

Tesis Doctoral

Las señales purinérgicas como reguladores de la proliferación y muerte celular durante la regeneración de la retina de pez cebra

Battista, Ariadna Gabriela

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Battista, Ariadna Gabriela. (2011). Las señales purinérgicas como reguladores de la proliferación y muerte celular durante la regeneración de la retina de pez cebra. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Battista, Ariadna Gabriela. "Las señales purinérgicas como reguladores de la proliferación y muerte celular durante la regeneración de la retina de pez cebra". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Las señales purinérgicas como reguladores de la
proliferación y muerte celular durante la regeneración de
la retina de pez cebra”**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas**

Licenciada Ariadna Gabriela Battista

Directora de tesis: Dra. María Paula Faillace

Consejero de estudios: Dr. Daniel Tomsic

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Retina de Vertebrado.
Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires**

Buenos Aires, 2011

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que, de una u otra forma, me ayudaron en la realización de esta tesis de doctorado:

- A Paula Faillace, mi directora de tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar mi doctorado, por su presencia, su constante interés y preocupación por mis experimentos, y por transmitirme todo su conocimiento.
- A Jimena Ricatti, por haber compartido conmigo esta etapa de mi vida, por los días, tardes y noches de experimentos, y por tantos otros momentos que nunca voy a olvidar, y que permitieron forjar esta amistad que hoy tenemos y que espero dure muchos años más.
- A Marien, Diego, Verónica, Ximena, Lionel, Mariano, Guille, Carlos, Vicky, Diego, Rudy, Vicky, Pablo, Rosalía y Marta por enseñarme día a día en los almuerzos, seminarios, charlas, y por su gran ayuda tanto experimental como emocional en la realización de esta tesis.
- A María Zorrilla y Berenice, por su gran ayuda con los experimentos de PCR.
- A Damián, a mi mamá Beatriz, mis hermanos Emiliano y Diego, y mi tía María Inés, por su apoyo, por estar siempre conmigo, y porque a ellos les debo todo lo que soy.

INDICE

Abreviaturas	8
Resumen	11
Introducción	19
1. El pez cebra	21
2. El ojo de los peces teleósteos	22
3. La retina de los peces teleósteos	23
4. Neurogénesis en el sistema nervioso de los vertebrados	26
4.1. Neurogénesis en el sistema nervioso adulto de los mamíferos	26
4.2. Neurogénesis en la retina adulta de los peces teleósteos	27
5. Estructuras homólogas a la CMZ de pez y anfibio en otros vertebrados	32
6. Regeneración de la retina adulta de pez cebra en respuesta a un daño	34
6.1. Tipos de daño	36
7. Señales que controlan la proliferación y diferenciación celular en la retina de vertebrado	38
7.1. Factores Intracelulares	39
7.2. Factores extracelulares	41
8. Los nucleótidos y nucleósidos como señales extracelulares	42
8.1. Receptores Purinérgicos	45
8.1.1. Receptores P2	45
8.1.1.1. Receptores P2X	45
8.1.1.2. Receptores P2Y	47
8.1.2. Receptores P1 o A	48
9. Metabolismo extracelular de los nucleótidos	49
10. Rol fisiológico de los nucleótidos extracelulares en el sistema nervioso de los vertebrados	53
11. Los nucleótidos en la retina de vertebrado	54
Hipótesis y objetivos	57
1. Hipótesis	58
2. Objetivos	59
2.1. Objetivo general	59
2.2. Objetivos específicos	60
Materiales y Métodos	62
1. Materiales	63
2. Animales en el laboratorio	68

2.1. Mantenimiento	68
3. Inyecciones intraoculares	68
3.1. Anestesia e inyección de los animales	68
3.2. Compuestos inyectados: ouabaína, enzimas que hidrolizan nucleótidos, agonistas y antagonistas de receptores purinérgicos y un marcador de proliferación celular	69
3.3. Protocolo de lesión con ouabaína	70
3.4. Exposición de los peces cebra a BrdU para determinar proliferación celular	71
3.4.1. Tiempo de exposición a BrdU	71
4. Grupos experimentales	72
5. Preparación de retinas para inmunohistoquímica, TUNEL y tinciones histológicas	75
5.1. Fijación de " <i>eyecups</i> " y armado de tacos para cortes con crióstato	76
6. Gelatinización de portaobjetos	76
7. Corte de las retinas en el crióstato	77
8. Tinciones histológicas de Nissl	78
9. Inmunohistoquímica de fluorescencia	78
9.1.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia simple	78
9.1.2. Inmunohistoquímica de fluorescencia doble	80
9.2. Anticuerpos	81
9.2.1. Anticuerpos primarios utilizados	81
9.2.2. Anticuerpos secundarios utilizados	81
10. Cuantificación de núcleos que incorporaron BrdU y análisis estadístico	82
11. Determinación de muerte celular	83
12. Cuantificación de núcleos marcados con TUNEL y análisis estadístico	83
13. Microscopía y análisis de las imágenes	84
14. Western Blot	84
14.1. Preparación de retinas	84
14.2. Procedimiento	85
14.3. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	86
15. Actividad de las enzimas apirasa y hexoquinasa	86
16. Transcripción reversa (RT), PCR estándar y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	89

16.1. Diseño y selección de <i>primers</i>	89
16.2. Procedimiento	91
16.2.1. Obtención de retinas	91
16.2.2. Lisis del tejido, purificación y extracción del ARN	92
16.2.3. Transcripción reversa (RT)	92
16.2.4. PCR estándar y qPCR	92
16.2.5. Análisis de los datos de RT-qPCR	94
17. Recetas de las soluciones	98
Resultados	101
Lesión parcial de la retina	102
1. Análisis histológico de la retina de pez cebra dañada parcialmente con ouabaína	102
2. Efecto de la lesión parcial con ouabaína sobre la proliferación celular	104
3. Efecto del tratamiento con enzimas que hidrolizan nucleótidos extracelulares sobre la proliferación celular inducida por la lesión	105
4. Actividad enzimática de la apirasa y la hexoquinasa dentro del vítreo	109
5. Efecto del tratamiento con agonistas de receptores purinérgicos sobre la proliferación celular de células progenitoras retinianas	112
6. Tratamiento con un agonista y un antagonista de receptores purinérgicos en retinas no lesionadas sobre la proliferación celular	115
7. Tratamiento de retinas lesionadas con antagonistas de receptores purinérgicos	118
8. Regulación de la muerte celular inducida por la lesión con ouabaína	121
9. Efecto del tratamiento con apirasa, hexoquinasa y MRS2179 en la reparación del tejido retiniano	125
10. Efecto de la lesión con ouabaína sobre la expresión de la NTPDasa2	129
Lesión global de la retina	132
11. Análisis histológico de la retina de pez cebra luego de un daño global con ouabaína	132
12. Efecto de la lesión global con ouabaína sobre la proliferación celular	134
13. Efecto de los nucleótidos extracelulares sobre la proliferación celular inducida por la lesión	137
14. Tratamiento con antagonistas de receptores purinérgicos sobre la proliferación celular en retinas globalmente lesionadas	139

15. Receptores purinérgicos que se expresan en la retina de pez cebra	141
16. Enzimas NTPDasas expresadas en la retina de pez cebra	142
17. Cambios en el nivel de expresión de los ARNm de los receptores purinérgicos y las NTPDasas luego de la lesión	143
18. Cambios en el patrón de expresión proteica del receptor P2Y ₁ durante las etapas de degeneración y regeneración de la retina	152
19. Localización del receptor P2Y ₁ en la retina de pez cebra	156
Discusión	166
1. La regeneración retiniana ocurre independientemente del grado de lesión	167
2. Los nucleótidos extracelulares endógenos mediarían la activación mitótica inducida por la lesión	170
3. El ADPβS incrementa la proliferación celular en retinas no lesionadas a través de la activación de los receptores P2Y ₁	174
4. El ADP media la proliferación celular inducida por la lesión a través de su unión a los receptores P2Y ₁	177
5. La muerte celular inducida por una lesión parcial citotóxica se prolonga durante toda la etapa proliferativa y ocurre sólo en la INL y la GCL	180
6. Los nucleótidos extracelulares moderan la muerte celular inducida por el daño citotóxico	182
7. El tratamiento con apirasa o MRS2179 interfiere con la reparación del tejido	185
8. Activación de la expresión del receptor P2Y ₁ inducida por la lesión retiniana	186
9. Cambios en el patrón de expresión proteica del receptor P2Y ₁ durante las etapas de degeneración y regeneración retiniana	189
9.1. Detección de la expresión proteica del receptor P2Y ₁ en la retina de pez cebra	189
9.2. Efectos de la lesión sobre la expresión proteica del receptor P2Y ₁	192
10. Aumento en los niveles de expresión proteica del receptor P2Y ₁ luego de la lesión retiniana	192
11. Importancia de las NTPDasas en la regulación de la proliferación celular	196
Conclusiones	200
Bibliografía	204

ABREVIATURAS

2D	Bidimensional	INL	Capa nuclear interna
8-SPT	8-sulfofenil teofilina, antagonista competitivo de los receptores P1 de adenosina	IPL	Capa plexiforme interna
ADN	Ácido desoxirribonucleico	kDa	Kilo Daltons
ADNasa	Enzima que degrada ADN	min	minutos
ADNc	ADN copia	MMLV	Enzima retrotranscriptasa del virus de la leucemia de murino Moloney
ADP	Adenosina difosfato	mN2-36	Anticuerpo policlonal contra la NTPDasa2
ADPβS	Agonista con alta afinidad de los receptores P2Y ₁	MRS2179	Antagonista competitivo del receptor P2Y ₁
AMP	Adenosina monofosfato	MRS2211	Antagonista competitivo del receptor activable por ADP vía P2Y ₁₃
AP	Ecto-fosfatasas alcalinas	MS222	Anestésico utilizado para peces y anfibios
ARL67156	Análogo estructural del ATP	NA	Apertura numérica
ARN	Ácido ribonucleico	NF 110	Antagonista de receptores P2X ₃ de alta afinidad
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	NF 157	Potente antagonista de los receptores P2Y ₁₁
ARNasa	Enzima que degrada ARN	NO-RT	Muestra control negativo del ensayo de retrotranscripción
ATP	Adenosina trifosfato	NT/NS	Nucleótidos/Nucleósidos
ATP_γS	Análogo sintético del ATP	NTPDasas	Enzimas miembros de la familia de las E-NTPDasas con dos dominios extracelulares con actividad ATPasa
ATPasas	Enzimas que hidrolizan ATP	OD₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
BC	Células bipolares	OD₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
bHLH	Factor de transcripción <i>basic helix-loop-helix</i>	OLM	Membrana limitante externa
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina	ONL	Capa nuclear externa
BSA	Albúmina de suero bovino	OPL	Capa plexiforme externa
Cal S	Muestra calibradora	P1	Familia de receptores purinérgicos de alta afinidad por la adenosina
CE	Stem cells	P2	Familia de receptores purinérgicos que poseen como ligandos a los nucleósidos di- y trifosfato
CH	Células horizontales	P2X	Receptores purinérgicos ionotrópicos
CMZ	Zona ciliar marginal	P2Y	Receptores purinérgicos metabotrópicos
CNTF	Factor neurotrófico ciliar	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
C_T	Ciclo umbral	Pax6	Gen homeótico maestro para la neurogénesis retiniana
DIC	Filtros ópticos Nomarski	PBS	Buffer fosfato salino
dNTPs	Desoxirribonucleótidos	PBST	PBS-Tween
dpi	Días posteriores a la lesión con ouabaína		
E-NPKasas	Ecto-nucleósido-difosfato-quinasas		
E-NPPasas	Ecto-nucleótido pirofosfatasas		
E-NTPDasas	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas		
FL	Capa de fibras del nervio óptico		
GC	Células ganglionares		
GCL	Capa de células ganglionares		
GS	Glutamina sintetasa		
HCl	Ácido clorhídrico		
HRP	Peroxidasa de rábano picante		
ILM	Membrana limitante interna		

PCM	Margen ciliar pigmentado	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de sodio lauril sulfato
PCR	Reacción de ADN polimerasa en cadena estándar	SNC	Suero normal de cabra
PFA	Paraformaldehído	SOI	Muestra de interés
PINC	Células precursoras proliferativas normalmente presentes en las capas nuclear interna	SV2	Proteína de vesículas presinápticas de las capas plexiformes retinianas
PL/PR	Capa de fotorreceptores	TBE	Buffer tris borato EDTA
PLC/IP₃	Fosfolipasa C/Inositol fosfato	TBST	TBS-Tween
PM	Peso molecular	TdT	transferasa de desoxinucleotidilo terminal
PPADS	Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',40'-disulfonato	TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real	UDP	Uridina difosfato
RPE	Epitelio pigmentario de la retina	UMP	Uridina monofosfato
RT	Transcripción reversa	UTP	Uridina trifosfato
RT-PCR	Transcripción reversa seguida de la reacción de ADN polimerasa en cadena estándar	UV	Ultra violeta
RT-qPCR	RT-PCR cuantitativa en tiempo real	Vi	Velocidad inicial de actividad enzimática
SDS	Sodio lauril sulfato	WB	Western blot

RESUMEN

Las señales purinérgicas como reguladores de la proliferación y muerte celular durante la regeneración de la retina de pez cebra

La retina de los peces óseos, a diferencia de la retina de los mamíferos, posee células progenitoras multipotentes que proliferan a lo largo de toda la vida del animal, originando todos los tipos celulares retinianos, que se agregan al tejido diferenciado a medida que éste crece. Este crecimiento ocurre en una región histológicamente distinguible, ubicada entre la retina neural y el epitelio ciliar, denominada zona ciliar marginal (CMZ), cuyas células poseen capacidad proliferativa. Esta zona representa un anillo de tejido, alrededor de la retina madura, donde existe un gradiente de diferenciación celular, que comprende tanto *stem cells* (más periféricas) como células progenitoras ya comprometidas con determinados fenotipos retinianos (más centrales). Una característica sorprendente de la retina adulta de pez es que posee la capacidad de regenerarse completamente en respuesta al daño. Por consiguiente, la retina de este vertebrado ofrece características únicas para el estudio de los factores extracelulares e intracelulares que dirigen la proliferación celular y que llevan a la regeneración del tejido adulto.

Tanto algunas neuronas como células gliales de la retina, así como también las células del epitelio pigmentario, liberan ATP hacia el espacio extracelular, donde éste, o sus productos de hidrólisis, actúan como neurotransmisores, o neuromoduladores, a través de su unión a receptores purinérgicos específicos. La liberación de ATP puede producirse en respuesta a diversos estímulos fisiológicos, ya sea mecánicos, químicos, osmóticos o eléctricos, o en respuesta a condiciones patológicas como la hipoxia, deshidratación, neurodegeneración o frente a una lesión.

Los nucleótidos extracelulares, además de interactuar de manera autócrina o parácrina con receptores purinérgicos de membrana, son hidrolizados por ectonucleotidasas presentes en

la membrana plasmática. Entre estas enzimas, una familia importante se denomina ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa). La actividad de estas enzimas no sólo garantiza la finalización del estímulo inducido por los nucleótidos extracelulares, sino que además posibilita la conversión de unos nucleótidos en otros, por ejemplo, ATP a ADP, éste a AMP y luego a adenosina, o UTP a UDP. Estos productos de hidrólisis, a su vez, presentan diferente afinidad por distintos receptores, provocando diversas respuestas intracelulares. El conjunto de nucleótidos y nucleósidos extracelulares, receptores y NTPDasas se conoce como sistema de señalización purinérgica.

En esta tesis doctoral, se realizó una caracterización detallada del posible rol regulatorio de las señales purinérgicas sobre la capacidad proliferativa y regenerativa de la retina adulta de pez cebra en respuesta al daño. Se utilizaron dos modelos de daño de tipo citotóxico, uno que provoca una lesión parcial del tejido, generando muerte celular solamente en las capas internas de la retina (interneuronas y células ganglionares), y otro que causa una lesión global, que involucra a todos los tipos celulares retinianos, incluyendo a los fotorreceptores.

En primer lugar, se describió que una lesión citotóxica con ouabaína, ya sea parcial o global, indujo la activación mitótica de las células proliferativas presentes tanto en el tejido maduro diferenciado como en la CMZ, alcanzándose un pico de máxima proliferación a los 7 días luego de la lesión.

Además, se evidenció un importante rol de los nucleótidos extracelulares en la regulación de esta activación mitótica luego de la inducción de ambos tipos de lesión, ya que el tratamiento con un exceso de enzimas que hidrolizan nucleótidos extracelulares disminuyó significativamente el máximo aumento de proliferación celular. Asimismo, el tratamiento con MRS2179 (un antagonista de los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y₁ con alta afinidad por el ADP) disminuyó significativamente el pico de proliferación celular inducido por la lesión (tanto parcial como global) de la retina.

Es interesante destacar que retinas no lesionadas y tratadas con un análogo poco hidrolizable del ADP presentaron un aumento significativo de la actividad proliferativa tanto en las capas de tejido maduro como en la CMZ. Estos resultados indicaron que el ADP es una señal suficiente para inducir activación mitótica de los precursores retinianos aún en ausencia de daño. El efecto del ADP en el tejido intacto fue también inhibido completamente por un antagonista del receptor P2Y₁.

Se observó también que los nucleótidos extracelulares son fundamentales para la reparación del tejido, ya que retinas lesionadas y posteriormente tratadas con apirasa o MRS2179 mostraron un mayor grado de desorganización tisular y desaparición nuclear en todas las capas retinianas, en comparación con retinas lesionadas. El grado de regeneración de las retinas dañadas y sometidas posteriormente a los tratamientos mencionados exhibió un retardo con respecto al tejido lesionado y en regeneración en presencia de señalización purinérgica endógena.

Asimismo, se observó que el tratamiento de retinas lesionadas con ARL67156, un inhibidor selectivo de las ecto-ATPasas, disminuyó significativamente el incremento de proliferación celular, evidenciando la importancia de la actividad de las NTPDasas en la regulación de la proliferación celular inducida por la lesión del tejido.

Por otra parte, se evidenció un importante rol de los nucleótidos extracelulares en la regulación de la muerte celular inducida por la lesión, ya que la remoción enzimática de estos nucleótidos incrementó significativamente este proceso. Este efecto fue reproducido al bloquear los receptores P2Y₁, sugiriendo un rol neuroprotector del ADP, particularmente sobre los fotorreceptores retinianos. Estos resultados sugirieron que las señales purinérgicas son capaces de atenuar significativamente los efectos de la lesión citotóxica sobre la muerte neuronal y glial.

Posteriormente, se observó que el nivel de expresión del ARNm de las NTPDasas 1, 2mq, 2mv, y 3 aumentó significativamente luego de inducida la lesión. En concordancia, el patrón

espacial de expresión de la proteína NTPDasa2 sufrió importantes cambios luego de la inducción de la lesión.

Finalmente, se describió la expresión del receptor P2Y₁ en la retina de pez cebra. El nivel de su ARNm, así como su expresión proteica, aumentaron de manera significativa luego de inducida la lesión citotóxica con ouabaína. Se observó además, mediante la técnica de western blot, un cambio en el patrón de expresión en las etapas de degeneración y proliferación, luego de lesionar el tejido retiniano.

En conjunto, estos resultados demuestran un rol fundamental, necesario y suficiente del sistema de señalización purinérgica en el control de los mecanismos de proliferación y muerte celular que ocurren durante el proceso de regeneración de la retina adulta de pez cebra.

Palabras clave: pez cebra, retina, regeneración, proliferación celular, ATP/ADP, muerte celular, señales purinérgicas.

Purinergic signals as regulators of proliferation and cell death during regeneration of the zebrafish retina

Teleost fish retina, in contrast with mammal retina, has multipotent progenitor cells that proliferate throughout the animal life, giving rise to all cell types of mature retina, which are added to the differentiated tissue whereas it grows.

Moreover, teleost fish retina has a ciliary marginal zone (CMZ) with proliferative capacity, localized around the mature retina, where there is a gradient of cell differentiation, including stem cells, progenitor cells committed to specific retinal phenotypes, and fully differentiated neurons.

Remarkably, in teleost fish mechanical, chemical, laser or light damage of the mature retina activates regenerative mechanisms. Regeneration and growth that occur in the adult teleost retina by neurogenesis have been helpful in identifying molecular and cellular mechanisms underlying cell proliferation and differentiation.

In the retina, ATP is released from neurons and glia (and also from the retinal pigmented epithelium) to the extracellular milieu where this nucleotide, or its hydrolysis products, acts as a neurotransmitter or neuromodulator by binding to purinergic receptors.

ATP release can occur in response to physiological stimuli or to pathological conditions, including retinal damage.

Extracellular nucleotides such as ATP, ADP, and UTP are extracellularly dephosphorylated by ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) localized in the cell membrane.

The activity of these enzymes not only guarantees the completion of a specific stimulus, but allows the conversion of some agonists to other, with different specificity for different receptors.

Extracellular nucleotides and nucleosides, receptors and NTPDases are known as purinergic signaling system.

In the present work, we performed a characterization of the possible regulatory role of purinergic signals on the capacity of the zebrafish retina to regenerate in response to damage. We use two different models of cytotoxic lesion: a partial lesion, which produces damage only in the inner layers of the retina, and a global injury, which involves all retinal layers, including photoreceptors.

We described that cytotoxic lesion with ouabain, either partial or global, increases cell proliferation both in the mature retina and in the CMZ, with a maximum at 7 days post injury (dpi).

Moreover, we demonstrated an important role for extracellular nucleotides in regulating injury-induced cell proliferation, regardless the magnitude of the injury, because treatment with enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides significantly decreased the peak of cell proliferation.

In addition, treatment with MRS2179 (an ADP-activated P2Y₁ receptor selective antagonist) provoked a significant decrease in the injury-induced cell proliferative peak normally observed 7 dpi both in the CMZ and the mature retina.

Interestingly, ADPβS significantly increased cell proliferation in intact retinas both at the CMZ and mature retina. Moreover, the selective antagonist MRS2179 of the metabotropic ADP-activated receptor P2Y₁ significantly inhibited the increment in cell proliferation induced by ADPβS.

We also demonstrated that extracellular nucleotides play a crucial role in retinal repair, since retinas treated with apirase or MRS2179 after lesioning were damaged at a higher level than control ouabain-treated retinas.

Additionally, we observed that treatment with ARL67156, which has been shown to inhibit NTPDase activity, significantly reduced injury-induced cell proliferation, showing a role for the

enzymes that catalyze the extracellular hydrolysis of ATP as well as other nucleotides in controlling cell proliferative activity in lesioned retinas.

On the other hand, we described an important role for purinergic signals in regulating cell death induced by injury, since scavenging of extracellular nucleotides significantly increased cell death. This effect is partially reproduced by blocking P2Y₁ receptors suggesting a neuroprotective function for ADP.

Furthermore, lesioned retinas showed a significant increase of NTPDase1, 2mq, 2mv and 3 following injury. In accordance with this result, expression pattern of NTPDas2 changed after injury. Lesioned retinas also showed a significant increase of P2Y₁ receptor mRNA expression relative to undamaged retinas in the proliferative phase. P2Y₁ receptor protein, when assessed by western blot and immunocytochemistry, showed a lesion-induced change in its expression pattern as well as an increase and modified distribution on damaged retinal layers.

In summary, this study demonstrated a crucial role for endogenous purinergic signals regulating cell proliferation, as well as cell death, induced by a cytotoxic injury of the adult zebrafish retina, which underlays retinal repair.

Key words: zebrafish, retina, regeneration, cell proliferation, ATP/ADP, cell death, purinergic signals.

INTRODUCCION

Durante la última década, se demostró que el pez cebra no sólo posee valor como un modelo genético de desarrollo embrionario sino que resulta de gran interés como un organismo modelo para estudiar enfermedades. La identificación de una variedad de mutaciones en el pez cebra que afectan al ojo y la retina, y el consecuente clonado de los genes mutados involucrados, reveló mecanismos celulares y moleculares fundamentales para el desarrollo y la fisiología del sistema visual.

A su vez, la retina de pez cebra, el modelo experimental utilizado en esta tesis de doctorado, ofrece características ideales para el estudio de procesos de plasticidad neuronal que incluyen el crecimiento y la regeneración del tejido adulto luego de haber sufrido una lesión. Estos procesos ocurren a través de la generación de nuevos tipos celulares a partir de “*stem cells*” y requieren de la comunicación intercelular. Por consiguiente, este modelo animal ofrece la característica de poder estudiar *in vivo* los mecanismos fisiológicos involucrados en los procesos de regeneración de un tejido neural adulto.

Durante muchos años se pensó que el ATP poseía una función estrictamente intracelular. Su descubrimiento, realizado en 1929, se debe a Fiske y Subbarow en Estados Unidos y Lohmann en Alemania (Simoni y col, 2002), quienes de manera independiente lograron localizarlo en extractos de músculo esquelético. Estos autores, sin embargo, nunca imaginaron que la parte energética era solamente una de las múltiples funciones del ATP en los diferentes organismos en los que se encuentra. Con el correr de los años, se evidenciaron múltiples efectos fisiológicos de los nucleótidos en el espacio extracelular.

Los nucleótidos extracelulares resultaron ser señales fundamentales para la comunicación intercelular en el sistema nervioso, como neurotransmisores o como señales autócrinas y parácrinas, involucradas en la regulación del desarrollo embrionario de dicho sistema, en mecanismos tales como la formación de nuevas neuronas o células de la glia.

Este trabajo de tesis doctoral propuso investigar la relación entre el sistema de señalización por nucleótidos y la regeneración del tejido retiniano, utilizando como modelo al pez cebra. El objetivo fue aportar nuevas evidencias sobre el rol de los nucleótidos extracelulares, sus principales enzimas de hidrólisis y sus receptores de membrana específicos, en el control de la proliferación de células progenitoras retinianas que llevan a la reparación del tejido luego de una lesión.

El conocimiento de las señales que regulan los procesos de proliferación y diferenciación celular en la retina podría contribuir con un posible uso terapéutico de estos factores para favorecer la recuperación de tipos celulares específicos, como las células ganglionares en el glaucoma o los fotorreceptores en la retinitis pigmentosa.

1. El pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es un excelente modelo de vertebrado para estudios embriológicos y genéticos y es también la especie de teleosteo más ampliamente utilizada en la investigación biomédica.

Una de las principales ventajas de la utilización del pez cebra resulta de su rápido desarrollo, siendo altamente accesible y fácil de manipular experimentalmente. Asimismo, es un animal de fácil mantenimiento y reproducción en el laboratorio. Alcanzan la madurez sexual a los 3 ó 4 meses de vida, y una pareja reproductora puede producir hasta 4000 huevos fecundados por apareamiento. La fecundación es externa, y tanto el huevo como el embrión son transparentes, hecho que facilita la visualización *in vivo* de sus estructuras y órganos internos. Existen para esta especie numerosas herramientas experimentales, como por ejemplo la disponibilidad de anticuerpos específicos, la posibilidad de bloquear la expresión génica de manera relativamente sencilla a través del uso de morfolidos, y la disponibilidad de mutantes o la relativa facilidad con la que se los genera. Además, se conoce

completamente su genoma y se dispone de amplia información en bancos de datos genómicos y de proteínas.

El pez cebra es una especie experimental establecida, no sólo para estudios de desarrollo embrionario sino también para la caracterización de genes involucrados en diversas funciones fisiológicas así como en diferentes patologías humanas. En los últimos años, diversos laboratorios han desarrollado métodos de mutagénesis en pez cebra con el objetivo de identificar mutaciones recesivas que afectan al desarrollo embrionario (Mullins y Nusslein-Volhard, 1993; Driever y col, 1994; Solnica-Krezel y col, 1994). Esto permitió el aislamiento de miles de mutaciones que afectan a cientos de *loci* esenciales para el desarrollo del embrión en vertebrado, incluyendo los ojos y el sistema visual (Fadool y Dowling, 2008).

Además, se caracterizó al pez cebra como un modelo ideal para la identificación de drogas en el campo de la farmacología y la contaminación ambiental de los reservorios naturales de agua dulce. Es un modelo también ampliamente utilizado para estudios conductuales en el laboratorio, relacionados con el aprendizaje, la memoria, la adicción o el estrés (Ninkovic y Bally-Cuif, 2006; Rinkwitz y col, 2011).

Todas estas características evidencian su extraordinario valor como modelo para la experimentación en el laboratorio.

2. El ojo de los peces teleósteos

El ojo de los peces teleósteos (**figura 1**), entre los cuales se encuentra el pez cebra, es una estructura par, simétrica, esferoidal y ligeramente aplanada en sentido latero-medial con respecto al eje longitudinal del pez. Ambos ojos se alojan en el condrocráneo, en una órbita cartilaginosa que les brinda soporte mecánico.

El ojo de los peces teleósteos posee una organización con características muy similares a las observadas en los ojos de los mamíferos. Una de las principales diferencias con respecto al ojo humano está dada a nivel del cristalino, el cual es casi esférico en el pez cebra y

ocupa prácticamente la totalidad de la luz del globo ocular. Otra diferencia importante a nivel retiniano, esta vez con los mamíferos en general, es la persistencia de la fisura coroidea ventral o fisura embrionaria, que en los peces teleósteos representa un área de neurogénesis postnatal y adulta.

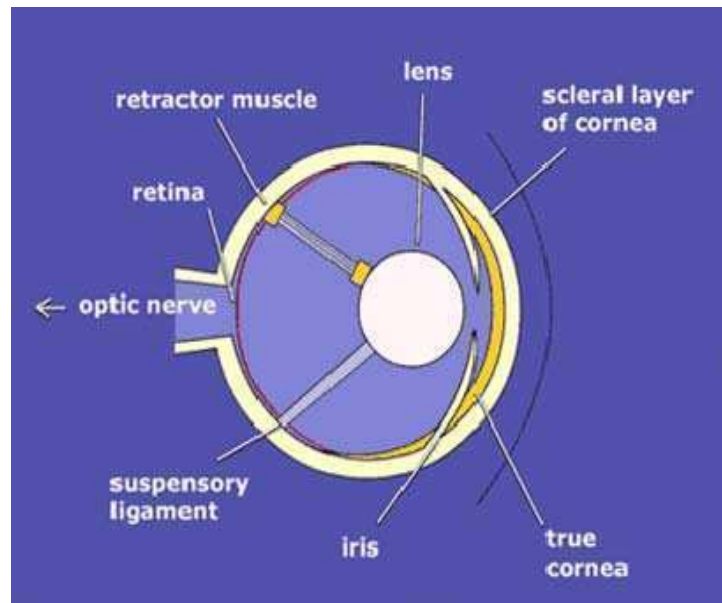


Figura 1. Esquema de la estructura del ojo de pez teleosteo. Se observan las tunicas que conforman el globo ocular, como la esclerótica (*scleral layer of cornea*), que recubre la parte anterior del ojo. Luego, la verdadera córnea (*true cornea*). El iris, en cuya parte central se localiza la pupila. El cristalino esférico (*lens*), sujeto al globo ocular por el músculo retractor (*retractor muscle*) y el ligamento suspensor (*suspensory ligament*) del cristalino. También se muestra la localización de la retina y el origen del nervio óptico (*optic nerve*).

3. La retina de los peces teleósteos

La retina es un delicado revestimiento tisular ubicado en la parte más interna del ojo y pertenece al sistema nervioso central.

Constituye una intrincada red sensorial compuesta por neuronas y células gliales. Allí ocurren las primeras etapas de procesamiento de la señal luminosa, transformándose esta señal en impulsos nerviosos que son enviados hacia centros cerebrales de procesado y

percepción visual, o centros de control reflejo del ingreso de la luz y de la mirada (Ramón y Cajal, 1892; Kolb y col, 2001; Masland, 2001, Wässle, 2004).

El tejido retiniano neural se origina embriológicamente a partir de la capa interna de la copa óptica (de origen diencefálico) y está recubierto por una porción externa pigmentada, llamada *pars pigmentada* o epitelio pigmentario, el cual se desarrolla a partir de la capa externa de dicha copa óptica.

La retina neural de los vertebrados (**figura 2**) se desarrolla siguiendo un patrón laminar estratificado. En cada uno de estos estratos, los tipos neuronales están organizados siguiendo un patrón en mosaicos. Las células se disponen en grupos ordenados en estructuras geométricas, que le confieren a cada capa retiniana la capacidad de obtener una correcta representación topográfica del campo visual (Wässle y Riemann, 1978; Cameron y Carney, 2000; Rockhill y col, 2000; Fadool y col, 2003).

La capa de fotorreceptores (PL) es la capa más externa de la retina y aloja a las células fotorreceptoras, es decir los bastones y los conos. Estas células poseen una zona apical llamada segmento externo, que limita con el epitelio pigmentario, y una región basal, o segmento interno, que corresponde a la parte del soma celular que contiene al núcleo. La zona que ocupan los núcleos de los fotorreceptores se denomina capa nuclear externa (ONL).

Por su parte basal, los fotorreceptores establecen contacto sináptico con las dendritas de las interneuronas, que incluyen a las células bipolares y horizontales. Estos contactos forman un plexo sináptico que se conoce como capa plexiforme externa (OPL).

Los somas conteniendo a los núcleos de las células horizontales y bipolares, junto con los núcleos de las células amácrinas (otra población de interneuronas) y las células gliales de Müller, conforman la capa nuclear interna (INL).

Las prolongaciones o terminales de las células bipolares y amácrinas, junto con las dendritas de las células ganglionares, establecen contactos sinápticos en diferentes estratos formando sublaminas en la capa plexiforme interna (IPL).

En la porción más interna de la retina se encuentra la capa de células ganglionares (GCL), neuronas de proyección cuyos axones conforman una capa de fibras nerviosas (FL) que, en contacto con el humor vítreo, convergen sobre la superficie retiniana en una zona conocida como disco óptico y luego se extienden hacia afuera del ojo formando el nervio óptico.

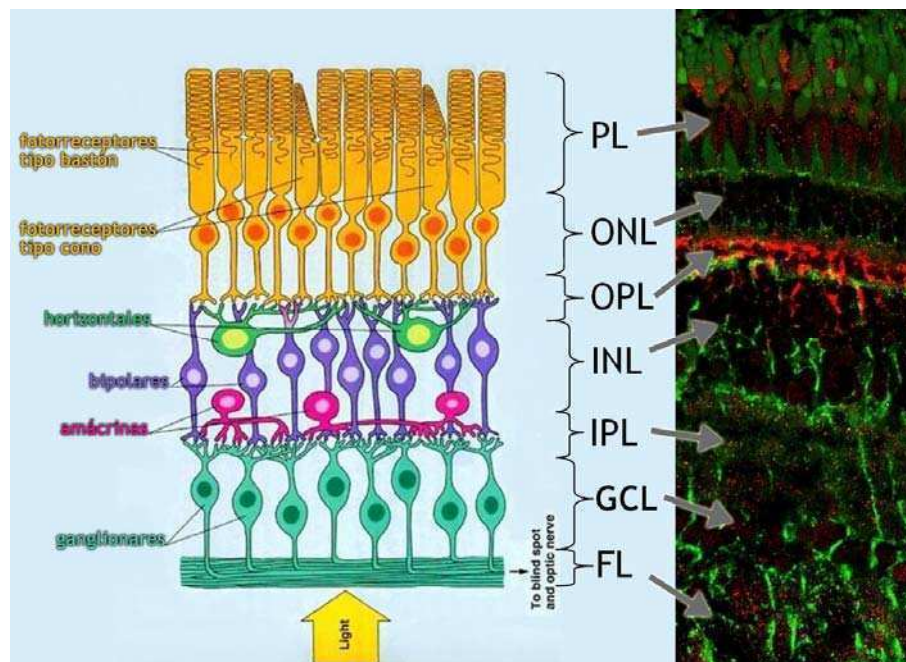


Figura 2. Esquema (izquierda) y microfotografía (derecha) de un corte de retina madura de pez cebra. Se observan los distintos tipos celulares y las capas retinianas. La flecha amarilla, en el esquema, representa la incidencia de la luz, que atraviesa todas las capas antes de alcanzar a los segmentos externos de los fotorreceptores, donde ocurre el proceso de fototransducción. PL: capa de segmentos externos e internos excluyendo al núcleo de los fotorreceptores; ONL: capa nuclear externa (núcleos de conos y bastones); OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna (núcleos de interneuronas); IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares; FL: capa de fibras axónicas de las células ganglionares (CG).

Las células de Müller, mencionadas anteriormente, son un tipo específico de células gliales. Este tipo celular atraviesa todas las capas retinianas y se extiende desde lo que se conoce

como capa limitante externa (a la altura de los segmentos internos de los fotorreceptores) hasta la capa limitante interna (a la altura de la GCL). La capa limitante externa está formada por prolongaciones de la membrana plasmática de las células de Müller y la capa limitante interna por los pies de este mismo tipo glial. Como se describió anteriormente, los somas de estas células gliales se encuentran en la INL (Dowling, 1979; Wässle, 2004).

