- Snaidero, N., Möbius, W., Czopka, T., Hekking, L. H. P., Mathisen, C., Verkleij, D., Goebbels, S., Edgar, J., Merkler, D., Lyons, D. A., Nave, K.-A. y Simons, M.** (2014) Myelin Membrane Wrapping of CNS Axons by PI(3,4,5)P3-Dependent Polarized Growth at the Inner Tongue, *Cell*, 156(1-2), pp. 277-290.
- Snyder, J. L., Kearns, C. a y Appel, B.** (2012) Fbxw7 regulates Notch to control specification of neural precursors for oligodendrocyte fate., *Neural development*, 7(1), p. 15.
- Solin, S. L., Wang, Y., Mauldin, J., Schultz, L. E., Lincow, D. E., Brodskiy, P. A., Jones, C. A., Syrkin-Nikolau, J., Linn, J. M., Essner, J. J., Hostetter, J. M., Whitley, E. M., Cameron, J. D., Chou, H.-H., Severin, A. J., Sakaguchi, D. S. y McGrail, M.** (2014) Molecular and Cellular Characterization of a Zebrafish Optic Pathway Tumor Line Implicates Glia-Derived Progenitors in Tumorigenesis, *PLoS ONE*. Editado por J. C. Glorioso. Public Library of Science, 9(12), p. e114888.
- Southard-Smith, E. M., Kos, L. y Pavan, W. J.** (1998) Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model., *Nature genetics*, 18(1), pp. 60-64.
- Spassky, N., de Castro, F., Le Bras, B., Heydon, K., Queraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chedotal, A., Zalc, B. y Thomas, J. L.** (2002) Directional guidance of

- oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1, *J Neurosci.* 2002/07/18, 22(14), pp. 5992-6004.
- Spassky, N., Goujet-Zalc, C., Parmantier, E., Olivier, C., Martinez, S., Ivanova, A., Ikenaka, K., Macklin, W., Cerruti, I., Zalc, B. y Thomas, J. L.** (1998) Multiple restricted origin of oligodendrocytes, *J Neurosci.* 1998/10/08, 18(20), pp. 8331-8343.
- Sperry, R. W.** (1948) Patterning of central synapses in regeneration of the optic nerve in teleosts., *Physiol. Zool.*, 21, pp. 351-361.
- Springer, A. D. y Wilson, B. R.** (1989) Light microscopic study of degenerating cobalt-filled optic axons in goldfish: role of microglia and radial glia in debris removal, *J Comp Neurol.* 1989/04/01, 282(1), pp. 119-132.
- Stafford, C. A., Shehab, S. A. S., Nona, S. N. y Cronly-Dillon, J. R.** (1990) Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in goldfish optic nerve following injury, *Glia.* 1990/01/01, 3(1), pp. 33-42.
- Stanke, J., Moose, H. E., El-Hodiri, H. M. y Fischer, A. J.** (2010) Comparative study of Pax2 expression in glial cells in the retina and optic nerve of birds and mammals, *J Comp Neurol.* 2010/05/04, 518(12), pp. 2316-2333.
- Stephens, W. Z., Senecal, M., Nguyen, M. y Piotrowski, T.** (2010) Loss of adenomatous polyposis coli (apc) results in an expanded ciliary marginal zone in the zebrafish eye, *Developmental Dynamics*, 239(7), pp. 2066-2077.
- Stoll, G. y Jander, S.** (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS, *Prog Neurobiol.* 1999/05/26, 58(3), pp. 233-247.
- Stolt, C. C., Rehberg, S., Ader, M., Lommes, P., Riethmacher, D., Schachner, M., Bartsch, U. y Wegner, M.** (2002) Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10, *Genes Dev.* 2002/01/19, 16(2), pp. 165-170.
- Stolt, C. C., Schmitt, S., Lommes, P., Sock, E. y Wegner, M.** (2005) Impact of transcription factor Sox8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord, *Dev Biol.* 2005/05/17, 281(2), pp. 309-317.
- Stolt, C. C. y Wegner, M.** (2010) SoxE function in vertebrate nervous system development, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(3), pp. 437-440.
- Straatsma, B. R., Foos, R. Y., Heckenlively, J. R. y Taylor, G. N.** (1981) Myelinated retinal nerve fibers., *American journal of ophthalmology*, 91(1), pp. 25-38.
