



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

Células gliales en el sistema visual de peces teleósteos

Laura DeOliveira-Mello
SALAMANCA, 2020



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**Células gliales en el sistema visual de
peces teleósteos**

TESIS DOCTORAL

Laura DeOliveira-Mello

Salamanca, 2020



**INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Departamento de Biología Celular y Patología

Instituto de Neurociencias de Castilla y León

Laboratorio 10

Células gliales en el sistema visual de peces teleósteos

**Memoria presentada por Laura de Oliveira Mello
para optar al título de Doctor con mención
Internacional por la Universidad de Salamanca**

Directores:

Profa. Dra. M^a Rosario Arévalo Arévalo

Prof. Dr. Juan M. Lara Pradas



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN
Laboratorio 10 Instituto de Neurociencias de Castilla y León
C/ Pintor Fernando Delgado, 1 37007 Salamanca (España/Spain)
Tel: +34 923 294500 ext. 5322 y 5323

Salamanca, el 08 de octubre de 2020

Juan Manuel Lara Pradas y María Rosario Arévalo Arévalo, Catedráticos de la
Universidad de Salamanca

HACEN CONSTAR:

QUE la Tesis Doctoral titulada “Células gliales en el sistema visual de peces teleósteos”, ha sido realizada por la graduada en Biología D^a Laura de Oliveira Mello en el departamento de Biología Celular y Patología y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

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

QUE reúne todos los requisitos científicos y formales, por lo que autorizamos la defensa de la Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor con mención Internacional por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca a ocho de octubre de dos mil veinte.

El director

Fdo: Juan M. Lara Pradas

La directora

Fdo: M^a Rosario Arévalo Arévalo

A todas las versiones de mi misma

Todo el mundo quiere ser apreciado, así que, si aprecias a alguien, no conviertas eso en un secreto.

Mary Kay Ash

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al “Jefe Jeffísimo”, el Prof. Dr. José Aijón Noguera (que probablemente no sepa que le llamo así) por haber participado en mi formación e inicios en la investigación: muchas gracias por aceptarme y orientarme en mis trabajos de TFG y TFM. Pero, sobre todo, muchas gracias por haber despertado la científica que creo que llevo dentro. Agradezco que me haya enseñado que siempre se puede mejorar, pero que no tenemos por qué sufrir en el proceso.

También doy las gracias a mi “Jefe” y a mi “Jefa”, Dr. Juan Lara y Dra. Rosario Arévalo, por toda la dedicación a mi formación. Gracias a Juan por dejar que vuele mi mente, por las cervezas, y por siempre emocionarse con las pequeñas cosas de la Ciencia. Gracias a Rosario por ponerme los pies en el suelo; me ha enseñado a ser mucho más objetiva y resolutiva. Gracias a los dos, por hacer fácil el trabajo con vosotros.

Agradezco a todos mis compañeros del Departamento de Biología Celular y Patología. A la Dra. Conchi Lillo por inspirarme desde el Grado y estar siempre disponible cuando la he necesitado. A la Dra. Almudena Velasco, por preocuparse por mi trabajo y por mí, por los momentos compartidos y por hacer el ambiente más alegre. Gracias a Maite Sánchez, por el tiempo dedicado a mi formación con energía y paciencia. A Carmen Payán por estar siempre disponible. A todos los investigadores en formación, con especial cariño a los TFGs y TFMs que han estado conmigo, por la energía que han traído al Lab.10, y por enseñarme a tener paciencia.

A los ex-Lab.13, actuales Lab.3. Gracias Dra. Verónica González-Núñez (Vero) por todas las charlas, por la paciencia y por haber compartido los momentos de “crisis” con los peces. Agradezco al Dr. Andrés Calderón, por escucharme y apoyarme en todo lo que ha podido, por encargarse de los peces siempre que hemos necesitado y hacer fácil coordinarse con las tareas. Gracias por la persona agradable y responsable que eres, y por haber sido “mi compi de Tesis” (o lo más parecido a ello). Muchas gracias también a María Pérez y a Lucía Moreno, porque sin ellas nos faltarían manos.

También me gustaría agradecer por la colaboración en este trabajo al Dr. Fernando Sánchez Juanes, de la Unidad de Proteómica de la USAL, y a Paloma Bárcena Carrasco, del Servicio de Citometría de flujo de la USAL.

I really would like to thank Dr. Andreas Mack for having me in his Lab. Thanks for all the meetings and discussions we had and all the help I have received: thanks for all you teach me, especially about microscopy. Thanks for making me believe in myself as scientist, for always listening my ideas and reminding me that make it better is possible. Also, thanks for the patience of your family with our working-addict side.

Ich bedanke mich herzlich für die Unterstützung von Seiten des Anatomischen Instituts Tübingen. Especially thanks to Ulrich Mattheus for teaching, supporting, and helping me (and thanks also for the best fondue that I have never eaten). Thanks to Leokadia Macher, we have been able to work together understanding each other without even talking. Muchas gracias a Lidia García-Pradas por la persona que es y por ser fiel a ello: gracias por ser mi amiga, por todos los momentos que hemos compartido y por siempre recibirme como a una familiar cada vez que he estado en Alemania.

A mi familia de “este lado del charco”, gracias a Saúl, a la Dra. Isabel Vicente Muñoz, a Celia, a Alejandro, a Griselda y a Jorge. Muchas gracias a Saúl, por su capacidad de alcanzar

los objetivos que se propone con integridad e inteligencia: eres una inspiración en mi vida. Gracias Isa por el ser ella, sin poner ni quitar, por haber estado ahí y por haberlo vivido conmigo. Gracias a Ce y Delgado, por todas las charlas, cervezas y consejos. Mi agradecimiento a Gri, porque, incluso de lejos, siempre ha estado. Gracias a todos vosotros, por acogerme en vuestras familias, hacerme sentir amada y por el orgullo que me produce poder llamaros amigos. Muchas gracias a Vega por acogerme en su casa y hacerme sentir muy cómoda y querida. Y muchísimas gracias a Jorge, porque, incluso habiéndome conocido en mi peor versión, ha podido ver mi lado bonito: gracias por estar a mi lado, escucharme, apoyarme y hacer de todo para entenderme. Gracias por la persona que eres, y por dejarme compartirlo contigo. Pero, principalmente, gracias por hacerme mejor persona y elegir “evoluir” a mi lado. Os quiero.

A mi familia “del otro lado del charco”, gracias a mis padres y sus parejas, Verinha y Rubinho, a mis hermanas y hermano, a mis abuelas y a toda mi familia, porque son un nido seguro al que volver siempre.

Obrigada à minha mãe, Silvia, e ao meu pai, Chico, por tudo. Agradeço a vocês dois tudo o que construí, tive e tenho na vida: graças a vocês sou a pessoa que sou e tive a possibilidade de chegar até aqui. Obrigada por vocês sempre terem confiado em mim e por não terem deixado eu desistir. Obrigada pela paciência e constância, sempre com muito amor, carinho e respeito, e obrigada por terem sido um exemplo de pessoas.

Obrigada às minhas irmãs, Letícia, Flávia, Giovanna, Camila e ao meu irmão Fábio. Obrigada Letícia pelo exemplo de mulher, profissional, amiga, filha, mãe e companheira que sempre representou na minha vida: obrigada por sempre ter se preocupado e cuidado de mim, por ter me ajudado (e seguir ajudando) a ser melhor pessoa. Obrigada também ao Ramyrez, por estar do lado dela (e à altura) e muito obrigada aos dois pelo Inácio [e obrigada ao Inácio, que fez a última (e pior) etapa do trabalho mais leve: amo vocês e amo a família de vocês]. Obrigada Flávia por ser minha irmã, por essa amizade tão presente mesmo tão longe: você me inspira, te amo. Obrigada “aos pequenos”: amo muito vocês.

Por último, obrigada às minhas avós Vera e Maria Amélia, e de novo à minha mãe, porque foram as primeiras mulheres a me inspirar e demonstrar que eu poderia fazer da minha vida o que eu quisese dela.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Programa de Ayudas al Estudio del Servicio de Relaciones Internacionales de la Universidad de Salamanca co-financiadas por el Banco Santander.

***NOTA:** Los apartados en el índice y las citas en el texto contienen hipervínculos internos (dentro del documento PDF). Los vídeos y las referencias en la bibliografía contienen hipervínculos externos.

***NOTE:** The table of contents, text citations and figures legends contain hyperlinks within the PDF. The videos and references contain external hyperlinks.

Índice

Agradecimientos	XI
Abreviaturas	XIX
1. Introducción	3
1.1. Peces como modelo de experimentación animal	3
1.2. Sistema visual	5
1.2.1. Retina	6
1.2.2. Nervio óptico	12
1.3. Células gliales	15
1.3.1. Astrocitos	16
1.3.2. Oligodendrocitos	17
1.3.3. Microglía	19
1.4. Precursores gliales	20
1.5. Regeneración del sistema visual	21
1.5.1. Regeneración de la retina	22
1.5.2. Regeneración del nervio óptico	23
1.6. Proteínas implicadas	25
1.6.1. Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)	25
1.6.2. Proteínas de la familia Sox (Sox2 y Sox10)	26
1.6.3. Marcadores axonales (Zn8, DCX y CR)	28
1.7. Terapia Celular	29
2. Justificación y Objetivos	33
3. Materiales y Métodos	37
3.1. Animales de experimentación	37
3.2. Cultivo Celular	39
3.2.1. Medio de cultivo modificado	43
3.2.2. Ampliación de los cultivos celulares por resiembra	43
3.2.3. Análisis de la proteómica de los medios de los cultivos celulares	43
3.3. Aclaramiento tisular	45
3.3.1. Técnica iDisco	46
3.3.2. Técnica PACT	46
3.4. Inmunohistoquímica (IHQ)	47
3.4.1. IHQ sobre secciones	47

3.4.2.	IHQ de retinas <i>in toto</i>	48
3.4.3.	IHQ en células obtenidas por cultivo celular	49
3.4.4.	IHQ de tejidos aclarados.....	50
3.5.	Citometría de Flujo.....	52
3.6.	Microscopía y análisis de imagen.....	53
3.7.	Análisis Estadísticos	53
4.	Resultados.....	57
4.1.	Aislamiento y caracterización de células gliales provenientes del nervio óptico de peces adultos.....	57
4.2.	Proteómica del medio de cultivo modificado.....	64
4.3.	Células Sox2 positivas procedentes de cultivos celulares de NO.....	65
4.4.	Análisis por citometría de flujo de células gliales de NO.....	66
4.5.	Caracterización de células gliales Sox2 positivas	68
4.5.1.	Células Sox2 positivas en la retina.....	68
4.5.2.	Células Sox2 positivas en la CNO	78
4.5.3.	Células Sox2 positivas en el NO.....	81
4.5.4.	Cuantificación de las células Sox2 positivas en los componentes pre-encefálicos del sistema visual de <i>A. burtoni</i>	85
4.6.	Aclaramiento del tejido	86
4.7.	Retinas <i>in toto</i>	88
5.	Discusión	93
5.1.	Disposición de células Sox2 positivas en el sistema visual de peces teleósteos: una visión general.....	93
5.2.	Células Sox2 positivas: células troncales, neuronas y gliales	95
5.2.1.	Células proliferativas Sox2 positivas	95
5.2.2.	Células gliales Sox2 positivas.....	97
5.2.3.	Células neuronales Sox2 positivas.....	98
5.3.	Papel de la proteína Sox2 en el sistema visual de peces.....	100
5.4.	Participación de las células gliales del NO en procesos de modulación de la neurogénesis: crecimiento continuo y regeneración	104
5.5.	Estudio <i>in vitro</i> de células gliales del NO	106
5.6.	Estudio comparativo de las células gliales de los componentes pre-encefálicos del sistema visual en tres especies de peces teleósteos	110
6.	Conclusiones.....	117
7.	Introduction summary	121
7.1.	Fish as experimental model	121
7.2.	Visual System.....	122
7.2.1.	Retina	122

7.2.2.	Optic nerve	125
7.3.	Glial cells.....	126
7.3.1.	Astrocytes	126
7.3.2.	Oligodendrocytes	127
7.3.3.	Microglia.....	128
7.4.	Glial precursors.....	128
7.5.	Regeneration of the fish visual system	129
7.5.1.	Retina regeneration	129
7.5.2.	ON regeneration	130
7.6.	Proteins involved in growth and regeneration of the CNS of adult vertebrates.....	131
7.6.1.	Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP)	131
7.6.2.	Sox proteins (Sox2 and Sox10).....	131
7.6.3.	Axons markers (Zn8, DCX and CR).....	132
7.7.	Cell Therapy.....	133
8.	Hypothesis and Objectives	134
9.	Materials and Methods	135
9.1.	Animals.....	135
9.2.	Cell Culture Protocol.....	136
9.2.1.	Conditioned cell culture medium.....	137
9.2.2.	Proteomic analysis	138
9.3.	Clearing tissue.....	139
9.3.1.	iDisco	139
9.3.2.	PACT.....	139
9.4.	Immunohistochemistry (IHQ).....	140
9.4.1.	IHQ in the histological sections.....	140
9.4.2.	IHQ in retinas <i>in toto</i>	141
9.4.3.	IHQ in cells <i>in vitro</i>	141
9.4.4.	IHQ of the cleared tissues.....	142
9.5.	Flow cytometry	144
9.6.	Image analyses.....	144
9.7.	Statistical Analyses.....	144
10.	Results	146
10.1.	Isolation and characterization of fish ON glial cells	146
10.2.	Proteomic analysis of conditioned medium	147
10.3.	Sox2 positive cells in fish ON cell cultures.....	148
10.4.	Flow cytometry analysis.....	148

10.5. Characterization of Sox2 positive glial cells	149
10.5.1. Sox2 positive cells in the retina	149
10.5.2. Sox2 positive cells in the ONH	151
10.5.3. Sox2 cells in the ON.....	152
10.5.4. Quantification of Sox2 positive cells	153
10.6. Cleared tissue	154
10.7. <i>In toto</i> retinas	154
11. Discussion	156
11.1. Sox2 expression in the visual system of fish teleost: a general view	156
11.2. Sox2 positive cells: stem cells, glial cells and neurons.....	157
11.2.1. Sox2 in proliferative cells.....	157
11.2.2. Sox2 in glial cells	159
11.2.3. Sox2 in neurons	160
11.3. Role of Sox2 in the fish visual system.....	161
11.4. Role of ON glial cells in the modulation of neurogenesis during continuous growth and regeneration	164
11.5. <i>In vitro</i> studies of glial cells from ON	165
11.6. Comparative analysis of glial cells of the pre-encephalic visual system in three species of teleost fish	167
12. Conclusions	171
13. Bibliografía/Bibliography.....	175

Abreviaturas

- **2DE:** Electroforesis Bidimensional
- **ACN:** Acetonitrilo
- **CCG:** Capa de Células Ganglionares
- **CFNO:** Capa de Fibras del Nervio Óptico
- **CGR:** Células Ganglionares de la Retina
- **ChaT:** Acetil Colina Transferasa
- **CNE:** Capa Nuclear Externa
- **CNI:** Capa Nuclear Interna
- **CNO:** Cabeza del Nervio Óptico
- **CNO:** Cabeza del Nervio Óptico
- **CPE:** Capa Plexiforme Externa
- **CPI:** Capa Plexiforme Interna
- **CR:** Calretinina
- **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- **DCX:** Doublecortina
- **DK:** asno (del inglés *Donkey*)
- **DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- **DMSO:** Dilmethylsulfóxido
- **Dpf:** Días post fecundación
- **EP:** Epitelio Pigmentario
- **FBS:** Suero Fetal Bovino (del inglés *Fetal Bovine Serum*)
- **GFAP:** Proteína Ácida Fibrilar Glial (del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*)
- **GS:** Glutamina Sintetasa
- **IBSAL:** Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca
- **IHQ:** Inmunohistoquímica
- **INCyL:** Instituto de Neurociencias de Castilla y León
- **L15:** Medio de Leibovitz's
- **MLE:** Membrana Limitante Externa
- **MLI:** Membrana Limitante Interna
- **NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés *National Center for Biotechnology Information*)
- **NO:** Nervio Óptico
- **OCT:** Medio de inclusión para criostato (del inglés *Optimal cutting temperature compound*)
- **OPC:** Células Progenitoras de Oligodendrocitos (del inglés *Oligodendrocyte Precursor Cells*)
- **PBS:** Tampón Fosfato Salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)
- **PBSsup:** PBS suplementado con antibióticos y antimicótico
- **PBST:** PBS con Tritón X
- **PCNA:** Antígeno Nuclear de Células Proliferativas (del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*)
- **PV:** Parvalbúmina
- **RPM:** Revoluciones por Minuto
- **SEA:** Servicio de Experimentación Animal
- **SF:** Segmentos de Fotorreceptores
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **Solución "HM":** Solución de hidro monómeros (del inglés *hydro monomer*)
- **TFA:** Ácido Trifluoroacético
- **USAL:** Universidad de Salamanca
- **Zn8:** Neurolina
- **ZPG:** Zona Periférica Germinal
- **ZT:** Zona de Transición



Introducción



*Reconocer nuestra propia invisibilidad significa
encontrar el camino hacia la visibilidad.*

Mitsuye Yamada

1. Introducción

Esta Tesis Doctoral se ocupa del estudio de las células gliales del sistema visual de peces teleósteos. Mediante diferentes técnicas experimentales se ha investigado aspectos de la Biología de dichas células, así como su participación en procesos de crecimiento axonal y regeneración en animales adultos.

1.1. Peces como modelo de experimentación animal

Los peces son animales vertebrados acuáticos que presentan diversas propiedades que les hacen interesantes para su estudio. En el ámbito de la Neurociencia, además de los estudios sobre desarrollo embrionario y diferenciación celular, estos animales son buenos modelos para comprender diferentes procesos biológicos. Con relación al presente trabajo, la principal característica de interés es la amplia plasticidad celular que presentan en edades adultas.

La gran mayoría de los peces teleósteos presentan crecimiento continuo y capacidad de regeneración del sistema nervioso central (SNC) durante toda la vida del animal (Bejarano-Escobar et al., 2013; Parrilla et al., 2009; Fernald, 1991; Mack y Fernald, 1991; Stuermer, 1988), incluyendo el sistema visual (Fig. 1). Ello implica la constante generación de células neurales (neuronas y glía), ya sea por el crecimiento tisular o para reemplazar las zonas dañadas, para que el sistema mantenga su funcionalidad.

Debido a que los mamíferos tienen una capacidad de neurogénesis y/o reparación neuronal muy reducida, los peces son un modelo de experimentación ideal para entender la neurogénesis en vertebrados adultos (Sîrbulescu et al., 2015; Gemberling et al., 2013; Fadool y Dowling, 2008; Hitchcock et al., 1992), y podría ser la clave para tratar las lesiones del sistema nervioso. Por ello, se han postulado como un modelo adecuado para la investigación

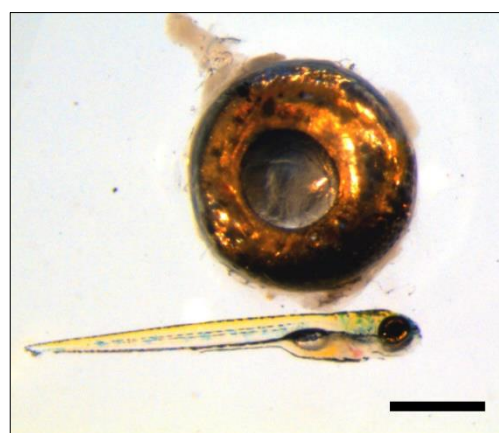


Figura 1: Comparación del tamaño de un ojo de un pez cebra adulto (6 meses) con el tamaño corporal completo de un individuo juvenil (10dpf) de la misma especie. Barra de escala: 2 mm.

científica y para el diseño de terapias celulares (Almasieh y Levin, 2017; Lieschke y Currie, 2007).

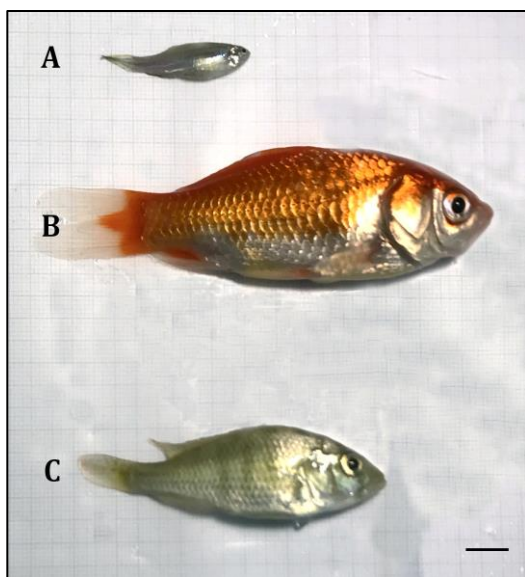


Figura 2: Especies de peces teleósteos utilizadas en este trabajo de investigación. A: *Danio rerio* o pez cebra; B: *Carassius auratus* o carpín dorado; C: *Astatotilapia burtoni* o ciclido. Barra de escala: 1 cm.

Por lo anterior, se ha optado por trabajar con tres especies de peces teleósteos, cada una con una ventaja específica para la investigación: *Danio rerio* (pez cebra), *Carassius auratus* (carpín dorado) y *Astatotilapia burtoni* (también conocido como *Haplochromis burtoni*) (Fig. 2).

El pez cebra es la especie de pez más comúnmente utilizada en investigación científica actual (Hitchcock et al., 2004; Bilotta y Saszik, 2001; Wixon, 2000; Stuermer, 1988). Ello se debe a sus características de fácil mantenimiento,

reducido tamaño, estrategia de fecundación externa y los huevos y alevines transparentes que posibilitan ver el desarrollo embrionario directamente. Además, el genoma de *D. rerio* está secuenciado por completo y publicado en diferentes bases de datos online de libre acceso (por ejemplo, en zfin.org). Por ello, son notables las herramientas e información genética disponibles con importante valor para la investigación (Harper y Lawrence, 2011; Perry et al., 2010; Bilotta y Saszik, 2001; Wixon, 2000).

Además, en nuestro laboratorio disponemos de diferentes líneas de peces cebra transgénicos (ver 3.1; Tabla 1), con proteínas fluorescentes asociadas a genes específicos de células gliales presentes en el SNC y en el sistema visual. La disponibilidad de animales transgénicos supone una ventaja para la identificación y caracterización celular. A diferencia de los animales de tipo silvestre, es posible detectar las células de interés mediante la utilización de microscopios de fluorescencia.

Los carpines dorados son animales que se pueden encontrar en tiendas de mascotas, para peceras domésticas. También se utilizan ampliamente como

modelo animal de experimentación en Neurociencias. Diferentes trabajos han descrito y caracterizado aspectos esenciales del sistema visual de esta especie (Parrilla et al., 2009; Hitchcock et al., 2004; Bastmeyer et al., 1993).

C. auratus también es una especie de pez teleósteo que presenta capacidad de crecimiento continuo y regeneración en edades adultas (Parrilla et al., 2016; Bastmeyer et al., 1989; Levine, 1989). Presenta un tamaño corporal y de los componentes del sistema visual superior al pez cebra. A efectos de este trabajo ha supuesto una ventaja para la realización de ciertos experimentos.

Tanto el pez cebra como el carpín dorado pertenecen a la misma familia en la filogenia; Clase *Actinopterygii*, Orden *Cypriniformes* de la Familia *Cyprinidae*. Aunque *A. burtoni* también pertenece a la Clase *Actinopterygii*, está filogenéticamente distante de las especies anteriores; Orden *Perciformes* de la Familia *Cichlidae*. Nuestro grupo de investigación tiene amplia experiencia en estudios sobre el sistema visual de las dos primeras especies, los ciprínidos. La colaboración con el grupo del Dr. Mack, de la Universidad de Tübingen (Alemania), nos ha permitido realizar estudios en la especie de pez cíclido (Mack y Tiedemann, 2013; Mack, 2007).

Como característica relevante para este estudio, los *A. burtoni* presentan un tamaño mayor en comparación a los peces cebra, y consecuentemente un incremento sustancialmente más significativo de los tejidos nerviosos. Además, ha sido más susceptible a una serie de técnicas aplicadas en comparación a los ciprínidos. En otros tipos de investigación, dicha especie ha presentado especial interés debido a sus comportamientos territoriales y de apareamiento (Juntti et al., 2016; Fernald y Maruska, 2012; Desjardins et al., 2010).

1.2. Sistema visual

El sistema visual de los vertebrados está constituido por la retina, el nervio óptico (NO) y los centros encefálicos visuales (Fig. 3). Por su origen en el desarrollo, y las células que lo componen, es parte del SNC (Butler y Hodos, 2005). El sistema visual es responsable de la visión. Este proceso comienza por la captación de los estímulos luminosos por células especializadas de la retina.

Mediante conexiones sinápticas, y a través del NO, se envía la información visual para ser procesada en los centros encefálicos correspondientes.

La gran mayoría de los peces teleósteos, y por supuesto las tres especies utilizadas en este estudio, presentan capacidad de crecimiento continuo y regeneración del SNC y consecuentemente del sistema visual (Parrilla et al., 2013; Mack et al., 2003; Marcus et al., 1999). Ambos procesos implican la generación de nuevas neuronas, así como la participación de células gliales para nutrir, guiar, mielinizar y dar soporte a los axones residentes y de nueva generación (März et al., 2010; Parrilla et al., 2009; Mack, 2007; Raymond et al., 2006; Zupanc y Zupanc, 2006).

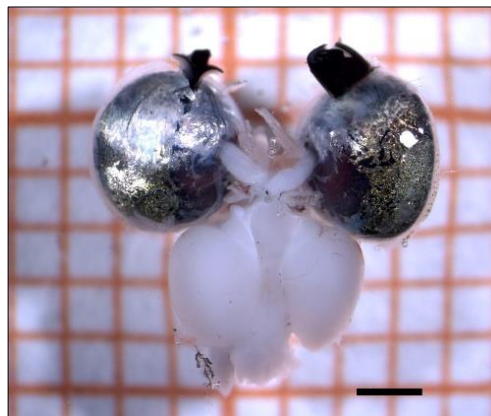


Figura 3: Componentes del sistema visual, ojos, nervios ópticos y encéfalo, extraídos de un *A. burtoni* adulto (3 cm de longitud corporal estándar). Barra de escala: 2 mm

La investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral se ha centrado en los componentes gliales de la porción pre-encefálica del sistema visual; retina, cabeza del nervio óptico (CNO) y NO.

1.2.1. Retina

La retina es la capa más interna del globo ocular y se origina desde una evaginación del prosencéfalo durante el desarrollo embrionario. Debido a su fácil acceso y la gran conservación evolutiva de su estructura entre los vertebrados, la retina es una parte del SNC que lleva muchos años despertando interés de estudio (Bollaerts et al., 2017; Crair y Mason, 2016; Easter y Nicola, 1996; Ramón y Cajal, 1893). La fototransducción es el proceso por el que los fotorreceptores de la retina convierten la energía luminosa en señal eléctrica o información visual, viable para su procesamiento en el encéfalo. Este proceso se genera en los fotorreceptores, sigue una vía vertical de transmisión pasando finalmente a las células ganglionares, que envían sus axones al encéfalo (Wässle y Boycott, 1991).

No obstante, antes de enviar la información visual a centros superiores, esta sufre modulaciones por parte de varios tipos de interneuronas, que constituyen la

vía horizontal (Petrulia et al., 2018; Kolb y Marshak, 2003; Kolb et al., 2002), y por parte de las células gliales de la retina. Por ello, las células gliales de la retina son un componente importante para la fototransducción y, consecuentemente, para la visión (Reichenbach et al., 2010; Bringmann et al., 2006; Metea y Newman, 2006; Gadea y López-Colomé, 2001).

La estructura de la retina es muy similar en todos los vertebrados. Presenta una organización laminar bien organizada en la que alternan capas nucleares y capas de neuropilo (Fig. 4). Los somas neuronales se localizan en las capas nucleares mientras que sus prolongaciones, y las conexiones que establecen, constituyen las capas plexiformes o de neuropilo. De la porción más escleral a la más vitreal, se distinguen las siguientes capas (Fig. 4) (Hoon et al., 2014; Tarboush et al., 2012; Wässle y Boycott, 1991):

- Epitelio Pigmentario (EP)
- Segmento de fotorreceptores (SF)
- Membrana limitante externa (MLE)
- Capa nuclear externa (CNE)
- Capa plexiforme externa (CPE)
- Capa nuclear interna (CNI)
- Capa plexiforme interna (CPI)
- Capa de células ganglionares (CCG)
- Capa de fibras del nervio óptico (CFNO)
- Membrana limitante interna (MLI)

1.2.1.1. Células neuronales

Desde el EP hasta la MLI la retina está compuesta por diferentes tipos celulares, que se describen a continuación (Fig. 4):

- Fotorreceptores:

Células neuronales especializadas sensibles a la energía lumínica. Se distinguen dos tipos, los conos y los bastones, distintos en morfología y función (Masland, 2012; Peters et al., 1991). Ambos tipos celulares, presentan un soma, un segmento externo y otro interno.

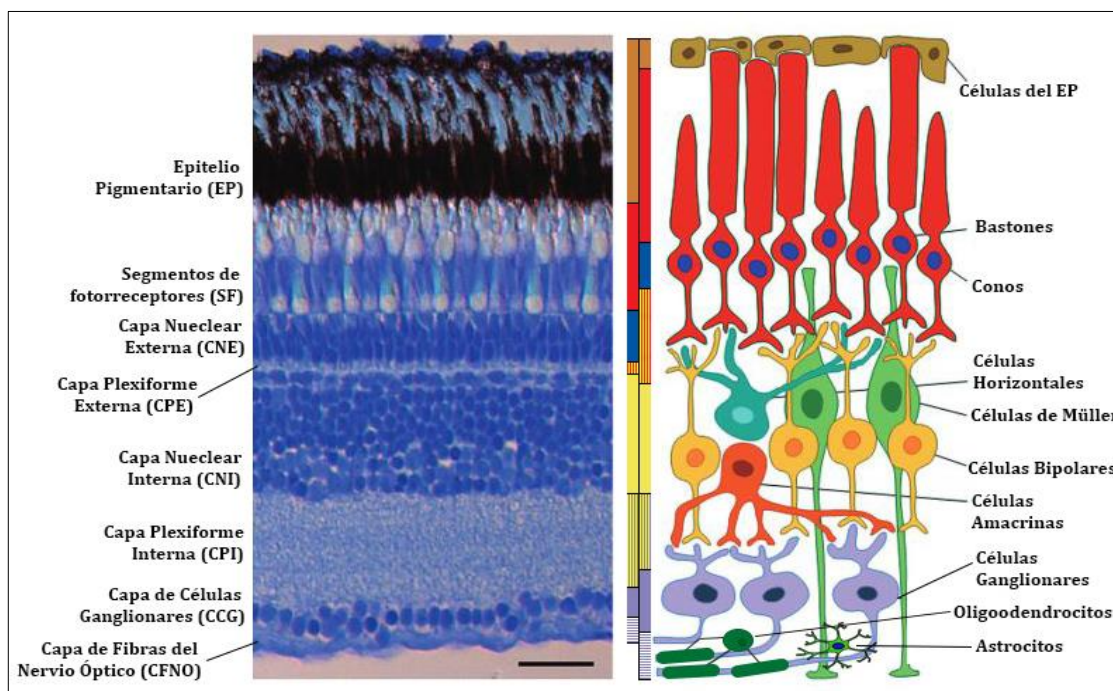


Figura 4: Esquema de la retina de peces teleósteos. A la izquierda, una imagen de microscopía óptica de una sección de retina en la que se distinguen las diferentes capas que la componen. A la derecha, un diagrama de las células que componen las distintas capas de la retina, y al centro, una barra de colores que indica la correspondencia entre las dos imágenes. Imagen modificada de *Gramage et al., 2014*. Barra de escala: 25 μm .

Los bastones son células cilíndricas, el segmento externo está formado por una aglomeración de discos membranosos apilados que a su vez están rodeados por una membrana celular. Los bastones son responsables de la visión escotópica o percepción visual en condiciones de baja de luminosidad. La fototransducción en estas células se desencadena por la rodopsina, un pigmento fotosensible. Los conos son células cónicas de menor tamaño, el segmento externo está formado por muchos repliegues de la propia membrana plasmática. Estas células son responsables de la visión en color que se desencadena por moléculas fotosensibles conocidas como opsinas (Masland, 2012; Bejarano-Escobar et al., 2009; Hagedorn y Fernald, 1992).

- Células horizontales:

Neuronas de gran tamaño que realizan sinapsis con las células bipolares, con fotorreceptores y con células interplexiformes. El cuerpo celular se sitúa horizontalmente en la parte más externa de la CNI (Parthe, 1982). Su función es modular la información transmitida desde los fotorreceptores hacia las células bipolares (Stell et al., 1982).

- Células bipolares:

Tipo neuronal que se sitúa en la zona intermedia de la CNI. Las células bipolares tienen una dendrita y un axón. La dendrita realiza sinapsis con fotorreceptores y con células horizontales interplexiformes en la CPE. El axón conecta en la CPI con las células ganglionares, amacrinas e interplexiformes (Camino et al., 2000, 1999).

- Células amacrinas:

Los somas de las células amacrinas se localizan en la parte más vitreal de la CNI y en la CCG (en este caso se denominan células amacrinas desplazadas). Las prolongaciones de las células amacrinas se extienden en la CPI y contactan con células bipolares y amacrinas, no realizan sinapsis directas con los fotorreceptores (Yan et al., 2020; Masland, 2012). Además, establecen conexiones con células ganglionares (Masland, 2012).

- Células Ganglionares:

Neuronas con el cuerpo celular localizado en la CCG, con el axón mielinizado, cuya función es transmitir la información visual recibida hasta el techo óptico (Xiang et al., 1996). Las células ganglionares conectan a través de sus dendritas con las células bipolares y amacrinas en la CPI (Sanes y Masland, 2015). La información es transmitida hasta el encéfalo a través de los axones dispuestos en la CFNO y el NO.

1.2.1.2. Células macrogliales

- Astrocitos:

Los astrocitos son un tipo de células gliales presentes en el SNC de vertebrados (Verkhratsky y Nedergaard, 2018), incluyendo los componentes pre-encefálicos del sistema visual (retina, CNO y NO). En la retina se encuentran dos subtipos: los astrocitos radiales o células de Müller y los astrocitos fibrosos (Kimelberg, 2010, 2004; Nagelhus et al., 1998).

Las células de Müller son células gliales especializadas y el tipo glial más abundante de la retina. Se ubican en la zona central de la CNI (Fig. 4) y, en el desarrollo, sirven de guía para que los precursores neurales se ubiquen

adecuadamente en las diferentes capas (Goldman, 2014). Presentan somas poligonales y alargados, así como sus núcleos. Las prolongaciones de las células de Müller acompañan los cuerpos celulares y las prolongaciones de las neuronas de las dos capas plexiformes de la retina (Bringmann et al., 2006; Marc y Cameron, 2001; Newman y Reichenbach, 1996).

Además, constituyen el principal reservorio de glucógeno de la retina que está directamente implicado en el metabolismo energético de las neuronas. Entre sus funciones están, por ejemplo, la regulación de la homeostasis, el control del microambiente neural y la participación en la formación de la barrera hematorretiniana (Reichenbach y Bringmann, 2013; Bringmann et al., 2006; Newman y Reichenbach, 1996).

Por otra parte, las células de Müller conservan cierta plasticidad que está íntimamente relacionada con los procesos de crecimiento y regeneración de vertebrados adultos (Lust y Wittbrodt, 2018; Ghosh y Hui, 2016; Thomas et al., 2016; Fischer y Bongini, 2010; Fischer y Reh, 2001). Los astrocitos fibrosos se ubican a lo largo de toda la CFNO de la retina (Fig. 4) (Kimmelberg, 2010; Nagelhus et al., 1998; Bastmeyer et al., 1989). Tienen morfología estrellada y presenta alta movilidad y plasticidad.

Las principales funciones de los astrocitos en la CFNO son servir de soporte y nutrir los axones de las CGR (Kimmelberg, 2010; Nagelhus et al., 1998; Bastmeyer et al., 1989; Büssow, 1980). Además, en la retina avascular de teleósteos, participan en la organización de los axones en la CNO y en los procesos de crecimiento, degeneración y regeneración (García-Pradas et al., 2018; Lyons y Talbot, 2015; Raymond et al., 2006; Lillo et al., 2001). Algunos estudios han descrito que los astrocitos participan en la fagocitosis de los restos de mielina (Parrilla et al., 2013, 2012; Colavincenzo y Levine, 2000). Se considera que los astrocitos de la retina provienen de precursores que migran desde el NO hacia la retina.

- Oligodendrocitos:

Los oligodendrocitos son un tipo de células gliales descritas por primera vez por Río-Hortega, realizando una modificación de la técnica de tinción de Golgi en 1921 (del Río-Hortega, 1928, 1921). Estas células están presentes en todo el SNC y

presentan gran variabilidad morfológica respecto a su orientación y a la ramificación de sus prolongaciones (Armati y Mathey, 2010; Mathey et al., 2010).

En el sistema visual están presentes en todos los componentes pre-encefálicos: retina, CNO y NO. En general, presentan un soma pequeño y redondeado (u oval) del que derivan sus largas prolongaciones que se ramifican posteriormente. A diferencia de los astrocitos, no poseen paquetes prominentes de filamentos intermedios ni en el soma, ni en sus prolongaciones celulares.

Dentro de la retina, los oligodendrocitos se encuentran mayoritariamente en la CFNO (Fig. 4) en la que su función principal es mielinizar los axones de las CGR que discurren por dicha capa (García-Pradas et al., 2018; León-Lobera, 2017; Armati y Mathey, 2010). Además, los oligodendrocitos están implicados en funciones metabólicas. A partir de la glucosa, por glucólisis, pueden generar lactato que es aportado como sustrato energético a los axones que están mielinizando (Lillo et al., 2002). Aunque en mamíferos este tipo celular glial sólo está presente en el NO, y no en la retina, en peces teleósteos se encuentran abundantes oligodendrocitos en todo el sistema visual, desde la retina hasta el techo óptico.

1.2.1.3. Crecimiento continuo

En los peces teleósteos, el crecimiento continuo de la retina ocurre principalmente gracias a la preservación de una zona denominada zona periférica germinal (ZPG) (Fig. 5). Esta parte de la retina ha sido descrita por Müller, en 1952,

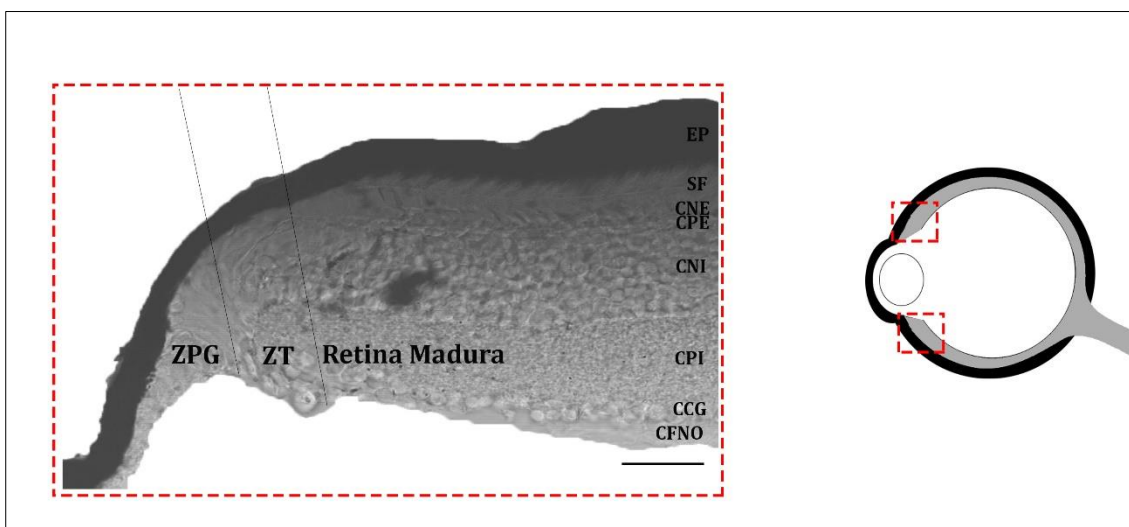


Figura 5: Esquema de la zona de crecimiento de la retina de peces teleósteos adultos. A la izquierda, micrografía de una retina de *A. burtoni* adulto. A la derecha, un diagrama del ojo que ilustra a las zonas representadas en la micrografía. En la micrografía, de una sección de 14 µm, además de las capas de la retina se distinguen las diferentes zonas de crecimiento, desde la periferia hacia la retina central: zona periférica germinal (ZPG), zona de transición (ZT) y retina madura. Barra de escala: 20 µm.

como un anillo de células dispuestas al margen del tejido. En la ZPG se generan todos los tipos neuronales de la retina (a excepción de los bastones) y las células de Müller (Ito et al., 2010; Olson et al., 1999).

Una vez generadas las nuevas células en la ZPG, estas se diferencian adecuadamente en la zona de transición (ZT). Las células diferenciadas se sitúan en la conocida como retina madura, formando las capas descritas anteriormente. Las CGR recién formadas se van instalando en la CCG y envían sus axones por la CFNO, que discurren en paralelo y se van añadiendo al NO hasta alcanzar el encéfalo (García-Pradas et al., 2018; Velasco et al., 2000; Weruaga et al., 2000).

Además de la ZPG, en la retina madura de los peces, se pueden encontrar otras dos poblaciones proliferativas: los precursores de bastones en la CNE, y células con capacidad proliferativa en la CNI (Song et al., 2017; Sánchez-Farías y Candal, 2015; Velasco et al., 2001; Kwan et al., 1996). Los denominados precursores de bastones son células unipotentes cuya función es generar exclusivamente bastones a medida que la retina se va expandiendo. Los progenitores que se encuentran en la CNI son células multipotentes, y su función parece que está relacionada con la generación de precursores de bastones (Song et al., 2017; Kwan et al., 1996; Hagedorn y Fernald, 1992).

Las células gliales de los componentes pre-encefálicos del sistema visual también presentan cierta capacidad proliferativa. Además, se han publicado diversos trabajos sobre la capacidad proliferativa de las células de Müller, aunque en condiciones normales de edades post-natales no suelen dividirse (Gorsuch et al., 2017; Craig et al., 2010).

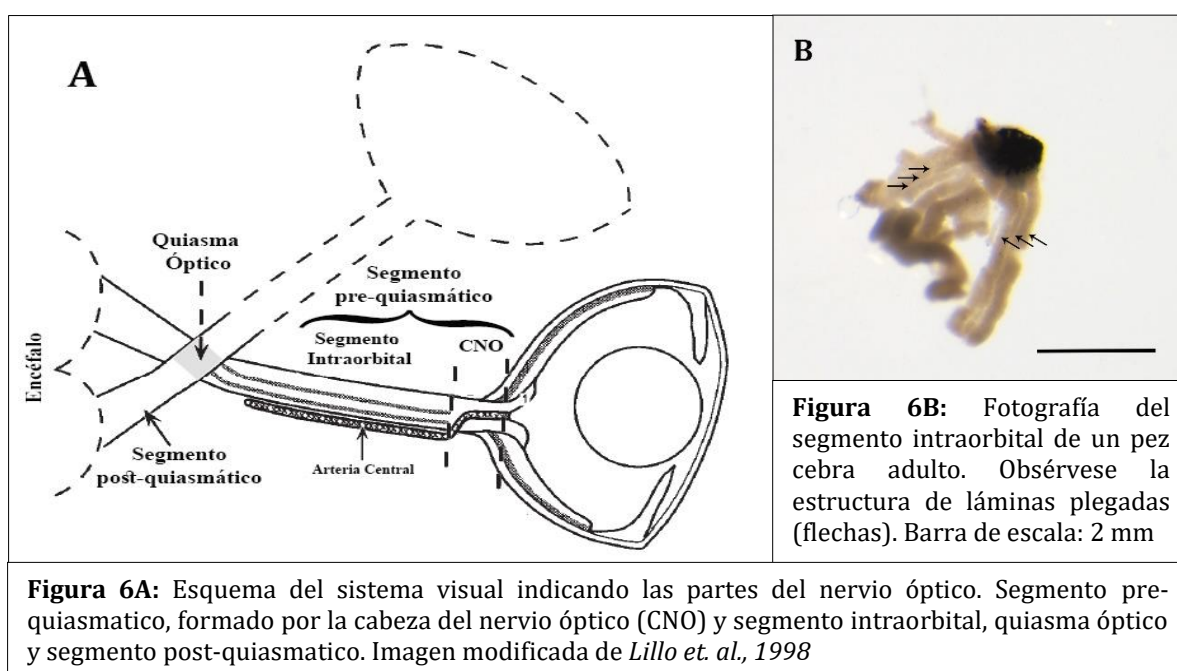
1.2.2. Nervio óptico

El NO es la estructura del SNC que conecta la retina con los centros encefálicos a los que ésta se proyecta (Fig. 6). Es la porción del sistema visual responsable de transmitir la información hasta el encéfalo para ser procesada e integrada. La parte neural del NO está constituida por los axones de las CGR y por diferentes tipos de células gliales, como son los astrocitos, oligodendrocitos y microglía.

El NO está recubierto por tejido conjuntivo, continuación de las meninges, dónde se encuentran numerosos vasos sanguíneos. Debido a su fácil acceso y que

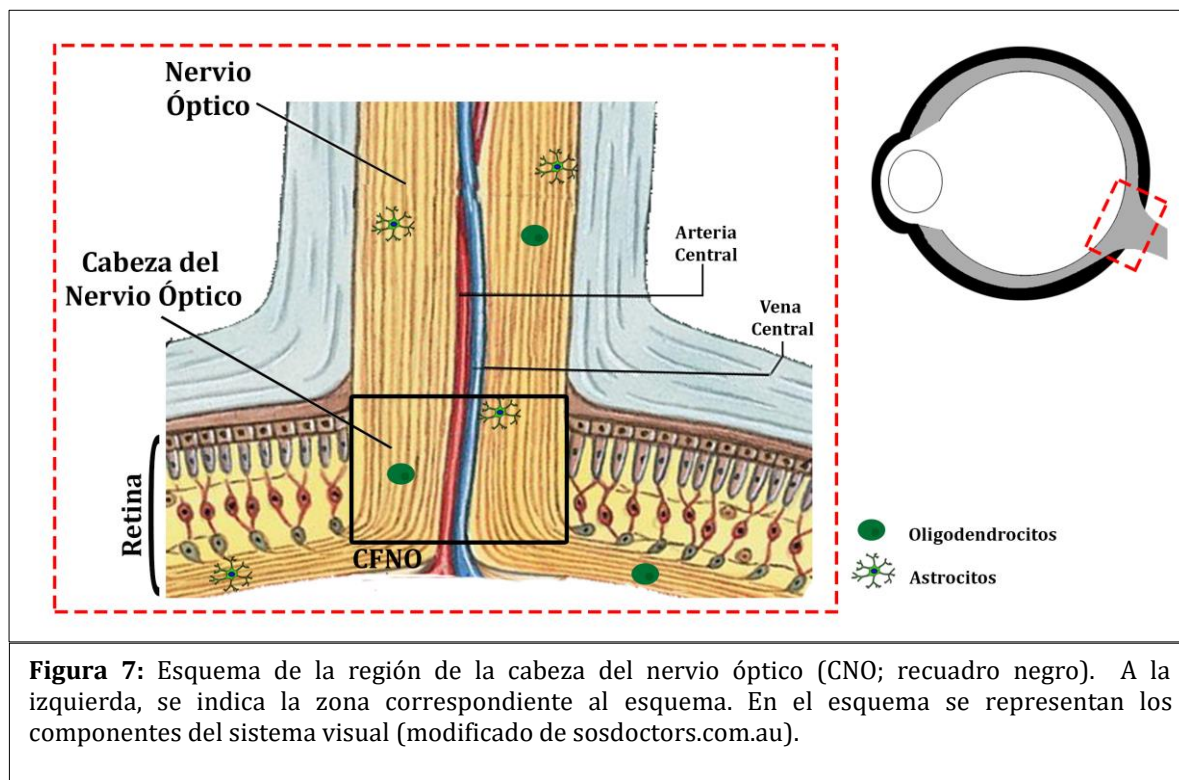
no presenta somas neuronales, es una estructura ideal para estudios sobre interacciones axón-glia y sobre la participación de las células gliales en procesos de crecimiento, degeneración y regeneración.

Para facilitar su estudio, el NO se ha dividido en distintas regiones. En los peces teleósteos, se han descrito tres regiones principales (Fig. 6A): segmento pre-quiasmático, el quiasma óptico (donde los axones se entrecruzan contralateralmente) y segmento post-quiasmático o tracto óptico. Además, el segmento prequiasmático se subdivide en segmento intraocular o CNO, y segmento intraorbital o extraocular (Lillo et al., 1998).



1.2.2.1. Cabeza del nervio óptico (CNO)

El segmento intraocular o CNO, zona de transición de la retina hacia el NO, es la región por donde los axones de las CGR atraviesan todas las capas de la retina hasta salir del globo ocular (Fig. 7). Es una estructura con características celulares y moleculares diferentes a la retina y al NO y es esencial en los procesos de crecimiento continuo y regeneración. En esta porción se encuentran los axones de las CGR y diferentes tipos de células gliales, además de los numerosos vasos sanguíneos que irrigan la retina.



Su organización y características son diferentes en los distintos grupos de vertebrados. En mamíferos, por ejemplo, los astrocitos de la CNO forman una estructura denominada lamina cribosa que en peces no se ha descrito. No obstante, en peces se ha visto una estructura de anillo formada por astrocitos, en la parte posterior de la CON, denominada limitante glial (Lillo et al., 2002). La CNO de los teleósteos está limitada por las prolongaciones de las células de Müller, donde presentan los procesos vitreales más gruesos y están íntimamente asociadas a astrocitos y microglía (Parrilla et al., 2013, 2012; Lillo et al., 1998).

Tanto los procesos de crecimiento como los de regeneración implican la formación de nuevas neuronas y células gliales. Desde la periferia de la retina, las células ganglionares de nueva generación envían sus axones por la CFNO pasando a la CNO. Estos axones son mielinizados en la CFNO por oligodendrocitos mielinizantes, que también están presentes en la CNO y NO (García-Pradas et al., 2018).

Como consecuencia, se observa una mielinización gradual que se traduce en una ordenación cronológica de los axones, desde la CFNO, incluyendo la CNO, hasta el NO (Lillo et al., 2002, 1998; Wanner et al., 1995; Bastmeyer et al., 1989; Stuermer,

1988). Además, en la CNO se han descrito diferentes poblaciones de precursores gliales (Parrilla et al., 2013, 2012; Fischer et al., 2010).

1.2.2.2. Segmento intraorbital

Una vez fuera del globo ocular, y formando también parte del segmento prequiasmático del NO, se encuentra el segmento intraorbital o extraocular. Los axones de las CGR inciden en el NO y se disponen formando una estructura de cinta plegada (Fig. 6B). El grado de plegamiento del NO, así como el número de axones que lo componen, varía según la especie.

En las porciones del NO en que se encuentran los axones mielinizados y funcionalmente maduros, existen muchos astrocitos reticulares. Las prolongaciones de estos astrocitos forman un entramado que separan los axones procedentes de la retina en fascículos, sus somas se disponen entre ellos (Peters et al., 1991; Scholes, 1991). Los oligodendrocitos también son muy numerosos ya que hay un aporte constante de axones amielínicos al NO y que necesitan ser mielinizados (Mack y Wolburg, 2006; Lillo et al., 2002; Bastmeyer et al., 1989).

Se ha descrito que, debido al crecimiento anular de la retina en los peces, los axones mielínicos de mayor tamaño se disponen en el centro del NO y hacia el exterior gradualmente se sitúan los axones de menos tamaño y amielínicos (Lillo et al., 1998; Easter et al., 1984). Pero se considera que dicha estructura es variable entre las especies de peces (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b).

En la transición del NO y CNO se encuentra la limitante glial. Esta estructura está constituida por numerosas prolongaciones astrocíticas y somas que se agrupan mediante desmosomas (Mack y Wolburg, 2012; Maggs y Scholes, 1990). Los astrocitos de la limitante glial son diferentes a los astrocitos reticulares en tamaño y función: son células mayores con prolongaciones más gruesas y no forman fascículos para organizar los axones (Peters et al., 1991).

1.3. Células gliales

En los peces adultos, las células gliales de la retina provienen mayoritariamente de la ZPG, así como los demás tipos celulares. El origen de las células gliales que se encuentran en la CNO y NO es incierto. Algunos estudios apuntan la presencia de precursores gliales residentes en el NO (León-Lobera, 2017; Parrilla, 2010; Chan-

Ling et al., 2009; Cid, 2006), mientras otros estudios describen procesos de migración de células gliales desde el encéfalo y/o desde la retina (Blaugrund et al., 1993). En todo caso, hay consenso en que las células gliales son esenciales para el funcionamiento del sistema visual, así como para los procesos de crecimiento continuo, degeneración y regeneración.

1.3.1. Astrocitos

Los astrocitos del NO se consideran un subtipo de astrocitos fibrosos denominados astrocitos reticulares (Maggs y Scholes, 1990; Bastmeyer et al., 1989). La estructura de entramado que presentan los astrocitos reticulares de peces teleósteos, que dividen los diferentes axones en grupos fasciculares (Lillo et al., 1998; Macdonald et al., 1997), no se ha descrito en mamíferos. En la CNO se encuentran astrocitos positivos para GFAP (Fischer et al., 2010; Lillo et al., 2002).

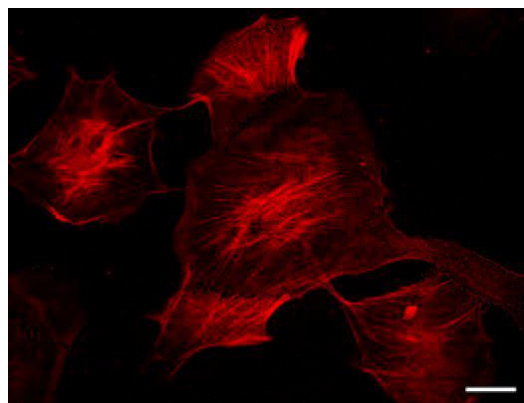


Figura 8: Astrocitos en cultivo (imagen modificada de Mack y Tiedemann, 2013). Barra de escala: 20 μ m.

En algunas especies de teleósteos, por ejemplo el pez cebra, dicho marcaje se pierde en el NO de animales adultos (Koke et al., 2010; Marcus y Easter, 1995; Levine, 1989). Son células con morfología típicamente estrellada (Fig. 8), además del empaquetamiento de axones, forman la denominada limitante glial: límite entre el tejido nervioso y el tejido conjuntivo. La limitante glial también se caracteriza porque las células que la componen están íntimamente relacionadas mediante desmosomas, y en su superficie externa están cubiertos por una lámina basal (García-Pradas et al., 2018; Lillo et al., 2002, 1998).

En el NO los astrocitos presentan una serie de peculiaridades en relación a los demás astrocitos del SNC. Se unen entre sí mediante uniones GAP, que típicamente expresan conexina 43 (Tabernerero et al., 2006; Bennett et al., 2003). Además, la expresión de otras proteínas asociadas a filamentos intermedios (citoqueratinas o vimentina) (Grupp et al., 2010; März et al., 2010; Cuoghi y Mola, 2009; Velasco et al., 1997), presente también en los astrocitos del NO, revela la naturaleza inmadura de este tipo glial.

Como se ha comentado anteriormente, en muchas especies de peces los astrocitos no expresan la proteína típica de sus filamentos intermedios (GFAP) en condiciones normales (Koke et al., 2010; Marcus y Easter, 1995; Levine, 1989). No obstante, en los procesos degenerativos y regenerativos, los astrocitos se vuelven reactivos y sí expresan GFAP (Blaugrund et al., 1993). Hay numerosos estudios de caracterización de dichas células en la CNO y NO, así como su comportamiento en los procesos de crecimiento, degeneración y regeneración (Parrilla et al., 2013, 2009; Dowding et al., 1991; Levine, 1989).

1.3.2. Oligodendrocitos

En el NO, los oligodendrocitos son morfológicamente muy similares a los oligodendrocitos interfasciculares del SNC, los que típicamente constituyen los haces fibrosos (Fischer et al., 2010; Cuoghi y Mola, 2009; Lillo et al., 1998). Presentan un soma redondeado, con numerosas prolongaciones citoplasmáticas (Fig. 9). La principal función de dichas células en el NO, igual que en la CFNO, es la de mielinizar los axones de las CGR. Especialmente, tanto su soma como sus prolongaciones se alinean de forma paralela a los axones del NO (Garcia-Pradas et al., 2018; Parrilla et al., 2016; Cuoghi y Mola, 2009; Lillo et al., 1998). La abundancia de los oligodendrocitos varía entre las distintas especies de peces teleósteos, así como el número de axones que componen el NO y su grado de mielinización (Lillo et al., 2002, 1998; Easter et al., 1984).

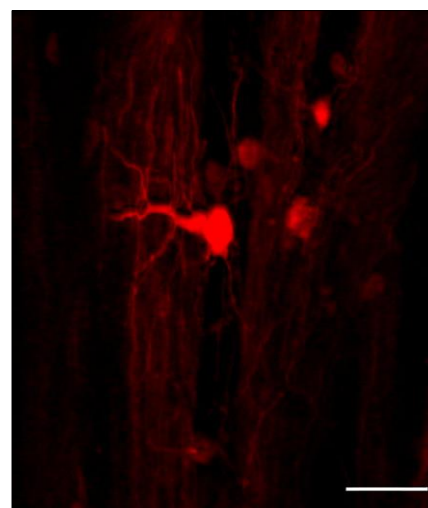


Figura 9: Oligodendrocito mielinizante, Sox10 positivo, en el nervio óptico de un pez cebra adulto. Animal transgénico, con expresión de proteína roja fluorescente asociada a la expresión del gen *sox10*, del linaje de oligodendrocitos. Barra de escala: 20 μ m

En los peces, se considera que los oligodendrocitos provienen de precursores residentes del NO, al igual que ocurre con los astrocitos (Sánchez-Gómez et al., 2018; León-Lobera, 2017; Moyon et al., 2016; Parrilla, 2010; Cid, 2006). Estas células no se originan en la retina, incluyendo los oligodendrocitos de la CFNO, sino que migran desde el NO [en mamíferos, a excepción de los conejos, la migración se

bloquea en la lámina cribosa y no entran en la retina; (León-Lobera, 2017; Tsai y Miller, 2002; Perry y Lund, 1990)].

Aunque parecen existir diferencias entre la mielina típicamente encontrada en el SNC y la mielina formada en la retina de peces (Bastmeyer et al., 1994; 1993), se ha descrito la presencia de oligodendrocitos en la retina que son funcionales (Parrilla et al., 2016). De hecho, se ha propuesto que según el grado de mielinización se puede identificar a los axones de las CGR más jóvenes, que todavía no están mielinizados, y los más antiguos, ya mielinizados. Además, los oligodendrocitos son células con alta plasticidad, una célula es capaz de mielinizar diversos axones con diferentes calibres (Almeida y Lyons, 2013; Almeida et al., 2011).

1.3.2.1. Mielinización

Rudolf Virchow acuñó el término “mielina”, del alemán *myelin* (pasado sin cambios al inglés), en 1858 antes de conocer su origen o función (Virchow, 1858). Actualmente sabemos que la mielina es una estructura multilaminar compuesta por capas membranosas, cuya función es envolver los axones formando vainas (Fig. 10) (Zalc y Rosier, 2018; Schafer y Stevens, 2015). Las vainas de mielina permiten la transmisión del impulso eléctrico de las neuronas de forma rápida y eficiente. Desde el punto de vista bioquímico, están compuestas de un 70% de lípidos y un 30% de proteínas (Zalc y Rosier, 2018; Buckley et al., 2008).

Las células responsables de formar las vainas de mielina son los oligodendrocitos. Dicha capacidad es inherente, puesto que los oligodendrocitos pueden mielinizar axones *in vitro*, incluso si éstos están previamente fijados (Rosenberg et al., 2008). Aparentemente, la única condición para que un oligodendrocito pueda mielinizar una fibra es el diámetro de ésta, aproximadamente 0,4 μm (Lee et al., 2012).

La mielinización se puede considerar un proceso análogo a la formación de sinapsis neuronales, debido a que ambos procesos implican una selección axonal controlada por la propia actividad sináptica del axón (Treichel y Hines, 2018; Zalc y Rosier, 2018; Koudelka et al., 2016; Lyons y Talbot, 2015; Almeida y Lyons, 2013). Este proceso, en el sistema visual de peces, ocurre continuamente y no sólo durante el desarrollo.



Figura 10: Micrografía electrónica de las vainas de mielina alrededor de un axón del nervio óptico (flechas). En la imagen, se ven las vainas rodeando al axón del nervio de un pez ciclido africano (modificado de *Maggs and Scholes, 1990*). Barra de escala no disponible

En los procesos de crecimiento continuo, como consecuencia de las aportaciones ininterrumpidas de nuevas neuronas y sus axones, la mielinización debe ser constante para una integración funcional de éstos nuevos axones al sistema. Además, en los procesos de regeneración del sistema visual, algunos estudios han demostrado que los oligodendrocitos tienen una respuesta diferente a la destrucción de los axones en crecimiento (sin mielinizar) y los axones más maduros (mielinizados) (León-Lobera, 2017; Parrilla et al.,

2016; Parrilla, 2010).

1.3.3. Microglía

La microglía fue descrita por primera vez por del Río-Hortega (1930, 1927), como un tipo celular glial que no correspondía ni con astrocitos ni con oligodendrocitos. En la actualidad se han detectado células de microglía en los diferentes grupos de vertebrados, incluyendo peces, y las características estructurales y funcionales son comparables en todos los casos. Son células con poco citoplasma, núcleo triangular u ovalado y numerosas prolongaciones irregulares y cortas (Fig. 11) (Frost y Schafer, 2016; Schafer y Stevens, 2015; Fischer et al., 2010).