En el aspecto funcional, los fotorreceptores bastones son responsables de la visión nocturna y son muy sensibles a condiciones de escasa iluminación, mientras que se saturan rápidamente en ambientes muy iluminados. Por el contrario, los conos son responsables de la visión de color y diurna y permiten una mayor agudeza visual.

Los peces presentan diferentes clases de células fotorreceptoras del tipo conos, que se clasifican, de acuerdo al tipo espectral de opsina, en conos rojos, verdes y azules. La mayoría de los peces poseen, además, un cuarto tipo de cono sensible a la luz ultravioleta (conos UV). Por lo tanto, los conos pueden clasificarse de acuerdo a las distintas longitudes de onda a las que responden con mayor sensibilidad (Bowmaker y Hunt, 2006).

Existe gran variabilidad entre especies de peces teleósteos con respecto a los fotorreceptores de tipo conos que poseen en su retina. Hay especies que poseen conos de una sola clase espectral mientras que otras poseen las cuatro clases mencionadas. Los conos rojos y verdes constituyen los morfológicamente denominados “conos dobles”.

4. Neurogénesis en el sistema nervioso de los vertebrados

4.1. Neurogénesis en el sistema nervioso adulto de los mamíferos

Diversas evidencias indican que en el cerebro adulto de los mamíferos persisten células progenitoras multipotentes o *stem cells*, localizadas en zonas con un microambiente adecuado para su supervivencia (Alvarez-Buylla y col, 2001). Este microambiente provee un entorno similar al embrionario, permitiendo a las *stem cells* mantener su capacidad proliferativa y originar diferentes linajes celulares (Doetsch, 2003). Se describió en la zona

subventricular, así como en el hipocampo del cerebro adulto de mamíferos, la existencia de precursores multipotentes con características morfológicas y moleculares que las definen como astrocitos, pero que funcionarían como *stem cells* neurogénicas (Alvarez-Buylla y Lim, 2004). Además, estas *stem cells* presentes en el cerebro adulto comparten características con una población de células gliales, llamada glia radial, presente durante el desarrollo embrionario, y que es considerada una población de precursores neurogénicos (Ever y Gaiano, 2005).

En la retina de los mamíferos, existe una zona potencialmente proliferativa y neurogénica, sin embargo ésta no presenta crecimiento o regeneración *in vivo* (Fischer y col, 2001).

4.2. Neurogénesis en la retina adulta de los peces teleósteos

La retina de los mamíferos pierde su capacidad neurogénica muy tempranamente durante la vida postnatal. Por el contrario, los peces teleósteos continúan creciendo durante toda su vida adulta y este crecimiento se acompaña con el crecimiento del globo ocular y de la retina (Johns y Fernald, 1981; Otteson y Hitchcock, 2003; Stenkamp, 2007). Esto convierte a los peces teleósteos en modelos especialmente útiles para investigar la neurogénesis en la retina, o retinogénesis.

El crecimiento retiniano en peces se realiza a través de dos mecanismos: por un lado, el tejido maduro se expande acompañando el aumento de tamaño del globo ocular y, por el otro, de forma simultánea, se forman nuevas células que se agregan a las células ya diferenciadas.

La adición de nuevas células ocurre a partir de un anillo de tejido indiferenciado, circunferencial y cuneiforme compuesto por una población de *stem cells* y progenitores retinianos que recibe el nombre de zona ciliar marginal (CMZ). Dicha región se ubica en el límite entre la retina neural diferenciada y el epitelio que reviste a los cuerpos ciliares (el epitelio ciliar). Esta zona periférica de la retina se encuentra en un proceso continuo y

secuencial de proliferación y diferenciación fenotípica y constituye una región histológicamente distintiva (Johns y Fernald, 1981) en la cual se encuentran células multipotentes que poseen la capacidad de generar clonalmente todos los tipos celulares retinianos, excepto los fotorreceptores bastones (**figura 3**). Las células multipotentes de la CMZ proliferan a lo largo de toda la vida postnatal del animal (Harris y Perron, 1998; Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004) y dan origen a las células ganglionares, amácrinas, bipolares, horizontales y fotorreceptores de tipo cono, además de las células de Müller.

En el espacio subretinal, rodeando la CMZ y por debajo de la cara luminal del epitelio pigmentario, se encuentran vasos sanguíneos, desde donde provienen señales extracelulares que afectarían la expresión génica de las células precursoras de la CMZ. Otras señales extracelulares con la misma función también provendrían del epitelio pigmentario (**figura 3**).

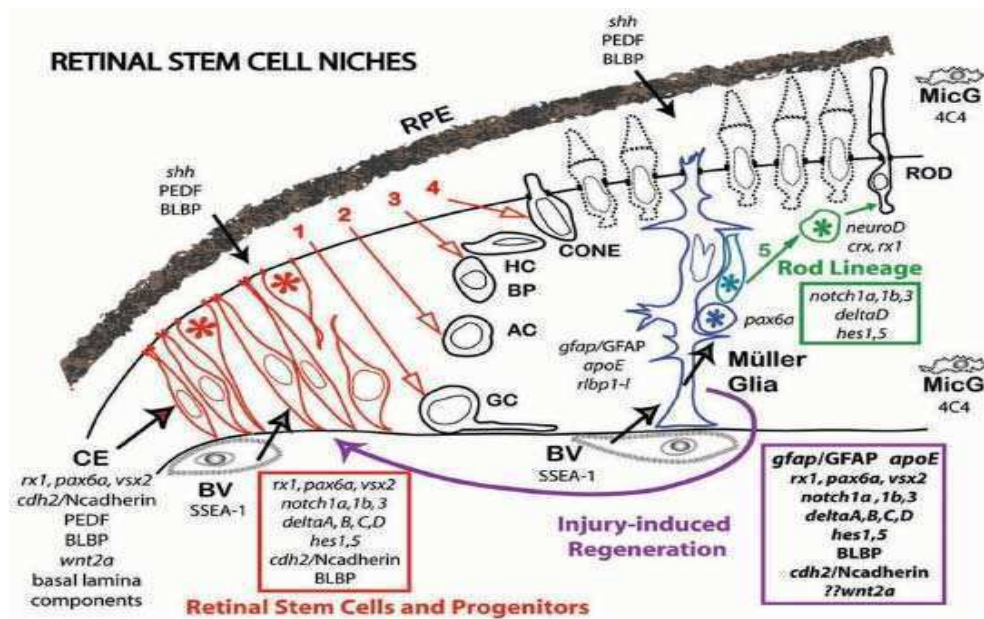


Figura 3. Esquema que representa los distintos nichos de *stem cells* en la retina de pez cebra ya sea durante el crecimiento normal o al ser estimulados por una lesión que induce regeneración. La zona periférica y proliferativa en el borde entre la retina neural y el epitelio ciliar es denominada zona ciliar marginal (CMZ). Las *stem cells* (CE) indicadas en rojo abarcan el ancho de la CMZ y los progenitores se originan a partir de dichas células y se diferencian a células ganglionares (GC, 1), células amácrinas (AC, 2), células bipolares (BC, 3), células horizontales (CH, 3) y fotorreceptores conos (4).

Durante el crecimiento normal y continuo del tejido retiniano, las células de la glia de Müller (en azul) crearían un “nicho de crecimiento” que sostiene a progenitores retinianos también identificados en azul. Estos progenitores originan a los fotorreceptores de tipo bastones (5, en verde). Cuando ocurre una lesión del tejido retiniano, se induciría la activación mitótica de algunas células de Müller para producir un “nicho de regeneración” (en violeta) el cual sería similar al nicho que se encuentra en la CMZ. Esquema tomado de Raymond y col, 2006.

En los peces, los fotorreceptores de tipo bastón derivan de una población neurogénica distinta de células precursoras, que se encuentra fuera de la CMZ, ubicada entre las células y capas de la retina madura (Raymond y col, 2006; Bernardos y col, 2007) (**figuras 3 y 4**). Los precursores de los bastones se encuentran en la ONL, mientras que otras poblaciones de células proliferativas llamadas PINC (células proliferativas de la capa nuclear interna), migrarían a la ONL y darían origen a los precursores de los bastones (Julian y col, 1998; Otteson y col, 2001).

Las células de Müller proporcionan un microambiente adecuado para la migración de los precursores de bastones hasta la capa nuclear externa de la retina neural.

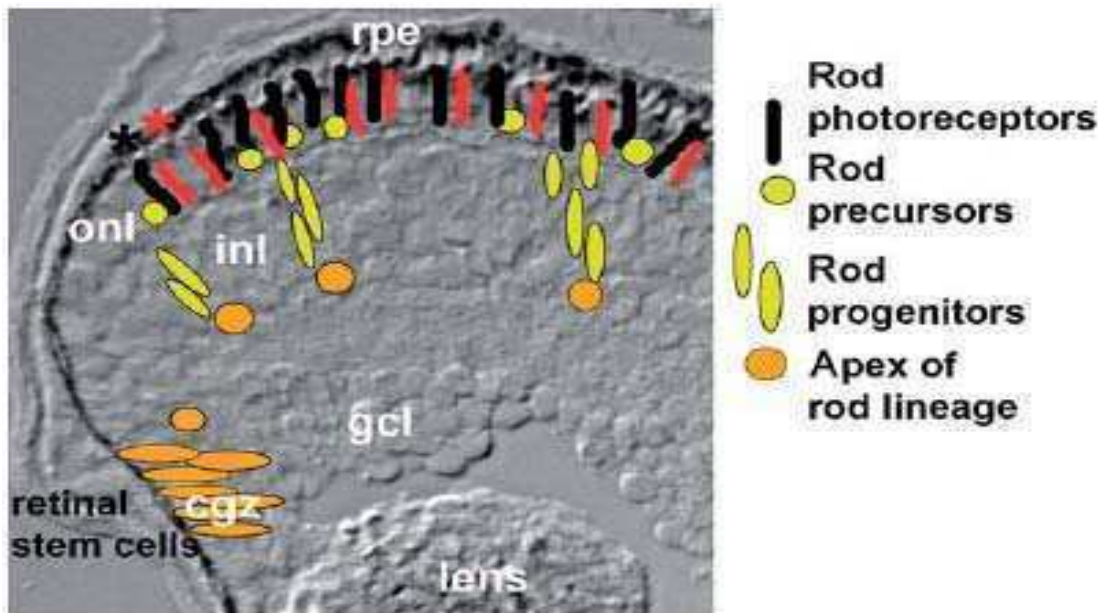


Figura 4. Neurogénesis retiniana y linaje de los bastones en los peces teleósteos (Otteson y Hitchcock, 2003). Criosección radial de retina de larva de pez cebra. En naranja se representa a las células troncales de la CMZ (cgz en la imagen) o a las células positivas para *pax6* de la capa nuclear

interna (INL), que representarían el origen del linaje de los bastones. En amarillo se esquematizan células progenitoras proliferativas localizadas en la INL (PINC) del linaje de los bastones (Hitchcock y Kakuk-Atkins, 2004); las células en amarillo en la ONL son precursores de los bastones (Raymond y col, 1988). En negro se representa a los bastones, mientras que en rojo se esquematizan los conos. El asterisco negro muestra el bastón más cercano a la CMZ y el asterisco rojo representa al cono más nuevo originado desde la CMZ. Al igual que en la larva, este proceso se repite y continúa de por vida en la retina del animal adulto. Tomado de Stenkamp, 2007.

Cuando la retina se estira gradualmente durante el crecimiento postnatal, las capas retinianas se adelgazan y el espacio entre los núcleos de los conos se agranda (Fernald, 1990). La sensibilidad visual se mantiene constante ya que la densidad de los fotorreceptores de tipo bastones no disminuye. Esto ocurre debido a que este tipo celular se origina continuamente en las capas de la retina madura durante el crecimiento retiniano, como se describió anteriormente (**figura 4**).

Histológicamente, la CMZ está definida por cuatro zonas (**figura 5**): periférica, media, central-interna y central-externa. La OPL separa la zona central-interna de la central-externa. La GCL deriva de la zona media de la CMZ, mientras que los progenitores de la zona central-interna están destinados a formar las células que integran la INL. La zona central-externa produce los fotorreceptores de tipo cono que van a formar parte de la ONL, mientras que la zona periférica contiene a los precursores multipotentes.

El proceso neurogénico que ocurre en la CMZ durante el crecimiento de la retina se encuentra altamente organizado. Como se mencionó previamente, comienza con células progenitoras totalmente indiferenciadas (más periféricas) y continúa con células precursoras que se alinean, siguiendo un gradiente periférico-central de menor a mayor grado de diferenciación hacia la retina madura. Este proceso recapitularía en una dimensión espacial periférico-central la expresión dinámica de diversos genes observada cuando se pone en

marcha la retinogénesis embrionaria en la dimensión temporal (Perron y col, 1998). A medida que estas células se comprometen con un destino fenotípico celular, su multipotencialidad disminuye, al mismo tiempo que mantienen una morfología fusiforme característica de las células neuroepiteliales mitóticamente activas. Las células que se encuentran en la región más central de la CMZ (vecina a la retina madura) expresan genes que son propios del linaje celular con el cual se comprometieron luego de perder su capacidad mitótica.

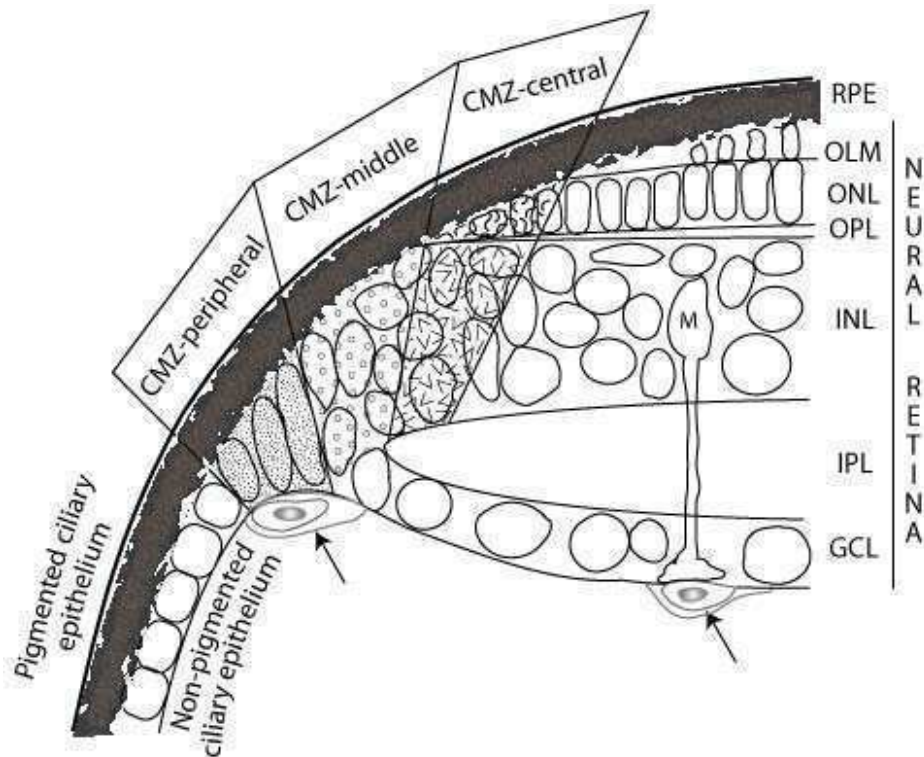


Figura 5. Representación esquemática de las cuatro regiones funcionales presentes en la CMZ. La zona periférica (peripheral), media (middle) y central de la CMZ, que se divide a su vez en central-interna y central-externa. Las flechas marcan vasos sanguíneos. M: células de Müller. RPE: epitelio pigmentario; OLM: membrana limitante externa; ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares. Esquema tomado de Raymond y col, 2006.

Existen además otras características que evidencian la notable plasticidad a nivel neural que conservan los peces teleósteos, en particular los salmónidos, en sus etapas juvenil y adulta.

Estos peces experimentan severos cambios fisiológicos (dependientes de hormonas tiroideas) antes de migrar al mar. Uno de estos cambios implica la pérdida de sus fotorreceptores de tipo conos UV, mediante muerte celular por apoptosis. Cuando estos peces retornan al agua dulce para reproducirse, recuperan sus conos UV a partir de un precursor latente que se encuentra en la retina (Hawryshyn y col, 2003).

5. Estructuras homólogas a la CMZ de pez y anfibio en otros vertebrados

Se describió recientemente la existencia de una CMZ reducida en pollos postnatales (hasta 3 semanas) y en algunos marsupiales, como la zarigüeya (**figura 6**; Kubota y col, 2002, Fischer y Reh, 2001). Se describió además, que las células de Müller podrían responder a la injuria proliferando y dando células hijas que se diferenciarían en al menos algunos tipos celulares retinianos (Fischer y Reh, 2001), de forma similar a lo descrito para los peces teleósteos (Bernardos y col, 2007).

En cuanto a los mamíferos euterios, algunas evidencias experimentales señalan que la retina poseería la maquinaria celular necesaria para la regeneración neuronal. En ratones en etapa postnatal temprana sometidos a una sobre-expresión del gen *sonic hedgehog* se observó una estructura homóloga a la CMZ en el cuerpo ciliar, denominada margen ciliar pigmentado (PCM; **figura 6**; Moshiri y Reh, 2004), que contendría células proliferativas. También en murinos, en experimentos *in vitro*, se aislaron *stem cells* del margen ciliar pigmentado, en preparaciones conocidas como neuroesferas, a partir de las cuales se obtuvieron células que expresaban genes marcadores de células retinianas.

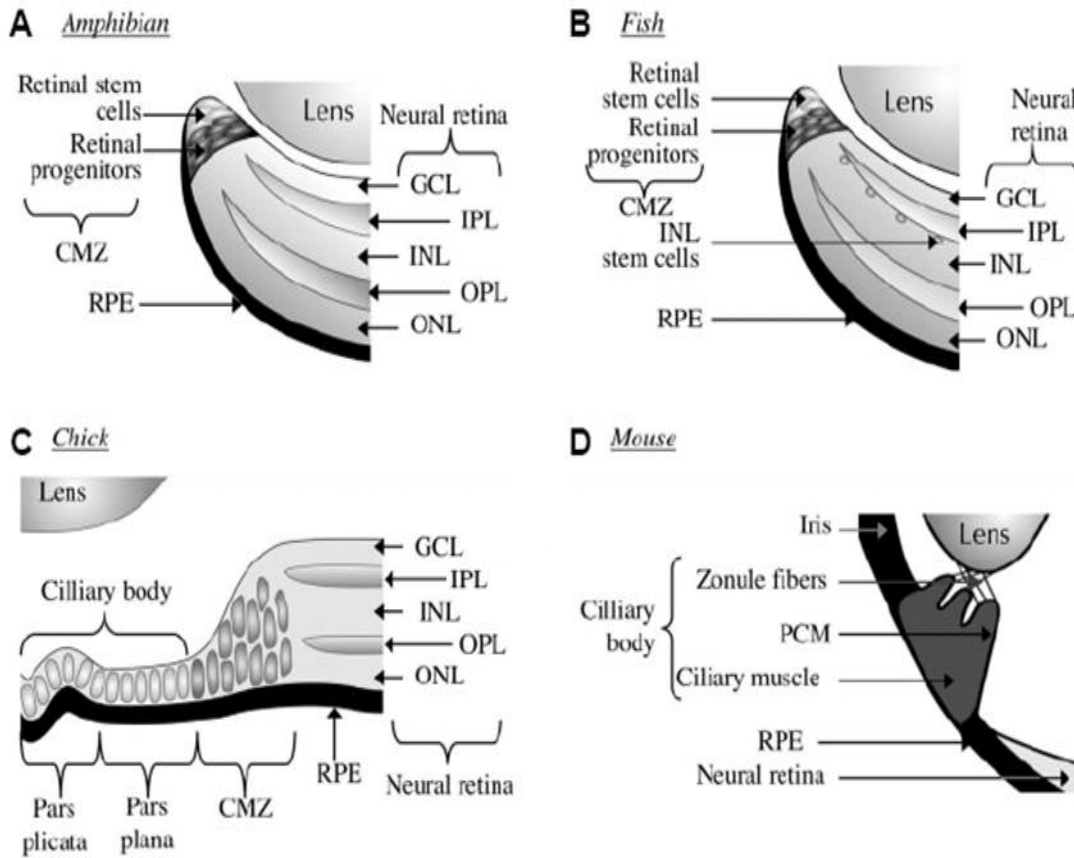


Figura 6. Localización de *stem cells* y células progenitoras retinianas en estructuras homólogas a la CMZ en diferentes clases de vertebrado. Anfibios (A), peces (B), pollos en las primeras tres semanas postnatales (C) y ratón (D). CMZ: zona ciliar marginal; PCM: margen ciliar pigmentado; RPE: epitelio pigmentario; lens: cristalino; ciliary body: cuerpo ciliar; ONL: capa nuclear externa; OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares.

Asimismo, se ha sugerido que la proliferación celular y la diferenciación en la retina de mamífero, en etapas postnatales tempranas, pueden ser estimuladas por factores de crecimiento tales como el factor neurotrófico ciliar (*CNTF*) (Bhattacharya y col, 2008).

El hallazgo de potenciales *stem cells* en el cuerpo ciliar de la retina de roedores y humanos, y la identificación de neurogénesis en los márgenes de la retina de pollo, sugieren que este mecanismo también estaría presente de manera latente en los vertebrados endotermos (Ahmad y col, 2000; Tropepe y col, 2000; Bhatia y col, 2009). Sin embargo, existen

evidencias controvertidas, puesto que recientemente se reportó que el epitelio ciliar o PCM de roedores y humanos no contendría *stem cells* retinianas, sino una población celular que puede proliferar, expandirse clonalmente y auto-renovarse en un medio óptimo para *stem cells*, e incluso expresar algunos marcadores neuronales (Cicero y col, 2009). No obstante, estas células una vez diferenciadas conservarían características inherentes a las células pigmentadas del epitelio ciliar y no se diferenciarían a células retinianas.

El interés en los mecanismos responsables de la neurogénesis en los vertebrados no mamíferos permitió la aparición de valiosos modelos y herramientas para estudiar las bases moleculares y celulares, así como los factores extracelulares que guían la retinogénesis adulta.

6. Regeneración de la retina adulta de pez cebra en respuesta a un daño

La posibilidad de estudiar los procesos neurogénicos involucrados en el crecimiento en un organismo adulto representa una importante ventaja. Además, los peces óseos, y también algunos anfibios, presentan otro fenómeno de plasticidad neuronal que se refleja en su capacidad de regenerar el tejido retiniano dañado luego de una injuria. Esto los convierte en un excelente modelo experimental para estudiar diversos mecanismos y señales involucrados en los fenómenos de plasticidad que subyacen a la recuperación de los tejidos neurales dañados. Esto los diferencia significativamente de los vertebrados mamíferos, en los que la respuesta al daño en el tejido nervioso se repara por medio de la gliosis con la consecuente pérdida de su función. En los mamíferos, la formación de nuevas neuronas cesa en las últimas etapas embrionarias o muy tempranamente en la etapa postnatal aunque, como se describió previamente, los mamíferos exhibirían una potencial capacidad neurogénica.

La retina de los peces teleósteos puede regenerarse íntegramente (morfológica y funcionalmente) en respuesta a un daño, independientemente de la extensión, severidad o tipo de lesión.

En los peces, las nuevas neuronas y células de la glía se originan a partir de células intrínsecas a la retina neural. En los últimos años, se ha postulado a las células de Müller (Bernardos y col, 2007) como las responsables de la reparación de la retina madura de pez cebra luego de haber sufrido un daño tisular. En este sentido, algunas evidencias experimentales sugieren la presencia de una subpoblación de células de Müller en la INL que, en respuesta a la lesión, podrían reingresar al ciclo celular, sufrir mitosis y formar grupos de células progenitoras (Yurco y Cameron, 2005; Bernardos y col, 2007; Ramachandran y col, 2010). Se sugiere que la injuria retiniana induce la reorganización del nicho constituido por algunas células de Müller, los precursores de los bastones y el microambiente que los rodea, el cual mimetizaría el patrón de expresión génica que caracteriza a los precursores de células retinianas de la CMZ (**figura 3**). La idea de que las células de Müller son fuente de progenitores retinianos proviene de estudios realizados utilizando peces transgénicos cuyas células de Müller expresan GFP y en los cuales se ha podido seguir el destino de dichas células, incluyendo la división mitótica de sus núcleos, por períodos cortos luego de la lesión (Fausett y Goldman, 2006; Bernardos y col, 2007; Fimbel y col, 2007; Thummel y col, 2008).

A su vez, las células PINC (células proliferativas localizadas en la INL), descritas previamente, podrían proliferar en respuesta a la lesión y migrar a la ONL para originar conos y bastones (Julian y col, 1998; Wu y col, 2001; **figura 3**).

Se ha sugerido además la existencia de una población celular muy poco numerosa, que se localiza entre la capa nuclear interna y la IPL, que serían verdaderas "*stem cells*" ya que se dividen muy lentamente y son escasas. Este tipo celular proliferativo sería multipotente, ya que expresa *pax6* (homeobox maestro en la formación del ojo y la retina), y se activaría en

respuesta al microambiente tisular provocado por la lesión. (Faillace y col, 2002; Otteson y Hitchcock, 2003).

Sin embargo, la identidad precisa del tipo celular o de las poblaciones celulares responsables de la regeneración del tejido retiniano, así como la descripción de los mecanismos y señales involucrados en este proceso, no han sido elucidados y se hallan actualmente bajo intenso estudio.

6.1. Tipos de daño

La retina de pez regenera todos sus tipos celulares y conexiones sinápticas, independientemente de la extensión o del tipo de daño (**figura 7**). Existen distintos modos de lesionar la retina con mayor o menor grado de severidad: por exposición a la luz o a rayos láser, lesiones mecánicas, químicas o citotóxicas, quirúrgicas, o por la ablación transgénica de un tipo celular en particular (Lombardo, 1972; Raymond y col, 1988; Kassen y col, 2007; Mensinger y Powers, 2007; Fimbel y col, 2007; Braisted y Raymond, 1992; Sullivan y col, 1997; Zhao y col, 2009).

Entre los distintos tratamientos para provocar una lesión experimental de la retina de pez, la lesión química con ouabaína es una técnica que se ha utilizado clásicamente y se encuentra bastante caracterizada. Ésta consiste en una lesión citotóxica por inhibición de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ con dicho tóxico metabólico (Fimbel y col, 2007). La inyección intraocular de ouabaína induce la destrucción de todas las células retinianas (**figura 7**). Se puede, sin embargo, disminuyendo la dosis de ouabaína, lograr una lesión parcial que daña principalmente a las capas internas de la retina, preservando a la capa de fotorreceptores (Fimbel y col, 2007).

El modelo de lesión quirúrgica o mecánica ha sido también utilizado en retinas de varios peces teleósteos, como por ejemplo *goldfish* (Hitchcock y Raymond, 1992), *sunfish* (Cameron y Easter, 1995), pez cebra (Cameron y Carney, 2000) y trucha arcoiris (Faillace y

col, 2002). Pequeñas porciones de la retina son removidas y los bordes de la lesión se activan y exhiben células proliferativas rodeando la zona de la herida (**figura 7**).

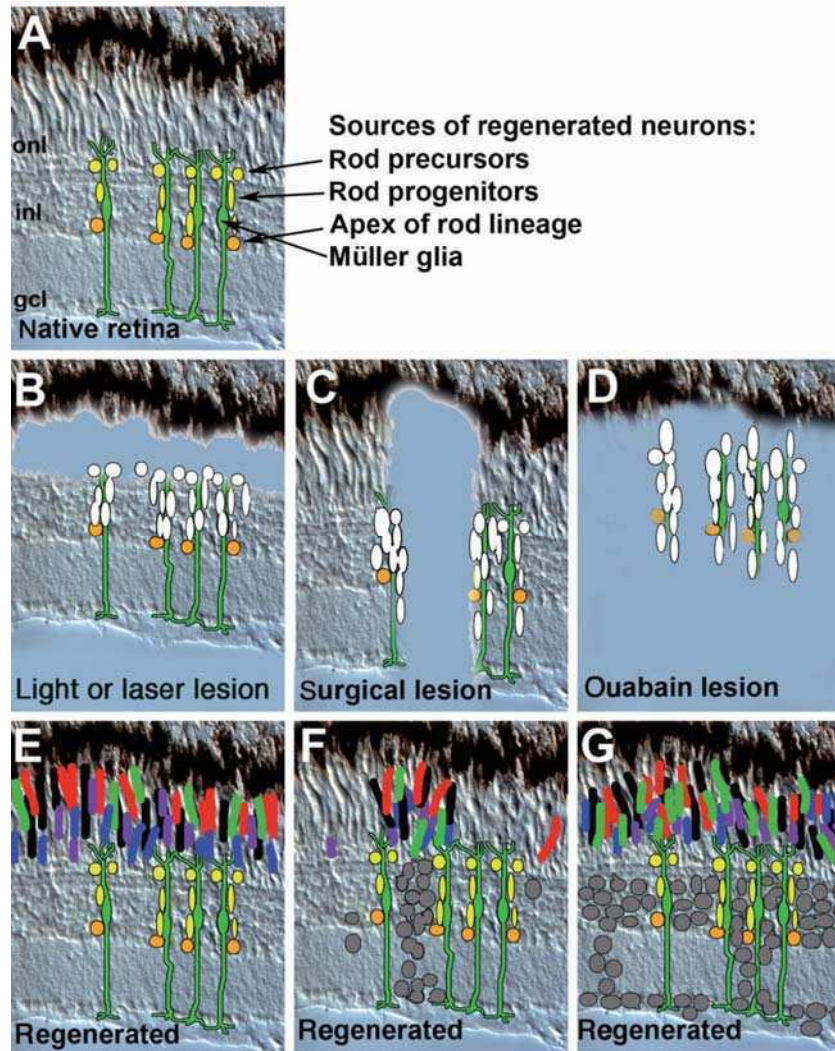


Figura 7. Esquema que muestra distintos tipos de lesión y el proceso de regeneración retiniana. **A:** Sección de una retina de pez cebra no dañada, con un esquema superpuesto, indicando los posibles tipos de precursores que darán origen a las nuevas células para reparar el tejido retiniano luego de la lesión. Células de Müller (en verde) y células del linaje de los bastones descritas en las figura 3 (Bernardos y col, 2007). **B, C, D:** Secciones de la retina de pez cebra lesionada: **B:** pérdida de la capa de fotorreceptores luego de una lesión lumínica o por láser; **C:** remoción mecánica de una porción de la retina mediante lesión quirúrgica; **D:** pérdida casi completa de células por un tratamiento con una alta concentración de ouabaína. En cada caso, la proliferación celular en la INL y ONL está aumentada, como se indica con los núcleos celulares en blanco, y algunas células de Müller reingresaron al ciclo celular. **E, F, G:** Cortes de retina de pez cebra regenerada luego de los daños causados en B, C y D, respectivamente. En gris, se muestran los núcleos regenerados y

algunos núcleos ectópicos. En colores en la capa de fotorreceptores, se muestran los distintos conos y bastones regenerados. Tomado de Stenkamp, 2007.

Respecto a la lesión lumínica (**figura 7**), por ejemplo, se ha utilizado luz constante para destruir la capa de fotorreceptores en peces cebra albinos (Vihtelic y Hyde, 2000) o láser de argón, dirigido a través de la córnea, para destruir una pequeña zona de fotorreceptores (Braisted y col, 1994).

Mediante ablación transgénica en retina de pez cebra, se ha estudiado, por ejemplo, la diferenciación de las células bipolares y la forma en que la retina se regenera luego del daño de este tipo celular (Zhao y col, 2009).

El proceso de regeneración retiniano, independientemente del tipo de lesión, consiste en la total recuperación de la morfología, así como de los contactos sinápticos con las estructuras cerebrales (Steurmer y col, 1985). La recuperación funcional de la retina regenerada se ha estudiado en peces utilizando electroretinogramas y mediante estudios de comportamiento visual que requieren, a su vez, la recuperación de los contactos sinápticos de los axones de las células ganglionares con las neuronas del tectum óptico (Mensinger y Powers, 1999; Mensinger y Powers, 2007; Sherpa y col, 2008).

7. Señales que controlan la proliferación y diferenciación celular en la retina de vertebrado

Las señales que controlan la retinogénesis de los vertebrados durante el desarrollo embrionario se dividen en dos grandes grupos: las señales *intracelulares*, que inducen o impiden que un progenitor previamente multipotente se comprometa con un destino celular

determinado, y las señales *extracelulares*, que median la influencia del entorno en la elección del destino fenotípico.

Clásicamente, se postuló que el entorno celular proporciona la información necesaria para alcanzar un destino celular a partir de un precursor multipotente (Turner y col, 1990). Actualmente, se postula que los progenitores retinianos pasan a través de distintos estados de competencia durante la retinogénesis en el desarrollo embrionario, donde cada estado depende de la etapa embrionaria (temprana o tardía), e implica un número limitado de destinos posibles para cada tipo de célula precursora (Livesey y Cepko, 2001). Estos estados de competencia están definidos por la presencia combinada de ciertos factores de transcripción que caracterizan distintos *pool*es de células progenitoras, los cuales les permiten a dichas células responder, o no, a las señales del entorno. Paralelamente, los factores extrínsecos a los precursores siguen siendo indispensables para regular la diferenciación celular.

7.1. Factores Intracelulares

Los principales factores intracelulares (**figura 8**) que controlan la retinogénesis en los vertebrados pertenecen a dos grupos: los genes *homeoboxes*, y los *factores de transcripción bHLH* (*basic helix-loop-helix*).

a) Los genes *homeoboxes*, como *pax6* (gen maestro en la morfogénesis del ojo y la retina de vertebrado), están inicialmente involucrados en la especificación del primordio óptico y la regulación de la proliferación celular. Posteriormente, cumplen un rol en la diferenciación celular (Dyer, 2003). Se demostró en *Drosophila melanogaster* que *pax6* es necesario para el desarrollo del ojo y su ausencia produce agenesia del globo ocular (Quiring y col, 1994). En vertebrados, al igual que en *Drosophila melanogaster*, su mutación en homocigosis genera embriones sin ojos y no hay formación de retina ni de varias estructuras oculares como la

córnea y el cristalino (Wawersik y Maas, 2000). Además, su sobre-expresión es suficiente para generar ojos ectópicos. *Pax6* se expresa en el primordio del ojo durante los estadios iniciales de la retinogénesis (Chow y col, 1999) y en la retina adulta principalmente en las células amácrinas, algunas ganglionares y unas pocas horizontales. En los peces teleósteos, *pax6* se expresa en *stem cells* proliferativas multipotentes en la CMZ, en escasas células proliferativas en la INL y también en las células amácrinas y algunas ganglionares (Otteson y Hitchcock, 2001; Faillace y col, 2002).

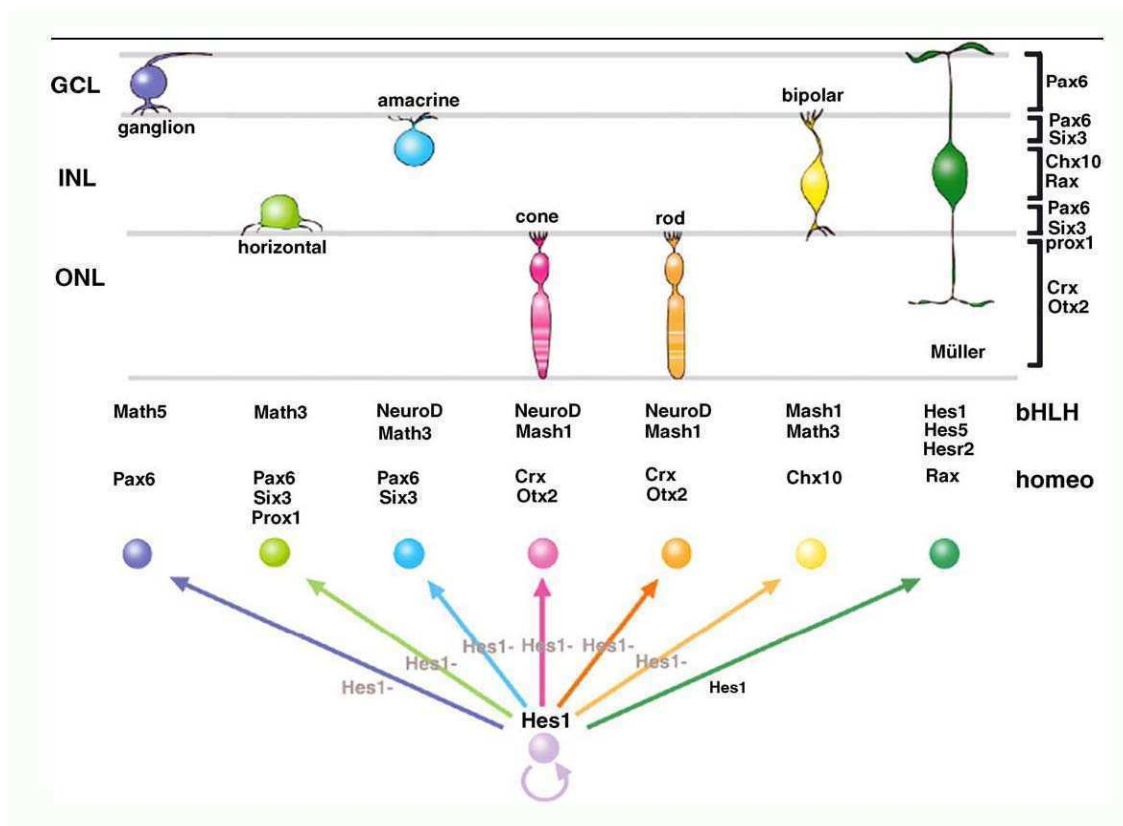


Figura 8. Factores intracelulares que regulan la diferenciación de las células retinianas a partir de un progenitor multipotente en el desarrollo embrionario de vertebrado (modificado de Hatakeyama y Kageyama, 2004).

b) La familia de factores de transcripción llamados *basic helix-loop-helix* es esencial en el proceso de retinogénesis durante el desarrollo embrionario de vertebrado (Marquardt y Gruss, 2002).