- Straatsma, B. R., Heckenlively, J. R., Foos, R. Y. y Shahinian, J. K.** (1979) Myelinated retinal nerve fibers associated with ipsilateral myopia, amblyopia, and strabismus., *American journal of ophthalmology*, 88(3 Pt 1), p. 506-10.
- Streit, W. J., Graeber, M. B. y Kreutzberg, G. W.** (1988) Functional plasticity of microglia: a review, *Glia.* 1988/01/01, 1(5), pp. 301-307.
- Streit, W. J. y Xue, Q.-S.** (2013) Microglial senescence., *CNS & neurological disorders drug targets*, 12(6), pp. 763-7.
- Stuermer, C. A.** (1988) Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo, *J Neurosci.* 1988/12/01, 8(12), pp. 4513-4530.
- Stuermer, C. A. y Bastmeyer, M.** (2000) The retinal axon's pathfinding to the optic disk, *Prog Neurobiol.* 2000/06/01, 62(2), pp. 197-214.
- Su, Y., Wang, F., Teng, Y., Zhao, S.-G., Cui, H. y Pan, S.-H.** (2009) Axonal regeneration of optic nerve after crush in Nogo66 receptor knockout mice., *Neuroscience letters*, 460(3), pp. 223-6.
- Suárez, I., Bodega, G. y Fernández, B.** (2002) Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia., *Neurochemistry international*, 41(2-3), pp. 123-42.
- Sugimoto, Y., Taniguchi, M., Yagi, T., Akagi, Y., Nojyo, Y. y Tamamaki, N.** (2001) Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve, *Development.* 2001/09/08, 128(17), pp. 3321-3330.
- Sun, D., Lye-Barthel, M., Masland, R. H. y Jakobs, T. C.** (2009) The morphology and spatial arrangement of astrocytes in the optic nerve head of the mouse, *J Comp Neurol.* 2009/06/30, 516(1), pp. 1-19.
- Surzenko, N., Crowl, T., Bachleda, A., Langer, L. y Pevny, L.** (2013) SOX2 maintains

BIBLIOGRAFÍA

- the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Müller glia, *Development*, 140(7), pp. 1445-1456.
- Svahn, A. J., Graeber, M. B., Ellett, F., Lieschke, G. J., Rinkwitz, S., Bennett, M. R. y Becker, T. S.** (2013) Development of ramified microglia from early macrophages in the zebrafish optic tectum, *Developmental Neurobiology*, 73(1), pp. 60-71.
- Svaren, J. y Meijer, D.** (2008) The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells, *Glia*, 56(14), pp. 1541-1551.
- Tabuchi, K., Ohnishi, R., Furuta, T. y Nishimoto, A.** (1983) Immunohistochemical localization of S-100 protein in human cerebral and cerebellar cortices., *Experientia*, 39(3), pp. 335-7.
- Takada, N. y Appel, B.** (2010) Identification of genes expressed by zebrafish oligodendrocytes using a differential microarray screen, *Developmental Dynamics*, 239(May), pp. 2041-2047.
- Takada, N., Kucenas, S. y Appel, B.** (2010) Sox10 is necessary for oligodendrocyte survival following axon wrapping, *Glia*. 2010/03/17, 58(March), pp. 996-1006.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M. y Yamanaka, S.** (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures, *Nat Protoc*, 2(12), pp. 3081-3089.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S.** (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, 126(4), pp. 663-676.
- Tansey, F. A., Farooq, M. y Cammer, W.** (1991) Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence., *Journal of neurochemistry*, 56(1), pp. 266-72.
- Tao, C. y Zhang, X.** (2014) Development of astrocytes in the vertebrate eye., *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. NIH Public Access, 243(12), pp. 1501-10.
- Tapp, R. L.** (1973) The structure of the optic nerve of the teleost: *Eugerres plumieri*, *J Comp Neurol*. 1973/08/01, 150(3), pp. 239-252.
- Taranova, O. V., Magness, S. T., Fagan, B. M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S. R. y Pevny, L. H.** (2006) SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence, *Genes and Development*, 20(9), pp. 1187-1202.
- Tarboush, R., Chapman, G. B. y Connaughton, V. P.** (2012) Ultrastructure of the distal retina of the adult zebrafish, *Danio rerio*, *Tissue and Cell*. Elsevier Ltd, 44(4), pp. 264-279.