En cuanto a su función, son células fagocíticas altamente especializadas en la defensa del SNC (Kettenmann et al., 2011). En consecuencia, la función de la microglía se da fundamentalmente en condiciones patológicas, aunque en condiciones normales también pueden fagocitar desechos celulares. También modulan toda la respuesta inmune del SNC, produciendo tanto sustancias neurotóxicas como factores tróficos (Brown y Vilalta, 2015; Schafer y Stevens, 2015).

En la retina, la localización de las células de la microglía varía según la especie de vertebrados (Zelinka et al., 2012; Jimeno et al., 1999; Dowding et al., 1991). En los peces, por lo general, se disponen principalmente en las capas CPE, CPI y CFNO, y en menor medida en las capas CGR, CNI y CNE (Lillo et al., 2001; Velasco et al., 1999; Dowding et al., 1991). También están presentes en la CNO y NO (Parrilla et al., 2016; Lillo et al., 2002).

Se distinguen dos tipos de microglía según su estado de activación: microglía residente o ramificada y la microglía ameboide o reactiva (Das et al., 2015; Zelinka et al., 2012; Kettenmann et al., 2011). Las células generalmente se encuentran en estado latente, como microglía ramificada, hasta que se activan tras cualquier daño, lesión o patología, proliferando y transformándose en microglía reactiva. La microglía reactiva presenta alta capacidad de migración y actividad fagocítica (Brown y Vilalta, 2015; Schafer y Stevens, 2015; Kettenmann et al., 2011).

1.4. Precursores gliales

La proliferación de células gliales en el SNC de vertebrados adultos ha sido descrita en diversos estudios (Ghosh y Hui, 2016; Sîrbulescu et al., 2015; Alvarez-Buylla et al., 2002; Seri y Alvarez-Buylla, 2002). Tanto los astrocitos totalmente diferenciados, fibrosos y protoplásmicos, como los oligodendrocitos y microglía son capaces de sufrir divisiones mitóticas en adultos (Wen et al., 2016; Dimou y Götz, 2014; Raymond et al., 2006).

En la CNO se han descrito progenitores de astrocitos, los astroblastos, cuya función sería el aporte de nuevas células gliales (Parrilla et al., 2016, 2012; Lillo et al., 2002). Actualmente se considera que las células gliales de la CFNO también provienen de astroblastos, que migrarían hasta la retina tras la división celular (Chan-Ling et al., 2009; Cid, 2006).

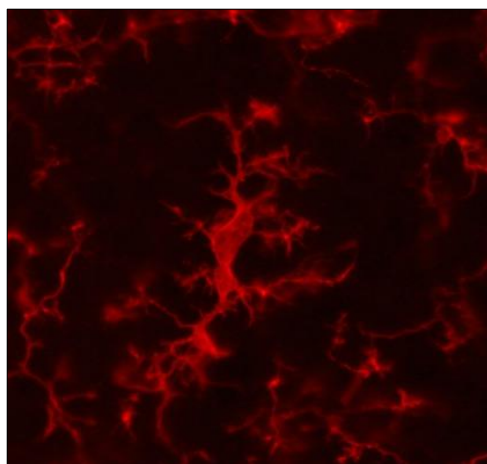


Figura 11: Imagen de microglía marcada frente a Iba-1. (imagen de neurojewelry.com). Barra de escala no disponible.

El NO, además de los precursores gliales, contiene astrocitos y oligodendrocitos en diferentes estadios de maduración. Por lo general se localizan en el borde de crecimiento a lo largo de todo el tejido (Arenzana et al., 2011; Parrilla et al., 2009; Mack y Wolburg, 2006; Lillo et al., 1998).

En mamíferos, estudios recientes han descrito una población de células progenitoras de oligodendrocitos denominadas OPCs (del inglés *Oligodendocyte Progenitor Cells*), en el SNC adulto (Dimou y Simons, 2017; Dimou y Götz, 2014; Levine et al., 2001). Estas células son capaces de diferenciarse tanto a oligodendrocitos como a astrocitos. Además, se caracterizan principalmente por la expresión de la proteína NG2 (proteoglicano de sulfato de condroitina), por ello también se denominan células NG2 (Dimou y Simons, 2017; Eugenin-von Bernhardt y Dimou, 2016; Dimou y Gallo, 2015; Trotter et al., 2010). Hasta el momento no se han detectado dichas proteínas en el SNC de peces.

1.5. Regeneración del sistema visual

Los animales amniotas tienen una reducida capacidad de regeneración en organismos adultos, especialmente limitada en el SNC. En contraste, los animales anamniotas presentan una gran capacidad de regeneración de distintas estructuras, incluyendo la regeneración del SNC (Lust y Tanaka, 2019; Alunni y Bally-Cuif, 2016; García y Koke, 2009).

En los mamíferos, se han descrito zonas con capacidad neurogénica en adultos como son los ventrículos laterales, el epitelio olfatorio o el giro dentado del hipocampo (Ortega et al., 2013; Alvarez-Buylla et al., 2002; Seri y Alvarez-Buylla, 2002). También en mamíferos se ha observado el incremento de la proliferación celular en respuesta a un daño o lesión (Lust y Wittbrodt, 2018; Dimou y Götz, 2014). No obstante, las células que se generan en condiciones patológicas normalmente no sobreviven o no migran a las zonas dañadas y no son capaces de restablecer el sistema dañado.

Sin embargo, los peces teleósteos tienen una alta capacidad de regeneración estructural y funcional (Ghosh y Hui, 2016; Gemberling et al., 2013; Wang et al., 2011). Se ha propuesto que se debe a la presencia de diversas zonas neurogénicas

en el SNC adulto, como las mencionadas del sistema visual (ZPG, precursores de bastones, progenitores en la CNI y precursores gliales).

Por lo general, la investigación sobre la regeneración del sistema visual está centrada en el origen de las células que la producen, y en los mecanismos que regulan y dirigen dicho proceso, además de las características anatómicas y funcionales del tejido regenerado.

1.5.1. Regeneración de la retina

La primera descripción de los procesos de regeneración que se producen en la retina de peces teleósteos se realizó en 1968 (Lombardo, 1968). Durante los últimos años se están estudiando los procesos morfológicos y moleculares que transcurren durante los procesos de degeneración y regeneración. Para ello, se han desarrollado diferentes métodos de lesión retiniana como son por ejemplo la apoptosis de células por exceso de luz, la eliminación quirúrgica de partes de la retina o la fotocoagulación por láser (Crair y Mason, 2016; Parrilla et al., 2016, 2013; Jimeno et al., 2003, 1999; Bastmeyer et al., 1993).

En algunos anfibios y aves, en estadios embrionarios, en respuesta a una lesión de la retina se originan progenitores retinianos en la EP por transdiferenciación (Hitchcock y Raymond, 2004; Reh y Pittack, 1995). Aunque estos progenitores pueden generar una retina completa y funcional, la plasticidad del EP es temporal y no llega a edades adultas (exceptuando los urodelos). En los mamíferos no hay regeneración retiniana, en caso de daño la glía se vuelve reactiva, originando una cicatriz glial que impide la restauración de la visión (Bringmann y Reichenbach, 2001; Dyer y Cepko, 2000). En contraste, en los peces teleósteos el EP no parece intervenir en los procesos de degeneración y regeneración, el daño provoca la activación de la neurogénesis, generación de nuevas neuronas (Diekmann et al., 2015; Fischer y Bongini, 2010; Otteson et al., 2001; Easter y Hitchcock, 2000; Jimeno et al., 1999).

Numerosos estudios han demostrado que en los peces teleósteos todos los componentes celulares y los contactos sinápticos pueden restablecerse, así como su funcionalidad (Rasmussen y Sagasti, 2017). Inicialmente se consideró a la ZPG como la principal responsable de la regeneración de la retina en los peces. Aunque

aumenta su actividad proliferativa tras una lesión (Jimeno et al., 1999), se ha demostrado que no contribuye directamente en los procesos de regeneración. Algunos estudios han demostrado que las células pertenecientes al linaje de bastones tienen capacidad de restaurar la retina por completo (Jimeno et al., 2003; Cid et al., 2002). Por otro lado, se ha observado que se produce una gran proliferación de las células de Müller en respuesta al daño (Guimarães et al., 2018; Reichenbach y Bringmann, 2013; Fischer y Reh, 2001).

1.5.2. Regeneración del nervio óptico

El NO de mamíferos ante una lesión no es capaz de recuperarse, ni estructural ni funcionalmente. Ello se debe principalmente a la formación de la cicatriz glial, estructura física y química que impide la regeneración y crecimiento axonal (Fischer y Leibinger, 2012). Por el contrario, tras una lesión los axones del NO de peces teleósteos son capaces de volver a crecer alcanzando el techo óptico y la funcionalidad del sistema (Diekmann et al., 2015).

En los peces teleósteos se ha comprobado que, tras un corte o aplastamiento de los axones del NO, se produce la regeneración del mismo, mientras que en los mamíferos se produce la muerte de las CGR por apoptosis o necrosis (Crair y Mason, 2016; Fischer, 2012). Además, se ha comprobado que la capacidad de crecimiento y regeneración de los axones depende de propiedades intrínsecas y del ambiente en que se encuentren (Carreño et al., 2013; Velasco et al., 2001).

En mamíferos, en el caso de una lesión, se forma una barrera física de glía reactiva y se genera un ambiente hostil que impide que los axones crezcan (Crair y Mason, 2016; Fischer, 2012). Además, los oligodendrocitos y sus productos mielínicos expresan diferentes inhibidores que impiden el crecimiento axonal (Fischer y Leibinger, 2012).

La regeneración del NO de los peces se inicia con un proceso inflamatorio, la desaparición de astrocitos en la zona lesionada, una activación de la microglía y la invasión de macrófagos (Bejarano-Escobar et al., 2017; Bollaerts et al., 2017; Colavincenzo y Levine, 2000; Jimeno et al., 1999). Los macrófagos son los responsables de limpiar la zona dañada de los desechos celulares y la eliminación de las señales inhibitorias del crecimiento. Además, se ha descrito que liberan

factores de crecimiento y favorecen el desarrollo de los axones regenerantes (Bodrikov et al., 2017; Craig et al., 2010).

En peces, la lesión del NO desencadena una serie de procesos celulares y moleculares desde la zona dañada hasta los somas de las CGR y el techo óptico. Afecta, por tanto, a todo el sistema visual y produce la modificación del medio que rodea a los axones lesionados, estableciendo un ambiente permisivo para su regeneración (Rasmussen y Sagasti, 2017; García y Koke, 2009; Wanner et al., 1995).

A medida que el NO va recuperando su estructura original, los axones regenerantes desplazan a los macrófagos y los astrocitos vuelven a disponerse entre ellos, formando nuevos fascículos y favoreciendo su avance a lo largo del NO (Parrilla et al., 2016; Velasco et al., 2000). En las CGR se sintetizan lípidos y proteínas del citoesqueleto que llegan al cono de crecimiento dónde son esenciales para que los axones puedan cruzar a la zona lesionada, proceso denominado cromatolisis (Zurn y Bandtlow, 2007; Grafstein y Murray, 1969).

La respuesta a la lesión del NO en las zonas distales se pone de manifiesto más tarde. Una vez que la zona lesionada ya está limpia de desechos celulares en degeneración, en la zona distal se encuentran restos de mielinas que son fagocitados por los astrocitos (Diekmann et al., 2015; Parrilla et al., 2013; Colavincenzo y Levine, 2000). Tras la eliminación de los desechos de mielina comienzan los procesos de nueva mielinización de los axones regenerados del NO, ya muy similar al estado pre-lesión (León-Lobera, 2017; Parrilla, 2010).

Se ha descrito que la nueva mielinización se desencadena tras un periodo de refinamiento sináptico del axón a mielinizar, y que, en el crecimiento axonal están implicadas las moléculas del medio (Nona et al., 2000; Grafstein y Murray, 1969).

Estudios realizados por el grupo de la Dra. Stuermer han demostrado que los oligodendrocitos de peces son capaces de estimular el crecimiento de axones en mamíferos, mientras que los de mamíferos inhiben el crecimiento axonal en peces (Bastmeyer et al., 1991). Por ello, actualmente muchos estudios se centran en el análisis de los mecanismos celulares y moléculas que puedan estar implicados en los procesos de regeneración del NO de peces.

Se ha descrito que proteínas como GAP-43, asociada al crecimiento axonal durante el desarrollo embrionario, o factores de transcripción como Pax6, crucial en la formación de la vía visual, incrementan su expresión tras una lesión (Wen et al., 2016; Diekmann et al., 2015; Otteson et al., 2001). Ello implica que el incremento de la expresión de algunos genes favorece la regeneración (Cid et al., 2002). Sin embargo, se han descrito diferencias entre el desarrollo embrionario y la regeneración (Cid, 2006).

Proteínas que intervienen en ambos procesos como por ejemplo GAP-43 y α tubulina, moléculas de interacción con la actina y moléculas de reconocimiento, que se activan por vías diferentes, están más expresadas durante la regeneración (Senut et al., 2004; Udvardia et al., 2001). Por otro lado, el ácido polisialico modificado de NCAM está presente en los axones jóvenes en el desarrollo, pero no en los axones regenerantes (Harman et al., 2003).

Entre las principales moléculas inhibitoras de la regeneración en los mamíferos están las proteínas de la mielina, lo que no ocurre en los peces. En el pez cebra, por ejemplo, el inhibidor asociado a la mielina (Nogo-A) de mamíferos, carece de su dominio inhibitor (Bodrikov et al., 2017). Por otro lado, en la CNO y NO, se han observado células gliales que, frente a lesiones, expresan genes para los factores de transcripción pax2, sox10 o sox2 (León-Lobera, 2017; Parrilla et al., 2016; Parrilla, 2010).

1.6. Proteínas implicadas

Se han descrito algunas proteínas que están implicadas en los procesos de crecimiento y regeneración del SNC de vertebrados adultos. A continuación, describiré aquellas que parecen estar implicadas en los procesos de crecimiento y regeneración del sistema visual relevantes para este trabajo.

1.6.1. Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

La proteína GFAP es una proteína fibrosa que se ha descrito formando parte de los filamentos intermedios y es típica del citoesqueleto de astrocitos, glía radial, glía de Bergmann y endimocitos. Presenta tres dominios de los cuales el más conservado es la hélice α central. Su principal función es modular la forma y el

movimiento de las prolongaciones celulares (Tao y Zhang, 2014; Alunni et al., 2005; Brenner, 1994).

Se ha descrito que en la retina madura, la proteína GFAP se expresa en las células de Müller de todos los grupos de vertebrados estudiados (Fischer et al., 2010; Koke et al., 2010; Bernardos y Raymond, 2006). En la porción del tracto óptico y en la entrada del encéfalo se han observado astrocitos de la vía visual GFAP positivos. Por otra parte, en especies como *A. burtoni* se observan en el NO células positivas para GFAP durante toda la vida del animal (Wen et al., 2016; Mack y Tiedemann, 2013). Se ha propuesto que en respuesta a lesiones se sobreexpresa GFAP, lo que caracteriza a los astrocitos reactivos o astrogliosis (Raymond et al., 2006).

1.6.2. Proteínas de la familia Sox (Sox2 y Sox10)

Las proteínas de la familia de genes sox, de la superfamilia de genes HMG-box (del inglés high mobility box) relacionados con SRY (del inglés Sex determining Region Y), son factores de transcripción que se unen al surco menor del ADN provocando que el mismo se curve. Hay 9 grupos (A, B1, B2, C, D, E, F, G y H) que presentan gran conservación evolutiva entre las especies eucariotas, con homólogos descritos en insectos, anfibios, reptiles, aves, peces y mamíferos (She y Yang, 2015; Sarkar y Hochedlinger, 2013; Wegner y Stolt, 2005).

Sox1, Sox2 y Sox3 pertenecen al grupo B1. Entre las funciones mejor conocidas de Sox2 (*SRY-box2*) están la de mantener la capacidad proliferativa de las células y la de participar en los procesos de diferenciación (Kamachi y Kondoh, 2013; Uchikawa et al., 1999; Kamachi et al., 1998). Al igual que la mayoría de los genes de esta familia, carece de intrones. Debido a la alta movilidad del grupo HMG, la unión de Sox2 al ADN es poco estable por lo que se da junto a otras proteínas. Sox2 está relacionada con el desarrollo del sistema visual, así, animales que no expresan Sox2 presentan microftalmia o anoftalmia (tamaño reducido o ausencia del globo ocular) (Williamson y FitzPatrick, 2014; Verma y FitzPatrick, 2007; Hever et al., 2006).

Se ha descrito que Sox2 se expresa en el sistema visual de animales adultos en diferentes especies de vertebrados (Kautzman et al., 2017; Fan et al., 2016;

Surzenko et al., 2013; Fischer et al., 2010). En la retina de peces este factor de transcripción se ha encontrado tanto en la ZPG como en diversos tipos celulares de la retina madura. En otras especies, incluyendo en los mamíferos, también se ha descrito la expresión de Sox2 en retinas de animales adultos (Reinhardt et al., 2015; Fischer et al., 2010; Hever et al., 2006).

Por otro lado, un estudio (Liu et al., 2014) ha demostrado que Sox2 puede actuar como inhibidor de la proliferación celular, según los factores que le acompañan en la interacción con el ADN. Además, factores con los que se asocia (otros factores de transcripción y/o moléculas de unión al ADN) pueden modificar su actividad (Kamachi et al., 2001).

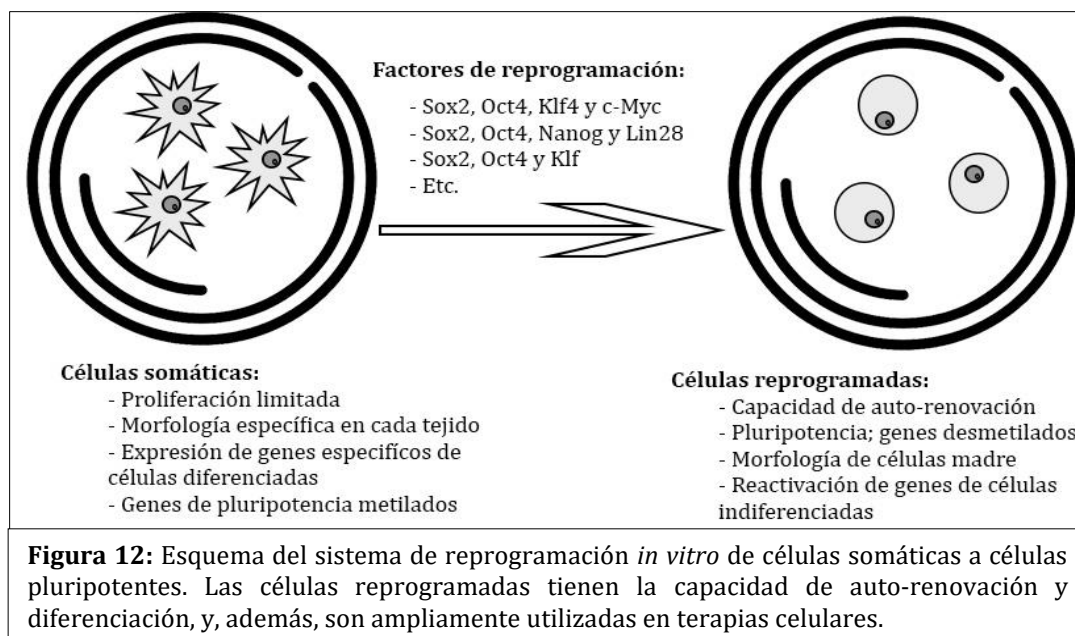
Una de las principales limitaciones en el estudio de la actividad y funciones de Sox2 es el elevado nivel de compensación funcional que presenta el grupo B1 (Sox1, Sox2 y Sox3). Los ensayos de silenciamiento génico han revelado que, en ausencia de Sox2, las proteínas Sox1 y Sox3 se ven incrementadas y asumen en gran medida las funciones de la proteína silenciada (She y Yang, 2015; Kamachi y Kondoh, 2013; Wegner y Stolt, 2005).

Se ha descrito también Sox2 en las zonas neurogénicas del encéfalo adulto (Zhang et al., 2018; Bollaerts et al., 2017; Bifari et al., 2015; Ferri et al., 2004). Aunque hay muchos procesos en los que parece estar implicado, todavía no se conocen con detalle su mecanismo de actuación y sus funciones.

En estudios realizados *in vitro* se ha empleado Sox2 en la reprogramación de diferentes tipos celulares a células troncales (Fig. 12). Los dos primeros estudios de reprogramación se basaban en la inducción de la expresión de Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 para obtener células pluripotentes (Park et al., 2008; Yu et al., 2007). Actualmente se están realizando tratamientos de terapia celular en los cuales se suministran a los pacientes dichas células reprogramadas. Finalmente, en cuanto a los procesos de degeneración y regeneración, está descrito que Sox2 incrementa sus niveles de expresión tras una lesión (León-Lobera, 2017).

Sox10 (SRV-box 10) es un factor de transcripción que se caracteriza por presentar un dominio HMG del grupo E (Sox8, Sox9 y Sox10). Las proteínas de este grupo son capaces de unirse al ADN en forma de monómeros o dímeros, y en cada caso desempeñan una función diferente. La expresión de genes del grupo E está

activa también en los derivados de las crestas neurales, y consecuentemente en el cartilago, melanocitos y algunas neuronas sensoriales en el tejido cardiaco (She y Yang, 2015; Kamachi y Kondoh, 2013; Sarkar y Hochedlinger, 2013).



En el SNC se ha descrito la expresión de Sox10 durante la formación, diferenciación y supervivencia de las células del linaje de los oligodendrocitos, no sólo durante el desarrollo, también en edades adultas (Parrilla et al., 2016; Takada et al., 2010; Wegner y Stolt, 2005). Se ha descrito también que es capaz de inducir la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la mielina, y con la interacción axón-glía (López-Anido et al., 2015; Peirano, 2000).

1.6.3. Marcadores axonales (Zn8, DCX y CR)

En el pez cebra se han descrito proteínas denominadas Neurolinas o Zn8. Son proteínas de adhesión, de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que participan en procesos de diferenciación y crecimiento de axones (Pushchina y Varaksin, 2018; Westerfield, 1995). Se conocen dos isoformas de Zn8 (Neurolina-a y Neurolina-b) con distinta función. Se ha descrito que la Neurolina-a es esencial para la diferenciación y supervivencia de las CGR mientras que la Neurolina-b no (Diekmann y Stuermer, 2009; Leppert et al., 1999; Ott et al., 1998). En ausencia de Neurolina-a gran parte de las CGR no se desarrollan y, en adultos, están ausentes o

en reducido número. La Neurolina-b parece estar involucrada en la guía de los axones desde el quiasma óptico al tracto óptico (Diekmann y Stuermer, 2009).

La proteína doblecortina (DCX), también denominada doblina o lisencefalina-X, es una proteína asociada a microtúbulos (Gleeson et al., 1999). Se expresa en células neuronales de reciente formación o inmaduras, tanto en fases de desarrollo como en la neurogénesis de adultos (Sánchez-Farías y Candal, 2015; von Bohlen und Halbach, 2011). Su expresión disminuye a medida que la neurona se diferencia, siendo reemplazada por marcadores típicos de neuronas maduras como la proteína nuclear neuronal (NeuN) (Heinrich et al., 2014).

Los niveles de expresión de DCX se incrementan durante los procesos de regeneración (Komitova et al., 2005) cuando se produce neurogénesis. En el SNC de algunas especies de peces teleósteos también está presente, aunque no se ha descrito en el pez cebra. En el sistema visual se han detectado células DCX positivas en la zona de transición de la retina (García-Pradas et al., 2018; Fernández-López et al., 2016; Sánchez-Farías y Candal, 2015), lo que permite seguir los axones de las neuronas recién formadas por la CNFO y NO.

La calretinina (CR), también llamada calbindina 2, es una proteína de unión al calcio descrita por primera vez en la retina en 1987 (Rogers, 1987). Es de la familia de proteínas ligantes de calcio, al igual que la parvalbumina o la calmodulina. En el SNC está asociada principalmente a las neuronas sensoriales. En la vía visual de peces se ha descrito la expresión de CR en neuronas del techo óptico, área preóptica y retina (Arenzana et al., 2011; Bejarano-Escobar et al., 2009; Weruaga et al., 2000; Miguel-Hidalgo et al., 1991). En la retina madura de animales adultos se expresa principalmente en células amacrinas, amacrinas desplazadas y CGR.

1.7. Terapia Celular

El glaucoma es un grupo de enfermedades que se caracterizan generalmente por un incremento patológico de la presión intraocular, dañando el NO. Se puede producir un aumento de la presión del líquido dentro del ojo lo que daña los axones de las CGR que forman el NO. Como consecuencia, se pierde la funcionalidad irreversiblemente y el campo visual va reduciéndose (Weinreb et al., 2014). La neuritis óptica, por ejemplo, es una inflamación del NO que puede ser

provocada por diferentes infecciones y enfermedades y que finalmente atrofia el NO (Abdelhakim y Rasool, 2018; Jacobs y Van Stavern, 2013).

Las patologías relacionadas con el NO suelen provocar la pérdida de visión, aunque en algunos casos existen tratamientos disponibles. Debido a que en los mamíferos la neurogénesis es muy escasa, no se pueden regenerar las células que hayan degenerado. Por tanto, en los mamíferos las CGR y sus axones que se hayan degenerado no podrán ser remplazados. Por ello, las estrategias de tratamientos actuales se enfocan más en frenar el avance del deterioro del NO que en recuperar las funciones perdidas.

La caracterización de células con capacidad proliferativa y de células progenitoras en la retina adulta de mamíferos ha estimulado el estudio de nuevas estrategias terapéuticas orientadas a la terapia celular (Zheng et al., 2018). La terapia celular (terapia: tratamiento de una enfermedad o de cualquier otra disfunción; celular: perteneciente o relativo a las células) es el proceso por el cual se introducen células extrínsecas al organismo como tratamiento a una enfermedad o lesión (Real Academia Española; rae.es). Esas células introducidas podrían reponer los tipos celulares dañados.

Para el implante de dichas células es muy importante conocer las propiedades de las mismas. Todo ello ha conducido a que los estudios *in vitro* de las células se hayan convertido en una herramienta esencial en biología regenerativa, incluyendo el estudio de células gliales.



Justificación y objetivos



Una investigación básica de calidad es fundamental para un posterior desarrollo, porque de ella saldrán resultados no previsibles a priori.

Margarita Salas

2. Justificación y Objetivos

Las células gliales son esenciales para el correcto funcionamiento del SCN, tanto en su mantenimiento habitual, como en los procesos de crecimiento continuo y regeneración. El crecimiento y la regeneración del SNC de vertebrados implica la generación de nuevas neuronas y su incorporación al sistema.

En el SNC de los mamíferos adultos, en condiciones normales, se han descrito cuatro zonas de proliferación neural: epitelio olfatorio, porciones de las zonas subventriculares, giro dentado y cuerpo ciliar del ojo. No obstante, estas zonas neurogénicas no parecen aportar cantidad suficiente de nuevas células para incrementar significativamente el tejido nervioso a lo largo de la vida del animal.

Aunque en los mamíferos hay respuesta frente al daño, la regeneración es muy limitada. Por lo general, con la activación de astrocitos reactivos y microglía, se forma una cicatriz glial que protege el tejido no dañado, pero impide el restablecimiento estructural y funcional del sistema.

En contraste, los peces teleósteos conservan amplias zonas proliferativas que provocan un crecimiento continuo del SNC, incluyendo del sistema visual. Además, la reacción glial frente al daño es distinta, la cicatriz glial aparentemente facilita los procesos de regeneración.

Consecuentemente, el sistema visual de los peces teleósteos se ha postulado como un buen modelo experimental para el estudio de la neurogénesis en vertebrados adultos, y es ampliamente utilizado en investigación. Nuestro grupo de investigación, con extensa experiencia en el estudio de las células gliales del sistema visual de peces, se ha centrado en el NO. Se han caracterizado diferentes poblaciones de células gliales y sus precursores, tanto en condiciones normales como tras distintos tipos de lesiones.

La hipótesis principal de esta Tesis Doctoral es que las células gliales del sistema visual están íntimamente relacionadas con los procesos de crecimiento y regeneración de vertebrados adultos. Se pretende identificar dichas células y analizar la función que desempeñan en dichos procesos.

Los objetivos de este trabajo de investigación han sido:

- Poner a punto el protocolo de cultivo de células gliales provenientes del NO de peces y caracterizar dichas células.
- Identificar y caracterizar las células gliales Sox2 positivas en el sistema visual de teleósteos adultos.
- Determinar las funciones que las células gliales Sox2 positivas desempeñan en el sistema visual de peces y en las interacciones axón-glía.
- Conocer el crecimiento axonal, desde la zona de transición de la retina hasta el nervio óptico, y los distintos tipos de neuroglia implicados.



Materialles y Métodos



Un científico en su laboratorio es como un niño, se enfrenta a fenómenos naturales que lo impresionan como si fueran cuentos de hadas.

Marie Curie

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales de experimentación

Para el trabajo de investigación se han utilizado 91 peces cebra, 24 carpines dorados y 21 peces cíclidos. El tamaño corporal estándar ha sido similar en cada especie y todos los animales utilizados eran adultos (machos y hembras); 1,5 – 2 cm en *D. rerio*, 4 – 7 cm en *C. auratus* y 2 – 4 cm en *A. burtoni*. Los especímenes utilizados eran de tipo silvestre, salvo en el caso del pez cebra, donde también se han utilizado animales transgénicos. En las dependencias del INCyL hay disponible cinco linajes diferentes de pez cebra transgénicos que se detallan en la Tabla 1.

Los peces cebra se mantienen en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (SEA-USAL), ubicado en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL) en Salamanca. Los carpines dorados adultos, adquiridos a proveedores comerciales autorizados (Kiwoko) se han trasladado al laboratorio dónde se han mantenido en peceras de al menos 50 litros. Los *A. burtoni*, han sido cedidos para este trabajo por el *Institute of Clinical Anatomy and Cell Analysis* en Tübingen, Universidad de Tübingen, Alemania.

Los animales fueron manipulados siguiendo las directrices 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 SEA-USAL. De la misma manera los animales utilizados en Alemania han sido manipulados según las mencionadas directrices de la Unión Europea y reguladoras específicas de Alemania.

3.1.1. Mantenimiento de los animales

Los peces cebra y los cíclidos son peces de agua cálida, se mantienen en acuarios a una temperatura de $28,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Los carpines son peces de aguas más frías y se mantienen en tanques a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Las tres especies están bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Todos los animales han sido alimentados al menos una vez al día, con piensos comerciales y artemia salina. Las larvas de pez cebra fueron alimentadas con una

solución de yema de huevo cocido, hasta que los animales alcanzaron tamaño suficiente para alimentarse del pienso.

Tabla 1: Líneas de peces cebra transgénicos.

Denominación	Fluorescencia	Gen asociado	Referencia
Tg(gfap:EGFP)	Verde	<i>gfap</i>	(Bernardos y Raymond, 2006)
Tg(sox10:EGFP)	Verde	<i>sox10</i>	(Dutton et al., 2008)
Tg(sox10:TagRFPt)	Roja	<i>sox10</i>	(Blasky et al., 2014)
Tg(olig2:EGFP)	Verde	<i>olig2</i>	(Shin et al., 2003)

*En esta tabla no se refleja las líneas de animales doblemente transgénicos.

Para la cría del pez cebra se separan machos y hembras reproductoras disponiéndolos en parideras. Se realiza por las tardes y a la mañana siguiente se recogen los huevos fecundados. Los huevos se recogen en placas Petri con solución E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl₂ 0,33 mM, MgSO₄ 0,33 Mm y una gota de azul de metileno), con cantidad máxima de 50 embriones por placa. Bajo una lupa binocular se elimina toda la suciedad, los huevos no fecundados y los embriones que presentan anomalías morfológicas. Las placas con los embriones se guardan a 28,5^aC dónde se mantienen hasta los 5 días post fecundación (dpf) cambiando la solución E3 diariamente. Cuando los embriones llegan a alevines se mantienen en tanques con el volumen de agua necesario según se produce su crecimiento. Una vez alcanzan un tamaño suficiente se incorporan al sistema de peceras.

En el caso de los peces transgénicos, antes de trasladar a los alevines al sistema principal de peceras, se seleccionan las diferentes líneas. Para obtener las distintas líneas se cruzan animales silvestres con animales transgénicos. A continuación, bajo una lupa con una lámpara de fluorescencia asociada, se separan los animales sin fluorescencia (silvestres) de los fluorescentes (transgénicos).

Para obtener dobles transgénicos se disponen dos tipos diferentes de animales reproductores [por ejemplo, Tg(gfap:EGFP) y Tg(sox10:TagRFPt)] en las parideras. En cada cruce se obtienen animales sin fluorescencia (silvestres), transgénicos con un fluorescencia asociada [por ejemplo los que expresan proteína verde asociada al gen *gfap* o proteína roja asociada al gen *sox10*; Tg(gfap:EGFP) o Tg(sox10:TagRFPt)], y dobles transgénicos, que expresan a la vez proteína verde fluorescente asociada al gen *gfap* y proteína roja fluorescente asociada al gen *sox10* [Tg(gfap:EGFP)(sox10:TagRFPt)].

3.2. Cultivo Celular

Las técnicas *in vitro* son muy susceptibles a diferentes tipos de contaminación que impiden el desarrollo de las células de interés. Por ello, todos los procedimientos, disoluciones y materiales implicados en el proceso tienen que estar bajo condiciones de esterilidad. Los pasos más críticos del protocolo han sido: la disgregación celular, la adhesión de las células a la superficie de la placa y su supervivencia *in vitro*. Las dos especies de peces con mayor tamaño, los carpines y los cíclidos, han sido más susceptibles a las variantes del protocolo. No obstante, se considera como protocolo de cultivo final el protocolo válido para aplicar a las tres especies.

Para la disección del NO, en tampón fosfato salino 0.1M pH 7.4 (PBS) suplementado con antibióticos y antimetabólicos (penicilina, estreptomicina y anfotericina B) (PBSSup), bajo la lupa se elimina el tejido conjuntivo que rodea el globo ocular (Fig. 13). Tras extirpar el ojo, es posible acceder al NO y extraerlo (Fig. 13). Se sumerge el tejido en PBSSup limpio y se elimina el tejido sanguíneo y conectivo de alrededor hasta aislar completamente el NO. Paralelamente se han extraído muestras de encéfalo para su uso. A continuación, tras limpiar el tejido completamente y trocearlo, se traslada el mismo a PBSSup limpio.

La disgregación enzimática se ha realizado mediante una incubación durante 10 minutos a 37°C en tripsina-EDTA (0,05%); los trozos de nervio en un Eppendorf con 500 µl y los encéfalos en un tubo falcón (15 ml) con 5 ml. Tras ello, se bloquea la acción de la tripsina añadiendo el mismo volumen de suero fetal bovino (FBS). En cuanto a la disgregación mecánica, normalmente se realiza

mediante la utilización de una pipeta Pasteur de cristal, con el interior siliconado, que provoca el rozamiento y aísla las células (Ghosh et al., 1997).

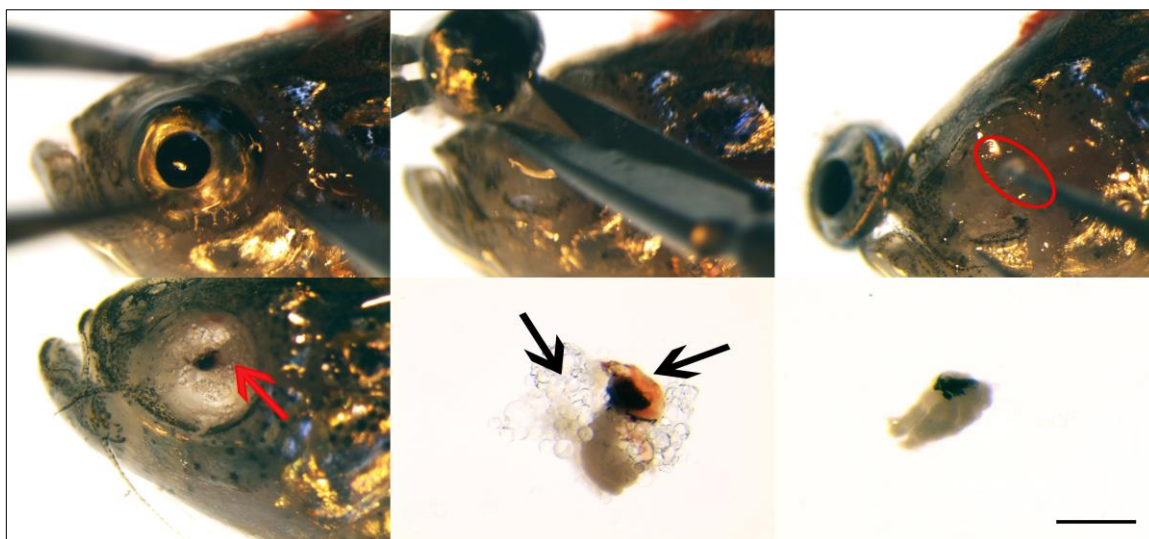


Figura 13: Proceso de disección del nervio óptico. Imagen de un pez cebra adulto bajo una lupa binocular. Tras la extracción del ojo y exposición del NO (elipse roja), se extrae el NO de ambos ojos (flecha roja), y se deposita en PBSSup (o PBS). Después, se eliminan los sobrantes de tejido conjuntivo y sanguíneo (flechas negras) hasta aislar completamente el nervio. Barra de escala: 1 cm

Los volúmenes con los que se ha trabajado en esta investigación han sido demasiado pequeños y dicha técnica no ha funcionado. La alternativa fue acoplar dos puntas de micropipetas (p20 y p200), que también provocan rozamiento y la disgregación tisular (Fig. 14). No obstante, los cultivos procedentes de NO solo han dado resultado en los casos que la disgregación no fue completa. Aunque los explantes directos del NO no han resultado en muchas células adheridas a la superficie, en las muestras en que la disgregación fue tan exhaustiva como en las muestras de encéfalo no se ha obtenido ninguna célula *in vitro*.

A continuación se han centrifugado las células a 1400 revoluciones por minuto (RPM) durante 5 minutos. En el caso de las muestras



Figura 14: Fotografía del sistema de dos puntas de micropipetas acopladas, utilizada para la disgregación mecánica.

del encéfalo, antes de la centrifugación, se descartan aglomerados utilizando una rejilla de 70 μm (Cell Strainer; *Falcon*, 352350). Se ha eliminado el sobrenadante por aspiración y re-suspendido el precipitado en el medio de cultivo. Muchos trabajos sobre el cultivo de células gliales utilizan el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), y/o sus variantes. Una característica importante de la composición de estos medios es que, como sistema de tampón se utiliza bicarbonato de sodio, lo que implica el requerimiento de niveles artificiales de CO_2 (5% - 10%) para mantener el pH óptimo (7.4 - 7.6).

En Salamanca, la estufa utilizada para mantener los cultivos, adaptada para el sistema de peces, no dispone de control automático de niveles de gas carbónico. La alternativa fue añadir una cámara a la estufa y controlar los niveles de CO_2 con una bomba de inyección externa. En los ciprínidos en ningún caso se han obtenido células en cultivos procedentes de NO utilizando este sistema. Además, a diferencia de los carpines, en los peces cebra tampoco se ha logrado obtener células procedentes del encéfalo. En Tübingen, al disponer de una estufa con control de los niveles de gas carbónico, utilizando peces *A. burtoni*, se han podido obtener exitosamente cultivos utilizando el medio DMEM/F12 (Sciencell, SC-09421). Por otro lado, el medio de Leibovitz (L15; Biowest, L0300-500) no presenta dichos requerimientos de los niveles de CO_2 para mantener el pH del medio, y ha funcionado en las tres especies.

En cuanto a contaminaciones, no se han presentado problemas recurrentes, por lo que se ha mantenido la concentración de antibiótico/antimicótico inicial (Mack y Tiedemann, 2013). Se ha suplementado el medio L15 con 0%, 5%, 10% y 20% de FBS para determinar la concentración óptima. Se han obtenido células *in vitro* tanto en los cultivos con medio al 10% como con medio al 20% de FBS. La concentración óptima para iniciar cultivos de NO fue del 20% y para los cultivos de encéfalo fue del 10% (Tabla 2).

Además, se han probado diferentes placas de cultivo, con áreas de 3,5, 1,9 y 9,6 cm^2 -y con diferentes tratamientos de superficie: placas con superficie Delta, placas con poli-lisina y placas con poli-ornitina. Las diferentes placas no han presentado

diferencias importantes en la adhesión celular tras 24 horas de cultivo, y se han utilizado las placas de 6 pocillos con superficie Delta (Nunc, 140675).

Tabla 2: Composición de los medios de cultivo utilizados.

Medio de cultivo	Tejido utilizado	Suplementos
L 15	Nervio Óptico	20% FBS Antibióticos Antimicoticos
L 15	Encéfalo	10% FBS Antibióticos Antimicoticos

Para la siembra, se depositan 200 μ l de la suspensión celular del NO en cada pocillo, que se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y bajo campana. A continuación, se añade el medio de cultivo hasta alcanzar el volumen total de 2 ml por pocillo (1800 μ l). Las muestras de encéfalo se han sembrado directamente 2 ml por pocillo o 3 ml por *flask*. En la figura 15 se ilustran los cultivos obtenidos tras aplicar cada protocolo. Además, para favorecer la adhesión celular, se han rajado contra la superficie de la placa los pequeños trozos de NO utilizando pinzas.

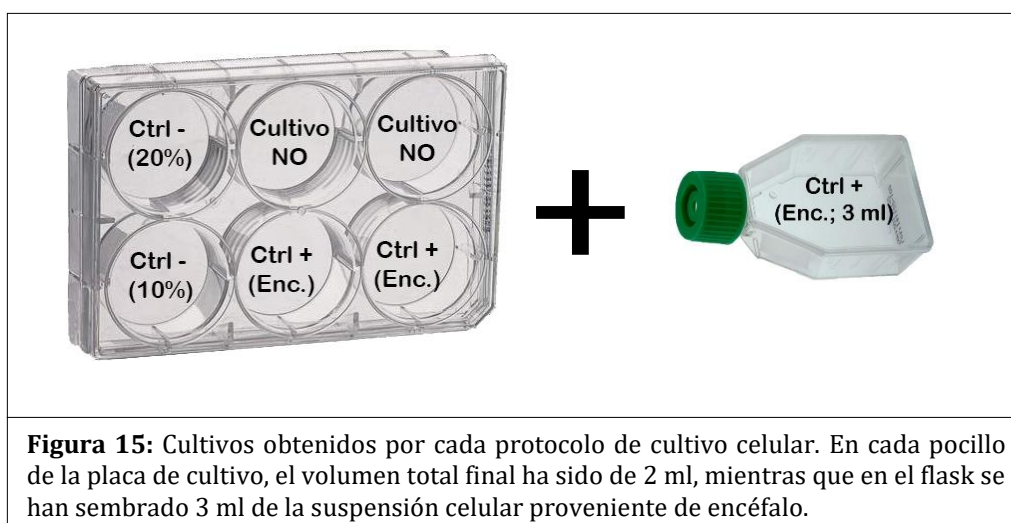


Figura 15: Cultivos obtenidos por cada protocolo de cultivo celular. En cada pocillo de la placa de cultivo, el volumen total final ha sido de 2 ml, mientras que en el flask se han sembrado 3 ml de la suspensión celular proveniente de encéfalo.

Todos los cultivos se mantuvieron a $28.5 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 24 horas en la estufa, se ha realizado el primer cambio del medio para eliminar células muertas y restos celulares. Para ello, y para todas las siguientes renovaciones del medio, se aspira el medio cuidadosamente y, sin lavar la placa, se deposita el medio nuevo gota a gota, para no dañar las células adheridas. Los demás cambios se han realizado cada 3 – 4 días.

3.2.1. Medio de cultivo modificado

A partir del segundo cambio del medio de cultivo, en los pocillos con células procedentes del NO, se ha modificado el medio de cultivo con el fin de mejorar la viabilidad celular. Para obtener dicho medio, se recojen los medios de cultivo presentes en los pocillos con células de encéfalo y se filtra dicho medio utilizando jeringuillas con filtros acoplados ($0.22 \mu\text{m}$ de poro; *VWR collection*, 514-0064). En este mismo tubo, con el medio procedente del cultivo de encéfalo filtrado, añadimos el mismo volumen del medio de cultivo L15 suplementado para NO (20% FBS; tabla 2). Posteriormente, se cambian los medios de cultivo de NO de la misma manera que lo descrito en 3.2 utilizando el medio modificado para mantener las células de NO *in vitro*.

3.2.2. Ampliación de los cultivos celulares por resiembra

En los cultivos celulares en los cuales las células han proliferado hasta ocupar el 70 – 80% de la superficie de la placa, se han aplicado técnicas de ampliación por resiembra. Para ello, primeramente, se han incubado los cultivos durante 3 – 5 minutos a temperatura ambiente y agitación leve, en 500 μl (por pocillo) de tripsina-EDTA (0,05%). Tras comprobar en el microscopio que la mayoría de las células se habían levantado, se ha bloqueado la acción enzimática añadiendo 500 μl de suero fetal a cada pocillo.

3.2.3. Análisis de la proteómica de los medios de los cultivos celulares

El análisis proteómico de los diferentes medios de cultivo (procedentes de los cultivos de NO, encéfalo y el medio L15 suplementado), se ha realizado en colaboración con el Dr. Fernando Sánchez Juanes [Unidad de Proteómica clínica del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)], según protocolos

previamente descritos (Ferreira et al., 2012). Los medios analizados se han recogido tras 10 días de cultivo de los pocillos con células procedentes de NO, con células del encéfalo y sin células (utilizado como control negativo). Tras filtrar los medios (0,22 μ m) se han procesado en la Unidad de Proteómica clínica del IBSAL.

La técnica de electroforesis bidimensional (2DE) consiste en separar las proteínas, en base a su punto isoeléctrico y su peso molecular, en un gel para poder identificarlas posteriormente. Para ello primeramente se precipitan las proteínas de los medios utilizando el kit comercial 2D Clean-up (GE Healthcare, Madrid) según las instrucciones del fabricante. Se recoge un volumen igual de proteínas de cada muestra y se rehidratan en 340 μ L de tampón de rehidratación [contiene urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, anfolitos de pH 3-11 0.5 % (tampón de IPG; del inglés *Immobilized pH gradient*), DTT 50 mM y azul de bromofenol 0.002 %]. Para el enfoque isoeléctrico se ha empleado un equipo de electroforesis para focalización isoeléctrica IPGphor™ (GE Healthcare). Se realizó una rehidratación activa de la tira a 30 – 60V durante 12 horas y, tras ello se inicia la electroforesis a 500V; este voltaje se va incrementando gradualmente hasta los 8000V, en el que se mantiene durante 6 horas. Posteriormente se equilibran las tiras IPG durante 15 minutos en una solución tampón con DTT al 1% (p/v), seguido de otra incubación durante 15 minutos en tampón de equilibrado [contiene urea 6M, glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 1,5 M PH 8,8, SDS 2% (p/v) y azul de bromofenol 0,002 % (v/v)] con yodoacetamida al 2,5% (p/v). La separación en la segunda dimensión se hizo en geles de poliacrilamida (160 x 180 x 1 mm; contiene 30 % solución de acrilamida y bisacrilamida 37.5:1 Bio-Rad en H₂O, 1.5 M Tris pH 8.8, 10 % SDS, 10 % APS y TEMED) que se cargaron a 40 mA en un equipo de electroforesis Ruby SE600 (GE Healthcare).

Posteriormente se fija el gel con las proteínas durante 30 minutos utilizando metanol al 30% y ácido acético al 10%. Luego se añaden 100 mL de Sypro Ruby (Molecular Probes), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realiza una incubación durante toda la noche y en oscuridad. Tras revelar las proteínas teñidas en el gel, y procesar las imágenes, se identifican las manchas (*spots*) encontradas.

Los parámetros utilizados para la identificación de las manchas de proteínas han sido: (i) factor *smooth* ≤ 2 , referente a la resolución mínima que el

programa debe considerar como válida; (ii) área de 5 píxeles, referente al tamaño mínimo que la mancha debe ocupar para que el programa la considere como proteína; (iii) predominancia o *saliency* igual a 100, que corresponde al umbral mínimo de fluorescencia detectada, en comparación con zonas no fluorescentes, para que el programa considere la mancha un dato válido. Además, se han eliminado manualmente posibles artefactos de la imagen.

Las manchas de proteínas encontradas se han aislado del gel, lavadas en bicarbonato amónico 25mM y deshidratadas en acetonitrilo (ACN) durante 10 minutos. Tras eliminar el ACN se dejan las muestras evaporando hasta que se sequen completamente. Se elimina el sobrenadante y, tras lavar el precipitado en NH_4HCO_3 (50mM) durante 10 minutos, se vuelven a deshidratar las muestras (en ACN como lo descrito anteriormente).

Las muestras se rehidratan en NH_4HCO_3 (50mM) con tripsina (Promega, Madison), se digiere el gel durante toda la noche a 37°C, en una solución de NH_4HCO_3 (25mM). Los péptidos se extraen en dos pasos: (i) 8 μl de ACN y (ii) ácido trifluoroacético (TFA) al 0,2% (v/v) en agua. Tras ello se re-suspenden los péptidos en 8 μl de TA (contiene 0.1% TFA/50% ACN). Los péptidos precipitados se disuelven en trifluoroacético al 0,1% (v/v) para el análisis MALDI-TOF.

La identificación de proteínas se ha finalizado utilizando el programa informático MASCOT (Matrix Science, London) asociado a una base de datos de secuencias de proteínas (Swiss Prot). Solo se han considerado válidos los resultados MASCOT con una probabilidad estadísticamente significativa (p-valor $\leq 0,05$).

3.3. Aclaramiento tisular

Las técnicas de aclaramiento tisular consisten en hacer los tejidos transparentes para poder ser observados posteriormente, manteniendo su estructura celular general. Según los productos que se utilicen, los métodos de aclaramiento tisular se pueden dividir en cuatro grupos: métodos basados en solventes orgánicos, los basados en inmersión del tejido en soluciones acuosas, métodos basados en una hiperhidratación del tejido por urea, y los métodos que se basan en la inmersión del tejido en hidrogeles que posteriormente se polimerizan.

Para este trabajo de investigación se han empleado dos protocolos de aclaramiento tisular. Por un lado, el método denominado iDISCO del grupo de solventes que deshidratan y transparentan la muestra y, por otro, el método conocido como PACT que utiliza hidrogeles polimerizados. En los animales transgénicos se ha aplicado el protocolo para el aclaramiento por iDisco, también se ha aplicado esta técnica en retinas *in toto*. Para los animales de tipo silvestre se ha empleado la técnica PACT.

3.3.1. Técnica iDisco

La técnica iDisco se basa en la inmersión del tejido en disolventes orgánicos con el fin de hacerlos transparentes. Una vez obtenidas las muestras para la deshidratación y fijación, se incuban en concentraciones crecientes de metanol durante 1 hora (20%, 40%, 60%, 80%, 100%), a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se deja el tejido en metanol 100% durante toda la noche a 4°C y en agitación.

Al día siguiente las muestras se incuban en una solución 2/3 metanol y 1/3 diclorometano durante 3 horas, a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se han realizado dos lavados en diclorometano 100% a temperatura ambiente y en agitación durante 15 minutos. Bajo campana, se sumergen las muestras en dibencil éter donde se almacenan a 4°C, sin agitación, al menos 12 horas y/o hasta el momento del análisis bajo el microscopio.

3.3.2. Técnica PACT

La fijación de las muestras se realiza mediante una solución conocida como “solución HM” (del inglés *hydro monomer*). Para cada protocolo se prepara una cantidad adecuada de solución HM fresca pocas horas antes de la disección. Su composición es la siguiente: PFA al 4% (pH =7.4) en PBS 0.1M, Acrilamida al 40%, Bis-Acrilamida al 2% y el acelerador de la polimerización conocido como VA-044 al 0.5% {2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl) propane]dihydrochloride}.

Se incuban los tejidos durante toda la noche a 4°C en la solución HM para que la misma pueda penetrar adecuadamente. Al día siguiente se trasladan las muestras a una solución HM limpia para la polimerización del hidrogel, que se realiza en ausencia de oxígeno a una temperatura de 50°C durante 3 horas.

A continuación se realizan repetidas incubaciones, de 2 días de duración cada una, en SDS 8% a 37°C y en agitación. Cuando el tejido es ópticamente transparente se para dicho tratamiento y se procede a lavarlo en PBS con Tritón X (PBST) al 0.3% durante al menos 3 días, a 37°C y en agitación. El PBST se cambia cada 24 horas. El tiempo necesario para el aclaramiento depende del tamaño del tejido; mientras que los NO provenientes de pez cebra se aclaran aproximadamente a los 6 días de incubación, las muestras de encéfalo del pez ciclído necesitan al menos 10 días para aclararse por completo. Posteriormente se pueden realizar técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) sobre los tejidos.

3.4. Inmunohistoquímica (IHQ)

La IHQ es un procedimiento que detecta, mediante anticuerpos, antígenos presentes en las células. Los anticuerpos utilizados se resumen en la Tabla 3.

3.4.1. IHQ sobre secciones

Para obtener los órganos para los análisis de secciones, se ha anestesiado profundamente a los animales en agua helada para su decapitación. Bajo lupa, y en PBS o NaCl al 0,9%, se han disecado las regiones de interés (Fig. 3). Utilizando tijeras y pinzas de precisión se han extraído los componentes del sistema visual de todos los animales: globos oculares, nervios ópticos y encéfalo. A continuación se lavan las muestras en PBS durante 3 minutos, a temperatura ambiente y agitación, antes de sumergirlas en el fijador.

Las muestras se han fijado utilizando PFA al 4% (v/v) en PBS 0,1M pH 7.4, en una incubación durante toda la noche a 4°C. Tras lavar los órganos en PBS, se han sumergido en sacarosa al 30% (v/v) en agua destilada durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, para su seccionamiento o su almacenamiento, se han incluido los órganos en moldes con medio OCT (del inglés *Optimal cutting temperature compound*; Sakura, 4583) convenientemente orientados. Tras ello se han obtenido secciones de 14 µm de grosor mediante su corte en criostato (*Leica* CM1850; *Thermo Scientific* HM560, HM550).

Para realizar la IHQ se atemperan las secciones a temperatura ambiente durante al menos 2 horas. Para eliminar el OCT y rehidratar el tejido, se lavan los portaobjetos en PBST al 0,02%. Después de tres lavados de 10 minutos cada, se

realiza una incubación de bloqueo, durante 90 minutos a temperatura ambiente. La incubación de bloqueo consiste en incubar las secciones en suero fetal no inmune, en este caso procedente de asno (DK; del inglés donkey), para facilitar la penetración de los anticuerpos y evitar las uniones inespecíficas de los mismos al tejido. Para ello se han depositado 300 μ l de una solución 5% de suero DK (v/v) en PBST (0,02%) por cada portaobjetos.

Posteriormente se añade dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% (v/v) y el anticuerpo primario en la concentración adecuada (Tabla 3A) a dicha solución. La incubación con el anticuerpo primario se realiza durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se eliminan los restos de anticuerpo con tres lavados de 10 minutos en PBS. Luego se realiza una incubación con los anticuerpos secundarios, en una solución de 5% (v/v) de suero DK en PBS y el anticuerpo secundario en la concentración correspondiente (Tabla 3B); durante 90 minutos a temperatura ambiente.

En las IHQ para detectar el antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA, del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), antes de la incubación de bloqueo, se realizó una incubación en HCl 2N durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación se lavan durante 10 minutos en PBS y se procede a incubar las muestras en 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o DRAQ5™; a una concentración de 1: 10 000 (en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras realizar los lavados pertinentes se montan las secciones con cubreobjetos utilizando el medio fluoromont o mowiol.

3.4.2. IHQ de retinas *in toto*

Antes del sacrificio los animales se han mantenido al menos 2h en oscuridad. Ello provoca que las prolongaciones de las células del EP se retraigan y se separen de las otras capas de la retina, lo que facilita la disección del tejido.

Primeramente se extirpan los ojos utilizando tijeras, y se limpia alrededor del globo ocular eliminando el tejido conjuntivo. Con la utilización de pinzas de precisión se eliminan cuidadosamente las capas oculares externas (esclerótica y coroides y el EP), hasta disponer solo de la retina. La fijación de las muestras se realizó en PFA 4% durante toda la noche a 4°C. Después de los lavados en PBS para

eliminar el fijador, se ha aplicado directamente la técnica IHQ, o bien se las ha almacenado en PBS a 4°C hasta su uso.

La IHQ se diferencia con el protocolo utilizado para las secciones en los tiempos de incubación, la concentración del Tritón en el PBST (0,3% en lugar de 0,02%) y en que los lavados y controles han sido más numerosos. Se ha realizado la incubación de bloqueo con el mismo medio descrito anteriormente, durante al menos 2 horas y media, a temperatura ambiente y en agitación. A continuación se procede a la incubación con el anticuerpo primario (Tabla 3A), añadiendo DMSO 1% y el anticuerpo correspondiente, durante 4 o 7 días a 4°C y en agitación.

Después de tres lavados de 30 minutos en PBS, se incuban las retinas en una solución similar a la descrita en el apartado anterior, con el anticuerpo secundario (Tabla 3B). En estos casos se ha añadido directamente el DAPI a dicha solución, y la incubación se realiza durante toda la noche a 4°C y en agitación. Tras los lavados en PBS se montan las retinas en portaobjetos, utilizando el medio fluoromont o ProLong Gold.

3.4.3. IHQ en células obtenidas por cultivo celular

Tras retirar el medio de cultivo y realizar tres lavados en PBS estéril, se fijan las células utilizando PFA 4%, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se lava la placa tres veces para eliminar los posibles restos de fijador, durante 10 minutos en PBS a temperatura ambiente y en agitación. Los cultivos procedentes de animales transgénicos se han mantenido en ausencia de luz durante todas las etapas del protocolo para no perder la fluorescencia.

El protocolo de IHQ utilizado para los cultivos fue muy similar al llevado a cabo en secciones. El bloqueo fue de una hora a temperatura ambiente y en agitación, la incubación con los anticuerpos primarios (Tabla 3A) fue durante toda la noche a 4°C, y la incubación con el anticuerpo secundario (Tabla 3B) fue durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después se ha realizado una incubación con DAPI (1:10 000) en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las células tres veces más en PBS, se montan los pocillos con un cubreobjetos de cristal bajo el medio de montaje fluoromont o mowiol.

3.4.4. IHQ de tejidos aclarados

Después de los lavados en PBST (0.3%) para eliminar el SDS 8% se procede a aplicar la IHQ en los tejidos transparentes. En los tejidos aclarados dicha técnica se diferencia principalmente en que todas las incubaciones se realizan a 37°C y en agitación. Para el bloqueo se incuban las muestras durante 4 días en una solución con suero DK al 5% y DMSO al 1%, en PBT 0.3%. A continuación se añade una solución nueva de bloqueo que, además, contiene el anticuerpo primario (Tabla 3A) y se incuba durante 5 días.

Para eliminar los restos de anticuerpo primario se lavan las muestras cuatro veces durante 2 horas. Después se realiza un lavado durante toda la noche en PBS limpio. Al día siguiente se incuban en una solución con el anticuerpo secundario (Tabla 3B), DAPI o DRAQ5 (1:10 000) y suero DK al 5% en PBS, durante al menos 3 días. Tras cuatro lavados de 2 horas en PBS, se procede al análisis bajo microscopio. Los tejidos aclarados se observan sumergidos en glicerol al 80%, utilizando placas Petri con fondo de cristal (VWR, 734-2904).

Tabla 3A: Anticuerpos primarios

Antígeno	Hospedador	Referencia	Dilución de uso	Observación
Calretitina (CR)	Ratón	Swant; 6b3	1: 1000	Proteína de unión al calcio
Acetil Colina Transferasa (ChaT)	Ratón	Chemicon; AB144P	1: 100	Enzima necesaria en la formación del neurotransmisor acetilcolina
Doblecortina (DCX)	Cabra	Santa Cruz; sc-8066	1:100	Proteína presente en axones en crecimiento; No funciona en los peces ciprínidos

Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)	Ratón	Sigma Aldrich; G6171	1:300	Proteína típica del citoesqueleto de astrocitos
GFAP	Ratón	ZIRC; zrf1	1:400	Proteína típica del citoesqueleto de astrocitos
Glutamina Sintetasa (GS)	Ratón	Millipore; mab302	1:500	Enzima del catabolismo de la glutamina
Neuroлина	Ratón	Zn8; DSHB	1:300	Proteína presente en axones inmaduros. No funciona en el cíclido
Antígeno Nuclear de Células Proliferativas (PCNA)	Ratón	Santa Cruz; sc- 56	1:300	Detecta células en proliferación
Parvalbúmina (PV)	Ratón	Sigma Aldrich; P3088	1:500	Proteína de unión al calcio
Sox2	Conejo	Seven Hills; WRAB-1236	1:500	Factor de transcripción
Sox2	Conejo	Abcam; (ab97959)	1:500	Factor de transcripción

Tabla 3B: Anticuerpos secundarios

Antígeno	Casa Comercial	Conjugado	Dilución de uso
Anti-ratón	Jackson ImmunoResearch;	Cy2	1: 250
Anti-ratón	Jackson ImmunoResearch;	Cy3	1: 250
Anti-ratón	Jackson ImmunoResearch;	Alexa 488	1: 400
Anti-ratón	Jackson ImmunoResearch;	Alexa 555	1: 400
Anti-conejo	Jackson ImmunoResearch;	Alexa 488	1: 400
Anti-conejo	Jackson ImmunoResearch;	Alexa 555	1: 400
Anti-conejo	Jackson ImmunoResearch;	Cy2	1: 250
Anti-conejo	Jackson ImmunoResearch;	Cy3	1: 250
Anti-cabra	Jackson ImmunoResearch;	Cy5	1: 250

3.5. Citometría de Flujo

En colaboración con el Servicio de Citometría de Flujo de la USAL se han analizado las células gliales de peces adultos transgénicos. Se han utilizado animales doblemente transgénicos, [Tg(gfap:EGFP) y Tg(sox10:TagRFPT)], para cuantificar y separar las células procedentes de NO y encéfalo. Además, se han utilizado animales silvestres y Tg(gfap:EGFP) como controles (ver 4.4).