La expresión de factores *bHLH* activadores y represores regulan de forma antagónica los procesos de proliferación celular y diferenciación (Ohsawa y Kageyama, 2008). Los factores *bHLH* represores mantienen a las células como progenitoras, mientras que los activadores (proneurales) promueven la determinación de las células neuronales, ya que regulan la expresión de un repertorio de genes característicos de cada tipo celular. A medida que las células se vuelven post-mitóticas y expresan estos factores, se determinan, es decir se comprometen con un linaje fenotípico y progresan en su diferenciación. En este sentido, las células ganglionares requieren el factor Ath5 de esta familia de genes proneurales, las amácrinas a NeuroD, las bipolares requieren los *bHLH* Ash1 y Ath3 y los fotorreceptores y bipolares a Ngn2. La formación de las células horizontales está regulada por Foxn4, el *bHLH* Ptf1a y el homeobox Prox1. Si alguno de estos genes es mutado, la formación de las células horizontales se ve comprometida. Los fotorreceptores requieren a Otx2, sin embargo, no se sabe como los *bHLH* coordinan la especificación de conos frente a bastones (Ohsawa y Kageyama, 2008).

7.2. Factores extracelulares

Tres grupos demostraron casi simultáneamente que un único tipo de precursor multipotente origina todas las células retinianas maduras durante el desarrollo embrionario (**figura 8**; Turner y Cepko, 1987; Holt y col, 1988; Wetts y Fraser, 1988). Esto condujo a la conclusión de que la diferenciación del fenotipo celular es controlada por factores extrínsecos que actúan durante o después del último ciclo mitótico de la célula progenitora. En este sentido, se describió el efecto de varias moléculas extracelulares que guían a las células progenitoras retinianas hacia diferentes destinos fenotípicos celulares. Por ejemplo, *Sonic*

hedgehog, un factor secretado por las células precursoras, iniciaría la diferenciación de las células ganglionares y los fotorreceptores (Neumann y Nueslein-Volhard, 2000; Stenkamp y Frey, 2003). El factor de crecimiento transformante (TGF- α), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor inhibitorio de la leucemia (LIF) pueden estimular la producción de tipos particulares de células retinianas e inhibir la formación de otros (Lillien, 1998, Marquardt y Gruss, 2002).

Otra importante señal extrínseca es el factor neurotrófico ciliar. Éste puede inhibir a una célula precursora comprometida para ser un bastón, incluso cuando ya es una célula post-mitótica, para convertirla en una célula de Müller (Bhattacharya y col, 2004). Se ha observado en la retina adulta de peces teleósteos, que el *CNTF* promovió la activación mitótica de las células proliferativas de la INL (Faillace y col, 2002).

8. Los nucleótidos y nucleósidos como señales extracelulares

Los nucleótidos y nucleósidos extracelulares son señales extrínsecas presentes en la mayoría de las especies y tejidos animales. Pueden interactuar con receptores purinérgicos (receptores P), que pueden ser purínicos o pirimidínicos, y ser hidrolizados por ectonucleotidasas presentes en la membrana plasmática (Zimmermann y Braun, 1999).

En las últimas décadas se demostró que el ATP, así como otros nucleótidos, puede actuar como señal extracelular autócrina y parácrina en distintos tejidos. La liberación de ATP desde el interior celular puede producirse en respuesta a diversos estímulos, dependiendo del tipo celular involucrado. Por ejemplo, la deformación mecánica o el cambio de voltaje de la membrana plasmática inducen la liberación de ATP al medio extracelular.

Los estímulos de tipo metabólico, como por ejemplo la hipoxia y acidosis, también inducen la liberación de ATP, que además puede ocurrir como respuesta a la unión de un ligando con su receptor (Beigi y col, 1999; Jans y col, 2002). Asimismo, tanto el aumento de volumen como la deshidratación celular provocan liberación de ATP. El ATP liberado al medio

extracelular alcanza concentraciones que le permiten participar en la regulación de una amplia variedad de procesos biológicos a través de su unión a sus receptores específicos (Sévigny y col, 1995).

Por otra parte, el ATP puede ser liberado a través de diversos mecanismos, por ejemplo por exocitosis vesicular específica o acompañando la liberación de un neurotransmisor como el glutamato (Burnstock, 2006; Pankratov y col, 2006; Fitz, 2007) o a través de hemicanales formados por conexinas y/o por un tipo diferente de subunidades proteicas denominadas pannexinas (**figura 9**) (D'hondt y col, 2009; Iwabuchi y Kawahara, 2010). Asimismo, se describió salida de ATP del interior celular a través de canales de cloruro regulados por cambios del volumen celular o a través de poros formados por varios receptores P2X7 (Abbracchio y col, 2009). Incluso, un incremento muy importante en los niveles de ATP extracelular en cultivos celulares primarios ocurre a través de la liberación del contenido intracelular de ATP como consecuencia de la lisis celular (Pafundo y col, 2008). Sin embargo, la completa descripción de los mecanismos de liberación en cada caso es todavía controvertida.

La hidrólisis del ATP extracelular, a través de la acción de ectonucleotidasas, produce secuencialmente ADP, AMP y adenosina, moléculas que a su vez actúan como señales autócrinas y parácrinas, activando otros tipos específicos de receptores P de membrana plasmática. De este modo, el ATP, ADP y la adenosina, a diferencia del AMP que carece de rol fisiológico conocido, cumplen un importante papel en la señalización intercelular. Asimismo, se ha descrito un papel fisiológico importante del UTP y UDP en este tipo de señalización, en diversos tejidos y sistemas celulares (Newman, 2004, 2006).

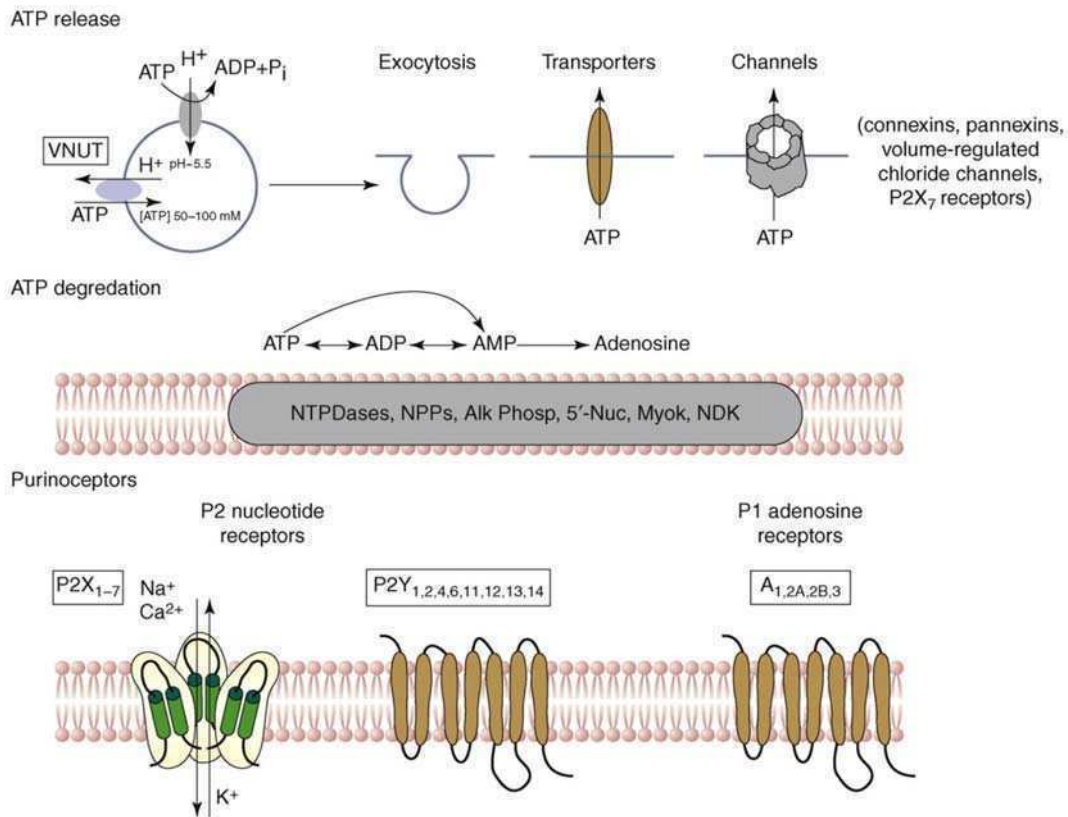


Figura 9. Ilustración de los mecanismos por medio de los cuales se produce la liberación, degradación y acción del ATP extracelular. NTPDases: nucleósido trifosfato difosfohidrolasas. Alk Phos: fosfatasa alcalina. Myok: adenilato quinasa. NDK: nucleósido difosfato quinasa. NPPs: nucleótido pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa. 5'-Nuc: ecto-5'-nucleotidasa. VNUT: transportador nucleotídico vesicular. En la parte superior y central de la figura se observa una representación de los mecanismos de liberación y degradación del ATP, respectivamente. En la parte inferior se detallan las familias de receptores purinérgicos. Tomado de Abbracchio y col, 2009.

En el sistema nervioso, el ATP funciona como neurotransmisor o neuromodulador. En los vertebrados se describieron efectos del ATP y la adenosina sobre la diferenciación neuronal y el desarrollo dendrítico, así como sobre la expresión de receptores para neurotransmisores en las células diana (Ribeiro, 1995; Cunha y Ribeiro, 2000; Braun y col, 2003).

Los nucleótidos, nucleósidos, sus receptores específicos y las enzimas de membrana plasmática que los hidrolizan, constituyen un sistema extracelular que se conoce en conjunto como señalización purinérgica.

8.1. Receptores Purinérgicos

Los nucleótidos y nucleósidos extracelulares ejercen su acción biológica a través de receptores de membrana plasmática de tipo P o purinérgicos. Estos receptores pueden unir moléculas tanto purínicas como pirimidínicas, es decir ATP, ADP, UTP, UDP o CTP (Burnstock, 1978, Lazarowski y col, 2003; Burnstock, 2007b).

Existen dos familias de receptores P denominadas P1 y P2. Los receptores P1 o "A" tienen como ligando principal a la adenosina. Los receptores P2 poseen como ligandos a los nucleósidos di- y trifosfato (**figura 9**).

8.1.1. Receptores P2

La familia de receptores P2 se divide en P2X, receptores ionotrópicos, es decir que la misma molécula proteica actúa de receptor y de canal iónico, y P2Y, receptores metabotrópicos, es decir acoplados a la señalización intracelular vía una proteína G (Ralevic y Burnstock, 1998).

8.1.1.1. Receptores P2X

Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes tipos de tejidos (Burnstock, 1978, 2007a, 2007b). En el sistema nervioso, se expresan tanto en neuronas como en células gliales. En cuanto a su estructura, los receptores P2X son trímeros. Cada subunidad posee dos dominios hidrofóbicos a través de la membrana plasmática. Ambos dominios hidrofóbicos están unidos entre sí por una extensa cadena extracelular de aminoácidos predominantemente polares. Dos dominios hidrofílicos, relativamente pequeños, ubicados hacia el interior de la célula forman los segmentos amino- y carboxilo terminales de estos receptores.

Los receptores P2X (P2X1-P2X7) conforman poros o canales catiónicos (principalmente canales de Ca^{2+}) que se activan en presencia de ATP extracelular. Ni el ADP, ni la adenosina, ni los nucleótidos de uridina activan a estos receptores.

Con respecto a los antagonistas de estos receptores (**tabla A**), la suramina y el PPADS (piridoxalfosfato-6-azofenil-2',40'-disulfonato) antagonizan inespecíficamente la acción del ATP, mientras que otros antagonistas, como el NF110, poseen efectos más específicos sobre algunos subtipos de estos receptores (Abbracchio y col, 2009).

subtipo de receptor	agonista endógeno	antagonista selectivo
P1	adenosina	8-SPT
P2X ₁	ATP	TNP-ATP, NF023, NF449, NF110
P2X ₂	ATP	NF778, NF110
P2X ₃	ATP	A317491, TNP-ATP, R03, RN-1838, NF110
P2X ₄	ATP	Sin antagonistas
P2X ₅	ATP	PPADS, suramina (no-selectivo)
P2X ₆	ATP	Sin antagonistas
P2X ₇	ATP	KN62, O-ATP, Coomassie BBG, RN-6189, A-740003, A-438079
P2Y ₁	ADP	MRS2179
P2Y ₂	ATP, UTP (equipotente)	AR-C126313
P2Y ₄	UTP	Reactive Blue 2
P2Y ₆	UDP	MRS2578
P2Y ₁₁	ATP, NAD ⁺ , NAADP ⁺	Reactive Blue 2, NF157
P2Y ₁₂	ADP	CT50547
P2Y ₁₃	ADP	MRS2211
P2Y ₁₄	UDP glucosa UDP galactosa	Sin antagonistas

Tabla A. Agonistas y antagonistas de los receptores purinérgicos. NAADP⁺: ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato. Información extractada de Abbracchio y col, 2009.

En la retina de los vertebrados se identificaron los subtipos P2X₂, P2X₃, P2X₄ y P2X₇ en las células ganglionares y bipolares (Wheeler-Schilling y col, 2000, 2001). La activación de receptores P2X₇ por altas concentraciones de ATP, en células ganglionares de la retina de mamífero, produce un aumento sostenido del Ca²⁺ intracelular que provoca la muerte de este tipo celular. Este efecto puede ser contrarrestado por una acción neuroprotectora de la

adenosina sobre los receptores P1 (Zhang y col, 2006). Se ha descrito que son necesarias concentraciones extracelulares de ATP de al menos 100 μ M para provocar la activación fisiológica de estos receptores (Volonté y col, 2006).

Los receptores P2X7 también se expresan en los terminales de los fotorreceptores y procesos de las células horizontales en la OPL (Puthussery y col, 2006; Puthussery y Fletcher, 2007).

8.1.1.2. Receptores P2Y

Estos receptores se expresan en el sistema nervioso desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, y se encuentran tanto en neuronas como en células de la glia (Sugioka y col, 1996).

Su característica estructural saliente es la presencia de siete dominios hidrofóbicos a través de la membrana plasmática, separando al segmento amino-terminal extracelular del carboxilo terminal citosólico.

Reconocen como agonistas selectivos a distintos nucleótidos de adenina y/o uridina y pertenecen a la superfamilia de los llamados receptores acoplados a proteínas G. Según al tipo de proteína G a la cual se acoplan, los receptores P2Y pueden clasificarse en dos grupos: aquellos que se asocian a proteínas G_q , activando la vía de la PLC/IP₃ (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁), y aquellos que se acoplan a proteínas G_i , inhibiendo la adenilato ciclasa y modulando canales iónicos (P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄) (Abbracchio y col, 2009). Los subtipos faltantes en la clasificación representan receptores ortólogos en organismos no mamíferos o con homología de secuencia con los receptores P2Y, pero cuyos agonistas no son nucleótidos (Abbracchio y col, 2003; Burnstock, 2007a).

Los subtipos de receptores P2Y pueden clasificarse también según su afinidad con los agonistas, como sensibles sólo a nucleótidos de adenina (P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃), a

nucleótidos de adenina y uracilo (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₄), a nucleósidos difosfato (P2Y₁, P2Y₆, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) o principalmente a nucleósidos trifosfato (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₁₁). Algunos de los antagonistas de receptores P2Y más utilizados son suramina, cibacrón blue y PPADS, aunque ninguno de estos actúa de manera específica (von Kugelgen y Wetter, 2000). Sin embargo, se han desarrollado agonistas y antagonistas con mayor especificidad para algunos subtipos de receptores (**tabla A**).

Los receptores P2 (tanto P2X como P2Y) pueden formar hétero y homo-oligómeros. Por ejemplo, se ha descrito la formación de homodímeros del receptor P2Y₁ humano y que la dimerización aumenta por la exposición al agonista (Choi y col., 2005).

8.1.2. Receptores P1 o A

Estos receptores están ampliamente distribuidos en la mayoría de los tipos celulares en los vertebrados (Stanley y col, 1987; Pafundo y col, 2004).

En cuanto a su estructura, al igual que los receptores P2Y, los receptores P1 poseen siete dominios hidrofóbicos a través de la membrana plasmática y están acoplados a proteínas G. Los receptores P1 o A se dividen en diferentes subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃ (Bucheimer y Linden, 2004; Burnstock, 2007a). Un mismo tipo celular puede expresar distintos subtipos de receptores P1 simultáneamente.

Con respecto a su mecanismo de señalización intracelular, los subtipos A₁ y A₃ se acoplan a proteína G_i, inhibiendo la formación de AMPc, mientras que los subtipos A_{2A} y A_{2B} se acoplan a la proteína G_s, estimulando la producción de AMPc.

Algunos de los antagonistas de receptores P1 (**tabla A**) más utilizados son los derivados de la teofilina: 8-fenilteofilina y 8-sulfofenilteofilina; (Daly y col, 1985; Fredholm y col, 2001). Un conocido antagonista de los receptores P1 es la cafeína (Müller y Jacobson, 2011).

En el sistema nervioso central y periférico, la adenosina está involucrada en múltiples procesos, incluyendo la modulación del dolor (Goldman y col., 2010), la señalización neurona-glia durante el proceso de neurogénesis y la regulación del ritmo sueño-vigilia. La disfunción del sistema de señalización mediado por adenosina se relaciona estrechamente con patologías tales como la epilepsia (Shah y Hodgson, 2010; Chen y Chern, 2011).

9. Metabolismo extracelular de los nucleótidos

La regulación de las concentraciones extracelulares de los nucleótidos impide que los receptores purinérgicos estén permanentemente activados, llegando incluso a desensibilizarse frente a la estimulación excesiva o prolongada de un ligando. Este papel lo cumplen las ecto-nucleotidasas, enzimas que metabolizan los nucleótidos extracelulares, y que se encuentran en la superficie de la mayoría de las células. La actividad de estas enzimas garantiza no sólo la terminación de un estímulo específico, sino que posibilita la conversión de unos agonistas en otros, los cuales presentan diferente afinidad por distintos receptores (Abbracchio y col, 2009). Estas enzimas poseen sus sitios catalíticos con actividad nucleotidasa ubicados en el espacio extracelular, de allí deriva su nombre de ecto-enzimas (Wang y Guidotti, 1998; Fausther y col, 2007).

En los vertebrados, las ecto-nucleotidasas pertenecen a alguna de las siguientes familias:

- 1) Ecto-nucleótido pirofosfatasas (E-NPPasas): utilizan un nucleósido trifosfato como sustrato y producen nucleósidos monofosfato y pirofosfato (Plesner, 1995; Zimmermann, 2001).
- 2) Ecto-fosfatasas alcalinas (AP): utilizan nucleósidos tri, di o monofosfato como sustrato y producen fosfato libre. Asimismo, liberan fosfato inorgánico a partir de varios compuestos orgánicos (Zimmermann, 2001).
- 3) Ecto-nucleósido-difosfato-quinasas (E-NPDKasas): promueven la transferencia de γ -Pi de un nucleósido trifosfato a un nucleósido difosfato (Lazarowski y col, 2000).

4) Ecto-5'-nucleotidasa: es la principal enzima de membrana que hidroliza AMP para producir adenosina (Zimmermann, 2001; **figura 10**).

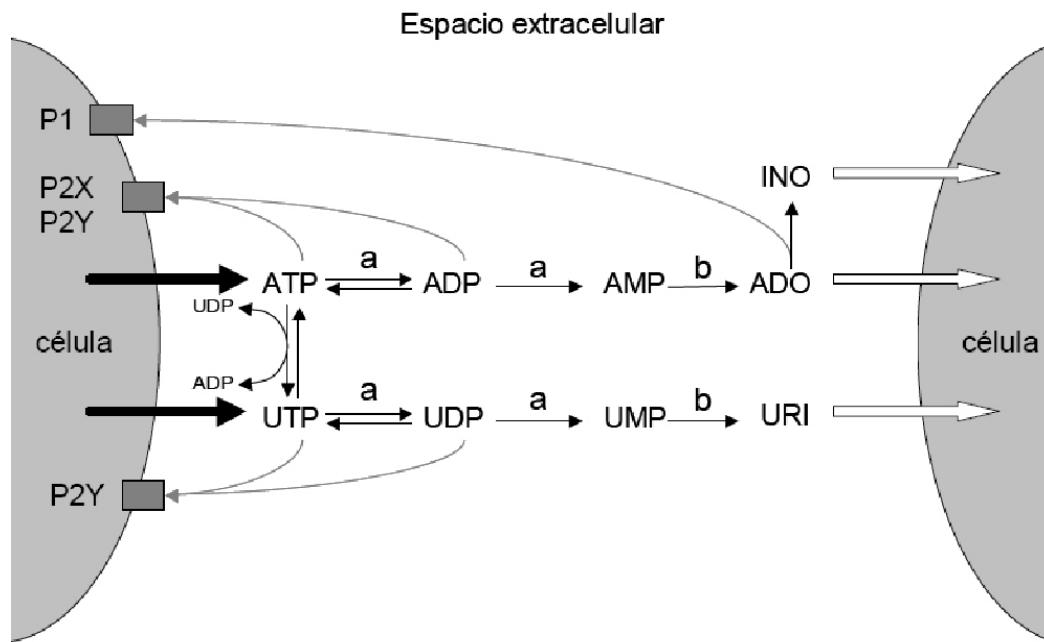


Figura 10. Metabolismo extracelular de nucleótidos y nucleósidos. Las flechas negras gruesas indican liberación de nucleótidos al espacio extracelular; las flechas blancas indican la incorporación intracelular de nucleósidos mediante transportadores. Las principales enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos son: E-NTPDasas (a), Ecto-5' nucleotidasas (b). ADO: adenosina; URI: uridina; INO: inosina. La acción de los nucleótidos o nucleósidos sobre los receptores purinérgicos puede ser tanto autócrina como parácrina, al igual que la recaptación de nucleósidos. Tomado de D. Pafundo, Tesis doctoral, 2009 (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA).

5) Ecto-nucleósido-trifosfato-difosfohidrolasas (E-NTPDasas): hidrolizan los residuos fosfato γ y β de nucleósidos de adenina y uracilo con dos o tres fosfatos produciendo ADP y AMP así como UDP y UMP. Es la principal familia de ecto-nucleotidasas en los vertebrados (**figura 10**).

La actividad ATPasa extracelular de las E-NTPDasas es dependiente de Ca^{2+} o Mg^{2+} , e insensible a inhibidores de fosfatasas alcalinas y ATPasas de transporte iónico.

En vertebrados se clonaron y caracterizaron 8 miembros de la familia de E-NTPDasas. Todas ellas poseen 5 dominios apirasa altamente conservados (Zimmermann y Braun, 1999; Zimmermann, 2001), sin embargo, los diferentes miembros de la familia pueden diferir en la identidad de sus secuencias y su capacidad de hidrólisis (Smith y col, 1999).

Las E-NTPDasas pueden ser inhibidas por Ce^{2+} , suramina, cibacrón blue (Ziganshin y col, 1994; Culic y col, 1995), ARL67156 (análogo estructural del ATP) y análogos del ATP que poseen un grupo metileno entre los fosfatos. Sin embargo, todos estos inhibidores exhiben relativamente baja especificidad (Joseph y col, 2004; Machida y col, 2005; Reigada y col, 2005; Lévesque y col, 2007).

Las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 son enzimas expresadas en la membrana plasmática y poseen dos dominios extracelulares con actividad catalítica y forman un bolsillo donde se ubica el sustrato (**figura 11**).

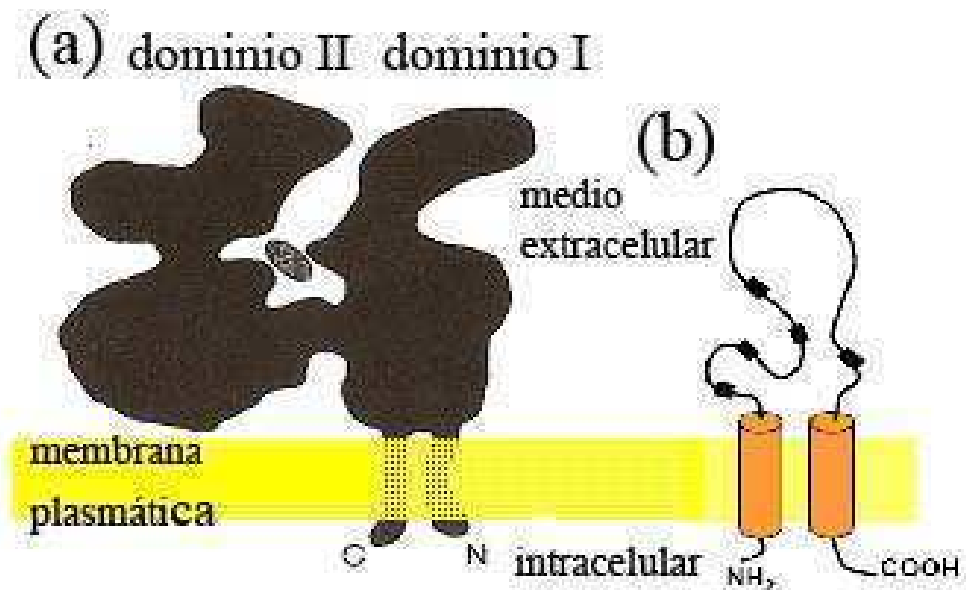


Figura 11. Esquema general de las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 de membrana plasmática y con actividad catalítica extracelular. (a) Se muestran los dos segmentos transmembrana y los dos dominios extracelulares que forman un bolsillo donde se ubica el sustrato. (b) Se muestran los cinco dominios

conservados llamados apirasa, ubicados hacia el exterior celular (rectángulos negros). C y COOH: extremo carboxilo terminal. N y NH₂: extremo amino terminal. Adaptado de Zimmermann, 2001, 2006.

Por el contrario, las NTPDasas 4, 5, 6 y 7 están presentes en las membranas del aparato de Golgi, retículo endoplasmático o de lisosomas y no poseen la capacidad de hidrolizar ATP o ADP aunque pueden hidrolizar otros nucleótidos.

Los tres tipos más estudiados de NTPDasas de membrana plasmática comprenden las NTPDasas 1, 2 y 3. La NTPDasa1 hidroliza ATP y ADP con la misma preferencia (Grinthal y Guidotti, 2000; Zimmermann, 2001; Kukulsky y col, 2005) y actúa principalmente finalizando las señales producidas por ambos nucleótidos sobre los receptores P2. De este modo, la actividad de esta enzima favorecería, junto con la actividad de la ecto-5'-nucleotidasa, la producción de adenosina (por desforilación del AMP) y en consecuencia, la activación de receptores P1.

La NTPDasa2 hidroliza al menos 30 veces más moléculas de ATP que de ADP por unidad de tiempo, generando acumulación de ADP en el espacio extracelular y favoreciendo la señalización mediada por receptores P2Y, sobre todo los subtipos principalmente activados por ADP (Zimmermann, 2001; Kukulsky y col, 2005).

La NTPDasa3 presenta una actividad hidrolítica intermedia a las otras dos enzimas que resulta 3 veces más alta para el ATP (Kukulsky y col, 2005).

Con respecto a su localización en el sistema nervioso, la NTPDasa1 se encuentra generalmente asociada a la microglia y a la vasculatura del cerebro (Braun y col, 2000), mientras que la NTPDasa2 aparece principalmente asociada a la glia (Braun y col, 2003). Estudios inmunohistoquímicos y de hibridización *in situ*, realizados en cerebro de rata, demostraron que la NTPDasa2 se expresa en la glia radial de las zonas germinales

neurogénicas del cerebro adulto, como la zona subventricular, y en las células progenitoras del giro dentado en el hipocampo (Shukla y col, 2005).

Por otro lado, en el genoma y la retina de pez cebra, existirían tres de las cuatro enzimas descritas en los mamíferos con actividad catalítica extracelular, las NTPDasas 1, 2 y 3 (Ricatti y col, 2009; 2011). La NTPDasa1 se encuentra predominantemente localizada en la retina interna, principalmente en las capas sinápticas y en las células ganglionares y sus axones, aunque también se detectó más débilmente en la OPL y en la capa de los fotorreceptores. En contraste, la NTPDasa2 se localiza principalmente en la OPL y con mucha menor intensidad en la IPL. Ambas enzimas además son expresadas por células progenitoras de la CMZ (Ricatti y col, 2009).

10. Rol fisiológico de los nucleótidos extracelulares en el sistema nervioso de los vertebrados

El ATP ha sido descrito como una molécula fundamental en la comunicación intercelular tanto en el cerebro como en la médula espinal y en las neuronas sensoriales. Se observó, además, en distintos tipos neuronales, que el ATP es almacenado en vesículas y es liberado, no sólo a nivel de los terminales sinápticos, sino también en los somas (Zhang y col, 2007) y a lo largo del axón (Hamilton y col, 2008). Se conoce actualmente que existe una comunicación activa entre las células de la glia y las neuronas a través de la liberación de ATP, la cual modularía procesos como la diferenciación y la plasticidad celular, tanto durante el desarrollo del sistema nervioso (Verderio y Mattioli, 2011) como en la maduración postnatal. Asimismo, el ATP liberado por las células de la glia regularía la comunicación entre neuronas (Gordon y col, 2005). Los receptores purinérgicos también juegan un papel muy importante en la señalización entre células gliales, así como entre células gliales y neuronas (Fields y Burnstock, 2006).

En el desarrollo embrionario, se ha descrito un rol esencial de los nucleótidos y nucleósidos extracelulares durante la formación de sinapsis y dendritas, la proliferación y migración de precursores celulares y la diferenciación y muerte de progenitores celulares (Fields y Burnstock, 2006; Zimmermann, 2006; Dale, 2008; Burnstock y Ulrich, 2011).

Por otro lado, en la fisiología de los sistemas sensoriales, se ha descrito la participación de los receptores purinérgicos P2X y P2Y en la transmisión sináptica en el órgano de Corti (Housley y Gale, 2010). Asimismo, los receptores P2X5 y P2X7 participan en la señalización extracelular que controla la regeneración celular epitelial en los corpúsculos gustativos (Kataoka y col, 2004).

11. Los nucleótidos en la retina de vertebrado

En el tejido retiniano, las señales purinérgicas juegan también, así como en otras regiones del sistema nervioso, un rol fundamental mediando la comunicación intercelular entre neuronas y entre éstas y las células de la glia (Newman, 2004, 2006). Además, los nucleótidos y nucleósidos extracelulares actúan como neurotransmisores clásicos (en el caso del ATP o UTP) o neuromoduladores (ADP, UDP y adenosina) regulando la actividad neuronal y glial en la retina (Newman, 2004, 2006; Hartwick y col, 2004).

Diversos estímulos provocan liberación de ATP, por ejemplo, frente a un estímulo mecánico las células de Müller liberarían ATP, que al convertirse a adenosina en el medio extracelular, inhibe la actividad eléctrica de las células ganglionares (Newman, 2006).

Estudios realizados en cultivos de retinas embrionarias de pollo demostraron que el tratamiento con concentraciones micromolares de ATP exógeno induce la proliferación de células retinianas a través de la activación de receptores P2Y₁ (França y col, 2007). Se demostró además, que el tratamiento *in vivo* con ATP exógeno acelera la división mitótica a través de aumentos transitorios del Ca²⁺ intracelular vía receptores P2Y. Este efecto provocó

un aumento de la proliferación celular y la formación de embriones de pollo con ojos de mayor tamaño (Sanches y col, 2002). También se describió que el ATP liberado a través de hemicanales desde el epitelio pigmentario, induce proliferación en la retina de embriones de pollo (Pearson y col, 2005; Martins y Pearson, 2008).

En embriones de *Xenopus laevis* se demostró que la sobre-expresión de la NTPDasa2 (que hidroliza ATP extracelular a ADP) induce la aparición de ojos ectópicos, mientras que la inhibición de su expresión, impide la formación de estructuras oculares, incluyendo la retina (Massé y col, 2007). Este efecto estaría mediado por receptores P2Y₁ que regularían la expresión de *pax6* y la formación de las estructuras oculares (Gehring e Ikeo, 1999; Massé y col, 2007).

En diversos sistemas celulares, se ha sugerido que algunas de las moléculas que controlan el ciclo celular estarían reguladas por señales purinérgicas (Heo y Han, 2006; Martins y Pearson, 2008). No obstante, el mecanismo molecular por el cual ocurre esta regulación no ha sido elucidado.

Se demostró que la activación de receptores de factores de crecimiento, o receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, induce la proliferación de células de Müller en cultivo. Por ejemplo, la estimulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) acelera la velocidad de síntesis de ADN en las células de Müller. Además, se describió que cultivos primarios de células de Müller de cobayo adulto expresan distintos tipos de receptores P2Y, pero no P2X o P1. La unión de ATP a dichos receptores produciría cambios en la corriente de Ca²⁺ hacia la célula de Müller, induciendo su reingreso al ciclo celular y proliferación. La proliferación excesiva de la glia o gliosis, como ocurre en los mamíferos para reparar el tejido dañado en el proceso de cicatrización, está asociada a alteraciones en las corrientes de Ca²⁺ debidas a cambios de sensibilidad de los receptores P2 al ATP (Milenkovic y col, 2003; Weick y col, 2005).

Por otra parte, la adenosina, no tendría efectos importantes sobre la proliferación de progenitores retinianos durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario o tendría un leve efecto inhibitorio (Sugioka y col, 1999). Los receptores P1, durante el desarrollo embrionario, aparecen en las células postmitóticas en diferenciación y el rol preponderante para la adenosina parece centrarse en la supervivencia celular (Fredholm, 1997; Martins y Pearson, 2008).

Finalmente, se describió que las células de Müller exhiben aumentos transitorios en sus niveles de calcio intracelular ya sea por estimulación lumínica de la retina o por activación eléctrica de los axones de las células ganglionares. La señal liberada por las células ganglionares en respuesta a ambos estímulos, y que induciría la activación de las células de Müller, es el ATP y su efecto es potenciado por la adenosina (Newman, 2005).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

En este trabajo de tesis doctoral se propone a los nucleótidos y nucleósidos (NT/NS), en particular el ATP, ADP y/o la adenosina, como señales extracelulares necesarias para la activación, división mitótica y/o neuroprotección de las células precursoras que llevan a la regeneración morfológica y funcional de la retina adulta de pez cebra luego de una lesión citotóxica.

Los NT/NS extracelulares ejercerían dicha acción biológica a través de receptores purinérgicos específicos. Además de interactuar con estos receptores, los nucleótidos extracelulares podrían ser hidrolizados por una familia de ecto-enzimas llamada E-NTPDasa.

En la retina de pez cebra se expresarían NTPDasas, enzimas de membrana plasmática que regulan los niveles extracelulares de NT/NS, cumpliendo un importante rol en la señalización mediada por este sistema de comunicación intercelular que en conjunto se denomina sistema purinérgico.

Luego de inducida la lesión, grandes cantidades de ATP serían liberadas al medio extracelular por las células retinianas dañadas. Ya sea el ATP liberado o su conversión a ADP por las NTPDasas, y luego a adenosina, mediaría la regulación de la división mitótica y la muerte celular.

En conclusión, se postula que el sistema de señalización purinérgica (formado por los NT/NS, las enzimas de membrana plasmática que los hidrolizan y los receptores purinérgicos específicos) regularía la inducción de la proliferación de células progenitoras presentes tanto en la retina madura como en la zona ciliar marginal, así como la reparación del tejido, independientemente del grado de lesión.