- Than-Trong, E. y Bally-Cuif, L.** (2015) Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system, *Glia*, 63(8), pp. 1406-1428.
- Thanos, S., Pavlidis, C., Mey, J. y Thiel, H. J.** (1992) Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells, *Exp Eye Res*. 1992/07/01, 55(1), pp. 101-117.
- Thummel, R., Kassen, S. C., Enright, J. M., Nelson, C. M., Montgomery, J. E. y Hyde, D. R.** (2008) Characterization of Müller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration, *Experimental Eye Research*. 2008/08/23. Elsevier Ltd, 87(5), pp. 433-444.
- Tian, C., Zou, S., Hu, B., A., W., RA., N. y PA., R.** (2016) Extraocular Source of Oligodendrocytes Contribute to Retinal Myelination and Optokinetic Responses in Zebrafish, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 57(4), p. 2129.
- Tiwari, S., Dharmarajan, S., Shivanna, M., Otteson, D. C. y Belecky-Adams, T. L.** (2014) Histone deacetylase expression patterns in developing murine optic nerve, *BMC Developmental Biology*, 14(1), p. 30.
- Tomassy, G. S., Berger, D. R., Chen, H.-H., Kasthuri, N., Hayworth, K. J., Vercelli, A., Seung, H. S., Lichtman, J. W. y Arlotta, P.** (2014) Distinct Profiles of Myelin Distribution Along Single Axons of Pyramidal Neurons in the Neocortex, *Science*, 344(6181), pp. 319-324.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E. y Gruss, P.** (1996) Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory, *Development*. 1996/11/01, 122(11), pp. 3381-3391.

- Touraine, R. L., Attié-Bitach, T., Manceau, E., Korsch, E., Sarda, P., Pingault, V., Encha-Razavi, F., Pelet, A., Augé, J., Nivelon-Chevallier, A., Holschneider, A. M., Munnes, M., Doerfler, W., Goossens, M., Munnich, A., Vekemans, M. y Lyonnet, S.** (2000) Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain., *American journal of human genetics*, 66(5), pp. 1496-503.
- Triviño, A., Ramirez, J. M., Salazar, J. J., Ramirez, A. I. y Garcia-Sanchez, J.** (1996) Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia, *Vision Res.* 1996/07/01, 36(14), pp. 2015-2028.
- Trost, A., Schroedl, F., Lange, S., Rivera, F. J., Tempfer, H., Korntner, S., Stolt, C. C., Wegner, M., Bogner, B., Kaser-Eichberger, A., Krefft, K., Runge, C., Aigner, L. y Reitsamer, H. A.** (2013) Neural crest origin of retinal and choroidal pericytes, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(13), pp. 7910-7921.
- Tsai, H. H. y Miller, R. H.** (2002) Glial cell migration directed by axon guidance cues, *Trends Neurosci.* 2002/05/10, 25(4), pp. 173-176.
- Turner, D. L. y Cepko, C. L.** (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development, *Nature.* 1987/07/09, 328(6126), pp. 131-136.
- Uckermann, O., Iandiev, I., Francke, M., Franze, K., Grosche, J., Wolf, S., Kohen, L., Wiedemann, P., Reichenbach, A. y Bringmann, A.** (2004) Selective Staining by Vital Dyes of Müller Glial Cells in Retinal Wholemounts, *GLIA*, 45(1), pp. 59-66.
- Udvardia, A. J., Koster, R. W. y Skene, J. H.** (2001) GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration, *Development.* 2001/03/14, 128(7), pp. 1175-1182.
- Vanegas, H. y Ito, H.** (1983) Morphological aspects of the teleostean visual system: a review, *Brain Res.* 1983/10/01, 287(2), pp. 117-137.
- Vecino, E., Velasco, A., Caminos, E. y Aijón, J.** (1997) Distribution of S100 immunoreactivity in the retina and optic nerve head of the teleost *Tinca tinca* L, *Microsc Res Tech.* 1997/01/01, 36(1), pp. 17-25.
- Velasco, A., Briñón, J. G., Caminos, E., Lara, J. M. y Aijón, J.** (1997) S-100-positive glial cells are involved in the regeneration of the visual pathway of teleosts, *Brain Res Bull.* 1997/01/01, 43(3), pp. 327-336.