Para la disección de los tejidos se ha aplicado el mismo mecanismo que para los cultivos celulares. Todos los procesos se realizaron en condiciones de esterilidad, con el fin de sembrar a las células después de su separación por citómetro de flujo.

Una vez obtenidas las suspensiones celulares, en lugar de resuspender el precipitado en el medio de cultivo, se han utilizado 500 µl de PBSsup. En algunas muestras se ha añadido DRAQ5 para detectar a las células viables. Tras la separación de las células, atendiendo a la fluorescencia presente en cada tipo

celular, se han centrifugado, resuspendido y sembrado de la misma manera que en el protocolo de cultivo explicado anteriormente.

3.6. Microscopía y análisis de imagen

Para el análisis de las muestras se ha utilizado un microscopio pseudoconfocal Axio Observer Z1, equipado con dispositivo Apotome (Zeiss). En el caso de los cultivos celulares se ha empleado un microscopio invertido de epifluorescencia eclipse TE2000-S (Nikkon) con una cámara DC350F (Leica) acoplada. Para las muestras analizadas en Alemania, en colaboración con el grupo del Dr. Mack, se ha utilizado un microscopio confocal LSM510 (Zeiss). Todos los microscopios utilizados estaban equipados con láseres de excitación a 488, 543 y 633 nm, y con los filtros apropiados. Las imágenes se han capturado con los softwares ZEN 2009, Leica IM50 y ZEN 2011, acoplados a los diferentes microscopios.

El procesado de las imágenes se ha realizado utilizando la versión CS6 del software Adobe Photoshop. Los colores presentados en el apartado de resultados no siempre corresponden a la fluorescencia observada *in situ*; se ha uniformizado al código de colores de los diferentes marcadores para facilitar la comprensión de las figuras.

3.7. Análisis Estadísticos

Diversos datos obtenidos a lo largo del trabajo de investigación se han analizado estadísticamente. Para ello, se han utilizado diferentes pruebas estadísticas según el tamaño de las muestras analizadas y del enfoque del análisis. Para todos los análisis se ha considerado que los resultados son estadísticamente significativos cuando el p-valor fue ≤ 0.05 . El método utilizado para cada caso se explica a continuación:

3.7.1. Cuantificación de las células gliales de NO y encéfalo analizadas por citometría de flujo

El análisis por citometría de flujo permite conocer los porcentajes de las diferentes poblaciones gliales (GFAP o Sox10 positivas) presentes en el NO y encéfalo de pez cebra adulto. Estos porcentajes han sido analizados

estadísticamente utilizando el mismo Software de IBM SPSS. Para dichos análisis se han considerado solo las células viables (DRAQ5 positivas).

Se ha aplicado la prueba de Kolmogorov-Smirnov, con la corrección de Lilliefors. Dependiendo de si los datos presentaban o no una distribución normal de Gauss, se ha aplicado la prueba de Levene y la t-Student para muestras independientes (muestras con distribución normal), o bien la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (muestras con distribución no normal).

3.7.2. Células Sox2 positivas en los componentes pre-encefálicos del sistema visual

Se han analizado al menos 25 secciones procedentes de 5 ejemplares de *A. burtoni* adultos. Primeramente se han cuantificado las células Sox2 positivas presentes en cuatro zonas de interés: CCG de la retina, CNO, y dos porciones del NO. La cuantificación se ha realizado directamente bajo microscopio, con un contador manual.

A continuación se han analizado los resultados con el Software de IBM SPSS, versión 25.0. Se ha aplicado la prueba de Levene y dos pruebas para datos no-paramétricos: prueba de Kruskal-Wallis y prueba de U de Mann-Whitney (aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples).



Resultados



Debes hacer las cosas que crees que no puedes.

Eleanor Roosevelt

4. Resultados

4.1. Aislamiento y caracterización de células gliales provenientes del nervio óptico de peces adultos

El protocolo de cultivo utilizado permitió obtener células procedentes de NO o encéfalo de las tres especies de peces teleósteos. Las dos especies de peces con mayor tamaño, los carpines y los cíclidos, han sido más susceptibles a las variantes del protocolo. El protocolo con el que se obtuvieron mejores resultados en las tres especies fue utilizando el medio L15 suplementado con antibióticos, antimicóticos y 20% de FBS. En los cultivos de encéfalo la concentración óptima de FBS fue del 10%.

El protocolo desarrollado nos ha permitido obtener células gliales adheridas a la superficie de la placa en las tres especies de peces y en los cultivos de peces transgénicos las células observadas presentan fluorescencia (Fig 16). En todos los cultivos de NO se han identificado células aisladas, o formando pequeños grupos, adheridas a la superficie de la placa y células que parten de las rendijas y/o de los trozos de tejido (Fig 16B, C y D).

Los resultados obtenidos en cultivos de encéfalo, utilizados como control, se resumen en la Fig. 17. Cuando las células se dividen hasta ocupar más del 70-80% de la superficie de la placa se ha ampliado a los cultivos de encéfalo por resiembra. No obstante, los cultivos de pez cebra no han llegado a ocupar más del 50% de la superficie en ningún momento, por lo que en dicha especie no ha sido posible ampliar los cultivos.

Las células cultivadas del NO también han presentado capacidad de migración y división (Vídeo 1), llegando a formar grupos celulares (Fig. 18). No obstante, la mayoría de las veces, los intentos de ampliar los cultivos de NO han fallado. Los cultivos han ido presentando más células gradualmente (Fig. 18B, D, F y H), hasta aproximadamente los 10 – 15 días, cuando entran en apoptosis (Fig. 19).

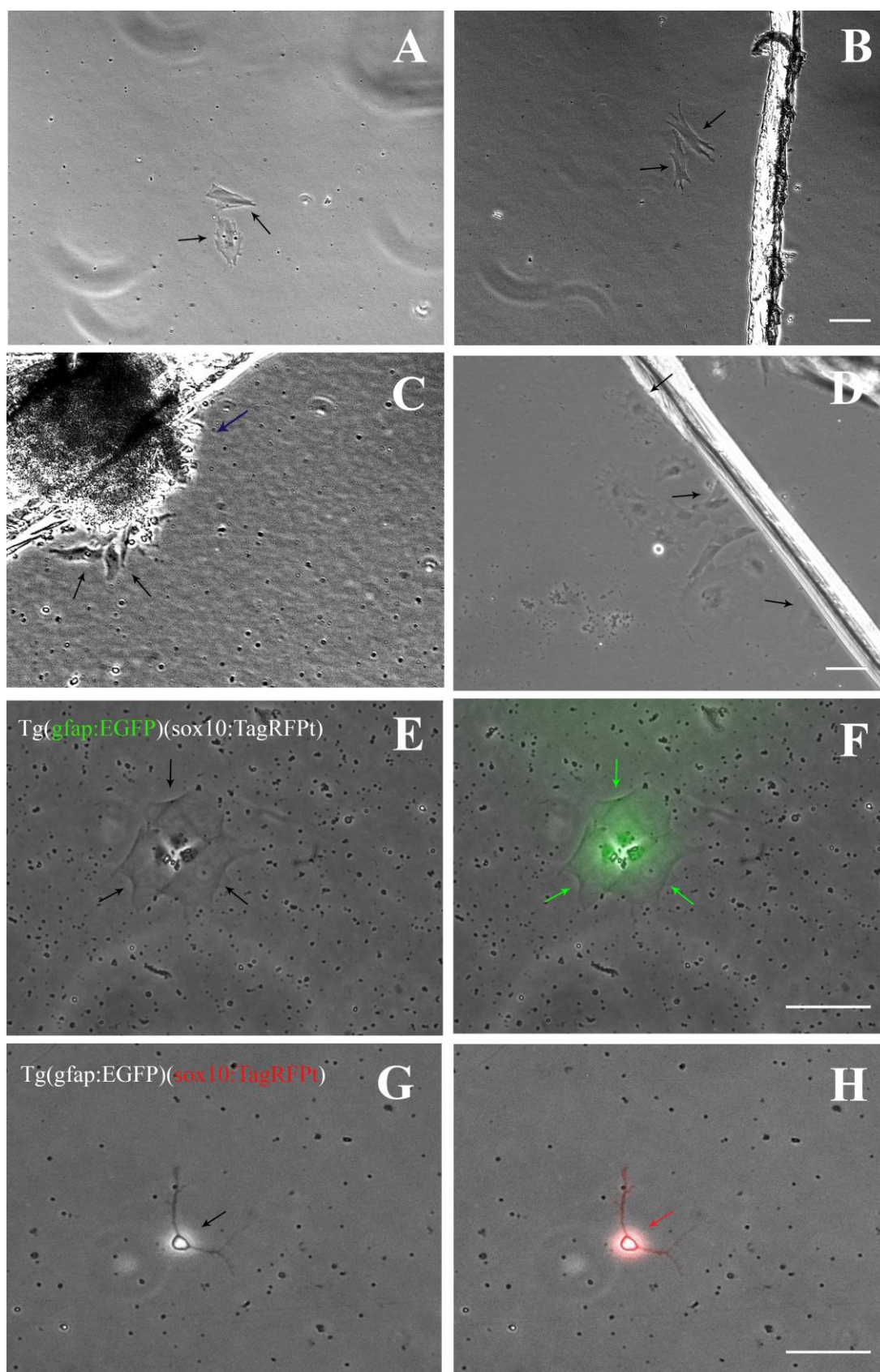


Figura 16: Células procedentes de NO de peces teleósteos tras 24 horas de cultivo celular. En las tres especies, *A. burtoni* (A y B), *C. auratus* (C y D) y *D. rerio* (E-H), se han obtenido células adheridas a la superficie de la placa de cultivo (flechas negras). Células aisladas (A, B y E-H), células que parten de porciones de NO (C; flecha azul) y células que parten de las rendijas de la placa (D). En las células procedentes de animales transgénicos (E-H) se observa la fluorescencia intrínseca asociada (F y H; flechas verdes o rojas). Barra de escala: 125 μ m

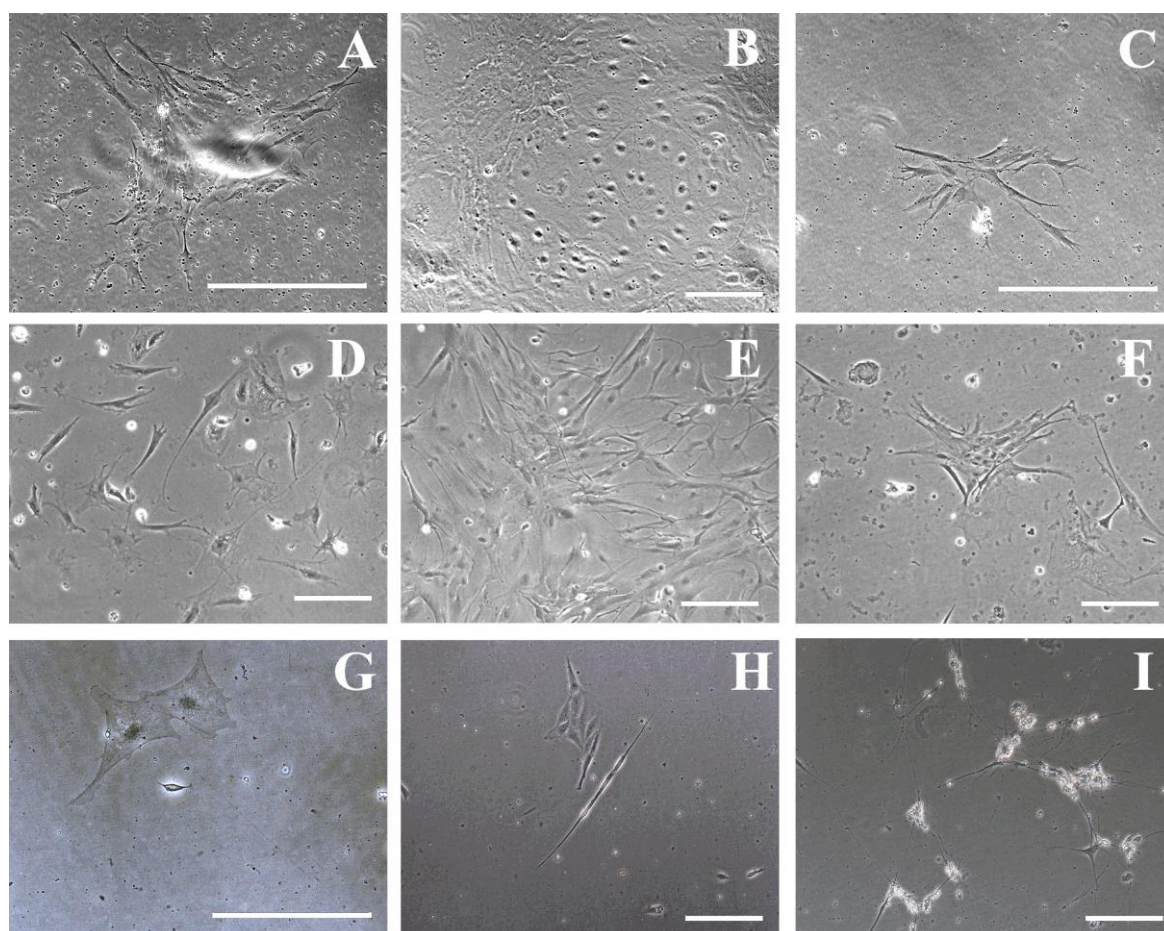


Figura 17: Células *in vitro* procedentes de encéfalo de peces teleósteos. En las tres especies, *A. burtoni* (A – C), *C. auratus* (D – F) y *D. rerio* (G – I), se han obtenido células adheridas a la superficie de la placa de cultivo. Células de cultivos de 5 días (A, D y G), cultivos de 11 días (B y H) y después de 17 días (E y I). Además, con excepción de los cultivos de pez cebrá, se ha podido ampliar el cultivo por resiembra (C y F). Barra de escala: 125 μ m

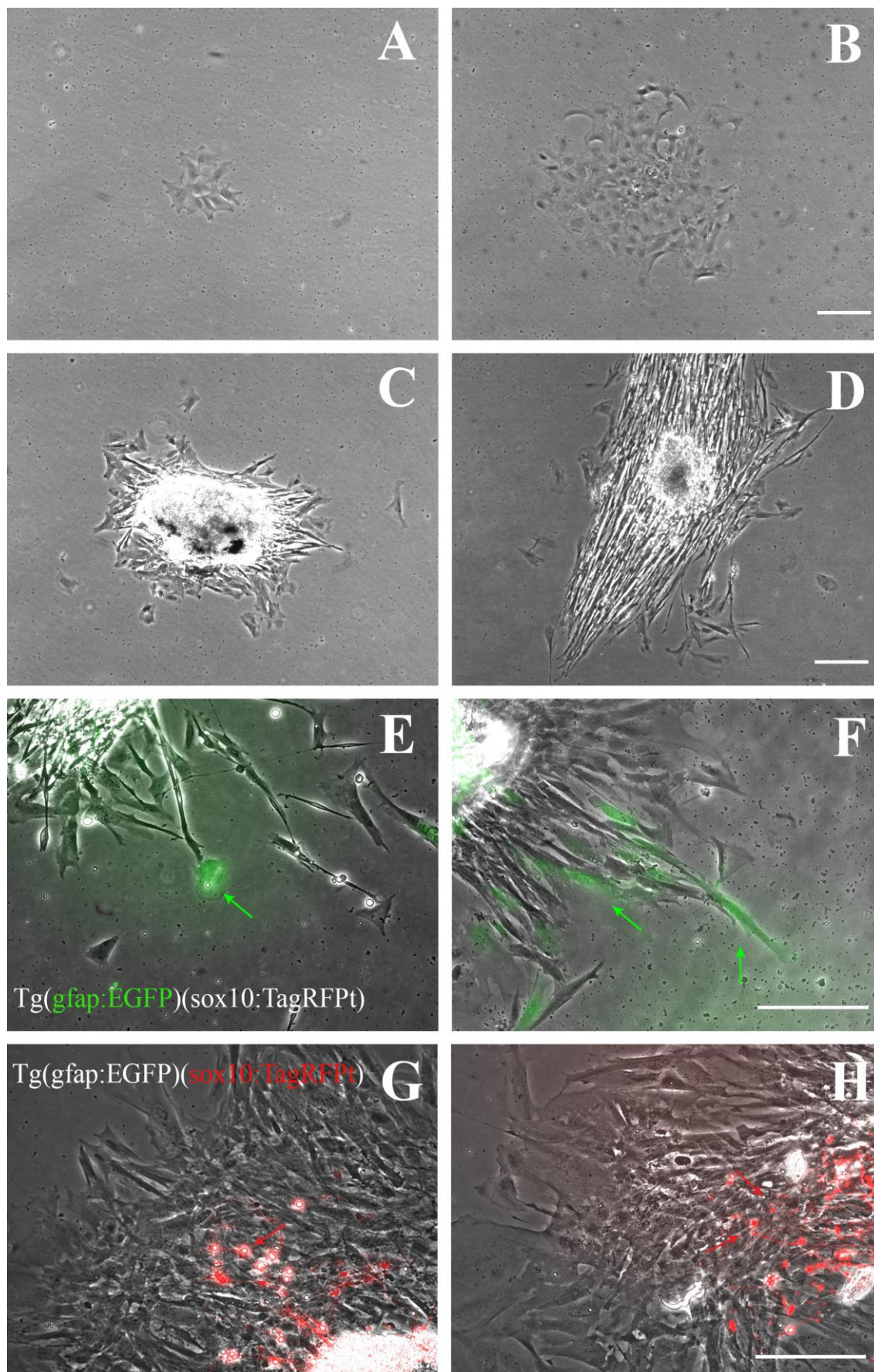


Figura 18: Células *in vitro* procedentes de NO de *C. auratus* (A - D) y *D. rerio* (E - H). Cultivos a los 3 (A y C), 4 (E), 6 (B, D y F), 8 (G) y 10 (H). En todos los cultivos es posible observar un incremento en el número de células adheridas a la superficie. En los cultivos de peces cebra se identifican células GFAP (flechas verdes en E y F) y Sox10 (flechas rojas en G y H) positivas. Barra de escala: 125 μ m

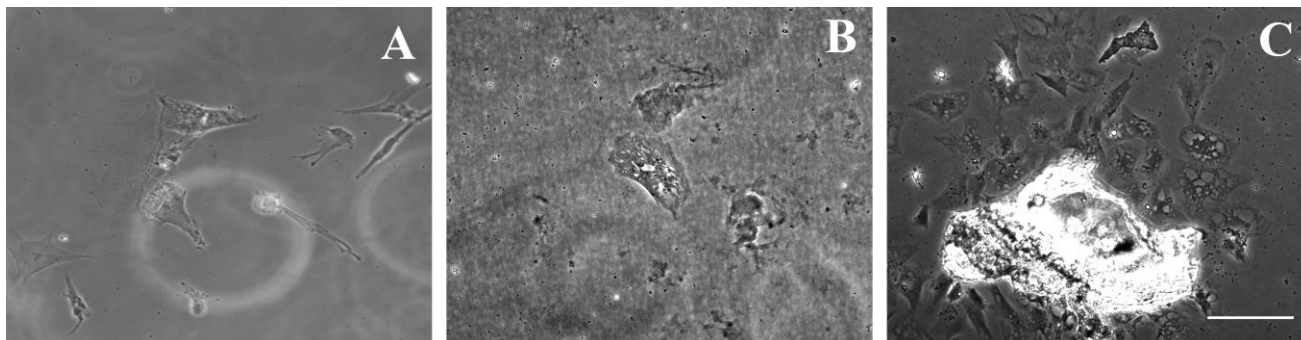


Figura 19: Células procedentes de NO de *A. burtoni* (A), *C. auratus* (B) y *D. rerio* (C). Cultivos celulares a los 10 (A), 12 (B) y 15 días (C), con membranas rotas y apariencia apoptótica. Barra de escala: 125 μ m

Se ha comprobado que, para incrementar la viabilidad de las células, a partir del segundo cambio de medio es más eficaz utilizar un medio de cultivo modificado (descrito en 3.2.3). En todas las especies, el medio de cultivo modificado ha mejorado la viabilidad de las células de NO. Las células de los cultivos de pez cebra han sobrevivido *in vitro* un mínimo de 28 días, mientras que las de los cultivos de las especies de mayor tamaño sobrevivieron más de un mes (Fig. 20). Además, en uno de los cultivos procedentes del NO de carpín ha sido posible ampliar el mismo por resiembra (Fig. 21).

Las células de los cultivos de *C. auratus* y *A. burtoni* se han caracterizado mediante la realización de IHQ utilizando anticuerpos frente a la proteína GFAP (Fig. 22). Además, se ha aplicado IHQ para detectar la proteína Conexina-43 en cultivos de *A. burtoni* (Fig. 23), y la proteína Sox10 en cultivos de *C. auratus*.

Todas las células presentes en los cultivos de NO del carpín y del cíclido han sido positivas para GFAP (Fig. 22). Las células GFAP positivas presentan un gran soma, con un núcleo de tamaño grande y numerosas prolongaciones cortas. Son las más abundantes en los cultivos de las tres especies, y las únicas identificadas en los cultivos de NO de carpín y cíclido. La IHQ para Conexina-43 en cultivos de *A. burtoni*, ha puesto de manifiesto que las células GFAP positivas de los cultivos también eran positivas para dicha proteína (Fig. 23). Estos resultados sugieren que las células obtenidas *in vitro* son mayoritariamente células de la familia de los astrocitos.

En los cultivos vivos (no fijados) de peces cebra, se han identificado al menos dos tipos celulares, con distinta fluorescencia transgénica asociada y

morfológicamente diferentes (Figs. E – H en 16 y 18). Además de las células GFAP positivas (Figs. E y F en 16 y 18), hay otras células que expresan *sox10* (Figs. G y H en 16 y 18).

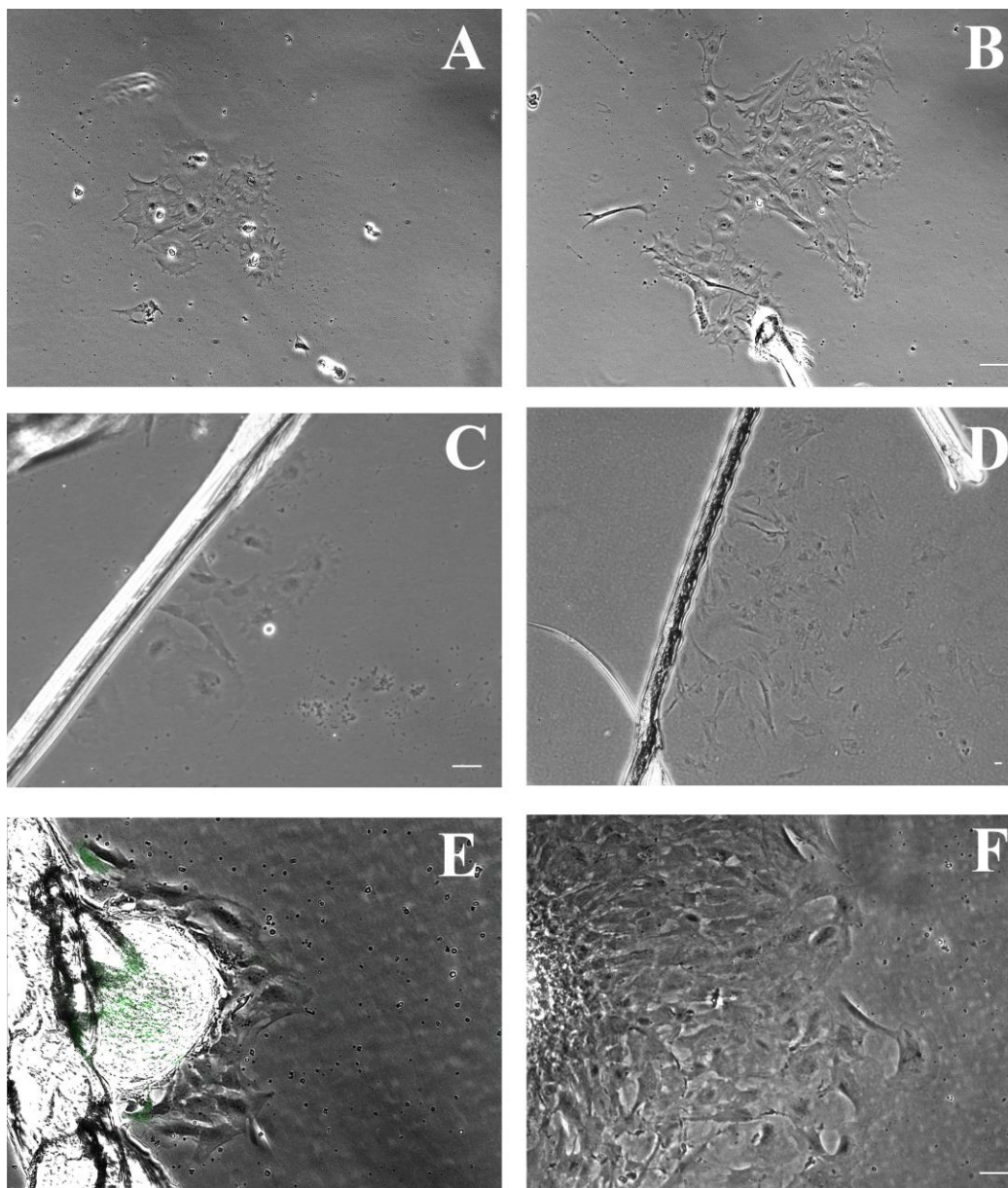
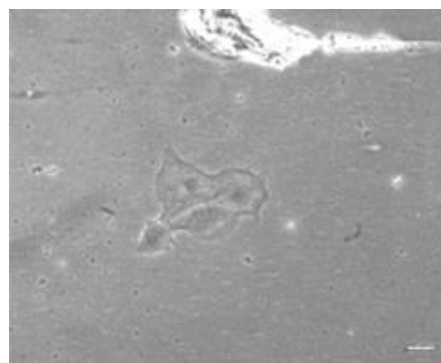


Figura 20: Evolución de los cultivos celulares de NO después de la optimización del medio de cultivo. Células de *A. burtoni* (A y B), *C. auratus* (C y D) y *D. rerio* (E y F). Cultivos a los 3-5 días (izquierda) y después de al menos un mes (derecha). Barra de escala: 20 μ m

Figura 21: Células de NO de carpín después de ampliar el mismo por resiembra. Barra de escala: 20 μ m



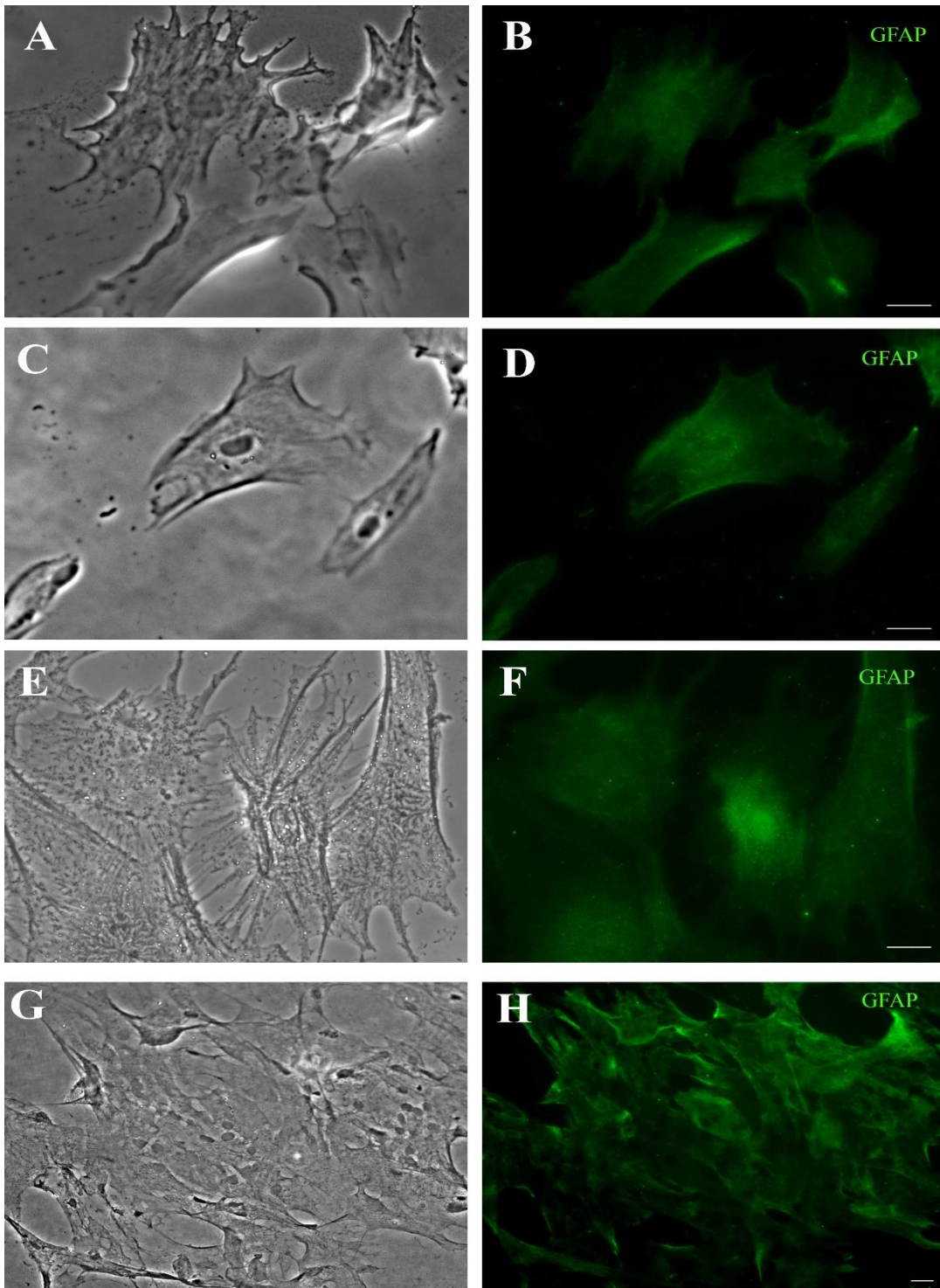


Figura 22: Células *in vitro* de NO de *A. burtoni* (A–F) y *C. auratus* (G y H). Caracterización de los cultivos celulares mediante la técnica de IHQ frente a la proteína GFAP. Barra de escala: 20

Dichas células son de menor tamaño y presentan dos prolongaciones largas que parten desde su soma con direcciones opuestas (Fig. 16E y F). Su morfología y la expresión de Sox10 indican que muy probablemente pertenecen a la familia de los oligodendrocitos. No obstante, en cultivos de carpín no hemos visto ninguna célula Sox10 positiva.

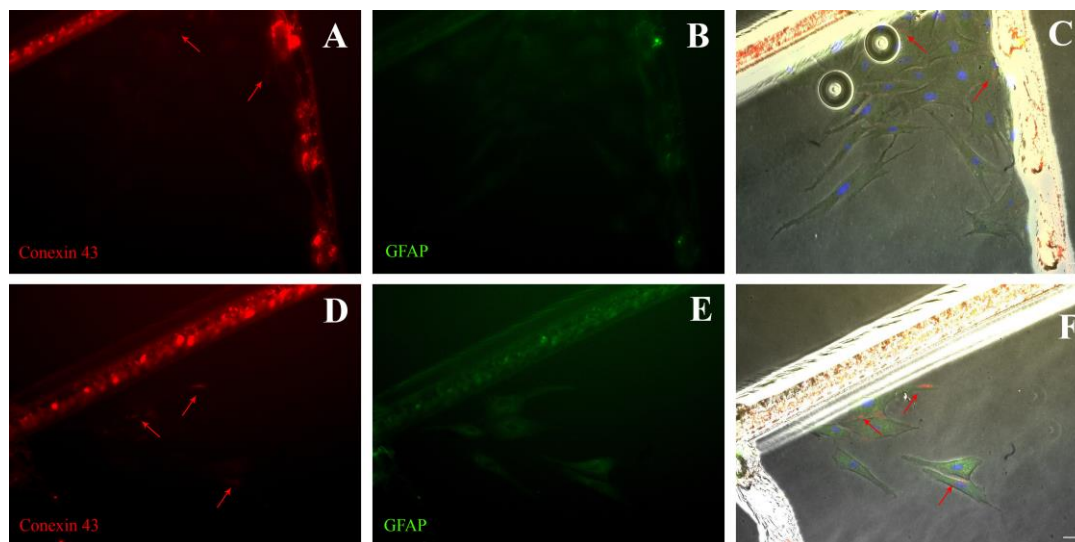


Figura 23: Células procedentes de NO de *A. burtoni*. IHQ para la detección de Connexina 43 (A y D) y GFAP (B y E), y la composición de imágenes (C y F). En las imágenes se indican el marcaje frente a Connexina 43 (flechas rojas) ubicados en las zonas de contacto celular. Barra de escala: 20 μ m

4.2. Proteómica del medio de cultivo modificado

Gracias a una colaboración con el Dr. Fernando Sánchez Juanes, de la Unidad de Proteómica de la USAL, se han analizado los diferentes medios de cultivo. La presencia del suero fetal en la composición de los medios de cultivo utilizados, y enviados para el análisis, han afectado a la resolución de los resultados. No obstante, se han podido caracterizar las proteínas del suero como albuminas y se han identificado tres manchas (*spots*) de proteínas exclusivas de los medios procedentes de los cultivos de encéfalo.

Estas manchas no están presentes en los demás medios y se han identificado como Transtiretina. Esta proteína, cuya función es transportar tiroxina y la proteína de unión al retinol, es la proteína más común del líquido cefalorraquídeo de vertebrados (Rabah et al. 2019; Power et al., 2000).

4.3. Células Sox2 positivas procedentes de cultivos celulares de NO

Se han identificado células Sox2 positivas, procedentes del NO, en cultivos de *A. burtoni* (Fig. 24) y *C. auratus* (Fig. 25). Las células de los cultivos han sido positivas para Sox2 en su gran mayoría (Fig. 24). Aunque generalmente Sox2 se encuentra en el núcleo celular (Fig. 25), en cultivos de *A. burtoni* se han identificado células en las cuales el marcaje se detecta extendido en el citoplasma (Fig. 24D – F).

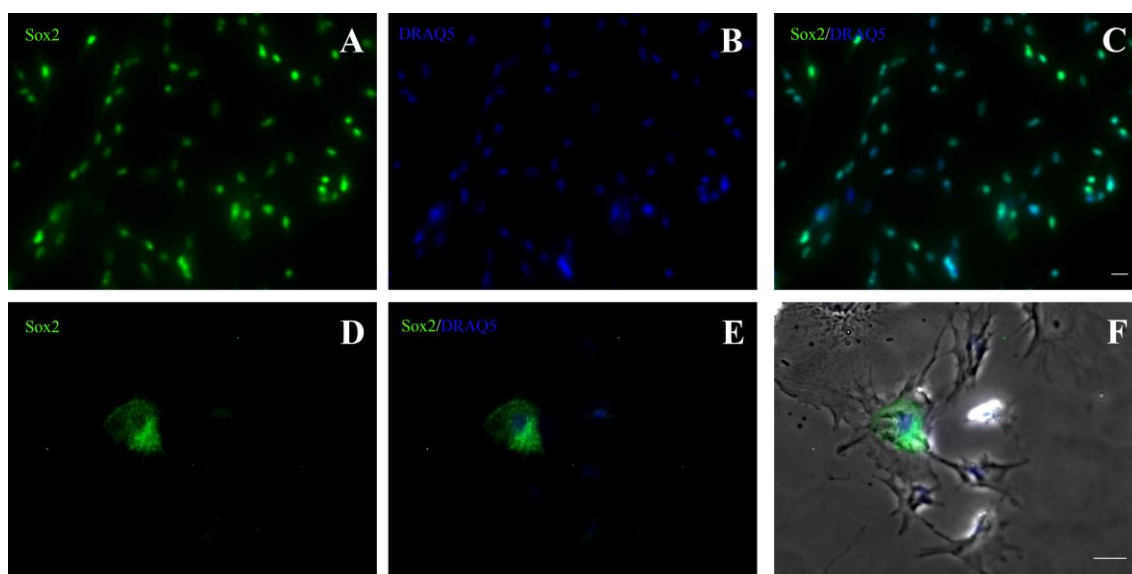


Figura 24: Células procedentes de NO de *A. burtoni*. IHQ para la detección de Sox2 (A y D) y DAPI (B y E), y la composición de imágenes (C y F). En la imagen F se observa la localización citoplasmática del marcaje. Barra de escala: 20 μm

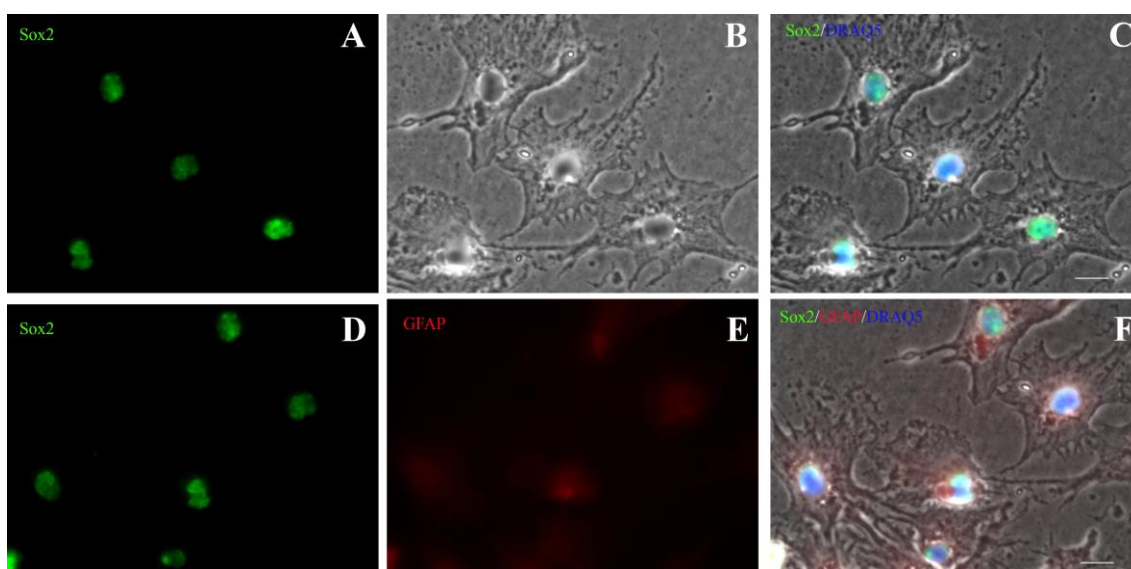


Figura 25: Células procedentes de NO de *C. auratus*. IHQ para la detección de Sox2 (A y D) y GFAP (E). En B se observa la morfología celular en una imagen de transmisión y en C y F la composición de imágenes. Barra de escala: 20 μm

4.4. Análisis por citometría de flujo de células gliales de NO

Aplicando el mismo protocolo utilizado para los cultivos celulares, hasta obtener la suspensión celular procedente del NO de peces cebra (ver 3.5), se han obtenido muestras adecuadas para un análisis y separación por citometría de flujo. El citómetro de flujo es capaz de detectar la fluorescencia intrínseca de las células de animales transgénicos, cuantificarlas y separarlas. Dado que no existen anticuerpos de superficie validados para dichos experimentos en peces, no hemos podido reproducirlo en las otras dos especies. La cuantificación celular se ha realizado en animales doble transgénicos Tg (*gfap:EGFP/sox10:TagRFPt*) y en paralelo con muestras de encéfalo como control positivo. Hemos considerado los porcentajes de las células viables (DRAQ5 positivas) que expresan fluorescencia verde (*gfap* positivas) o roja (*sox10* positivas).

El análisis de los datos obtenidos de las muestras de NO (Fig. 26) indican una distribución normal en ambos casos, células GFP y RFP positivas (prueba Kolmogorov-Smirnov; $p\text{-valor} \geq 0.05$, se acepta la hipótesis nula de que los datos siguen una distribución normal). En contraste, en las muestras de encéfalo mientras las células RFP positivas también tienen distribución normal, las células GFP no ($p\text{-valor} \leq 0.05$, se rechaza hipótesis nula).

Comparando los datos de los porcentajes de células RFP positivas, entre muestras de NO y encéfalo, hemos comprobado la igualdad de las varianzas (prueba Levene; $p\text{-valor} \leq 0.05$ se rechaza la hipótesis nula de igualdad de varianzas) y aplicado la prueba *t-Student* para muestras independientes con varianzas no idénticas.

El análisis estadístico ha revelado que no hay diferencias significativas entre las muestras ($p\text{-valor} \geq 0.05$ se acepta hipótesis nula de que las medias de las muestras son iguales). Para comparar los porcentajes de células GFP positivas, hemos utilizado la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. El análisis ha resultado en diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-valor} \leq 0.05$; se rechaza la hipótesis nula de que las medianas de las muestras son iguales).

Tras la separación celular por citometría hemos sembrado las células con el mismo protocolo de cultivo ya descrito (ver 3.2 y 3.5). De las muestras (NO y

encéfalo) en las que se habían añadido DRAQ5 no hemos obtenido ninguna célula adherida a la superficie tras 24 horas de la siembra. Por ello, hemos probado a separar muestras sin añadir el marcador nuclear; en estos casos si hemos obtenido células (Fig. 27).

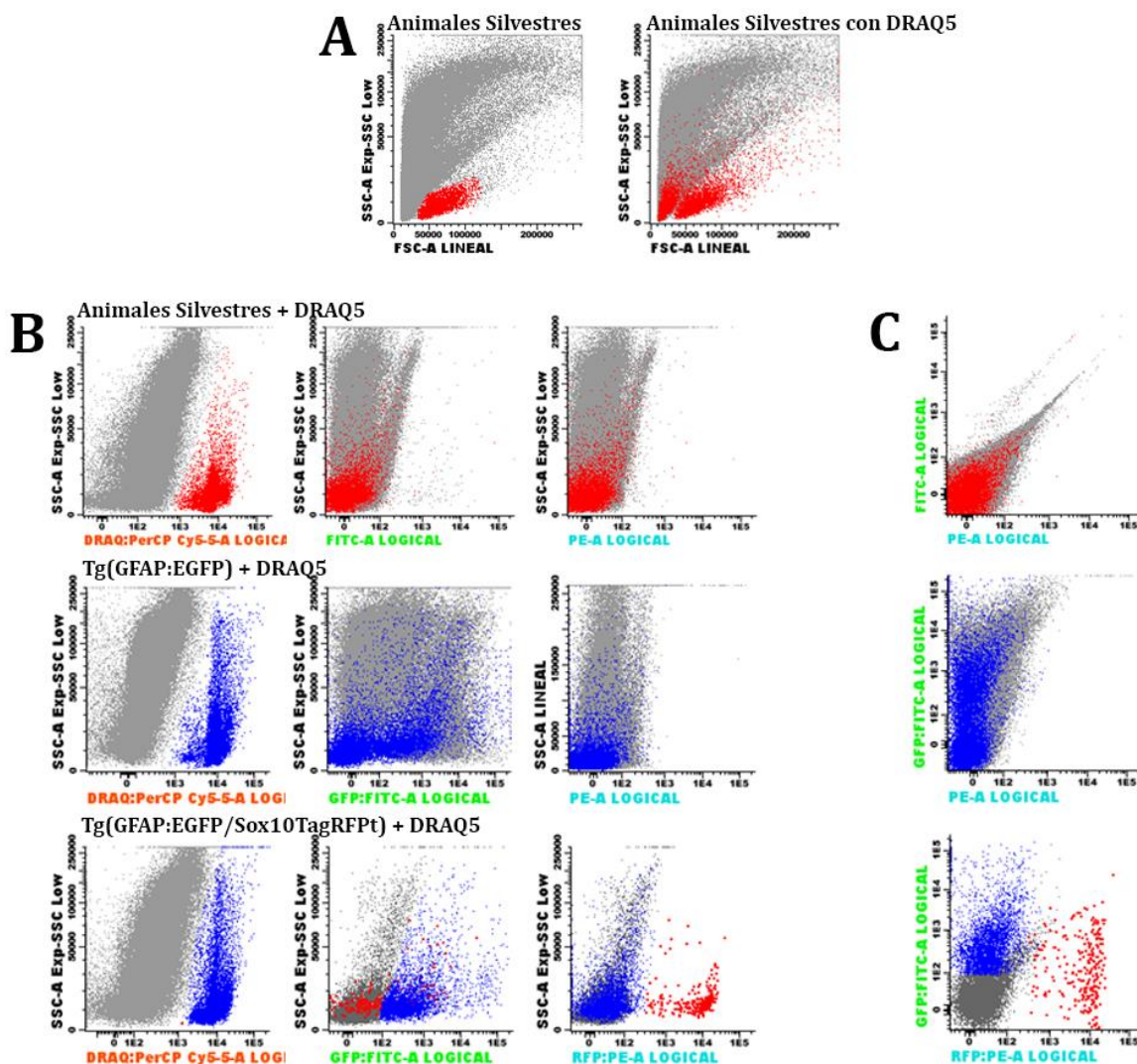


Figura 26: Gráficas de la cuantificación por citometría de flujo de células gliales de NO de pez cebra. Las muestras con y sin el marcador de viabilidad (DRAQ5) han presentado resultados muy similares (A). Se han utilizado animales doblemente transgénicos Tg (gfap:EGFP/sox10:TagRFpt), además de animales silvestres y Tg (gfap:EGFP) como controles (B). En C, obsérvese que el citómetro de flujo solamente ha detectado fluorescencia en los animales transgénicos, y ha identificado los los colores emitidos por las diferentes células fluorescentes presentes en el doblemente transgénico (C).

Las células que hemos obtenido *in vitro* han sido idénticas en cuanto a morfología y fluorescencia a los cultivos obtenidos sin la separación por citometría.

No obstante, las células de los cultivos procedentes de NO no han presentado capacidad de migración y/o proliferación.

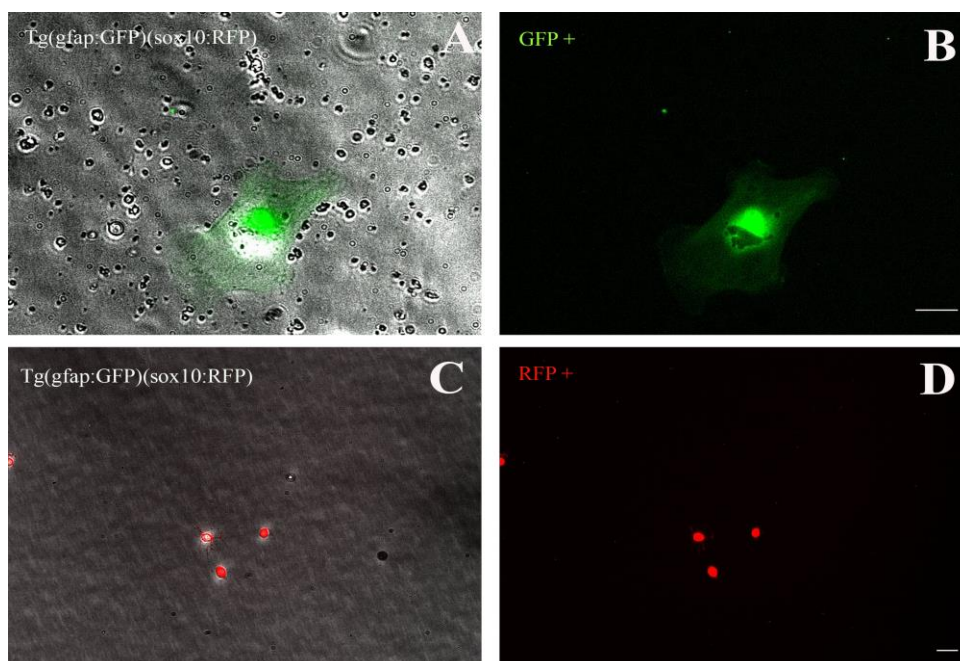


Figura 27: Células procedentes de NO de peces cebra doble transgénicos Tg(gfap:GFP)(sox10:RFP) *in vitro* tras la separación por citometría de flujo. Las células con fluorescencia verde (A y B), y, por lo tanto, que expresan el gen *gfap*, se separan de las células rojas (C y D) que expresan *sox10*. Barra de escala: 20 μ m.

4.5. Caracterización de células gliales Sox2 positivas

Se ha estudiado la distribución de células Sox2 positivas presentes en los componentes pre-encefálicos del sistema visual de *A. burtoni*, *C. auratus* y *D. rerio* mediante IHQ. Además, se ha combinado la detección de Sox2 (ubicada principalmente en el núcleo) con la de diferentes marcadores: para células proliferativas (PCNA), células neuronales [Calretinina (CR), Parvalbúmina (PV), Acetil Colina Transferasa (ChaT), Doblecortina (DCX) y Neurolina (Zn8)] y células gliales [Glutamina Sintetasa (GS), Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP; del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*) y Conexina 43]. Se han utilizado también animales transgénicos.

4.5.1. Células Sox2 positivas en la retina

Los análisis de las secciones con la técnica IHQ han demostrado la presencia de células Sox2 positivas en la retina de las tres especies analizadas; *A. burtoni* (Fig. 28), *C. auratus* (Fig. 29) y *D. rerio* (Fig. 30). En la ZPG todas las células son Sox2

positivas (Figs. A – C en 28, 29 y 30), mientras que en la zona de transición no se han observado células marcadas. En la retina madura las células positivas se encuentran principalmente en la CNI y CCG, también se detectan algunas células marcadas dispersas en la CPI y CFNO, y menos frecuentemente en la CNE (Figs. 28D – I, 29 y 30).

Se ha propuesto que la función de Sox2 está íntimamente relacionada con células proliferativas (Surzenko et al., 2013; Pevny y Placzek, 2005); por ello, realizamos un doble marcaje de Sox2 y PCNA. Todas las células de la ZPG de la retina han sido positivas para ambos marcadores, Sox2 y PCNA (Figs. A – C en 28, 29 y 30), y negativas para todos los demás marcadores utilizados.

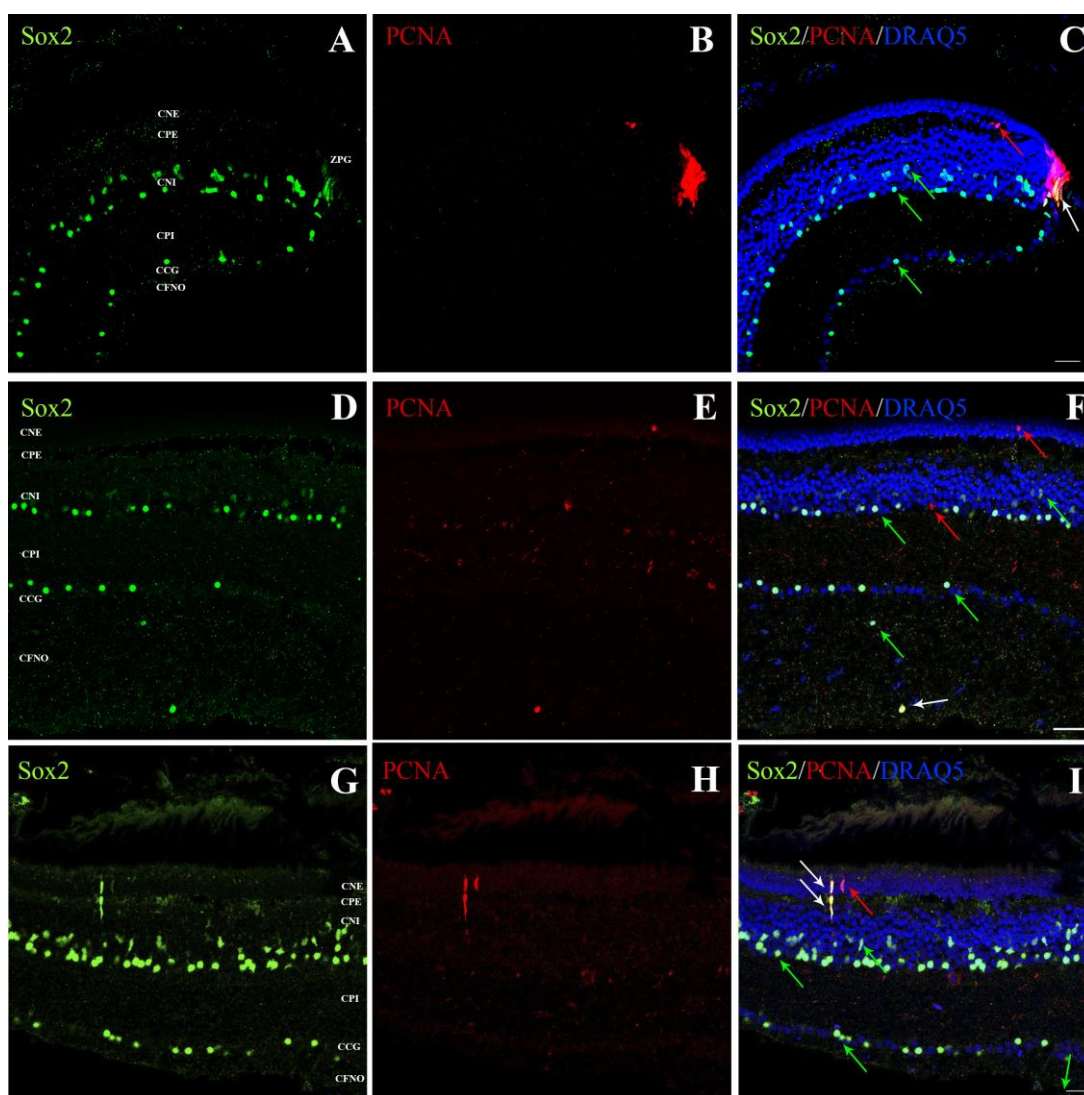


Figura 28: Secciones de retina de *A. burtoni* tras la aplicación del protocolo de IHQ frente a Sox2 y PCNA. Células Sox2 positivas detectadas en la ZPG (A), CFNO, CCG, CNI (D y G), CPI (D) y CNE (G). Las células PCNA positivas se han detectado en la CFNO, CNI (E), y CNE (E y H). En las imágenes C, F e I se observan las células con doble marcaje (flechas blancas) y células que solamente expresan Sox2 (flechas verdes) o PCNA (flechas rojas). Barra de escala: 20 μ m

En la retina madura, hemos detectado células PCNA positivas presentes en la CNI que también eran positivas para Sox2 (Fig. 30C). Además, hemos observado células con doble marcaje en la CFNO y CNE (Fig. 28F e I). La mayoría de las células Sox2 positivas en la retina madura han sido negativas para la detección frente a PCNA (Figs. 28, 29 y 30).

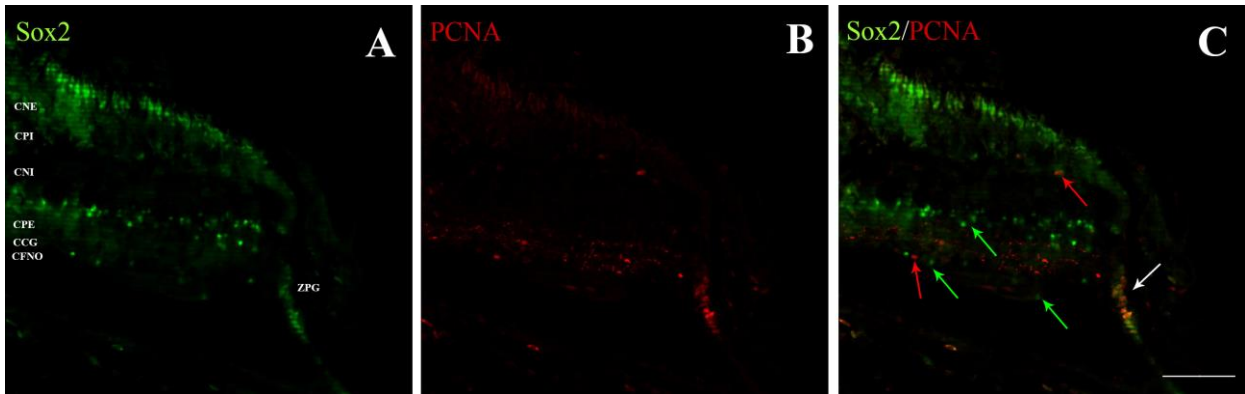


Figura 29: Secciones de retina de *C. auratus* tras la aplicación del protocolo de IHQ frente a Sox2 y PCNA. Células Sox2 positivas detectadas en la ZPG, CFNO, CCG y CNI (A). Las células PCNA positivas se han detectado en la CFNO, CNI y CNE (B). En la imagen C se indican las células con doble marcaje (flechas blancas) y células que solamente expresan Sox2 (flechas verdes) o PCNA (flechas rojas). Barra de escala: 20

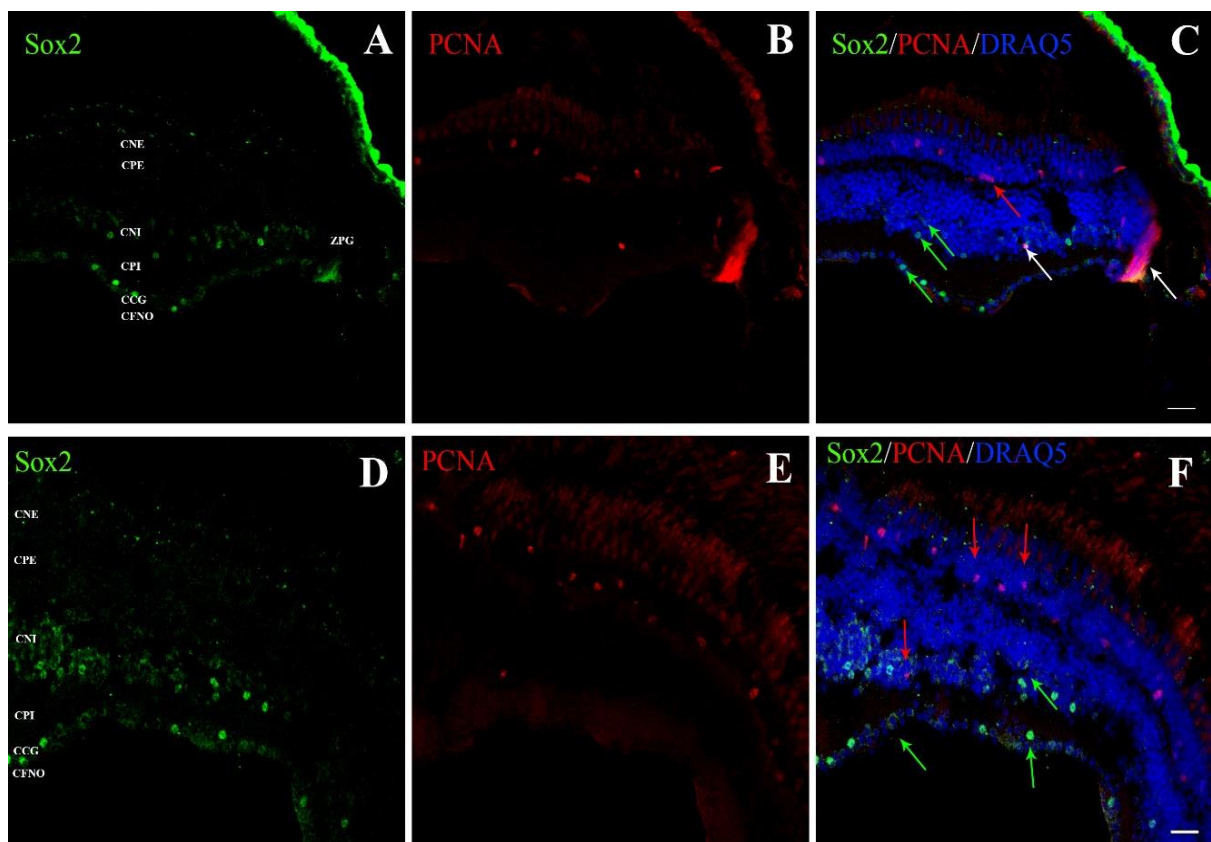


Figura 30: Secciones de retina de *D. rerio* tras la aplicación del protocolo de IHQ frente a Sox2 y PCNA. Células Sox2 positivas detectadas en la ZPG (A), CFNO, CCG y CNI (A y D). Las células PCNA positivas se han detectado en la CNI (B) y CNE (B y E). En las imágenes C y F se observan las células con doble marcaje (flechas blancas), y células que solamente expresan Sox2 (flechas verdes) o PCNA (flechas rojas). Barra de escala: 20 μ m

En la CNI hemos observado células Sox2 positivas que se disponen a su vez formando dos subcapas. Esas subcapas de células Sox2 positivas en la CNI se distinguen no sólo por su ubicación, sino también por su forma nuclear e intensidad de marcaje (Figs. 28, 29 y 30). Las células ubicadas en la zona más escleral presentan un núcleo más alargado o fusiforme y la fluorescencia es más tenue, mientras que las de la zona vitreal presentan un núcleo redondo y el marcaje es más intenso.