Objetivos:

Objetivo general:

Los peces son modelos útiles para estudiar retinogénesis ya que, a diferencia de los mamíferos, desarrollan su retina casi completamente durante la etapa postnatal y conservan el crecimiento retiniano durante su vida adulta. Asimismo, la retina de pez se regenera funcional y morfológicamente en respuesta al daño (Raymond y Hitchcock, 1997). Este modelo, por consiguiente, permite estudiar los mecanismos que controlan que una célula madura pueda desdiferenciarse, dividirse y dar origen a otros tipos celulares (Stenkamp, 2007).

Durante el desarrollo embrionario en vertebrados, los procesos de división y diferenciación celular son controlados por dos tipos de señales: las señales extracelulares, que regulan que a partir de un único progenitor común multipotente se desarrollen los distintos tipos de células retinianas, y las señales intracelulares, que determinan estadios celulares progresivos de competencia, permitiendo que una célula pluripotente o en diferenciación pueda, o no, responder a una dada señal extracelular. Ambas señales determinan que una célula precursora se divida o experimente una mitosis terminal y prosiga un camino de diferenciación específico.

En este marco, se propone estudiar los mecanismos involucrados en la proliferación celular que subyace a la regeneración de la retina, así como los factores extracelulares que regulan estos procesos.

Objetivos específicos:

Objetivo 1: Evaluar la capacidad regenerativa del tejido retiniano, luego de una lesión citotóxica, independientemente del grado de lesión. Evaluar la capacidad regenerativa de la retina adulta de pez cebra, luego de lesionar el tejido mediante la inyección intraocular de diferentes dosis de ouabaína (2 y 10 μ M final dentro del ojo).

Objetivo 2: Estudiar la activación mitótica de células progenitoras retinianas luego de lesionar el tejido. Examinar si las células precursoras presentes en la retina madura y en la zona ciliar marginal se activan mitóticamente luego de lesionar la retina, tanto en las regiones de tejido retiniano diferenciado como en la zona ciliar marginal.

Objetivo 3: Evaluar el rol de las señales purinérgicas extracelulares en la regulación del proceso de proliferación celular inducido por la lesión así como en la reparación tisular. Estudiar, mediante el uso de agonistas y antagonistas *in vivo*, la participación de las señales purinérgicas extracelulares en la regulación de la proliferación de células progenitoras retinianas presentes en el tejido diferenciado y en la zona ciliar marginal. Además, examinar el rol de los NT/NS en los procesos de muerte celular y regeneración del tejido retiniano.

Objetivo 4: Estudiar la expresión de receptores purinérgicos en la retina de pez cebra. Caracterizar por primera vez en la retina de pez cebra, a través de la técnica de transcripción reversa (RT) y PCR, la expresión de los ARN mensajeros de diferentes receptores purinérgicos. Estudiar, mediante inmunohistoquímica y western blot, la expresión proteica de los receptores que podrían estar involucrados en el control de la activación

mitótica inducida por la lesión. Por último, evaluar cambios cuantitativos, inducidos por la lesión, de la expresión de los ARNm (por RT-PCR cuantitativa) y localización (por inmunohistoquímica) de dichos receptores.

Objetivo 5: Estudiar variaciones en la expresión de las NTPDasas en la retina de pez cebra inducidas por la lesión del tejido. Evaluar, mediante la técnica de RT y PCR cuantitativa, la expresión de los ARN mensajeros de las principales enzimas encargadas de regular los niveles extracelulares de nucleótidos, antes y después de inducida la lesión, así como la localización de las mismas mediante inmunohistoquímica.

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

Reactivo/Droga	Empresa	Utilización	Concentración
Sodio Lauril sulfato (SDS)	GenBiotech	Extracción ARN Western blot	1% P/V 0,05; 1; 4% P/V
Kit Total RNA Extraction	RBC Biosciences, Taiwan	Extracción ARN	
Beta-mercaptoetanol	BioRad	Extracción ARN	1% P/V
Agua destilada estéril libre de ARNasas y ADNasas		Extracción ARN Retro- transcripción PCR no cuantitativa PCR cuantitativa	Volumen necesario
Etanol	Merck	Extracción ARN	solución 70%
Random Primers	Invitrogen Corp., USA	Retro- transcripción	300 ng
dNTPs Mix	Invitrogen Corp., USA	Retro- transcripción	10 mM
FS (First Strand) Buffer	Invitrogen Corp., USA	Retro- transcripción	5x
MMLV (enzima retrotranscriptasa del virus de la leucemia de murino Moloney)	Invitrogen Corp., USA	Retro- transcripción	200 U/μl por reacción de 20μl
DTT (ditiotreitól)	Invitrogen Corp., USA	Retro- transcripción	0,1 M
RNaseOUT (inhibidor de ARNasas)	Invitrogen Corp., USA	Retro- transcripción	40 U/μl por reacción de 20 μl
Agarosa	GenBiotech	Electroforesis	2% P/V
Go Taq Buffer	Biodynamics SRL, Argentina	PCR no cuantitativa	5x
dNTPs Mix (mezcla de desoxirribonucleótidos)	Biodynamics SRL, Argentina	PCR no cuantitativa Retro-transcripción	1 mM

Primers MIX (sentido y anti-sentido)	Invitrogen Corp., USA	PCR no cuantitativa PCR cuantitativa	10 μ M
Go Taq ADN Polimerasa	Biodynamics SRL, Argentina	PCR no cuantitativa	5 U/ μ l
ADNasa I	Biodynamics SRL, Argentina	Purificación de ARN	5-10 U/ μ l por reacción de 90 μ l
Mezcla real	Biodynamics SRL, Argentina	PCR cuantitativa	2x
Paraformaldehído (PFA)	Sigma-Aldrich, USA	Preparación del tejido	solución 4%
Solución salina estéril	Farmacity, Argentina	Inyección intravítrea	solución 0,65% con H ₂ O d estéril
5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU)	Sigma-Aldrich, USA	Inyección intravítrea	8 ó 20 g/l
MS-222 (Tricaína)	Sigma-Aldrich, USA	Anestésico utilizado para peces	0,02% P/V
ARL 67156 (Inhibidor selectivo de actividad ecto- ATPasa)	Tocris Bioscience, UK	Inyección intravítrea	100 μ M
Hexoquinasa	Sigma-Aldrich, USA	Inyección intravítrea	20 U/ml
Apirasa	Sigma-Aldrich, USA	Inyección intravítrea	20 U/ml
Ouabaína	Sigma-Aldrich, USA	Inyección intravítrea	3 ó 10 μ M
ADP β S	Sigma-Aldrich	Inyección intravítrea	5 ó 25 μ M
ATP γ S	Sigma-Aldrich	Inyección intravítrea	5 ó 50 μ M
Adenosina	Sigma-Aldrich	Inyección intravítrea	5 ó 25 μ M

DMSO	Sigma-Aldrich, USA	Inyección intravítrea	78,13 M
MRS 2211	Tocris Bioscience, UK	Inyección intravítrea	5 μ M
MRS 2179	Tocris Bioscience, UK	Inyección intravítrea	1 μ M
8-SPT	Sigma-Aldrich, USA	Inyección intravítrea	10 μ M
NF 157/110	Tocris Bioscience, UK	Inyección intravítrea	5 μ M/5 μ M
NaCl	Sigma-Aldrich, USA	Buffer Fosfato Salino (PBS) Western blot	137 mM 150mM; 0,7M
KCl	Sigma-Aldrich, USA	Buffer Fosfato Salino (PBS)	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, USA	Buffer Fosfato Salino (PBS)	5,7 mM
Gelatina de piel porcina	Sigma-Aldrich, USA	Solución de gelatinización	2% P/V
Alúmina de cromo	Denver Argentina	Solución de gelatinización	0,05% P/V
Tween-20 (detergente)	Sigma-Aldrich, USA	PBST y TBST)	0,1 % V/V
Tritón X-100	Sigma-Aldrich, USA	Buffer de lisis	0,5%
Sacarosa	Sigma-Aldrich, USA	Preparación del tejido	5; 10 y 20% P/V
Cryoplast (medio para cortar en crióstato)	Biopack, Argentina	Preparación del tejido	solución ½
Violeta de Cresilo	Sigma-Aldrich, USA	Coloración de Nissl	1%
Acido Clorhídrico	Cicarelli, Arg	Inmunohistoquímica	2 N

Vectashield	Vector Laboratories, USA	Inmunohistoquímica (IHQ)	Cantidad necesaria
Medio de montaje sintético	BIOPUR SRL, Argentina	Inmunohistoquímica (IHQ)	Cantidad necesaria
Acido acético glacial	Cicarelli, Arg	Preparación del tejido	2 M
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company, USA	Inmunohistoquímica (IHQ)	Cantidad necesaria
Suero normal de cabra (SNC)	Natocor, Argentina	Inmunohistoquímica (IHQ)	3 y 5% V/V
Anticuerpo policlonal P2Y ₁	Invitrogen	Inmunohistoquímica Western blot	1:100 1:300
Anticuerpo policlonal mN2-36	Dr. Jean Sevigny, Université Laval, Québec, Canadá	Inmunohistoquímica (IHQ)	1:100
Anticuerpo monoclonal SV2	Developmental Studies Hybridoma Bank, USA	Inmunohistoquímica (IHQ)	1:2000
Anticuerpo monoclonal contra Glutamina Sintetasa (GS)	BD Biosciences, USA	Inmunohistoquímica	1:200
Anticuerpo monoclonal contra BrdU	Roche, USA	Inmunohistoquímica	1:200
Anticuerpo Alexa 488	Invitrogen Corp.,	Inmunohistoquímica	1:400
Anticuerpo Alexa 546	Invitrogen Corp.,	Inmunohistoquímica	1:400
Anticuerpo monoclonal contra Calretinina	Chemicon, USA	Inmunohistoquímica	1:500
Tris-base	Sigma Aldrich	Western blot	25 mM; 100 mM
Leche descremada en polvo	Svelty, Nestlé	Western blot	3% P/V

Rojo Ponceau	Sigma-Aldrich	Western blot	0,2%
Anticuerpo contra conejo, acoplado a la peroxidada de rábano picante (HRP)	Bio-Rad, CA	Western blot	1:3000
Membrana de Nitrocelulosa para transferir proteínas separadas por page	Amersham Biosciences UK	Western blot	Cantidad necesaria
ECL: sustrato quimioluminiscente de La peroxidasa de rábano HRP	Amersham Biosciences UK	Western blot	1 ml por membrana
BSA (Albúmina de suero bovino)	Sigma Aldrich USA	Lowry	2,5-40 µg
SDS	Sigma-Aldrich	Western blot	3,46 mM
Inhibidor de proteasas	Roche	Western blot	1 pastilla/10ml buffer de lisis
Acido tricloroacético	Sigma-Aldrich, USA	Western blot	3%
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, USA	Western blot	100 mM
Metanol	Cicarelli, Arg.	Western blot	20 % V/V
Glicina	Sigma-Aldrich	Western Blot	200 mM
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Western Blot	30% P/V
Bisacrilamida	Sigma-Aldrich	Western Blot	0,8% P/V
Azul de Coomassie	Sigma-Aldrich	Western Blot	0,25% V/V
kit de detección denominado <i>In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein</i>	Roche	TUNEL	Cantidad necesaria

Tabla B. Materiales utilizados para el desarrollo de los experimentos de esta tesis de doctorado.

2. Animales en el laboratorio

2.1. Mantenimiento

Como modelo experimental se utilizó el pez cebra (*Danio rerio*) adulto. Los peces fueron adquiridos en un acuario local (Ichthys, Buenos Aires, Argentina) y aclimatados a las condiciones del laboratorio, durante al menos dos semanas, en peceras con agua libre de cloro, aireadas constantemente, con una conductividad entre 400 y 800 μS , un pH entre 6,8 y 7,5 y una temperatura de $28 \pm 0,5$ °C. Se realizaron cambios parciales del volumen de agua varias veces por semana, reemplazando el volumen extraído de la pecera con agua limpia y filtrada con carbón activado.

Además, los peces fueron alimentados dos veces por día con alimento balanceado para peces tropicales Vita Fish y con *Artemia sp.* preparada diariamente. Los peces utilizados para los distintos experimentos fueron mantenidos bajo un ciclo diario de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. El tamaño de los peces fue de alrededor de 3,5 cm de longitud céfalo-caudal.

3. Inyecciones intraoculares

3.1. Anestesia e inyección de los animales

Antes de realizar una inyección intraocular o previamente al sacrificio, los peces fueron anestesiados con una solución conteniendo MS222 (20 mg/100 ml de agua de la pecera). Una vez anestesiados, fueron mantenidos húmedos sobre una plataforma a temperatura ambiente y se les empaparon las branquias continuamente con agua de la pecera aireada, conteniendo el anestésico, para permitir el intercambio gaseoso.

Bajo un microscopio de disección con una jeringa Hamilton de 10 μl acoplada a una aguja con una punta biselada de 33 G, los compuestos experimentales o el vehículo fueron inyectados en el ojo izquierdo de cada animal. Las inyecciones se realizaron dentro de la

cavidad vítrea, detrás del cristalino, teniendo cuidado de no tocar el tejido retiniano, que tapiza el fondo y parte de los laterales del interior del globo ocular.

Se inyectó un volumen de entre 0,5-0,6 μl en cada ojo, dependiendo del tamaño del animal.

Los peces toleran muy bien tanto la anestesia como las inyecciones intraoculares repetidas.

En los casos en los que fue necesario aplicar una droga durante varios días, las inyecciones subsiguientes se realizaron utilizando el mismo orificio perforado por la primera inyección, para evitar dañar excesivamente el globo ocular y además para asegurar que la droga fuera inyectada aproximadamente en el mismo sitio del vítreo antes de difundir.

3.2. Compuestos inyectados: ouabaína, enzimas que hidrolizan nucleótidos, agonistas y antagonistas de receptores purinérgicos y un marcador de proliferación celular

- Ouabaína: tóxico metabólico que bloquea la bomba sodio/potasio (Na^+/K^+) ATPasa.
- BrdU: análogo de la timidina que se incorpora al ADN en la fase S del ciclo celular.
- Apirasa: nucleósido trifosfato difosfohidrolasa, remueve los fosfatos de las posiciones γ y β .
- Hexoquinasa: hidroliza ATP produciendo D-hexosa fosforilada y ADP.
- ADP β S: agonista de receptores activados por ADP.
- ATP γ S: agonista de receptores activados por ATP.
- Adenosina: agonista de receptores P1.
- ARL67156: análogo del ATP e inhibidor selectivo de ecto-ATPasas. No posee acción sobre receptores purinérgicos.
- 8-sulfofenil teofilina (8-SPT): antagonista competitivo de los receptores P1 de adenosina (K_i : 1,2 μM).

- NF 110: antagonista de receptores P2X3 de alta afinidad (IC50: 0,527 μ M; Ki: 36/82/4144 nM para los receptores activados por ATP P2X3/X1/X2, respectivamente) no muestra actividad sobre los receptores P2Y₁/Y₂/Y₁₁ (IC50 >10 μ M).
- NF 157: potente antagonista de los receptores P2Y₁₁ (IC50: 0,463 μ M). Presenta mucha mayor selectividad para los receptores activados por ATP P2Y₁₁ y P2X1 comparado con los receptores P2Y₁/Y₂, P2X2/X3/X4/X7.
- MRS 2179 (Ki 100 nM, IC50: 0,330 μ M): antagonista competitivo del receptor P2Y₁. Presenta mucha mayor selectividad por dicho receptor comparado con los receptores P2X1, P2X3, P2X2, P2X4, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆.
- MRS 2211 (IC50: 1,07 μ M): antagonista competitivo del receptor activable por ADP P2Y₁₃, presenta 20 veces más selectividad que sobre los receptores P2Y₁.

3.3. Protocolo de lesión con ouabaína

La lesión con ouabaína consiste en una lesión de tipo químico y citotóxica, ya que esta droga bloquea la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa. Dicha bomba produce un movimiento neto de una carga positiva hacia el espacio extracelular por ciclo, ya que intercambia 3 iones Na⁺ por sólo 2 iones K⁺. La ouabaína bloquea la extrusión activa de Na⁺ dependiente de K⁺, compitiendo por los sitios de fijación de K⁺ de la bomba en la cara externa de la membrana celular. Se produce así un desequilibrio osmótico en la célula, que provoca la entrada de agua a las mismas, causando finalmente su muerte.

Luego de anestésiar a los peces, se les inyectó intraocularmente ouabaína en el ojo izquierdo. Se inyectó un volumen de 0,6 μ l en una concentración de 3 μ M ó 14 μ M (de acuerdo a si se requería realizar una lesión parcial o global de la retina, respectivamente) en solución salina (NaCl 0,65%). La concentración final intravítrea de ouabaína fue de 2 μ M ó de 10 μ M, según cálculos realizados utilizando el volumen del globo ocular y restando de

éste el volumen del cristalino. El volumen del vítreo se calculó alrededor de 0,24 μl en promedio (Fimbel y col, 2007).

Como control se utilizaron peces cebra inyectados con 0,6 μl de solución salina también en el ojo izquierdo. El día de la inyección con ouabaína se consideró como día cero (d0).

3.4. Exposición de los peces cebra a BrdU para determinar proliferación celular

Con el objetivo de estudiar la actividad proliferativa de las células progenitoras retinianas se realizaron inyecciones de BrdU. Luego se sacrificó a los peces cebra, como se describió anteriormente, y los cortes de tejido retiniano se utilizaron para la detección de BrdU por inmunohistoquímica de fluorescencia, utilizando un anticuerpo específico dirigido contra este análogo de la timidina.

La BrdU se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular, por lo tanto, las células que replicaron su ADN durante el periodo de exposición a BrdU incorporaron dicho análogo nucleotídico y lo transmitieron luego a sus células hijas. Esto ocurriría varias horas después de la exposición al análogo, si las células proliferativas progresaron a las siguientes fases del ciclo celular y se dividieron mitóticamente. De esta manera, la proliferación celular determinada corresponde a células en actividad de fase S, recientemente postmitóticas, o aún proliferativas y que se dividieron una o más veces, de acuerdo a que estadio del ciclo celular se encontraban esas células en el momento del sacrificio del animal.

3.4.1. Tiempo de exposición a BrdU

Para detectar el pico de proliferación inducido por la lesión con ouabaína, grupos de peces fueron inyectados con solución salina (grupo control) o con ouabaína (10 μM) en el día 0. Luego, los peces fueron inyectados intraocularmente con 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BrdU a los días 0 (sólo el grupo control), 4, 6, 10, 13 o 27 (grupos lesionados) y luego de 24 horas fueron sacrificados.

Cuando el objetivo de los experimentos fue estudiar el efecto de diferentes compuestos en el aumento de la proliferación inducida por la lesión, grupos de peces fueron inyectados intraocularmente una vez por día durante 6 días con 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BrdU y fueron sacrificados en el día 7.

4. Grupos experimentales

En la serie de experimentos en los que se estudió proliferación celular en la retina, las inyecciones de BrdU y los agonistas, antagonistas, o enzimas, se realizaron simultáneamente.

A continuación se detallan los grupos experimentales utilizados, con los respectivos intervalos estudiados:

Tabla C. Efecto del tratamiento con enzimas que hidrolizan nucleótidos extracelulares sobre la proliferación celular inducida por la lesión parcial con ouabaína.

Grupo	Día 0	Días 1-6
1	Solución Salina	8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BrdU en Solución Salina
2	3 μM Ouabaína	20 U/ml Apirasa + 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BrdU en Solución Salina
3	3 μM Ouabaína	20 U/ml Apirasa inactivada + 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BrdU en Solución Salina
4	3 μM Ouabaína	20 U/ml Hexoquinasa + 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BrdU en Solución Salina
5	3 μM Ouabaína	20 U/ml Hexoquinasa inactivada + 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BrdU en Solución Salina

Tabla D. Efecto del tratamiento con un agonista de los receptores P2 (ATP γ S) sobre la proliferación de células progenitoras retinianas.

Grupo	Días 1-6
1	Solución Salina + 20 U/ml Apirasa + 8 μ g/ μ l BrdU
2	Solución Salina + 8 μ g/ μ l BrdU
3	ATP γ S 5 μ M + 20 U/ml Apirasa + 8 μ g/ μ l BrdU en Solución Salina
4	ATP γ S 50 μ M + 20 U/ml Apirasa + 8 μ g/ μ l BrdU en Solución Salina
5	ATP γ S 5 μ M + 8 μ g/ μ l BrdU en Solución Salina
6	ATP γ S 50 μ M + 8 μ g/ μ l BrdU en Solución Salina

Tabla E. Efecto del tratamiento con un agonista de los receptores P2 (ADP β S) sobre la proliferación de células progenitoras retinianas.

Grupo	Días 1-6
1	Solución Salina + 20 U/ml Apirasa + 8 μ g/ μ l BrdU
2	Solución Salina + 8 μ g/ μ l BrdU
3	ADP β S 5 μ M + 20 U/ml Apirasa + 8 μ g/ μ l BrdU en Solución Salina
4	ADP β S 25 μ M + 20 U/ml Apirasa + 8 μ g/ μ l BrdU en Solución Salina
5	ADP β S 5 μ M + 8 μ g/ μ l BrdU en Solución Salina
6	ADP β S 25 μ M + 8 μ g/ μ l BrdU en Solución Salina

Tabla F. Efecto del tratamiento con un agonista de los receptores P1 (adenosina) sobre la proliferación de células progenitoras retinianas.

Grupo	Días 1-6
1	Solución salina + 8 µg/µl BrdU
2	DMSO + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
3	Adenosina 5 µM (en DMSO) + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
4	Adenosina 25 µM (en DMSO) + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina

Tabla G. Tratamiento con un agonista y un antagonista del receptor P2Y₁ en retinas no lesionadas sobre la proliferación celular.

Grupo	Días 1-6
1	Solución salina + 8 µg/µl BrdU
2	1 µM MRS2179 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
3	ADPβS 5 µM + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
4	ADPβS 5 µM + 1 µM MRS2179 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina

Tabla H. Tratamiento con antagonistas de receptores P2Y, P2X y P1 en retinas parcialmente lesionadas sobre la proliferación celular

Grupo	Día 0	Días 1-6
1	Solución Salina	8 µg/µl BrdU en Solución Salina
2	3 µM Ouabaína	8 µg/µl BrdU en Solución Salina
3	3 µM Ouabaína	5 µM MRS2211 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
4	3 µM Ouabaína	1 µM MRS2179 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
5	3 µM Ouabaína	10 µM 8-SPT + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
6	3 µM Ouabaína	5 µM NF110 + 5 µM NF157 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina

Tabla I. Efecto de los nucleótidos extracelulares sobre la proliferación celular inducida por la lesión global de la retina.

Grupo	Día 0	Días 1-6
1	Solución Salina	8 µg/µl BrdU en Solución Salina
2	10 µM Ouabaína	8 µg/µl BrdU en Solución Salina
3	10 µM Ouabaína	20 U/ml Apirasa inactivada + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
4	10 µM Ouabaína	20 U/ml Apirasa + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
5	10 µM Ouabaína	100 µM ARL67156 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
6	10 µM Ouabaína	5 µM MRS2211 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
7	10 µM Ouabaína	1 µM MRS 2179 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
8	10 µM Ouabaína	10 µM 8-SPT + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina
9	10 µM Ouabaína	5 µM NF110 +5 µM NF157 + 8 µg/µl BrdU en Solución Salina

5. Preparación de retinas para inmunohistoquímica, TUNEL y tinciones histológicas

Para obtener cortes de retina, los peces cebra fueron sacrificados mediante un corte transversal realizado con una hoja de bisturí a la altura de las branquias, luego de anestesiarlos como se describió previamente.

La disección de los ojos se realizó bajo una lupa (10-25x), con iluminación proveniente de una lámpara fría (halógena con accesorio de fibra óptica) y utilizando instrumental quirúrgico oftalmológico. En presencia de PBS 1X, se realizaron cortes alrededor de la cavidad ocular y luego se seccionó el nervio óptico por detrás del ojo para desprenderlo. Posteriormente, se realizó una incisión en la córnea con una aguja 25 G y se recortó, con una tijera de iridectomía, una ventana circular para extraer la córnea y dejar expuesto el interior del ojo.

Se realizó una leve presión en los laterales del globo ocular para extraer el cristalino a través de la pupila, sin desprender ni dañar la retina. Esta preparación se denomina en inglés "eyecup".

5.1. Fijación de "eyecups" y armado de tacos para cortes con crióstato

Los "eyecups" fueron fijados durante 1 hora en paraformaldehído 4% en buffer PBS 1X a temperatura ambiente y luego incubados sucesivamente en sacarosa 5% y sacarosa 10% en PBS 1X durante 30 minutos. Finalmente, los "eyecups" fueron incubados toda la noche a 4°C en sacarosa 20%.

Al día siguiente, los "eyecups" fueron incubados con una solución 1:1 de medio Cryoplast: sacarosa 20%, durante 25 minutos. Luego, se vertió un poco de la mezcla mencionada en un molde de papel aluminio de aproximadamente 1 cm³, y éste se colocó sobre hielo seco para lograr la solidificación del volumen vertido formando una base. El "eyecup" fue orientado adecuadamente dentro del molde de aluminio e inmediatamente se relleno el molde con más mezcla hasta el borde y se dejó solidificar sobre el hielo seco. Este "taco" una vez solidificado se almacenó en un freezer a -20°C hasta que fue seccionado en el crióstato.

6. Gelatinización de portaobjetos

Portaobjetos de vidrio limpios fueron sumergidos durante 2 minutos en una solución de gelatina 2% y alúmina de cromo 0,05% en H₂O destilada a 45-50°C y luego secados en estufa a 50°C. El procedimiento se repitió 3 veces. Luego los portaobjetos fueron guardados en cajas a temperatura ambiente y protegidos de la humedad hasta el día de su utilización. Este procedimiento permite, y es fundamental para la adherencia del tejido al portaobjetos.

7. Corte de las retinas en el crióstato

Se realizaron cortes transversales de cada "eyecup", desde la superficie dorsal a la ventral, de 10 ó 16 μm en crióstato a -20°C . Los cortes fueron adheridos sobre portaobjetos previamente gelatinizados. Sobre cada portaobjetos se adhirieron entre 10 y 12 cortes de tejido, representando diversas porciones del globo ocular y de la superficie retiniana (**figura 12**).

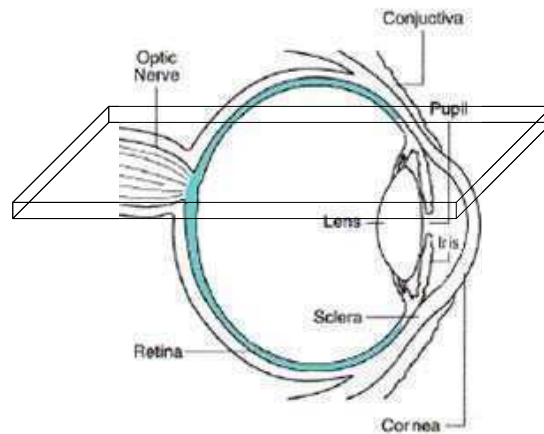


Figura 12. Esquema que indica el plano de los cortes de crióstato (rectángulo transparente) con respecto al globo ocular y sus diferentes estructuras. Lens: cristalino; Sclera: esclera; Conjunctiva: conjuntiva, Optic Nerve: nervio óptico; Pupil: pupila. La retina está indicada en gris, tapizando internamente las paredes póstero-laterales del globo ocular.

Esta orientación de corte permite obtener secciones de tejido en forma de medialuna cuyos extremos contienen la zona ciliar marginal proliferativa (CMZ) y en la parte central, la retina madura totalmente diferenciada. Los cortes se dejaron secar 2-4 horas en una estufa a 37°C y se almacenaron en el freezer a -20°C , en cajas selladas para preservarlos de la humedad, hasta el día de su utilización para los experimentos de inmunohistoquímica, de TUNEL o tinciones histológicas.

8. Tinciones histológicas de Nissl

Estas tinciones se realizaron para observar la ubicación de las capas y tipos celulares en la retina de pez cebra. A través de esta técnica, se evaluó el daño tisular a los distintos días luego de la lesión (dpi).

Los portaobjetos conteniendo cortes de retina se descongelaron y secaron durante una noche en una estufa a 37°C y posteriormente fueron incubados con una solución del colorante violeta de cresilo durante 30 segundos (tinción de Nissl, observándose basofilia nuclear y en los corpúsculos de Nissl, gránulos de retículo endoplasmático rugoso y ribosomas libres) y se sumergieron en agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Luego se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y xileno (o se dejaron secar en una estufa a 37°C) y se montaron con un medio sintético similar al bálsamo de Canadá y cubreobjetos de vidrio.

9. Inmunohistoquímica de fluorescencia

9.1.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia simple

Día 1

Se seleccionaron cortes de tejido retiniano cortados en crióstato que exhibieran un buen aspecto histológico examinado con un microscopio óptico, y se dejaron secar en una estufa a 37°C durante toda la noche y luego por 10 minutos a 50°C. A continuación, los portaobjetos se rotularon de acuerdo a su condición experimental y se incubaron en PBST durante 10 minutos. Las incubaciones de los portaobjetos conteniendo los cortes de retina con los distintos anticuerpos se realizaron en recipientes de plástico con tapa hermética, conteniendo agua destilada, a modo de cámara húmeda, con el fin de evitar la evaporación de la solución de incubación.

El primer paso consistió en realizar un bloqueo de la unión inespecífica de anticuerpos, incubando durante 1 hora los cortes de retina con 150 µl de suero normal de cabra (SNC) al

5% en PBST 1X. La solución de bloqueo se colocó sobre el portaobjetos cubriendo todos los cortes de retina y sobre éstos se depositó suavemente una lámina rectangular de parafilm para evitar la deshidratación de la solución de incubación.

Luego, se realizó la incubación con 150 µl de una solución conteniendo el anticuerpo primario en SNC al 3% (en PBST 1X), durante toda la noche a 4°C. Durante la incubación, los cortes fueron cubiertos con parafilm. Se probaron varias diluciones de la solución de incubación para encontrar las concentraciones óptimas de cada anticuerpo primario, a partir de las concentraciones especificadas por los proveedores o de la información hallada en la literatura científica.

En los ensayos para la detección de células proliferativas en la retina de pez cebra se utilizaron exclusivamente portaobjetos con secciones de retinas provenientes de peces que fueron inyectados intraocularmente con BrdU. Previamente al tratamiento con la solución de bloqueo, dichos portaobjetos se incubaron con HCl 2N a 37°C durante 15 minutos. Este tratamiento desnaturaliza al ADN en los núcleos celulares permitiendo la detección de BrdU con un anticuerpo monoclonal específico. Luego se lavó cuidadosamente con PBST 1X y se prosiguió con el protocolo general indicado para todas las inmunohistoquímicas.

Día 2

Se quitó cuidadosamente el parafilm de los portaobjetos y se realizaron lavados por un tiempo total de 40-50 minutos con PBST 1X, para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido al tejido. Luego, se realizó una incubación de 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente.

Se realizaron lavados (en oscuridad) para eliminar el anticuerpo secundario no unido específicamente durante 40-50 minutos con PBST 1X. Por último, se realizó un lavado con agua destilada para eliminar la presencia de sales.

Finalmente, los cortes fueron montados utilizando medio de montaje para fluorescencia y un cubreobjetos de vidrio. Se sellaron los contactos entre el portaobjetos y el cubreobjetos con esmalte de uñas. Se guardaron los cortes en oscuridad a 4°C hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia o confocal.

En paralelo con cada incubación se realizaron 2 controles:

- Omisión del anticuerpo primario (control sin primario), que evidencia posible unión inespecífica del anticuerpo secundario a cualquier otro epitope presente en el tejido.
- Omisión del anticuerpo secundario (control sin secundario), que permite descartar autofluorescencia del tejido y/o algún otro tipo de fluorescencia inespecífica.

En los portaobjetos en los que se realizó la omisión de alguno de los dos anticuerpos se colocó SNC 3% en PBST 1X.

9.1.2. Inmunohistoquímica de fluorescencia doble

Día 1

Se procedió de igual manera que lo descrito previamente para la inmunofluorescencia simple, pero en este caso, se incubaron los cortes de tejido con una solución conteniendo ambos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C.

Día 2

Se procedió de manera similar que durante el día 2 descrito para la inmunofluorescencia simple, aunque en este caso se detectó la unión de ambos anticuerpos primarios utilizando una solución conteniendo dos anticuerpos secundarios conjugados a dos fluoróforos diferentes. Los anticuerpos secundarios reconocieron la región constante (Fc) de uno de los anticuerpos primarios ya sea de conejo o de ratón.

Las concentraciones finales de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se indican en la tabla B de Materiales.

9.2. Anticuerpos

9.2.1. Anticuerpos primarios utilizados

- Glutamina Sintetasa: anticuerpo monoclonal hecho en ratón dirigido contra la enzima Glutamina sintetasa (GS) que marca el citoplasma de las células de Müller.
- BrdU: anticuerpo monoclonal hecho en ratón dirigido contra el análogo de timidina bromodeoxiuridina, el cual es incorporado exclusivamente por células mitóticamente activas durante la fase S del ciclo celular. Fue utilizado para la detección de células proliferativas.
- Anticuerpo policlonal denominado mN2-36 dirigido contra la NTPDasa2 de ratón. Se obtuvo mediante la inoculación de conejos con la secuencia del ADN codificante de la NTPDasa2 de ratón ligada en el plásmido pcDNA3 (Vlajkovic y col., 2002; Sévigny y col., 2002).
- Anticuerpo monoclonal SV2, marcador de vesículas presinápticas en las capas plexiformes (sinápticas) tanto externa como interna.
- Anticuerpo policlonal hecho en conejo dirigido contra el extremo C-terminal del receptor purinérgico metabotrópico P2Y₁ de humano.
- Anticuerpo monoclonal hecho en ratón dirigido contra la proteína calretinina, marcador de diversos tipos de células ganglionares y algunos tipos de células amácrinas, que expresan dicha proteína.

9.2.2. Anticuerpos secundarios utilizados

- Alexa 488: anticuerpo de cabra conjugado al fluoróforo Alexa-488, que reconoce anticuerpos primarios producidos en ratón y cuya fluorescencia se percibe en color verde.
- Cy3: anticuerpo de cabra conjugado al fluoróforo Cy3, que reconoce anticuerpos primarios hechos en conejo y cuya fluorescencia se percibe en color rojo.

- Alexa 546 ó Alexa 594: anticuerpos de cabra conjugados a los fluoróforos Alexa-546 ó 594, que reconocen anticuerpos primarios producidos en conejos y cuya fluorescencia se percibe en color rojo.

10. Cuantificación de núcleos que incorporaron BrdU y análisis estadístico

La cuantificación de los núcleos inmunomarcados para BrdU se realizó en 5-6 cortes de retina adheridos a cada portaobjetos, contando los núcleos positivos para BrdU en cada CMZ en los extremos de cada corte retiniano y en la retina madura. Se contaron los núcleos bajo observación directa en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E200, Japan, objetivo 40X-NA: 0,65), desplazando el control micrométrico para identificar cada uno de los núcleos positivos (fluorescentes) en distintas posiciones del foco en el eje Z. Una vez cuantificadas varias secciones de un ojo, el número de núcleos positivos para BrdU se expresó como un promedio por sección ya sea en la retina madura o en la CMZ, obteniéndose un único valor, para cada región, por retina y por pez cebra. Luego, se calculó la media y el desvío estándar por grupo experimental o control. Se compararon los distintos grupos por medio del análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey-Kramer. Los datos en todos los casos mostraron una distribución normal (Test de homocedacia).

En algunos casos, los datos fueron expresados como el número normalizado de células positivas para BrdU por sección y por CMZ para cada pez cebra. Cuando retinas no lesionadas y sometidas a algún tratamiento fueron comparadas con retinas controles no lesionadas, el valor promedio de las retinas no lesionadas e inyectadas con salina (controles no lesionadas) fue tomado como factor de normalización. De la misma manera, cuando se compararon retinas lesionadas y sometidas a algún tratamiento posteriormente a la lesión con retinas lesionadas control (sin tratamiento posterior), el valor promedio de las retinas lesionadas control fue utilizado como factor de normalización. En ningún caso la

normalización de los datos modificó la significancia estadística de las diferencias observadas previamente a la normalización.

11. Determinación de muerte celular

A través del método de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling*) se detectaron roturas en el ADN que se producen en las primeras etapas del proceso de apoptosis. Se utilizó el kit de detección denominado "*In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein de Roche*". Se seleccionaron cortes de tejido retiniano cortados en crióstato, de buen aspecto histológico, y se dejaron secar en una estufa a 37°C durante toda la noche. A continuación, se rotularon los portaobjetos de acuerdo a su condición experimental y se incubaron en PBST durante 10 minutos. Luego, los portaobjetos conteniendo los cortes de tejido retiniano se incubaron 15 minutos a 37°C con HCl 2M. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBST, y se incubaron los cortes durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con transferasa de desoxinucleotidilo terminal (TdT) y fluoresceína-dUTP. Luego se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBST, y se montaron los portaobjetos según se describió para la inmunofluorescencia. Se utilizaron como control positivo muestras de tectum óptico de embriones de ratón sometidos a un tratamiento de hipoxia. En los controles negativos se omitió la incubación con TdT. Además, como control, se evaluó el efecto del HCl sobre la muerte celular. No se detectó muerte celular en retinas no lesionadas y tratadas durante 15 minutos con HCl 2M.