- Velasco, A., Caminos, E., Vecino, E., Lara, J. M. y Aijón, J.** (1995) Microglia in normal and regenerating visual pathways of the tench (*Tinca tinca* L., 1758; Teleost): a study with tomato lectin, *Brain Res.* 1995/12/24, 705(1-2), pp. 315-324.
- Veldman, M. B., Bemben, M. A. y Goldman, D.** (2010) Tuba1a gene expression is regulated by KLF6/7 and is necessary for CNS development and regeneration in zebrafish, *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2010/02/04. Elsevier Inc., 43(4), pp. 370-383.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., Villegas-Perez, M. P., Thanos, S. y Aguayo, A. J.** (1987) Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat, *J Neurosci.* 1987/09/01, 7(9), pp. 2894-2909.
- Vorwerk, C. K., Zurakowski, D., McDermott, L. M., Mawrin, C. y Dreyer, E. B.** (2004) Effects of axonal injury on ganglion cell survival and glutamate homeostasis, *Brain Research Bulletin*, 62(6), pp. 485-490.
- Wan, J. y Goldman, D.** (2016) Retina regeneration in zebrafish, *Current Opinion in Genetics & Development.* 40, pp. 41-47.
- Wang, Y., Kudoh, J., Kubota, R., Asakawa, S., Minoshima, S. y Shimizu, N.** (1996) Chromosomal mapping of a family of human glutamine synthetase genes: functional gene (GLUL) on 1q25, pseudogene (GLULP) on 9p13, and three related genes (GLULL1, GLULL2, GLULL3) on 5q33, 11p15, and 11q24., *Genomics*, 37(2), pp. 195-9.
- Warrington, A. E., Barbarese, E. y Pfeiffer, S. E.** (1993) Differential myelinogenic capacity of specific developmental stages of the oligodendrocyte lineage upon transplantation into hypomyelinating hosts, *Journal of Neuroscience Research*, 34(1), pp. 1-13.
- Watanabe, T. y Raff, M. C.** (1988) Retinal astrocytes are immigrants from the optic

BIBLIOGRAFÍA

- nerve, *Nature*. 1988/04/28, 332(6167), pp. 834-837.
- Wegner, M.** (2008) A matter of identity: transcriptional control in oligodendrocytes, *J Mol Neurosci*. 2008/04/11, 35(1), pp. 3-12.
- Wegner, M. y Stolt, C. C.** (2005) From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development, *Trends Neurosci*. 2005/09/06, 28(11), pp. 583-588.
- Wehr, R. y Gruss, P.** (1996) Pax and vertebrate development, *Int J Dev Biol*. 1996/02/01, 40(1), pp. 369-377.
- Werner, P., Pitt, D. y Raine, C. S.** (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage., *Annals of neurology*, 50(2), pp. 169-80.
- Westerfield, M.** (2000) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 4th Edition. 4.^a ed, University of Oregon Press. 4.^a ed. Eugene, Oregon: University of Oregon Press.
- Whitney, I. E., Keeley, P. W., St. John, A. J., Kautzman, A. G., Kay, J. N. y Reese, B. E.** (2014) Sox2 Regulates Cholinergic Amacrine Cell Positioning and Dendritic Stratification in the Retina, *Journal of Neuroscience*, 34(30), pp. 10109-10121.
- Whitney, I. E., Keeley, P. W., Raven, M. A. y Reese, B. E.** (2008) Spatial patterning of cholinergic amacrine cells in the mouse retina, *The Journal of Comparative Neurology*, 508(1), pp. 1-12.
- Willott, E., Balda, M. S., Heintzelman, M., Jameson, B. y Anderson, J. M.** (1992) Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1, *Am J Physiol*. 1992/05/01, 262(5 Pt 1), pp. C1119-24.
- Wilson, M. y Koopman, P.** (2002) Matching SOX: Partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators, *Current Opinion in Genetics and Development*, pp. 441-446.
- Wißmüller, S., Kosian, T., Wolf, M., Finzsch, M. y Wegner, M.** (2006) The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors, *Nucleic Acids Research*, 34(6), pp. 1735-1744.
- Wolburg, H.** (1980) Myelinated axons of ganglion cells in the retinae of teleosts., *Cell and tissue research*, 210(3), pp. 517-520.
- Wolburg, H.** (1981a) Axonal transport, degeneration, and regeneration in the visual system of the goldfish, *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1981/01/01, 67, pp. 1-94.