Todas las células ubicadas en la subcapa escleral de la CNI, que además presentan un núcleo alargado, son GFAP positivas en las tres especies estudiadas, incluyendo los animales transgénicos (Figs. 31A - C, 32 y 33A - F). Además, en secciones analizadas de *A. burtoni* (Fig. 31) y *D. rerio* (Fig. 33), dichas células también han resultado positivas a GS (Figs. 31D - F y 33G - I). Debido a su ubicación, forma y marcadores, se han identificado como células de Müller.

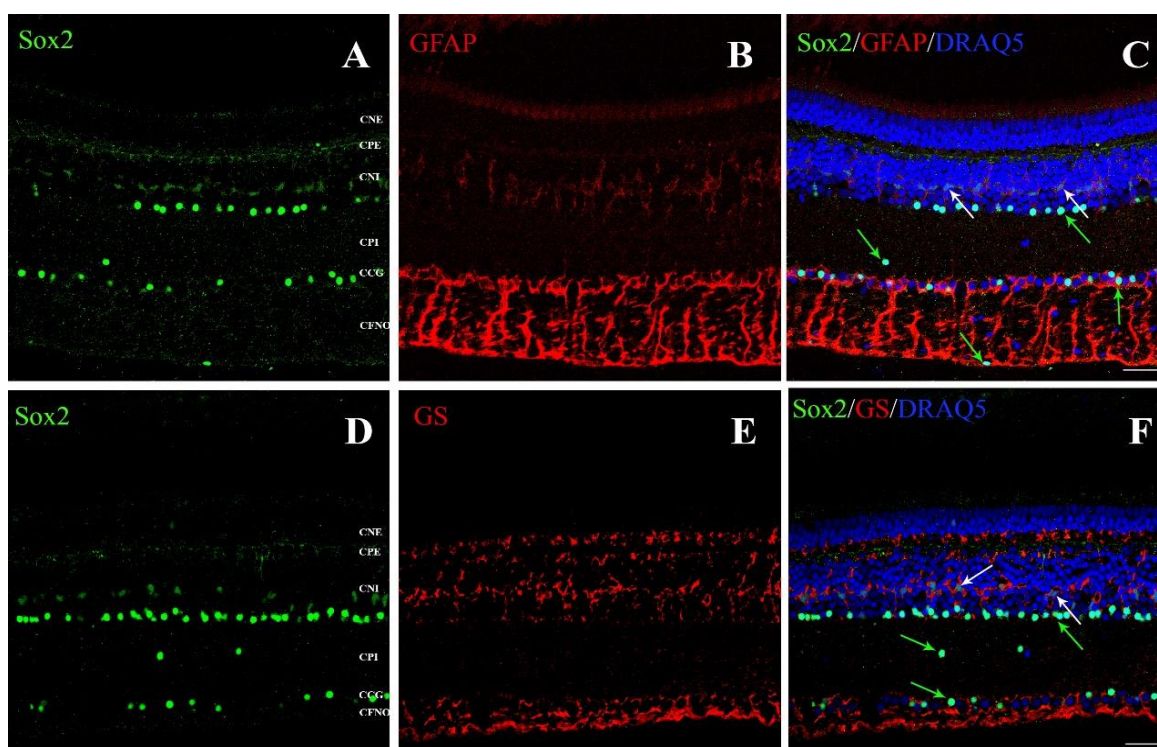


Figura 31: Secciones de retina de *A. burtoni* combinando la detección de Sox2 y marcadores gliales. Células Sox2 positivas detectadas en la CFNO, CCG, CPI y CNI (A y D). Células GFAP (B) y GS (E) positivas en la CNI. En las imágenes C y F se observan las células con doble marcaje (flechas blancas), y células que solamente expresan Sox2 (flechas verdes). Barra de escala: 20 μ m

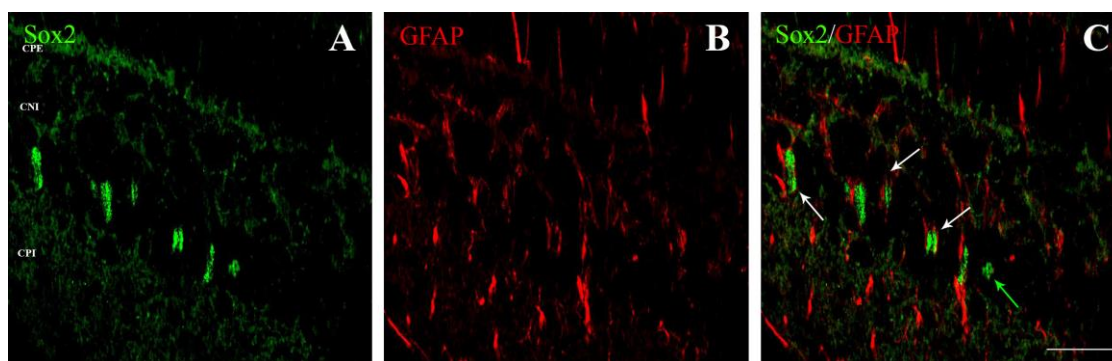


Figura 32: Secciones de retina de *C. auratus* combinando la detección de Sox2 (A) y GFAP (B). Las células con núcleos alargados, ubicadas en la CNI, han sido positivas para ambos marcadores (C; flechas blancas). Además, se encuentran células con núcleo redondeado que solamente expresan Sox2 (ejemplo en C; flecha verde). Barra de escala: 20 μ m

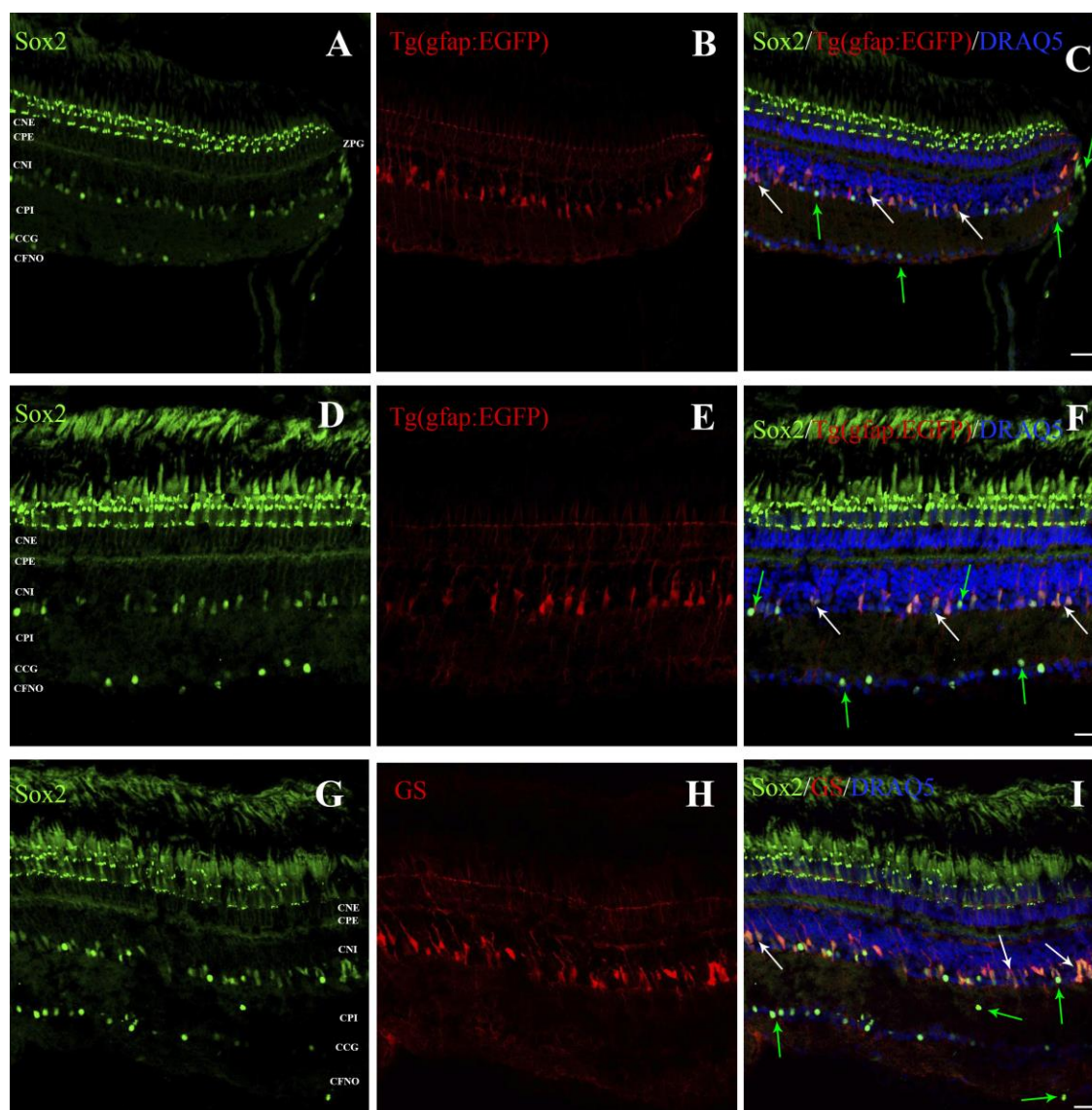


Figura 33: Secciones de retina de *D. rerio* combinando la detección de Sox2 y marcadores gliales. Células Sox2 positivas detectadas en la CNI, CPI, CCG (A, D y G) y CFNO (G). Células GFAP (B y E) y GS (H) positivas en la CNI. En las imágenes C, F e I se observan células con doble marcaje (flechas blancas) y células que solamente expresan Sox2 (flechas verdes). Barra de escala: 20 μ m

Se ha estudiado también la distribución de células Sox2 positivas en secciones de peces cebra transgénicos para genes típicamente del linaje de oligodendrocitos (Fig. 34); ya sean éstos en diferenciación, animales Tg(sox10:EGFP), o totalmente diferenciados, animales Tg(olig2:EGFP). Esas células típicamente presentan núcleo redondeado y se ubican en la CFNO, aunque en algunos casos se encuentran en la CNI. En las secciones de animales Tg(sox10:EGFP), aunque se han detectado algunas células positivas para Sox10 y Sox2, la mayoría solamente presentan uno de los dos marcadores (Fig. 34G - L). En las secciones de los transgénicos del linaje Tg(olig2:EGFP) no se han visto células doblemente positivas en ningún caso (Figs. 34A - F).

Para caracterizar las demás células Sox2 positivas de la retina, hemos utilizado marcadores de células amacrinas (CR y PV; además, se han analizado secciones de *A. burtoni* con ChaT). Las células Sox2 positivas presentan un núcleo redondeado y generalmente se encuentran en la CNI, aunque también se pueden encontrar en la CPI y CCG, se las conoce como amacrinas desplazadas. En ninguna de las tres especies hemos observado células positivas para los dos marcadores Sox2 y CR (Fig. 35).

En secciones de pez cebra y pez cíclido, se han encontrado varias células con doble marcaje para Sox2 y PV (Fig. 36A - F). En las secciones de *A. burtoni* tampoco se han observado células que expresan los marcadores Sox2 y ChaT a la vez (Fig. 36G -H). Todos esos datos indican que una serie de células Sox2 positivas se pueden identificar como células amacrinas, ya que son PV positivas. No obstante, no todas las células amacrinas expresan Sox2.

En secciones de *A. burtoni* y *D. rerio*, se ha analizado si las células Sox2 positivas lo eran también a marcadores de neuronas de nueva generación (DCX y Zn8). Como ya se ha visto, todas las células de la ZPG son Sox2 positivas y se encuentran células en diferentes capas de la retina madura (Figs. 28, 29 y 30). Hemos observado que las células DCX o Zn8 positivas se encuentran en la zona de transición (Fig. 37B y E), dónde las células son Sox2 negativas (Fig. 37A y D). En las zonas maduras de la retina se observan axones positivos a DCX o Zn8 que parten de células de la zona de transición y discurren por la CFNO, en ningún caso hemos

observado somas neuronales positivos. No hemos encontrado células doblemente marcadas en la retina de peces para dichos marcadores (Fig. 37C y F).

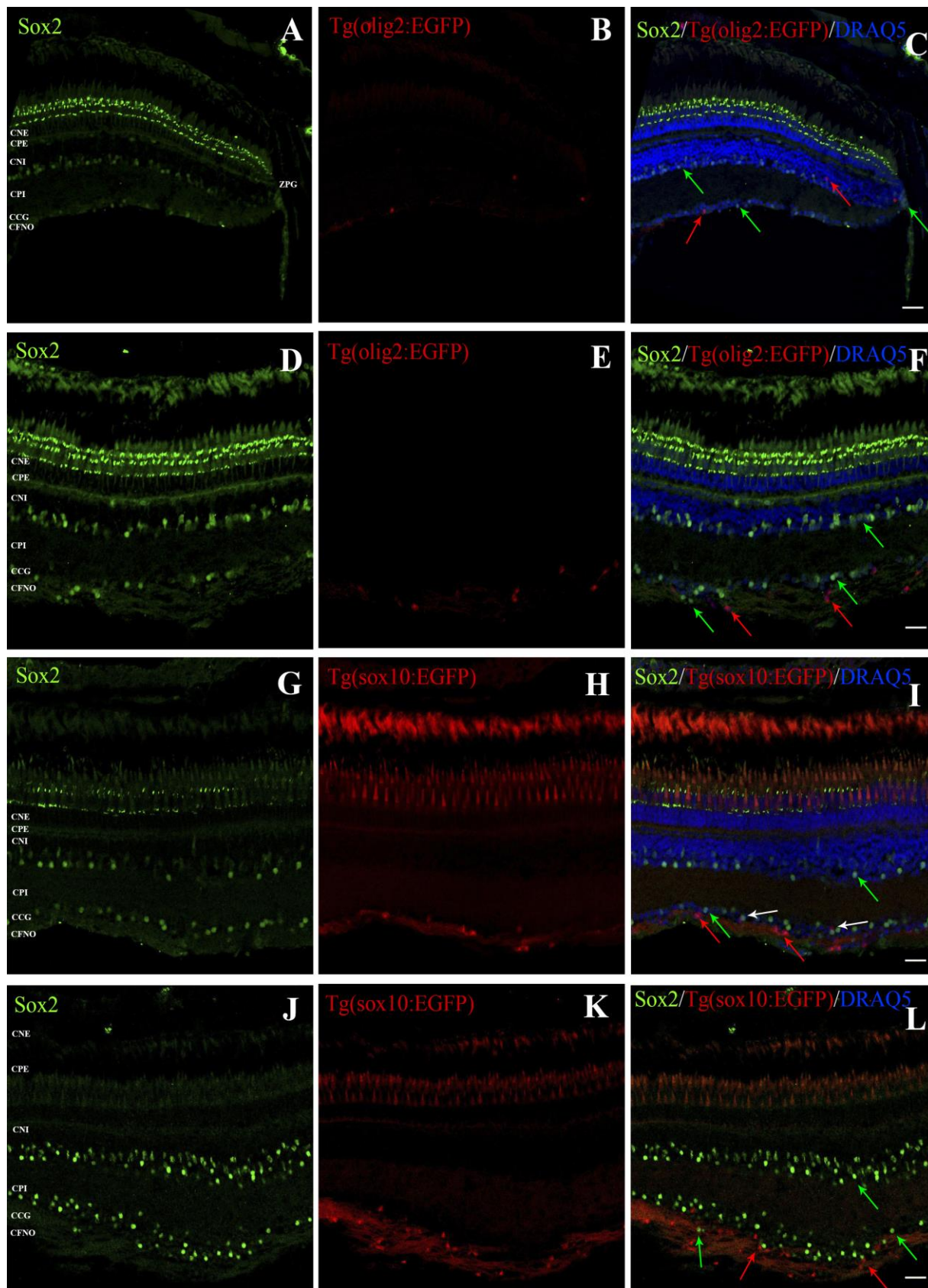


Figura 34: Secciones de retina de *D. rerio* de los linajes Tg(olig2:EGFP) (A – F) y Tg(sox10:EGFP)(G–L). Las células Sox2 positivas en la ZPG (A) y en la retina madura (A, D, G y J) y las células de la retina que expresan la proteína fluorescente del transgénico (B, E, H y K). En las imágenes C, F, I y L se observa que, aunque la inmensa mayoría de las células Sox2 positivas no presentaron fluorescencia transgénica (flechas verdes o rojas) existen algunas células doble positivas (flechas blancas) en animales Tg(sox10:EGFP). Barra de escala: 20 μ m

Utilizando los tres marcadores mencionados anteriormente, que no presentan co-localización, en secciones de *A. burtoni*, se ha delimitado por primera vez mediante IHQ las tres zonas de crecimiento de la retina de peces (Fig. 38): ZPG (células Sox2 positivas), zona de transición (células DCX positivas) y retina madura (células CR positivas).

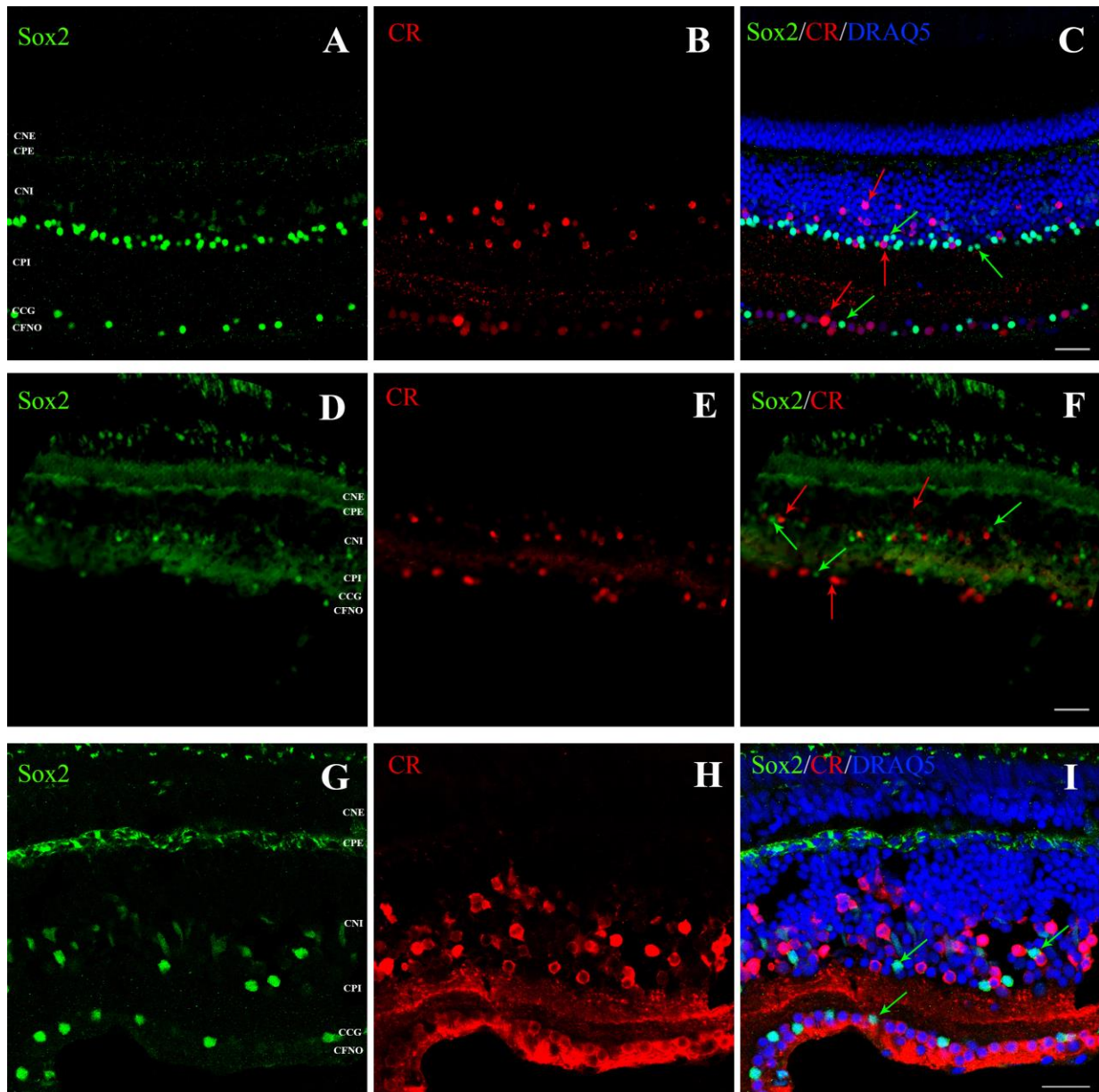


Figura 35: Secciones de retina de *A. burtoni* (A – C), *C. auratus* (D – F) y *D. rerio* (H – I). Células Sox2 (A, D y G) y CR (B, E y H) positivas. Aunque los dos marcajes se han detectado en la CNI y CCG, en ningún caso hubo doble marcaje (C, F e I; flechas verdes o rojas). Barra de escala: 20 μ m

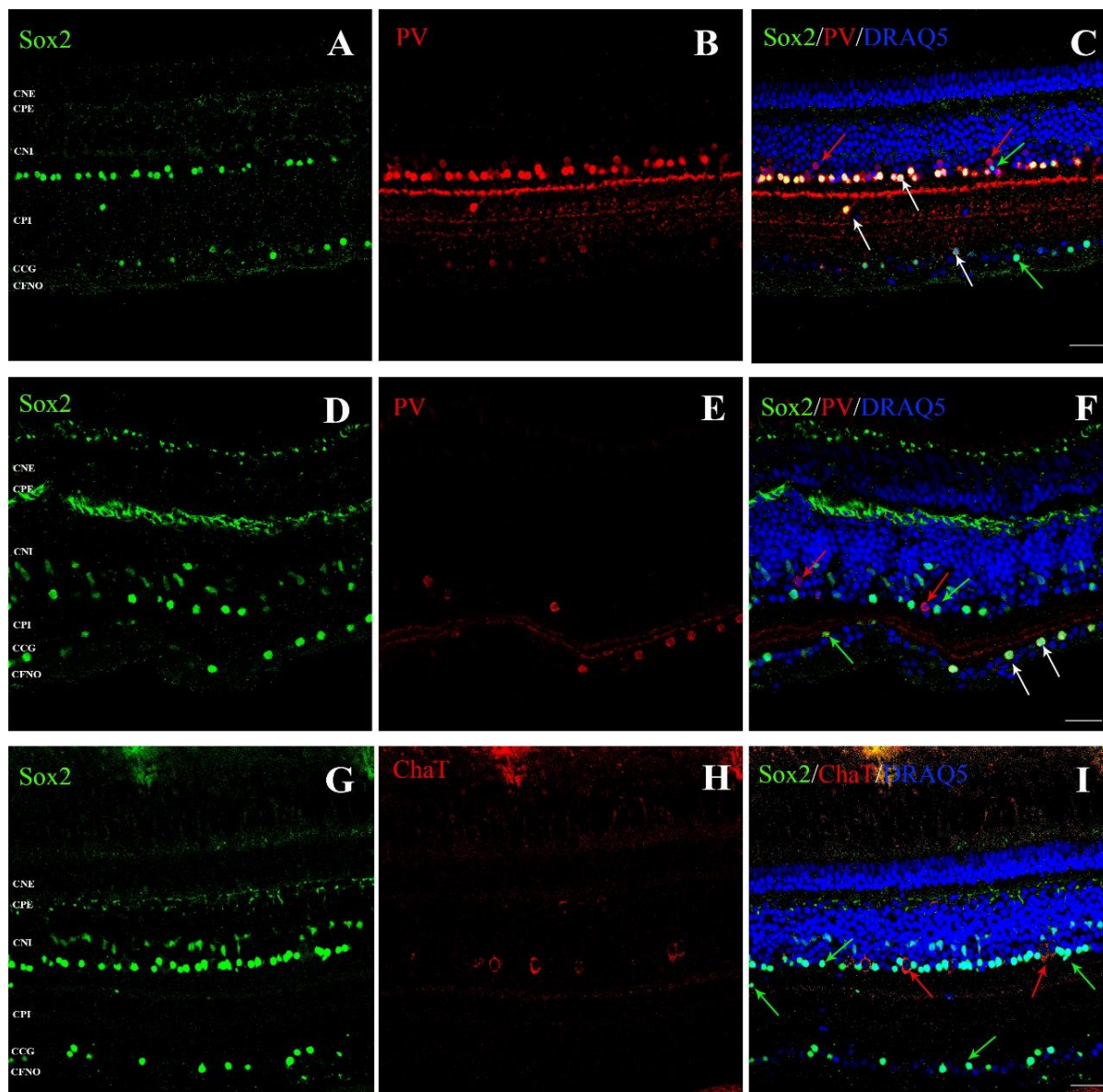


Figura 36: Secciones de retina de *A. burtoni* (A – C y G – I) y *D. rerio* (D – F). Células Sox2 (A, D y G), PV (B y E) o ChaT (H) positivas. En las imágenes C y F se observan células con doble marcaje (flechas blancas) y con sólo uno de los marcadores (flechas verdes o rojas). En el caso de ChaT no se han detectado dobles marcajes (I). Barra de escala: 20 μ m

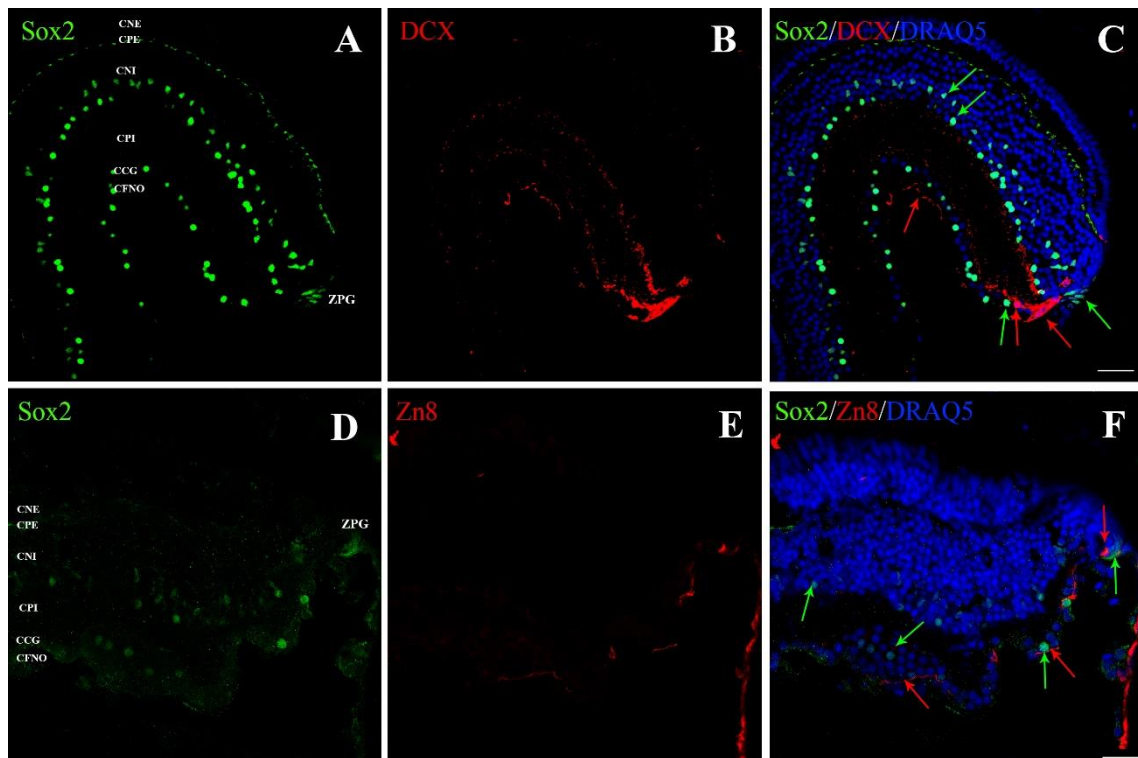


Figura 37: Secciones de retina de *A. burtoni* (A - C) y *D. rerio* (D - F). Células Sox2 (A y D) y DCX (B) o Zn8 (E) positivas. En las imágenes C y F no se observa doble marcaje en ambas especies; se indican células Sox2 (flechas verdes) y DCX o Zn8 (flechas rojas) positivas. Barra de escala: 20 μ m

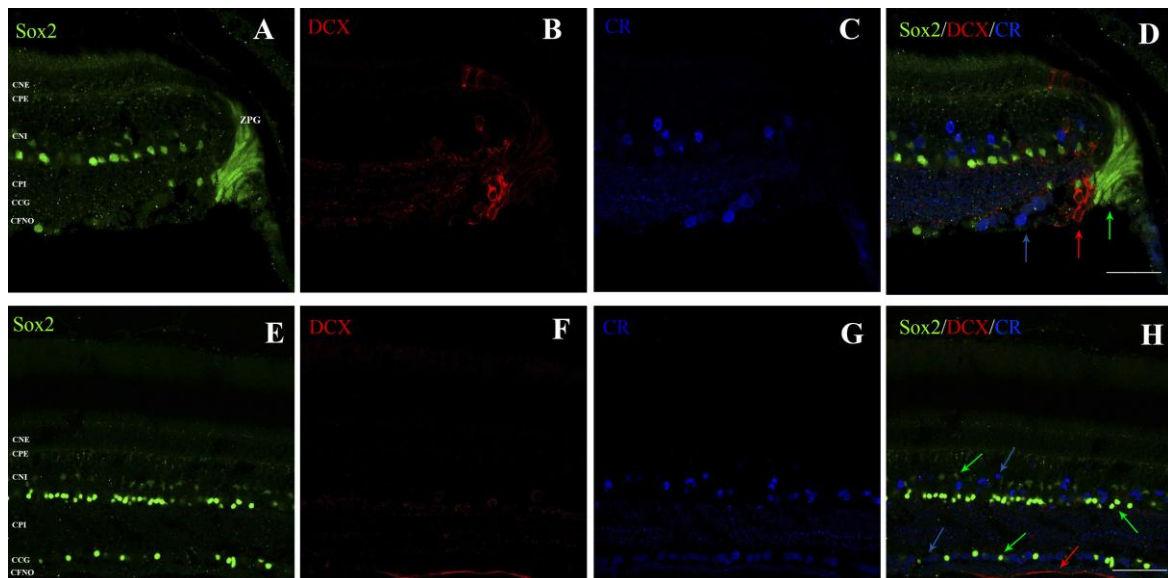


Figura 38: Secciones de retina de *A. burtoni* con IHQ frente a Sox2 (A y E), DCX (B y F) y CR (C y G). No existe co-localización de ninguno de los marcadores. En la periferia de la retina (A - D) se delimitan las zonas de crecimiento (D): ZPG con células Sox2 positivas (flecha verde), zona de transición con células DCX positivas (flecha roja) y retina madura con la expresión de CR (flecha azul). En la imagen H se indican las células Sox2 (flechas verdes) y CR (flechas azules), así como los axones DCX positivos procedentes de las células de la zona de transición (flecha roja). Barra de escala: 20 μ m

4.5.2. Células Sox2 positivas en la CNO

Analizando secciones sagitales de *A. burtoni* se han podido seguir los axones DCX positivos procedentes de la zona de transición de la retina, en su recorrido por la CFNO, hasta la CNO y el NO (Fig. 39B y C). El marcaje en la CNO no fue muy intenso (Fig. 39B). Si se invierte la orientación de las secciones, horizontales al eje mayor del animal (Fig. 39A), se observa un patrón de expresión de dichos axones muy diferente. A diferencia de los cortes sagitales, el marcaje para DCX en la CNO ha resultado intenso y permite distinguir un entrelazado de los axones en esa área (Fig. 39E). Además, el marcaje para DCX en ningún caso presenta co-localización con GFAP (Fig. 39D - F).

Utilizando el marcador nuclear DRAQ5 se han encontrado bastantes células marcadas en la CNO. Sin embargo, no se han detectado células Sox2 positivas en dicha zona (Fig. 40A - F). Los axones DCX positivos delimitan la región dónde no se detecta marcaje para Sox2.

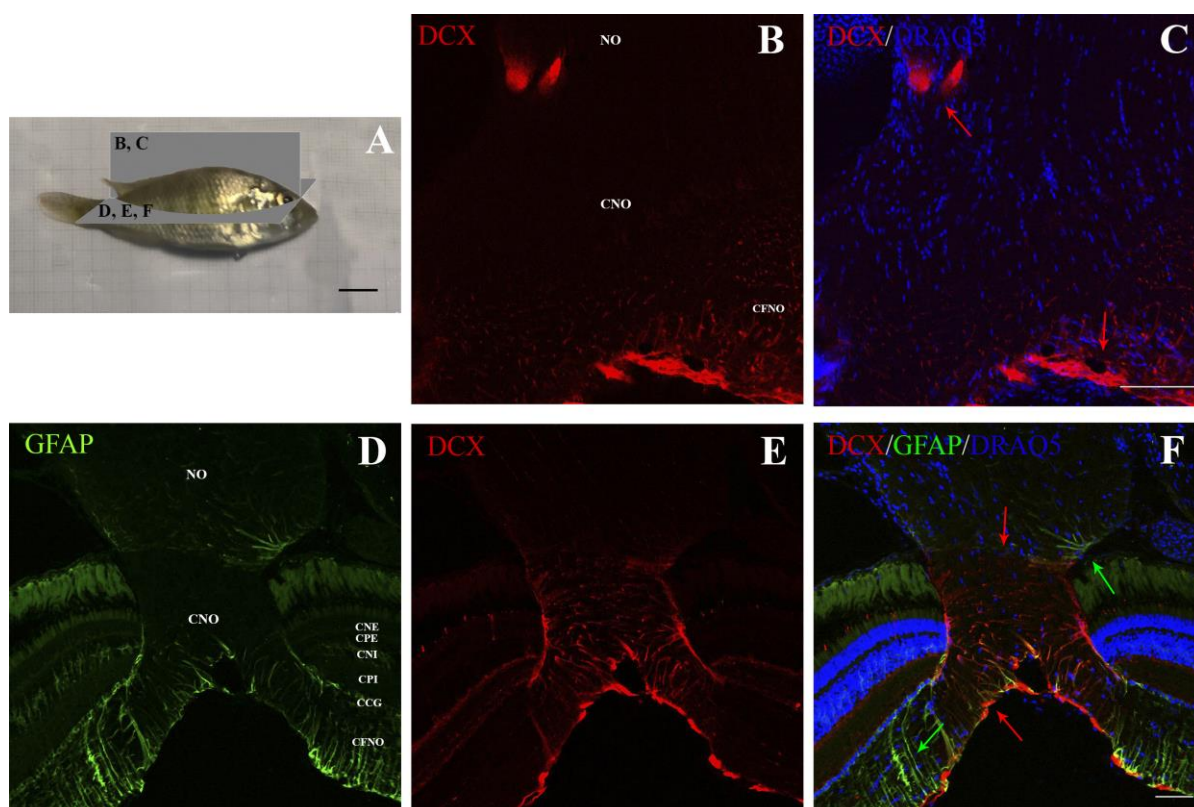


Figura 39: Secciones de CNO de *A. burtoni*. En A se ilustran los diferentes planos de corte utilizados. En cortes sagitales (B y C) el marcaje positivo a DCX está en la CFNO y NO (flechas rojas) y más tenue en la CNO. En secciones horizontales al eje mayor del animal (D - F) se observa un entrecruzado de los axones DCX positivos (flechas rojas) en la CFNO y CNO (flechas rojas); que no co-localiza con el marcaje GFAP (flechas verdes) en ningún caso. Barras de escala: (A): 1 cm; (B-F): 20 μ m

Se realizó también un marcaje de las células con CR y Sox2 (Fig. 40G – I), y un triple marcaje con CR, DCX y Sox2 (Fig. 40J – M). No se ha observado ninguna colocalización. En las secciones con el triple marcaje es posible observar al menos dos zonas bien delimitadas (Fig. 40J – M): la entrada de los axones jóvenes (DCX positivos) y la región donde se disponen los axones maduros (CR positivos).

Sin embargo, en secciones de retina de las especies de ciprínidos se pueden encontrar algunas células Sox2 positivas en la CNO (Fig. 41); esas células no han sido positivas para ningún otro marcador utilizado.

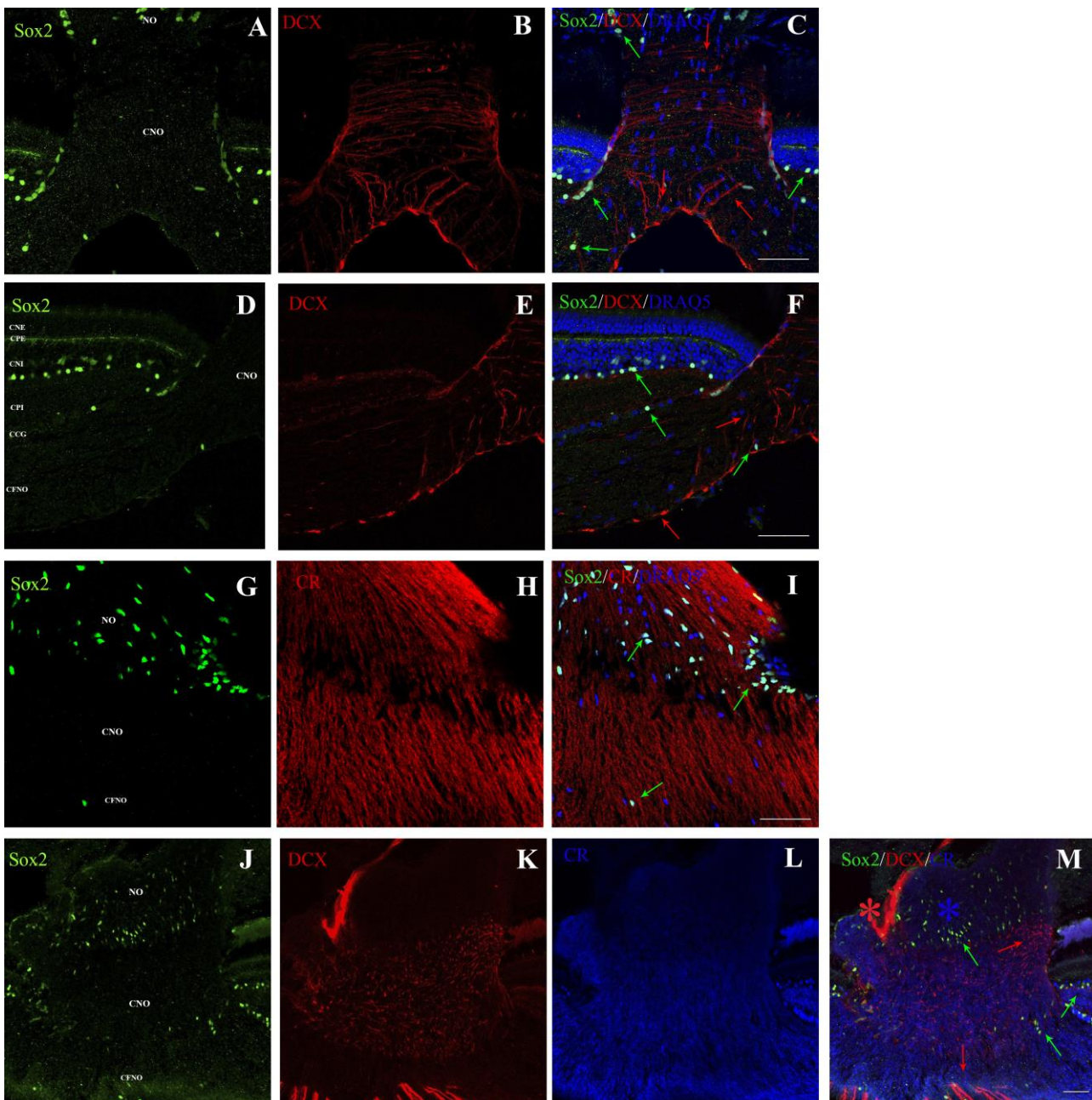


Figura 40: Caracterización de células Sox2 positivas en secciones de *A. burtoni*. Mientras el marcaje para Sox2 en la CNO es ausente (A, D, G y J), en dicha zona se observa un entrecruzado de los axones DCX positivos (B, E y K). Ambos marcajes no colocalizan en ningún caso (flechas rojas y verdes en C, F y M). Además, en secciones marcadas con CR (H y L), tampoco colocaliza con Sox2 (I), las zonas de axones jóvenes (asterisco rojo en M) y axones maduros (asterisco azul en M). Barra de escala: 20 μ m

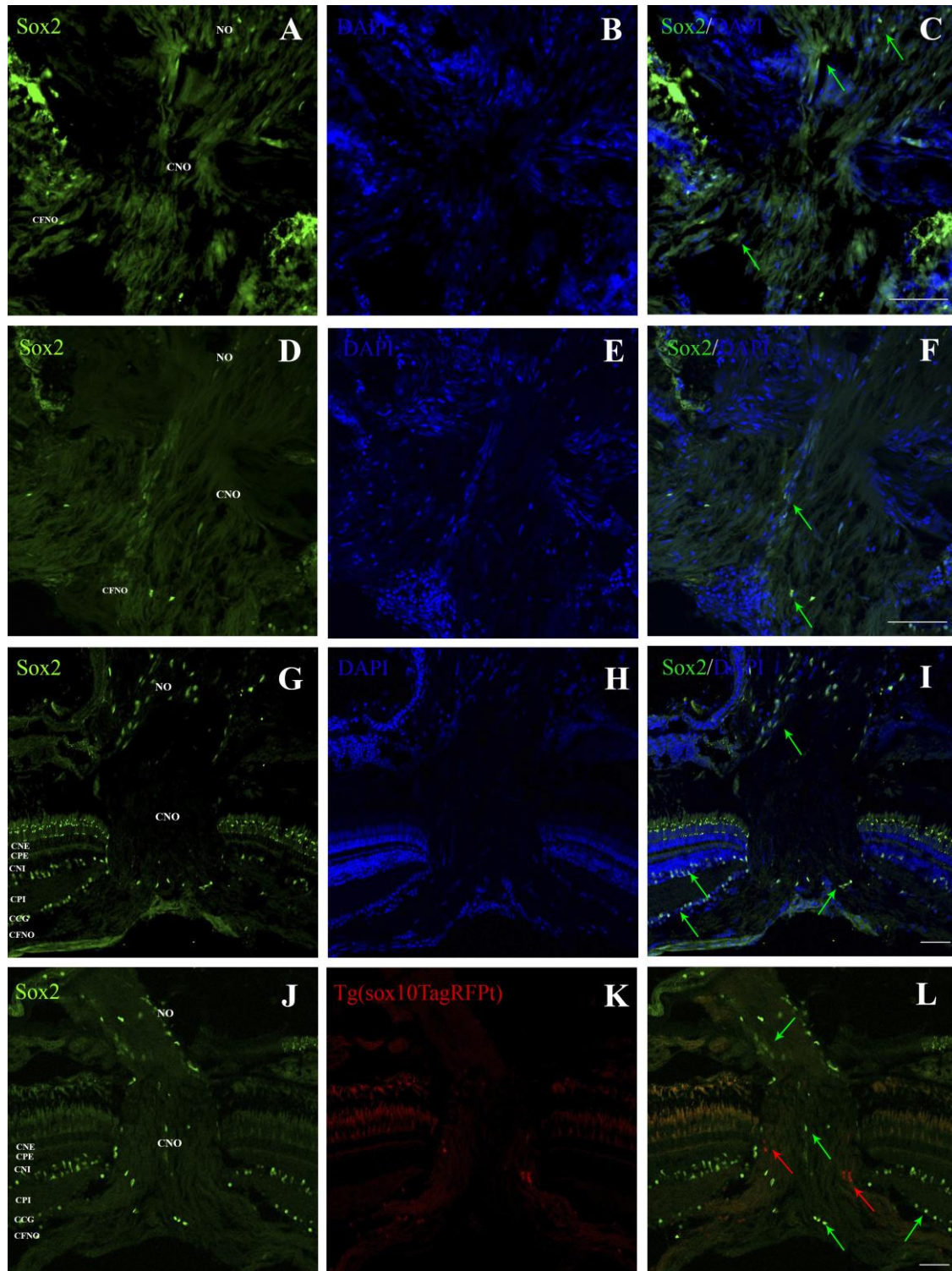


Figura 41: Secciones de CNO de *C. auratus* (A – F) y *D. rerio* (G – L). Muestras en las que no se ha detectado Sox2 en la CNO (A y G), y en las que si se han encontrado dichas células (D y J). En los casos en los que se ha aplicado DAPI (B, E y H) se observan células en la CNO de ambas especies. En las imágenes C, F, I e L se indica la ubicación de las células Sox2 positivas (flechas verdes). Además, utilizando animales transgénicos del linaje Tg(Sox10:TagRFPT) (K) no se han podido identificar células doblemente positivas (células Sox10 positivas señaladas con flechas rojas en L). Barra de escala: 20 μ m

4.5.3. Células Sox2 positivas en el NO

A lo largo del NO en las tres especies analizadas, *A. burtoni* (Fig. 42), *C. auratus* (Fig. 43) y *D. rerio* (Fig. 44), se han detectado células Sox2 positivas. La caracterización de las células Sox2 positivas en el NO se ha realizado utilizando los mismos marcadores que en la retina. Algunas células proliferativas (PCNA positivas) se observan dispersas por toda la longitud del NO (Figs. A – C en 42, 43 y 44). Entre ellas hay tanto células Sox2 positivas como negativas. En el NO de peces se observan tanto células doblemente marcadas (Sox2 y PCNA), como otras que expresan solamente uno de los dos marcadores (Figs. C en 42, 43 y 44).

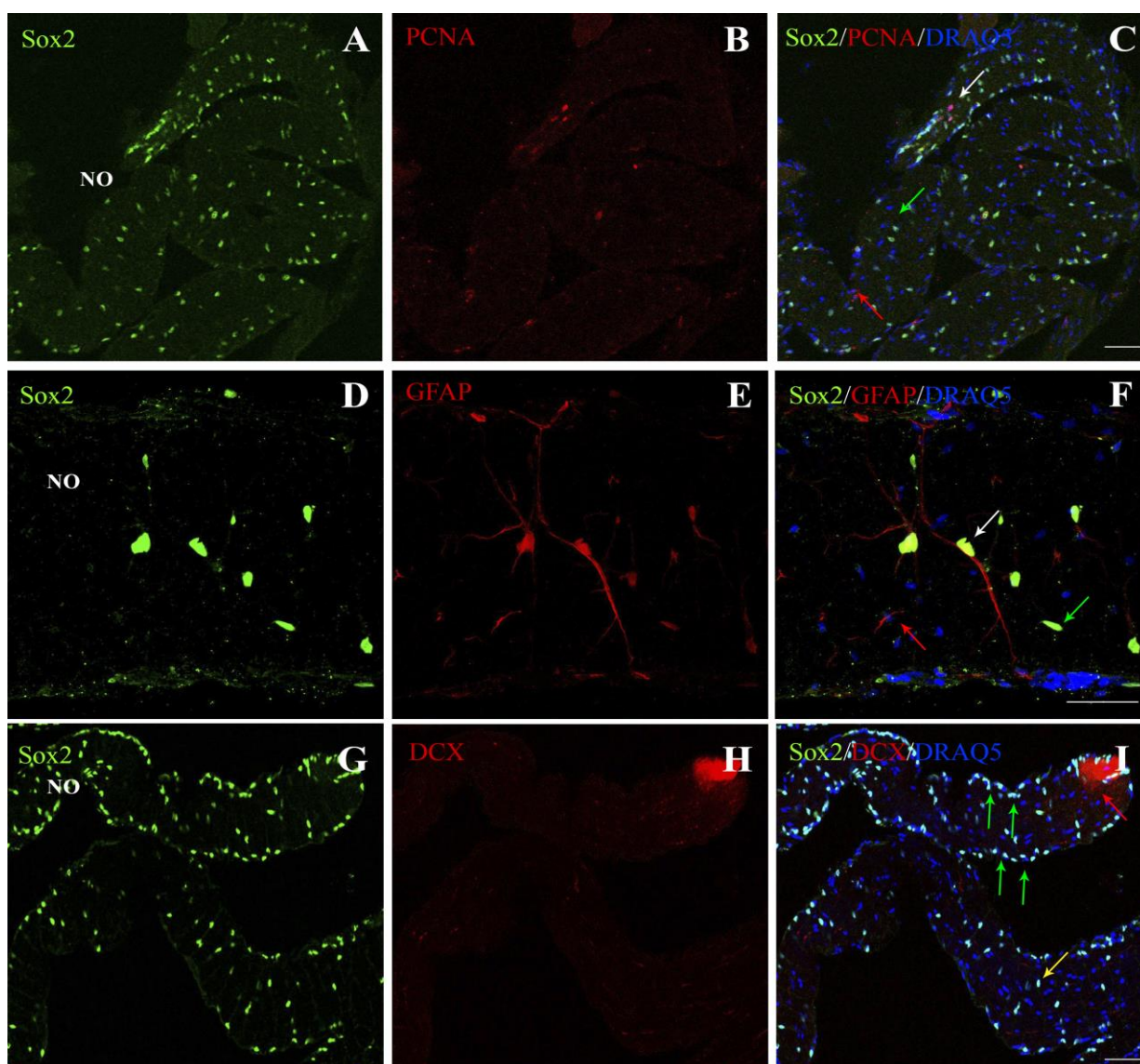


Figura 42: Caracterización de células Sox2 positivas en secciones de NO de *A. burtoni*. Se ha detectado marcaje frente a Sox2 en toda la longitud del NO (A, D y G), que se han combinado con PCNA (B), GFAP (E) y DCX (H). En las imágenes C, F e I se indican las células doblemente positivas (flechas blancas) y las células que solamente han presentado uno de los dos marcadores (flechas verdes y amarillas o rojas). Además, en I se distingue la disposición paralela de las células Sox2 positivas al inicio del NO (flechas verdes) y con disposición aleatoria en las demás zonas (flecha amarilla). Barra de escala: 20 μm

En cuanto a las células gliales, en secciones de *A. burtoni*, se han identificado células con doble marcaje para GFAP y Sox2, y células solamente Sox2 positivas (Fig. 42D – F). En secciones de peces cebra transgénicos Tg (gfap:EGFP), aunque la expresión de GFAP en esta especie es muy escasa en edades adultas, ha sido posible caracterizar algunas células doblemente positivas en algunas zonas del NO (Fig. 44D – F).

Se han analizado también secciones de NO para identificar células Sox2 y GS positivas (Figs. 42G – I, 43D – F y 44G – I). Aunque se han encontrado algunas células con doble marcaje, la gran mayoría de células Sox2 positivas son negativas para GS. Además, también se han detectado células GS positivas que no expresan Sox2 (Figs. 42I, 43F y 44I).

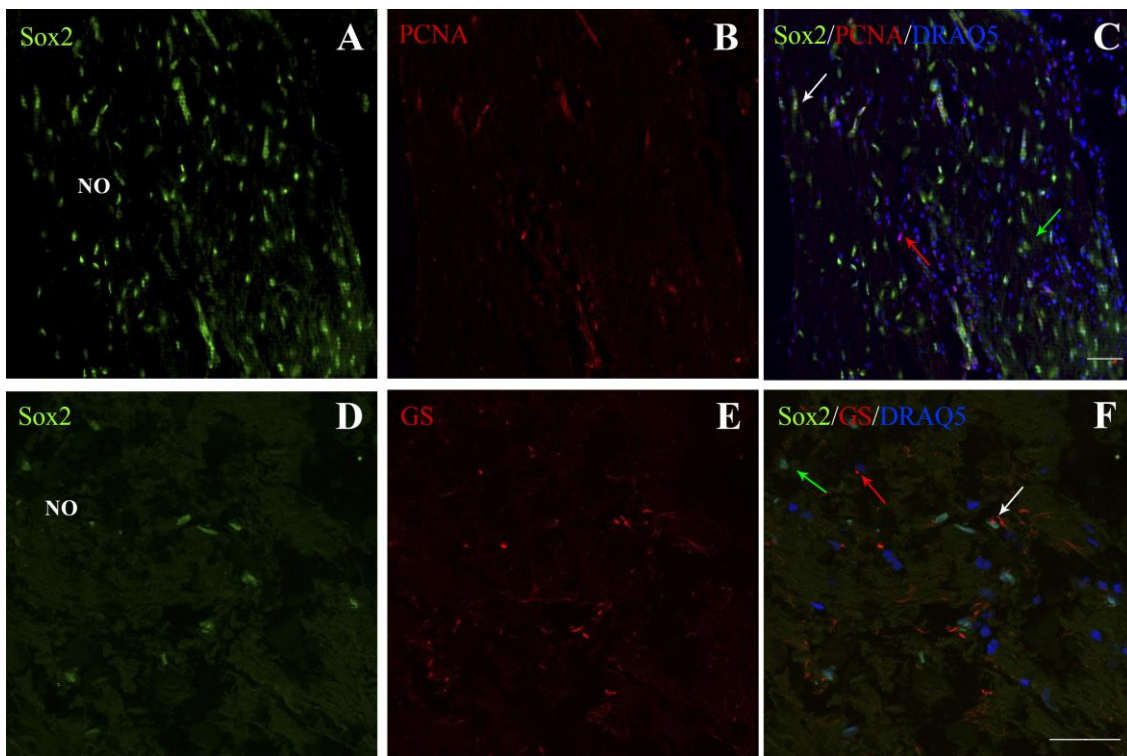


Figura 43: Secciones de NO de *C. auratus*. Células Sox2 (A y D), PCNA (B) y GS (E) positivas. En las imágenes C y F se indican las células doblemente positivas (flechas blancas), y las células que en que solamente se ha detectado uno de los marcadores (flechas verdes o rojas). Barra de escala: 20 μ m

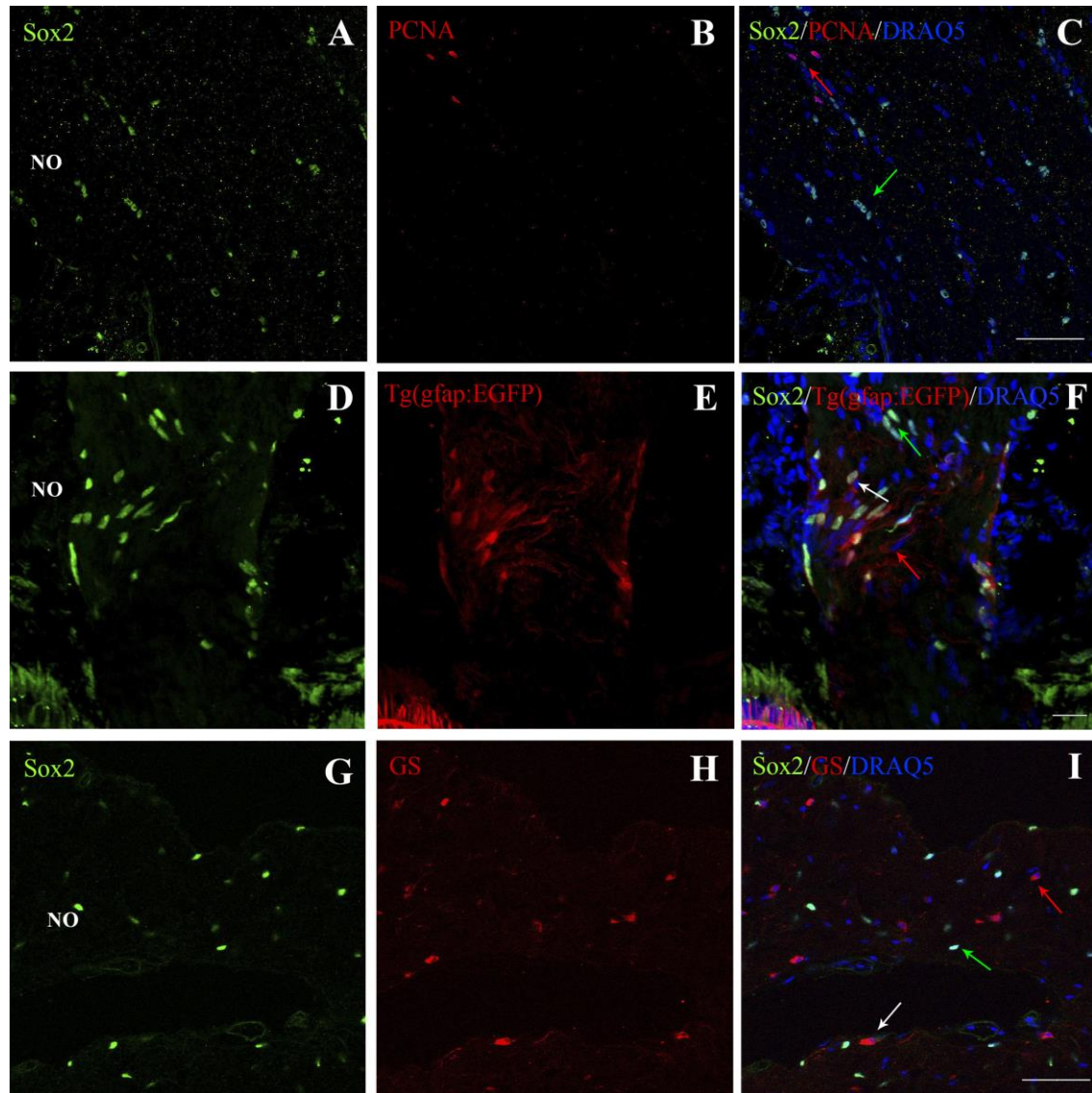


Figura 44: Secciones de NO de *D. rerio*. Células Sox2 (A, D y G), PCNA (B), GFAP (E) y GS (H) positivas. En las imágenes C, F e I se indican las células con doble marcaje (flechas blancas) y las que solamente expresan uno de los marcadores (flechas verdes o rojas). Barra de escala: 20 μ m

Para identificar las células Sox2 positivas de la familia de los oligodendrocitos se analizaron secciones de animales transgénicos de los linajes Tg(olig2:EGFP) y Tg(sox10:TagRFPT) (Figs. 45). En ningún caso se han encontrado células positivas para Sox2 y alguno de los dos marcadores en el NO.

Utilizando marcadores neuronales (CR, DCX, Zn8, PV o ChaT) no se ha localizado ninguna célula positiva en el NO. Los marcadores de axones del NO, ya sean inmaduros (DCX positivos) o mielinizados (CR positivos), han permitido analizar la disposición de los mismos en la entrada del NO y su disposición en relación a las células Sox2 positivas (Figs. 40G - M y 42I). Aparentemente dichas células se

disponen de forma aleatoria en la gran mayoría del NO (Fig. 42I). No obstante, en la zona nasal del NO y adyacente a la zona de mayor marcaje por DCX, se ha observado una mayor densidad de las células Sox2 positivas (Fig. 40G - M) dispuestas de manera paralela entre ellas (Fig. 42I).

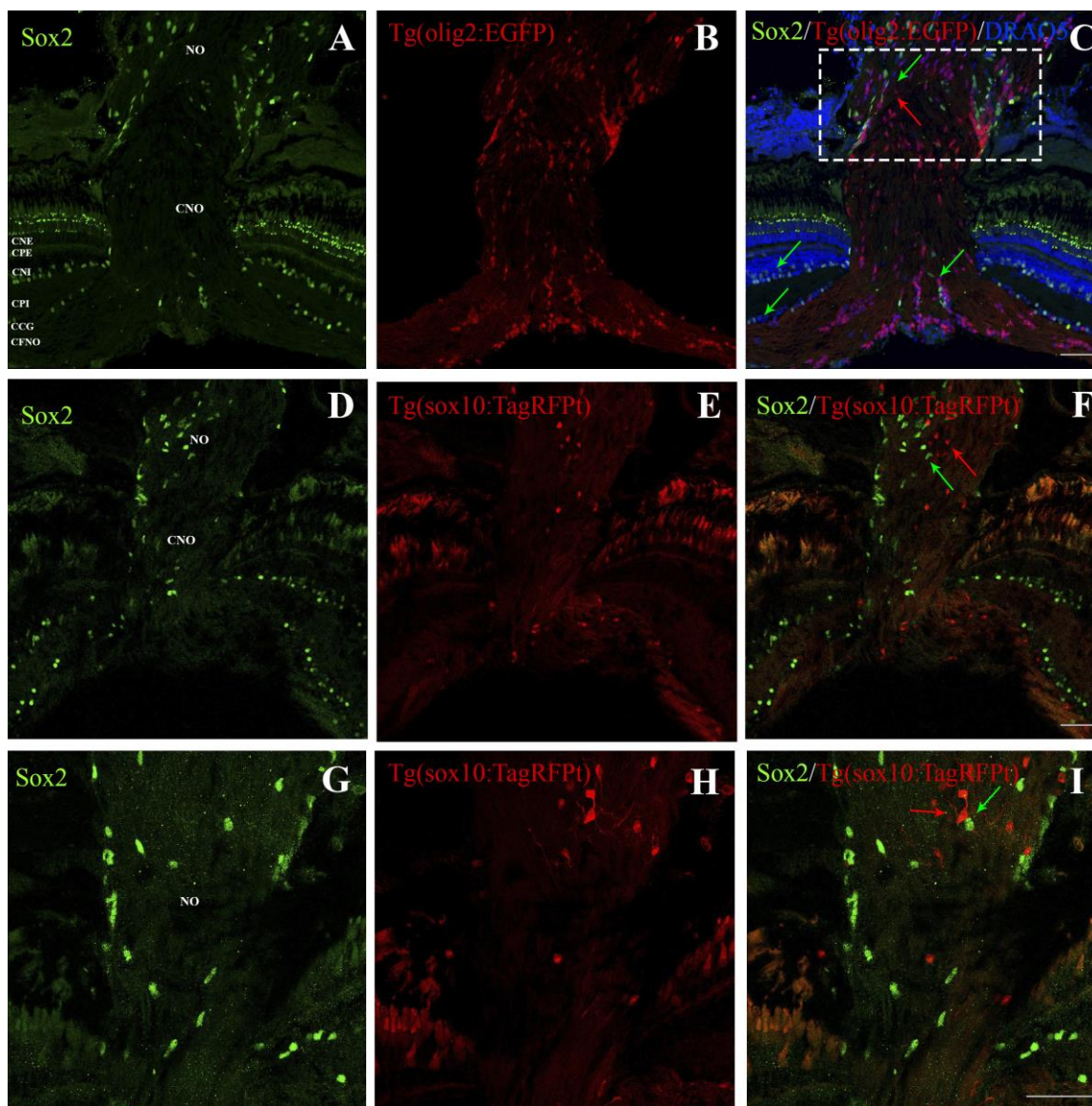
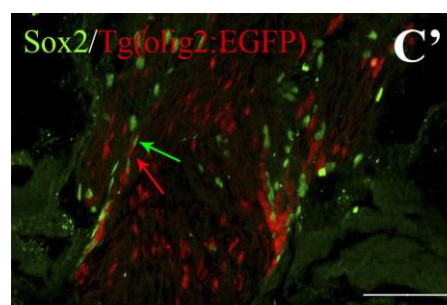


Figura 45: Secciones de NO procedentes de peces cebra transgénicos de los linajes Tg(olig2:EGFP) (A - C') y Tg(sox10:TagRFPT) (D - I). Células Sox2 (A, D y G), Olig2 (B) y Sox10 (E y H) positivas que se indican en las imágenes C, F, I y C' (flechas verdes o rojas). En detalle (G - I y C') se observa que los marcadores no co-localizan. Barra de escala: 20 μ m



4.5.4. Cuantificación de las células Sox2 positivas en los componentes pre-encefálicos del sistema visual de *A. burtoni*

Para comprobar si la densidad de la población de células Sox2 positivas en la entrada del NO era estadísticamente diferente a las zonas centrales, hemos realizado una cuantificación celular (ver 3.7.2). Dado que los datos del contaje no han presentado una varianza homogénea (prueba Levene, p -valor ≤ 0.05 ; se rechaza la hipótesis nula de que las varianzas son iguales), hemos aplicado dos pruebas no paramétricas para el análisis estadístico (Fig. 46).