12. Cuantificación de núcleos marcados con TUNEL y análisis estadístico

La cuantificación de los núcleos marcados con TUNEL se realizó en 5 cortes de retina adheridos a cada portaobjetos, en cinco campos microscópicos de la retina madura (183²- μm^2). Se contaron los núcleos bajo observación directa en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E200, Japón, objetivo 40X-NA: 0,65), desplazándose con el control

micrométrico en el espesor del corte, para identificar los núcleos fluorescentes en distintas posiciones del foco en el eje Z.

Se calculó la media y el desvío estándar del número de núcleos fluorescentes, expresado por campo microscópico de retina madura y se compararon los distintos grupos por medio del análisis de varianza (ANOVA) seguido de Tukey-Kramer o de Dunnett.

13. Microscopía y análisis de las imágenes

Las imágenes de campo claro y de fluorescencia no confocales fueron adquiridas con un microscopio de epifluorescencia Modelo BX50, Olympus, Tokio, Japón. El programa con el que fueron tomadas las imágenes fue el Image Pro plus. Se utilizó un objetivo de 40x, con NA: 1,25.

Las microfotografías confocales fueron tomadas con un microscopio confocal Modelo FV-1000 Espectral Olympus, Tokio, Japón, utilizando un objetivo 60x; NA: 1,35 de inmersión en aceite. Se utilizó el programa Fluoview, con el cual fueron tomadas las imágenes. El programa Adobe photoshop versión CS2 fue utilizado para el procesamiento de las imágenes.

Las reconstrucciones en dos dimensiones (2D) se realizaron, con el programa Fluoview, a partir de series de micrografías confocales en rebanadas de 1,2 μm de grosor en el eje z y en un plano fijo x-y del campo microscópico.

14. Western Blot

14.1. Preparación de retinas

Se prepararon “*eyecups*” de peces cebra, a partir de los cuales se disecó cuidadosamente la retina neural, en presencia de PBS a 4°C. Los peces fueron previamente adaptados a oscuridad durante 1 hora para facilitar la separación de la retina neural del epitelio pigmentario.

14.2. Procedimiento

Se extrajeron 12 retinas neurales (sin epitelio pigmentario) de pez cebra, que fueron homogeneizadas a 4°C en presencia de 70 µl de buffer de lisis conteniendo 0,5% de tritón X100, con o sin SDS 0.1% e inhibidores de proteasas (la presencia de detergente permitió extraer las proteínas de las membranas celulares). El homogenato se incubó por 10 minutos en hielo y se centrifugó a 14000 xg por 10 minutos. Se descartó el pellet y se utilizó una alícuota del sobrenadante para la cuantificación de proteínas. En geles de poliacrilamida 9% en presencia de SDS (SDS-PAGE) se sembraron por calle 80 µg de proteína de cada una de las muestras y se separaron por electroforesis, junto a marcadores proteicos de peso molecular. Como tejidos de control positivo para el receptor P2Y₁, se utilizaron homogenatos de cerebro de rata y de pez cebra (25 µg de proteína por calle). Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa a 1,8 mA por cm² de membrana durante 1 hora y se detectaron las bandas proteicas transferidas mediante una tinción con rojo Ponceau. Además, se utilizaron marcadores proteicos estándar coloreados para facilitar el monitoreo de la transferencia. Posteriormente, se procedió a la detección de las bandas proteicas específicas correspondientes al receptor P2Y₁.

Cada uno de los siguientes pasos de incubación se realizó colocando las membranas y el medio de incubación dentro de un envoltorio plástico sellado.

Se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con leche descremada al 3% en TBST 1X. Luego de la incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBST 1X.

Posteriormente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario de interés (P2Y₁, dilución 1:300) en TBST 1X. Se realizaron 4 lavados de 10 minutos con TBST 1X, a temperatura ambiente en agitación. Luego, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con un anticuerpo secundario acoplado a HRP dirigido contra anticuerpos de conejo (1:3500 en TBST 1X). Por último, se

realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS, y un lavado de 10 minutos con TBS 1X. Se utilizó un sustrato quimioluminiscente de la HRP denominado ECL para la detección de las bandas proteicas específicas. Para la visualización y captura digital de las imágenes quimioluminiscentes se utilizó un equipo denominado G-Box (Syngene)

14.3. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Se realizó para cada medición de proteínas una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA) de 2,5; 5; 10; 20; 30 y 40 μg . Tanto los puntos de la curva como las muestras (diluidas 1:20 ó 1:50) fueron llevados a un volumen final de 100 μl con H_2O . Luego se adicionaron 100 μl de NaOH 1M en cada tubo, se vortexeó e incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 750 μl por tubo de una mezcla de 100 partes de Na_2CO_3 1 parte de tartrato doble de Na^+ y K^+ y 1 parte CuSO_4 2%. Esta solución se vortexeó e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregaron 75 μl de reactivo de Folin: H_2O (1:1) a cada tubo, se vortexeó e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de cada muestra a 750 nm en un espectrofotómetro convencional (Lowry y col., 1951).

15. Actividad de las enzimas apirasa y hexoquinasa

Grupos de peces cebra fueron inyectados intraocularmente con 20 U/ml de apirasa, apirasa inactivada, hexoquinasa o hexoquinasa inactivada y 20 horas más tarde fueron sacrificados.

La inactivación se realizó incubando a dichas enzimas por 5 minutos a 100°C.

Se estimó la actividad ecto-ATPásica de las enzimas apirasa y hexoquinasa dentro del vítreo determinando la cinética de desaparición de ATP agregado en el medio de reacción, utilizando el sistema luciferina-luciferasa (Brown, 1982).

La luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) promueve la producción de luz por oxidación de luciferina dependiente de ATP y puede ser utilizada para determinar las concentraciones de este nucleótido.

El esquema de la reacción de luciferina-luciferasa y sus productos finales de reacción se esquematizan en la **figura 13**.

Para medir la concentración de ATP se utilizó un sistema de detección de luminiscencia de alta sensibilidad, formado por una cámara de medición, un fotomultiplicador, un gabinete impermeable a la luz y un obturador electrónico que regula el paso de luz entre la cámara de medición y el fotomultiplicador. La información se recoge digitalmente (frecuencia de adquisición = 1/seg) utilizando una PC y un programa de adquisición (Sobral v1.01, BA, Argentina).

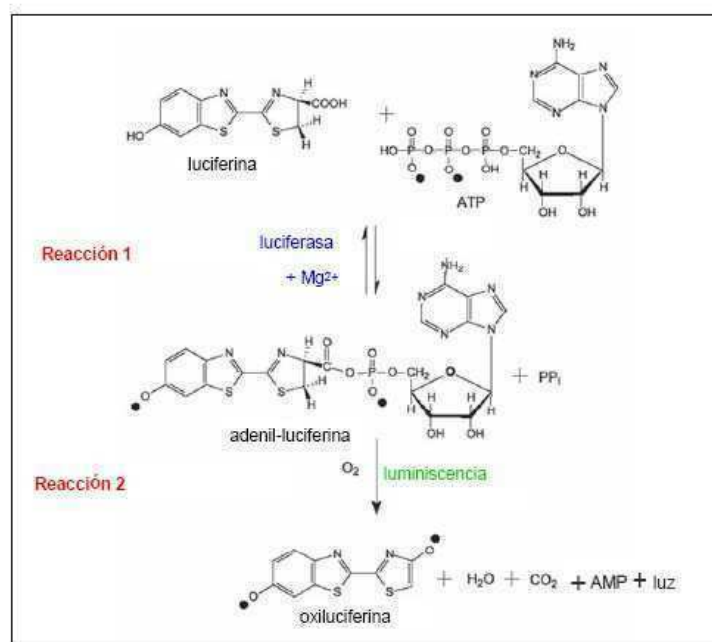


Figura 13. Reacción de luciferina-luciferasa utilizada en la detección de ATP. La luciferina es transformada en oxiluciferina mediante la enzima luciferasa, en una reacción que consume ATP y O_2 , y libera energía en forma de luz. La intensidad de luz es proporcional a la concentración de ATP en el medio de reacción.

Los peces cebra fueron inyectados intraocularmente con 20 U/ml (concentración final) de apirasa, apirasa inactivada, hexoquinasa o hexoquinasa inactivada y 20 horas más tarde fueron sacrificados.

Se prepararon “*eyecups*”, removiendo la córnea, sin derramar el vítreo. En cada experimento se midió la luminiscencia obtenida de los “*eyecups*” expuestos a 200 μ l de medio en ausencia de la enzima luciferasa y en presencia de 1% BSA, 200 μ M luciferina y 100 μ g/ml Coenzima A y 500 nM de ATP (luminiscencia de fondo). Luego, el medio extracelular fue reemplazado por un medio conteniendo 1% BSA, 50 ng luciferasa, 200 μ M luciferina, 100 μ g/ml CoA y 500 nM de ATP y se continuó la medición por aproximadamente 20 minutos (Battista y col, 2009).

La intensidad de luz fue transformada en concentración de ATP utilizando una curva de calibración realizada al final de cada experimento. Se extrajeron los “*eyecups*” de la cámara de medición y se cambió el medio de reacción por medio fresco y se agregó ATP de 2,5 a 540 nM de manera secuencial. Se determinó que una función exponencial decreciente (Ecuación 1) presenta el mejor ajuste a los datos experimentales de ATP vs tiempo:

$$Y=A.e^{(-k.t)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En la ecuación 1 “Y” representa el valor de ATP a tiempo “t” mientras que “A” y “k” son los parámetros de ajuste. La velocidad inicial de la desaparición de ATP (V_i) fue calculada como $V_i=A.k$ (la primer derivada de la Ecuación 1 cuando “t” tiende a 0).

Para cada experimento se utilizaron 6 “*eyecups*” por determinación y por grupo experimental. Cada experimento se repitió 5 veces. Debido a la gran variabilidad obtenida entre cada uno de los ensayos, para el análisis estadístico se realizó un test de Student para muestras pareadas en cada experimento independiente.

16. Transcripción reversa (RT) y PCR estándar y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

16.1. Diseño y selección de *primers*

Sobre la base de la bibliografía publicada y el acceso a bases de datos genómicos y de proteínas *online*, se diseñaron *primers* específicos para secuencias codificantes correspondientes a los genes de pez cebra que resultaron de interés para este trabajo de tesis.

A continuación se detalla el procedimiento utilizado para diseñar dichos *primers*:

Para la búsqueda de las secuencias que codifican para las proteínas mencionadas se utilizaron las siguientes bases de datos:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mlval=aa-ZDB_home.apg

http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index

Una vez conocidos los exones e intrones correspondientes, se priorizaron para la selección los exones vecinos y lejos de los extremos de la secuencia. Cuando fue posible, se eligieron exones separados por un intrón de por lo menos 1000 pares de bases.

Se verificó la ausencia de una posible homología de cada par de *primers* específico para un gen con otras secuencias de genes relacionados. Para esto se obtuvo la secuencia codificante completa de cada gen en <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>.

El objetivo de este procedimiento fue evaluar que los *primers* seleccionados para cada gen no presentaran afinidad por otras secuencias similares, como podría ocurrir entre las isoformas de una misma enzima. De esta forma se aseguró que los *primers* hibridaran exclusivamente con la secuencia para la que habían sido diseñados.

Las secuencias de los *primers* diseñados fueron las siguientes:

Gen	Sentido	Antisentido
18S rRNA (gen de referencia) (ENSDART00000017975)	ACCCTCGCCAGTACAAAATCC	CCTGATCTTCTTCAGCCTCTCC
β-Actina (gen de referencia) (ENSDART00000054987)	TCCCAAAGCCAACAGAGAGAAG	GTCACACCATCACCAGAGTCC
NTPDasa1 (gen de interés) (ENSDART00000066257)	TCACAGACACAGCGAAACCC	GAATGTGCAACGGAGGTAAGC
NTPDasa2 mq (gen de interés) (ENSDART00000043259)	GAGCAGCAGCACGTAGCC	GACCTCAGCCGACTCTTTGG
NTPDasa2 mv (gen de interés) (ENSDART00000051434)	TGATGGAGTCTTTCAGCCCAAC	AGCAGCGTCCTCTAAATGAGC
NTPDasa3 (gen de interés) (ENSDART00000051167)	GGCTGGATCACTGTCAACTACC	CCCAAATCCAATGACCCAACTG
P2Y₁ (gen de interés) (ENSDART00000109100)	TATGGACAATGCTCCGCTTAGG	CGCTCTCATGTTTCAGGTTCTTC
P2Y₂ (gen de interés) (ENSDART00000092965)	TCTGGTGTTTGTGTTCCGGTCTG	ATGTAGATGGTGTGGGCTTCC
P2Y₁₂ (gen de interés) (ENSDART00000102224)	AGCGTCTCCAACAGTTCATCC	GCCAGAGCGTTCAGGGATAATC
P2X1 (gen de interés) (ENSDART00000002866)	GGCAGGTGTATGAACAAAACCC	TCTGCTGTCAGTAGGATTGGAG
P2X2 (gen de interés) (ENSDART00000019461)	GCCAGAGAGAAATTCAGCGAAC	TATGTGGGAATACACGCAGACG
P2X3 (gen de interés) (ENSDART00000021417)	ATTCGCTTCCCTCTCTTTGGTG	AAAGATGGGACAGAACGGATGG
P2X7 (gen de interés) (ENSDART00000062229)	ACACCGAGAGGAAGTTTGAGG	AGGGGTTTTGTCTCCTGTAGTC

Tabla I: *Pimers* utilizados para los experimentos de RT-PCR y RT-PCR cuantitativa.

Una vez elegida la secuencia, y por medio del software Beacon Design, se fijaron parámetros de la reacción de amplificación comunes para todos los genes y se seleccionaron pares de *primers* cuyo funcionamiento resultara predictivamente óptimo bajo estas condiciones. Dichos parámetros fueron temperaturas medias de desnaturalización (*melting*) entre 56 y 60°C, el tamaño del amplicón entre 75 y 150 pares de bases (bp), y que los *primers* sentido y antisentido tuvieran longitudes de 18 a 22 pares de bases y se ubicaran exclusivamente en exones contiguos, salvo en los casos en los que existiera un solo exón (por ejemplo, gen del receptor P2Y₁). Además, el porcentaje de bases GC de los *primers* fue menor del 50%.

16.2. Procedimiento

16.2.1. Obtención de retinas

Para la realización de RT-PCR o RT-qPCR se prepararon “*eyecups*” de peces cebra, a partir de los cuales se disecó cuidadosamente la retina neural a 4°C y en presencia de PBS. Para facilitar la separación de la porción neural de la retina del epitelio pigmentario, los peces fueron adaptados a la oscuridad durante 1 hora.

El material de cirugía, las micropipetas y las bandejas de disección fueron tratados con SDS 1% por 30 minutos, con el objetivo de eliminar ARNasas. De la misma forma, se utilizó PBS y otros materiales esterilizados por autoclave.

Las soluciones utilizadas para la homogenización del tejido, purificación del ARN y para el protocolo de RT y qPCR, al igual que el material descartable, provenían de insumos comerciales desprovistos de ARNasas y ADNasas. En los pasos más sensibles, como la RT, se utilizó un inhibidor de ARNasas.

16.2.2. Lisis del tejido, purificación y extracción del ARN

Para la extracción del ARN se utilizó un kit comercial. Se disecaron 10 retinas por muestra (sin epitelio pigmentario) y se homogeneizaron obteniéndose un lisado que fue transferido a una columna de purificación de ARN. Cada muestra fue tratada con ADNasa1 para degradar fragmentos de ADN genómico. Se cuantificó la cantidad de ARN en alícuotas de cada muestra, midiéndose su absorbancia a 260 nm (OD260), al mismo tiempo que se determinó su pureza por el cociente OD260/OD280, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific Inc), que permite medir los espectros de absorción de las muestras en volúmenes muy reducidos.

16.2.3. Transcripción reversa (RT)

El ARN obtenido se retrotranscribió a ADNcopia (ADNc) mediante la utilización de reactivos comerciales (5x FS buffer, DTT, dNTPs, RNaseOUT y la enzima transcriptasa reversa MMLV). El producto de esta reacción se denominó RT. Paralelamente, se realizó un control negativo o No-RT, en el cual se omitió la enzima MMLV en la reacción de transcripción reversa. Este control negativo también fue utilizado posteriormente en la reacción de amplificación (PCR cuantitativa).

Se separó una alícuota de la muestra RT ó No-RT para la cuantificación y determinación de la pureza del ADNc (y/o ARN), como se mencionó más arriba. Una vez obtenidas las muestras, se realizó PCR estándar o PCR cuantitativa.

16.2.4. PCR estándar y qPCR

Tanto para la PCR estándar como para la qPCR se utilizaron los *primers* específicos descritos previamente y correspondientes a genes de interés (receptores purinérgicos y NTPDasas) y a secuencias de genes seleccionados como referencia endógena, es decir que se supone que se expresan de modo constitutivo en las mismas muestras donde se intentan

detectar los genes de interés. Estos genes de referencia cumplen con la condición de que la expresión de su ARNm no se modifica en respuesta a los tratamientos realizados. De lo contrario, son descartados como genes de referencia.

Para la amplificación del ADNc por PCR estándar se emplearon reactivos comerciales conteniendo la enzima Taq ADN polimerasa con su respectivo buffer, los desoxirribonucleótidos (dNTPs), los *primers* y el templado de ADNc. Se utilizó en todos los casos 1µg de ADNc (o una masa equivalente de ARN de las muestras No-RT).

Los parámetros bajo los que se realizaron estas amplificaciones fueron:

Número de ciclos: 45

Desnaturalización inicial: 95°C 2 minutos

Desnaturalización: 95°C 30 segundos

Hibridación o “*Annealing*”: 58°C 30 segundos

Elongación: 72°C 20 segundos

Elongación final: 72°C 5 minutos

Con los productos de las reacciones de PCR estándar se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en presencia de bromuro de etidio 0,02 mg/100 ml en buffer TBE, y se fotografiaron las bandas (amplicones) correspondientes a cada par de *primers* obtenidas en el gel, por medio del equipo de detección G Box. Se corroboró que el tamaño molecular de cada banda correspondiera con el tamaño del amplicón esperado para cada par de *primers*. Se examinó, además, la presencia de otras posibles bandas o la ausencia de bandas específicas, que pudieran deberse a amplificación del ADN genómico (por contaminación durante la extracción del ARN) o a una pobre eficiencia de los *primers* y/o de las condiciones de la reacción de amplificación, respectivamente. En los casos en los que se observaron bandas de amplificación genómica (de mayor tamaño molecular por la presencia de un intrón pequeño) se realizó la reacción con la ADNasa1 hasta observar la desaparición de dichas

bandas. Finalmente, por precaución, todas las muestras fueron sometidas a esta reacción que elimina los fragmentos de ADN genómico contaminantes.

Para la qPCR también se utilizó 1 µg de ADNc, producto de la reacción de RT, o 1 µg de ARN en el caso de la No-RT. El ADNc de las muestras junto a los *primers* de los genes de referencia o de interés (en tubos de PCR separados y por triplicado) se incubó con una mezcla comercial (Mezcla Real) conteniendo Taq ADN Polimerasa, dNTPs, Mg²⁺, buffer y un fluoróforo verde denominado *cybergreen*. El *cybergreen* se intercala en el ADN, y es necesario para cuantificar los incrementos de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación del ADN, en el que se basa esta metodología. El equipo termociclador para PCR en tiempo real y software que se utilizó para este fin fue el RotorGene 6000 (Quiagen, Valencia, CA).

16.2.5. Análisis de los datos de RT-qPCR

Con el *software* del equipo utilizado se construyó una curva de fluorescencia relativa en función de los ciclos de amplificación (**figura 14**) para cada una de las muestras (en cada tubo de reacción), determinando la fluorescencia emitida al final de cada ciclo.

Se determina un ciclo umbral (C_T) de detección de fluorescencia específica de la muestra, que representa el número de ciclos necesario para detectar un valor de fluorescencia distinto del ruido (*background*). Este ciclo se selecciona en la parte exponencial de la curva de amplificación obtenida. Luego de algunos (pocos) ciclos la curva se hace más lenta y ese valor ya no es útil para cuantificar el nivel inicial de ADNc presente en cada muestra.

Un valor de C_T más bajo indica que una muestra contiene mayor cantidad de ADNc inicial que una muestra con un valor de C_T más alto, siempre y cuando las eficiencias de amplificación en ambas muestras sean equivalentes.

Para determinar la existencia de un cambio relativo en la expresión de los ARN mensajeros se utilizó el método denominado “Gene expression’s C_T Difference” (GED) descrito en detalle por Schefe y colaboradores en el 2006.

Este método compara los valores de C_T de una o varias muestra de **interés (SOI)** con respecto a una muestra **calibradora (Cal S)**, teniendo en cuenta las eficiencias individuales de cada curva de amplificación en cada tubo.

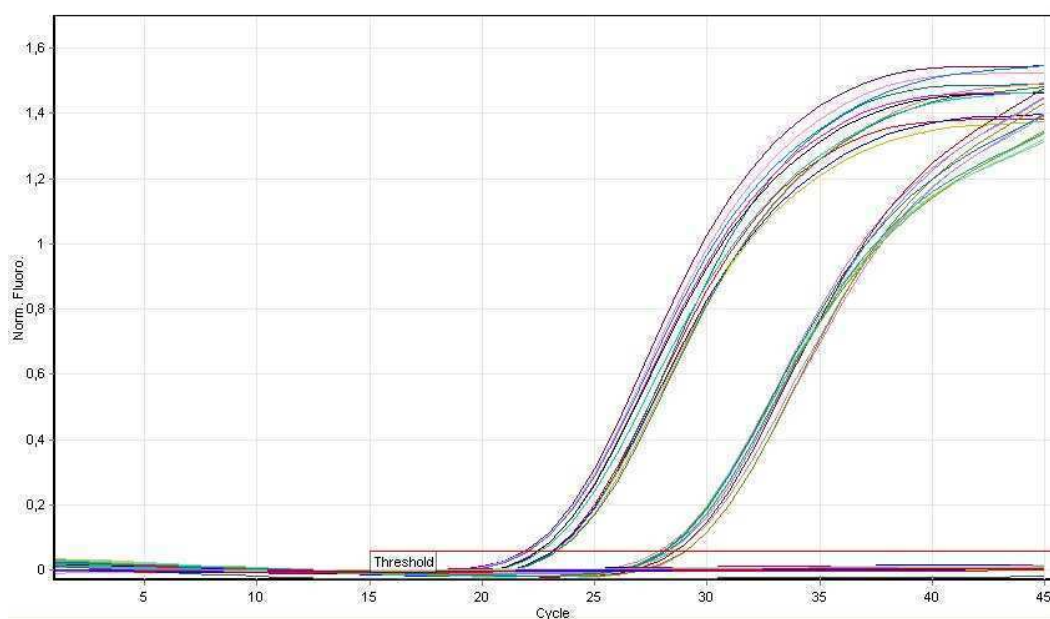


Figura 14. Imagen de las curvas obtenidas durante 45 ciclos de amplificación por PCR, que representan la fluorescencia relativa emitida al final de cada ciclo de amplificación del ADN, detectada por el equipo, en función del número de ciclo. Este tipo de curvas es construido por el software del equipo utilizado durante el ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real en donde se observa la fluorescencia *background* o ruido, hasta aproximadamente el ciclo 20 para el primer grupo de curvas ó el 25 para el segundo grupo (en este ejemplo). Luego se observan las curvas de amplificación en tiempo real (los ciclos 23 al 27 y 28 al 32). Se considera que la amplificación en tiempo real debe darse entre 8 y 35 ciclos para ser considerada amplificación específica. Las curvas correspondientes a las amplificaciones utilizadas como controles negativos (No-RT) no se elevaron de la señal ruido y se observan paralelas al eje X en este ensayo. Threshold: ciclo umbral (C_T) de detección de fluorescencia específica.

Para obtener los valores de eficiencia de amplificación de las diferentes curvas, se procedió de la siguiente manera:

1) Se calcularon las pendientes de las curvas cinéticas de la qPCR, obtenidas como el logaritmo de la cantidad de fluorescencia normalizada después de n ciclos (R_n) graficado en función del número de ciclos (n). Estas curvas fueron obtenidas para cada gen y para cada triplicado. La ecuación 2 describe el rango lineal en la fase exponencial de la curva cinética:

$$\log R_n = \log (1+E)^n + \log R_0 \quad (\text{Ecuación 2})$$

R_0 : cantidad de fluorescencia inicial

E: eficiencia de amplificación.

2) Dentro del rango lineal de la curva, se definió una recta de 4 ó 5 puntos de cada curva, con la mejor pendiente posible y el mayor coeficiente de correlación, y se calculó la eficiencia para cada reacción ($E=10^{\text{slope}-1}$). Se determinó un rango de eficiencias de amplificación de entre 0,86 y 1,2 (Scheffe y col, 2006). Las muestras que presentaron valores de eficiencia en este rango se consideraron muestras aceptables. Las muestras cuyas eficiencias de amplificación estuvieron fuera de este rango fueron consideradas “outliers” y no se consideraron en el análisis.

Para obtener los valores de C_T se eliminó la información correspondiente a los 10-15 primeros ciclos, donde hay emisión de fluorescencia *background*, y se trazó un umbral de fluorescencia relativa arbitrario de 0,06 para cada una de las amplificaciones realizadas. Este valor umbral fue seleccionado ya que corresponde a la región media de la pendiente de la parte exponencial de la curva cuyos valores fueron expresados como fluorescencia relativa. Este valor umbral, seleccionado arbitrariamente, se utilizó con todas las amplificaciones realizadas en este trabajo.

Las muestras de retinas no lesionadas fueron elegidas como muestra calibradora, mientras que las muestras de retinas correspondientes a los días 2, 7 y 15 posteriores a la lesión fueron elegidas como muestras de interés. Los valores de C_T y eficiencia de ambas

muestras (interés y calibradora), fueron previamente normalizados con el gen de referencia (18S rRNA) medido para cada muestra en cada amplificación. El resultado final se expresa como veces de cambio de una muestra de interés con respecto a una muestra calibradora, usando la siguiente fórmula:

$$rER = R_{norm} (SOI) / R_{norm} (Cal S)$$

$$rER = [(1 + E (ref. gene; SOI))^{CT (ref. gene; SOI)} / (1 + E (targ. gene; SOI))^{CT (targ. gene; SOI)}] \cdot [(1 + E (ref. gene; Cal S.))^{-CT (ref. gene; Cal S)} / (1 + E (targ. gene; Cal S))^{-CT (targ. gene; Cal S)}]$$

(Ecuación 3)

rER: cociente de expresión relativa

SOI: muestra de interés

Cal S: muestra calibradora

R_{norm} (SOI) y R_{norm} (Cal S): cantidad inicial de fluorescencia en la muestra de interés (SOI) y en la muestra calibradora (Cal S), respectivamente, del gen de interés normalizada al gen de referencia.

La eficiencia E fue calculada por separado para cada triplicado. Luego los valores fueron promediados antes de aplicarse la Ecuación 3. Los valores de C_T también fueron promediados previamente a la aplicación de dicha fórmula.

Los valores relativos (veces de cambio de la muestra de interés sobre la calibradora) de tres experimentos independientes (cada experimento realizado con un pool de 10 retinas y por triplicado) fueron expresados como media ± desvío estándar. El análisis estadístico se realizó a través de un ANOVA no paramétrico o Kruskal-Wallis, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn's.

17. Recetas de las soluciones

- 1) Solución de gelatinización (gelatina 2% P/V, alúmina de cromo 0,05% P/V, H₂Od).
- 2) PBS 10x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 5,7 mM, H₂Od, pH: 7,4).
- 3) PBS 1x (PBS 10x 10% V/V, H₂Od).
- 4) PBST (Tween-20 0,1% V/V, en PBS 1x).
- 5) Solución de sacarosa (sacarosa 5, 10 y 20% P/V, en PBS 1x).
- 6) PFA 4% (paraformaldehído 4% P/V, en PBS 1x).
- 7) Solución de Cryoplast: Sacarosa 20% (1:1).
- 8) Solución de Violeta de Cresilo (acetato de violeta de cresilo 1% P/V, ácido acético glacial 0,25% V/V, H₂Od).
- 9) Ácido clorhídrico 2 N (Acido clorhídrico fumante (12 N) 16,7 % V/V, H₂Od).
- 10) Solución de SDS (1% P/V, H₂Od).
- 11) Buffer de lisis (homogenato de tejido para Western Blot) (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, Tritón X-100 0,5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas)
- 12) Buffer de corrida 5X para Western blot (Tris Base 25 mM, Glicina 200 mM, SDS 3.46 mM)
- 13) Buffer de transferencia para Western blot (Tris Base 25 mM, Glicina 0.2 M, Metanol 20%)
- 14) Rojo Ponceau (Rojo Ponceau 0.2%, Ácido tricloroacético 30%)
- 15) TBS 10X (NaCl 1,5 M, Tris base 0,2 M, H₂Od, pH: 7,4)
- 16) TBS 1x (TBS 10x 10% V/V en H₂Od).
- 17) TBST (Tween-20 0,1% V/V en TBS 1x).
- 18) Solución de bloqueo para WB (TBS 5x 2 ml, Tween20 10 µl, BSA 1% P/V, leche descremada en polvo 5% P/V, SNC 5% V/V, H₂Od hasta completar 10 ml).
- 19) SNC (Suero normal de cabra: 3 y 5% V/V en PBST 1X)
- 20) Buffer de siembra (*sample buffer*) de las muestras proteicas 2x (Tris HCl pH 6,8 100 mM, SDS 4% P/V, β-mercaptoetanol 10% V/V, Azul de bromofenol 0,1% P/V, glicerol 20% V/V).

21) Gel de poliacrilamida (*running*) 9% (SDS-PAGE) para separar proteínas por sus pesos moleculares mediante una corrida electroforética:

Buffer 4x gel de corrida (<i>running</i>) electroforética	2 ml
Acrilamida-Bis (30%-0,8%)	2,40 ml
Persulfato de Amonio 3%	192 µl
Agua Bidestilada	3,36 ml
TEMED	4 µl
VF	7,956 ml

22) Gel de apilamiento de proteínas (*stacking*):

Buffer 4x de apilamiento de proteínas (<i>stacking</i>)	1 ml
Acrilamida-Bis (30%-0,8%)	520 µl
Persulfato de Amonio 3%	152 µl
Agua Bidestilada	2,3 ml
TEMED	4 µl
VF	3,976 ml

23) Buffer de corrida electroforética (*running buffer*) 5% (Tris base 15,1 g, Glicina 72 g, SDS 5 g, H₂O hasta VF 1 litro).

24) Buffer de transferencia 1% (Tris base 25 mM, Glicina 0,2 M, metanol 20% V/V, H₂O hasta VF 1 litro).

- 25) Acrilamida-Bis solución patrón (Acrilamida 15 g, Bisacrilamida 0,4 g, H₂O hasta VF 50 ml).
- 26) Buffer 4x para el gel de apilamiento de proteínas (*stacking gel buffer*) pH 6,8 (Tris base 6,5 g, SDS 0,4 g, H₂O hasta VF 100 ml).
- 27) Buffer 4x para el SDS-PAGE (*running*) pH 8,8 (Tris base 45,5 g, SDS 1 g, H₂O hasta VF 250 ml).
- 28) TBE 10x (Tris base 5,4% P/V, Acido Bórico 2,75% P/V, EDTA 0,5 M pH 8; 2% V/V, H₂O hasta VF 500ml).

RESULTADOS

Lesión parcial de la retina

1. Análisis histológico de la retina de pez cebra dañada parcialmente con ouabaína

Se evaluó la capacidad regenerativa de la retina de pez cebra luego de una lesión citotóxica inducida por 2 μ M de ouabaína inyectada intraocularmente (concentración final en el vítreo). Está descrito que dicha concentración de ouabaína provoca una lesión parcial del tejido, dañando principalmente a las capas internas de la retina, sin provocar muerte celular en la capa de los fotorreceptores (Fimbel y col, 2007).

La **figura 1** muestra secciones de tejido retiniano control (inyectado con solución salina) y a los días 2, 7, 14, 30 y 60 posteriores a la lesión con ouabaína, teñidas mediante la técnica de Nissl. Luego de la lesión se observó desorganización tisular y pérdida celular, principalmente en las capas internas de la retina, incluyendo células ganglionares, amácrinas y otras células de la INL. Sin embargo, en el día 2 posterior a la lesión se observó un aparente daño en la ONL, ya que se observan agujeros en la zona de los núcleos de los fotorreceptores, aunque como se muestra posteriormente no se detectó muerte celular en esta capa. La zona correspondiente a los núcleos de las células horizontales (ubicadas entre la OPL y la INL) también sufrió desorganización, aunque tampoco se observó muerte celular en dicha capa. La desorganización también fue evidente en ambas regiones sinápticas, con un daño más evidente de la capa sináptica interna. A día 7 luego de inducida la lesión, todas las capas retinianas mostraron una aparente reorganización, sobre todo los núcleos de los fotorreceptores y las células ganglionares. A los 14 dpi, se observó un avanzado grado de reorganización en la INL y en la OPL, siendo más evidente esta reorganización luego de 30 días de inducido el daño. A los 60 días luego de la lesión, se observó una conspicua aunque incompleta recuperación de la estructura retiniana, donde pueden observarse claramente las distintas capas celulares.

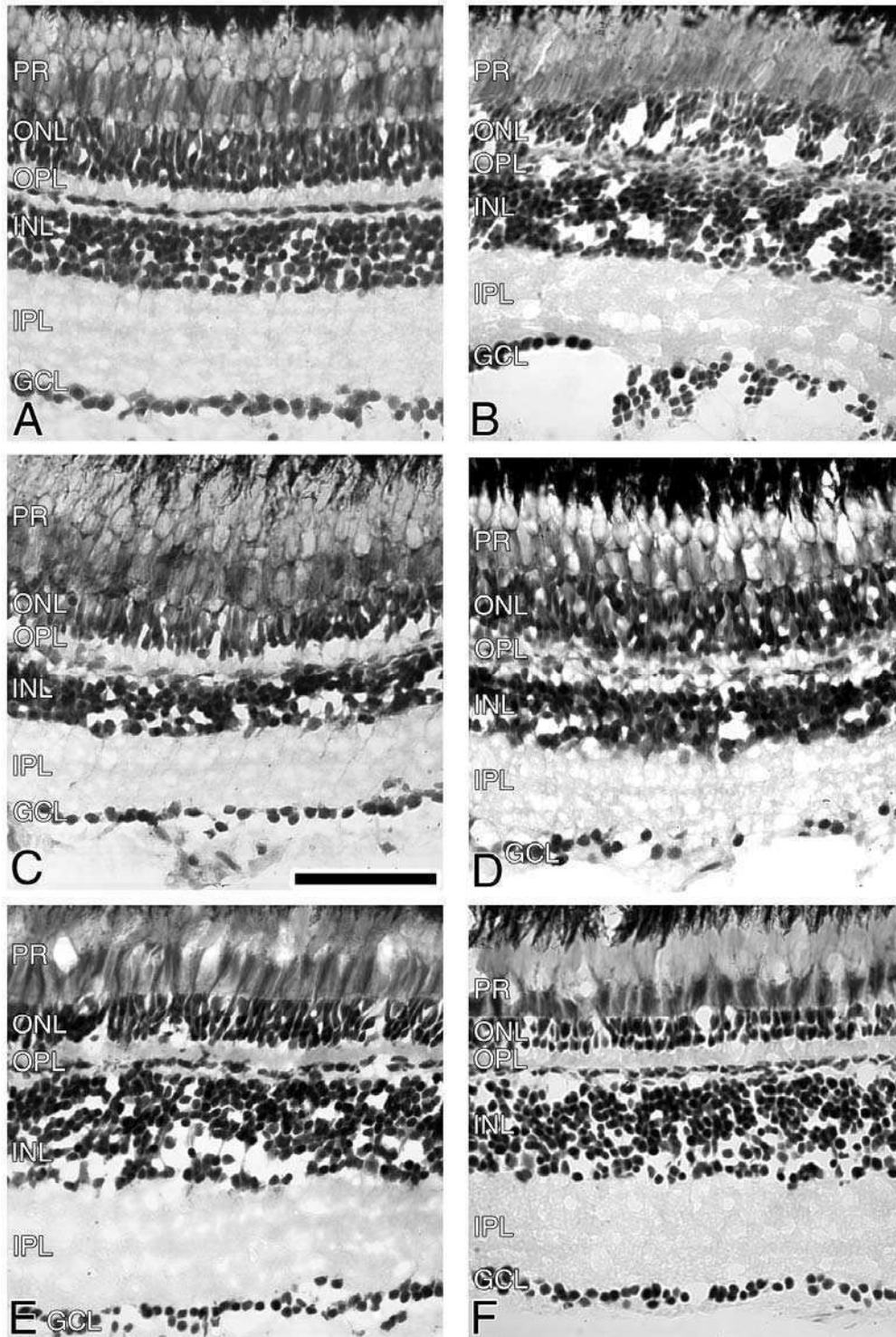


Figura 1. Histología de cortes de 10 μm de retinas de pez cebra a diferentes días luego de una única inyección intraocular de 2 μM de ouabaína. A: Control salino, B: 2dpi, C: 7dpi, D: 14dpi, E: 30dpi, F: 60dpi. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de células ganglionares. La barra en el panel C indica 50 μm . dpi: días posteriores a la lesión (inyección de ouabaína).