- Wolburg, H.** (1981b) Myelination and remyelination in the regenerating visual system of the goldfish, *Exp Brain Res*. 1981/01/01, 43(2), pp. 199-206.
- Wolburg, H., Kastner, R. y Kurz-Isler, G.** (1983) Lack of orthogonal particle assemblies and presence of tight junctions in astrocytes of the goldfish (*Carassius auratus*). A freeze-fracture study, *Cell Tissue Res*. 1983/01/01, 234(2), pp. 389-402.
- Won, M. H., Kang, T. C. y Cho, S. S.** (2000) Glial cells in the bird retina: immunochemical detection, *Microsc Res Tech*. 2000/07/13, 50(2), pp. 151-160.
- Wong, W. T.** (2013) Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation., *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(22), p. 10.3389/fncel.2013.00022.
- Wright, P. A., Steele, S. L., Huitema, A. y Bernier, N. J.** (2007) Induction of four glutamine synthetase genes in brain of rainbow trout in response to elevated environmental ammonia, *Journal of Experimental Biology*, 210(16), pp. 2905-2911.
- Yoshida, M. y Macklin, W. B.** (2005) Oligodendrocyte development and myelination in GFP-transgenic zebrafish, *Journal of Neuroscience Research*, 81(1), pp. 1-8.
- Young, R. W. y Bok, D.** (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process, *J Cell Biol*. 1969/08/01, 42(2), pp. 392-403.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. y Thomson, J. A.** (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells., *Science (New York, NY)*, 318(5858), pp. 1917-1920.
- Yu, Y., Chen, Y., Kim, B., Wang, H., Zhao, C., He, X., Liu, L., Liu, W., Wu, L. M. N., Mao, M., Chan, J. R., Wu, J. y Lu, Q. R.** (2013) Olig2 targets chromatin remodelers to enhancers to initiate oligodendrocyte differentiation, *Cell*, 152(1-2), pp. 248-261.

- Zannino, D. a. y Appel, B.** (2009) Olig2+ Precursors Produce Abducens Motor Neurons and Oligodendrocytes in the Zebrafish Hindbrain, *Journal of Neuroscience*, 29(8), pp. 2322-2333.
- Zhang, Y., Qi, X. M., Yao, Y. M., Liu, Z. H. y Xia, C. L.** (2014) Expression pattern of transcription factor SOX2 in reprogrammed oligodendrocyte precursor cells and microglia: Implications for glial neurogenesis., *Acta neurobiologiae experimentalis*, 74(1), pp. 33-43.
- Zhao, C., Ma, D., Zawadzka, M., Fancy, S. P. J., Elis-Williams, L., Bouvier, G., Stockley, J. H., de Castro, G. M., Wang, B., Jacobs, S., Casaccia, P. y Franklin, R. J. M.** (2015) Sox2 Sustains Recruitment of Oligodendrocyte Progenitor Cells following CNS Demyelination and Primes Them for Differentiation during Remyelination, *Journal of Neuroscience*, 35(33), pp. 11482-11499.
- Zhao, S., Cui, W.-Y., Cao, J., Luo, C., Fan, L. y Li, M. D.** (2014) Impact of Maternal Nicotine Exposure on Expression of Myelin-Related Genes in Zebrafish Larvae, *Zebrafish*, 11(1), pp. 10-16.
- Zhou, Q., Choi, G. y Anderson, D. J.** (2001) The bHLH transcription factor Olig2 Promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2, *Neuron*, 31(5), pp. 791-807.
- Zou, J., Wang, Y.-X., Dou, F.-F., Lü, H.-Z., Ma, Z.-W., Lu, P.-H. y Xu, X.-M.** (2010) Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons, *Neurochemistry International*, 56(4), pp. 577-584.
- Zou, S., Tian, C., Ge, S. y Hu, B.** (2013) Neurogenesis of Retinal Ganglion Cells Is Not Essential to Visual Functional Recovery after Optic Nerve Injury in Adult Zebrafish, *PLoS ONE*, 8(2), p. e57280.
- Zupanc, G. K.** (2006) Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain, *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 2006/02/08, 192(6), pp. 649-670.
- Zupanc, M. M., Wellbrock, U. M. y Zupanc, G. K. H.** (2006) Proteome analysis identifies novel protein candidates involved in regeneration of the cerebellum of teleost fish, en *Proteomics*, pp. 677-696.