El análisis general ha detectado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados (prueba Kruskal-Wallis, p -valor ≤ 0.05 ; se rechaza la hipótesis nula de que todos los datos potencialmente representan la misma población). Para detectar cuál de los grupos presenta mayor diferencia hemos aplicado la prueba U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni (análisis grupo a grupo). Los resultados demuestran que estadísticamente (Fig. 46A'): (i) la CNO es la porción con menor cantidad de células Sox2 positivas; (ii) no existen diferencias significativas entre la CCG de la retina y porciones centrales del NO; (iii) la entrada del NO, porción más rostral del mismo, es la zona con mayor densidad de células Sox2 positivas.

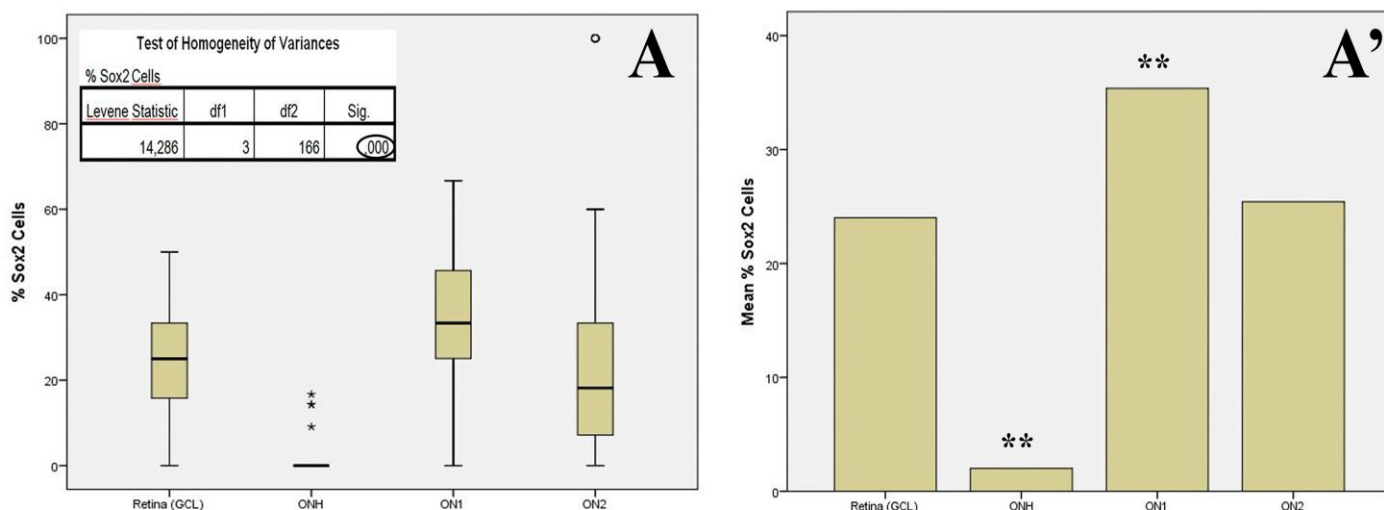


Figura 46: Resultados del análisis estadístico de las poblaciones de células Sox2 positivas en los componentes pre-encefálicos del sistema visual. Prueba Levene y box-plot (A) para el análisis general de los diferentes grupos y gráficas de la prueba U de Mann-Whitney (A') dónde se indican los grupos con mayor diferencia estadística (asteriscos).

4.6. Aclaramiento del tejido

Tras el marcaje con Sox2, se han podido transparentar las muestras del globo ocular de *A. burtoni* adultos, incluyendo la retina, CNO y una porción del NO (Fig. 47 y vídeos 2, 3 y 4). Ello nos ha permitido observar la disposición de las células Sox2 positivas en tres dimensiones desde la ZPG hasta el NO (Fig. 47A – I). Además, hemos podido observar la estructura de los axones DCX positivos y la relación de éstos con las células Sox2 positivas (Fig. 47C, F e I).

En toda la extensión de la retina se distinguen células Sox2 positivas repartidas en distintas capas (Fig. 47A, D y G). En el NO se observan muchas células Sox2 positivas mientras que en la CNO no se han visto dichas células (Fig. 47A – I). En esta última región, la CNO, es dónde el marcaje para DCX (Fig. 47B, E y F) se hace más intenso, ocupando toda la zona.

Si se analiza en detalle, se puede comprobar que el mayor número de células Sox2 positivas se encuentra en la porción cercana a la CNO, adyacente a los axones DCX positivos, y presentan una disposición paralela entre ellas (Fig. 47C' – C'''). Los axones inciden conjuntamente al NO por la zona nasal y están rodeados de células Sox2 positivas (Fig. 47C – C'''). Por lo anterior, aunque el marcaje de DCX es intenso en el NO, su disposición está restringida a la porción nasal del mismo (Fig. 47C).

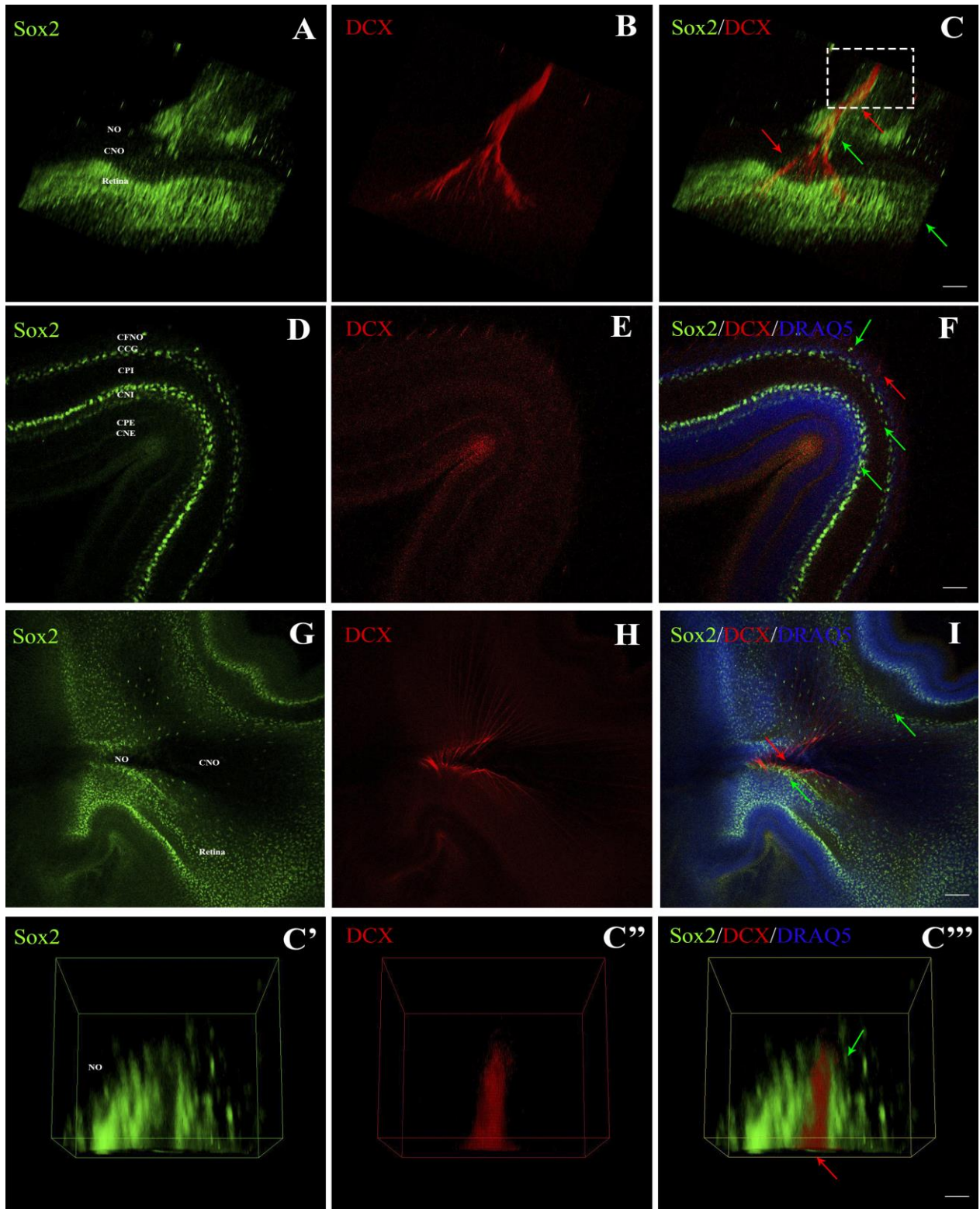


Figura 47: Imágenes de los análisis de los componentes pre-encefálicos del sistema visual, de *A. burtoni*, tras aplicar técnicas de aclaramiento de tejido. Se observa la disposición general de las células Sox2 (A) y de los axones DCX (B) en la retina, CNO y NO (C; flechas verdes o rojas). En la retina, las células Sox2 positivas (D) se disponen en diferentes capas y los axones DCX positivos (E) discurren por la CFNO; no hay co-localización de ambos (F; flechas verdes o roja). A diferencia del NO, en la CNO no se detectan células Sox2 positivas (G). Además, en la CNO el marcaje frente a DCX (H) se intensifica, y en el NO se encuentran en la zona nasal (C y I; flechas verdes o rojas). En las imágenes C' - C''' se observa la zona del recuadro (C) en detalle; la zona en la que se encuentra cada marcador, se indica en C''' (flechas verdes o rojas). Barra de escala: (A - C''): 200 μ m y (D - I): 20 μ m

4.7. Retinas *in toto*

En el caso de los ciprínidos, se ha analizado la disposición de las células Sox2 positivas mediante técnicas IHQ en retinas *in toto* (Fig. 48, 49 y 50), que se han extraído junto a una porción del NO (incluyendo la CNO). Además, se han analizado los axones de nueva generación, Zn8 positivos, procedentes de las células de la zona de transición de la retina.

Los resultados obtenidos han respaldado las observaciones realizadas en secciones. Se han detectado células Sox2 positivas en la retina (Figs. 48A, B, E, F y 49), prácticamente ausentes en la CNO (Fig. 50A – C) y dispersas en toda la longitud del NO (Fig. 50). Las células Sox2 positivas, al igual que en secciones, también se han observado en la ZPG y en diferentes capas de la retina madura. Debido a dicha disposición en capas (CFNO, CCG y CNI principalmente), en imágenes se observan diferentes intensidades del marcaje frente a Sox2 (Fig. 48A, E y 48A).

Con relación al marcaje frente a Zn8, se encuentran somas positivos en porciones periféricas de la retina (Fig. 48C y D). Además, ha sido posible seguir sus axones a lo largo de la retina madura (Figs. 48G, H y 49) hasta el NO (Fig. 50). Estos axones discurren por la CFNO, dónde también se encuentran células Sox2 positivas, y se entrecruzan entre ellos a lo largo de toda la retina (Figs. 48H y 49B).

La CNO es una zona en la que prácticamente no se han detectado células Sox2 positivas (Fig. 50A), y se detecta un marcaje muy intenso de axones Zn8 que se entrecruzan (Fig. 50B). En el NO, las células Sox2 positivas son más numerosas en zonas adyacentes al marcaje Zn8 (Fig. 50C y F). Además, aparentemente, en dicha región presentan una disposición paralela entre ellas, que no se observa en las células Sox2 positivas presentes en las zonas maduras del NO (Fig. 50F y vídeo 5).

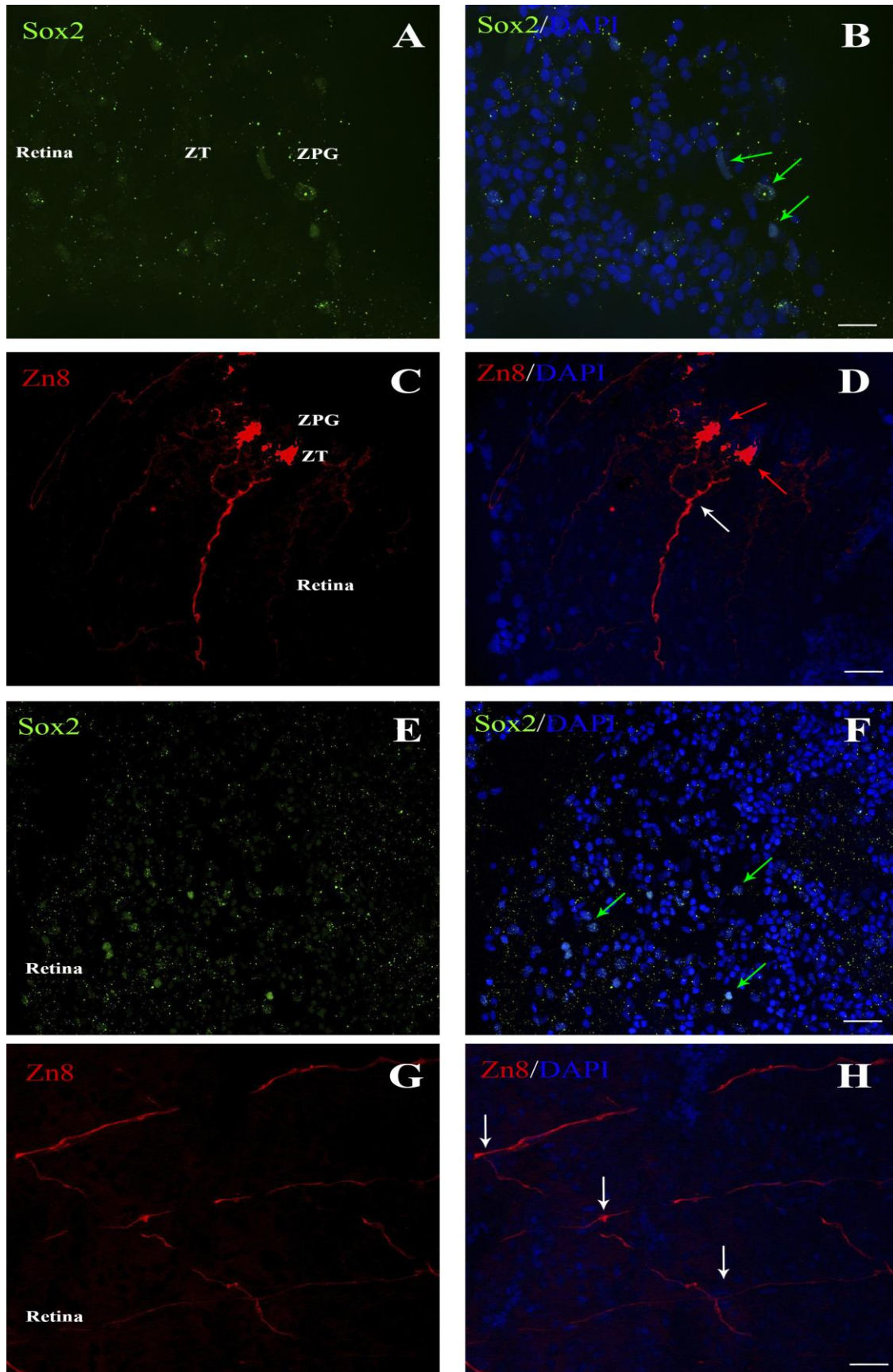


Figura 48: Imágenes de los análisis de las retinas *in toto*. En regiones periféricas de la retina (A-D), se encuentran células positivas para Sox2 (A y B) en la ZPG, y para Zn8 (C y D) en la ZT (flechas verdes y rojas). Además, el marcaje frente a Zn8 ha permitido seguir a los axones de estas células (flechas blancas) a lo largo de la retina. En zonas centrales de la retina (E-H), se han detectado células Sox2 (E y F) y axones Zn8 (G y H) positivos. Debido a la distribución de las células Sox2 en diferentes capas de la retina, se observan distintas intensidades del marcaje (flechas verdes). A lo largo de toda la retina se observan entrecruzados de axones Zn8 positivos (flechas blancas). Barra de escala: 20 μm

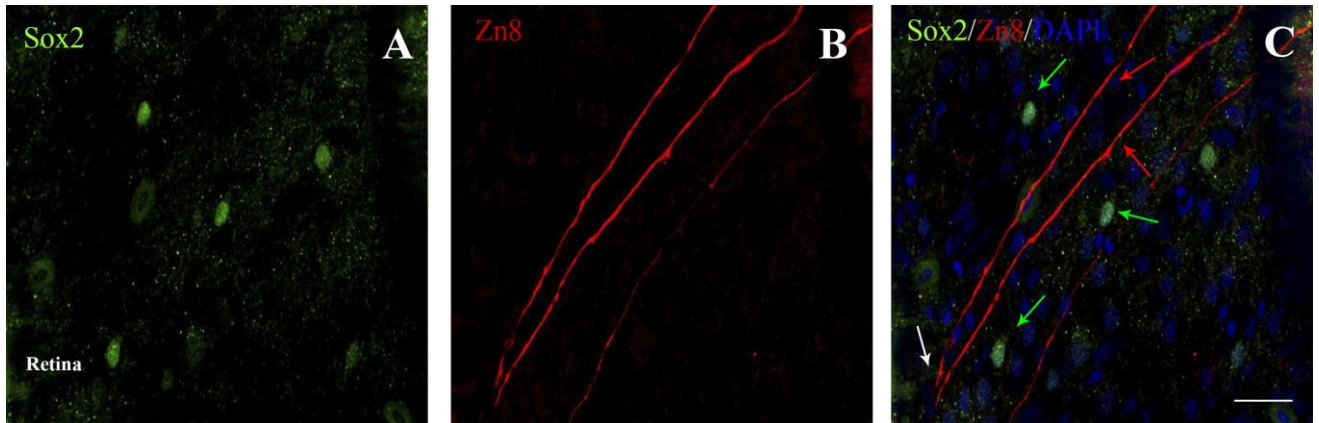


Figura 49: Imágenes de la CFNO de la retina de un ejemplar de *C. auratus* adulto. Se detectan células Sox2 (A) y axones Zn8 (B) positivos. En C se indican las células (flechas verdes) y los axones (flechas rojas), y una zona dónde dichos axones se entrecruzan (flecha blanca). Barra de escala: 20 μ m

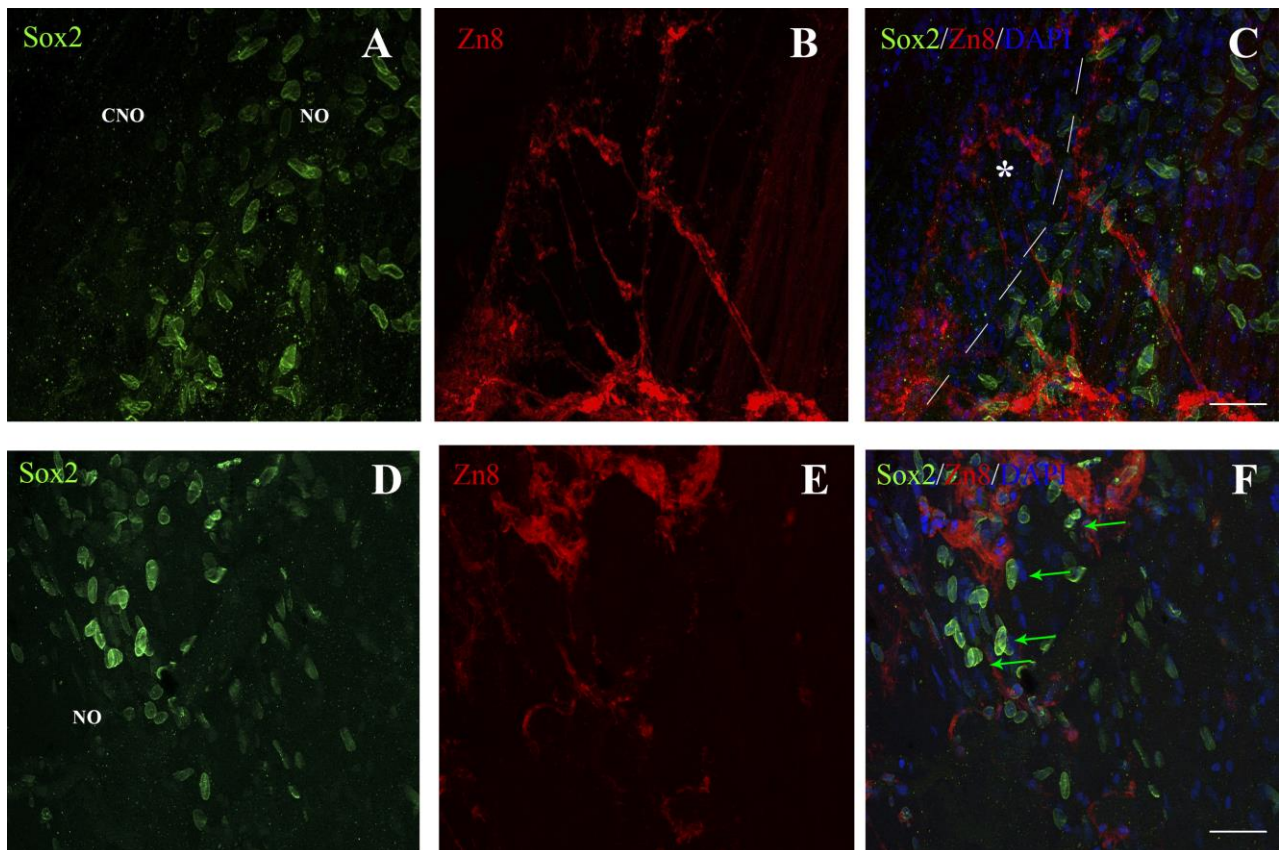


Figura 50: Imágenes de la CNO (A-C) y NO (D-F) de *C. auratus*. En el análisis de los preparados se han observado células Sox2 (A y D) y axones Zn8 (B y E) positivos. Los dos marcadores no colocan en ningún caso (C y F). En la CNO apenas se han detectado células Sox2 positivas (asterisco blanco), y en el NO aparentemente dichas células son más numerosas en zonas adyacentes al marcaje Zn8 positivo (flechas verdes). Barra de escala: 20 μ m



Discusión



*Conserva celosamente tu derecho a reflexionar,
porque incluso el hecho de pensar erróneamente es
mejor que no pensar en absoluto.*

Hipatia

5. Discusión

5.1. Disposición de células Sox2 positivas en el sistema visual de peces teleósteos: una visión general

Los resultados de los análisis de las secciones (ver 4.5; Fig.51) y de los tejidos *in toto* (ver 4.6 y 4.7) han relevado un patrón de expresión de las células Sox2 positivas muy similar en las tres especies: las células marcadas están presentes en la retina, prácticamente ausentes en la CNO y se localizan dispersas por toda la longitud del NO. Aparentemente, en las primeras porciones del NO las células Sox2 se disponen paralelas entre sí.

El análisis en secciones histológicas determina en qué capas de la retina se ubican, así como la disposición que presentan en el NO. La proteína Sox2 está presente en las células troncales de la ZPG (Figs. A - C en 28, 29 y 30), en diferentes capas de la retina madura (ver 4.5.1) y en el NO (ver 4.5.3).

Combinando el marcaje frente a Sox2 con los marcadores DCX y CR, hemos podido delimitar mediante IHQ, por primera vez, las tres zonas de crecimiento de la retina (Fig. 38). Además, utilizando diferentes marcadores, hemos podido determinar diferentes tipos celulares que expresan dicha proteína. La variedad de tipos celulares que expresan Sox2 en edad adulta, en las tres especies estudiadas, hace evidente la necesidad de discutir sobre la función, o funciones, en que dicha proteína participa en el sistema visual de peces (ver 5.2 y 5.3).

Cabe destacar que las células Sox2 positivas parecen presentar, al menos en la CNO (por su ausencia) y en el NO (por su disposición diferencial), cierta relación con los axones de las neuronas recién formadas (DCX o Zn8 positivos). En ningún caso se han encontrado células con doble marcaje para Sox2 y DCX/Zn8, indicando que las neuronas de nueva generación pierden la expresión de Sox2 en procesos tempranos de diferenciación. Por otro lado, se observa una fasciculación de los axones jóvenes de la CFNO (Stuermer et. al., 1992), que se intensifica en la CNO, hasta formar un solo fascículo que entra conjuntamente en el NO. Curiosamente, la zona de la CNO delimitada por esta intensificación del marcaje DCX/Zn8 es exactamente la misma región dónde prácticamente no existen células Sox2 positivas.

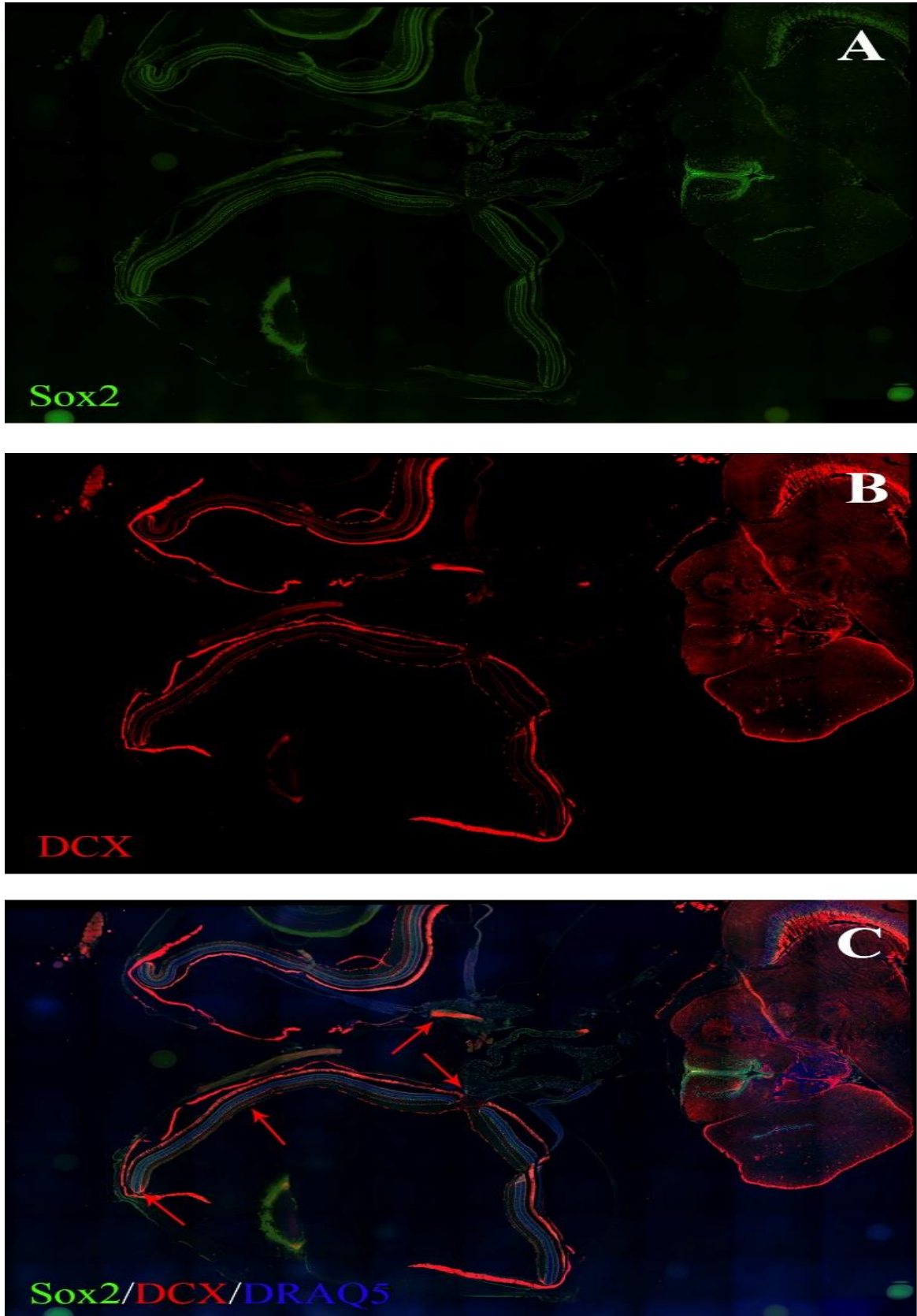


Figura 51: Composición de imágenes histológicas para tener una visión general de los componentes pre-encefálicos de *A. burtoni*. Se observa la disposición de células Sox2 positivas (A) en la ZPG, retina madura y NO. Además, el marcaje para DCX (B) nos ha permitido seguir los axones procedentes de las células de la zona de transición hasta su entrada en el NO, que en ambos ojos se da por la zona nasal (flechas rojas en C).

Además, analizando en detalle la entrada de un fascículo de axones jóvenes en el NO, se observa a las células Sox2 en una disposición cilíndrica alrededor del mismo. En cuanto a la vía de dichos axones, en secciones histológicas, hemos podido determinar que, en las tres especies de peces, los axones de nueva generación entran en el NO por la zona nasal (Fig. 51). Esto indicaría que la laminación del NO se realiza desde las zonas maduras del mismo, y que la ubicación de la entrada de nuevos axones es inmutable a lo largo de la vida del animal.

5.2. Células Sox2 positivas: células troncales, neuronas y gliales

La gran mayoría de publicaciones se centran en la función de Sox2 en mantener la capacidad proliferativa de las células (Surzenko et al., 2013; Lin et al., 2009; Hever et al., 2006; Episkopou, 2005; Pevny y Placzek, 2005). Además, se ha demostrado que, junto a otros factores de transcripción, Sox2 participa en la reprogramación de células somáticas a células troncales o proliferativas (Fig. 12) (Park et al., 2008; Yu et al., 2007). Por lo que hay consenso sobre la participación de Sox2 en la regulación de la proliferación celular.

No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, y diferentes estudios anteriores, hacen evidente que la proteína Sox2 se expresa también en células completamente diferenciadas del sistema visual (Whitney et al., 2014; Le Rouedec et al., 2002). Por ello, sugerimos que dicho factor de transcripción desempeña, al menos en el sistema visual, funciones adicionales a la descrita.

A continuación, se discute separadamente la presencia de Sox2 en los diferentes tipos celulares.

5.2.1. Células proliferativas Sox2 positivas

Como hemos mencionado, la principal función atribuida al factor de transcripción Sox2 es la de mantener la capacidad proliferativa de las células. Consecuentemente, hemos caracterizado las células proliferativas (PCNA positivas) de los componentes pre-encefálicos del sistema visual que a su vez expresan Sox2. En la ZPG de la retina, todas las células han sido positivas para Sox2 y PCNA (Figs. A - C en 28, 29 y 30), y negativas para todos los demás marcadores

utilizados (descrito en 4.2.1). Por ello podemos afirmar que las células Sox2 positivas ubicadas en la ZPG son las células troncales de la retina descritas con anterioridad (Garcia-Pradas et al., 2018; Jimeno et al., 2003; Olson et al., 1999). Por otro lado, aunque existen trabajos publicados sobre células que expresen ambos marcadores a la vez en el SNC (Sîrbulescu et al., 2015; Alunni et al., 2010; Ito et al., 2010), hemos identificado por primera vez su presencia en la retina de peces (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b).

En la retina madura y en el NO hemos identificado células Sox2 positivas proliferativas (con ambos marcadores) y células con solo uno de los marcadores, Sox2 o PCNA (Figs. 28D – I, 29 y 30). La gran mayoría de células Sox2 positivas observadas en la retina no han sido positivas frente a PCNA (Figs. 28, 29 y 30). Por ello, hemos utilizado también otros marcadores (gliales y neuronales; ver 5.2.2 y 5.2.3) para elucidar si dichas células podrían ser células proliferativas potenciales (Chan-Ling et al., 2009; Mack et al., 2003; Kwan et al., 1996; Hitchcock et al., 1992) como, por ejemplo, las células de Müller (Lust y Wittbrodt, 2018; Surzenko et al., 2013).

Según los resultados obtenidos cabe destacar: (i) todas las células PCNA positivas ubicadas en la CFNO también han sido positivas para Sox2, y podrían ser precursores gliales residentes de la retina (Garcia-Pradas et al., 2018; León-Lobera, 2017; Parrilla, 2010; Chan-Ling et al., 2009); (ii) se han identificado células PCNA positivas en la CNE que no expresan Sox2, que podrían corresponder a los precursores de bastones (Mack et al., 2003; Otteson et al., 2001; Kwan et al., 1996). Lo anterior es importante porque indica que el factor de transcripción Sox2 mantiene la capacidad proliferativa de las células (células con ambos marcadores, Sox2 y PCNA positivas), incluyendo aquellas ubicadas en zonas maduras del tejido adulto. Ello es importante porque demuestra que Sox2 no es esencial para que la célula pueda entrar en división (células PCNA positivas y Sox2 negativas).

Los resultados en el NO con relación a las células Sox2 positivas proliferativas han sido muy similares; aunque pocas células han presentado ambos marcadores, la mayoría de ellas han sido positivas solamente para Sox2 o PCNA. Consecuentemente se puede interpretar de manera similar: aunque, muy

probablemente, el factor de transcripción Sox2 tiene relación con las capacidades proliferativas, aparentemente no es esencial para la proliferación.

Por otro lado, la proteína PCNA como marcador de células proliferativas, y la escasa disponibilidad de anticuerpos alternativos [con excepción de la histona 3 phostato, que presenta una horquilla de detección mucho más estricta (von Bohlen und Halbach, 2011), no conocemos otros marcadores que funcionen en peces], es una limitación en el análisis de resultados. Como en el caso de las células de Müller, el hecho de que una célula no se encuentre en división (PCNA positivas), no está directamente relacionado con su capacidad proliferativa. Consecuentemente, determinar los tipos gliales y en que estadio de diferenciación se encuentran, sería relevante para determinar si las células Sox2 positivas del NO mantienen su capacidad proliferativa.

5.2.2. Células gliales Sox2 positivas

Diferentes estudios han descrito la expresión de la proteína Sox2 en las células de Müller de la retina (Gorsuch et al., 2017; Fischer et al., 2010; Lin et al., 2009). Por ello, hemos aplicado Sox2 y marcadores conocidos para células de Müller (GFAP y GS). Además, hemos analizado parámetros morfológicos de las células doblemente positivas (Sox2 y GFAP/GF): ubicadas en la región interna de la CNI, núcleo alargado, con dos prolongaciones largas y distales. También hemos utilizado animales transgénicos Tg (gfap:EGFP) para analizar la expresión de Sox2 en las células de Müller. Todas las células con la morfología y los marcadores típicos de células de Müller han sido positivas para Sox2 (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b).

La expresión de Sox2 en las células de Müller se asocia principalmente a su participación y/o implicaciones como potenciales células proliferativas en procesos de generación de nuevas células durante el crecimiento normal (Lenkowski y Raymond, 2014; Surzenko et al., 2013; Kimelberg, 2010; Bringmann et al., 2006) o durante la regeneración tras un daño (Lust y Wittbrodt, 2018; Bejarano-Escobar et al., 2017; Gorsuch et al., 2017; Thomas et al., 2016; Lenkowski y Raymond, 2014; Raymond et al., 2006).

Por otro lado, es conocido que la expresión de la proteína GFAP (principal marcador utilizado para la caracterización de células de la familia de los astrocitos) en el NO de peces no es constitutiva (Koke et al., 2010; Marcus y Easter, 1995; Levine, 1989). Por lo que, aunque hemos encontrado células GFAP y Sox2 positivas, es difícil determinar con seguridad a qué tipo celular pertenecen dichas células en los ciprínidos. Hemos identificado diversas células Sox2 y GS positivas en el NO de las tres especies de peces. Esto indica que las células gliales Sox2 positivas del NO presentan capacidad de metabolizar los compuestos nitrogenados, y típicamente se identifican como células astrocíticas; aunque existen estudios que localizan la proteína GS en OPCs y oligodendrocitos maduros (León-Lobera, 2017; Parrilla, 2010; Parrilla et al., 2009).

No obstante, en la caracterización de células Sox2 positivas en secciones de animales transgénicos Tg(olig2:EGFP) y Tg(sox10:TagRFPT) no hemos localizado células con doble marcaje. Esto indica que las células del linaje de oligodendrocitos no expresan Sox2. Además, en retinas de ratón está descrita la participación de astrocitos Sox2 positivos en el desarrollo de la vascularización (Kautzman et al., 2017). Sin embargo, las especies de peces utilizadas en este trabajo de investigación no presentan vasos sanguíneos intraretinianos (García-Pradas et al., 2018; Tarboush et al., 2012; Butler y Hodos, 2005), y por lo tanto, no tienen los astrocitos intraretinianos típicos.

Es evidente que las células gliales de los componentes pre-encefálicos del sistema visual de peces pueden expresar Sox2 en condiciones normales. Con mucha probabilidad, las células Sox2 positivas descritas en este trabajo de investigación son precursores gliales y/o células de la familia de los astrocitos. Consideramos que son necesarios más experimentos para determinar con seguridad a qué tipo glial, o subtipos, pertenecen dichas células y qué grado de diferenciación presentan (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b; Parrilla et al., 2016; Wen et al., 2016; Tao y Zhang, 2014; Chan-Ling et al., 2009; Lillo et al., 2002; Levine et al., 2001).

5.2.3. Células neuronales Sox2 positivas

Hemos caracterizado neuronas Sox2 positivas en la CNI, CPI y CCG de la retina mediante IHQ frente a PV y CR, en las tres especies de peces (además, en el caso de

A. burtoni se han analizado secciones con ChaT). Muchas de las células Sox2 también han sido positivas para el marcador PV, y ninguna de ellas ha presentado expresión frente a CR o ChaT (ver 4.5.1).

Las células Sox2 y PV positivas se han identificado como células amacrinas (CNI), y amacrinas desplazadas (CPI y CCG), según su ubicación en las diferentes capas de la retina (Fig. 36A – F). Aunque diferentes publicaciones hacen referencia a las células amacrinas PV positivas en la retina de peces adultos (Mack, 2007; Mack et al., 2004; Weruaga et al., 2000), a raíz de este trabajo se ha descrito por primera vez la expresión de Sox2 en dichas células (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b).

Con relación a las células amacrinas CR positivas, no hemos detectado ninguna célula con doble marcaje (Sox2 y CR). De igual manera, en los análisis de células Sox2 y ChaT positivas en secciones de *A. burtoni* no hemos detectado células con doble marcaje. En contraste, Whitney et. al. (2014) han identificado células Sox2 y ChaT positivas (amacrinas colinérgicas) en retinas de mamíferos. Ello sugiere que las células Sox2 positivas corresponderían a diferentes subtipos de células amacrinas en los distintos grupos de vertebrados.

La caracterización de células amacrinas Sox2 positivas evidencia que: (i) algunos subtipos de células amacrinas son Sox2 positivas (células con doble marcaje Sox2 y PV); (ii) no todos los subgrupos de células amacrinas mantienen la expresión de Sox2 (células CR y ChaT no han presentado marcaje frente a Sox2 en ningún caso); (iii) no todas las células de un mismo subgrupo de células amacrinas (PV positivas) son idénticas (algunas de ellas son Sox2 negativas). La enorme variedad de subgrupos identificados como células amacrinas, y la diversidad de clasificación de los mismos, es la principal limitación para caracterización de las células Sox2 positivas a estos niveles (Yan et al., 2020; Voinescu et al., 2009; Mack et al., 2004; Weruaga et al., 2000; Wässle et al., 1993).

Todas las células DCX o Zn8 positivas, neuronas de nueva generación de la zona de transición de la retina, han sido negativas para la proteína Sox2. No obstante, gracias a estos marcadores, hemos podido seguir a los nuevos axones y observar su interacción con las células Sox2 positivas en el sistema visual de teleósteos (ver 5.4). Esto podría tener un significado funcional en las interacciones axón-glía de los

procesos de guía y/o modulación de la generación de nuevas neuronas. Obviamente, debido a la estructura neural que presenta (descrito en 1.2.2), no se han detectado marcadores neuronales en el NO.

5.3. Papel de la proteína Sox2 en el sistema visual de peces

Como hemos mencionado, la principal función atribuida a la proteína Sox2 es la de mantener la capacidad proliferativa en las células que la expresan. Nuestros resultados apoyan esta idea que lleva décadas siendo estudiada y discutida por diversos grupos de investigación y desde diferentes aspectos: funcional, molecular y/o las aplicaciones de dicha función para la reprogramación celular. En la retina, la colocalización celular de Sox2 y PCNA dejan evidente la capacidad proliferativa que presentan todas las células de la ZPG, y algunas células en diferentes capas de la retina madura.

En esta misma línea, no nos ha sorprendido que las células de Müller expresen la proteína Sox2. Se ha descrito que las células de Müller tienen capacidad de dividirse y diferenciarse a diferentes tipos celulares retinianos (Guimarães et al., 2018; Gorsuch et al., 2017; Goldman, 2014; Reichenbach y Bringmann, 2013; Hitchcock et al., 2004), pudiendo así mantener la estructura en crecimiento (o recuperar partes del tejido dañado en procesos de regeneración) sin pérdidas en la función visual (Lust y Wittbrodt, 2018; Bejarano-Escobar et al., 2017; Goldman, 2014; Lenkowski y Raymond, 2014; Fischer, 2005; Fischer y Reh, 2001). Por ello, consideramos que, muy probablemente, las células con doble marcaje (Sox2 y PCNA), ubicadas en la CFNO de la retina, corresponden a precursores gliales. Dichos precursores podrían formar células de la familia de los oligodendrocitos descritos en el sistema visual de peces (García-Pradas et al., 2018; León-Lobera, 2017; Parrilla et al., 2016; French-Constant et al., 1988).

No obstante, los análisis de secciones de animales transgénicos, con fluorescencia asociada a genes típicamente del linaje de oligodendrocitos (sox10 y olig2) no ha revelado ninguna célula con doble marcaje. Por otro lado, estudios recientes han descrito a la proteína Sox2 como un importante modulador de los procesos de mielinización durante el desarrollo y postnatalmente del SNC de ratón (Zhang et al., 2018).

Esto sugiere que: (i) las células Sox2 positivas pertenecen a un subtipo de precursor glial menos comprometido con la diferenciación hacia oligodendrocitos que las conocidas OPCS; (ii) dichas células pertenecen a precursores gliales comprometidos en parte con la diferenciación hacia células de la familia de los astrocitos; (iii) existe algún subgrupo de astrocitos que mantiene capacidades proliferativas, aunque ya estén completamente diferenciados (de manera similar a las células de Müller). El análisis de secciones del NO de las tres especies de peces ha revelado la presencia de células Sox2 positivas con expresión de GFAP y/o GS lo que también apoya las tres hipótesis planteadas.

La bibliografía actual no proporciona información sobre la expresión de Sox2 en células de la CNO, y no hemos encontrado trabajos publicados sobre dichas células en el sistema visual de peces (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b). De los resultados obtenidos en dicha zona, de las tres especies de peces, es destacable que: (i) prácticamente no se han identificado células Sox2 positivas (Figs. 40, 41A – C y G – I, 45A – C, 47 y 50); (ii) se observa un entrecruzado de los axones procedentes de las neuronas de nueva generación (Figs. 39E, 40B y K, 47A – C, 48C, D, G y H, 49 y 50). No obstante, en algunas secciones de peces ciprinídeos hemos encontrado unas pocas células Sox2 positivas en la CNO (Figs. 41D – E y J – L y 45D – F), lo que no ha pasado en los cíclidos. Ello podría tener un significado funcional en las estrategias de crecimiento continuo y/o regeneración de los diferentes grupos de peces teleósteos (ver 5.6).

Estudios previos han descrito la presencia de astrocitos y sus prolongaciones en la región de la CNO (Parrilla et al., 2013; Yang y Hernández, 2003; Lillo et al., 2002). Para descartar que las fibras DCX positivas no sean prolongaciones astrocíticas, hemos realizado una IHQ doble (DCX y GFAP) en secciones de *A. burtoni* (Figs. 39D – F) no encontrando ningún caso de co-localización.

Hemos realizado una cuantificación de las células Sox2 positivas en secciones de *A. burtoni*. En comparación al pez cebra, esta especie presenta mayor tamaño corporal y de los componentes del sistema visual, y con relación a los dos ciprinídeos, presenta una separación de las capas de la retina más evidente. Consecuentemente es más sencillo determinar a qué capa pertenece cada célula contada y la cuantificación es más fiable. La cuantificación de las células Sox2

positivas (ver 5.4.4) ha revelado una población más densa en las primeras porciones del NO (rostrales) en comparación con las zonas centrales (Fig. 46).

Diferentes trabajos identifican la presencia de precursores gliales en la CNO y en el NO, que proporcionan constantemente nuevas células gliales necesarias para guiar, soportar, orientar y mielinizar a los nuevos axones (Moyon et al., 2016; Parrilla et al., 2016, 2013; Lillo et al., 2002). Así, los axones de nueva generación, aportados constantemente al NO, pueden acomodarse funcionalmente al sistema visual en crecimiento. La mayor densidad de células Sox2 positivas en el NO rostral indica que podrían corresponder a una población de células proliferativas, o a precursores gliales, necesarios para mantener la funcionalidad del sistema visual en crecimiento.

En los tejidos *in toto* hemos comprobado la disposición de las células Sox2 positivas en el NO. Analizando las imágenes en detalle es posible observar cómo dichas células forman un cilindro alrededor del marcaje de axones en crecimiento (Fig. 47C' - C''' y vídeo 3). En colaboración con el grupo del Dr. Mack hemos procesado los tejidos transparentados para comprobar su ultraestructura. Las imágenes obtenidas muestran una serie de células alrededor de los axones jóvenes (no mielinizados) que entran conjuntamente en el NO (Fig. 52).

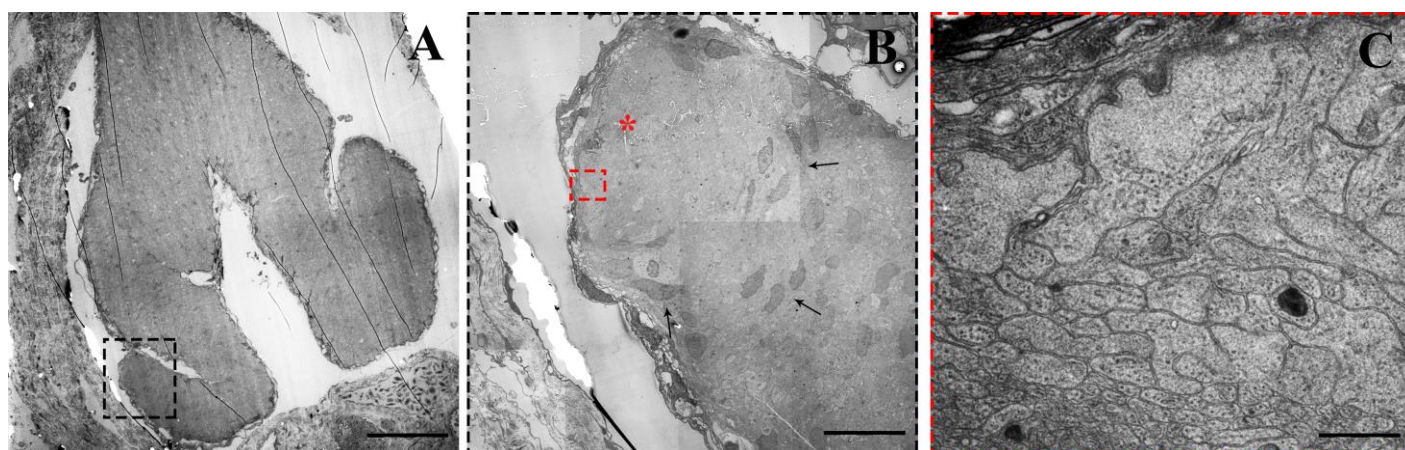


Figura 52: Imágenes del análisis de la ultraestructura del NO de *A. burtoni*. Se observa la estructura plegada del NO (A), que mantiene una ordenación cronológica de los axones. Observando en detalle la entrada de axones jóvenes (recuadro negro; B), se observan células (núcleos celulares; flechas negras) formando un cilindro alrededor de los axones sin mielinizar (asterisco rojo), que entran en conjunto por la misma zona del NO. En la imagen C se presenta en detalle el recuadro rojo en B y observan los numerosos axones amielínicos que se disponen en dicha zona. Barras de escala: (A): 50 μm , (B): 5 μm y (C): 0.5 μm .

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, consideramos que hay pruebas significativas sobre la participación de células gliales Sox2 positivas en la vía de los axones en crecimiento del sistema visual de peces. No obstante, sugerimos que dicha relación podría estar asociada a funciones diferentes a las proliferativas (DeOliveira-Mello et al., 2019a; Mercurio et al., 2019). Tras comprobar que células diferenciadas en la retina expresan Sox2 (ver 4.5.2), y identificar células Sox2 positivas a lo largo de todo el NO (ver 4.5.3) y no solo en la entrada del mismo, sugerimos que la proteína Sox2 desempeña diferentes funciones en el sistema visual de peces. Ello se traduciría en que las poblaciones de células Sox2 positivas podrían corresponder a diferentes nichos neuroquímicos que indican el adecuado recorrido de los axones en crecimiento [ver 5.4; (Tsai y Miller, 2002)].

La ausencia de células Sox2 positivas en la CNO correspondería a una señal para que dichos axones encuentren la zona adecuada para entrecruzarse, formar el fascículo y entrar correctamente por la zona nasal del NO, que también estaría marcada por las mismas células. Este nicho neuroquímico diferencial podría explicar la organización cronológica que mantienen los axones en el NO de peces durante la vida del animal, en continuo crecimiento (Tsai y Miller, 2002; Dowding et al., 1991; Scholes, 1991; Maggs y Scholes, 1986).

Liu et al. (2014) han descrito que el factor de transcripción Sox2, en algunos casos, puede actuar como represor de células troncales neuronales. Otros estudios discuten el papel de Sox2 en los procesos de diferenciación en el desarrollo (Kautzman et al., 2017; Sarkar y Hochedlinger, 2013; Hever et al., 2006; Kondoh et al., 2004). Aparentemente, la función de Sox2 está condicionada al cofactor al que se asocia en las distintas células, y/o procesos celulares (Cox et al., 2010; Kondoh y Kamachi, 2010; Inoue et al., 2007). Ello indica la necesidad de elucidar las funciones y/o los mecanismos de regulación que Sox2 desempeña en el sistema visual de vertebrados (DeOliveira-Mello et al., 2019a; Mercurio et al., 2019).

5.4. Participación de las células gliales del NO en procesos de modulación de la neurogénesis: crecimiento continuo y regeneración

Como hemos comentado, planteamos dos hipótesis principales en cuanto a la función de las células gliales Sox2 positivas en los componentes pre-encefálicos del sistema visual de peces teleósteos: (i) células que se mantienen como precursores gliales más o menos comprometidos, cuya función es aportar nuevas células gliales, tanto en la CFNO como en el NO, para mantener la funcionalidad del sistema en crecimiento; (ii) células que mantienen la expresión de Sox2 como señales neuroquímicas para que los axones jóvenes encuentren la vía adecuada para el mantenimiento de la funcionalidad durante el crecimiento. Ambas hipótesis no son excluyentes, ya que los precursores gliales que delimitan la vía axonal también aportarían nuevas células gliales al sistema, al tiempo que, según con que otros factores interactúe, pueden participar en otras funciones (Mercurio et al., 2019; Wei et al., 2019).

Además de los resultados presentados en este trabajo de investigación, hemos obtenido resultados preliminares sobre la expresión de Sox2 en procesos de regeneración. Se ha provocado una lesión del NO por aplastamiento en animales de tipo silvestre de peces cebra adultos (Liu y Londraville, 2003), y se ha analizado el patrón de expresión inmunohistoquímico en diferentes tiempos post lesión (3, 6, 9 y 24 horas) (Figs. 53 y 54).

En su Tesis Doctoral, León-Lobera (2017) ha cuantificado las células Sox2 positivas en procesos de regeneración y ha descrito un incremento del número de células Sox2 positivas tras 2, 7, 21 y 60 días post-lesión siendo evidente la tendencia en las gráficas al restablecimiento de las condiciones control. En los tres primeros tiempos post-pinzamiento analizados (3, 6 y 9 horas; Fig. 53A – I) se observan células Sox2 positivas en todos los componentes pre-encefálicos del sistema visual: retina, CNO y NO en todas las secciones analizadas. Curiosamente, en las secciones de animales sacrificados a las 24 horas de la lesión, las células Sox2 positivas prácticamente desaparecen de las zonas más periféricas de la retina y del NO, aunque se mantiene en la CNO (Figs. 53J – L y 54).

Aunque nuestros análisis sobre las células Sox2 en regeneración son todavía muy preliminares, sugerimos dos explicaciones: (i) los precursores gliales Sox2 positivos pasan por un periodo de muerte celular y/o pérdida de la expresión de la proteína Sox2, y posteriormente incrementan su número para aportar las células necesarias para la regeneración del sistema [a partir de las 48 horas; (León-Lobera, 2017)] (ii) tras la lesión, en la horquilla de tiempo en que la zona de lesión

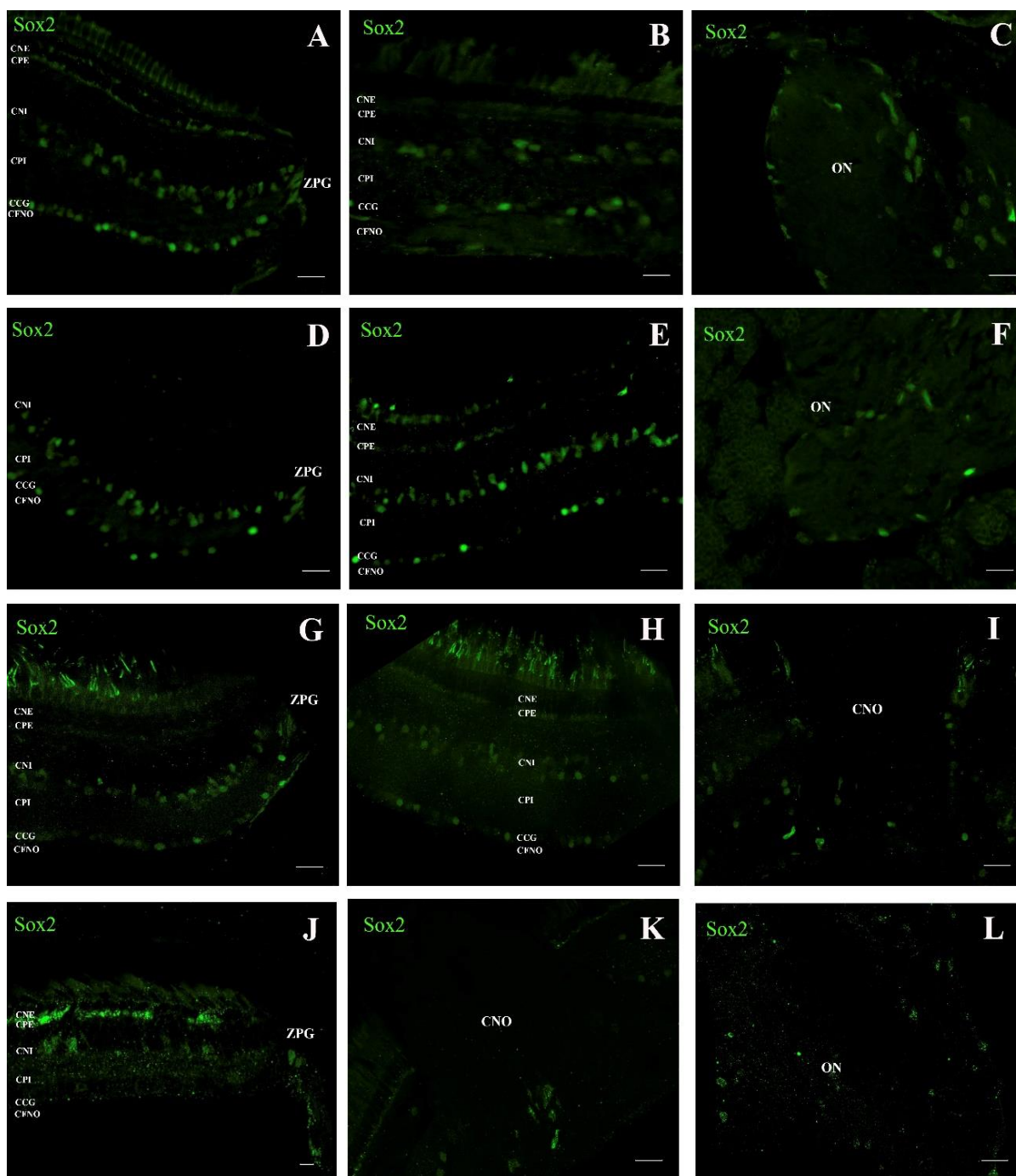


Figura 53: Secciones histológicas de pez cebra en diferentes tiempos post pinzamiento: 3 (A - C), 6 (D - F), 9 (G - I) y 24 horas (J - L). Células marcadas mediante IHQ para la detección de células Sox2 positivas. Barra de escala: 20 μ m

degenera, se limpia y antes de generar nuevas neuronas, la falta de señales procedentes de los axones en crecimiento (perdidos) provocan la muerte de las células gliales Sox2 positivas (24 horas post-lesión). Ambos supuestos, otra vez no excluyentes, ponen en evidencia la interacción axón-glía en la estructura del sistema visual y en los procesos de crecimiento y regeneración.

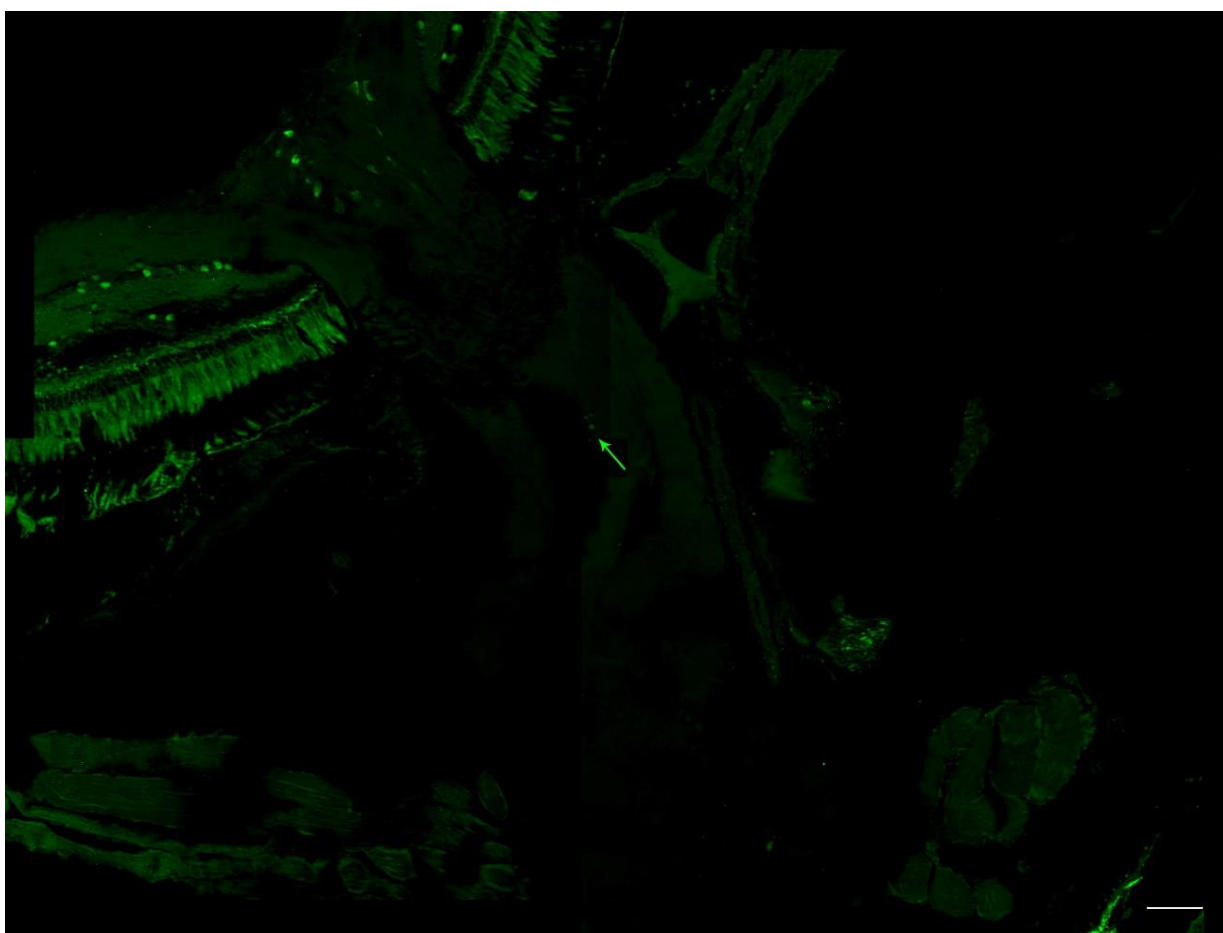


Figura 54: Composición de imágenes del análisis de las secciones de peces cebra tras 24 horas post pinzamiento. Se observa la presencia de células Sox2 positivas en la retina central y CNO, mientras está prácticamente ausente en el NO, salvo algunas excepciones (flecha verde). Barra de escala: 20 μ m

5.5. Estudio *in vitro* de células gliales del NO

El objetivo del estudio de células gliales *in vitro*, además de desarrollar una herramienta válida e importante para la investigación (Lara et al., 2019; DeOliveira-Mello et al., 2018), fue analizar con más detalle la Biología de dichas células. Las técnicas de caracterización IHQ en células de peces es muy compleja, debido a que la gran mayoría de anticuerpos comerciales están desarrollados para mamíferos. No obstante, hemos podido comprobar, ya sea por IHQ o con la

utilización de animales transgénicos que, en las tres especies, las células obtenidas correspondían a células gliales.