2. Efecto de la lesión parcial con ouabaína sobre la proliferación celular

Por datos previos de la bibliografía (Fimbel y col, 2007) se sabe que luego del daño citotóxico parcial, las células progenitoras retinianas se activan mitóticamente y alcanzan un máximo de proliferación a los 7 dpi. Se analizaron retinas a los 2 y 7 dpi y se confirmó que efectivamente el mayor número de células proliferativas se observa a día 7 luego de inducida la lesión. A modo de ejemplo, en la **figura 2** se muestran microfotografías representativas de cortes de retinas en los cuales se observan los núcleos positivos para BrdU en la retina madura y en la CMZ de retinas no lesionadas y a los 2 y 7 dpi.

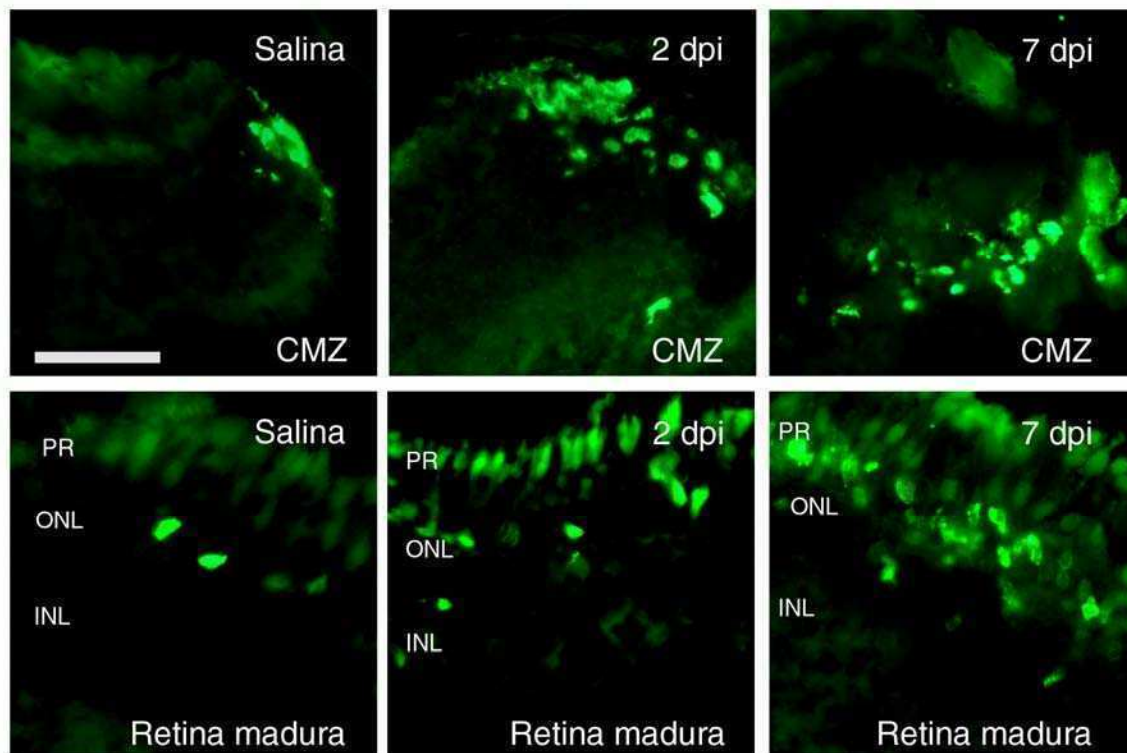


Figura 2. Microfotografías representativas de cortes de 10 μm de retinas en las cuales se observan los núcleos positivos para BrdU, detectados por inmunohistoquímica de fluorescencia, en los días 2 y 7 posteriores a la lesión o en retinas no lesionadas. Los peces fueron inyectados intraocularmente con solución salina o con 2 μM de ouabaína en el día 0. PR: capa de fotorreceptores; ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; CMZ: zona ciliar marginal. La barra indica 50 μm .

3. Efecto del tratamiento con enzimas que hidrolizan nucleótidos extracelulares sobre la proliferación celular inducida por la lesión

Con el objetivo de determinar si los nucleótidos extracelulares eran capaces de regular el aumento en la proliferación celular inducido por la lesión, se trató a retinas previamente lesionadas, con apirasa y hexoquinasa. La apirasa es una enzima que hidroliza nucleótidos di- y tri-fosfato, mientras que la hexoquinasa hidroliza ATP produciendo glucosa fosforilada y ADP.

El tratamiento con dichas enzimas, ya sea activas o inactivadas por calor, se realizó durante 6 días mediante una inyección intravítrea diaria, y la cuantificación de las células positivas para BrdU se realizó el día 7 posterior a la lesión, ya que este día corresponde al intervalo donde se observó un mayor índice de proliferación. El tratamiento con apirasa activa provocó una disminución significativa de la proliferación de células progenitoras inducida por la lesión, tanto en la retina madura (**figura 3**) como en la zona ciliar marginal o CMZ (**figura 4**). El número de células positivas para BrdU en retinas lesionadas y tratadas posteriormente con apirasa no fue significativamente diferente al observado en las retinas no lesionadas. Por el contrario, no se observó un efecto significativo sobre este parámetro luego del tratamiento con hexoquinasa, en ninguna de las regiones retinianas examinadas (**figuras 3 y 4**). Tres grupos controles de retinas lesionadas fueron agrupados antes de realizar la normalización de los datos (ver Materiales y Métodos), ya que no se encontraron diferencias significativas en el número de células proliferativas entre ellos (retina madura, $p=0,57$; CMZ, $p=0,63$). Dichos grupos fueron: retinas lesionadas y tratadas con apirasa inactivada (retina madura: $46,73 \pm 7,37$; CMZ= $39,46 \pm 6,79$), retinas lesionadas y tratadas posteriormente con hexoquinasa inactivada (retina madura: $47,87 \pm 1,19$; CMZ= $37,06 \pm 6,32$), y retinas lesionadas y posteriormente tratadas con solución salina (retina madura: $50,74 \pm 9,83$, CMZ= $35,54 \pm 4,59$). El número normalizado de células positivas para BrdU, en estos tres

grupos de retinas lesionadas utilizadas como control de los tratamientos enzimáticos, se muestra en las figuras 3 y 4 en la barra indicada como Ouabaína.

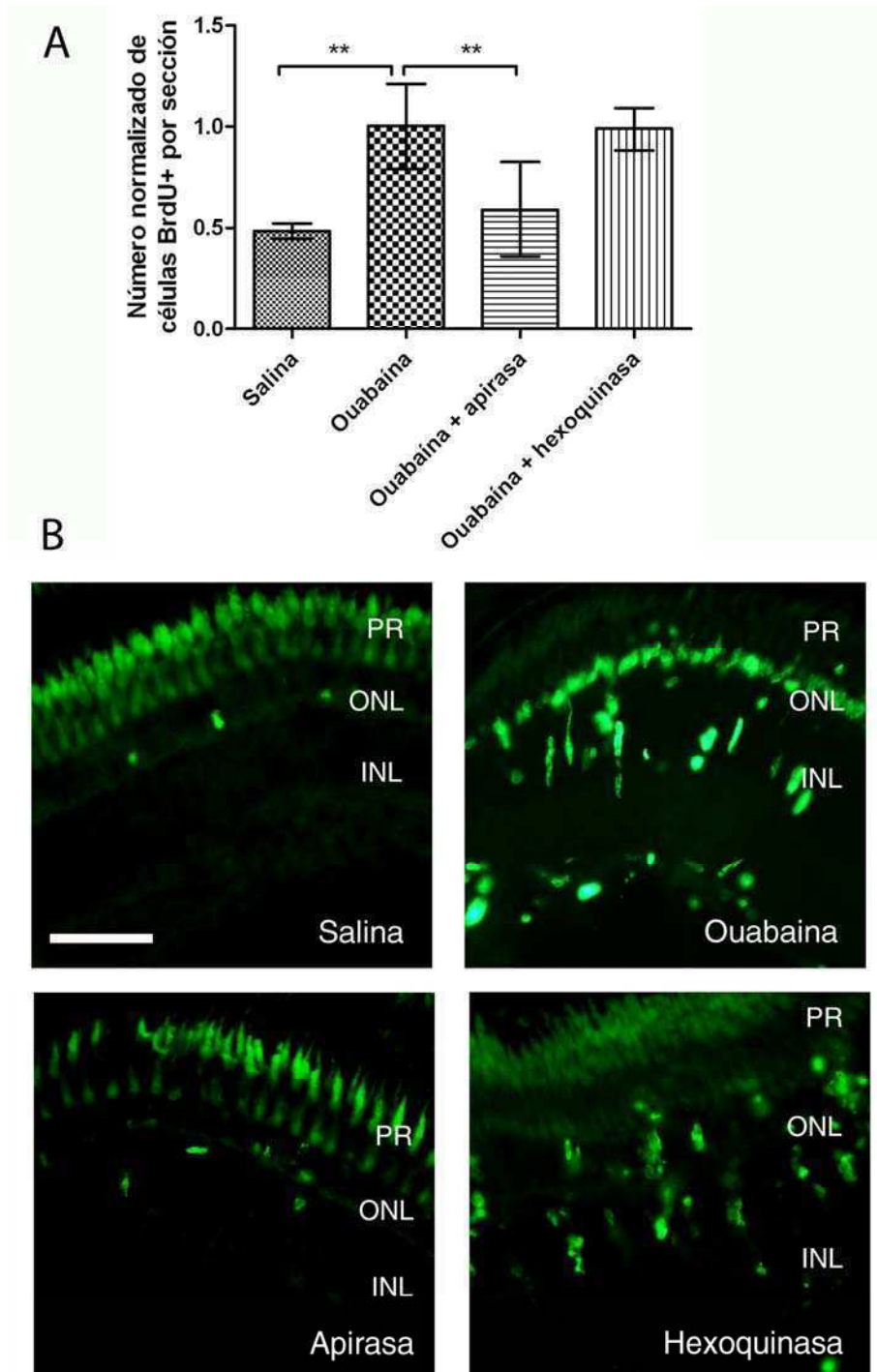


Figura 3. Células proliferativas detectadas en la retina diferenciada de pez cebra luego de 6 días de exposición a BrdU. Los peces fueron inyectados intraocularmente con solución salina o con 2 μ M de ouabaína (día 0). Luego los peces inyectados con ouabaína fueron tratados durante 6 días con

solución salina, apirasa inactivada, apirasa, hexoquinasa inactivada o hexoquinasa. **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número normalizado de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar (n=4-5 peces cebras). **p<0,01 (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías representativas de retinas en las cuales se observan los núcleos positivos para BrdU en una zona de la retina diferenciada. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna. La barra indica 50 μ m.

Los valores en el eje de ordenadas indican las veces de cambio en el número de células proliferativas para cada tratamiento enzimático respecto al valor control normalizado a 1 (Ouabaína).

En los paneles **B** se muestran, además, microfotografías representativas de cortes de retinas en los cuales se observan los núcleos marcados con BrdU en la retina madura (**figura 3**) y en la CMZ (**figura 4**) de retinas controles, retinas lesionadas y evaluadas a los 7 dpi, o en retinas dañadas con ouabaína y luego tratadas durante 6 días con apirasa o con hexoquinasa.

Por consiguiente, el efecto sobre la proliferación celular observado en presencia de enzimas que hidrolizan tanto ATP como ADP (entre otros nucleótidos di y trifosfato) en el medio extracelular retiniano, sugiere que los nucleótidos extracelulares endógenos podrían estar involucrados en la regulación de la activación mitótica de las células progenitoras inducida por una lesión parcial de la retina con 2 μ M de ouabaína.

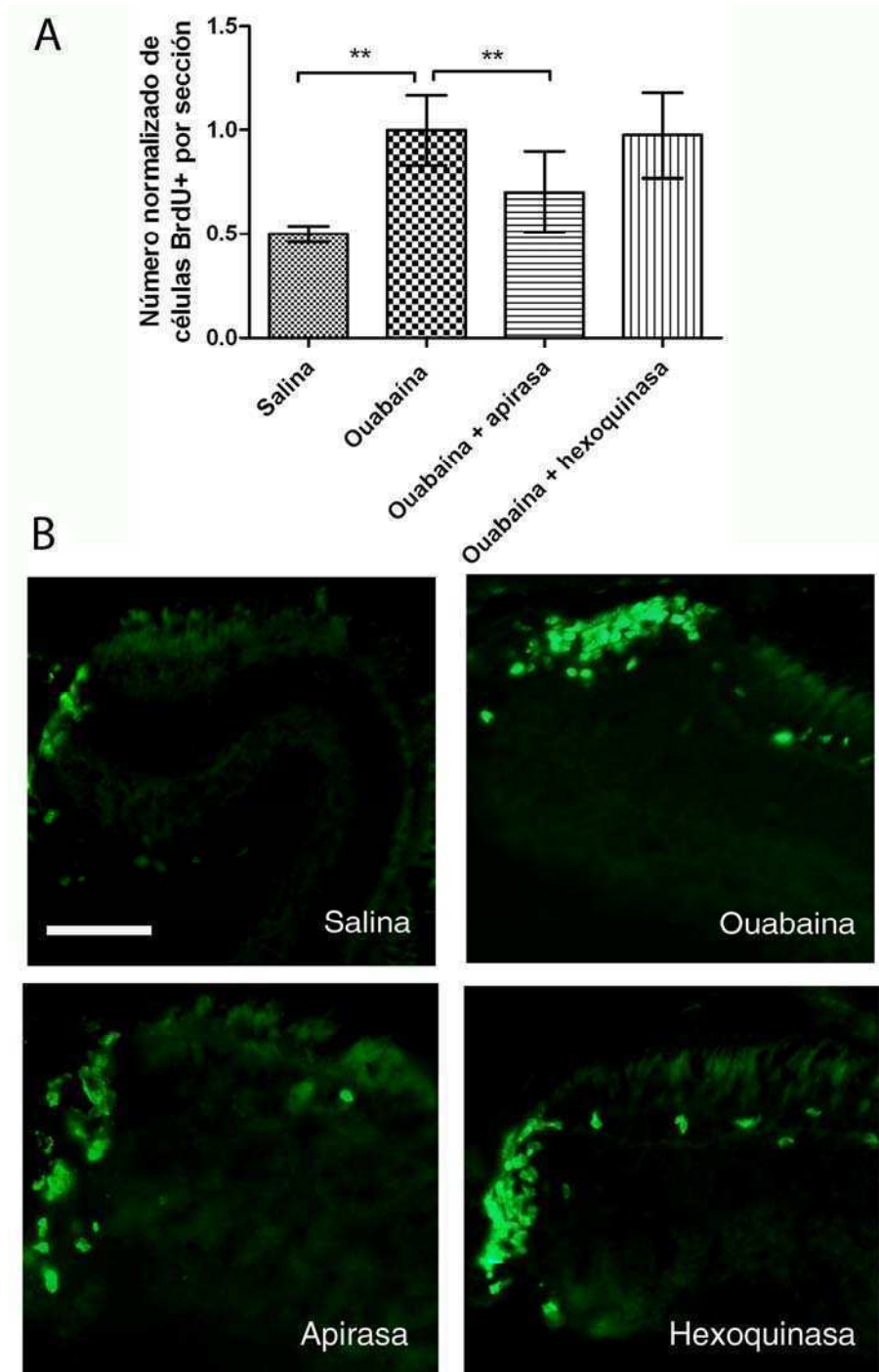


Figura 4. Células proliferativas detectadas en la CMZ de la retina de pez cebra luego de 6 días de exposición a BrdU. Los peces fueron inyectados intraocularmente con solución fisiológica o con 2 μ M de ouabaína (día 0). Luego, los peces previamente tratados con ouabaína fueron inyectados por 6 días con solución salina, apirasa inactivada, apirasa, hexoquinasa inactivada o hexoquinasa. **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número normalizado de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar (n=4-5

peces cebra). ** $p < 0,01$ (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías representativas de retinas en las cuales se observan los núcleos positivos para BrdU en la CMZ. La barra indica 50 μm .

4. Actividad enzimática de la apirasa y la hexoquinasa dentro del vítreo

Se evaluó la actividad de las enzimas apirasa y hexoquinasa dentro del vítreo luego de 20 horas de su inyección intraocular. La **figura 5** muestra determinaciones representativas de 5 mediciones independientes, del consumo de ATP en el medio de reacción en función del tiempo, en los ojos tratados con apirasa o con apirasa inactivada por calor. Luego de cada medición, se calculó la velocidad inicial (V_i) a partir de las curvas de la cinética de desaparición del ATP y se compararon la media y el desvío estándar en presencia ($V_i = 37 \pm 17,03$ nM ATP/minuto) y en ausencia ($V_i = 23 \pm 7,36$ nM ATP/minuto) de actividad apirasa. Se compararon estos valores de V_i mediante un test de Student pareado (ver Materiales y Métodos) que evidenció diferencias significativas ($p < 0,05$). Esto indicó una mayor actividad ATPasa, aún luego de 20 horas, en los ojos inyectados con apirasa.

Del mismo modo, la **figura 6** muestra un experimento representativo de 5 mediciones independientes de seis ojos (por condición) que habían sido previamente inyectados con hexoquinasa, ya sea activa o inactivada por calor (control). En cada determinación se calculó la velocidad inicial (V_i) en los ojos inyectados con hexoquinasa ($V_i = 26,6 \pm 6,9$ nM ATP/minuto), que fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que en los ojos control tratados con hexoquinasa inactivada ($V_i = 19,5 \pm 3,2$ nM ATP/minuto). Ambos tratamientos, como en el caso de la apirasa, habían sido realizados 20 horas antes de la determinación enzimática, indicando la persistencia de actividad intravítrea de las enzimas inyectadas durante varias horas.

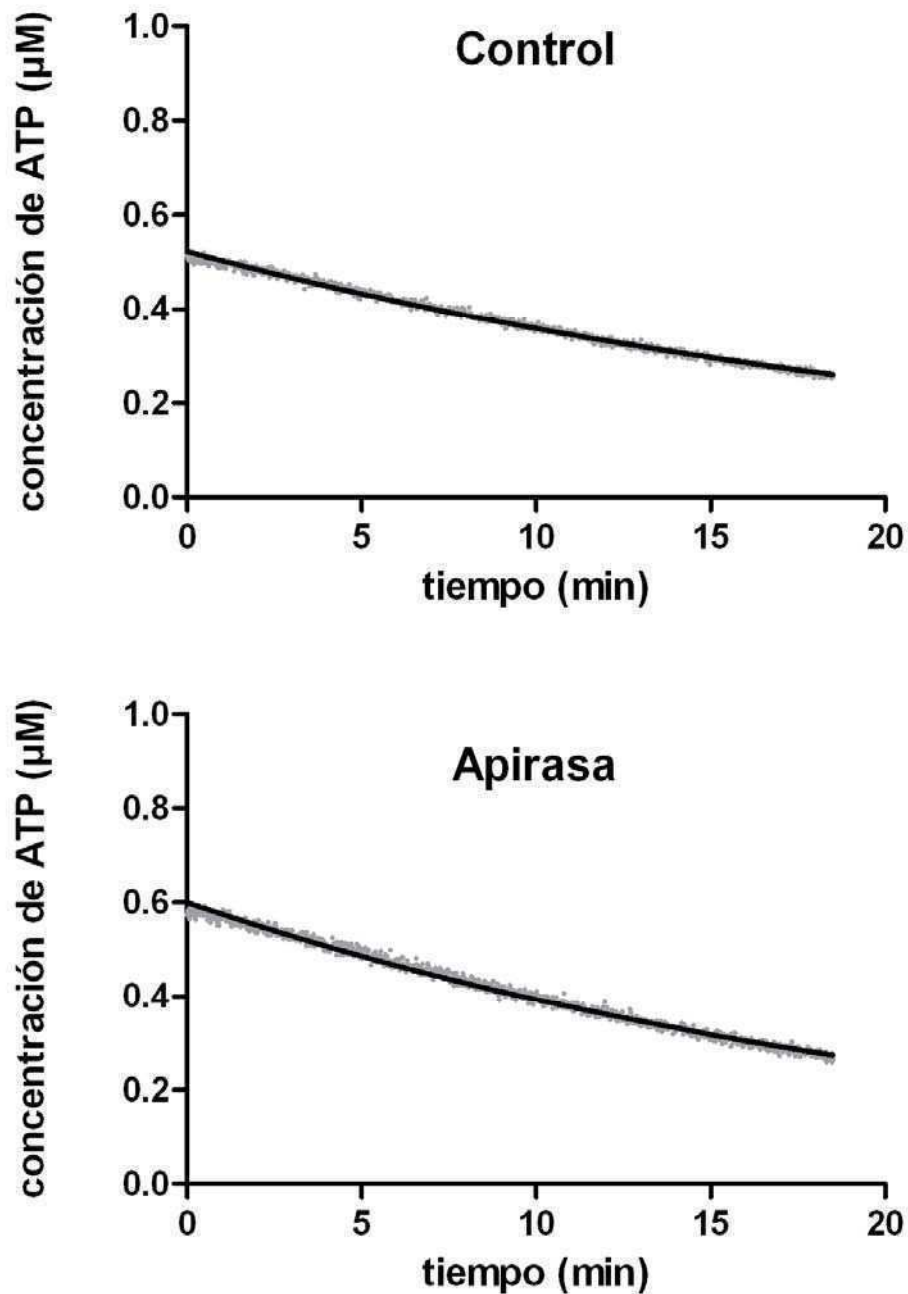


Figura 5. Consumo de ATP en función del tiempo, medido *in vitro* en seis “*eyecups*” de pez cebra, en presencia de apirasa o apirasa inactivada (control), 20 horas después de su inyección intravítrea. Los puntos grises corresponden a los datos experimentales, determinados a partir de una curva estándar de emisión de luz a través de la reacción luciferina-luciferasa vs diferentes concentraciones de ATP en el medio de reacción. Los parámetros del mejor ajuste para el cálculo de la velocidad inicial de actividad enzimática (V_i) fueron obtenidos mediante el ajuste de una función exponencial decreciente simple (línea negra) a los datos experimentales.

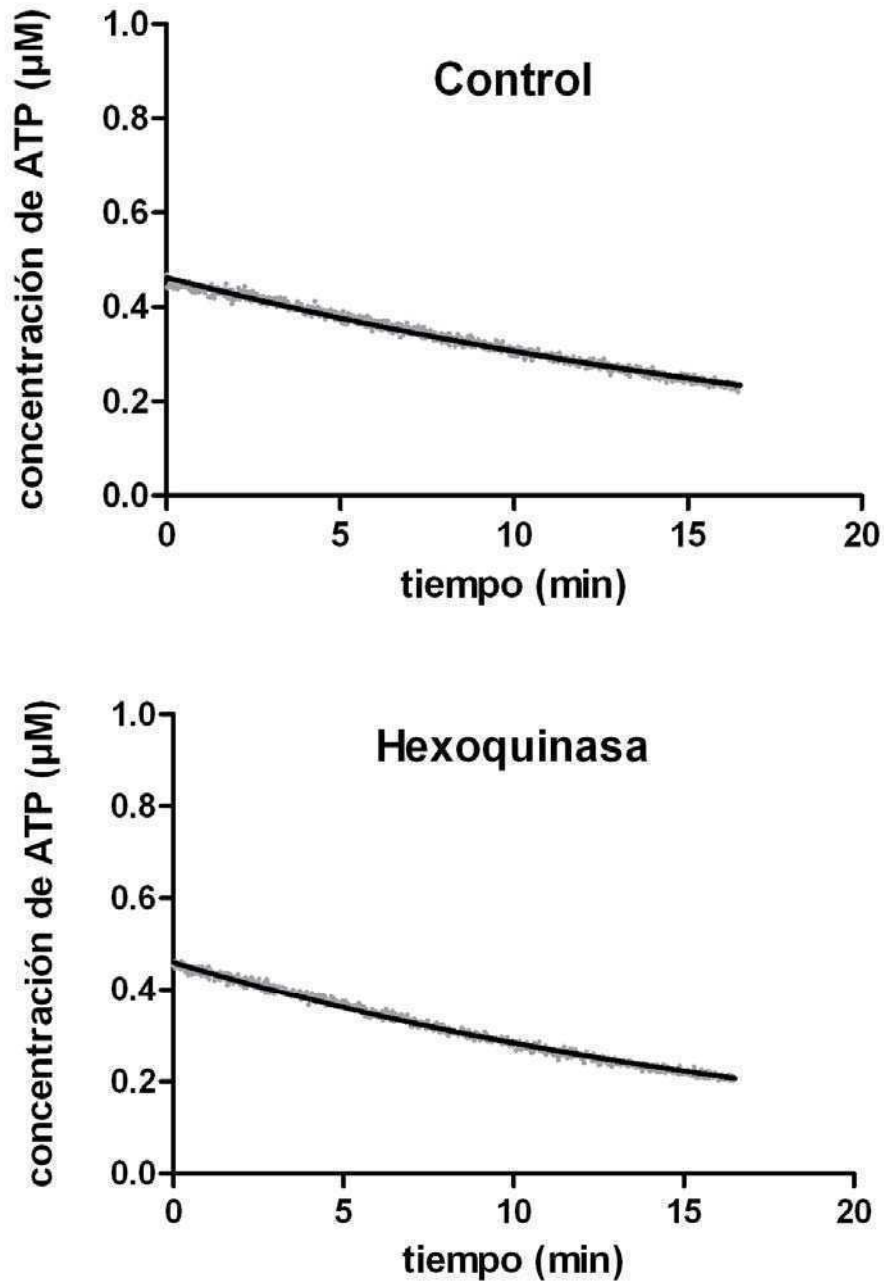


Figura 6. Consumo de ATP en función del tiempo, medido *in vitro* en “eyecups” de pez cebra en presencia de hexoquinasa o hexoquinasa inactivada (control), 20 horas después de su inyección intravítrea. Los puntos grises corresponden a los datos experimentales, calculados a partir de una curva estándar de emisión de luz a través de la reacción luciferina-luciferasa vs diferentes concentraciones de ATP en el medio de reacción. Los parámetros del mejor ajuste para el cálculo de la velocidad de actividad enzimática inicial (V_i) fueron obtenidos mediante el ajuste de una función exponencial decreciente simple (línea negra) a los datos experimentales.

5. Efecto del tratamiento con agonistas de receptores purinérgicos sobre la proliferación celular de células progenitoras retinianas

A fin de determinar cual es el nucleótido extracelular involucrado en la regulación de la proliferación de las células progenitoras retinianas y, debido a la ausencia de efecto luego del tratamiento con hexoquinasa, se trató a retinas intactas (no lesionadas) durante 6 días con ATP γ S, ADP β S o adenosina. Ambos análogos del ATP y del ADP, son muy lentamente hidrolizados en condiciones fisiológicas y, en principio, no serían clivados por la apirasa. Por consiguiente, se acumularían en el medio extracelular y tendrían un efecto mucho más prolongado que los nucleótidos endógenos. En el día 7 se cuantificó el número de células positivas para BrdU. ATP γ S y ADP β S fueron inyectados con o sin apirasa, de modo de observar un posible efecto ya sea en presencia o ausencia de nucleótidos endógenos. (Ver protocolo en **Tablas D, E y F**).

El tratamiento con ADP β S, a una concentración de 5 ó 25 μ M, provocó un aumento significativo de la proliferación celular en las retinas no lesionadas tanto en zonas de la retina madura completamente diferenciada (**figura 7**) como en la CMZ (**figura 8**).

El ADP β S presentó efectos significativos a las dos concentraciones examinadas, pero el efecto fue notoriamente mayor cuando se utilizó una dosis de 25 μ M en ausencia de apirasa, mientras que en presencia de esta enzima ambas concentraciones (5 y 25 μ M) fueron igualmente efectivas pero presentaron una menor potencia.

Por el contrario, el tratamiento con ATP γ S o con adenosina, a cualquiera de las concentraciones examinadas y en presencia o ausencia de apirasa, no provocó cambios significativos en los niveles de proliferación celular observados normalmente en las retinas intactas (**figuras 7 y 8**).

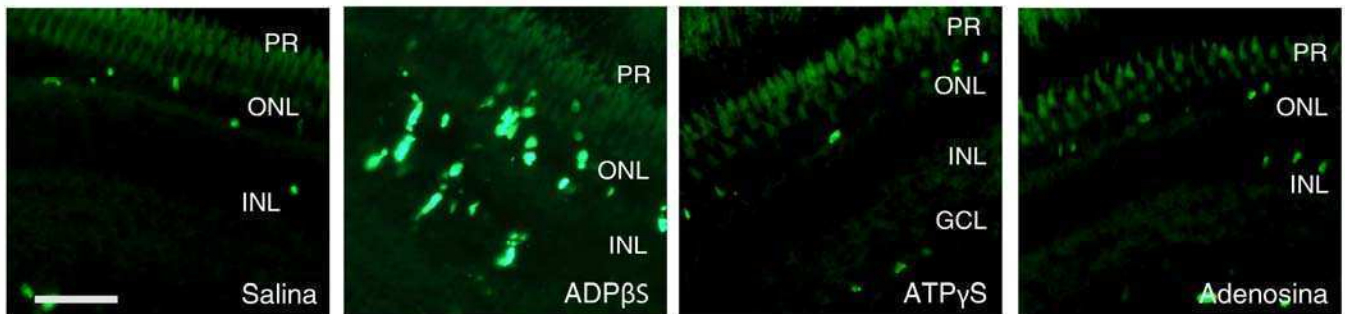
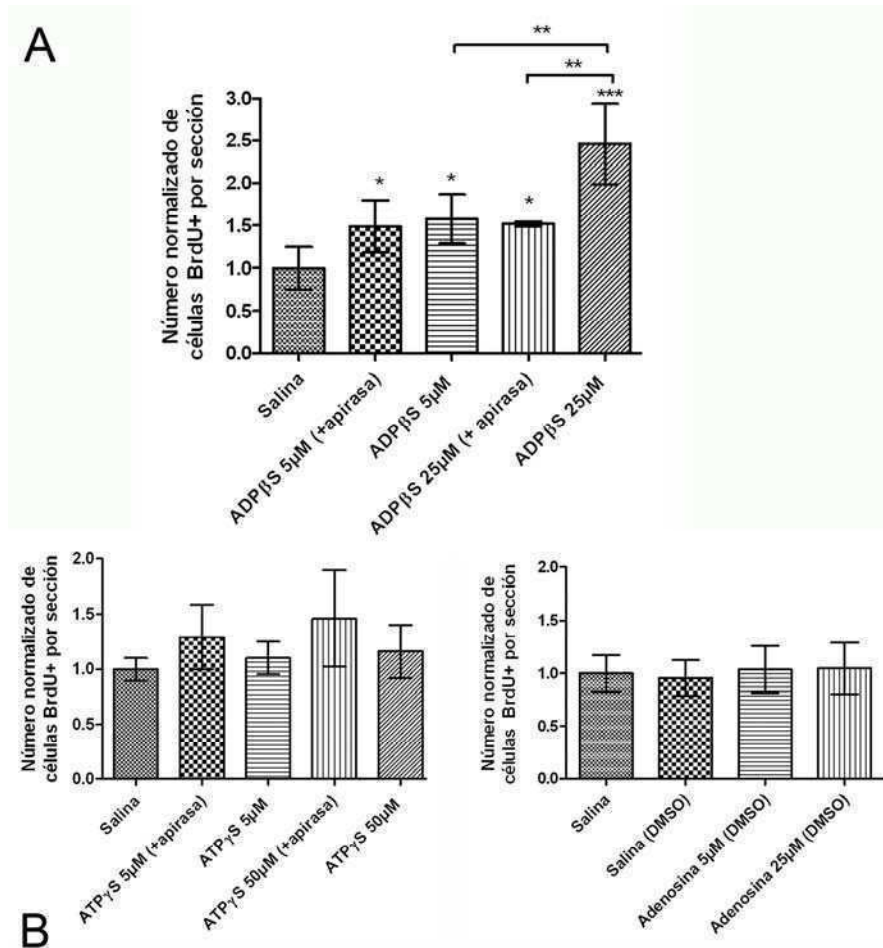


Figura 7. Células proliferativas detectadas en la retina diferenciada de pez cebra luego de 6 días de exposición a BrdU. Los peces fueron inyectados en el vítreo durante 6 días con solución salina, ADPβS 5 ó 25 μ M, ATPγS 5 ó 50 μ M (estos dos últimos en presencia o ausencia de apirasa) o adenosina 5 ó 25 μ M. **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número normalizado de células BrdU positivas por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=4-5$ peces cebra). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). Los asteriscos en ausencia de corchete indican diferencias significativas de cada barra respecto al control salino. **B:** Microfotografías representativas de retinas en las cuales se observan los núcleos marcados con BrdU en las capas de la retina diferenciada, en retinas que fueron inyectadas ya sea

con solución salina o con los agonistas de receptores purinérgicos. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna, GCL: capa de células ganglionares. La barra indica 50 μm .

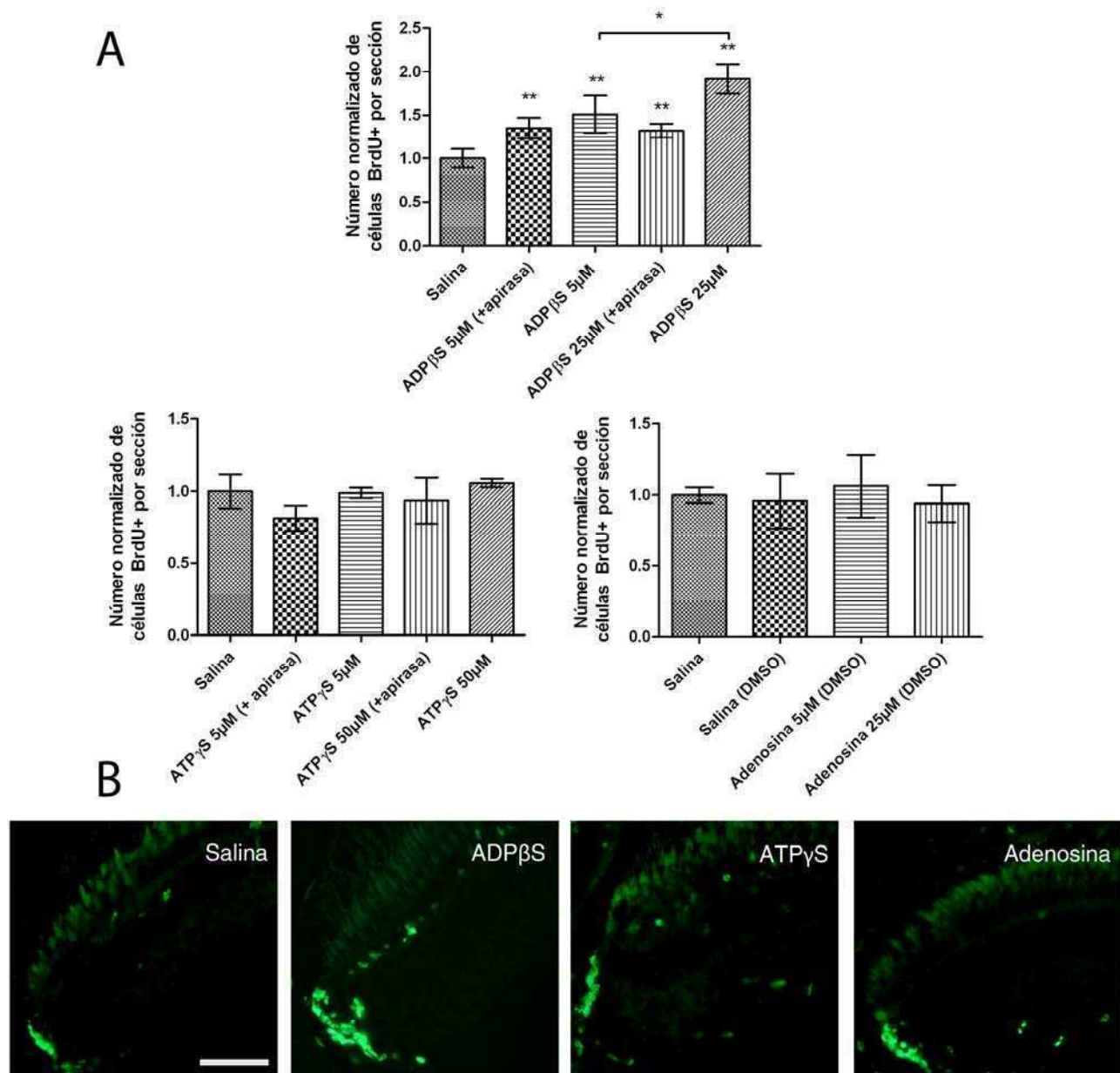


Figura 8. Células proliferativas detectadas en la CMZ de la retina de pez cebra luego de 6 días de exposición a BrdU. Los peces fueron inyectados en el vítreo durante 6 días con solución salina, ADP β S 5 ó 25 μM , ATP γ S 5 ó 50 μM (estos dos últimos en presencia o ausencia de apirasa) o adenosina 5 ó 25 μM . **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número normalizado de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=4-5$ peces cebra). ** $p<0,01$ de todos los tratamientos con respecto al control salino, * $p<0,05$, entre las barras indicadas con el corchete (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:**

Microfotografías representativas de retinas, tratadas ya sea con solución salina o con los agonistas de receptores purinérgicos, en las cuales se observan los núcleos positivos para BrdU en la CMZ. La barra indica 50 μm .