Hemos identificado a las células de los cultivos procedentes del NO en las tres especies de peces utilizadas para este trabajo, con al menos un marcador glial conocido (Mack y Tiedemann, 2013; Bernardos y Raymond, 2006). La caracterización celular también se ha realizado en los cultivos de encéfalo utilizados como control (datos no presentados), lo que indica la efectividad del protocolo para el cultivo de células gliales de peces teleósteos.

Comparando los cultivos celulares obtenidos con células del NO y del encéfalo, fue evidente que las células procedentes del encéfalo presentan más capacidad de supervivencia *in vitro* que las células del NO. En los cultivos de encéfalo se observan más células adheridas a la superficie de la placa, no solo tras aplicar el protocolo, sino también a lo largo de los días, siendo posible ampliarlas por resiembra, con excepción del pez cebra. En los cultivos de encéfalo de pez cebra, aunque en comparación con los cultivos de NO eran indiscutiblemente mejores, las células no han llegado a ocupar más del 50% de la placa y las técnicas de ampliación por resiembra no han tenido éxito.

En general, el protocolo de cultivo de células gliales fue significativamente más sencillo de aplicar a las dos especies de peces de mayor tamaño corporal: *A. burtoni* y *C. auratus*. La hipótesis más evidente es que se parte de una cantidad de tejido más elevada, con más células, y se obtienen más células adheridas a la placa. Por otro lado, consideramos que hemos intentado partir de una cantidad de tejido similar en los experimentos de pez cebra y las otras dos especies (cuatro veces más animales) y aun así observamos diferencias entre los cultivos. En la bibliografía consultada, salvo por una excepción (Tapanes-Castillo et al., 2014), solo hemos encontrado trabajos sobre cultivos neurales de pez cebra que utilicen tejidos embrionarios y/o muestras del Sistema Nervioso Periférico (Meade et al., 2019; Patel et al., 2019; Treichel y Hines, 2018; Kroehne et al., 2017; Ghosh et al., 1997). Ello sugiere que el tamaño corporal del pez cebra no es la única limitación en el cultivo de células del SNC adulto de pez cebra.

Con respecto al protocolo de cultivo de células gliales de NO, consideramos como pasos críticos: la disgregación mecánica, el porcentaje de FBS y el medio de

cultivo necesario para mantener las células *in vitro*. Los protocolos de cultivo publicados para células neurales utilizan una pipeta Pauster de cristal con el interior siliconado que provoca un leve rozamiento del tejido. Así, pueden aislar las células en una suspensión celular y posteriormente sembrarlas (Häring et al., 2020; Nakano et al., 1976). Esta técnica ha funcionado para las muestras de encéfalo, utilizadas como control, pero en ningún caso para las muestras de NO.

Hemos solventado este problema concentrando las células presentes en la suspensión celular obtenida de las muestras de NO y buscando una alternativa a la disgregación mecánica (ver 3.2), ya que las características de la pipeta Pauster no permite trabajar con volúmenes tan bajos. Acoplando dos puntas de micropipetas (p20 y p200; Fig. 14) hemos podido trabajar con volúmenes no mayores de 300 μ l, reproducir el rozamiento tisular y disgregar las células correctamente. Igualmente, los mejores resultados en cultivos celulares de NO se han obtenido en los casos en que la disgregación tisular no fue completa (se ha mantenido pequeños trozos de tejido; ver 3.2).

Obtuvimos células gliales de NO *in vitro* al utilizar los medios de cultivo iniciales con las dos concentraciones de FBS más elevadas (10% y 20%), de acuerdo con lo consultado en la bibliografía (Souza et al., 2017; Mack y Tiedemann, 2013; Rosenberg et al., 2008). Sin embargo, consideramos que para iniciar el cultivo de NO se obtienen mejores resultados, en las primeras 24 horas, en los casos de los cultivos con FBS al 20% (v/v); no hemos observado diferencias en cuanto al mantenimiento del cultivo (a partir del segundo cambio del medio) con una u otra concentración. La diferencia en el mantenimiento del cultivo de NO, principalmente en el incremento de la viabilidad de las células, se observó cuando aplicamos el medio condicional (ver 3.2.1 y 4.1). No obstante, el cultivo de NO más longevo fue de 32 días, tras este periodo algunas células empezaron a presentar morfología apoptótica, con membranas rotas o “fantasmas celulares”. En el caso de los cultivos de encéfalo, incluyendo los de peces cebra, eso no ha ocurrido.

En los experimentos por citometría de flujo, aunque hemos obtenido células *in vitro* los cultivos procedentes de la separación han sido indudablemente los que han presentado menor viabilidad (no más de 5 días), diferencia que no hemos observado en los cultivos de encéfalo utilizados como control. Por otro lado, hemos

podido determinar por primera vez, la proporción del porcentaje de células que expresan los genes *gfap/sox10* en el NO de peces cebra (ver 4.4).

Conjuntamente, los resultados obtenidos sugieren que las células gliales del NO necesitan factores procedentes de células del encéfalo para su supervivencia. Sabemos que el medio modificado puede contener diferentes compuestos como lisosomas, proteínas, péptidos y/o lípidos que muy probablemente afectan a las células gliales de NO al estar en contacto (Guimarães et al., 2018; Souza et al., 2017; Cheng et al., 2015; Wanner et al., 1995; Bastmeyer et al., 1991). Los resultados preliminares del análisis proteómico apoyan lo anterior, ya que se ha detectado una composición proteica diferente entre los medios de cultivo de NO y encéfalo.

En referencia a las células gliales Sox2 positivas en los cultivos, hemos detectado la presencia de dichas células en todos los cultivos de NO analizados, aunque no en todas las células (ver 4.1.2). Aparentemente las células *in vitro* presentan diferentes densidades del marcaje frente a Sox2 (ver 4.1.2; Fig. 24C), que podría deberse a diferentes cantidades de proteínas presentes en cada célula.

También hemos detectado marcaje frente a Sox2, que normalmente se ubica en el núcleo celular, en regiones citoplasmáticas (Fig. 24D), que se ha descrito con anterioridad en el caso de células cancerígenas (Schaefer y Lengerke, 2020; van Schaijik et al., 2018). Esto podría deberse a cambios celulares provocado por el estrés al que las sometemos aplicando el protocolo de cultivo. Ambas observaciones podrían relacionarse con la variedad de subtipos gliales Sox2 positivos en el NO, con la gran plasticidad que presentan las células gliales de peces, o bien que dichas células presentan diferentes grados de diferenciación (Zhou et al., 2018; Corsinotti et al., 2017; Sarkar y Hochedlinger, 2013; Taranova, 2006).

Gracias al protocolo desarrollado en este trabajo, se hace posible realizar diferentes experimentos para elucidar diversos aspectos de la Biología de las células gliales del NO de peces teleosteos, por ejemplo: (i) ensayos funcionales, con co-cultivos de células retinianas y/o cerebrales, para investigar la interacción axón-glía a diferentes niveles; (ii) ensayos moleculares, y de las ómicas, para determinar los factores principales que secretan y/o absorben dichas células; (iii)

ensayos de caracterización de los diferentes grados de diferenciación de estas células y/o el potencial de plasticidad que presentan.

Es decir, en cuanto a las perspectivas futuras de este apartado del trabajo, consideramos que abrimos la posibilidad de determinar si las células gliales Sox2 positivas del NO pueden guiar a los axones en crecimiento, además de la proteómica, transcriptómica, lipidómica, etc., de las células gliales de NO de peces teleósteos al menos en tres especies. También estudios *in vitro* provocando cambios en las condiciones del medio de cultivo para determinar cómo las células reaccionan en cuanto a mantener su capacidad proliferativa y/o diferenciarse a los diferentes subtipos gliales.

5.6. Estudio comparativo de las células gliales de los componentes pre-encefálicos del sistema visual en tres especies de peces teleósteos

Los resultados en conjunto, obtenidos en paralelo en tres especies de peces teleósteos, aportan informaciones significativas en el ámbito de la biología comparada. No pretendemos abarcar más allá de los componentes pre-encefálicos del sistema visual: retina, CNO y NO. No obstante, consideramos que la caracterización de células Sox2 positivas en las tres especies, así como el estudio *in vitro* de las células gliales procedentes del NO, reúnen datos suficientes para comparar algunos aspectos de interés.

Aunque se conocen innúmerables diferencias entre las tres especies (Maruska y Fernald, 2018; Ghosh y Hui, 2016; Theis et al., 2012; Arenzana et al., 2011; Perry et al., 2010; Hitchcock y Raymond, 2004; Mack et al. 2004; Cid et al., 2002), a efectos de este trabajo las comparaciones se harán de manera general entre ciprínidos y cliéclidos. Como hemos comentado, aunque las tres especies de peces teleósteos comparten clase en la filogenia (*Actinopterygii*), *A. burtoni* pertenece a un orden y familia diferentes al carpín y al pez cebra (ver 1.1).

La disposición general de células Sox2 positivas en las estructuras analizadas ha sido muy similar en las tres especies, pero hay diferencias que consideramos destacables: (i) los ciprínidos tienen muchas más células PCNA positivas en la CNE que el pez cíclido; (ii) en muestras de *A. burtoni* hemos detectado células con doble

marcaje de Sox2 y PCNA en la CFNO y CNE, y células PCNA positivas en la CNE, que no se han observado en las otras dos especies; (iii) hemos observado algunas pocas células Sox2 positivas en la CNO de *C. auratus* y *D. rerio*, pero en ningún caso en secciones de *A. burtoni*. (iv) en el pez cebra, la mayoría de las células amacrinas Sox2 y PV positivas se detectan en la CCG, mientras y en los cíclidos se encuentran mayoritariamente en la CNI (Fig. 36B y E). Suponemos que dichas diferencias podrían tener algún significado funcional en cuanto a la estrategia de crecimiento continuo de los distintos órdenes de peces teleósteos.

La diferencia en la ubicación y/o cantidad de precursores gliales, así como la diferencia en la guía de axones en crecimiento podrían reflejar diferentes modelos de crecimiento y/o regeneración. En los ciprínidos, las células proliferativas (PCNA) son abundantes en la CNE (Figs. 29B y 30B y E), muy probablemente precursores de bastones. En los cíclidos, apenas hemos detectado células proliferativas presentes en CNE (Fig. 28H). Además, en *A. burtoni*, aparentemente los precursores de bastones expresan el factor de transcripción Sox2 durante su proceso de división/diferenciación (Fig. 28G – I).

En cuanto a la CNO, es evidente la diferencia entre los órdenes de peces. Destacamos el hecho de que no se ha detectado ninguna célula Sox2 positiva en ninguna de las secciones de CNO analizadas de *A. burtoni*. No obstante, antes de formular una hipótesis fundamentada, consideramos necesario caracterizar las subpoblaciones de células gliales y/o sus progenitores de los diferentes grupos de peces teleósteos, así como si están en procesos de migración (desde la retina hacia el NO o viceversa), o si son residentes de esta zona. En esta línea, la disposición diferencial de los subgrupos de células amacrinas podría indicar una diversidad en cuanto a la estructura de la retina de peces teleósteos.

Además, gracias a una colaboración con la Dra. Isabel Vicente Muñoz de la Universidad de Pisa (Italia), hemos realizado un análisis *in silico* con el software *Geneious* (v. 10.0.9). Hemos analizado las secuencias de las proteínas utilizadas como marcadores de axones jóvenes DCX y Zn8 debido a que los anticuerpos utilizados no han sido efectivos en las distintas especies. Para confirmar la presencia de estas proteínas en el genoma de las tres especies, primeramente hemos accedido a sus genomas completos [público en la página web del Centro

Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, del inglés *National Center for Biotechnology Information*): *A. burtoni* [número de *assembly NCBI*: GCF_000239415.1_AstBur1.0; *Bioproject*, PRJNA60363 (Brawand et al., 2014)], *C. auratus* [número de *assembly NCBI*: GCA_003368295.1_ASM336829v1; *Bioproject*, PRJNA487739 (Lau y Ge, 2005; Murakami et al., 1998)] y *D. rerio* [número de *assembly NCBI*: GCA_000002035.4_GRCz11; *Bioproject*, PRJNA11776 (Howe et al., 2013; Broughton et al., 2001)]. Tras obtener las secuencias descritas para la proteína DCX en el pez cíclido (número de accesoión *NCBI*: XP_005922256.1) y en el carpín dorado (número de accesoión *NCBI*: XP_026110587.1), hemos comprobado si son homólogas entre sí. Las dos proteínas presentan un 89,4% de similitud en el análisis de alineado de pares.

A continuación se ha realizado un alineamiento de la secuencia de DCX (de ambas especies) al genoma de *D. rerio*, y no se ha encontrado ninguna coincidencia. Como control positivo hemos identificado la secuencia de la proteína Zn8 en *D. rerio* (número de accesoión *NCBI*: NP_571075.1). Pese a que el anticuerpo que hemos utilizado no es efectivo en *A. burtoni*, los análisis *in silico* han revelado que las tres especies poseen secuencias para dicha proteína en sus genomas [número de accesoión *NCBI*: XP_014186870.1 (*A. burtoni*) y XP_026129486.1 (*C. auratus*)].

En conjunto, los análisis bioinformáticos indican que el pez cebra ha sufrido alguna mutación o deleción en el gen para la DCX y que, el antígeno o la estructura terciaria de Zn8 en cíclidos y ciprínidos, muy probablemente, es diferente. Aunque estos análisis son preliminares, consideramos que son indicios adicionales sobre la posible diversidad que los grupos de peces teleósteos presentan en cuanto a estrategias para mantener el SNC adulto en crecimiento y con capacidad de regeneración.

Consecuentemente, conocer los subgrupos de células gliales, sus diferentes grados de diferenciación y su plasticidad, en los grupos de peces teleósteos con capacidad de crecimiento continuo y regeneración, es esencial para comprender la relación glía-neurona en los procesos de generación de nuevas células. De igual manera, entender la Biología de las células gliales y desarrollar métodos para manipularlas *in vitro*, podría ser la clave para lograr entender la neurogénesis y la



regeneración del SNC de vertebrados, y a largo plazo lograr desarrollar terapias celulares exitosas (Zheng et al., 2018).





Conclusiones



*La inteligencia es la capacidad de maximizar
opciones futuras.*

Suzana Herculano-Houzel

6. Conclusiones

- 1. El protocolo de cultivo desarrollado es suficiente para obtener y mantener células gliales procedentes de nervio óptico de peces teleósteos.** Disponer de una herramienta de estudio *in vitro* válida, amplía significativamente las posibilidades de comprender la Biología de las células gliales del NO de peces teleósteos. Además, a largo plazo supone una disminución en la necesidad del uso de animales en la experimentación.
- 2. Hay células proliferativas, gliales y neuronales, en los componentes pre-encefálicos del sistema visual que expresan el factor de transcripción Sox2.** La presencia de Sox2 en diferentes subgrupos celulares, incluyendo células totalmente diferenciadas como neuronas, demuestra que la función de este factor de transcripción no está restringida a mantener la capacidad proliferativa de las células y que podría depender de diferentes factores.
- 3. Los axones jóvenes entran en el NO por la zona nasal del mismo agrupados en un solo fascículo.** Aparentemente, los axones procedentes de las células de la zona de transición (DCX/Zn8 positivos) van gradualmente formando pequeños fascículos a lo largo de la retina madura. En la CNO dicho proceso se intensifica hasta que todos estos axones forman un solo fascículo.
- 4. Las células Sox2 positivas se disponen alrededor del fascículo formado por los axones jóvenes procedentes de las células de la zona de transición.** El cilindro que las células Sox2 positivas forman alrededor de la entrada de nuevos axones en el NO, que no se observa en zonas maduras del mismo, supone un indicio importante de la interacción glía-axón en procesos de crecimiento en peces en edades adultas.
- 5. Este trabajo de investigación pone en evidencia la importancia y necesidad de estudios sobre los subtipos de**



progenitores gliales y células gliales diferenciadas, en los diferentes grupos de peces teleósteos. Diferencias en la ubicación y/o en la diversidad de los subtipos gliales del sistema visual de peces podrían indicar una posible diversidad de estrategias para el crecimiento continuo y regeneración. Consecuentemente, consideramos que este trabajo también concierne a aspectos de la Biología comparada de peces.



English Version



*My methods are really methods of working and
thinking; this is why they have crept in everywhere
anonymously.*

Emmy Noether

7. Introduction summary

This PhD thesis is focused on the study of glial cells of the fish visual system. We have investigated different aspects of the biology of glial cells and their involvement in the axonal growth of the visual system of fish teleost during adulthood.

7.1. Fish as experimental model

In contrast to mammals, the central nervous system (CNS) of several species of teleost fish shows continuous growth and capacity to regenerate during the entire animal's life (Bejarano-Escobar et al., 2013; Parrilla et al., 2009; Fernald, 1991; Mack and Fernald, 1991; Stuermer, 1988), including their visual system (Fig. 1). Consequently, fish species are an excellent model to study aspects of neurogenesis in adulthood (Sîrbulescu et al., 2015; Gemberling et al., 2013; Fadool and Dowling, 2008; Hitchcock et al., 1992), and to assay and try to develop cell therapies for disorders of the CNS (Almasieh and Levin, 2017; Lieschke and Currie, 2007).

In this study, we have employed three different fish species in parallel, since each of them have different interests: *Danio rerio* (zebrafish), *Carassius auratus* (goldfish), and *Astatotilapia burtoni* (cichlid fish; formerly known as *Haplochromis burtoni*) (Fig.2). Zebrafish is a well-established teleost model for the study of the visual system (Hitchcock et al., 2004; Bilotta and Saszik, 2001; Wixon, 2000; Stuermer, 1988), being one of the advantages the large knowledge of its genome (Harper and Lawrence, 2011; Perry et al., 2010; Bilotta and Saszik, 2001; Wixon, 2000). In addition, we have available transgenic linages of adult zebrafish, which have fluorescent proteins associated to the expression of particular glial genes. Goldfish is also a widely-used fish teleost employed for the study of the CNS (Parrilla et al., 2016, 2009; Hitchcock et al., 2004; Bastmeyer et al., 1993, 1989), and since this fish presents a larger body size in comparison to *D. rerio*, it is particularly valuable for experiments where larger models are needed. The cichlid fish is a model for behavioral studies (Juntti et al., 2016; Fernald and Maruska, 2012; Desjardins et al., 2010) and visual system growth adding substantial CNS tissue throughout life (Mack et. al., 2003; Fernald, 1991).

Figure 1: Eye of an adult zebrafish (6 months old) in comparison to the size of an entire juvenile (10 days after fecundation). Scale bar: 2 mm

Figure 2: The three fish species employed in this study. *D. rerio* (A), *C. auratus* (B), and *A. burtoni* (C). Scale bar: 1 cm

7.2. Visual System

The visual system of vertebrates comprises the retina, optic nerve (ON), and the brain centers processing visual information (Fig. 3). As part of the CNS, the visual system of adult teleosts shows continuous growth and spontaneous regeneration (Parrilla et al., 2013; Mack et al., 2003; Marcus et al., 1999), which implies the capacity of generating new cells during the entire animal's life. Glial cells are generated to guide, nourish, myelinate and support the axons both types of neurons, mature and newly formed ones (März et al., 2010; Parrilla et al., 2009; Mack, 2007; Raymond et al., 2006; Zupanc and Zupanc, 2006). We are mainly interested in the study of the glial cells of the pre-encephalic visual system: retina, optic nerve head (ONH), and optic nerve (ON).

7.2.1. Retina

The retina is the part of the CNS in charge of capturing luminous stimulus to transform it in electrical signals to be processed in the brain (Wässle and Boycott, 1991). Retinal phototransduction pathway is modulated by different signals throughout the retinal layers and culminates in the ganglion cell layer (Petralia et al., 2018; Kolb y Marshak, 2003; Kolb et al., 2002). Glial cells also are involved in phototransduction by modulating the visual pathway (Reichenbach et al., 2010; Bringmann et al., 2006; Metea and Newman, 2006; Gadea and López-Colomé, 2001).

Vertebrate retinas show a very similar structure among species and they are organized in nuclear and plexiform layers (Fig. 4). From scleral-most areas to the vitreous the organization of the retinal layers is:

- Retinal Pigment Epithelium
- Photoreceptor segments
- Outer nuclear layer (ONL; CNE in Spanish)
- Outer plexiform layer (OPL; CPE in Spanish)
- Inner nuclear layer (INL; CNI in Spanish)
- Outer plexiform layer (OPL; CPI in Spanish)
- Ganglion cell layer (GCL; CCG in Spanish)
- Nerve fiber layer (NFL; CFNO in Spanish)

Figure 3: Dissected components of cichlid visual system: eyes, optic nerved, and brain. Scale bar: 2 mm

Figure 4: The histological structure of the retina indicating its layers (acronyms in Spanish) (left) and a representative scheme (right). The cells that compose the retinal layers are indicated in the scheme. The color bars indicate each layer (Modified form Gramage et al., 2014; Scale bar: 25 µm).

7.2.1.1. Neurons of the retina

The retina has different neuronal cell types, described below (Fig. 4):

Photoreceptors: neurons in charge of capturing luminous stimulus and transform them into electrical signals. Rods and cones are different subtypes of photoreceptors according to their function and morphology (Masland, 2012; Peters et al., 1991).

Horizontal cells: these cells establish synaptic connections with photoreceptors, bipolar and interplexiform cells (Parthe, 1982) to modulate the visual transduction (Stell et al., 1982).

Bipolar cells: these neurons are located in the INL and connects with photoreceptors and ganglion cells and are modulated by other neurons in the ONL and INL (Caminos et al., 2000, 1999).

Amacrine cells: located in the inner INL, although some displaced ones are found in the GCL. These cells do not form synapsis directly with photoreceptors (Yan et al., 2020; Masland, 2012) but connect with bipolar and ganglion cells (Masland, 2012).

Ganglion cells: their soma are in the GCL and their myelinated axons are transmitting visual information to the brain throughout the NFL (Sanes and Masland, 2015; Xiang et al., 1996).

7.2.1.2. Macroglial cells of the retina

Astrocytes: one of the main glial cell types of vertebrate CNS (Verkhratsky and Nedergaard, 2018), also in the visual system. Retina shows two subtypes of astrocytes: radial astrocytes or Müller cells, and fibrous astrocytes (Kimmelberg, 2010; 2004; Nagelhus et al., 1998).

Müller cells are a specialized type of glia and the most common one in the retina (Fig. 4). These cells have a fusiform nucleus and their processes cross throughout all retina layers (Bringmann et al., 2006; Marc and Cameron, 2001; Newman and Reichenbach, 1996). During development, Müller cells are in charge of guiding different cell types to their correct layer (Goldman, 2014).

In addition, Müller cells are involved in neuronal metabolism serving as a reservoir of glycogen, regulating homeostasis and forming the blood-retina barrier (Reichenbach and Bringmann, 2013; Bringmann et al., 2006; Newman and Reichenbach, 1996). Müller cells also display a role in continuous growth and regeneration processes since they conserve their plasticity in adulthood (Lust and Wittbrodt, 2018; Ghosh and Hui, 2016; Thomas et al., 2016; Fischer and Bongini, 2010; Fischer and Reh, 2001).

Fibrous astrocytes and their processes are mostly located in the NFL of the retina (Fig. 4) (Kimelberg, 2010; Nagelhus et al., 1998; Bastmeyer et al., 1989). These cells show high mobility and plasticity and their main function is to support and nourish the ganglion cells axons (Kimelberg, 2010; Nagelhus et al., 1998; Bastmeyer et al., 1989; Büssow, 1980). Additionally, in the avascular teleost retina, astrocytes are involved in the organization of axons in the NFL, as well as participate in processes as axonal growth and regeneration (Garcia-Pradas et al., 2018; Lyons and Talbot, 2015; Raymond et al., 2006; Lillo et al., 2001). Several studies have also shown that fibrous astrocytes are involved in phagocytosis of myelin (Parrilla et al., 2013, 2012; Colavincenzo and Levine, 2000).

Oligodendrocytes: This glial cell type was first described by Del Río Horteiga (1921). Oligodendrocytes show a very diverse morphology and are distributed throughout the entire vertebrate CNS (Armati and Mathey, 2010; Mathey et al., 2010). In the retina, they are almost entirely restricted to the NFL (Fig. 4), where their main function is to myelinate the axons of the ganglion cells (Garcia-Pradas et al., 2018; León-Lobera, 2017; Armati and Mathey, 2010). This is in contrast to what happens in mammals, where these cells are restricted to the ON. In the fish retina, oligodendrocytes are also involved in metabolic functions by synthesizing lactate from glucose, which works as an energetic substrate for the axons (Lillo et al., 2002).

7.2.1.3. Continuous growth of the fish visual system

In fish, retinal neurogenesis continues after embryonic development by the preservation of a peripheral germinal zone (PGZ; ZPG in Spanish) in the circumferential edge of retinal tissue (Fig. 5). PGZ function is to apport all the new

neurons to the growing visual system (except for rod cells), and the Müller cells (Ito et al., 2010; Olson et al., 1999).

Once new cells are formed in the PGZ, they start to differentiate next to this area, in the transition zone (ZT), and the mature cells will locate in the most differentiated central retina (Fig. 5). Fish retina also shows proliferating cells in the ONL (rod precursors) and in the CNI (Song et al., 2017; Sánchez-Farías and Candal, 2015; Velasco et al., 2001; Kwan et al., 1996).

7.2.2. Optic nerve

Ganglion cells of the retina connect to the brain through the axons of the ON (Fig. 6), since ON tissue is formed by these axons and glial cells. Thus, the function of the ON is to transmit visual information to be processed and integrated in the brain. For this reason, the ON has been proposed as an appropriate model for glial-axon interaction studies, and to investigate glial cell involvement in processes such as axonal growth and regeneration.

To analyze and facilitate the study of all the processes taking place along the ON, this structure has been divided in different segments (Fig. 6A): pre-chiasm segment, optic chiasm (area where optic nerves cross), and post-chiasm or optic tract. In addition, pre-chiasm segment has been divided in intraocular segment or optic nerve head (ONH), and extraocular segment (Lillo et al., 1998).

7.2.2.1. Optic Nerve Head (ONH)

Intraocular segment or optic nerve head (ONH, CNO in Spanish) is the area where ganglion cells axons exit the eyeball (Fig. 7). ONH shows a structure and cell composition different to both, adjacent areas of the retina and the pre-chiasm segment of the ON. This portion is essential for the growth and regeneration of axons and it is formed by these axons accompanied by glial cells.

The ONH of fish teleost does not present the cribriform plate described in mammals, although it does show an astrocyte ring structure (known as glial limitans) (Lillo et al., 2002) and it is delimited by Müller cell processes. Furthermore, astrocytes and microglial cells are in contact with the vitreal-most Müller cells extensions near the ONH (Parrilla et al., 2013, 2012; Lillo et al., 1998).

Figure 6: A) Scheme of the visual system showing the segments of the ON: the pre-chiasm segment (segmento pre-quiasmático) formed by optic nerve head (CNO) and extraocular segment (segmento intraorbital), the optic chiasm (quiasma óptico), and the post chiasm segment (segmento post-quiasmático). Modified image from *Lillo et al., 1998* **B)** Dissected extraocular segment of an adult zebrafish showing the laminar structure of the optic nerve (arrows). Scale bar: 2 mm

As a consequence of the arrangement of the newly formed and growing axons, these are organized in a chronological manner in the ONH and in the ON (Lillo et al., 2002, 1998; Wanner et al., 1995; Bastmeyer et al., 1989; Stuermer, 1988). In addition, different glial cell precursors reside in the ONH (Parrilla et al., 2013, 2012; Fischer et al., 2010).

7.2.2.2. Extraocular segment

The extraocular segment shows a laminated structure with a chronological distribution of axons (Fig. 6B) according to their degree of myelination. In this zone there are also several reticular astrocytes that form axon fascicles (Peters et al., 1991; Scholes, 1991), as well as oligodendrocytes that myelinate the new unmyelinated ganglion cells axons which are constantly provided by the retina (Mack and Wolburg, 2006; Lillo et al., 2002; Bastmeyer et al., 1989).

Currently, the ON structure description is based on the annular growth of the retina showing the highly myelinated axons in the center surrounded by the new axons (Lillo et al., 1998; Easter et al., 1984). However, this structure seems to differ in the different fish species (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b).

7.3. Glial cells

Glial cells of adult fish retina are formed in the PGZ, while the origin of these cells in the ONH and in the ON is still unclear. Some studies shown that there is resident glial progenitors in the ON (León-Lobera, 2017; Parrilla, 2010; Chan-Ling et al., 2009; Cid, 2006), although others had described glial cells migrating from retina to colonize the ON (Blaugrund et al., 1993). In any case, glial cells are essential for the functioning of the visual system, not only during the normal processes of growth and lesion but also during regeneration.

7.3.1. Astrocytes

Astrocytes of the ON are a type of reticular astrocytes (Maggs and Scholes, 1990; Bastmeyer et al., 1989). In fish, these cells group the axons of the ON in multiple fascicles, but this organization has not been described in mammals (Lillo et al., 1998; Macdonald et al., 1997). In the ONH of teleosts, astrocytes express GFAP (Fig. 8) (Fischer et al., 2010; Lillo et al., 2002), but in some fish as in cyprinids, this labeling is not continuous throughout the extension of the ON in adulthood (Koke

et al., 2010; Marcus and Easter, 1995; Levine, 1989). These cells also form the limit of the neural and the connective tissues by organizing the so-called glial limitans (Garcia-Pradas et al., 2018; Lillo et al., 2002, 1998). In addition, a feature of these astrocytes is that they form GAP junctions, identified by immunolabelling for Connexin 43 (Tabernero et al., 2006; Bennett et al., 2003).

As mentioned, astrocytes of the ON do not constitutively express GFAP in adulthood of cyprinids, although after injury, these cells become reactive and increase the expression of this protein (Blaugrund et al., 1993). Numerous studies have described the characteristics and functions of astrocytes in the ONH and in the ON, in normal conditions as well as their involvement in both growing and regenerating processes (Parrilla et al., 2013, 2009; Dowding et al., 1991; Levine, 1989).

7.3.2. Oligodendrocytes

The oligodendrocytes of the ON form fibrous bundles and are quite similar to those in the rest of the CNS (Fig. 9) (Fischer et al., 2010; Cuoghi and Mola, 2009; Lillo et al., 1998). The main function of these cells in the ON is to form the myelin sheaths around the ganglion cell axons (Garcia-Pradas et al., 2018; Parrilla et al., 2016; Cuoghi and Mola, 2009; Lillo et al., 1998).

Resident ON glial progenitors are in charge of providing new oligodendrocytes to the growing fish ON (Sánchez-Gómez et al., 2018; León-Lobera, 2017; Moyon et al., 2016; Parrilla, 2010; Cid, 2006) and to the ONH by cell migration processes. (León-Lobera, 2017; Tsai and Miller, 2002; Perry and Lund, 1990). In addition, it has been described that oligodendrocytes are also present in the fish retina.

7.3.2.1. Myelinization

Rudolf Virchow coined the term *myelin* in 1858 for the first time [word translated from German to English without changes (Virchow, 1858)] before its origin or function were understood. Myelin is a multilaminar structure of membrane layers, and its main function is to surround axons forming sheaths (Fig. 10) (Zalc and Rosier, 2018; Schafer and Stevens, 2015). The myelin sheaths protect the axons and increase the speed of the nerve impulse.

Figure 8: Astrocytes of the cichlid CNS in culture. (Modified from Mack and Tiedemann, 2013) Scale bar: 20 μ m.

Figure 9: Myelinating oligodendrocyte of an adult transgenic zebrafish Tg (sox10:TagRFPT). Scale bar: 20 μ m.

Myelination is an inherent capacity of the oligodendrocyte that apparently only depends on the diameter of the axons (Lee et al., 2012; Rosenberg et al., 2008). The myelination process has been compared to the synaptic formation since both processes show a selective axonal selection according to the proper synaptic activity of the axons (Treichel and Hines, 2018; Zalc and Rosier, 2018; Koudelka et al., 2016; Lyons and Talbot, 2015; Almeida and Lyons, 2014).

Fish visual system contains myelinating oligodendrocytes during the entire animal's life. In addition, several studies have demonstrated that in regenerating processes, oligodendrocytes respond differently depending whether axons are myelinated or unmyelinated (León-Lobera, 2017; Parrilla et al., 2016; Parrilla, 2010).

7.3.3. Microglia

Del Río-Hortega described microglia for the first time (1930, 1927) as a cell type different to astrocytes and oligodendrocytes. This type of microglial cell has been described in all different vertebrate groups including fish (Fig. 11) (Frost and Schafer, 2016; Schafer and Stevens, 2015; Fischer et al., 2010).

Microglia are a highly specialized macrophage cell type in charge of the protection of the CNS (Kettenmann et al., 2011). In consequence, microglia functions reacting to pathological conditions, although in healthy conditions also functions as a phagocyte removing any toxic cell debris (Brown and Vilalta, 2015; Schafer and Stevens, 2015).

In fish retina, microglia are mainly localized in the OPL, IPL and the NFL; and less frequently in the ONL, INL, and the GCL (Lillo et al., 2001; Velasco et al., 1999; Dowding et al., 1991) although microglia retinal location highly depends on vertebrate species (Zelinka et al., 2012; Jimeno et al., 1999; Dowding et al., 1991). Microglia have been also described in the ONH and the ON (Parrilla et al., 2016; Lillo et al., 2002).

7.4. Glial precursors

Several studies have described proliferating glial cells in the adult vertebrate CNS (Ghosh and Hui, 2016; Sîrbulescu et al., 2015; Alvarez-Buylla et al., 2002; Seri

Figure 10: Electron microscope image showing myelin sheaths (arrows) surrounding an axon in the fish ON. (Modified from Maggs and Scholes, 1990). Scale bar is not available.

Figure 11: Microglial cell. (from neurojewelry.com). Scale bar is not available.

and Alvarez-Buylla, 2002). The three glial cell types, astrocytes, oligodendrocytes, and microglia have shown mitotic divisions in adult species (Wen et al., 2016; Dimou and Götz, 2014; Raymond et al., 2006).

Glial progenitors, as well glial cells in various differentiation stages have been observed in the ONH (Parrilla et al., 2016, 2012; Lillo et al., 2002) and in the ON (Arenzana et al., 2011; Parrilla et al., 2009; Mack and Wolburg, 2006; Lillo et al., 1998). Glial cells located in the NFL of the retina are also originated from these precursors that after formation, migrate towards the retina (Chan-Ling et al., 2009; Cid, 2006).

In mammals, recent studies have described an oligodendrocyte progenitor cell population (OPCs or NG2-glia) in the vertebrate CNS (Dimou and Simons, 2017; Dimou and Götz, 2014; Levine et al., 2001), that are able to differentiate to both, oligodendrocytes and astrocytes. OPCs are characterized by the expression of chondroitin sulfate proteoglycans, recognized by the NG2 antibody (Dimou and Simons, 2017; Eugenin-von Bernhardt and Dimou, 2016; Dimou and Gallo, 2015; Trotter et al., 2010). Nevertheless, to date, this protein (NG2) has not been recognized in the fish CNS.

7.5. Regeneration of the fish visual system

The CNS of teleost fish, including the visual system, shows a major regenerative capacity at both, structural and functional levels (Ghosh and Hui, 2016; Gemberling et al., 2013; Wang et al., 2011).

7.5.1. Retina regeneration

The first description of the regeneration capacity of a fish retina was in 1968 (Lombardo, 1968). To understand both, the degenerative and regenerative processes that occur after an injury, many different retina lesion paradigms have been developed along years, as for example, using light injuries to induce apoptosis (Crair and Mason, 2016; Parrilla et al., 2016, 2013; Jimeno et al., 2003, 1999; Bastmeyer et al., 1993). In fish, after an injury, neurogenesis is activated to provide new cells to reestablish the damaged area (Diekmann et al., 2015; Fischer and Bongini, 2010; Otteson et al., 2001; Easter and Hitchcock, 2000; Jimeno et al., 1999).

Many studies have shown that after a lesion in the fish visual system, a complete reestablishment of the cells, their synaptic contacts, as well as their functional recovering occur (Rasmussen and Sagasti, 2017). Interestingly, previous works had shown that the PGZ is not directly involved in these regeneration processes (Jimeno et al., 1999), but rod precursors are the ones that experiment an activation after a lesion contributing to generate all retinal cell types and to restore the damaged retina (Jimeno et al., 2003; Cid et al., 2002). In addition, Müller cells also become reactive and proliferate after an injury (Guimaraes et al., 2018; Reichenbach and Bringmann, 2013; Fischer and Reh, 2001).

7.5.2. ON regeneration

The formation of a glial scar generated after an ON lesion is the main restriction to the regeneration of the mammals CNS after an injury (Fischer and Leibinger, 2012), but this phenomena does not occur in the fish CNS. Fish ON is able to recover visual function by reestablishing its structure and reconnecting the axons of ganglion cells in the brain (Crair and Mason, 2016; Diekmann et al., 2015; Fischer, 2012). In addition, previous studies have demonstrated that both axonal growth and regeneration capacities depend on intrinsic environmental conditions (Carreño et al., 2013; Velasco et al., 2001).

Regeneration of fish ON starts with an inflammatory response, loss of astrocytes and microglia activation (Bejarano-Escobar et al., 2017; Bollaerts et al., 2017; Colavincenzo and Levine, 2000; Jimeno et al., 1999). Macrophages are responsible of clearing the debris from the damaged area, eliminating the growth inhibiting factors and to secrete factors that improve regenerating process (Bodrikov et al., 2017; Craig et al., 2010). Thus, fish ON experiments different cellular and molecular mechanisms after an injury to reconnect ganglion cells to the brain, generating a permissive environment for regeneration (Rasmussen and Sagasti, 2017; García and Koke, 2009; Wanner et al., 1995).

Bastmeyer et al., (1991) demonstrated that fish oligodendrocytes were able to stimulate mammalian axonal growth *in vitro*, while mammalian oligodendrocytes inhibited fish axonal growth. Currently, many studies have focused on describing which are the cellular and molecular mechanisms involved in axonal regeneration of fish (Wen et al., 2016; Diekmann et al., 2015; Otteson et al., 2001).

7.6. Proteins involved in growth and regeneration of the CNS of adult vertebrates

For the comprehension of this PhD thesis, it is important to introduce some proteins involved in the growth and regeneration processes in the CNS of adult vertebrates.

7.6.1. Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP)

GFAP is an intermediate filament protein typically found in the cytoskeleton of the astrocytes, radial glia, Bergmann cells, and ependymal cells (Tao and Zhang, 2014; Alunni et al., 2005; Brenner, 1994). Müller cells of all vertebrate species analyzed so far express GFAP (Fischer et al., 2010; Koke et al., 2010; Bernardos and Raymond, 2006). Although some fish species as *A. burtoni* maintain the expression of GFAP during the entire animal's life (Wen et al., 2016; Mack and Tiedemann, 2013), in other species as cyprinids, astrocytes loss its expression. However, after a lesion, these cells experiment an increase in GFAP expression (Raymond et al., 2006).

7.6.2. Sox proteins (Sox2 and Sox10)

Sox2 is a transcription factor known for its primary function in stem cell proliferation and as a regulator of cell fate during development (Williamson and FitzPatrick, 2014; Verma and FitzPatrick, 2007; Hever et al., 2006). Previous studies have described cells expressing Sox2 in the visual system of vertebrates (Kautzman et al., 2018; Fan et al., 2016; Reinhardt et al., 2015; Surzenko et al., 2013; Fischer et al., 2010; Hever et al., 2006). However, Liu et al. (2014) shown that Sox2 can inhibit cell proliferations depending on the co-factor acting as a functional partner. In addition, it is known that different transcription factors can modulate Sox2 activity (Kamachi, 2001). Cells expressing Sox2 have been observed in the neurogenic zones of adult CNS (Zhang et al., 2018; Bollaerts et al., 2017; Bifari et al., 2015; Ferri, 2004).

The first studies with the purpose of reprogramming cells *in vitro* employed the induction of Sox2, Oct4, c-Myc, and Klf4 gene expression to obtain pluripotent cells (Fig. 12) (Park et al., 2008; Yu et al., 2007). Nowadays, several cell therapies are

Figure 12: Scheme of the technique for reprogramming cells *in vitro*. *Células somáticas* means somatic cells (limited proliferation, tissue-specific morphology, expression of specific genes, and methylated pluripotent genes), *Factores de reprogramación* means reprogramming factors, and *Células reprogramadas* means reprogramed cells (auto-renewal capacity, demethylated pluripotent genes, stem cell morphology, and reactivation of the typical undifferentiated cell genes).

being conducted thanks to the administration of reprogramed cells. Interestingly, after an injury in the fish visual system, Sox2 expression increases (León Lobera, 2017).

Sox10 is another transcription factor of the Sox gene family, widely expressed in cells of the oligodendrocyte lineage. The function of Sox10 depends on how it binds to the DNA, as monomer or as dimer. Sox10 is also expressed by the cells of the neural crest and their derivatives: cartilage, melanocytes, and some sensory neurons in the cardiac tissue (She and Yang, 2015; Kamachi and Kondoh, 2013; Sarkar and Hochedlinger, 2013).

Regarding the vertebrate SNC, several studies have described Sox10 expression in the lineage of oligodendrocytes during generation, differentiation and survival (Parrilla et al., 2016; Takada et al., 2010; Wegner and Stolt, 2005). Furthermore, Sox10 proteins modulate the gene expression of different myelin related genes (López-Anido et al., 2015; Peirano, 2000).

7.6.3. Axons markers (Zn8, DCX and CR)

Neuroilin (Zn8) is an adhesion protein of the immunoglobulin family. Zn8 is involved in the processes of cell differentiation and axonal growth (Pushchina and Varaksin, 2019; Westerfield, 1995). Furthermore, Zn8 is widely used as a marker of growing axons.

Doublecortin (DCX) is a microtubule associated protein (Gleeson et al., 1999) widely expressed in newly formed neurons of the vertebrate CNS (Sánchez-Farías and Candal, 2015; von Bohlen und Halbach, 2011). DCX expression is increased during regenerative processes when neurogenesis become active (Komitova et al., 2005). In fish, DCX have been described in the transition zone of the *A. burtoni* retina (Garcia-Pradas et al., 2018; Fernández-López et al., 2016; Sánchez-Farías and Candal, 2015) and to our knowledge, this proteein has not been reported in cyprinids.

Calretinin (CR) also named calbidin-2 is a calcium-binding protein that was described for the first time in 1987 (Rogers, 1987). In the CNS, this protein is mainly related to sensory neurons, including in the fish visual pathway (Arenzana et al., 2011; Bejarano-Escobar et al., 2009; Weruaga et al., 2000; Miguel-Hidalgo et

al., 1991). The cells that express CR in the fish adult retina are the amacrine (INL), the displaced amacrine (IPL/GCL), and the ganglion cells (GCL).

7.7. Cell Therapy

ON pathologies as glaucoma or optic neuritis usually produce an irreversible loss of visual function and blindness (Abdelhakim and Rasool, 2018; Weinreb et al., 2014; Jacobs and Van Stavern, 2013). Nowadays, several studies are focused on developing cell therapy strategies to reestablish missing cells and consequently, restoring vision. Consequently, the characterization of proliferating cells and detection of progenitors in the adult retina of mammals are stimulating this type of cell therapy strategies (Zheng et al., 2018).

However, to understand the biology and properties of different cell types of vertebrate CNS, including glial cells, could be the key to obtain successful cell therapy procedures and necessarily, *in vitro* studies have become an essential tool for this purpose.

8. Hypothesis and Objectives

In contrast to mammals, fish CNS shows continuous growth and spontaneous regeneration capacity during the entire animal's life. Glial cells are essential for all the processes taking place during growth and regeneration, although these cells mammals generate a glial scar in response to an injury, blocking the possibility of a regenerative process. Consequently, fish visual system has been postulated as an ideal model to study the neurogenesis in the adult vertebrates.

The main hypothesis of this PhD thesis is that glial cells of the fish visual system are directly involved in adult growth and regeneration processes. The goal is to identify which glial cells of the pre-encephalic visual system are involved in these processes and analyze their precise role.

To test our hypothesis, we have planned to achieve these objectives:

- Optimize fish ON glial cell culture protocol and characterize the *in vitro* cells obtained.
- Identify and characterize the Sox2 positive cells from pre-encephalic visual system (retina, ONH, and ON) by using adult teleost fish.
- To determine the function of glial cells expressing Sox2 in the fish visual system and analyze their interactions with axons.
- To increase the knowledge on the processes involved in the growth of axons from the retina transition zone to their arrival to the ON, as well on the contribution of the different glia subtypes in this pathway.

9. Materials and Methods

9.1. Animals

For this study we employed 91 wild type and transgenic zebrafish (Table 1') measuring more than 1,5 cm standard length, 24 goldfish measuring between 4 – 7 cm, and 21 cichlids measuring between 2 – 5 cm. All zebrafish and cichlids were bred in our own colonies, *D. rerio* in the Institute of Neuroscience of Castilla y León (University of Salamanca, Spain), and *A. burtoni* in the Institute of Clinical Anatomy and Cell Analysis (University of Tübingen, Germany). *C. auratus* were purchased from an authorized commercial distributor (Kiwoko) and they were maintained in our laboratory (USAL, Spain) in tanks with at least 50 liters capacity.

Table 1': Transgenic zebrafish linages

Named	Fluorescence	Asociated gene	Reference
Tg(gfap:EGFP)	Green	<i>gfap</i>	(Bernardos y Raymond, 2006)
Tg(sox10:EGFP)	Green	<i>sox10</i>	(Dutton et al., 2008)
Tg(sox10:TagRFPT)	Red	<i>sox10</i>	(Blasky et al., 2014)
Tg(olig2:EGFP)	Green	<i>olig2</i>	(Shin et al., 2003)

*This table is not showing double transgenic linages.

All animals were kept in aquaria (zebrafish and cichlids at $28,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and goldfish at $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$) under 12 h light/dark cycle without food restrictions. All procedures were performed in accordance with the guidelines of European Union Council Directive (2010/63/EU). Animal procedures were approved by local authorities (Regierungspräsidium Tübingen and Animal Ethical Committee of University of Salamanca) before experimentation in both institutions.

9.2. Cell Culture Protocol

All procedures involved in cell culture protocol have performed under sterile conditions. The animals were deeply anesthetized with tricaine methane sulphonate (MS222; from Sigma-Aldrich, E10521) and sacrificed by decapitation. The connective tissue around the edge of the eyes was removed using fine forceps and scissors exposing the ON and subsequently, the extraocular segment of the ON was extracted to culture (Fig. 13). Tissue pieces (2 ON in the case of goldfish and cichlids, and 6 – 8 ON in the case of zebrafish) were immersed in phosphate buffer saline (PBS) 0.1M pH 7.4 supplemented (PBSsup) with penicillin, streptomycin and amphotericin B (Antibiotic-Antimycotic 100X, from Gibco, 15240) and rests of connective tissue and blood vessels were removed (Fig. 13). In addition, brains were dissected (four brains in the case of zebrafish) to use as positive controls in the *in vitro* studies.

For the enzymatic dissociation of the ON, tissue was transferred to a vial with 500 μ l of trypsin-EDTA (0,05%) phenol res (from Gibco, 25300054), and incubated for 10 min at 37°C (5 ml of trypsin for brain tissue). The enzymatic reaction was stopped adding the same volume of fetal bovine serum (FBS; from Biochrom, S0115) to the solution. Mechanical separation of cells was performed using tips (p200 and p20) attached to a micropipette (Fig. 14). However, the samples with the best results were the ones with partial cell dissociation (maintaining small tissue pieces of ON in the cell suspension samples). Afterwards, samples were centrifuged at 1400 rpm for 5 min. Brain samples were filtered with a cell strainer (70 μ m) to eliminate cell aggregates before their centrifugation.

The pellet obtained from ON was re-suspended in 400 μ l of Leibovitz's medium (L15; from Gibco, 11415064) supplemented with 20% of FBS, penicillin, streptomycin, and amphotericin B with the recommended concentration (Mack and Tiedemann, 2013). The cell suspension obtained from brain was re-suspended in 7 ml of the same medium. To determine the most suitable percentage of FBS for the cells obtained from ON, the medium was tested with 0%, 5%, 10% and 20% of FBS, based on related bibliography. DMEM/F12 medium (from Sciencell, SC-

Figure 13: Images showing the steps of the dissection process of an adult fish ON. The connective tissue around the edge of the eyes is removed using fine forceps and scissors, exposing the ON (red ellipse), and subsequently, the extraocular segment is extracted for cell culture (red arrow). Afterwards, rests of connective tissue and blood vessels are removed (black arrows). Scale bar: 1 cm

Figure 14: Picture of the system with two micropipette tips attached for the mechanical dissociation (white tip is a p20 and yellow is a p200).

09421) and a mixture of both (50% L15 and 50% DMEM/F12) was also tested for the same purpose.

Out of the ON cell suspension, 200 μ l were seeded per well of the multi-dish (Nunc, 140675), which was incubated for 30 min at room temperature. Afterwards, 1800 μ l of the L15 medium with antibiotics and 20% of FBS (Table 2') was added in each well (Fig. 15). The cell suspension from the brain was directly seeded in the L15 medium with antibiotics and 10% of FBS (Table 2'), 2 ml per well and 3 ml in a flask (Fig. 15). The first change of the medium was done 24 hours after seeding cells, and afterwards each 3–4 days. All cultures were maintained in an incubator at $\pm 28.5^{\circ}\text{C}$.

Table 2': Cell culture media

Medium	Tissue sample	Supplements
L15	Optic Nerve	20% FBS Antibiotics Antimycotic
L15	Brain	10% FBS Antibiotic Antimycotic

9.2.1. Conditioned cell culture medium

To improve cell survival, a conditioned medium was also tested. To do this, medium from brain cultures that began in parallel with the ON cultures, was collected and filtered using a 0.22 μm pore size filter (VWR collection, 514-0064). Afterwards, this medium was mixed at 50% (v/v) with the original medium (L15 with antibiotics and 20% of FBS) to culture the ON plates. The medium was changed every 3 – 4 days.

9.2.2. Proteomic analysis

To determine the proteins generated in the cultures of ON, brain and supplemented L15 medium without cells, proteomic analysis were performed (Ferreira et al., 2012). We collected the cell medium from 10 days cultures and after filtration (0,22 μm pore), the samples were processed in the Proteomic Unit of USAL in a collaboration with Dr. Juanes.

The 2D electrophoresis technique is based on segregating proteins in a gel according to their isoelectric point and molecular weight. For 2DE of cell extracts, proteins were precipitated with “Clean Up” kit (GE Healthcare, Spain) according to the suggested protocol. A fixed volume of proteins from each sample was rehydrated in 340 μl of a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (w/v), 0.5% ampholytes (pH 3-10 nonlinear) 50mMDTT and bromophenol blue before being loaded onto an IPG strip (non-linear pH gradient 3–10, 18 cm long, GE Healthcare).

To obtain the isoelectric focus an IPGphor electrophoresis apparatus was (GE Healthcare). The gel activation was performed by re-hydration at 30 – 60 V for 12 hours. Afterwards, electrophoresis was set up at 500 V and the voltage was gradually increased to 8000 V and maintained constant for 6 hours. Immediately after electrophoresis, IPG strips were equilibrated for 15 min in 1% DTT (w/v) in equilibration buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol (v/v), 2% SDS (w/v), 0.01% bromophenol blue (w/v)], and followed by another 15 min in 2,5% (w/v) iodoacetamide in the same buffer. The 2D separation was performed in 12 % SDS polyacrylamide gels (160 x 180 x 1 mm, containing 30% Acrylamide and Bisacrylamide solution, 1.5 Tris, 10% SDS, 10% APS and TEMED in water). The gels were run at 40 mA in a SE 600 Ruby device (GE Healthcare).

The proteins were fixed in 30% methanol and 10% acetic acid for 30 min and were visualized by using Sypro Ruby (Molecular Probes) following manufacturing instructions. Afterwards, the gel was scanned to identify possible spots. The parameters for spots detection used were: (i) smooth factor was 2, (ii) minimal area was 5 pixels, and (iii) saliency was 100. In addition, potential artefacts were removed manually.

The spots were isolated from the gel, washed, and dehydrated in acetonitrile (ACN) for 10 min. Afterwards, ACN was removed and the samples were dried by evaporation. The pellets were washed in NH_4HCO_3 (50mM) for 10 min and re-dehydrated in ACN. Samples were hydrated in NH_4HCO_3 (50mM) and digested in NH_4HCO_3 (25mM) with trypsin (Promega, Madison) overnight at 37°C. Peptides extraction was performed in two steps, in 8 μl of ACN and in 0,2% trifluoroacetic acid (TFA) in water. Afterwards, pellets were re-suspended in 8 μl of TA (containing 0,1% TFA and 50% ACN) and the peptides were dissolved in 0.1% (v/v) TFA for MALDI-TOF analysis.

Identification of proteins was completed by using MASCOT software (Matrix Science, London) associated to protein database (Swiss Prot). Only MASCOT results with statistical p-value $\leq 0,05$ were considered.

9.3. Clearing tissue

The clearing tissue technique can turn transparent any tissue sample, making it possible to visualize and analyze in three dimensions. Several clearing protocols are currently being published, which are divided in four groups: based on organic solvents, based on immerge samples under aqueous solutions, based on an urea hyperhydration, and based on immersing the tissue in hydrogels that can be polymerized.

9.3.1. iDisco

iDisco technique is a clearing protocol based on immersing the tissue in organic solvents. Samples were incubated in increasing concentration of methanol solutions for 1 hour each (20%, 40%, 60%, 80%, and 100%) at room temperature. Afterwards, samples were in methanol 100% at 4°C overnight. Next day, samples were incubated in 2/3 methanol and 1/3 dichloromethane for 3 hours at room temperature. After two washes in dichloromethane 100% at room temperature for 15 min each, samples were immersed in dibenzyl ether for 12 hours at 4°C and renewed prior to being analyzed under the microscope.

9.3.2. PACT

PACT is a clearing protocol based on immersing samples in hydrogels. Tissues were fixed using an hydro monomer solution [HM solution; containing 4% PFA pH

7.4 in PBS, 40% Acrylamide 2% Bis-acrylamide, and 0,5% VA-044 {2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl) propane]dihydrochloride}} overnight at 4°C. Afterwards, samples were translated into a new HM solution for the polymerization of the hydrogel that was performed without oxygen at 50°C for 3 hours.

Polymerized hydrogel was incubated twice, for 2 days each, in SDS 8% solution at 37°C shaking. When samples became transparent, the SDS treatment was stopped and tissues were washed three times in PBS with 0.3% Triton X (PBST) at 37°C for 24 hours each. SDS time incubation time depends on the size of the samples.

9.4. Immunohistochemistry (IHQ)

All used antibodies are indicated in the Table 3'.

9.4.1. IHQ in the histological sections

To analyze the components of the pre-encephalic visual system of fish (retina, ONH and ON), eyeballs, ONs and brain samples were dissected out (Fig. 3) and fixed in 4% paraformaldehyde dissolved in phosphate buffer saline 0.1M pH 7.2 (PBS) overnight at 4 °C. After the fixation, samples were rinsed in PBS and cryoprotected in 30% sucrose overnight at 4 °C, embedded in Optimal cutting temperature compound (OCT; *Sakura*, 4583) and sectioned on a cryostat at 14 µm thickness (Leica CM1850; Thermo Scientific HM560, HM550).

To identify the population of cells expressing Sox2, the immune detection for Sox2 was combined with different well-known markers. After three washes in PBS to remove the OCT, sections were pre-incubated with 5% (v/v) normal donkey serum (DK) in 0,02% PBST for 90 min at room temperature. For PCNA labeling, before pre-incubation, sections were treated with 2 N HCl in PBS for 30 min at room temperature. After blocking, sections were incubated overnight at 4°C in a buffer containing the primary antibodies (Table 3'A), 5% (v/v) DK, and 1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) in 0,02% PBST.

After three washes in PBS, sections were incubated with fluorescent secondary antibodies for 90 min at room temperature (Table 3'B), in a buffer containing 5% (v/v) DK in PBST 0,02%. Nuclei were labeled with either 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) or DRAQ5 for 10 min at room temperature. Negative controls

without first or secondary antibodies were performed. Sections were mounted with coverslips using Mowiol or Fluoromont.

9.4.2. IHQ in retinas *in toto*

For this purpose, fish were maintained at least 2 hours in darkness before being sacrificed to facilitate separation of the EP from the rest of the retina. The entire retina without the rest of the external layers (sclera and choroids, and the EP) was then dissected out and fixed *in toto* in 4% PFA overnight at 4°C. After washing in PBS to remove the fixative, samples were stored at 4°C in PBS until used (IHQ).

The differences between IHQ protocols for *in toto* retinas and histological sections are most of all in the incubation times, the concentration of Triton X (0,3% instead of 0,02%) and that they require more frequent wash steps. Pre-incubation was performed in the same buffer already described during 2,5 hours at room temperature. After blocking, samples were incubated with the primary antibodies (Table 3'A) diluted in PBST 0,3% with 1% (v/v) DMSO and 5% (v/v) DK for 4–7 days at 4°C. Afterwards, *in toto* retinas were washed three times for 30 min in PBS. Secondary antibodies incubation was performed similarly to the incubation of sections, overnight at 4°C (Table 3'B). Nuclei were labeled with DAPI and samples were mounted with coverslips using Fluoromont or ProLong Gold.

9.4.3. IHQ in cells *in vitro*

After the removal cell culture medium and wash the cells three times in sterile PBS cells in culture were fixed in 4%PFA for 5 min at room temperature and the fixative was removed with PBS for 10 min at room temperature. Cells from the transgenic animals were kept in darkness during all steps of the protocol. To immunolabel the cells *in vitro*, the same buffers than those used for the IHQ in sections were employed. Pre-incubation was performed for 1 hour at room temperature and primary antibodies incubation was performed overnight at 4°C. The secondary antibodies incubation was done for 90 min at room temperature and nuclei were labeled with DAPI for 5 min. After washing with PBS, samples were mounted with coverslips using Mowiol or Fluoromont.

9.4.4. IHQ of the cleared tissues

In this case, samples were blocked in a buffer containing 5% DK and 1% DMSO in 0,3% PBST for 4 days at 37°C. Afterwards, this blocking buffer was renewed adding the primary antibodies (Table 3'A) and samples were incubated for 5 days at 37°C. After four washes in PBS for 2 hours, the samples were incubated in PBS overnight at 37°C. Secondary antibodies incubation was performed in parallel with the DAPI or DRAQ5 nuclear labeling for at least 3 days. Transparent tissues were observed under an 80% glycerol solution in water.

Table 3'A: Primary Antibodies

Antigen	Host	Source	Dilution	Observation
Calretinin (CR)	Mouse	Swant; 6b3	1: 1000	Calcium-binding protein
Acetyl Colin Transferase (ChaT)	Mouse	Chemicon; AB144P	1: 100	Enzyme involved in the acetylcholine neurotransmitter synthesis
Doublecortin (DCX)	Goat	Santa Cruz; sc-8066	1:100	Newly formed neurons marker; not worked in the cyprids
Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP)	Mouse	Sigma Aldrich; G6171	1:300	Typical astrocyte cytoskeleton protein
GFAP	Mouse	ZIRC; zrf1	1:400	
Glutamine Synthetase (GS)	Mouse	Millipore; mab302	1:500	Glutamine catabolism enzyme

Neurolin	Mouse	Zn8; DSHB	1:300	Growing axon marker; not worked in <i>A. burtoni</i>
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	Mouse	Santa Cruz; sc-56	1:300	Proliferating cells
Parvalbumin (PV)	Mouse	Sigma Aldrich; P3088	1:500	Calcium-binding protein
Sox2	Rabbit	Seven Hills; WRAB-1236	1:500	Transcription factor
Sox2	Rabbit	Abcam; (ab97959)	1:500	

Table 3B: Secondary Antibodies

Antigen	Source	Conjugated	Dilution
Anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch;	Cy2	1: 250
Anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch;	Cy3	1: 250
Anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch;	Alexa 488	1: 400
Anti-Mouse	Jackson ImmunoResearch;	Alexa 555	1: 400
Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResearch;	Alexa 488	1: 400
Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResearch;	Alexa 555	1: 400
Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResearch;	Cy2	1: 250
Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResearch;	Cy3	1: 250

Anti-Goat	Jackson ImmunoResearch;	Cy5	1: 250
-----------	-------------------------	-----	--------

9.5. Flow cytometry

Flow cytometry has been employed to analyze the glial cells of the double transgenic fish. The samples were prepared using the same tissue dissection and cell dissociation protocols previously described. First, the samples were analyzed to quantify the percentage of the different glial populations and afterwards, these cells were seeded by employing the same cell culture protocol previously described (see 9.2). Controls using wild type and single transgenic Tg(GFAP:EGFP) zebrafish as well as brain tissue as a positive control were also performed.

9.6. Image analyses

Cell cultures were observed on a Nikon microscope (eclipse TE 2000 S) with appropriated excitation and emission fluorescent filters. The images were captured with a Leica (DC 350 F) camera coupled to the microscope. Time-lapse experiments and Apotome images were performed using a Zeiss microscope (Axio ObserverZ1) and the images were captured with the ZEN2011 software. Sections also were examined on a LSM510 confocal microscope (Zeiss) using laser excitations at 488, 543, and 633 nm in sequential scans with appropriated filter sets.

Images were linearly adjusted for contrast, brightness, and uniform the color code, and the images plates were assembled with Adobe Photoshop CS6.

9.7. Statistical Analyses

Quantitative data obtained in this PhD thesis were statistically analyzed. In all cases, the null hypothesis was accepted when $p\text{-value} \leq 0,05$ and rejected when $p\text{-value} \geq 0,05$. Each statistical test used is explained below:

9.7.1. Quantification of flow cytometry data

The quantitative data obtained by flow cytometry was statistically analyzed using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Only viable cells were considered, that were detected with the addition of DRAQ5 (Thermo Fisher Scientific, 62251). These viable cells were obtained from 11 brains and 27 ON and

analyzed using Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction. Afterwards, to compare data obtained from different tissues, Levene and t-Student independent samples tests and the non-parametric Mann-Whitney-U test were employed, depending on the data distribution. A p-value < 0.05 was considered as statistically significant.

9.7.2. Quantification of Sox2 positive cells

Cells from random areas of 1000 μm^2 in 25 sections selected from at least 5 different adult cichlid fish were quantified. The DRAQ5 and Sox2 labeled cells were counted in the retina, ONH and two different zones of the ON. The cell quantification was performed under 20 \times and 40 \times objectives. The statistical analysis was performed using the software SPSS® using the test of Levene and two non-parametric tests, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney-U tests (applying the Bonferroni correction to multiple comparisons).

10. Results

10.1. Isolation and characterization of fish ON glial cells

The developed cell culture protocol allowed to obtain optic nerve cells from three adult teleost fish species and brain-derived cells. The different steps of the protocol were optimized to the two largest species employed (goldfish and cichlid). The best ON cell culture protocol resulted by using L15 media supplemented with antibiotics, antimycotic, and 20% FBS. The optimal concentration of FBS to obtain a larger number of brain-derived cell cultures attached to the plates was 10%.

Zebrafish transgenic derived *in vitro* glial cells shown fluorescence at the very beginning of the observations (24 hours after dissection), and glial cells from the other two species analyzed were identified by immunodetection techniques (Fig. 16). In the cultures there were isolated cells attached to the surface and cells forming groups (Fig 16B, C y D). The results obtained in the cell cultures from brain used as control are summarized in Fig. 17. The brain cell cultures were split when cells occupied more than 70 – 80% of dish surface, except those from zebrafish, since never shown more than 50% confluency.

ON-derived cells also shown migration and proliferation capacities (Video 1; Fig. 18). However, although ON cells increased in number gradually (Fig. 18B, D, F and G) intents to amplify the samples by splitting the cultures, did not work properly. In addition, ON cell cultures had a sort survival time of no more than 10 – 15 days (Fig. 19), in comparison with cell cultures from brain which can be maintained *in vitro* for more than a month.

To increase the survival time of cells from ON, we decided to test a conditioned medium for cell cultures (see 9.2.1). In parallel, ON cell cultures without this

Figure 16: ON-derived cells of teleost fish obtained with our cell culture protocol after 24 hours. Attached cells (black arrows) of the three fish species, *A. burtoni* (A y B), *C. auratus* (C y D), and *D. rerio* (E-H). Fluorescent cells (F and H; green or red arrows) in zebrafish cultures (E – H) appeared after the shortest observation time. Scale bar: 125 μ m

Figure 17: Fish brain-derived cells. Cells from the three teleost fish species were attached to the surface: *A. burtoni* (A – C), *C. auratus* (D – F) y *D. rerio* (G – I). Cell cultures after 5 days (A, D and G), 11 days (B and H) and 17 days afterwards (E and I). In addition, we were able to split brain cell cultures (C and F). Scale bar: 125 μ m

Figure 18: *In vitro* ON cells from *C. auratus* (A – D) and *D. rerio* (E – H). Age of cell cultures: 3 (A and C), 4 (E), 6 (B, D and F) and 10 days (H). An increase in the number of cells was observed in all cases. In addition, transgenic-derived cells were expressing intrinsic fluorescence associated with gfap (green arrows) and sox10 (red arrows) expression. Scale bar: 125 μ m

Figure 19: Apoptotic cells in the ON cultures from *A. burtoni* (A), *C. auratus* (B), and *D. rerio* (C). Age of cell cultures: 10 (C), 12 (A), and 15 days (B). Scale bar: 125 μ m

conditioned medium were maintained as control. The conditioned medium improved the survival of the cell cultures of the three species, since cells survived well for more than 32 days (Fig. 20). Furthermore, we were able to split an ON cell culture from goldfish by using the conditioned medium improvement (Fig. 21).

By using immunostaining for GFAP, we detected cells in *C. auratus* and *A. burtoni* cultures (Fig. 22). In the cell cultures from cichlid fish, we also found cells expressing Connexin 43 (Fig. 23). All the cells in the cultures from both genders, goldfish and cichlid were positive for GFAP and shown very similar morphology. These cells had a big soma in comparison to the length of their numerous processes. In the case of zebrafish, we found cells expressing GFP protein (which is associated with the *gfap* gene expression) and showing the same morphology. However, several but not all zebrafish-derived cells with the described morphology were GFAP positive. These results suggest that most of the cells from fish ON obtained *in vitro* present an astrocytic lineage.

In addition, we found a different cell morphology in the zebrafish cultures, with a round cell body and two opposed long processes (Panels E – H in figs. 16 and 18). These cells showed RFP fluorescence indicating the expression of the *sox10* gene and therefore belonging to the oligodendrocytic lineage (Panels G and H in figs. 16 and 18). In the case of cichlid and goldfish cell cultures, this type of cell morphology (or GFAP negative) was not found.

10.2. Proteomic analysis of conditioned medium

In collaboration with Dr. Fernando Sánchez Juanes from USAL, we have performed a proteomic analysis of the conditioned medium. Preliminary results showed a difference in proteins present in culture media between brain and ON. Three protein spots that were not identified in the ON cell culture medium, were found in the brain-derived medium samples. These spots correspond to the Transthyretin protein, which is involved in the tyrosine and retinol protein-

Figure 20: Cell cultures after adding conditioned medium: *A. burtoni* (A and B), *C. auratus* (C and D) and *D. rerio* (E and F). Cell cultures after 3 – 5 days (left), and 27 days in culture (right). Scale bar: 125 μm

Figure 21: Cell from *C. auratus* ON attached to the surface after splitting of the cell culture. Scale bar: 20 μm

Figure 22: GFAP positive cells in cell cultures obtained from the ON of *A. burtoni* (A – F) and *C. auratus* (G and H). Scale bar: 20 μm

Figure 23: Connexin 43 (A and D) and GFAP immunolabeling (B and E) of *in vitro* ON cells from *A. burtoni*. In the merged image (C and F), Connexin 43 (red arrows) is located in the zones of cell contact. Scale bar: 20 μm

binding transport. Interestingly, it is well-known that Transthyretin is the most common protein in the vertebrate cerebrospinal fluid (Rabah et al. 2019; Power et al., 2000).

10.3. Sox2 positive cells in fish ON cell cultures

In the ON cell cultures from *A. burtoni* (Fig. 24) and *C. auratus* (Fig. 25), some Sox2 positive cells were identified. Although Sox2 is typically found the cell nuclei (Fig. 25), this staining was also found in the cytoplasm of a few cichlid-derived cells (Fig. 24D – F).

10.4. Flow cytometry analysis

To obtain samples for flow cytometry analysis, we employed the same protocol used for cell cultures, except for the seeding step (see 9.2). The ON cells that were used to separate and quantify by fluorescence detection were those obtained from the double transgenic zebrafish [Tg (gfap:GFP/sox10:TagRFPt)]. In addition, the control analysis were performed using wild type zebrafish, and the [Tg (gfap:EGFP)] transgenic zebrafish. Also, adult fish ON glial cells and brain-derived cells samples were employed as control. Unfortunately, there are no surface markers available to repeat these experiments with cells obtained from the other two fish species.

Flow cytometer detects green or red fluorescent cells (expressing GFP or RFP) associated to the expression of gfap or sox10 genes, respectively. Only viable cells (DRAQ5 positive) were considered and all data obtained was statistically analyzed (Fig. 26). In samples from ON, both GFP and RFP positive cells showed a normal distribution (p -value ≥ 0.05 ; Kolmogorov-Smirnov test). In contrast to that, in samples from brain tissue, the cells showing a normal distribution were the RFP positive ones (p -value ≥ 0.05 ; Kolmogorov-Smirnov test), but not those GFP positive (p -value ≤ 0.05 ; Kolmogorov-Smirnov test).

The variance of RFP positive cells was homogeneous in both types of samples,

Figure 24: *In vitro* ON cells from *A. burtoni*. Labeled cells for Sox2 (A and D) and DAPI (B and E) and the merged images (C and F). Few cells expressed Sox2 in the cytoplasm (green arrow). Scale bar: 20 μ m

Figure 25: *In vitro* ON cells from *C. auratus* labeled for Sox2 (A and D) and GFAP (E). Transmitted light image (B) showing cell morphology. Merged images in C and F. Scale bar: 20 μ m

Figure 26: Flow cytometry results. In A, size versus granularity graphic (SSC-A vs FSC-B) shows the similarity of data from samples with or without DRAQ5. In B, graphics from samples analysis; viable cells identification by adding DRAQ5 (left, named DRAQ5:PerCP), cells with green fluorescence that are expressing GFP (center, named FITC-A or GFP:FITC-A), and cells with red fluorescence that are expressing RFP (right, named PE-A). In C, GFP positive cells versus RFP positive cells graphics (FITC-A or GFP:FITC-A vs PE-A) show the capacity of flow cytometer detection to identify the different cells expressing fluorescent proteins.

from ON and brain (p -value ≥ 0.05 ; Levene test), so the t-Student test to compare independent samples was applied, resulting in no significant difference between them (p -value ≥ 0.05). Furthermore, non-parametric Mann-Whitney-U test resulted in a significant difference (p -value ≤ 0.05) between GFP positive cells of both tissues. Afterwards, these cells were seeded using the cell culture protocol previously described. Out of the samples from ON and brain labeled with the nuclear marker DRAQ5, we did not obtain any cell attached to the surface after 24 hours of culture, so we decided to perform the cell separation protocol by flow cytometry without the addition of DRAQ5. From these samples separated without DRAQ5, properly attached cells of both glial populations were obtained (Fig. 27). These cell cultures were very similar to the mixed cultures in terms of cell morphology, but no proliferation and/or migration processes were observed.

10.5. Characterization of Sox2 positive glial cells

We have found several Sox2 positive cells in the pre-encephalic visual system of adult teleost fish by using immunolabeling techniques. Different cell types expressing Sox2 were identified in the three species employed by combining labeling for Sox2 with that of well-known markers: for proliferating cells (PCNA), for glial cells [Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), and Glutamine Synthetase (GS)] and for neurons [Calretinin (CR), Parvalbumin (PV), Acetyl Colin Transferase (ChaT), Doublecortin (DCX) and Neuroilin (Zn8)]. In addition, this analysis was also performed in transgenic zebrafish.

10.5.1. Sox2 positive cells in the retina

Sox2 positive cells were found in the retina of *A. burtoni* (Fig. 28), *C. auratus* (Fig. 29), and *D. rerio* (Fig. 30). In the PGZ, all PCNA labeled cells were also Sox2

Figure 27: ON cell cultures from double transgenic zebrafish after flow cytometry separation. Two different cell cultures for each sample were obtained according to the intrinsic fluorescence: *gfap* (green; A and B) or *sox10* (red; C and D). Scale bar: 20 μ m

Figure 28: Images of immunolabeling for Sox2 and PCNA in *A. burtoni* sections. Sox2 positive cells are found in the ZPG (A) and in several layers of the differentiated retina: NFL, GCL, INL, IPL (A, D, and G) and ONL (G). PCNA positive cells are observed in the ZPG (B), and in the NFL, INL (E and H) and ONL (G) of the retina. Double labeled PCNA and Sox2 positive cells (C and I; white arrows), and without Sox2 co-expression (C, F, and I; red arrows) were found. Several Sox2 positive cells are not expressing PCNA (C, F, and I; green arrows). Scale bar: 20 μ m

Figure 29: Double labeling for Sox2 and PCNA in *C. auratus* retina. In the ZPG, all cells were co-labeled (C; white arrow) for both markers, Sox2 (A) and PCNA (B) in contrast to differentiated retina where cells are expressing only one of the two proteins (green or red arrows). Scale bar: 20 μ m

Figure 30: Double immunolabeling for Sox2 (A and D) and PCNA (B and E) in *D. rerio* retina. We have detected co-labeled cells in the ZPG and INL of the retina (C; white arrows) and cells expressing only Sox2 (green arrows) or PCNA (red arrows). Scale bar: 20 μ m

positive in the three species analyzed (Figs. A – C in 28, 29 and 30), while in the transition zone all cells were negative for both markers. In addition, several Sox2 positive cells were observed in layers of the differentiated retina: mainly located in the INL and NFL, but also a few in the ONL (Figs 28D – I, 29 and 30). In the differentiated retina, cells co-labeled for Sox2 and PCNA were found in the INL, NFL, and ONL (Figs. 30C, 28F and I). However, most of the Sox2 positive cells in the central retina were negative for PCNA (Figs. 28, 29 and 30).

Several Sox2 positive cells in the retina were located within the INL in two different sublayers and with different intensities of immunoreactivity. Sox2 cells in the outer INL sublayer showed elongated nuclei and were positive for GFAP, including in the Tg(gfap:EGFP) transgenic zebrafish retinas (Figs. 31A – C, 32 and 33A – F). In addition, in sections of cichlid and zebrafish, these cells were also positive for GS (Figs. 31D – F y 33G – I). According to cell morphology, the expression of both cell markers (GFAP and GS) and their location in the INL, these Sox2 positive cells were identified as Müller cells.

To characterize the Sox2 positive cells of the oligodendrocyte lineage, these cells were analyzed in zebrafish transgenic for both stages of the oligodendrocyte precursors Tg(sox10:EGFP) and of the mature oligodendrocytes Tg(olig2:EGFP) (Fig. 34). These cells are mostly located in the NFL, although in some sections, some were observed in the INL (Fig. 34C). Except for a few cells co-labeled for Sox2 and Sox10, most of the cells were positive for only one of the markers (Sox2 or Sox10/Olig2; Fig. 34 G – L).

Sox2 positive cells in the inner INL showed stronger immunofluorescence, had round nuclei and were located in the layer where amacrine cells are found. To test this possibility, we identified the amacrine population by using classical markers,

Figure 31: Double immunolabeling of Sox2 and GFAP/GS to characterize Sox2 cells in the cichlid retina. Sox2 positive cells are located in the NFL, GCL, IPL, and INL (A and D). Double GFAP (B) and GS (E) labeled cells are located in the INL. Several co-labeled cells are observed in the INL (C and F; white arrows), as well as cells expressing only Sox2 (green arrows). Scale bar: 20 μ m

Figure 32: Double immunolabeling for Sox2 and GFAP in *C. auratus* retina. Double labeled Sox2 (A) and GFAP (B) cells are found in the INL. GFAP cells were also expressing Sox2 (white arrows), but some cells were only positive for Sox2 (green arrow). Scale bar: 20 μ m

Figure 33: Double immunolabeling for Sox2 and GFAP/GS to characterize the glial cells in the zebrafish retina. Sox2 positive cells (A, D, and G) are detected in different layers of the retina. In the INL, Sox2 cells (C, F, and I; white arrows) also express GFAP (B and E), and GS (H). Some cells only expressed Sox2 (green arrow). Scale bar: 20 μ m

Figure 34: Sox2 positive cells characterization in the oligodendrocyte-lineage transgenic zebrafish: Tg(sox10:EGFP) and Tg(olig2:EGFP). Sox2 positive cells were present in the ZPG (A) and in different layers of the retina (A, D, G, and J). The oligodendrocyte subtypes were located in the NFL (B, E, H, and K). Only a few co-labeled cells were found (I; white arrows), as well as cells expressing only Sox2 (C, E, I, and L; green arrows) or the oligodendrocyte marker (red arrows). Scale bar: 20 μ m

such as CR, PV, and ChaT (Fig. 35 and 36). In no case there were cells that colocalized for Sox2 and CR (Fig. 35), or Sox2 and ChaT (Fig. 36G – H). In contrast to that, several co-labeled Sox2 and PV positive cells were observed (Fig. 36A – F). These data indicate that several Sox2 cells can be identified as amacrine cells due to the PV expression, but it is evident that not all amacrine cells express Sox2.

We analyzed the potential relationship of Sox2 positive cells with newly formed neurons and their axons by immunolabeling with DCX (in cichlid sections) and with Zn8 (in zebrafish sections). Newly formed cells next to PGZ and their extensions expressed DCX or Zn8 (Fig. 37B and E) but not Sox2 (Fig. 37A and D). The DCX and ZN8 allowed to visualize the newly formed neurons and axons throughout the NFL. Additionally, in the differentiated retina there were not any neuronal soma positive for DCX or Zn8, or any colocalization of these proteins with Sox2 (Fig. 37C and F). The triple labeling revealed Sox2 positive cells in the PGZ (Fig. 38A), DCX positive cells in a transition zone (Fig. 38B) and CR positive cells in the differentiated retina (Fig. 38C).

10.5.2. Sox2 positive cells in the ONH

Preliminary analyses using *A. burtoni* sagittal sections (Fig. 39A) revealed DCX positive cells in the transition zone of the retina, as well as the possibility of following their axons throughout the NFL to the ON (Fig. 39B and C). Inverting histological orientation (Fig. 39A), a stronger labeling for DCX in the ONH was

Figure 35: Double immunolabeling for Sox2 and CR in *A. burtoni* (A – C), *C. auratus* (D – F), and *D. rerio* (G – I) retinal sections. No co-labeled cells were found (C, F, and I), only for Sox2 (A, D, and G; green arrows) or for CR (B, E, and H; red arrows) independently. Scale bar: 20 μ m

Figure 36: Characterization of amacrine cells in the retina of cichlids (A – C, and G – I) and zebrafish (D – F) by combining Sox2 (A, D, and G) and PV (B and E) or ChaT (H) immune detection. Several co-labeled cells for Sox2 and PV were detected (C, and F; white arrows). Cells expressing only one of the proteins were found (green or red arrows). We did not find any Sox2 cell positive for ChaT. Scale bar: 20 μ m

Figure 37: Double immunolabeling for Sox2 and DCX in retinal sections from *A. burtoni* (A – C) and for Sox2 and Zn8 in *D. rerio* (D – F). Sox2 positive cells (A and D) and cells expressing markers for newly formed neurons [DCX (B) or Zn8 (E)]. No colocalization for Sox2 (green arrows) and any of the newly formed neurons markers (red arrows) were observed (C and F). Scale bar: 20 μ m

Figure 38: Characterization of the growing zones of the cichlid retina by immunolabeling for Sox2 (A and E), DCX (B and F) and CR (C and G). No double stained cell was found and consequently the three growing zones of the retina were easily delimited by these markers. Stains for Sox2 (green arrows), DCX (red arrows), and CR (blue arrows) are indicated in images D and H. Scale bar: 20 μ m

Figure 39: Histological orientations to obtain the ONH and retinal sections of *A. burtoni* used in this study (A), both sagittal (B and C) and horizontal (D – F). Sagittal sections revealed an intense DCX labeling in the NFL (B) and in the ON (C; red arrows), but very weak in the ONH. In contrast to that, in horizontal sections, several DCX labeled axons were stained in the ONH (E). In this area, no colocalization for the glial marker GFAP (D) and DCX (F; green or red arrows) was found. Scales bar: (A) 1 cm, and (B – F) 20 μ m

evident (Fig. 39B and E).

The counterstaining with nuclear DAPI or DRAQ5™ showed numerous cell nuclei with different morphologies in this portion of the visual system, but they were not positive for Sox2 (Fig. 40A – F).

In addition, the DCX labeled axons appeared crossed at the level of the ONH, delimitating the zone devoid of Sox2 positive cells. Also, the double Sox2/CR and the triple labeling for CR, DCX and Sox2 (Fig. 40J – M) revealed that there was no colocalization of these proteins in the ONH (Fig. 40G – I). However, although most of the sections from cyprinid analyzed show similar results, in a few cases some Sox2 positive cells in the ONH were found (Fig. 41).

10.5.3. Sox2 cells in the ON

Sox2 positive cells were distributed along the entire extension of the teleost fish ON. To characterize this population of cells in the ON of *A. burtoni* (Fig. 42), *C. auratus* (Fig. 43) and *D. rerio* (Fig. 44) the cell markers previously mentioned were employed (see 10.5). In the ON of the three species PCNA positive cells were observed (Fig. A – C in 42, 43, and 44), but only a few of them were also labeled for Sox2.

GFAP labeling in the ON is highly variable depending on the species (and possibly on the antibodies) and it is not constitutively expressed in the fish ON. In the ON of

Figure 40: Analysis of the cichlid ONH zone by combining the immunolabeling for Sox2 and axonal markers (DCX for unmyelinated axons, and CR for myelinated axons). No Sox2 positive cells were found in the ONH (A, D, G and J), while both axonal markers DCX (B, E, and K) and CR (H and L) show an intense labeling in this zone. No co-localization of the three markers was found (C, F, I, and M; green or red arrows). In addition, the triple labeling revealed that new axons entrance (M; red asterisk) are restricted to the nasal zone. In contrast to that, myelinated axons (M; blue asterisk) were in the temporal area, delimiting chronological ON structure. Scale bar: 20 µm

Figure 41: Images from both cyprinids ONH analyses, *D. rerio* (A – F) and *C. auratus* (G – L). Although we have observed a few Sox2 positive cells in the cyprinids ONH (D and J), this zone has been a mainly free of Sox2 stains (A and G). The counterstaining with DAPI (B, E, and H) showed numerous cell nuclei in the ONH of both species. In the merge images (C, F, I, and L), Sox2 positive cells (green arrows) are indicated. We did not find any co-labeled cell for Sox2 and other used marker, for example using Tg(Sox10:TagRFPT) transgenic zebrafish (K, and L; red arrows). Scale bar: 20 µm

Figure 42: Characterization of Sox2 positive cells (A, D, and G) of the cichlid ON by combining immune detection with PCNA (B), GFAP (E), and DCX (H). We have detected co-labeled cells for Sox2 and PCNA/GFAP by analyzing merge images (C, and F; green, red arrows for single stain, and white arrows indicating double stain). In addition, we have observed a parallel distribution between Sox2 cells (green arrows) by analyzing the first portion of ON in detail (I), which have not been observed in the ON central zones (yellow arrow). Scale bar: 20 µm

Figure 43: Characterization of ON *C. auratus* cells by combining immune detection for Sox2 (A, and D), and PCNA (B) or GS (E). We have found co-labeled cells (C, and F; white arrows), as well single-stained cells (green or red arrows). Scales bar: 20 µm

Figure 44: ON histological section from zebrafish. Sox2 positive cells (A, D, and G) have been characterized by using markers for PCNA (B), GFAP (E), or GS (H). Both co-labeled cells (white arrows) and single-stained cells (green or red arrows) have been observed by analyzing merge images (C, F, and I). Scale bar: 20 µm

cichlid, we found Sox2 positive cells with and without staining for GFAP (Fig. 42D – F). In the first portion of the ON of the transgenic line Tg(gfap:EGFP) zebrafish, a few of the Sox2 positive cells were also labeled for GFAP (Fig. 44D – F). Although Sox2 and GS positive cells were found, most of the Sox2 positive cells were negative for GS (Fig. 42G – I, 43D – F, and 44G – I). In addition, GS positive cells without Sox2 staining were also observed (Figs. 42I, 43F y 44I).

We have characterized Sox2 positive cells of the oligodendrocyte lineage (Fig. 45) by using the two transgenic zebrafish lines Tg(olig2:EGFP) and Tg(sox10:TagRFPT). The analysis revealed that there was no colocalization for Sox2 and any of the oligodendrocyte markers in the ON.

As expected, we did not find any staining for PV, CR or ChaT along the entire extension of the ON. However, the triple labeling revealed the pathway that the myelinated and unmyelinated axons describe in the entrance to the ON, as well as their association with the Sox2 positive cells in the first portion of the ON (Figs. 40G – M y 42I). The Sox2 positive cells in this zone are placed in an apparent parallel disposition in this zone (Fig. 42I).

10.5.4. Quantification of Sox2 positive cells

To determine whether Sox2 cell density and distribution are comparable in the different zones of the pre-encephalic visual system (retina, ONH, and ON), we quantified the Sox2 positive cells (see 9.7). Because this data did not have a homogenous variance, we applied two non-parametric tests to determine the statistical differences between the four zones (Fig. 46A). The Kruskal-Wallis test resulted in a significant difference ($p\text{-value}\leq 0.01$) in the Sox2 positive cell density in the four zones. In order to detect which group showed the greater differences we applied the Mann-Whitney-U test with a Bonferroni correction (Fig. 46A').

The analyses showed that the Sox2 positive cell density had a significant difference in the analyzed areas, except for the comparison between the retina and the distant ON (Fig. 46A'). The highest density of Sox2 cells was found in the ON1 region, and the lowest in the ONH.

Figure 45: Sox2 positive cells (A, D, and G) characterization by using transgenic zebrafish from oligodendrocytes-lineages Tg(olig2:EGFP) (B), and Tg(sox10TagRFPT) (E, and H). No double labeled cells were found for Sox2 and Olig2 (green or red arrows) (C – C'), or Sox10 (F, and I). Scale bar: 20 μm

Figure 46: Statistical analysis of Sox2 positive cells. The Levene test and box-plots (A) are showing the descriptive analysis of the total data. The fish pre-encephalic visual system areas were compared by using the U of Mann-Whitney test (A') detecting significant differences (asterisks).

10.6. Cleared tissue

We have been able to turn the entire eye into transparent samples, including the retina, ONH and a piece of the ON from *A. burtoni* (Fig. 47, videos 2, 3, and 4). This allowed to observe the three-dimensional distribution of Sox2 cells from PGZ to the ON (Fig. 47A – I). Additionally, this allowed to analyze the interactions of these cells with the structure formed by the new axons through the NFL, in the ONH, and their entrance into the ON (Fig. 47C, F and I).

In this transparent tissue, Sox2 positive cells were found in different layers of the retina (Fig. 47A, D and G). Also, these cells were distributed throughout the entire extension of the ON piece analyzed, but not in the ONH (Fig. 47A – I). In addition, in the ONH there was an intense labeling for DCX (Fig. 47B, E and F).

Sox2 positive cells next to the ONH were surrounding the newly formed axons (Fig. 47 C' – C'''). In addition, it is clearly distinguishable that DCX positive axons are incoming all together into the ON forming a single fascicle. The entrance of this fascicle of new axons is restricted to the nasal zone and show several Sox2 positive cells around it (Fig. 47C).

10.7. *In toto* retinas

The three-dimensional distribution of Sox2 cells in the cyprinids has been analyzed by the immunolabeling of *in toto* retinas (Figs. 48, 49 and 50). In addition, the characterization of the axons from newly formed neurons was also performed by immunolocalization of the Zn8 marker.

Figure 47: Characterization of Sox2 positive cells in cichlid pre-encephalic visual system by analyzing *in toto* transparent tissue. Three-dimensional analysis of Sox2 (A), and DCX (B) general labeling pattern. Sox2 positive cells are located in different layers of the retina (D) and DCX stained axons run through the NFL (E). Sox2 positive cells are also placed in the ON, but not in the ONH (G). Sox2 cells form a cylinder around DCX staining in the first portion of ON (white square in C) in detail (C' – C'''). (C, C''' and I) Sox2 (green arrows) and DCX (red arrows) did not colocalize. Scale bar: 20 μ m

Figure 48: Identification of Sox2 positive cells and newly formed neurons (Zn8 positive) by analyzing *in toto* retinas of cyprinids. In the PGZ (A – D), cells were positive for Sox2 (A and B; green arrows), while Zn8 positive cells were in the transition zone (C and D; red arrows). Zn8 staining allowed to follow the unmyelinated axons (white arrows) through the NFL of the retina. In the differentiated retina (E – H), Sox2 positive cells (E and F; green arrows) and axons stained for Zn8 (G and H) were detected. In addition, a crossing pattern of the new axons were observed in this area (H; white arrows). Scale bar: 20 μ m

Figure 49: Analysis of immunolabeled Sox2 (A) and Zn8 profiles (B) in the NFL of *C. auratus in toto* retina. (C) Both markers, Sox2 (green arrows) and Zn8 (red arrows) are indicated, as well the crossing points of the new axons (white arrows). Scale bar: 20 μ m

Figure 50: Sox2 and Zn8 detection in the ONH and the ON in the *in toto* retina of the goldfish. The cells expressing Sox2 (A and D), and Zn8 positive axons (B and E) did not co-localized in any case (C and F). The ONH present very few cells labeled for Sox2 (white asterisk in C) and in the ON apparently most of these cells were next to the new axons (green arrows in F). Scales bar: 20 μ m

Results of the *in toto* retina analyses were very similar to the histological sections. We detected Sox2 positive cells in the retina (Figs. 48A, B, E and F and 49), both in the PGZ and in the differentiated retina. Very few Sox2 labeled cells were found in the ONH (Fig. 50A – C) and several of them are found in the ON (Fig. 50).

Regarding the Zn8 immunolabeling, positive somas were found next to the PGZ (Fig. 48C and D), and their positive axons were located throughout the entire differentiated retina (Figs. 48G and H, and 49). The Zn8 positive axons were found running from retina to the ON (Fig. 50) showing an apparent fasciculation pattern (Fig. 48H and 49B). Both, the almost absence of Sox2 cells in the ONH (Fig. 50A), and their parallel distribution were also observed by analyzing *in toto* retinas (Fig 50F and video 5).

11. Discussion

11.1. Sox2 expression in the visual system of fish teleost: a general view

Our results have shown that the expression of Sox2 is very similar in the three fish species analyzed, both on histological sections (see 10.5; Fig. 51) and on *in toto* tissue (see 10.6 and 10.7): Sox2 labeled cells are found in the retina and ON, while ONH is almost devoid of them. Apparently, Sox2 positive cells of the first portion of ON are distributed parallel to each other.

We determined in which layers of the retina are located the Sox2 positive cells, and their localization in the extension of the ON by analyzing histological sections. We found positive cells in the PGZ (Panels A–C in figs. 28, 29 and 30), in different layers of central retina (see 10.5.1) and in the ON (see 10.5.3).

Combining Sox2 detection with markers for DCX and CR we were able to determine for the first time, by using immunohistochemistry, the already described three growth zones of the teleost fish retina (Fig. 38). In addition, by using different markers we identified the expression of Sox2 in different cell types, concluding that these cell types expressing Sox2 in the three species of adult fish retina analyzed are very diverse. This proves the need of continue investigating and discussing the function (or functions) of this transcription factor in the visual system (see 11.2 and 11.3).

Due to the particular distribution of the Sox2 positive cells in the ON and their absence in the ONH, it seems very probable that they play an important role in the organization of the newly formed axons (DCX or Zn8 positive axons). Interestingly, there were no cells double-labeled for Sox2 and markers for the new axons (DCX/Zn8), which indicate that the new neurons may lose Sox2 expression in the first steps of their differentiation. Furthermore, DCX or Zn8 positive axons form fascicles in the NFL (Stuermer et. al., 1992) becoming more grouped in the entrance of the ONH where they are reunited in a single fascicle. Interestingly, the ONH zone is delimited by both, the particular arrange in one single fascicle of new axons and the absence of Sox2 cells.

The analysis in detail of the entrance of new axons in the ON shows that Sox2 positive cells form a cylinder around the fascicle. In addition, analyzing histological sections we demonstrated that new axons enter into ON, in the three fish species, through the nasal zone (Fig. 51). This could indicate that the structural lamination of the ON is done starting from the mature zones, so the entrance of new axons into the ON does not change during an animal's life.

11.2. Sox2 positive cells: stem cells, glial cells and neurons

Currently, most publications are focused on investigating the function of the protein Sox2 as a factor that maintains the proliferation capacities of cells (Surzenko et al., 2013; Lin et al., 2009; Hever et al., 2006; Episkopou, 2005; Pevny y Placzek, 2005). In addition, it is known that, together with other factors, Sox2 can function in reprogramming somatic cells to stem cells *in vitro* (Fig. 12) (Park et al., 2008; Yu et al., 2007). It is then obvious that Sox2 proteins are involved in the cell cycle regulation processes.

However, our results together with that of previous studies proved that Sox2 expression is maintained in some completely differentiated cells of the adult visual system (Whitney et al., 2014; Le Rouedec et al., 2002). Consequently, we suggest that this transcription factor has functions different to that of the already described.

A separated discussion about the presence of Sox2 in each cell type is specified below.

11.2.1. Sox2 in proliferative cells

To characterize the proliferative Sox2 cells of pre-encephalic visual system PCNA marker was employed. In the PGZ, all cells were positive for both, Sox2 and PCNA markers (Panels A–C in figs. 28, 29 and 30) and negative for the rest of the other antibodies employed (see 10.2.1). So, we confirm that the already described stem cells of the peripheral fish retina (Garcia-Pradas et al., 2018; Jimeno et al., 2003; Olson et al., 1999) are expressing Sox2. Previous studies have described the colocalization of these two proteins (Sox2 and PCNA) in cells of the adult brain, but our work is the first reporting this colocalization in the adult fish retina.

Figure 51: Mosaic composition obtained from histological analysis of pre-encephalic visual system of *A. burtoni*. We found Sox2 positive cells (A) in the PGZ, mature retina and ON. In addition, the DCX labeling (B) allowed to follow the new axons, from cells in the transition zone that run through the NFL until their entrance into the ON, which in both eyes occurs through the nasal zone (red arrows in C).

In the mature retina and ON, we found proliferating PCNA/Sox2 positive cells and cells expressing only Sox2 or PCNA (Figs. 28D – I, 29 y 30); although most of them just shown one marker. Therefore, in order to elucidate whether these cells could have potential capacities of proliferation (Chan-Ling et al., 2009; Mack et al., 2003; Kwan et al., 1996; Hitchcock et al., 1992); as for example the Müller cells (Lust and Wittbrodt, 2018; Surzenko et al., 2013), Sox2 immunolabeling was combined with different known cell markers (for glial cells and neurons; see 11.2.2 and 11.2.3).

It is remarkable that: (i) all PCNA positive cells in the NFL were positive for Sox2 too, being a possibility that they could be resident glial precursors of the retina (Garcia-Pradas et al., 2018; León-Lobera, 2017; Parrilla, 2010; Chan-Ling et al., 2009); (ii) in the ONL there are PCNA positive cells that not are expressing Sox2, that could correspond to the rod precursors (Mack et al., 2003; Otteson et al., 2001; Kwan et al., 1996). These observations are of interest because they seem to indicate that Sox2 transcription factor is present in proliferative cells (PCNA positive cells), including cells in the mature retina of adult fish. In the same way, they seem to indicate that there is no need of Sox2 in cells that can active their division (PCNA positive and Sox2 negative cells).

Analyzing the data from ON sections, we found a very similar result comparing with mature retina; a few co-labeled cells are observed, although most of the cells were positive only for Sox2 or PCNA. Consequently, the conclusion is similar: Sox2 protein functions are related to proliferative capacities, but apparently is not essential for proliferation.

However, since PCNA is the only available marker of proliferative cells in fish, [with the exception of the histone 3 phosphate, with a more restrictive window of proliferation detection (von Bohlen und Halbach, 2011)], implies a limitation in the analysis of proliferative cells in this model. The fact that a cell is not labeled PCNA does not mean that this cell is not able to proliferate; as for example the Müller cells, that can activate their cell cycle under certain situations. Thus, to determine the glial cell types of the fish visual system, and in which differentiation stage they are, could be relevant to know whether Sox2 positive cells of the ON can maintain their proliferative capacities.

11.2.2. Sox2 in glial cells

Previous studies have described Sox2 expression in the Müller cells of retina (Gorsuch et al., 2017; Fischer et al., 2010; Lin et al., 2009). To characterize them, double immunolabeling for Sox2 and already known Müller cells markers, such as GFAP and GS, was employed. By using these tools, the morphology of co-labeled cells (Sox2 and GFAP/GS) was investigated: these cells shown elongated nuclei located in the inner zone of the INL, from which two long and distal processes were originated. Analysis performed in the transgenic zebrafish Tg(gfap:EGFP) to identify Müller cells shown that all cells with typical Müller cell markers and morphology also expressed Sox2 (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b). The Sox2 expression in the Müller cells is associated with their involvement and/or implications as potential stem cells that can generate new cells during the continuous growth of the fish retina (Lenkowski and Raymond, 2014; Surzenko et al., 2013; Kimelberg, 2010; Bringmann et al., 2006) or during regeneration after a lesion (Lust and Wittbrodt, 2018; Bejarano-Escobar et al., 2017; Gorsuch et al., 2017; Thomas et al., 2016; Lenkowski and Raymond, 2014; Raymond et al., 2006).

On the other hand, it is known that the expression of GFAP (the most common marker of cells of the astrocytic family) in the fish ON is not constitutive (Koke et al., 2010; Marcus and Easter, 1995; Levine, 1989). Thus, although we found co-labeled Sox2 and GFAP cells in the ON, is very difficult to determine which cell types are Sox2 positive in cyprinids. Sox2 and GS positive cells were detected in the ON of the three fish species. This indicates that Sox2 glial cells of the ON shows nitrogen metabolism that is typically performed by astrocytes, but some studies have observed that OPCs and oligodendrocytes can also express GS (León-Lobera, 2017; Parrilla, 2010; Parrilla et al., 2009). Nevertheless, in the present work no co-labeled cells were found when characterizing Sox2 positive cells in the transgenic animals Tg(olig2:EGFP) and Tg(sox10:TagRFPT). This indicates that oligodendroglial cells do not express Sox2 in these models.

In addition, Kautzman et al. (2018) have described the involvement of Sox2 positive astrocytes in the development of the vascularization of the mouse retina, but the fish species used in the present study do not have a vascularized retina

(Garcia-Pradas et al., 2018; Tarboush et al., 2012; Butler and Hodos, 2005), so they do not have typical intra-retinal astrocytes.

In summary, we found Sox2 positive glial cells in pre-encephalic visual system of the three species: *A. burtoni*, *C. auratus* and *D. rerio*. The Sox2 positive cells described in this work are very probably glial precursors and/or astroglial cells. Furthermore, we consider that more studies are needed to determine which glial type or subtypes express Sox2 in the adult visual system (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b; Parrilla et al., 2016; Wen et al., 2016; Tao and Zhang, 2014; Chan-Ling et al., 2009; Lillo et al., 2002; Levine et al., 2001).

11.2.3. Sox2 in neurons

In the retina of the three fish species, we have characterized neurons expressing Sox2 by identifying them with PV and CR markers (and ChaT in the case of *A. burtoni*). Several Sox2 positive cells were also labeled for PV, but none of them were positive for CR or ChaT (see 10.5.1). The Sox2 and PV positive cells were identified as amacrine and displaced amacrine cells (Fig. 36A – F). Although previous studies had already identified the PV amacrine cells in the retina of adult fish (Mack, 2007; Mack et al., 2004; Weruaga et al., 2000), our study is the first one to report the expression of Sox2 in this cell subtype (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b). We did not find any Sox2 positive cell with CR or ChaT expression, in contrast to Whitney's studies (2014) that detected Sox2 positive cholinergic amacrine cells in the mouse retina. The above suggests that Sox2 cells could correspond to a different amacrine cell subtype in the different vertebrate groups.

The identification of Sox2 expression in the amacrine cells demonstrates that: (i) some amacrine subtypes are Sox2 positive (Sox2 and PV cells); (ii) some amacrine subtypes do not express Sox2 (CR and ChaT cells); (iii) several, but not all cells are positive for Sox2 into the same amacrine subtype (PV positive and Sox2 negative cells). The wide variety of amacrine cell subtypes and the diversity of classifications are the two main limitations in order to characterize the Sox2 cells on this level (Yan et al., 2020; Voinescu et al., 2009; Mack et al., 2004; Weruaga et al., 2000; Wässle et al., 1993).

All new neurons in the transition zone of the retina were positive for DCX or Zn8, and negative for Sox2. However, combining Sox2 with new neuronal markers (DCX or Zn8) allowed to follow the new axons and observe their interaction with Sox2 positive cells in the fish visual system. As expected, the ONH and ON was devoid of neuronal positive cells.

11.3. Role of Sox2 in the fish visual system

As already mentioned, the main function of Sox2 transcription factor is to maintain the proliferative capacities of cells. Our results are according to this role that has been broadly analyzed and discussed for decades, focusing on different aspects: functional, molecular and/or applications of this protein. In addition, the co-localization of Sox2 and PCNA demonstrated the proliferative capacity of Sox2 positive cells, not only in the PGZ but also in retina and ON.

Similarly, it is not surprising that in the fish retina, Müller cells were expressing Sox2. The capacity of fish Müller cells to divide and differentiate to support the continuous growth of the retina (Guimarães et al., 2018; Gorsuch et al., 2017; Goldman, 2014; Reichenbach and Bringmann, 2013; Hitchcock et al., 2004), or to support tissue regeneration after a lesion (Lust and Wittbrodt, 2018; Bejarano-Escobar et al., 2017; Goldman, 2014; Lenkowski and Raymond, 2014; Fischer, 2005; Fischer and Reh, 2001) is already known. Thus, we have considered that the co-labeled Sox2 and PCNA cells in the NFL of the mature retina could correspond to glial progenitors, maybe the described cells of oligodendrocyte family of the fish visual system (Garcia-Pradas et al., 2018; León-Lobera, 2017; Parrilla et al., 2016; Ffrench-Constant et al., 1988).

However, in the transgenic animals of the oligodendrocyte lineage no co-labeled Sox2 and Sox10/Olig2 cells were found in the analysis of the histological sections. Furthermore, recently Zhang et al. (2018) described the protein Sox2 as an important modulator of myelinization processes in the mouse CNS, during development and in adulthood.

Taking together, the above suggests that: (i) Sox2 positive cells could be a glial precursor subtype in a less differentiated stage than the described OPCs; (ii) these cells are an astrocyte precursor subtype; (iii) some cells of the astrocyte family

could maintain their proliferation capacity, although they are completely differentiated (similar to the Müller cells in the retina). Our findings shown co-labeled Sox2 and GFAP/GS cells, which are in accordance with these three hypotheses.

There is no recent bibliography that provide of any information about Sox2 positive cells in the ONH, and our study is the first one to report these cells in the fish visual system (DeOliveira-Mello et al., 2019a, 2019b). From these results, it is remarkable that, in the three fish species: (i) ONH is almost devoid of Sox2 positive cells (Figs. 40, 41A – C y G – I, 45A – C, 47 y 50); (ii) axons from newly formed differentiating neurons appeared to cross at the level of the ONH (Figs. 39E, 40B y K, 47A – C, 48C, D, G y H, 49 y 50). However, we found a few Sox2 positive cells in the ONH of cyprinids (Figs. 41D – E y J – L y 45D – F), which never occurred in the analysis of cichlid ONH. This may have repercussion in functions such as in continuous growth and/or regeneration strategies of the different teleost fish groups (see 11.6).

Previous studies have described the presence of astroglial profiles and their processes in the ONH zone (Parrilla et al., 2013; Yang y Hernández, 2003; Lillo et al., 2002). Thus, to exclude the possibility that the DCX labeling corresponded to astrocyte processes, we performed immune histochemical labeling for both markers (GFAP and DCX) on cichlid sections (Fig. 39D – F) and no co-localization of labeled processes was found.

Several studies have reported the presence of resident glial precursors in the ONH and ON, which provide new glial cells necessary to receive, guide, support, orient and myelinate the new axons (Moyon et al., 2016; Parrilla et al., 2016, 2013; Lillo et al., 2002). Consequently, constant newly formed cells from the transition zone accommodate their axons into a functional visual system. In addition, the quantification of Sox2 positive cells in *A. burtoni* sections (see 10.5.4) showed several differences among the four analyzed zones (Fig. 46); the cell population expressing Sox2 is more abundant in the first portion of the ON than in central zones. These cells could correspond to a population of glial precursors, or proliferative glial cells, required to maintain the functionality of the growing visual system.

We have been able to verify a differential distribution of Sox2 positive cells in the ON by *in toto* tissue analysis. These cells form a cylinder around the newly formed axons in the entrance to the ON (Fig. 47C' - C''' y video 3). Afterwards, the electron microscopy analysis of cleared tissues performed in collaboration with Dr. Mack's group shown that several cells are disposed around the new axons (unmyelinated) in their entry into the ON (Fig. 52).

Taking together, we considered that our results provide significant proofs of the involvement of Sox2 glial cells in the pathway of newly formed axons of fish growing visual system. However, we suggest that this participation could be associated with different functions other than proliferation (DeOliveira-Mello et al., 2019a; Mercurio et al., 2019). Thus, considering that we (i) found differentiated Sox2 positive cells in the retina (see 10.5.2) and (ii) identified Sox2 positive cells though entire extension of the ON (see 10.5.3), not only in the entrance of new axons; our hypothesis is that Sox2 transcription factor has different functions in the adult fish visual system. These different Sox2 positive cell populations could generate diverse neurochemical niches for the new axons that are navigating from the entire circumferential retina periphery to compact themselves in a fascicle to enter in the ON [see 10.4; (Tsai and Miller, 2002)]. The absence of Sox2 positive cells in the ONH and the complete lack of co-localization with markers for new axons, support the existence of this neurochemical niche. In fact, this hypothesis could provide an explanation of how fish have a chronological ON structure, not only during development but also in life-long growth (Tsai and Miller, 2002; Dowding et al., 1991; Scholes, 1991; Maggs and Scholes, 1986).

However, Liu et. al. (2014) have described that the Sox2 transcription factor can act sometimes as a neuronal stem cell repressor and other studies analyze the role of Sox2 during cell differentiation processes (Kautzman et al., 2017; Sarkar and Hochedlinger, 2013; Hever et al., 2006; Kondoh et al., 2004). Apparently, Sox2 function are affected by the association with other co-factors (Cox et al., 2010; Kondoh y Kamachi, 2010; Inoue et al., 2007). Consequently, it is evident the needs to elucidate the functions and/or modulation mechanisms of Sox2 to regulate the cells of the visual system in adult vertebrates (DeOliveira-Mello et al., 2019a; Mercurio et al., 2019).

Figure 52: Micrography of the ultrastructure of ON in *in toto* tissue of *A. burtoni*. (A) The already described laminated structure of ON that keeps a chronological organization of axons is evident. The entrance of new axons in detail (black square; B), with several cells (black arrows indicate cell nucleus) arranged around these axons. (C) The new axons (unmyelinated; red asterisk) entering into the ON forming one fascicle are showed in detail.

11.4. Role of ON glial cells in the modulation of neurogenesis during continuous growth and regeneration

As previously mentioned, we have proposed two hypotheses in relation with the functions of Sox2 on glial cells of the pre-encephalic fish visual system: (i) Sox2 positive cells are glial precursors, maybe on different differentiation stages, to provide of new glial cells to maintain a growing functional system, both in the ONH and in the ON; (ii) these glial cells preserve Sox2 expression as neurochemical signals to guide the new axons during continuous growth. These hypotheses are not excluding each other, since glial precursors could also function as signaling cells. Furthermore, the function of Sox2 could be different depending on the factors that interact with it (Mercurio et al., 2019; Wei et al., 2019).

In addition, we have obtained preliminary results regarding the expression of Sox2 in regenerative processes after crushing the ON of adult wild type zebrafish (Figs. 53 and 54). The population of Sox2 positive cells was analyzed by immunohistochemistry at different post-injury times (3, 6, 9, and 24 hours).

Dr. León-Lobera in his Doctoral Thesis (2017) described an increase of Sox2 positive cells in adult zebrafish during regenerative processes after different post-injury times (2, 7, 21 and 60 days). In contrast to that, our analysis resulted in a decrease in the number of cells positive for Sox2. Labeled cells were found at 3, 6 and 9 hours after injury in the retina, ONH, and ON (Fig. 53A – I); while 24 hours post-injury, two zones were devoid of Sox2 positive cells; the periphery of the retina and the ON (Figs. 53J – L, and 54).

Knowing that our results on regeneration processes are still very preliminary, we suggest that: (i) Sox2 positive glial precursors undergo a period of cell death and/or diminish this protein expression due to the degenerating process. After that period, these cells increase their number to provide glial cells to the regenerating fish visual system [starting at 48 hours after-injury (León-Lobera, 2017)]; (ii) after injury, while the lesion area is degenerating the lack of signals from new axons may cause Sox2 cells death. These hypotheses do not exclude each other and evidence the need of an axon-glia interaction in the growing structure,

Figure 53: Histological sections of regenerating wild type zebrafish: at 3 (A – C), 6 (D – F), 9 (g – I) and 24 hours (J – L). Sox2 positive cells are shown in green. Scale bar: 20 μ m

Figure 54: Image composition of regenerating zebrafish visual system after 24 hours. Sox2 positive cells are located in the central retina and ONH, while ON is almost devoid of Sox2 labeled cells (with some exception; green arrow). Scale bar: 20 μ m

not only during normal growth but also in visual regeneration processes.

11.5. *In vitro* studies of glial cells from ON

In addition to provide a new research tool (Lara et al., 2019; DeOliveira-Mello et al., 2018), the aim of our *in vitro* studies was to analyze the biology of these glial cells with more detail. Since most of commercial antibodies are designed to detect proteins in mammals, the immunocharacterization of cells in fish species results very complicated. However, we have identified glial cells *in vitro* in the cell cultures obtained from the three fish species by using well-known glial markers (Mack and Tiedemann, 2013; Bernardos and Raymond, 2006). We have also performed a cell characterization of cell cultures from brain used as control (data not shown), that helped to prove that this protocol is appropriate to obtain *in vitro* fish glial cells.

Comparing ON and brain cell cultures, it was evident that brain cells have a longer *in vitro* lifespan than cells from the ON. Samples from brain resulted in more cells adhering on dish surface, not only after dissection but also along the days afterwards, being possible to split and amplify the brain cell cultures, with exception of those of zebrafish. Zebrafish cell cultures from brain never occupied more than 50% of dish surface, and they did not adhere to the dish surface after splitting protocol, although in general, these cells shown longer *in vitro* lifespan than ON cultures.

In summary, cell culture protocol is significantly easier to perform when using the largest fish species, *A. burtoni* and *C. auratus*. The main hypothesis is that the more abundant tissue volume obtained to start with, are preferable to obtain more adhering cells on the dish surface. On the other hand, even though we tried to plate an equal volume of tissue in each dish (four times more specimens of zebrafish were necessary than for the other two species to equalize the amount of cells), the zebrafish cell cultures still shown significant differences. Current studies on zebrafish *in vitro* neuronal cells are using embryo or peripheral nervous system samples (Meade et al., 2019; Patel et al., 2019; Treichel and Hines, 2018; Kroehne et al., 2017; Ghosh et al., 1997), with one exception (Tapanes-Castillo et al., 2014). This suggest that the low volume of tissue is not the only limitation to culture cells from adult zebrafish CNS.

Cell culture protocol from fish ON has shown some critical steps: cells mechanical dissociation, the percent of FBS to start the culture and the medium composition to maintain cells *in vitro*. Published cell culture protocols usually perform a mechanical dissociation of the tissue by using a Pauster's glass pipette (Håring et al., 2020; Nakano et al., 1976). In our work, this approach also worked in the cases of cells from fish brain, but not in the ON samples. Thus, we increase cell concentration by decreasing samples volume and adapting the mechanical dissociation technique (see 9.2). Attaching two tips (p200 and p20; Fig. 14) on a micropipette, an using small vials with no more than 200 – 300 μ l, we were able to apply enough friction to cells to separate them. Anyhow, the best cell cultures were obtained when cell dissociation of the tissue was not complete (small tissue fragments were visible on cell suspension; see 9.2).

The glial cells of ON were best attached to the surface with the two highest FBS concentration of medium (10% and 20%), according to bibliography. However, the best results were obtained when using 20% of FBS to start ON cell cultures since they shown more attached cells after 24 hours. Regarding the culture medium to maintain *in vitro* cells, those where the conditioned medium from brain cultures was employed showed an improvement in their viability (see 9.2.1 and 10.1).

Although we obtained attached cells when using the cells obtained from the flow cytometer separation samples, these cells shown the shorter *in vitro* lifespan (not more than 5 days). This viability difference is not observed in the case of brain samples used as control. In addition, we have determined for the first time the percentage proportion of glial cells expressing gfap/sox10 genes in the adult zebrafish ON (see 10.4).

Taking together, these results suggest that brain factors might play a role in the survival of ON glial cells. We know that the conditioned medium could contains lysosomes, proteins, peptides and/or lipids that high probably affect *in vitro* cells from ON after contacting it (Guimarães et al., 2018; Souza et al., 2017; Cheng et al., 2015; Wanner et al., 1995; Bastmeyer et al., 1991). Preliminary proteomic analysis showed a difference in proteins present in culture media between brain and ON

(see 10.2). To determine major factors of ON glial cell metabolism further detailed proteomic studies are still needed.

Regarding the *in vitro* ON glial cells expressing Sox2, these labeled cells were found in all analyzed cell cultures, but not all cells were Sox2 positive (see 10.1.2). ON glial cells apparently show different intensities of Sox2 labeling under *in vitro* conditions (see 10.1.2; Fig. 24C) that could correspond to differences in the concentration of this protein inside of each cell. Sox2 has been found in the cytoplasm, in contrast to the typical nuclear localization of this protein, which have been reported before on cancer cells. The proper cell culture protocol could be responsible to drive cell changes and/or stress to shift Sox2 protein location. These observations could be related with the hypotheses: (i) Sox2 positive cells from ON correspond to different glial subtypes and/or they present different differentiation stages (ii) ON glial cells have high plasticity (Zhou et al., 2018; Corsinotti et al., 2017; Sarkar and Hochedlinger, 2013; Taranova, 2006).

The cell culture protocol developed in the present study offers the possibility to perform different types of experiments that could elucidate essential aspects of the biology of teleost fish ON glial cells; for example: (i) functional assays, by performing co-cultures with cells from the retina (and/or cells from brain), to study axon-glia interactions; (ii) molecular assays, and regarding ómics aspects, to determine cell secretion and/or absorption major factors; (iii) studies to characterize different differentiation stages of ON cells and/or their plasticity potential.

In relation with future perspectives, we consider that we are opening different research lines: (i) *in vitro* tools to determine if Sox2 positive glial cells from ON can guide growing axons; (ii) provide a tool to describe proteomic, transcriptomic, lipidomic, etc., of adult fish ON cells, at least on three species; (iii) possibility to perform changing condition assays, and observe how glial cells react to it.

11.6. Comparative analysis of glial cells of the pre-encephalic visual system in three species of teleost fish

We consider that these results gather significant data of comparative biology by analyzing the three fish species in parallel. However, this work is restricted to

the study of the glial cells of the pre-encephalic visual system: the retina, ONH, and ON. Although the differences between the three used fish species are well-known (Maruska y Fernald, 2018; Ghosh y Hui, 2016; Theis et al., 2012; Arenzana et al., 2011; Perry et al., 2010; Hitchcock y Raymond, 2004; Mack et al. 2004; Cid et al., 2002), our discussion is focused on the differences between cyprinids and cichlids groups (see 7.1).

The tissue localization of Sox2 positive cells was very similar in the three species analyzed, but some differences are remarkable: (i) the cyprinids shown more PCNA positive cells in the ONL than the cichlid; (ii) Sox2 and PCNA co-labeled cells were found in two retina layers, NFL and ONL, of *A. burtoni*, that were not found in the other two species; (iii) although we did not observed any Sox2 positive cell in the ONH of cichlid fish, few of these cells were observed in the histological sections of the cyprinids; (iv) most of zebrafish amacrine cells expressing Sox2 and PV were detected in the retina GCL, while in the *A. burtoni* sections these cells were located in the INL (Fig. 36B and E). Thus, our proposal is that these differences could have a functional meaning related with the strategies regarding the continuous growth in the different teleost fish groups.

Differences in the amount and/or location of glial precursors might reflect different teleost fish growth and/or regeneration strategies, as well as differences in guidance of new axons (unmyelinated). Several PCNA positive cells were observed in the retina ONL of cyprinids (Figs. 29B, and 30B and E) being very probable they correspond to rod precursors. In cichlid sections, we only found a few PCNA positive cells in the retina ONL that sometimes also expressed Sox2 (Fig. 28G - I).

The main difference is the presence of cells expressing Sox2 in the ONH of cyprinids that have not been observed in any cichlid section. However, we consider that more studies about glia and glial precursors subtypes characterization are needed to understand these differences. In addition, more studies of the migration of glial cells (from retina to ON and/or vice versa), and/or the location of each glial subtype could elucidate the growing mechanisms involved in fish visual system. As well the different disposition of amacrine cells could indicate a diversity in the retina structure of fish species.

Thanks to a collaboration with Dra. Isabel Vicente Muñoz, from the University of Pisa (Italy), we were able to perform an *in silico* analysis using Geneious software (v. 10.0.9). First, the genomic data of three fish species was revealed; public on NCBI (National Center for Biotechnology Information): *A. burtoni* [assembly number: GCF_000239415.1_AstBur1.0; *Bioproject*, PRJNA60363 (Brawand et al., 2014)], *C. auratus* [assembly number: GCA_003368295.1_ASM336829v1; *Bioproject*, PRJNA487739 Lau and Ge, 2005; Murakami et al., 1998]] y *D. rerio* [assembly number: GCA_000002035.4_GRCz11; *Bioproject*, PRJNA11776 (Howe et al., 2013; Broughton et al., 2001)]. After that, we obtained the DCX protein sequence of cichlid (NCBI: XP_005922256.1) and goldfish (NCBI: XP_026110587.1). We found 89,4% of DCX protein homology by pair alignment analysis. Nevertheless, we did not find any homologue sequence to the DCX protein by looking for these sequences in zebrafish genome.

As positive control, we identified the Zn8 protein sequence in the genome of cyprinids [NCBI: NP_571075.1 (*D. rerio*) and XP_026129486.1 (*C. auratus*)]. Although Zn8 antibody is not effective in cichlid, a homologue sequence for this protein in *A. burtoni* genome was located (NCBI: XP_014186870.1).

Bioinformatic analysis showed that *D. rerio* has experienced a DCX protein sequence mutation or deletion. Furthermore, the tertiary structure of the Zn8 protein and or its isoforms is not identical in the different teleost fish, due to that cichlid has a cyprinid homologue Zn8 sequence, but the commercial antibody is ineffective to detect it. This observation may support the idea that different fish species could have various strategies to maintain an adult growing CNS with the capacity to regenerate.

Increasing knowledge about glial cell subtypes, their diverse differentiation stages and their plasticity could be the key to comprehend the involvement of glia cells in the modulation of neurogenesis. Similarly, comparative studies of the teleost fish diversity are needed to understand the strategy possibilities of vertebrate adult growing and regenerating CNS. In addition, optimizing and developing *in vitro* tools could be the way to characterize and analyze all glial cell subtypes of fish CNS and their involvement in the metabolism of neurons.



Understanding glial cell biology and being able to manipulate it, could be the key to develop successful cell therapies using glial cells.

12. Conclusions

- 1. The developed protocol allows to obtain and maintain glial cells from the optic nerve of teleost fish.** To have a validated and effective *in vitro* tool increase the possibilities on studies of glial cells from fish optic nerve. In addition, the development of this protocol, implies a reduction in animal experimentation applications in the long term
- 2. We found Sox2 positive cells co-labeled for either markers of cell proliferation, of the astroglial family or neuronal cells in retina and optic nerve. Apparently, the optic nerve head is a zone almost free of Sox2 positive cells.** The Sox2 expression in different cell types, including progenitors and completely differentiated cells proves that: (i) the function of this transcription factor is not restricted to maintain the proliferation capacity of cells (ii) Sox2 function could depend on other factors.
- 3. New axons compact themselves in a single fascicle to enter into the ON by the nasal zone.** The axons from the transition zone cells (labeled with DCX/Zn8) run through the nerve fiber layer of the retina forming little fascicles. In the ONH, this grouping become more important until all of these axons join into one single fascicle.
- 4. Sox2 positive cells are disposed around the fascicle formed by new axons originated in the transition zone.** The cylinder that Sox2 positive cells are forming around the entrance of the new axons into the ON is not observed in mature zones. This seems to be an indicative of the important interaction of the glia-axon involved in the processes of continuous growth of adult fish.
- 5. Taking together, our work demonstrates that studies elucidating the diversity of glial cells subtypes and their progenitors and their importance on the different teleost fish groups are still necessary.** Differences in the localization and/or the diversity glial cell subtypes of fish visual system could indicate that



there are differences in the continuous growth and regeneration strategies in the diverse fish species. Consequently, we consider that this work also contributes into some aspects of the Comparative Biology of teleost fish.