A modo de ejemplo, en los paneles **B** de las **figuras 7 y 8** se muestran microfotografías de secciones retinianas representativas en las que se observan los núcleos positivos para BrdU tanto en una región de tejido diferenciado como en la CMZ, respectivamente, en retinas intactas y tratadas durante 6 días con solución salina o con ADP β S, ATP γ S o adenosina.

Por lo tanto, estos resultados indican que el ADP, pero no el ATP o la adenosina, podría ser el nucleótido extracelular involucrado en la activación del ciclo celular de las células progenitoras retinianas en retinas no lesionadas.

6. Tratamiento con un agonista y un antagonista de receptores purinérgicos en retinas no lesionadas sobre la proliferación celular

Con el fin de identificar a través de que receptor purinérgico ejercería su acción el ADP β S, se trataron retinas no lesionadas con ADP β S y MRS2179, un antagonista de los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y₁, principalmente activados por ADP en condiciones fisiológicas (ver protocolo en **Tabla G**). En paralelo y como control, se trataron retinas intactas con 5 μM de ADP β S o con 1 μM de MRS2179. El tratamiento con dichos compuestos, se realizó durante 6 días y la cuantificación de células positivas para BrdU se realizó en el día 7. El tratamiento con MRS2179 inhibió significativamente, y de forma completa, el incremento en el número de células positivas para BrdU inducido por ADP β S, tanto en las capas de retina madura (**figura 9**) como en la CMZ (**figura 10**).

En los paneles **B** de dichas figuras se muestran microfotografías representativas de cortes de retinas en las cuales se observan los núcleos marcados con BrdU en las capas de tejido

diferenciado (**figura 9**) y en la CMZ (**figura 10**) en retinas tratadas durante 6 días con solución salina, ADP β S o ADP β S + MRS2179.

Estos resultados indican que el ADP β S regularía positivamente la proliferación celular de los progenitores retinianos en el tejido intacto, a través de su unión a los receptores purinérgicos de tipo P2Y₁.

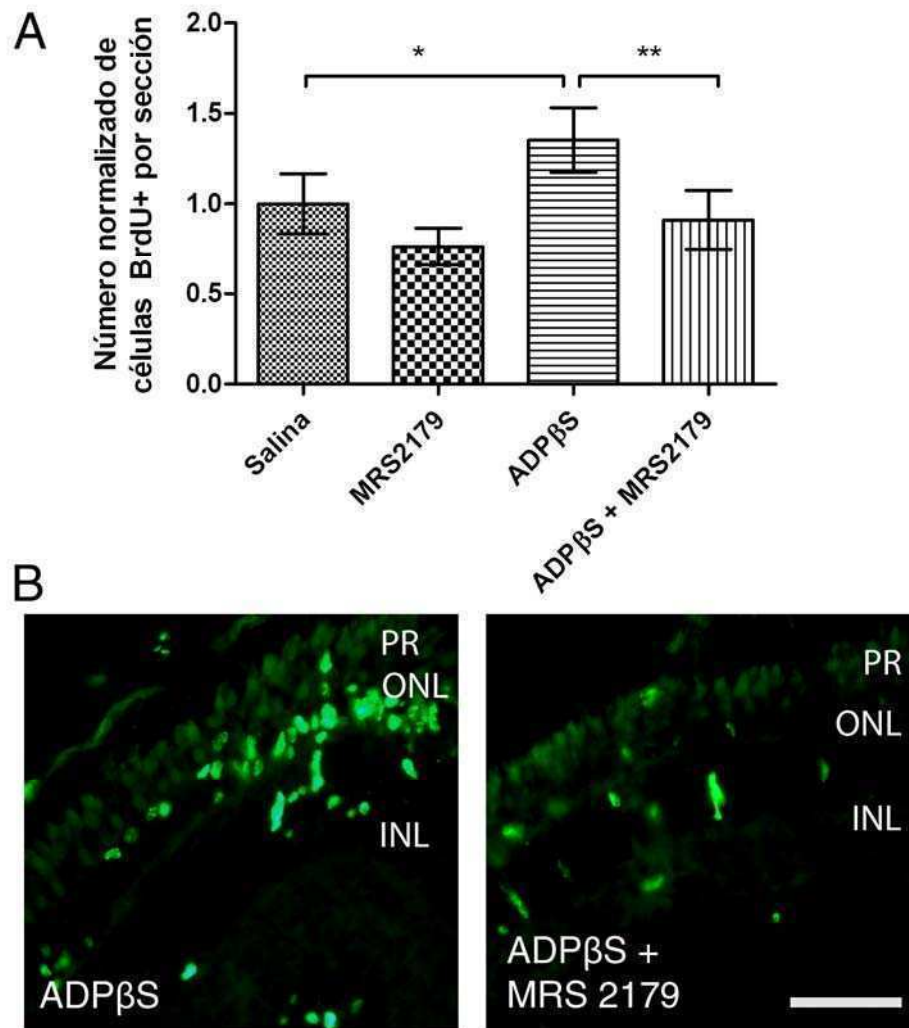


Figura 9. Células proliferativas detectadas por incorporación nuclear de BrdU durante la fase S del ciclo celular, en la retina madura (diferenciada) de pez cebra, luego de 6 días de exposición a dicho análogo timidínico. Los peces fueron inyectados intraocularmente con ADP β S 5 μ M, MRS2179 1 μ M o ADP β S 5 μ M + MRS2179 1 μ M durante los mismos 6 días de exposición a BrdU. **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número normalizado de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar (n=4-5 peces cebra). **p<0,01; *p<0,05 (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías representativas de

retinas en las que se observan los núcleos marcados con BrdU en las capas de tejido diferenciado. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna. La barra indica 50 μm .

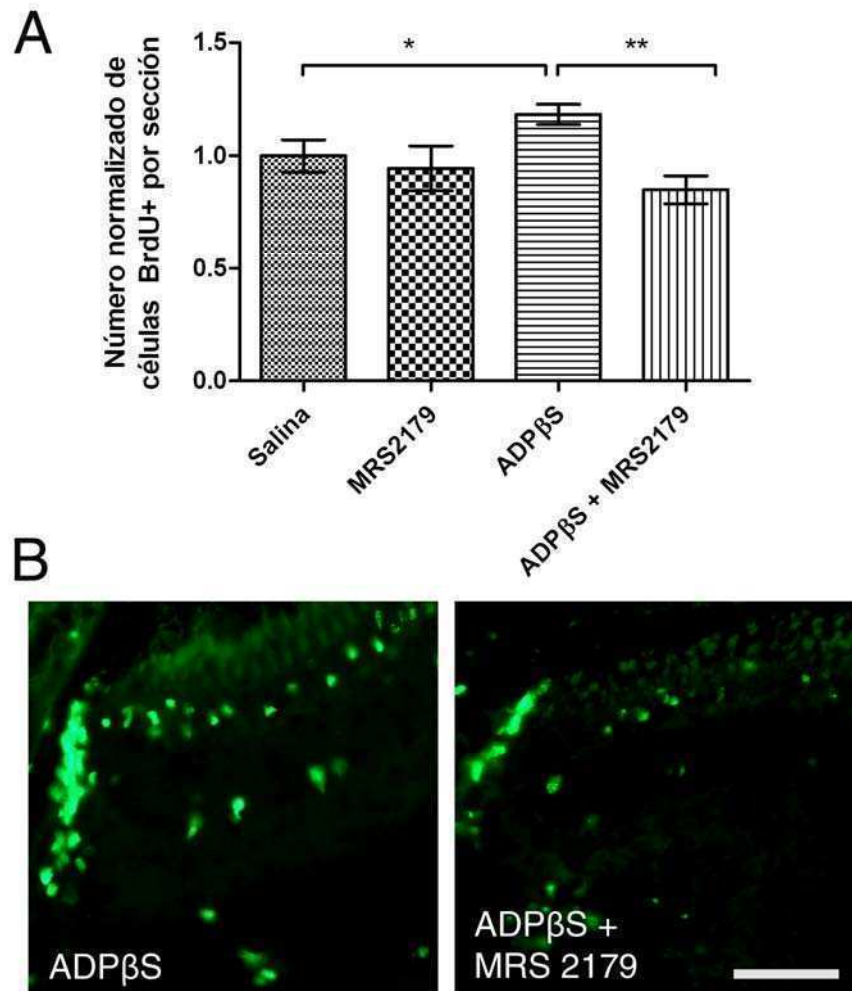


Figura 10. Células progenitoras proliferativas, detectadas por incorporación nuclear de BrdU, en la CMZ de la retina de pez cebra luego de 6 días de exposición al análogo timidínico. Los peces fueron inyectados intraocularmente con ADP β S 5 μM , MRS2179 1 μM ; o ADP β S 5 μM + MRS2179 1 μM durante los mismos 6 días de exposición a BrdU. **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número normalizado de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=4-5$ peces cebra). $**p<0,01$; $*p<0,05$ (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías representativas de retinas en las cuales se observan los núcleos marcados con BrdU en la CMZ, que comprende progenitores y precursores retinianos en proliferación y diferenciación. La barra indica 50 μm .

7. Tratamiento de retinas lesionadas con antagonistas de receptores purinérgicos

Con el objetivo de elucidar el tipo de receptor purinérgico que media el aumento en la proliferación celular inducido por la lesión con ouabaína, se trató durante 6 días a retinas previamente lesionadas, con diferentes antagonistas de receptores purinérgicos. En el día 7 posterior a la lesión se cuantificó el número de células positivas para BrdU (ver protocolo en **Tabla H**).

El tratamiento con MRS2179, que a la concentración utilizada antagoniza de manera específica a los receptores de tipo P2Y₁, inhibió completamente el aumento en la proliferación celular inducido por la lesión en ambas regiones de la retina examinadas, la retina madura (**figura 11**) y la CMZ (**figura 12**). En los paneles **B** de dichas figuras se muestran microfotografías representativas de cortes de retinas lesionadas, en los cuales se observan los núcleos positivos para BrdU, en la región del tejido maduro (**figura 11**) y en la CMZ (**figura 12**) luego del tratamiento con MRS2179 o con solución salina como control.

En contraste, el tratamiento con MRS2211 (un antagonista de los receptores purinérgicos P2Y₁₃, principalmente activados por ADP en condiciones fisiológicas) no provocó cambios en el número de células proliferativas observado en las retinas previamente lesionadas con ouabaína, ni en las capas de retina diferenciada, ni en la CMZ (**figuras 11 y 12**, respectivamente). Del mismo modo, el tratamiento con 8-SPT (un antagonista no selectivo de receptores P1 activados por adenosina), o el tratamiento con NF110/NF157 (una mezcla de antagonistas de los receptores P2X1, P2X2, P2X3 y P2Y₁₁, ya sea exclusiva o principalmente activados por ATP en condiciones fisiológicas) no provocaron cambios en el número de células proliferativas en ninguna región de las retinas lesionadas (**figuras 11 y 12**).

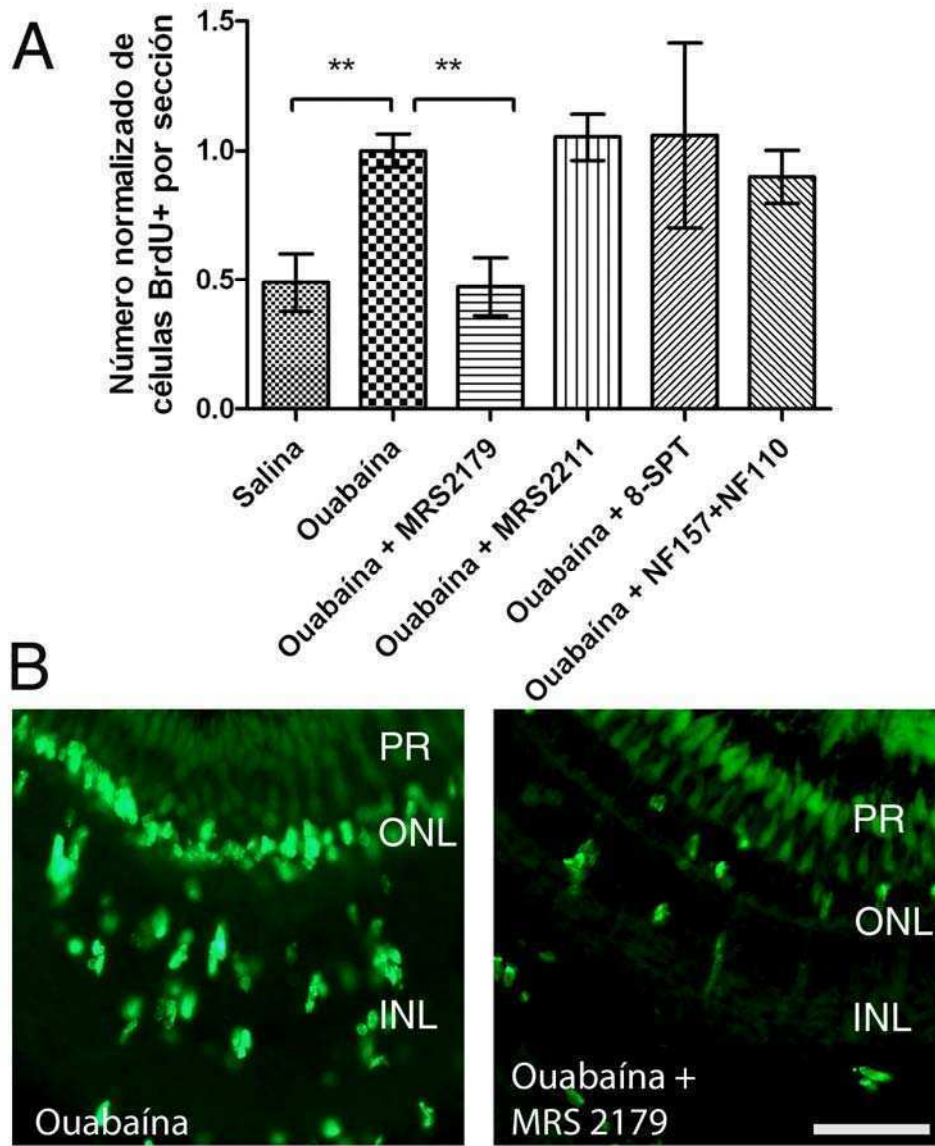


Figura 11. Células proliferativas, detectadas en la retina madura de pez cebra luego de 6 días de exposición intravítrea a BrdU. Los peces fueron inyectados intraocularmente con 2 μ M de ouabaína (día 0) y luego, durante los mismos 6 días de exposición a BrdU, con solución salina, MRS2179 1 μ M, MRS2211 5 μ M, 8-SPT 10 μ M, o una mezcla de NF157 5 μ M y NF110 5 μ M. **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número normalizado de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=4-5$ peces cebra). $**p<0,01$ (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías representativas de secciones de retina en las que se observan los núcleos positivos para BrdU en el tejido diferenciado de pez cebra. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna. La barra indica 50 μ m.

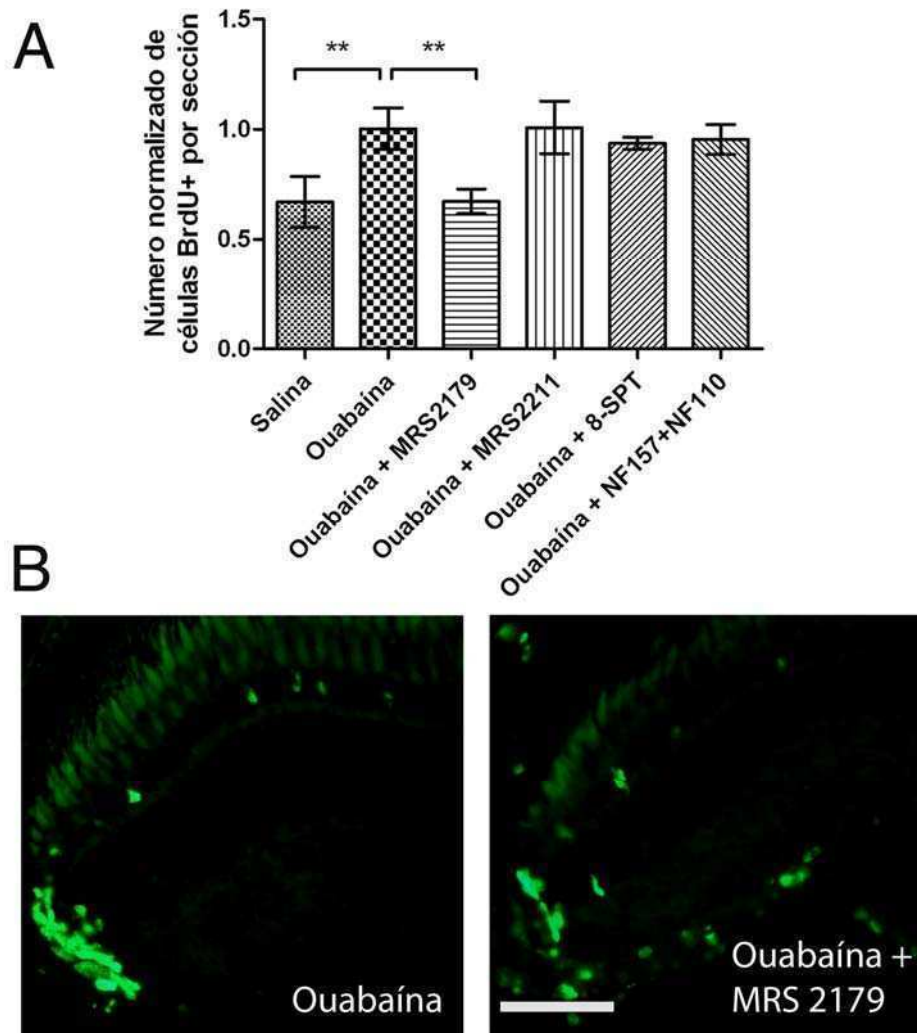


Figura 12. Células proliferativas detectadas luego de 6 días de exposición intravítrea a BrdU en la CMZ de la retina de pez cebra. Los peces fueron inyectados intraocularmente con 2 μM de ouabaína (día 0) y luego, durante los mismos 6 días de exposición al análogo timidínico, con solución salina, MRS2179 1 μM , MRS2211 5 μM , 8-SPT 10 μM , o una mezcla de NF157 5 μM y NF110 5 μM . **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número normalizado de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=4-5$ peces cebra). $**p<0,01$ (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías representativas de secciones retinianas en las que se observan los núcleos positivos para BrdU en la CMZ. La barra indica 50 μm .

Los resultados sugieren que el ADP, a través de su unión a receptores P2Y_1 , y no el ATP o la adenosina, mediaría la activación mitótica de las células progenitoras retinianas inducida por la lesión.

8. Regulación de la muerte celular inducida por la lesión con ouabaína

A través del método de TUNEL se examinó la inducción de muerte celular por apoptosis luego de la lesión con 2 μ M de ouabaína. En primer lugar, se cuantificó el número de núcleos marcados mediante el método de TUNEL en retinas controles no lesionadas y en retinas dañadas y examinadas a los 2, 7, 14 y 60 días posteriores a la lesión.

Como se observa en la **figura 13**, el número de núcleos apoptóticos aumentó luego de la lesión (en retinas no lesionadas prácticamente no se observó muerte celular), siendo significativamente mayor en el día 2 posterior a la inducción de la lesión que en los días 7, 14 y 60. Sin embargo, la muerte celular permaneció incrementada en los días 7 y 14 posteriores al daño (80 y 60% del valor observado a los 2 dpi), mientras que en el día 60 luego de la lesión, el valor de muerte celular no fue significativamente diferente al observado en las retinas controles no lesionadas.

Los núcleos marcados mediante esta metodología se encontraron principalmente en la capa de células ganglionares (GCL) y en la porción interna de la INL, donde se encuentran los somas de las células amácrinas y de algunas células de Müller. En el panel **B** de la **figura 13** se muestran microfotografías de cortes de tejido retiniano en las cuales se observan los núcleos marcados con el reactivo de TUNEL exclusivamente en las capas internas retinianas.

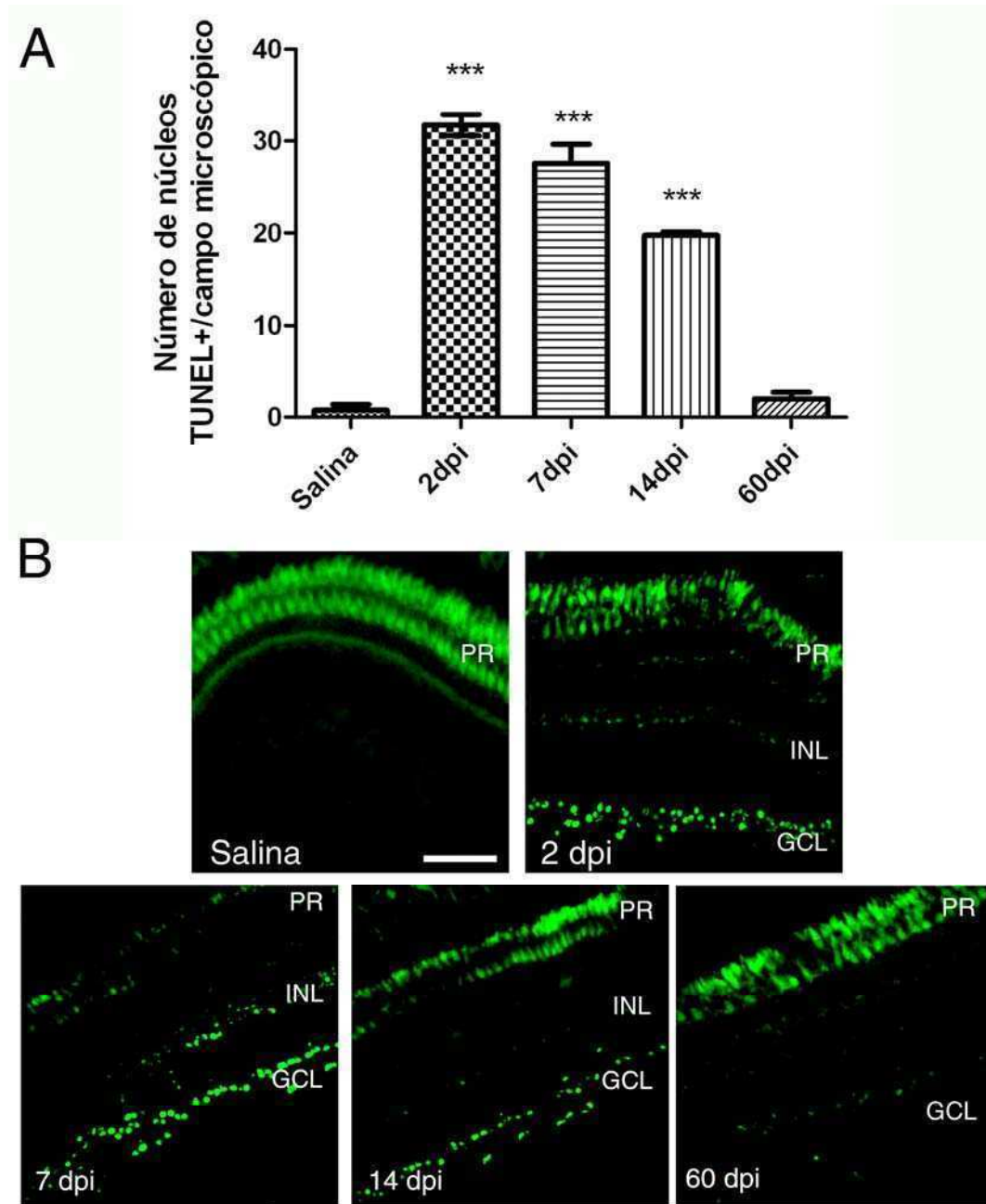


Figura 13. Muerte celular en la retina madura de pez cebra ya sea en retinas controles no lesionadas o lesionadas y evaluadas a distintos días (2, 7, 14 y 60) luego del daño con ouabaína (día 0). **A:** Cuantificación del número de núcleos marcados con el método de TUNEL. Los valores indican el número de núcleos positivos por campo microscópico ($183^2 \mu\text{m}^2$), expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=3-5$ peces cebra). *** $p<0,001$ (ANOVA seguido de Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías fluorescentes de secciones de retina de pez cebra mostrando núcleos marcados mediante el método de TUNEL en las capas internas. PR: fotorreceptores; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares. La barra indica $50 \mu\text{m}$. La fluorescencia en la capa de los fotorreceptores (segmentos internos y externos) se debe a la autofluorescencia de este tipo celular,

que se observa también en los cortes incubados en ausencia de los anticuerpos primario y secundario fluorescente.

Posteriormente, se evaluó el efecto de los nucleótidos extracelulares en la regulación de la muerte celular inducida por la lesión. Para ello, se cuantificó el número de núcleos marcados por el método de TUNEL en el día 7 posterior a la lesión, luego del tratamiento durante 6 días con apirasa o con diferentes antagonistas de los receptores purinérgicos. Como se observa en la **figura 14**, el tratamiento con apirasa durante los seis días posteriores a la lesión incrementó significativamente el número de núcleos marcados, con respecto al tratamiento con solución salina o con apirasa inactivada por calor posteriormente a la lesión con ouabaína. Los valores observados en ambos controles no fueron significativamente diferentes ($p=0,7079$) y por lo tanto, fueron agrupados y se muestran en el gráfico bajo el nombre de ouabaína ($31,7 \pm 5,1$ para las retinas tratadas con apirasa inactivada y $29,86 \pm 4,9$ para las retinas tratadas con solución salina). Luego del tratamiento con apirasa activa, los núcleos marcados positivamente se encuentran principalmente en la capa de células ganglionares (GCL) y en la parte interna de la INL, al igual que lo ocurrido en las retinas lesionadas controles. El tratamiento con MRS2179, el antagonista de los receptores P2Y₁, también provocó un incremento significativo en la muerte celular. Sin embargo, el efecto obtenido con dicho antagonista fue menor al efecto observado luego del tratamiento con apirasa. Es de notar que el tratamiento con MRS2179 provocó la aparición de núcleos marcados por el método de TUNEL en todas las capas retinianas, incluyendo la mitad externa de la INL y los fotorreceptores.

Por otro lado, el tratamiento con una mezcla de antagonistas de receptores principalmente activados por ATP (NF110 + NF157) o el tratamiento con 8-SPT, que bloquea a los receptores P1 de adenosina, no provocó cambios significativos en el número de células apoptóticas.

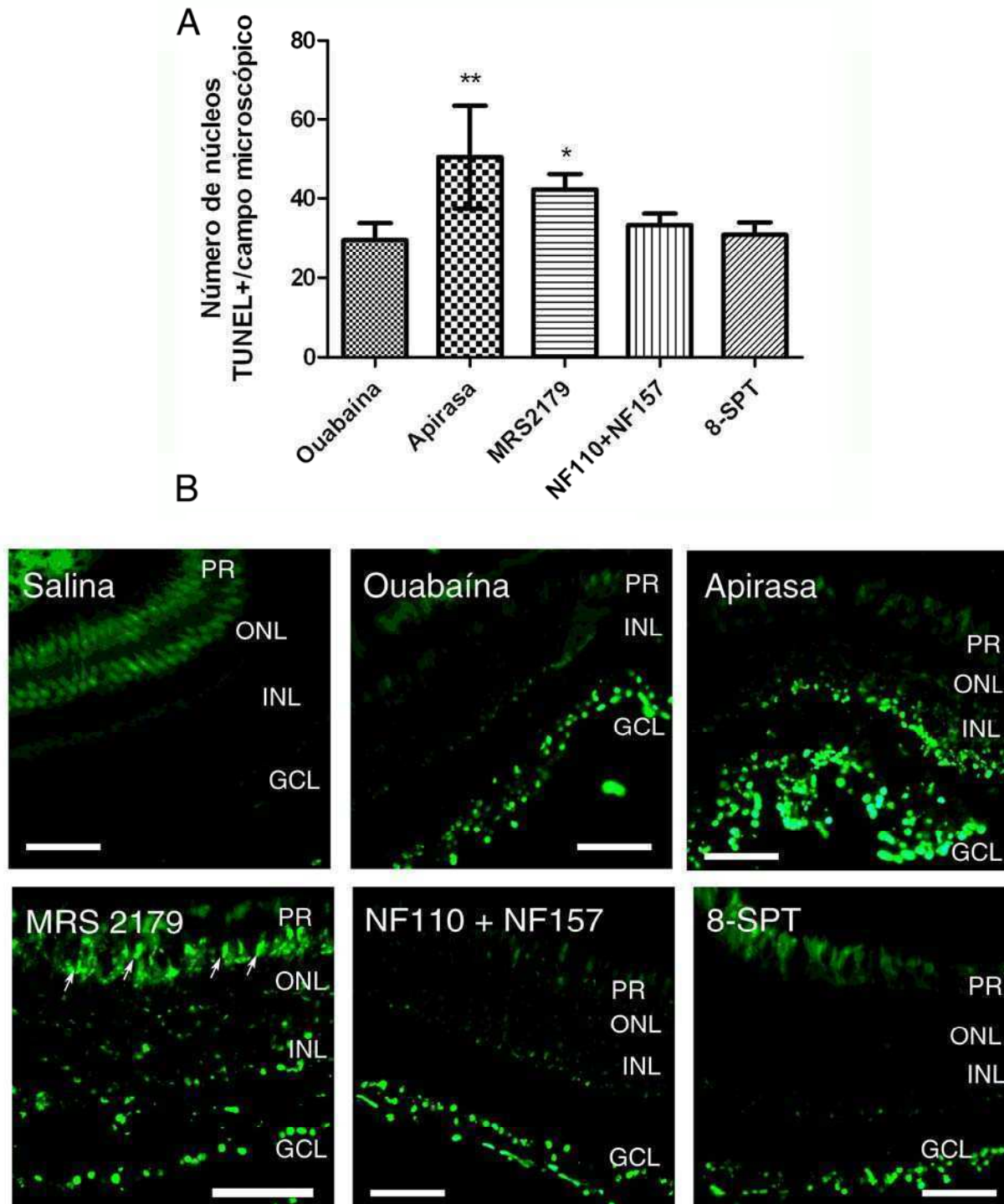


Figura 14. Muerte celular en la retina madura de pez cebra, en retinas controles no lesionadas, o lesionadas y posteriormente tratadas durante 6 días con solución salina, apirasa, apirasa inactivada, MRS2179, NF110+NF157, 8-SPT y evaluadas en el día 7 posterior a la lesión. **A:** Cuantificación del número de núcleos apoptóticos. Los valores expresan el número de núcleos marcados con el método de TUNEL por campo microscópico ($183^2 \mu\text{m}^2$) y son expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=3-5$ peces cebra). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ (ANOVA seguido de Dunnett). **B:** Microfotografías

fluorescentes de secciones de tejido retiniano de pez cebrá mostrando los núcleos marcados por el método de TUNEL. PR: fotorreceptores; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares. La barra indica 50 μm . Las flechas en el panel correspondiente al tratamiento con MRS2179 indican los núcleos marcados mediante el método de TUNEL en la capa de fotorreceptores. La fluorescencia en la capa de los fotorreceptores (segmentos internos y externos) se debe a la autofluorescencia de este tipo celular en el tejido fijado, aún en ausencia de anticuerpos.

9. Efecto del tratamiento con apirasa, hexoquinasa y MRS2179 en la reparación del tejido retiniano

Con el objetivo de evaluar si los nucleótidos extracelulares, al regular la proliferación celular, estaban también involucrados en la regulación de la regeneración tisular, se realizaron los experimentos cuyos resultados se describen a continuación.

Mediante la técnica de Nissl (tinción con acetato de violeta de cresilo) se evaluó, en el día 7 posterior a la lesión, la morfología de las retinas lesionadas y posteriormente tratadas durante 6 días con apirasa, hexoquinasa, o MRS2179. Como control se evaluaron retinas lesionadas y posteriormente tratadas con las enzimas inactivadas o con solución fisiológica.

Las retinas tratadas con apirasa mostraron un muy elevado grado de desorganización y degeneración tisular, así como una gran reducción en el número de núcleos, en comparación con retinas lesionadas y posteriormente tratadas con apirasa inactivada por calor (**figura 15: A, B**).

En contraste, las retinas lesionadas y posteriormente tratadas con hexoquinasa durante 6 días no mostraron cambios morfológicos significativos con respecto a retinas lesionadas y tratadas con hexoquinasa inactivada (**Figura 16: A, B**). Por otra parte, no se observaron cambios evidentes en la morfología retiniana en las retinas tratadas con las enzimas inactivas, con respecto a retinas lesionadas control, es decir tratadas durante 6 días con solución fisiológica luego de la inducción del daño.

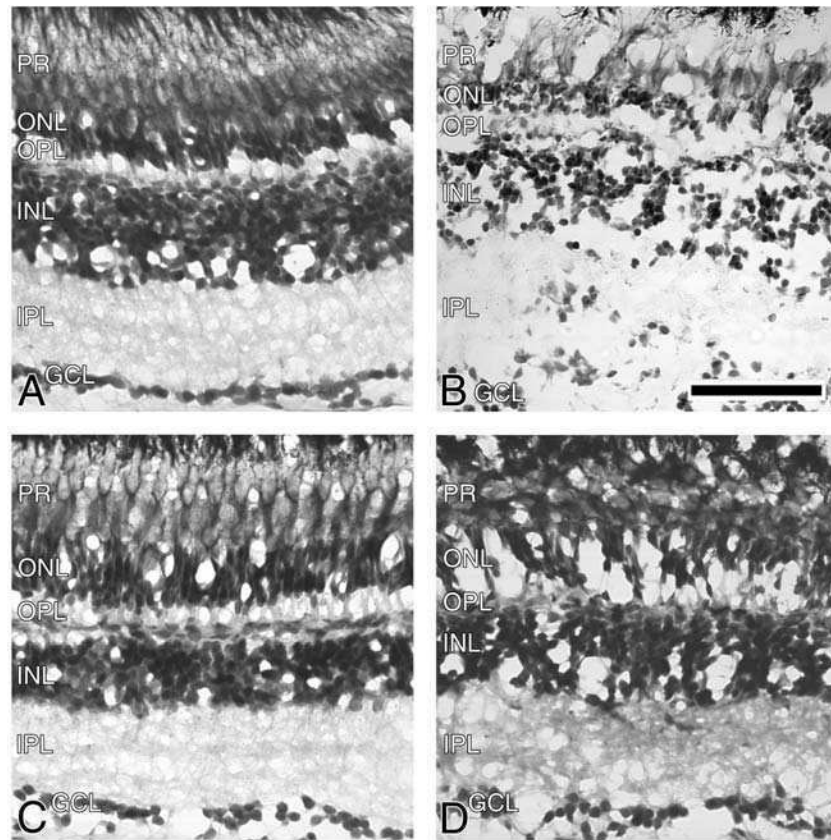


Figura 15. Histología de secciones de retina de pez cebra lesionadas con 2 μM de ouabaína (día 0) y tratadas durante 6 días con apirasa inactivada (A, C) o apirasa (B, D) y examinadas a los 7 (A, B) o 14 (C, D) días posteriores a la lesión. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de células ganglionares. La barra indica 50 μm .