Bibliografía/Bibliography



13. Bibliografía/Bibliography

- Abdelhakim, A., and Rasool, N. (2018). Neuroretinitis: a review. *Current Opinion in Ophthalmology*, 29(6), 514–519. doi: 10.1097/ICU.0000000000000527
- Almasieh, M., and Levin, L. A. (2017). Neuroprotection in glaucoma: animal models and clinical trials. *Annual Review of Vision Science*, 3(1), 91–120. doi: 10.1146/annurev-vision-102016-061422
- Almeida, R. G., and Lyons, D. A. (2013). On the resemblance of synapse formation and CNS myelination. *Neuroscience*, 276, 98–108. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.062
- Almeida, R. G., Czopka, T., Ffrench-Constant, C., and Lyons, D. A. (2011). Individual axons regulate the myelinating potential of single oligodendrocytes *in vivo*. *Development*, 138(20), 4443–4450. doi: 10.1242/dev.071001
- Alunni, A., and Bally-Cuif, L. (2016). A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Development*, 143(5), 741–753. doi: 10.1242/dev.122796
- Alunni, A., Hermel, J.-M., Heuze, A., Bourrat, F., Jamen, F., and Joly, J.-S. (2010). Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Developmental Neurobiology*, 70(10), 693–713. doi: 10.1002/dneu.20799
- Alunni, A., Vaccari, S., Torcia, S., Meomartini, M. E., Nicotra, A., and Alfei, L. (2005). Characterization of glial fibrillary acidic protein and astroglial architecture in the brain of a continuously growing fish, the rainbow trout. *European Journal of Histochemistry*, 49(2), 157–166. doi: 10.4081/940
- Alvarez-Buylla, A., Seri, B., and Doetsch, F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Research Bulletin*, 57(6), 751–758. doi: 10.1016/S0361-9230(01)00770-5
- Arenzana, F.J., Santos-Ledo, A., Porteros, A., Aijón, J., Velasco, A., Lara, J.M., Arévalo, R., (2011). Characterisation of neuronal and glial populations of the visual system during zebrafish lifespan. *International Journal of Development Neuroscience*, 29, 441–449. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.02.008
- Armati, P., and Mathey, E. (2010). The biology of oligodendrocytes. *Cambridge University Press*, doi: 10.1017/CBO9780511782121

- Bastmeyer, M., Jeserich, G., and Stuermer, C. A. O. (1994). Similarities and differences between fish oligodendrocytes and schwann cells *in vitro*. *Glia*, 11(4), 300–314. doi: 10.1002/glia.440110403
- Bastmeyer, M., Bähr, M., and Stuermer, C. A. O. (1993). Fish optic nerve oligodendrocytes support axonal regeneration of fish and mammalian retinal ganglion cells. *Glia*, 8(1), 1–11. doi: 10.1002/glia.440080102
- Bastmeyer, M., Beckmann, M., Schwab, M., and Stuermer, C. (1991). Growth of regenerating goldfish axons is inhibited by rat oligodendrocytes and CNS myelin but not by goldfish optic nerve tract oligodendrocytelike cells and fish CNS myelin. *The Journal of Neuroscience*, 11(3), 626–640. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-03-00626.1991
- Bastmeyer, M., Beckmann, M., Nona, S. M., Cronly-Dillon, J. R., and Stuermer, C. A. O. (1989). Identification of astrocyte and oligodendrocyte-like cells of goldfish optic nerves in culture. *Neuroscience Letters*, 101(2), 127–132. doi: 10.1016/0304-3940(89)90518-1
- Bejarano-Escobar, R., Sánchez-Calderón, H., Otero-Arenas, J., Martín-Partido, G., and Francisco-Morcillo, J. (2017). Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. *Journal of Anatomy*, 231(4), 471–483. doi: 10.1111/joa.12653
- Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., Martín-Partido, G., and Francisco-Morcillo, J. (2013). Molecular characterization of cell types in the developing, mature, and regenerating fish retina. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24(1), 127–158. doi: 10.1007/s11160-013-9320-z
- Bejarano-Escobar, R., Blasco, M., DeGrip, W. J., Martín-Partido, G., and Francisco-Morcillo, J. (2009). Cell differentiation in the retina of an epibenthonic teleost, the Tench (*Tinca tinca*, Linneo 1758). *Experimental Eye Research*, 89(3), 398–415. doi: 10.1016/j.exer.2009.04.007
- Bennett, M. V. L., Contreras, J. E., Bukauskas, F. F., and Sáez, J. C. (2003). New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends in Neurosciences*, 26(11), 610–617. doi: 10.1016/j.tins.2003.09.008
- Bernardos, R. L., and Raymond, P. A. (2006). GFAP Transgenic zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 6(8), 1007–1013. doi: 10.1016/j.modgep.2006.04.006
- Bifari, F., Berton, V., Pino, A., Kusalo, M., Malpeli, G., Di Chio, M., ... Decimo, I. (2015). Meninges harbor cells expressing neural precursor markers during development

and adulthood. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fncel.2015.00383

- Bilotta, J., and Saszik, S. (2001). The zebrafish as a model visual system. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(7), 621–629. doi: 10.1016/S0736-5748(01)00050-8
- Blasky, A. J., Pan, L., Moens, C. B., and 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*, 243(12), 1511–1523. doi: 10.1002/dvdy.24172
- Blaugrund, E., Lavie, V., Cohen, I., Solomon, A., Schreyer, D. J., and Schwartz, M. (1993). Axonal regeneration is associated with glial migration: comparison between the injured optic nerves of fish and rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 330(1), 105–112. doi: 10.1002/cne.903300109
- Bodrikov, V., Welte, C., Wiechers, M., Weschenfelder, M., Kaur, G., Shypitsyna, A., ... Stuermer, C. A. O. (2017). Substrate properties of zebrafish rtn4b/nogo and axon regeneration in the zebrafish optic nerve. *Journal of Comparative Neurology*, 525(14), 2991–3009. doi: 10.1002/cne.24253
- Bollaerts, I., Van houcke, J., Andries, L., De Groef, L., and Moons, L. (2017). Neuroinflammation as fuel for axonal regeneration in the injured vertebrate central nervous system. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–14. doi: 10.1155/2017/9478542
- Brawand, D., Wagner, C. E., Li, Y. I., Malinsky, M., Keller, I., Fan, S., Di Palma, F. (2014). The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. *Nature*, 513(7518), 375–381. doi: 10.1038/nature13726
- Brenner, M. (1994). Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathology*, 4(3), 245–257. doi: 10.1111/j.1750-3639.1994.tb00840.x
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S., Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(4), 397–424. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003
- Bringmann, A., and Reichenbach, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Frontiers in Bioscience*, 6(1), e77. doi: 10.2741/Bringman
- Broughton, R. E., Milam, J. E., and Roe, B. (2001). The complete sequence of the zebrafish (*danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in

vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Research*, 11(11), 1958–1967. doi: 10.1101/gr.156801

- Brown, G. C., and Vilalta, A. (2015). How microglia kill neurons. *Brain Research*, 1628, 288–297. doi: 10.1016/j.brainres.2015.08.031
- Buckley, C. E., Goldsmith, P., and Franklin, R. J. M. (2008). Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination? *Disease Models and Mechanisms*, 1(4–5), 221–228. doi: 10.1242/dmm.001248
- Büssow, H. (1980). The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell and Tissue Research*, 206(3), 367–378. doi: 10.1007/BF00237966
- Butler, A. B., and Hodos, W. (2005). Comparative vertebrate neuroanatomy. *John Wiley and Sons, Inc.* doi: 10.1002/0471733849
- Caminos, E., Velasco, A., Jarrín, M., Lillo, C., Jimeno, D., Aijón, J., and Lara, J. M. (2000). A comparative study of protein kinase c-like immunoreactive cells in the retina. *Brain, Behavior and Evolution*, 56(6), 330–339. doi:10.1159/000047217
- Caminos, E., Velasco, A., Jarrín, M., Aijón, J., and Lara, J. M. (1999). Protein kinase C-like immunoreactive cells in embryo and adult chicken retinas. *Developmental Brain Research*, 118(1–2), 227–230. doi: 10.1016/S0165-3806(99)00156-X
- Carreño, H., Santos-Ledo, A., Velasco, A., Lara, J. M., Aijón, J., and Arévalo, R. (2013). Effects of retinoic acid exposure during zebrafish retinogenesis. *Neurotoxicology and Teratology*, 40, 35–45. doi: 10.1016/j.ntt.2013.06.001
- Chan-Ling, T., Chu, Y., Baxter, L., Weible II, M., and Hughes, S. (2009). *In vivo* characterization of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in developing rat retinae: differentiation, proliferation, and apoptosis. *Glia*, 57(1), 39–53. doi: 10.1002/glia.20733
- Cheng, L., Gao, L., Guan, W., Mao, J., Hu, W., Qiu, B., ... Pei, G. (2015). Direct conversion of astrocytes into neuronal cells by drug cocktail. *Cell Research*, 25(11), 1269–1272. doi: 10.1038/cr.2015.120
- Cid, E. (2006). Participación de las poblaciones proliferativas y de factores de transcripción en el crecimiento continuado y la regeneración del sistema visual de teleósteos. Tesis Doctoral; *Universidad de Salamanca*. doi: 10.2307/j.ctvc5d3q.7
- Cid, E., Velasco, A., Ciudad, J., Orfao, A., Aijón, J., and Lara, J. (2002). Quantitative evaluation of the distribution of proliferating cells in the adult retina in three

cyprinid species. *Cell and Tissue Research*, 308(1), 47–59. doi: 10.1007/s00441-002-0529-8

- Colavincenzo, J., and Levine, R. L. (2000). Myelin debris clearance during wallerian degeneration in the goldfish visual system. *Journal of Neuroscience Research*, 59(1), 47–62. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(20000101)59:1<47::AID-JNR7>3.0.CO;2-P
- Corsinotti, A., Wong, F. C. K., Tatar, T., Szczerbinska, I., Halbritter, F., Colby, D., ... Chambers, I. (2017). Distinct SoxB1 networks are required for naïve and primed pluripotency. *eLife*, 6, 1–28. doi: 10.7554/eLife.27746
- Cox, J. L., Mallanna, S. K., Luo, X., & Rizzino, A. (2010). Sox2 uses multiple domains to associate with proteins present in Sox2-protein complexes. *PLoS ONE*, 5(11), e15486. doi: 10.1371/journal.pone.0015486
- Craig, S. E. L., Thummel, R., Ahmed, H., Vasta, G. R., Hyde, D. R., and Hitchcock, P. F. (2010). The zebrafish galectin Drgal1-l2 is expressed by proliferating Müller glia and photoreceptor progenitors and regulates the regeneration of rod photoreceptors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(6), 3244. doi: 10.1167/iovs.09-4879
- Crair, M. C., and Mason, C. A. (2016). Reconnecting eye to brain. *The Journal of Neuroscience*, 36(42), 10707–10722. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1711-16.2016
- Cuoghi, B., and Mola, L. (2009). Macroglial cells of the teleost central nervous system: a survey of the main types. *Cell and Tissue Research*, 338(3), 319–332. doi: 10.1007/s00441-009-0870-2
- Das, T., Hoarau, J. J., Jaffar Bandjee, M. C., Maquart, M., and Gasque, P. (2015). Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against chikungunya neuroinfection. *The Journal of General Virology*, 96(Pt 2), 294–310. doi: 10.1099/vir.0.071175-0
- Del Río-Hortega, P. (1930). Histogenic, morphological, physiological and physio-pathological concepts of microglia. *Revue Neurologique*, 53, 956–986.
- Del Río-Hortega, P. (1928). Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. *Real Sociedad Española de Historia Natural* (Ed.) 161- 280. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*.
- Del Rio-Hortega, P., and Penfield, W. (1927). Cerebral cicatrix - The reaction of neuroglia and microglia to brain wounds. *Bulletin of The Johns Hopkins Hospital*, 41, 278–303.

- Del Río-Hortega, P. (1921). Estudios sobre la neuroglia: la glía de escasa radiaciones (oligodendroglía). En Real Sociedad Española de Historia Natural (Ed.). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*.
- DeOliveira-Mello, L., Lara, J. M., Arevalo, R., Velasco, A., and Mack, A. F. (2019a). Sox2 expression in the visual system of two teleost species. *Brain Research*, 1722, 146350. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146350
- DeOliveira-Mello, L., Lara, J. M., Velasco, A., Arévalo, R., Mack, A. F., Arevalo, R., ... Mack, A. F. (2019b). Expression of Sox2 in the visual system of fish. In *XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease* (Vol. 67, pp. E732–E733). doi: 10.1002/glia.23675
- DeOliveira-Mello, L., Lara, J. M., Velasco, A., Arévalo, R., and Mack, A. F. (2018). Optic nerve glial cells culture of zebrafish (*Danio rerio*). In *11th FENS Forum of Neuroscience*. Berlin.
- Desjardins, J. K., Klausner, J. Q., and Fernald, R. D. (2010). Female genomic response to mate information. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(49), 21176–21180. doi: 10.1073/pnas.1010442107
- Diekmann, H., Kalbhen, P., and Fischer, D. (2015). Characterization of optic nerve regeneration using transgenic zebrafish. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 11. doi: 10.3389/fncel.2015.00118
- Diekmann, H., and Stuermer, C. A. O. (2009). Zebrafish Neurolin-a and -b, orthologs of ALCAM, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding. *The Journal of Comparative Neurology*, 513(1), 38–50. doi: 10.1002/cne.21928
- Dimou, L., and Simons, M. (2017). Diversity of oligodendrocytes and their progenitors. *Current Opinion in Neurobiology*, 47, 73–79. doi: 10.1016/j.conb.2017.09.015
- Dimou, L., and Gallo, V. (2015). NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia*, 63(8), 1429–1451. doi: 10.1002/glia.22859
- Dimou, L., and Götz, M. (2014). Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain. *Physiological Reviews*, 94(3), 709–737. doi: 10.1152/physrev.00036.2013
- Dowding, A. J., Maggs, A., and Scholes, J. (1991). Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS: immunohistochemical characterization using

- fl. 1, an anti-macrophage monoclonal antibody. *Glia*, 4(4), 345–364. doi: 10.1002/glia.440040403
- Dutton, J. R., Antonellis, A., Carney, T. J., Rodrigues, F. S. L. M., Pavan, W. J., Ward, A., and Kelsh, R. N. (2008). An evolutionarily conserved intronic region controls the spatiotemporal expression of the transcription factor Sox10. *BMC Developmental Biology*, 8(1), 105. doi: 10.1186/1471-213X-8-105
 - Dyer, M. A., and Cepko, C. L. (2000). Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nature Neuroscience*, 3(9), 873–880. doi: 10.1038/78774
 - Easter, S. S., and Hitchcock, P. F. (2000). Stem cells and regeneration in the retina: what fish have taught us about neurogenesis. *The Neuroscientist*, 6(6), 454–464. doi: 10.1177/107385840000600608
 - Easter, S. S., and Nicola, G. N. (1996). The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Biology*, 180(2), 646–663. doi: 10.1006/dbio.1996.0335
 - Easter, S., Bratton, B., and Scherer, S. (1984). Growth-related order of the retinal fiber layer in goldfish. *The Journal of Neuroscience*, 4(8), 2173–2190. doi: 10.1523/JNEUROSCI.04-08-02173.1984
 - Episkopou, V. (2005). Sox2 functions in adult neural stem cells. *Trends in Neurosciences*, 28(5), 219–221. doi: 10.1016/j.tins.2005.03.003
 - Eugenin-von Bernhardt J., and Dimou, L. (2016). NG2-glia, more than progenitor cells. In R. VonBernhardt (Ed.), *Glial Cells in Health and Disease of the CNS* (Vol. 949, pp. 27–45). *Springer International Publishing*. doi: 10.1007/978-3-319-40764-7_2
 - Fadool, J., and Dowling, J. E. (2008). Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(1), 89–110. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.08.002
 - Fan, W., Li, X., Yao, H., Deng, J., Liu, H., Cui, Z., Deng, J. (2016). Neural differentiation and synaptogenesis in retinal development. *Neural Regeneration Research*, 11(2), 312. doi: 10.4103/1673-5374.177743
 - Fernald, R. D., and Maruska, K. P. (2012). Social information changes the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(Supplement_2), 17194–17199. doi: 10.1073/pnas.1202552109

- Fernald, R. D. (1991). Teleost vision: seeing while growing. *Journal of Experimental Zoology*, 256(S5), 167–180. doi: 10.1002/jez.1402560521
- Fernández-López, B., Romaus-Sanjurjo, D., Senra-Martínez, P., Anadón, R., Barreiro-Iglesias, A., and Rodicio, M. C. (2016). Spatiotemporal pattern of doublecortin expression in the retina of the sea lamprey. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 13. doi: 10.3389/fnana.2016.00005
- Ferreira, L., Fuentes-Calvo, I., Muñoz-Félix, J. M., Muñiz-Martín, C., Sánchez-Juanes, F., Raposo, C., ... Martínez-Salgado, C. (2012). Functional specific roles of H-ras and N-ras. A proteomic approach using knockout cell lines. *Electrophoresis*, 33(9–10), 1385–1396. doi: 10.1002/elps.201100606
- Ferri, A., Cavallaro, M., Braida, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., ... Nicolis, S. K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15), 3805–3819. <https://doi.org/10.1242/dev.01204>
- Ffrench-Constant, C., Miller, R. H., Burne, J. F., and 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. *Journal of Neurocytology*, 17(1), 13–25. doi: 10.1007/BF01735374
- Fischer, A. J., and Bongini, R. (2010). Turning Müller glia into neural progenitors in the retina. *Molecular Neurobiology*, 42(3), 199–209. doi: 10.1007/s12035-010-8152-2
- Fischer, A. J., Zelinka, C., and Scott, M. A. (2010). Heterogeneity of glia in the retina and optic nerve of birds and mammals. *PLoS ONE*, 5(6), e10774. doi: 10.1371/journal.pone.0010774
- Fischer, A. J. (2005). Neural regeneration in the chick retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24(2), 161–182. doi: 10.1016/j.preteyeres.2004.07.003
- Fischer, A. J., and Reh, T. A. (2001). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature Neuroscience*, 4(3), 247–252. doi: 10.1038/85090
- Fischer, D. (2012). Stimulating axonal regeneration of mature retinal ganglion cells and overcoming inhibitory signaling. *Cell and Tissue Research*, 349(1), 79–85. doi: 10.1007/s00441-011-1302-7

- Fischer, D., and Leibinger, M. (2012). Promoting optic nerve regeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(6), 688–701. doi: 10.1016/j.preteyeres.2012.06.005
- Kondoh, H., and Kamachi, Y. (2010). Sox-partner code for cell specification: regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(3), 391–399. doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.003
- Kondoh, H., Uchikawa, M., and Kamachi, Y. (2004). Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(8–9), 819–827. doi: 10.1387/ijdb.041868hk
- Frost, J. L., and Schafer, D. P. (2016). Microglia: architects of the developing nervous system. *Trends in Cell Biology*, 26(8), 587–597. doi: 10.1016/j.tcb.2016.02.006
- Gadea, A., and López-Colomé, A. M. (2001). Glial transporters for glutamate, glycine and gaba i. glutamate transporters. *Journal of Neuroscience Research*, 63(6), 453–460. doi: 10.1002/jnr.1039
- García, D. M., and Koke, J. R. (2009). Astrocytes as gate-keepers in optic nerve regeneration: a mini-review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 152(2), 135–138. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.09.026
- Garcia-Pradas, L., Gleiser, C., Wizenmann, A., Wolburg, H., and Mack, A. F. (2018). Glial cells in the fish retinal nerve fiber layer form tight junctions, separating and surrounding axons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 12. doi: 10.3389/fnmol.2018.00367
- Gemberling, M., Bailey, T. J., Hyde, D. R., and Poss, K. D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics*, 29(11), 611–620. doi: 10.1016/j.tig.2013.07.003
- Ghosh, C., Liu, Y., Ma, C., and Collodi, P. (1997). Cell cultures derived from early zebrafish embryos differentiate *in vitro* into neurons and astrocytes. *Cytotechnology*, 23(1–3), 221–230. doi: 10.1023/A:1007915618413
- Ghosh, S., and Hui, S. P. (2016). Regeneration of zebrafish CNS: adult neurogenesis. *Neural Plasticity*, 21. doi: 10.1155/2016/5815439

- Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., and Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, 23(2), 257–271. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80778-3
- Goldman, D. (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(7), 431–442. doi: 10.1038/nrn3723
- Gorsuch, R. A., Lahne, M., Yarka, C. E., Petravick, M. E., Li, J., and Hyde, D. R. (2017). Sox2 regulates Müller glia reprogramming and proliferation in the regenerating zebrafish retina via Lin28 and Ascl1a. *Experimental Eye Research*, 161, 174–192. doi: 10.1016/j.exer.2017.05.012
- Grafstein, B., and Murray, M. (1969). Transport of protein in goldfish optic nerve during regeneration. *Experimental Neurology*, 25(4), 494–508. doi: 10.1016/0014-4886(69)90093-4
- Gramage, E., Li, J., and Hitchcock, P. (2014). The expression and function of midkine in the vertebrate retina. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), 913–923. doi: 10.1111/bph.12495
- Grupp, L., Wolburg, H., and Mack, A. F. (2010). Astroglial structures in the zebrafish brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(21), 4277–4287. doi: 10.1002/cne.22481
- Guimarães, R. P. D., Landeira, B. S., Coelho, D. M., Golbert, D. C. F., Silveira, M. S., Linden, R., ... Costa, M. R. (2018). Evidence of Müller glia conversion into retina ganglion cells using Neurogenin2. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 15. doi: 10.3389/fncel.2018.00410
- Hagedorn, M., and Fernald, R. D. (1992). Retinal growth and cell addition during embryogenesis in the teleost, *Haplochromis burtoni*. *The Journal of Comparative Neurology*, 321(2), 193–208. doi: 10.1002/cne.903210203
- Häring, M., Fatt, M., and Kupari, J. (2020). Protocol to prepare single-cell suspensions from mouse vagal sensory ganglia for transcriptomic studies. *STAR Protocols*, 1(1), 100030. doi: 10.1016/j.xpro.2020.100030
- Harman, A. M., Rodger, J., Ahmat, A., Thomas, C., Bartlett, C., Chen, P., ... Beazley, L. D. (2003). PSA-NCAM is up-regulated during optic nerve regeneration in lizard but not in goldfish. *Experimental Neurology*, 182(1), 180–185. doi: 10.1016/S0014-4886(03)00081-5
- Harper, C., and Lawrence, C. (2011). The laboratory zebrafish. *CRC Press*.

- Heinrich, C., Bergami, M., Gascón, S., Lepier, A., Viganò, F., Dimou, L., ... Götz, M. (2014). Sox2-mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. *Stem Cell Reports*, 3(6), 1000–1014. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.10.007>
- Hever, A., Williamson, K., and Van Heyningen, V. (2006). Developmental malformations of the eye: the role of Pax6, Sox2 and OTX2. *Clinical Genetics*, 69(6), 459–470. doi: 10.1111/j.1399-0004.2006.00619.x
- Hitchcock, P. F., and Raymond, P. A. (2004). The teleost retina as a model for developmental and regeneration biology. *Zebrafish*, 1(3), 257–271. doi: 10.1089/zeb.2004.1.257
- Hitchcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A., and Otteson, D. (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23(2), 183–194. doi: 10.1016/j.preteyeres.2004.01.001
- Hitchcock, P. F., Myhr, K. J. L., Easter, S. S., Mangione-Smith, R., and Jones, D. D. (1992). Local regeneration in the retina of the goldfish. *Journal of Neurobiology*, 23(2), 187–203. doi: 10.1002/neu.480230209
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., and Wong, R. O. L. (2014). Functional architecture of the retina: development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 42, 44–84. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.06.003
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. doi: 10.1038/nature12111
- Inoue, M., Kamachi, Y., Matsunami, H., Imada, K., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2007). Pax6 and Sox2-dependent regulation of the sox2 enhancer n-3 involved in embryonic visual system development. *Genes to Cells*, 12(9), 1049–1061. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01114.x
- Ito, Y., Tanaka, H., Okamoto, H., and Ohshima, T. (2010). Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Developmental Biology*, 342(1), 26–38. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.03.008
- Jacobs, S. M., and Van Stavern, G. P. (2013). Neuro-ophthalmic deficits after head trauma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 13(11), 389. doi: 10.1007/s11910-013-0389-5

- Jimeno, D., Lillo, C., Cid, E., Aijón, J., Velasco, A., and Lara, J. M. (2003). The degenerative and regenerative processes after the elimination of the proliferative peripheral retina of fish. *Experimental Neurology*, 179(2), 210–228. doi: 10.1016/S0014-4886(02)00020-1
- Jimeno, D., Velasco, A., Lillo, C., Lara, J. M., and Aijón, J. (1999). Response of microglial cells after a cryolesion in the peripheral proliferative retina of tench. *Brain Research*, 816(1), 175–189. doi: 10.1016/S0006-8993(98)01170-6
- Juntti, S. A., Hilliard, A. T., Kent, K. R., Kumar, A., Nguyen, A., Jimenez, M. A., ... Fernald, R. D. (2016). A neural basis for control of cichlid female reproductive behavior by Prostaglandin F 2 α . *Current Biology*, 26(7), 943–949. doi: 10.1016/j.cub.2016.01.067
- Kamachi, Y., and Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 140(20), 4129–4144. doi: 10.1242/dev.091793
- Kamachi, Y., Uchikawa M., Tanouchi A., Sekido R., and Kondoh, H. (2001). Pax6 and Sox2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes and Development*, 15(10), 1272–1286. doi: 10.1101/gad.887101
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., and Kondoh, H. (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development (Cambridge, England)*, 125(13), 2521–2532. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609835>
- Kautzman, A. G., Keeley, P. W., Nahmou, M. M., Luna, G., Fisher, S. K., and Reese, B. E. (2017). Sox2 regulates astrocytic and vascular development in the retina. *Glia*, 66(3), 623–636. doi: 10.1002/glia.23269
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010
- Kimelberg, H. K. (2010). Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *The Neuroscientist*, 16(1), 79–106. doi: 10.1177/1073858409342593
- Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International*, 45(2–3), 191–202. doi: 10.1016/j.neuint.2003.08.015

- Koke, J. R., Mosier, A. L., and García, D. M. (2010). Intermediate filaments of zebrafish retinal and optic nerve astrocytes and Müller glia: Differential distribution of cytokeratin and GFAP. *BMC Research Notes*, 3(1), 50. doi: 10.1186/1756-0500-3-50
- Kolb, H., and Marshak, D. (2003). The midget pathways of the primate retina. *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, 106(1), 67–81. doi: 10.1023/a:1022469002511
- Kolb, H., Zhang, L., Dekorver, L., and Cuenca, N. (2002). A new look at Calretinin-immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 453(2), 168–184. doi: 10.1002/cne.10405
- Komitova, M., Mattsson, B., Johansson, B. B., and Eriksson, P. S. (2005). Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke*, 36(6), 1278–1282. doi: 10.1161/01.STR.0000166197.94147.59
- Koudelka, S., Voas, M. G., Almeida, R. G., Baraban, M., Soetaert, J., Meyer, M. P., ... Lyons, D. A. (2016). Individual neuronal subtypes exhibit diversity in CNS myelination mediated by synaptic vesicle release. *Current Biology*, 26(11), 1447–1455. doi: 10.1016/j.cub.2016.03.070
- Kroehne, V., Tsata, V., Marrone, L., Froeb, C., Reinhardt, S., Gompf, A., ... Reimer, M. M. (2017). Primary spinal OPC culture system from adult zebrafish to study oligodendrocyte differentiation *in vitro*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(September), 1–10. doi: 10.3389/fncel.2017.00284
- Kwan, J. W., Lee, M. J., Mack, A. F., Chiu, J. F., and Fernald, R. D. (1996). Non-uniform distribution of cell proliferation in the adult teleost retina. *Brain Research*, 712(1), 40–44. doi: 10.1016/0006-8993(95)01426-8
- Lara, J. M., DeOliveira-Mello, L., Mack, A. F., Velasco, A., Borza, R., and Arévalo, R. (2019). Optic nerve glial cell culture of three fish species. In *XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease* (Vol. 67, p. E734). doi:10.1002/glia.23675
- Lau, M.-T., and Ge, W. (2005). Cloning of Smad2, Smad3, Smad4, and Smad7 from the goldfish pituitary and evidence for their involvement in activin regulation of goldfish FSH β promoter activity. *General and Comparative Endocrinology*, 141(1), 22–38. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.10.019

- Le Rouedec, D., Rayner, K., Rex, M., Wigmore, P. M., and 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), 51–56. doi: 10.1046/j.0021-8782.2001.00007.x
- Lee, S., Leach, M. K., Redmond, S. A., Chong, S. Y. C., Mellon, S. H., Tuck, S. J., ... Chan, J. R. (2012). A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nature Methods*, 9(9), 917–922. doi: 10.1038/nmeth.2105
- Lenkowski, J. R., and Raymond, P. A. (2014). Müller glia: stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Progress in Retinal and Eye Research*, 40, 94–123. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.007
- León-Lobera, F. (2017). Caracterización de los oligodendrocitos en la vía visual del pez cebra en desarrollo y en procesos regenerativos. Tesis Doctoral; *Universidad de Salamanca*. doi: 10.14201/gredos.137077
- Leppert, C. A., Diekmann, H., Paul, C., Laessing, U., Marx, M., Bastmeyer, M., and Stuermer, C. A. O. (1999). Neurolin Ig domain 2 participates in retinal axon guidance and Ig domains 1 and 3 in fasciculation. *Journal of Cell Biology*, 144(2), 339–349. doi: 10.1083/jcb.144.2.339
- Levine, J. M., Reynolds, R., and Fawcett, J. W. (2001). The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends in Neurosciences*, 24(1), 39–47. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01691-X
- Levine, R. L. (1989). Organization of astrocytes in the visual pathways of the goldfish: an immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology*, 285(2), 231–245. doi: 10.1002/cne.902850206
- Lieschke, G. J., and Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353–367. doi: 10.1038/nrg2091
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Lara, J. M., and Aijón, J. (2002). The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(10), 1289–1302. doi: 10.1177/002215540205001002
- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Cid, E., Aijón, J., and Lara, J. M. (2001). Non-neuronal cells involved in the degeneration and regeneration of the fish retina. *Journal of Neurocytology*, 30(6), 475–491. doi: 10.1023/a:1015684932550

- Lillo, C., Velasco, A., Jimeno, D., Lara, J. M., and Aijón, J. (1998). Ultrastructural organization of the optic nerve of the tench (Cyprinidae, Teleostei). *Journal of Neurocytology*, 27(8), 593–604. doi: 10.1023/A:1006974311861
- Lin, Y., Ouchi, Y., Satoh, S., and Watanabe, S. (2009). Sox2 plays a role in the induction of amacrine and Müller glial cells in mouse retinal progenitor cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(1), 68. doi: 10.1167/iovs.07-1619
- Liu, Q., and Londraville, R. L. (2003). Using the adult zebrafish visual system to study Cadherin-2 expression during central nervous system regeneration. *Methods in Cell Science*, 25(1/2), 71–78. doi: 10.1023/B:MICS.0000006854.18378.fc
- Liu, Y.-R., Laghari, Z. A., Novoa, C. A., Hughes, J., Webster, J. R., Goodwin, P. E., ... Scotting, P. J. (2014). Sox2 acts as a transcriptional repressor in neural stem cells. *BMC Neuroscience*, 15(1), 95. doi: 10.1186/1471-2202-15-95
- Lombardo, F. (1968). Retinal regeneration in adult Teleostei. *Atti Della Accademia Nazionale Dei Lincei Rendiconti*, 45(6), 631.
- López-Anido, C., Sun, G., Koenning, M., Srinivasan, R., Hung, H. A., Emery, B., ... Svaren, J. (2015). Differential Sox10 genomic occupancy in myelinating glia. *Glia*, 63(11), 1897–1914. doi: 10.1002/glia.22855
- Lust, K., and Tanaka, E. M. (2019). A comparative perspective on brain regeneration in amphibians and teleost fish. *Developmental Neurobiology*, 79(5), 424–436. doi: 10.1002/dneu.22665
- Lust, K., and Wittbrodt, J. (2018). Activating the regenerative potential of Müller glia cells in a regeneration-deficient retina. *ELife*, 7, 1–23. doi: 10.7554/eLife.32319
- Lyons, D. A., and Talbot, W. S. (2015). Glial cell development and function in zebrafish. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), 21. doi: 10.1101/cshperspect.a020586
- Macdonald, R., Scholes, J., Strähle, U., Brennan, C., Holder, N., Brand, M., and Wilson, S. W. (1997). The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. *Development (Cambridge, England)*, 124(12), 2397–2408. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199366>

- Mack, A. F., and Tiedemann, K. (2013). Cultures of astroglial cells derived from brain of adult cichlid fish. *Journal of Neuroscience Methods*, 212(2), 269–275. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.11.003
- Mack, A. F., and Wolburg, H. (2012). A novel look at astrocytes. *The Neuroscientist*, 19(2), 195–207. doi: 10.1177/1073858412447981
- Mack, A. F. (2007). Evidence for a columnar organization of cones, Müller cells, and neurons in the retina of a cichlid fish. *Neuroscience*, 144(3), 1004–1014. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.10.029
- Mack, A. F., and Wolburg, H. (2006). Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions. *Brain Research*, 1103(1), 25–31. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.135
- Mack, A. F., Süssmann, C., Hirt, B., and Wagner, H.-J. (2004). Displaced amacrine cells disappear from the ganglion cell layer in the central retina of adult fish during growth. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(10), 3749. doi: 10.1167/iovs.04-0190
- Mack, A. F., Papanikolaou, D., and Lillo, C. (2003). Investigation of the migration path for new rod photoreceptors in the adult cichlid fish retina. *Experimental Neurology*, 184(1), 90–96. doi: 10.1016/S0014-4886(03)00131-6
- Mack, A. F., and Fernald, R. D. (1991). Thin slices of teleost retina continue to grow in culture. *Journal of Neuroscience Methods*, 36(2–3), 195–202. doi: 10.1016/0165-0270(91)90045-2
- Maggs, A., and 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*, 10(5), 1600–1614. doi: 10.1523/JNEUROSCI.10-05-01600.1990
- Maggs, A., and Scholes, J. (1986). Glial domains and nerve fiber patterns in the fish retinotectal pathway. *The Journal of Neuroscience*, 6(2), 424–438. doi: 10.1523/JNEUROSCI.06-02-00424.1986
- Marc, R. E., and Cameron, D. (2001). A molecular phenotype atlas of the zebrafish retina. *Journal of Neurocytology*, 30(7), 593–654. doi: 10.1023/a:1016516818393
- Marcus, R. C., Delaney, C. L., and Easter, S. S. (1999). Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Visual Neuroscience*, 16(3), 417–424. doi: 10.1017/S095252389916303X

- Marcus, R. C., and Easter, S. S. (1995). Expression of glial fibrillary acidic protein and its relation to tract formation in embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Comparative Neurology*, 359(3), 365–381. doi: 10.1002/cne.903590302
- Maruska, K. P., and Fernald, R. D. (2018). *Astatotilapia burtoni*: a model system for analyzing the neurobiology of behavior. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(8), 1951–1962. doi: 10.1021/acschemneuro.7b00496
- März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesl, B., Takamiya, M., ... Strähle, U. (2010). Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia*, 58(7), NA-NA. doi: 10.1002/glia.20971
- Masland, R. H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76(2), 266–280. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.002
- Mathey, E. K., Arthur, A., and Armati, P. J. (2010). CNS oligarchs: the rise of the oligodendrocyte in a neuron-centric culture. In P. Armati and E. Mathey (Eds.), *The Biology of Oligodendrocytes* (pp. 1–18). Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511782121.002
- Meade, M. E., Roginsky, J. E., and Schulz, J. R. (2019). Primary cell culture of adult zebrafish spinal neurons for electrophysiological studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 322(February), 50–57. doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.04.011
- Mercurio, S., Serra, L., and Nicolis, S. K. (2019). More than just stem cells: functional roles of the transcription factor sox2 in differentiated glia and neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4540. doi: 10.3390/ijms20184540
- Metea, M. R., and Newman, E. A. (2006). Calcium signaling in specialized glial cells. *Glia*, 54(7), 650–655. doi: 10.1002/glia.20352
- Miguel-Hidalgo, J. J., Ito, H., and Lara, J. (1991). Distribution of Calbindin-like immunoreactive structures in the optic tectum of normal and eye-enucleated cyprinid fish. *Cell and Tissue Research*, 265(3), 511–516. doi: 10.1007/BF00340874
- Moyon, S., Liang, J., and Casaccia, P. (2016). Epigenetics in NG2 glia cells. *Brain Research*, 1638, 183–198. doi: 10.1016/j.brainres.2015.06.009
- Murakami, M., Yamashita, Y., and Fujitani, H. (1998). The complete sequence of mitochondrial genome from a gynogenetic triploid “Ginbuna” (*Carassius auratus langsdorfi*). *Zoological Science*, 15(3), 335–337. doi: 10.2108/zsj.15.335

- Nagelhus, E. A., Veruki, M. L., Torp, R., Haug, F.-M., Laake, J. H., Nielsen, S., ... Ottersen, O. P. (1998). Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in müller cells and fibrous astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 18(7), 2506–2519. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-07-02506.1998
- Nakano, H., Fawcett, C. P., and McCann, S. M. (1976). Enzymatic dissociation and short-term culture of isolated rat anterior pituitary cells for studies on the control of hormone secretion. *Endocrinology*, 98(2), 278–288. doi: 10.1210/endo-98-2-278
- Newman, E., and Reichenbach, A. (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 307–312. doi: 10.1016/0166-2236(96)10040-0
- Nona, S. N., Thomlinson, A. M., Bartlett, C. A., and Scholes, J. (2000). Schwann cells in the regenerating fish optic nerve: evidence that CNS axons, not the glia, determine when myelin formation begins. *Journal of Neurocytology*, 29(4), 285–300. doi: 10.1023/a:1026575805331
- Olson, A., Picones, A., Julian, D., and Korenbrot, J. (1999). A developmental timeline in a retinal slice from rainbow trout. *Journal of Neuroscience Methods*, 93(2), 91–100. doi: 10.1016/S0165-0270(99)00111-9
- Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., ... Berninger, B. (2013). Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nature Cell Biology*, 15(6), 602–613. doi: 10.1038/ncb2736
- Ott, H., Bastmeyer, M., and Stuermer, C. A. O. (1998). Neurolin, the goldfish homolog of DM-GRASP, is involved in retinal axon pathfinding to the optic disk. *The Journal of Neuroscience*, 18(9), 3363–3372. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-09-03363.1998
- Otteson, D. C., D'Costa, A. R., and Hitchcock, P. F. (2001). Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Developmental Biology*, 232(1), 62–76. doi: 10.1006/dbio.2001.0163
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., ... Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175), 141–146. doi: 10.1038/nature06534

- Parrilla, M., León-Lobera, F., Lillo, C., Arévalo, R., Aijón, J., Lara, J. M., and 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*, 11(5), e0154703. doi: 10.1371/journal.pone.0154703
- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrión, M. J. J., Arévalo, R., Aijón, J., Lara, J. M. J. M., and Velasco, A. (2013). Pax2+ astrocytes in the fish optic nerve head after optic nerve crush. *Brain Research*, 1492, 18–32. doi: 10.1016/j.brainres.2012.11.014
- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrión, M. J., Arévalo, R., Aijón, J., Lara, J. M., and Velasco, A. (2012). Characterization of pax2 expression in the goldfish optic nerve head during retina regeneration. *PLoS ONE*, 7(2), e32348. doi: 10.1371/journal.pone.0032348
- Parrilla, M. (2010). Estudio de las interacciones axón-neuroglía en la cabeza del nervio óptico de teleósteos durante el crecimiento continuado y la regeneración. Tesis Doctoral; *Universidad de Salamanca*. doi: 10.14201/gredos.76507
- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrion, M. J., Arévalo, R., Lara, J. M., Aijón, J., and Velasco, A. (2009). Pax2 in the optic nerve of the goldfish, a model of continuous growth. *Brain Research*, 1255, 75–88. doi: 10.1016/j.brainres.2008.12.010
- Parthe, V. (1982). Horizontal cells in the teleost retina. In B. D. Drujan and M. Laufer (Eds.), *The S-potential* (Vol. 113; pp. 31–49). *Progress in Clinical and Biological Research*.
- Patel, B. B., Clark, K. L., Kozik, E. M., Dash, L., Kuhlman, J. A., and Sakaguchi, D. S. (2019). Isolation and culture of primary embryonic zebrafish neural tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 328(August), 108419. doi: 10.1016/j.jneumeth.2019.108419
- Peirano, R. I. (2000). The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Research*, 28(16), 3047–3055. doi: 10.1093/nar/28.16.3047
- Perry, S. F., Ekker, M., Farrell, A. P., and Brauner, C. J. (2010). Zebrafish. *Elsevier*. doi: 10.1016/S1546-5098(10)02913-4
- Perry, V. H., and Lund, R. D. (1990). Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons. *Journal of Neurocytology*, 19(2), 265–272. doi: 10.1007/BF01217304

- Peters, A., Palay, S. L., and Webster, H. de F. (1991). The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells. *Oxford University Press*.
- Petralia, R. S., Wang, Y.-X., Mattson, M. P., and Yao, P. J. (2018). Invaginating structures in mammalian synapses. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10(APR), 1–8. doi: 10.3389/fnsyn.2018.00004
- Pevny, L., and Placzek, M. (2005). Sox genes and neural progenitor identity. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(1), 7–13. doi: 10.1016/j.conb.2005.01.016
- Power, D. M., Elias, N. P., Richardson, S. J., Mendes, J., Soares, C. M., and Santos, C. R. A. (2000). Evolution of the thyroid hormone-binding protein, Transthyretin. *General and Comparative Endocrinology*, 119(3), 241–255. doi: 10.1006/gcen.2000.7520
- Pushchina, E., and Varaksin, A. (2018). Neurolin expression in the optic nerve and immunoreactivity of pax6-positive niches in the brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after unilateral eye injury. *Neural Regeneration Research*, 14(1), 156. doi: 10.4103/1673-5374.243721
- Rabah, S. A., Gowan, I. L., Pagnin, M., Osman, N., and Richardson, S. J. (2019). Thyroid hormone distributor proteins during development in vertebrates. *Frontiers in Endocrinology*, 10(August), 1–8. doi: 10.3389/fendo.2019.00506
- Ramón y Cajal, S. (1893). La retina des vertébrés. *Cellule*, (9), 17–255.
- Rasmussen, J. P., and Sagasti, A. (2017). Learning to swim, again: axon regeneration in fish. *Experimental Neurology*, 287, 318–330. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.02.022
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L., and Perkowski, J. J. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Developmental Biology*, 6, 36. doi: 10.1186/1471-213X-6-36
- Reh, T. A., and Pittack, C. (1995). Transdifferentiation and retinal regeneration. *Seminars in Cell Biology*, 6(3), 137–142. doi: 10.1006/scel.1995.0019
- Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2013). New functions of Müller cells. *Glia*, 61(5), 651–678. doi: 10.1002/glia.22477
- Reichenbach, A., Derouiche, A., and Kirchhoff, F. (2010). Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 11–25. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.02.003

- Reinhardt, R., Centanin, L., Tavhelidse, T., Inoue, D., Wittbrodt, B., Concordet, J.-P., ... Wittbrodt, J. (2015). Sox2, Tlx, Gli3, and Her9 converge on Rx2 to define retinal stem cells *in vivo*. *The EMBO Journal*, 34(11), 1572–1588. doi: 10.15252/embj.201490706
- Rogers, J. H. (1987). Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *The Journal of Cell Biology*, 105(3), 1343–1353. doi: 10.1083/jcb.105.3.1343
- Rosenberg, S. S., Kelland, E. E., Tokar, E., De La Torre, A. R., and Chan, J. R. (2008). The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14662–14667. doi: 10.1073/pnas.0805640105
- Sánchez-Farías, N., and Candal, E. (2015). Doublecortin is widely expressed in the developing and adult retina of sharks. *Experimental Eye Research*, 134, 90–100. doi: 10.1016/j.exer.2015.04.002
- Sánchez-Gómez, M. V., Paz Serrano, M., Alberdi, E., Pérez-Cerdá, F., and Matute, C. (2018). Isolation, expansion, and maturation of oligodendrocyte lineage cells obtained from rat neonatal brain and optic nerve. In *Zebrafish* (Vol. 15, pp. 95–113). doi: 10.1007/978-1-4939-7862-5_8
- Sanes, J. R., and Masland, R. H. (2015). The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annual Review of Neuroscience*, 38(1), 221–246. doi: 10.1146/annurev-neuro-071714-034120
- Sarkar, A., and Hochedlinger, K. (2013). The Sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*, 12(1), 15–30. doi: 10.1016/j.stem.2012.12.007
- Schaefer, T., and Lengerke, C. (2020). SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene*, 39(2), 278–292. doi: 10.1038/s41388-019-0997-x
- Schafer, D. P., and Stevens, B. (2015). Microglia function in CNS development and plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(10), a020545. doi: 10.1101/cshperspect.a020545
- Scholes, J. (1991). The design of the optic nerve in fish. *Visual Neuroscience*, 7(1–2), 129–139. doi: 10.1017/S0952523800011007

- Senut, M. C., Gulati-Leekha, A., and Goldman, D. (2004). An element in the 1-Tubulin promoter is necessary for retinal expression during optic nerve regeneration but not after eye injury in the adult zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 24(35), 7663–7673. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2281-04.2004
- Seri, B., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Neural stem cells and the regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. *Clinical Neuroscience Research*, 2(1–2), 11–16. doi: 10.1016/S1566-2772(02)00004-X
- She, Z.-Y., and Yang, W.-X. (2015). Sox family transcription factors involved in diverse cellular events during development. *European Journal of Cell Biology*, 94(12), 547–563. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.08.002
- Shin, J., Park, H., Topczewska, J. M., Mawdsley, D. J., and Appel, B. (2003). Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics. *Methods in Cell Science*, 25(1/2), 7–14. doi: 10.1023/B:MICS.0000006847.09037.3a
- Sîrbulescu, R. F., Ilieș, I., Vitalo, A. G., Trull, K., Zhu, J., Traniello, I. M., and Zupanc, G. K. H. (2015). Adult stem cells in the knifefish cerebellum. *Developmental Neurobiology*, 75(1), 39–65. doi: 10.1002/dneu.22210
- Song, H., Wang, D., De Jesus Perez, F., Xie, R., Liu, Z., Chen, C.-C., ... Zhao, S. (2017). Rhythmic expressed clock regulates the transcription of proliferating cellular nuclear antigen in teleost retina. *Experimental Eye Research*, 160, 21–30. doi: 10.1016/j.exer.2017.04.004
- Souza, D. G., Bellaver, B., Terra, S. R., Guma, F. C. R., Souza, D. O., and Quincozes-Santos, A. (2017). *In vitro* adult astrocytes are derived from mature cells and reproduce *in vivo* redox profile. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(10), 3111–3118. doi: 10.1002/jcb.26028
- Stell, W. K., Kretz, R., and Lightfoot, D. O. (1982). Horizontal cell connectivity in goldfish. In B. D. Drujan and M. Laufer (Eds.), *The S-potential* (pp. 51–75). *Progress in Clinical and Biological Research*.
- Stuermer, C. A. O. O., Bastmeyer, M., Bähr, M., Strobel, G., and Paschke, K. (1992). Trying to understand axonal regeneration in the CNS of fish. *Journal of Neurobiology*, 23(5), 537–550. doi: 10.1002/neu.480230508
- Stuermer, C. (1988). Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo. *The Journal of Neuroscience*, 8(12), 4513–4530. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-12-04513.1988

- Surzenko, N., Crowl, T., Bachleda, A., Langer, L., and Pevny, L. (2013). Sox2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Müller glia. *Development*, 140(7), 1445–1456. doi: 10.1242/dev.071878
- Taberero, A., Medina, J. M., and Giaume, C. (2006). Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *Journal of Neurochemistry*, 99(4), 1049–1061. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04088.x
- Takada, N., Kucenas, S., and Appel, B. (2010). Sox10 is necessary for oligodendrocyte survival following axon wrapping. *Glia*. doi: 10.1002/glia.20981
- Tao, C., and Zhang, X. (2014). Development of astrocytes in the vertebrate eye. *Developmental Dynamics*, 243(12), 1501–1510. doi: 10.1002/dvdy.24190
- Tapanes-Castillo, A., Shabazz, F. S., Mboge, M. Y., Vajn, K., Oudega, M., and Plunkett, J. A. (2014). Characterization of a novel primary culture system of adult zebrafish brainstem cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 223, 11–19. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.11.022
- Taranova, O. V. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes and Development*, 20(9), 1187–1202. doi: 10.1101/gad.1407906
- Tarboush, R., Chapman, G. B., and Connaughton, V. P. (2012). Ultrastructure of the distal retina of the adult zebrafish, *Danio rerio*. *Tissue and Cell*, 44(4), 264–279. doi: 10.1016/j.tice.2012.04.004
- Theis, A., Salzburger, W., and Egger, B. (2012). The function of anal fin egg-spots in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *PLoS ONE*, 7(1), e29878. doi: 10.1371/journal.pone.0029878
- Thomas, J. L., Ranski, A. H., Morgan, G. W., and Thummel, R. (2016). Reactive gliosis in the adult zebrafish retina. *Experimental Eye Research*, 143, 98–109. doi: 10.1016/j.exer.2015.09.017
- Treichel, A. J., and Hines, J. H. (2018). Development of an embryonic zebrafish oligodendrocyte–neuron mixed coculture system. *Zebrafish*, 15(6), 586–596. doi: 10.1089/zeb.2018.1625
- Trotter, J., Karram, K., and Nishiyama, A. (2010). NG2 cells: properties, progeny, and origin. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 72–82. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.006

- Tsai, H.-H., and Miller, R. H. (2002). Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends in Neurosciences*, 25(4), 173–175. doi: 10.1016/S0166-2236(00)02096-8
- Uchikawa, M., Kamachi, Y., and Kondoh, H. (1999). Two distinct subgroups of group b sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mechanisms of Development*, 84(1–2), 103–120. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00083-0
- Udvadia, A. J., Köster, R. W., and Skene, J. H. P. (2001). GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration. *Development*, 128(7), 1175–1182. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245583>
- van Schaijik, B., Davis, P. F., Wickremesekera, A. C., Tan, S. T., and Itinteang, T. (2018). Subcellular localization of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: A review. *Journal of Clinical Pathology*, 71(1), 88–91. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204815
- Velasco, A., Cid, E., Ciudad, J., Orfao, A., Aijon, J., and Lara, J. M. (2001). Temperature induces variations in the retinal cell proliferation rate in a cyprinid. *Brain Research*, 913(2), 190–194. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02804-9
- Velasco, A., Bragado, M. J., Jimeno, D., Caminos, E., Lillo, C., Aijón, J., and Lara, J. M. (2000). Growing and regenerating axons in the visual system of teleosts are recognized with the antibody RT97. *Brain Research*, 883(1), 98–106. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02783-9
- Velasco, A., Jimeno, D., Lillo, C., Caminos, E., Lara, J. M., and Aijón, J. (1999). Enzyme histochemical identification of microglial cells in the retina of a fish (*Tinca tinca*). *Neuroscience Letters*, 263(2–3), 101–104. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00117-2
- Velasco, A., Briñón, J. G., Caminos, E., Lara, J. M., and Aijón, J. (1997). S-100 positive glial cells are involved in the regeneration of the visual pathway of teleosts. *Brain Research Bulletin*, 43(3), 327–336. doi: 10.1016/S0361-9230(97)00014-2
- Verkhratsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016
- Verma, A. S., and FitzPatrick, D. R. (2007). Anophthalmia and microphthalmia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2(1), 47. doi: 10.1186/1750-1172-2-47

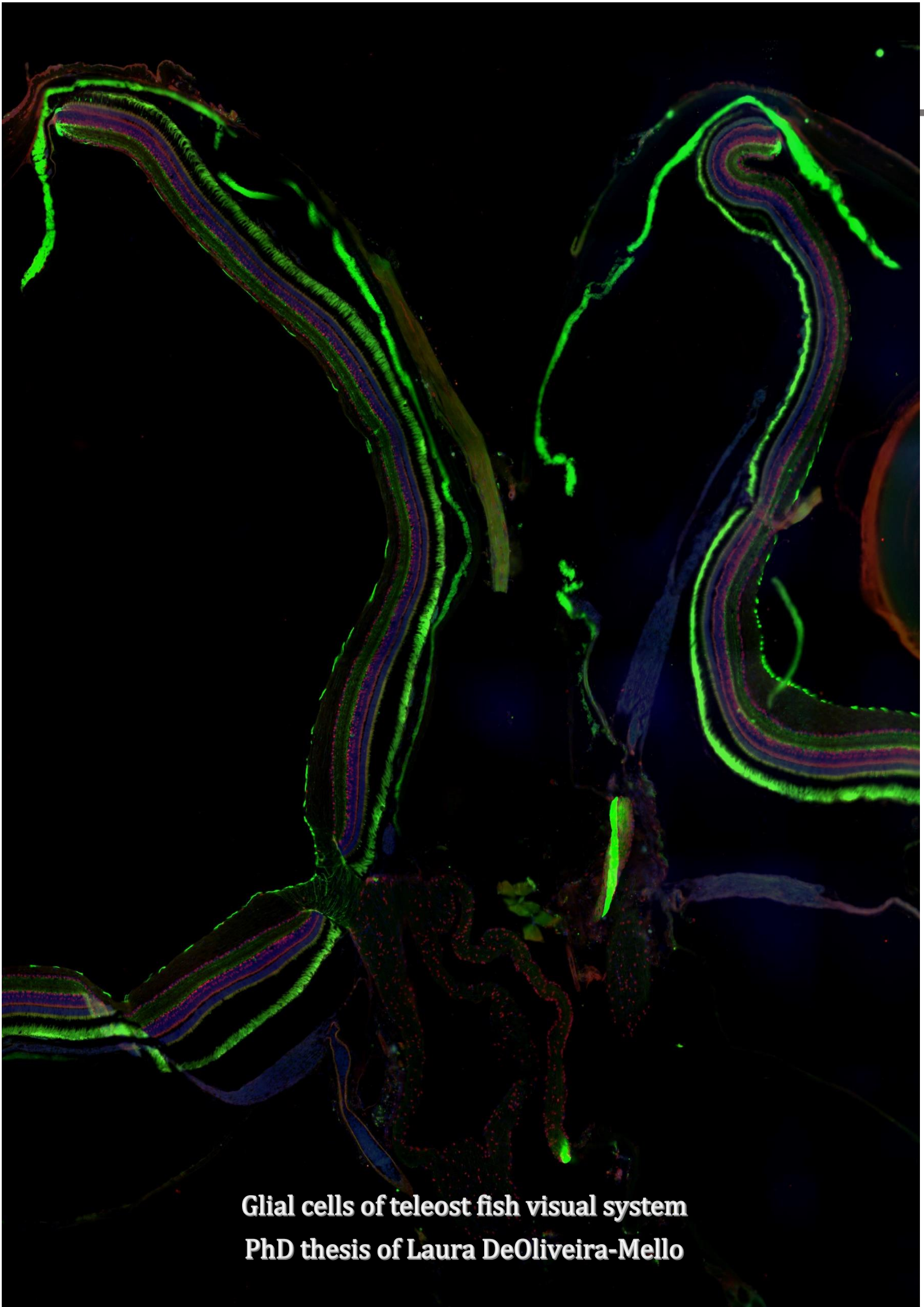
- Virchow, R. (1858). Die Cellularpathologie in ihrer begründung auf physiologische and pathologische gewebelehre. *Verlag von August Hirschfeld*.
- Voinescu, P. E., Kay, J. N., and Sanes, J. R. (2009). Birthdays of retinal amacrine cell subtypes are systematically related to their molecular identity and soma position. *The Journal of Comparative Neurology*, 517(5), 737–750. doi: 10.1002/cne.22200
- von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell and Tissue Research*, 345(1), 1–19. doi: 10.1007/s00441-011-1196-4
- Wang, J., Panáková, D., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Gemberling, M., Burris, J. S., ... Poss, K. D. (2011). The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development*, 138(16), 3421–3430. doi: 10.1242/dev.068601
- Wanner, M., Lang, D., Bandtlow, C., Schwab, M., Bastmeyer, M., and Stuermer, C. (1995). Reevaluation of the growth-permissive substrate properties of goldfish optic nerve myelin and myelin proteins. *The Journal of Neuroscience*, 15(11), 7500–7508. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-11-07500.1995
- Wässle, H., Grünert, U., and Röhrenbeck, J. (1993). Immunocytochemical staining of all-amacrine cells in the rat retina with antibodies against parvalbumin. *The Journal of Comparative Neurology*, 332(4), 407–420. doi: 10.1002/cne.903320403
- Wässle, H., and Boycott, B. B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews*, 71(2), 447–480. doi: 10.1152/physrev.1991.71.2.447
- Wegner, M., and Stolt, C. C. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends in Neurosciences*, 28(11), 583–588. doi: 10.1016/j.tins.2005.08.008
- Wei, C.-L., Nicolis, S. K., Zhu, Y., and Pagin, M. (2019). Sox2-dependent 3D chromatin interactomes in transcription, neural stem cell proliferation and neurodevelopmental diseases. *Journal of Experimental Neuroscience*, 13, 117906951986822. doi: 10.1177/1179069519868224
- Weinreb, R. N., Aung, T., and Medeiros, F. A. (2014). The pathophysiology and treatment of glaucoma. *JAMA*, 311(18), 1901. doi: 10.1001/jama.2014.3192
- Wen, C. M., Chen, M. M., Nan, F. H., and Wang, C. S. (2016). Immunocytochemical characterisation of neural stem-progenitor cells from green terror cichlid

Aequidens rivulatus. *Journal of Fish Biology*, 90(1), 201–221. doi: 10.1111/jfb.13170

- Weruaga, E., Velasco, A., Briñón, J., Arévalo, R., Aijón, J., and Alonso, J. (2000). Distribution of the calcium-binding proteins Parvalbumin, Calbindin d-28k and Calretinin in the retina of two teleosts. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 19(1), 1–15. doi: 10.1016/S0891-0618(00)00046-6
- Westerfield, M. (1995). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish. Eugene (Ed.) *University of Oregon Press*.
- Whitney, I. E., Keeley, P. W., St. John, A. J., Kautzman, A. G., Kay, J. N., and Reese, B. E. (2014). Sox2 regulates cholinergic amacrine cell positioning and dendritic stratification in the retina. *Journal of Neuroscience*, 34(30), 10109–10121. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0415-14.2014
- Williamson, K. A., and FitzPatrick, D. R. (2014). The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma. *European Journal of Medical Genetics*, 57(8), 369–380. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.05.002
- Wixon, J. (2000). *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast*, 1(3), 225–231. doi: 10.1002/1097-0061(20000930)17:3<225::AID-YEA34>3.0.CO;2-5
- Xiang, M., Zhou, H., and Nathans, J. (1996). Molecular biology of retinal ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(2), 596–601. doi: 10.1073/pnas.93.2.596
- Yan, W., Laboulaye, M. A., Tran, N. M., Whitney, I. E., Benhar, I., and Sanes, J. R. (2020). Molecular identification of sixty-three amacrine cell types completes a mouse retinal cell atlas. *BioRxiv*, 2020.03.10.985770. doi: 10.1101/2020.03.10.985770
- Yang, P., and Hernández, M. R. (2003). Purification of astrocytes from adult human optic nerve heads by immunopanning. *Brain Research Protocols*, 12(2), 67–76. doi: 10.1016/S1385-299X(03)00073-4
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. doi: 10.1126/science.1151526
- Zalc, B., and Rosier, F. (2018). Myelin. *Oxford University Press*.
- Zelinka, C. P., Scott, M. A., Volkov, L., and Fischer, A. J. (2012). The reactivity, distribution and abundance of non-astrocytic inner retinal glial (NIRG) cells are

regulated by microglia, acute damage, and IGF1. *PLoS ONE*, 7(9), e44477. doi: 10.1371/journal.pone.0044477

- Zhang, S., Zhu, X., Gui, X., Croteau, C., Song, L., Xu, J., ... Guo, F. (2018). Sox2 is essential for oligodendroglial proliferation and differentiation during postnatal brain myelination and CNS remyelination. *The Journal of Neuroscience*, 38(7), 1802–1820. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1291-17.2018
- Zheng, W., Li, Q., Zhao, C., Da, Y., Zhang, H.-L., and Chen, Z. (2018). Differentiation of glial cells from hiPSCs: potential applications in neurological diseases and cell replacement therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(August). doi: 10.3389/fncel.2018.00239
- Zhou, J., Benito-Martin, A., Mighty, J., Chang, L., Ghoroghi, S., Wu, H., ... Redenti, S. (2018). Retinal progenitor cells release extracellular vesicles containing developmental transcription factors, microRNA and membrane proteins. *Scientific Reports*, 8(1), 2823. doi: 10.1038/s41598-018-20421-1
- Zupanc, G. K., and Zupanc, M. M. (2006). New neurons for the injured brain: mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish. *Regenerative Medicine*, 1(2), 207–216. doi: 10.2217/17460751.1.2.207
- Zurn, A. D., and Bandtlow, C. E. (2006). Regeneration Failure in the CNS. In *Brain Repair* (pp. 54–76). Springer. doi: 10.1007/0-387-30128-3_4



Glial cells of teleost fish visual system
PhD thesis of Laura DeOliveira-Mello