Luego del tratamiento de retinas lesionadas con MRS2179, un antagonista de los receptores P2Y_1 , se observó un mayor grado de degeneración y desorganización del tejido en comparación con retinas lesionadas controles (es decir tratadas posteriormente con solución salina). En este caso, se observó daño y signos de inflamación (aumento de volumen) en los segmentos externos de los fotorreceptores y una muy evidente reducción en el número de núcleos en la ONL, así como un mayor grado de desorganización de la OPL y la INL (**figura 17: A, B**).

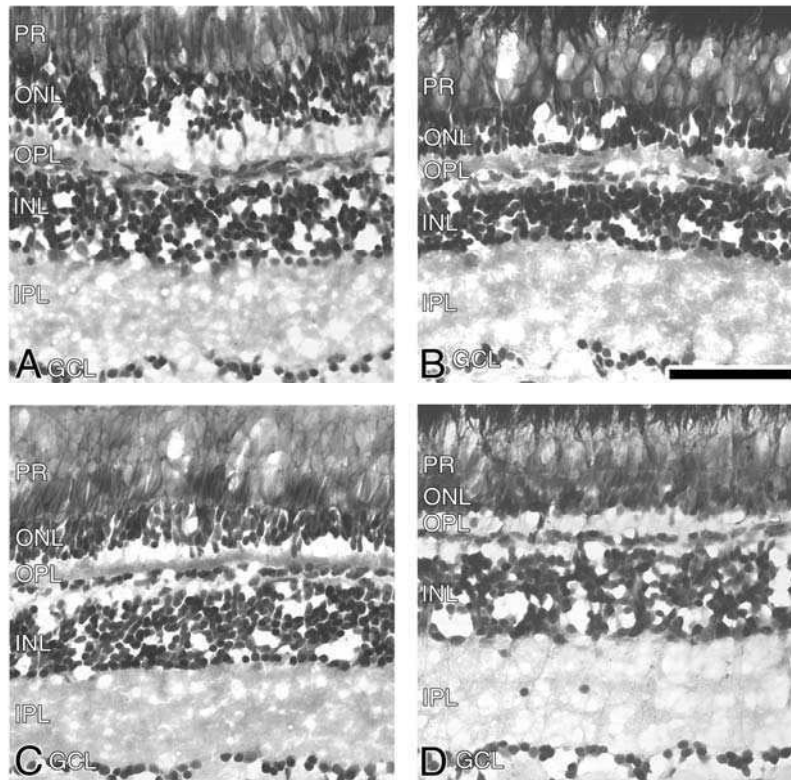


Figura 16. Histología de secciones de retina de pez cebra lesionadas con 2 μM de ouabaína (día 0) y tratadas durante 6 días con hexoquinasa inactivada (A, C) o hexoquinasa (B, D) y observadas a los 7 (A, B) ó 14 (C, D) días posteriores a la lesión. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de células ganglionares. La barra indica 50 μm .

Estos resultados indicarían que los nucleótidos extracelulares, en particular el ADP actuando a través de los receptores P2Y_1 , son fundamentales para la correcta regeneración del tejido retiniano.

Posteriormente, a fin de determinar si el efecto observado sobre la regeneración tisular luego de antagonizar a los nucleótidos extracelulares endógenos podía revertirse, se realizaron los mismos tratamientos a las retinas lesionadas durante 6 días, pero la morfología retiniana se evaluó luego de 14 días de la inducción de la lesión. En este caso

también se realizaron controles tratados con las enzimas inactivadas o con solución fisiológica durante 6 días luego de inducida la lesión.

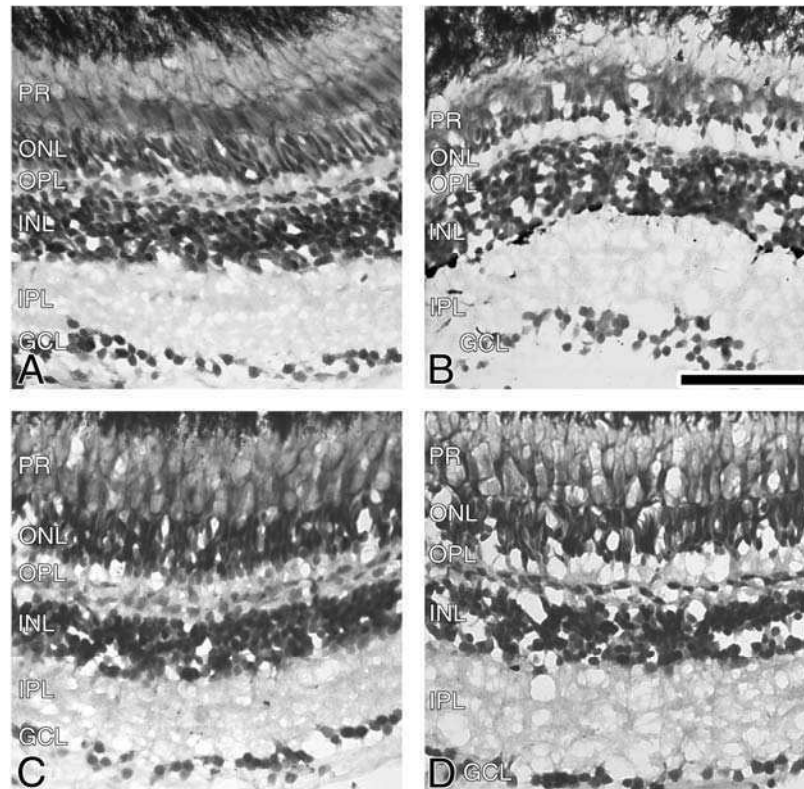


Figura 17. Histología de secciones de retina de pez cebra lesionadas con 2 μM de ouabaína (día 0) y posteriormente tratadas durante 6 días con solución salina (A, C) o MRS2179 (B, D). Los cortes de tejido teñidos por el método de Nissl se examinaron a los 7 (A, B) ó 14 (C, D) días luego de inducida la lesión. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de células ganglionares. La barra indica 50 μm .

Las retinas lesionadas y subsecuentemente tratadas con apirasa durante 6 días mostraron en el día 14 una estructura laminar, con un evidente grado de reorganización en capas nucleares e interplexiformes en comparación con lo observado en el día 7. De todos modos, se observó un retraso de la reparación tisular en comparación con retinas lesionadas y tratadas durante 6 días con apirasa inactivada y evaluadas en el día 14 (**figura 15: C, D**).

En contraste, retinas lesionadas y posteriormente tratadas con hexoquinasa durante 6 días no mostraron cambios morfológicos significativos a día 14 con respecto a retinas lesionadas y tratadas con hexoquinasa inactivada y evaluadas en el mismo intervalo luego de la lesión (**figura 16: C, D**).

Cuando se evaluó el efecto del tratamiento durante 6 días con MRS2179, el tejido examinado a día 14 mostró una recuperación morfológica significativa, con respecto al tejido observado a día 7. Sin embargo, el tejido se encontró más dañado en comparación con retinas lesionadas y tratadas durante 6 días con solución salina y evaluadas el día 14 posterior a la lesión (**figura 17: C, D**).

Estos resultados sugieren que el efecto de impedir la correcta regeneración del tejido a través del secuestro o la inhibición transitoria de la acción de los nucleótidos extracelulares, puede ser revertido, al menos parcialmente.

10. Efecto de la lesión con ouabaína sobre la expresión de la NTPDasa2

De las NTPDasas de membrana plasmática con actividad enzimática extracelular, la NTPDasa2 hidroliza ATP provocando la acumulación de ADP en el medio extracelular. Ya que el ADP parece ejercer un importante rol en la regulación de la regeneración retiniana, el estudio de la localización de la NTPDasa2 durante la degeneración y regeneración tisular podría evidenciar su importancia durante dicho proceso. Por consiguiente, se estudió si la lesión retiniana induce cambios en la expresión de esta enzima examinando su localización en las capas retinianas a través de inmunohistoquímica de fluorescencia, a diferentes días posteriores a la lesión con ouabaína.

Como se observa en la **figura 18**, el patrón de expresión de la NTPDasa2 sufrió cambios aparentes luego de lesionar el tejido retiniano. En retinas no lesionadas (panel **A**) la

NTPDasa2 se expresa mayoritariamente en los procesos postsinápticos, principalmente en la OPL y con menor intensidad en la IPL. Luego de la inducción de la lesión parcial con 2 μ M de ouabaína, la expresión de la NTPDasa2 disminuyó significativamente en la OPL.

Al mismo tiempo, se indujo su expresión en la INL (en donde se encuentran los cuerpos celulares de las interneuronas), así como en la capa de células ganglionares y en la capa de fibras, donde se encuentran los axones de este tipo neuronal (paneles **D**, **G**). Particularmente el día 14 (panel **J**), aunque también a partir del día 2 posterior a la lesión, se observó una sobre-expresión de esta enzima también en la capa de los fotorreceptores (PR). A los 30 dpi (panel **M**), la NTPDasa2 mostró un patrón de localización similar al exhibido por retinas no lesionadas, es decir un elevado grado de expresión en la capa sináptica externa (OPL) y más débilmente en la IPL.

La distribución de la proteína SV2 (marcador de vesículas presinápticas) no mostró variaciones significativas en su localización en las capas retinianas en los diferentes días posteriores a la lesión (**figura 18**). Se observó, sin embargo, un aparente cambio relativo en la densidad de expresión de esta proteína vesicular debido probablemente a la desorganización de las proyecciones y contactos sinápticos. De todas maneras, la expresión de SV2 se mantuvo relativamente constante durante las etapas degenerativas y proliferativas luego de la lesión y se limitó siempre a las capas sinápticas tanto externa como interna.

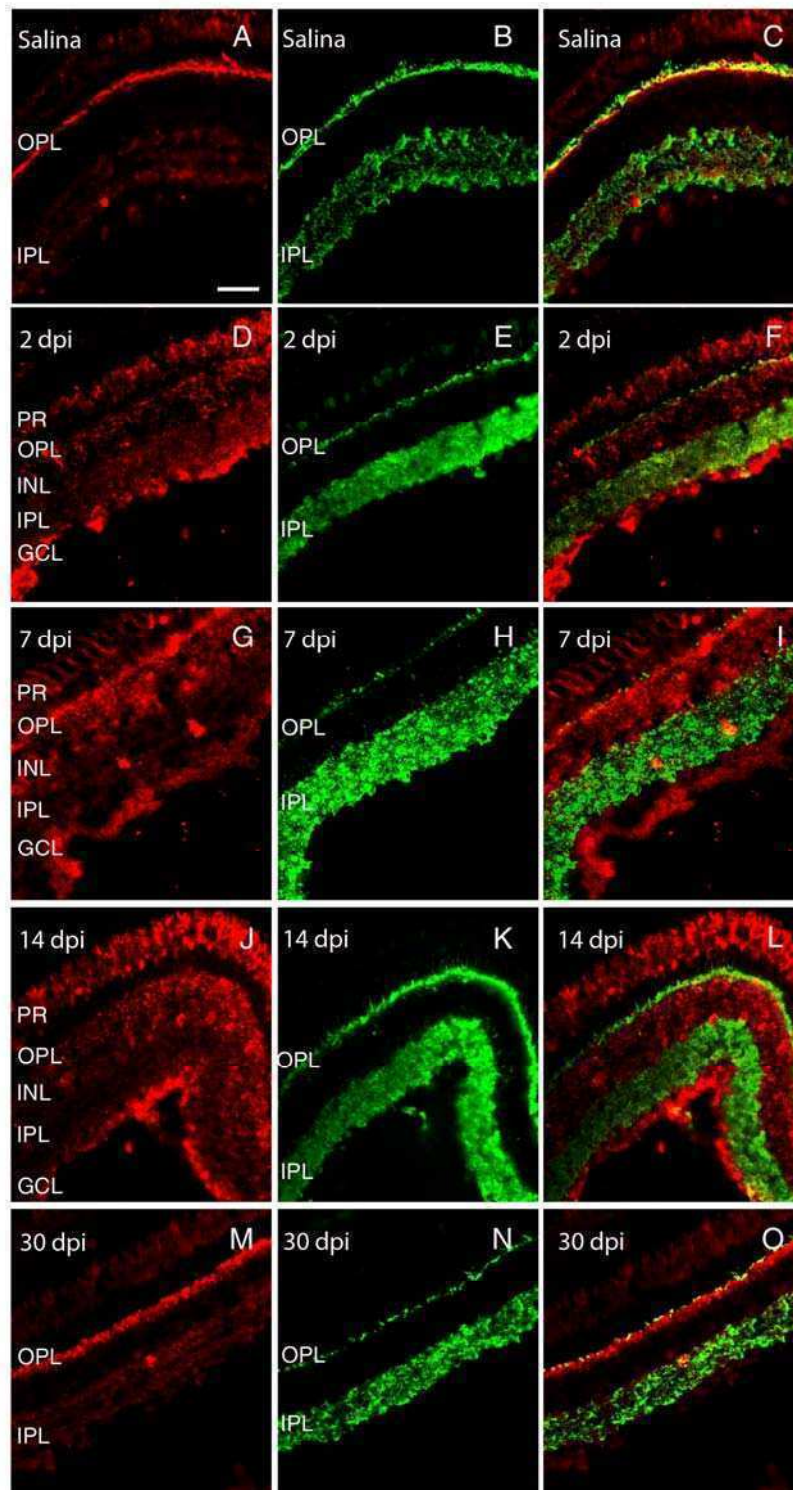


Figura 18. Microfotografías fluorescentes representativas de retinas de pez cebra no lesionadas (A, B, C), o lesionadas con ouabaína y examinadas a diferentes días luego de inducida la lesión: 2 dpi: D-F; 7 dpi: G-I; 14 dpi: J-L; 30 dpi: M-O. La inmunodetección correspondiente a la NTPDasa2 se observa en color rojo (A, D, G, J, M). En verde se muestra el marcador de vesículas presinápticas SV2 (B, E, H, K, N). En C, F, I, L, O se muestra la superposición de las imágenes de cada fila. PR:

capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de células ganglionares. La barra indica 50 μm .

Lesión global de la retina

11. Análisis histológico de la retina de pez cebra luego de un daño global con ouabaína

Se evaluó la capacidad regenerativa de la retina de pez cebra luego de una lesión citotóxica global, es decir, luego de dañar a todas las capas retinianas, incluyendo a los fotorreceptores, inducida por 14 μM de ouabaína inyectada intraocularmente (la concentración final en el vítreo fue de aproximadamente 10 μM).

La **figura 19** muestra secciones de tejido retiniano, teñidas mediante la técnica de Nissl, a diferentes días posteriores a la lesión causada con 10 μM de ouabaína en el día 0 (control, inyectado con solución salina y días 2, 5, 7, 14, 28 y 60). Luego de inducida la lesión, principalmente a los 2 dpi, el tejido mostró una gran desorganización tanto en las capas nucleares como en las capas sinápticas. En los días 2 y 5 posteriores a la lesión, el daño fue visible en todas las capas retinianas, y resultó evidente la reducción en el número de núcleos en la capa de células ganglionares, la INL y la capa de fotorreceptores. Asimismo, se observó un posible daño en el epitelio pigmentario. Luego de 7 días, se observó un incremento en el número de núcleos tanto en la ONL como en la INL. En los días 14 y 28 luego de inducida la lesión se observó un aumento en la cantidad de núcleos en la capa de células ganglionares.

Además, y a pesar de la aparente reducción en el número de núcleos, en los días 14 y 28 posteriores a la lesión, el tejido mostró una progresiva reorganización tanto en la capa de los

fotorreceptores (en los segmentos internos y externos y también en la ONL) como en la región de las células horizontales, la INL y la GCL. Luego de 60 días de inducida la lesión la retina mostró un avanzado grado de reorganización en su estructura tanto en sus capas nucleares, con un número aparentemente adecuado de núcleos celulares, como en las capas sinápticas.

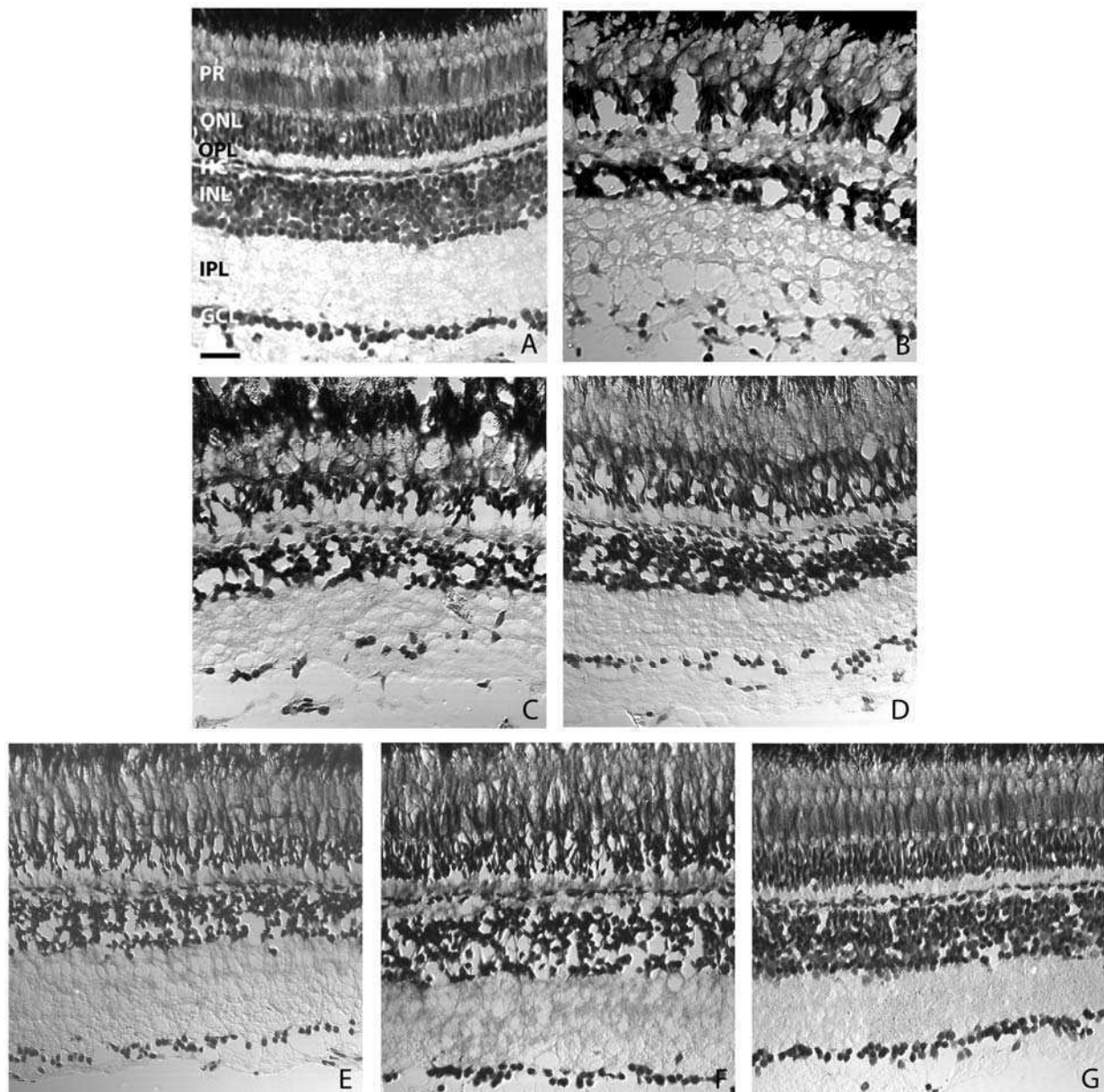


Figura 19. Histología de retinas de pez cebra a diferentes días luego de una única inyección intraocular de 10 μ M final de ouabaína. A: Control salino, B: 2 dpi, C: 5 dpi, D: 7 dpi, E: 14 dpi, F: 28 dpi, G: 60 dpi. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme

externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de células ganglionares; HC: células horizontales. La barra indica 40 μm . dpi: días posteriores a la lesión con ouabaína.

Estos resultados demuestran que la retina posee la capacidad de regenerarse luego de una lesión global, es decir, que involucra daño en todas las capas retinianas, incluyendo la capa de fotorreceptores.

12. Efecto de la lesión global con ouabaína sobre la proliferación celular

Con el objetivo de caracterizar el modelo de lesión global de la retina con 10 μM de ouabaína, se estudió el patrón temporal de proliferación de las células progenitoras presentes en la retina, a diferentes días luego de inducida la lesión. Para ello, se inyectó intraocularmente ouabaína en el día 0 y a diferentes días posteriores a la lesión se cuantificó el número de células positivas para BrdU. En cada caso, 24 horas antes del sacrificio, se realizó una única inyección intraocular de BrdU.

La lesión indujo la activación mitótica de las células progenitoras presentes en la INL y ONL (**figura 20**), así como en la CMZ (**figura 21**). El número de células proliferativas, cuantificado en un intervalo de 24 horas, alcanzó un máximo a los 7 dpi. A partir del día 11 posterior a la lesión, el número de células positivas para BrdU, durante un intervalo de igual duración, no mostró diferencias significativas con respecto a las retinas controles, no lesionadas.

En los paneles **B** de las **figuras 20** y **21** se muestran proyecciones bidimensionales de microfotografías confocales de cortes de retina, tomadas en el eje z. En dichas imágenes, se observan los núcleos marcados con BrdU en la retina madura (**figura 20**) y en la CMZ (**figura 21**), en retinas controles o a 7 dpi y expuestas por 24 horas al análogo de la timidina.

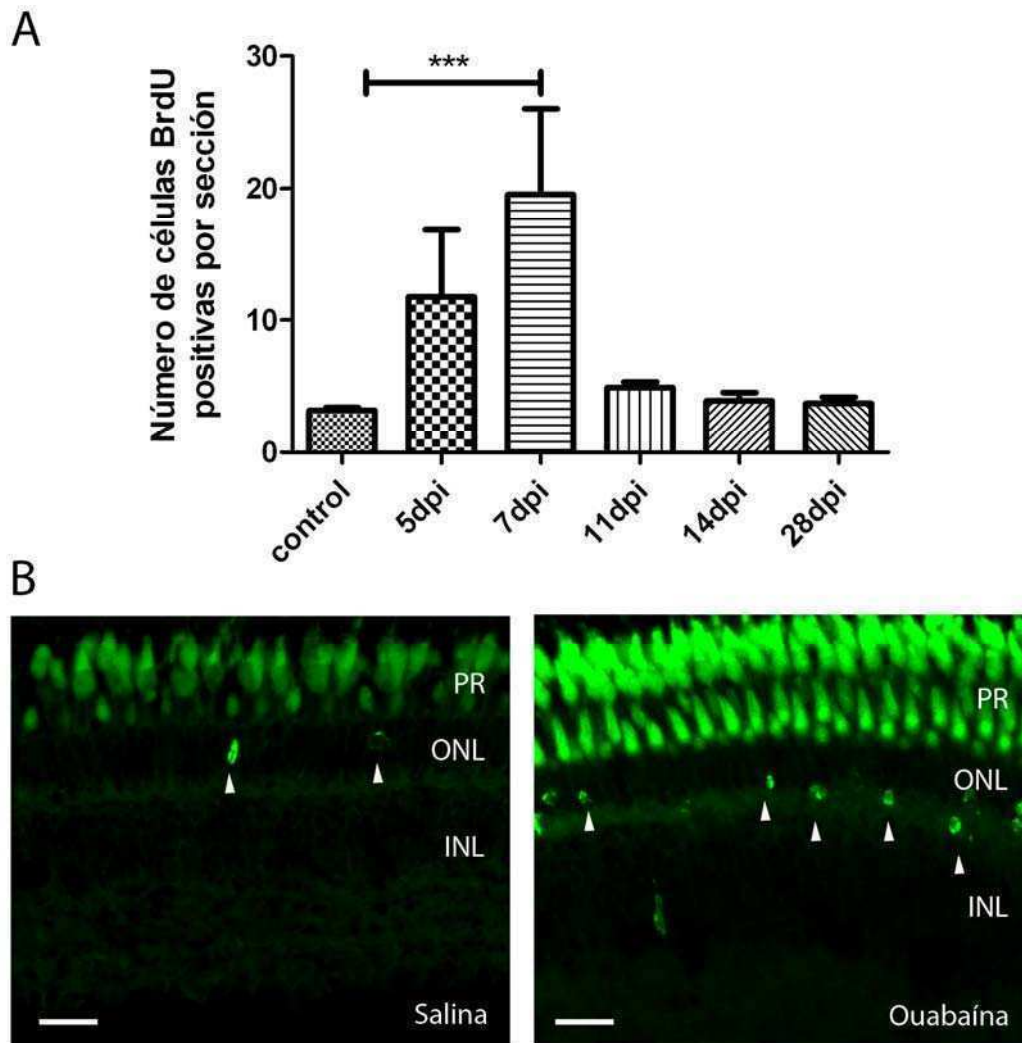


Figura 20. Células proliferativas detectadas en la retina diferenciada de pez cebra luego de 24 horas de exposición a BrdU, a distintos días luego de la lesión. Los peces fueron previamente inyectados con solución salina o con 10 μM final de ouabaína (día 0). **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=4-5$ peces cebra). $***p<0,001$ (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías representativas de cortes de retinas en los cuales se observan los núcleos positivos para BrdU (puntas de flecha) en la zona de la retina madura en retinas controles o a los 7 dpi. PR: capa de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna, dpi: días posteriores a la lesión con ouabaína. La barra indica 20 μm . La fluorescencia en la capa de los fotorreceptores (segmentos internos y externos) se debe a autofluorescencia de este tipo celular, que se observa también, en la mayoría de los cortes, en los controles negativos en ausencia del anticuerpo primario o secundario.

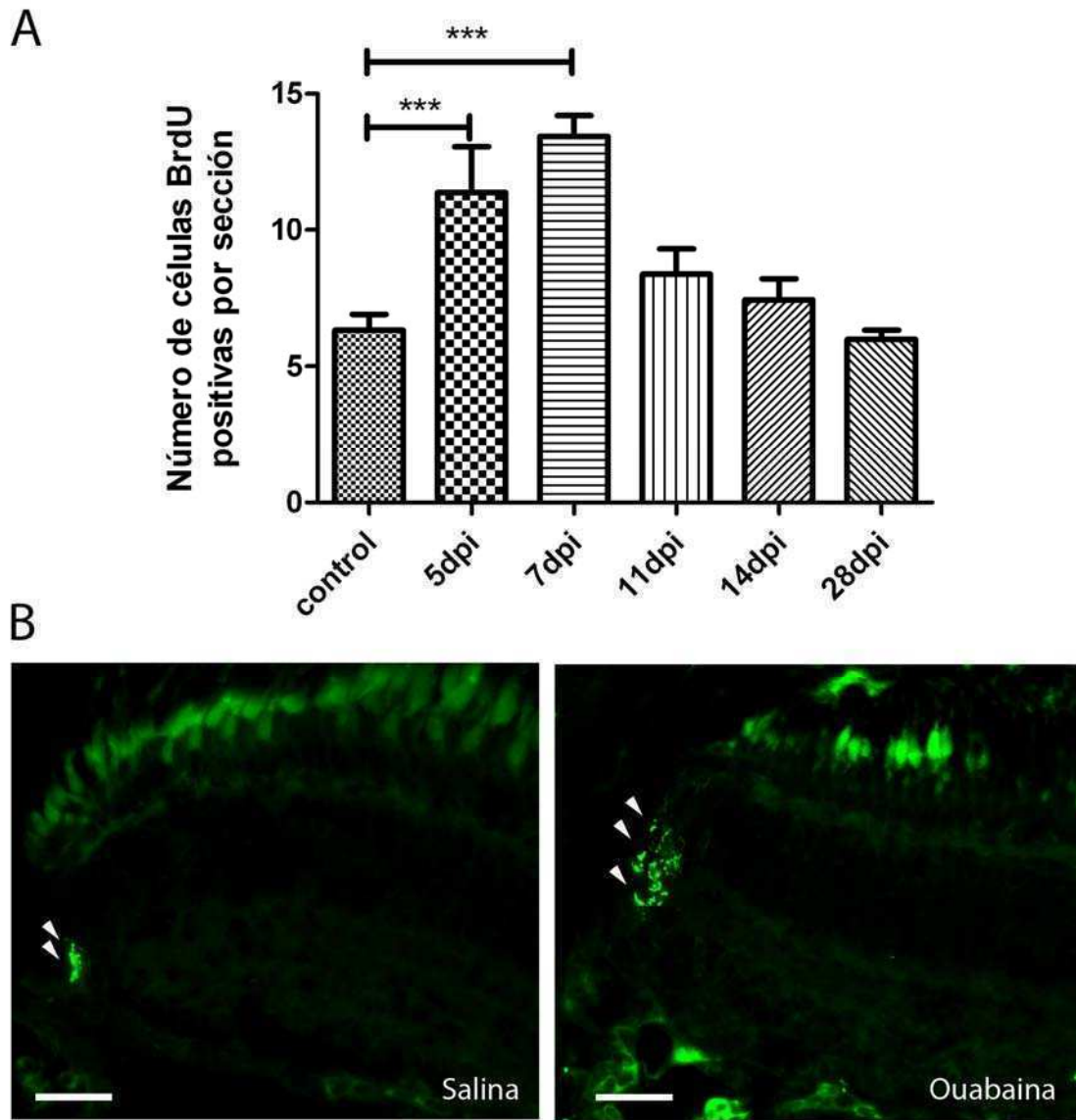


Figura 21. Células proliferativas detectadas en la CMZ de la retina de pez cebra luego de 24 horas de exposición a BrdU, a distintos días luego de inducida la lesión. Los peces fueron previamente inyectados con solución salina o con 10 μ M final de ouabaína (día 0). **A:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número de células positivas para BrdU por sección y por CMZ, expresados como la media \pm el desvío estándar ($n=4-5$ peces cebra). *** $p<0,001$ (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **B:** Microfotografías representativas de retinas en las cuales se observan los núcleos positivos para BrdU (puntas de flecha) en la CMZ de la retina en retinas controles o a los 7 dpi (días posteriores a la lesión con ouabaína). La barra indica 20 μ m.

13. Efecto de los nucleótidos extracelulares sobre la proliferación celular inducida por la lesión

Debido a las controversias existentes con respecto a la capacidad de regeneración retiniana según sean lesionados, o no, los fotorreceptores, y que este hecho podría desencadenar distintos mecanismos de regeneración, fue necesario examinar el rol de los nucleótidos extracelulares durante el proceso de regeneración luego de la inducción de un daño global del tejido retiniano. Con tal fin, se trató a retinas previamente lesionadas con apirasa (enzima que hidroliza nucleótidos di- y trifosfato) y ARL67156 (inhibidor de la actividad NTPDasa), durante 6 días, y a día 7 se evaluó su efecto sobre la proliferación celular inducida por la lesión (ver protocolo en **Tabla I**).

Se observó que el tratamiento con apirasa provocó una inhibición significativa del aumento de la cantidad de células positivas para BrdU inducido por la lesión con ouabaína, tanto en la retina madura (**figura 22, A**) como en la CMZ (**figura 23, A**).

Asimismo, el tratamiento con ARL67156 provocó una disminución significativa de la proliferación de células precursoras inducida por la lesión, en ambas zonas examinadas (**figuras 22, A y 23, A**).

En el panel **C** de las **figuras 22 y 23** se muestran proyecciones bidimensionales de microfotografías confocales de retinas, tomadas en el eje z, y en las cuales se observan los núcleos positivos para BrdU en retinas lesionadas luego del tratamiento con apirasa o con ARL67156, respectivamente.

Los grupos controles fueron lesionados en el día 0 y posteriormente tratados durante 6 días con apirasa inactivada o con solución salina. En la CMZ, el tratamiento con apirasa inactivada provocó una pequeña pero significativa disminución en el número de células proliferativas. Sin embargo, el efecto observado luego del tratamiento con la enzima activa fue mucho más fuerte y mostró diferencias significativas con el valor control (apirasa

inactivada), provocando la completa inhibición del incremento del número de células proliferativas inducido por la lesión.

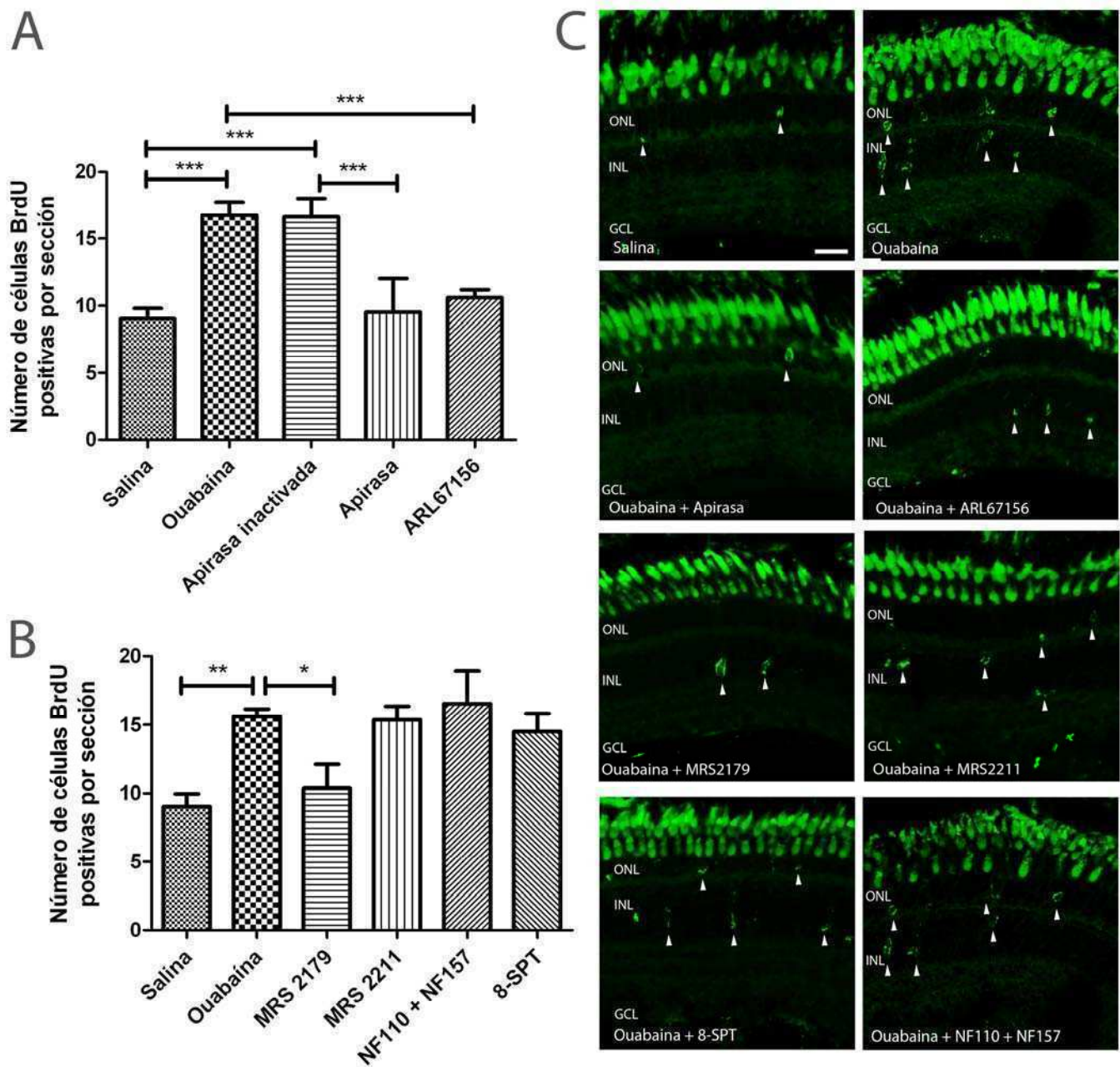


Figura 22. Células proliferativas detectadas en la retina madura de pez cebra luego de 6 días de exposición a BrdU. Los peces fueron inyectados intraocularmente con solución salina o con 10 μ M de ouabaína (día 0). Luego los peces tratados con ouabaína fueron inyectados con solución salina, apirasa inactivada, apirasa, ARL67156, MRS2179, MRS2211, 8-SPT o NF110+NF157 durante 6 días. **A, B:** Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número de células positivas para BrdU por sección, expresados como la media \pm el desvío estándar (n=4-5 peces cebra). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **C:** Microfotografías

confocales representativas de secciones de retinas en las cuales se observan los núcleos positivos para BrdU. ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna, GCL: capa de células ganglionares. La barra indica 20 μm . La fluorescencia en la capa de fotorreceptores (segmentos internos y externos) se debe a autofluorescencia de este tipo celular, que se observa también en la mayoría de los cortes en los controles negativos en ausencia del anticuerpo primario o secundario.

En la retina madura completamente diferenciada, el tratamiento con apirasa inactivada no tuvo efecto mientras que el tratamiento con la enzima activa inhibió completamente el aumento en el número de células positivas para BrdU inducido por la lesión.

Estos resultados indican que los nucleótidos extracelulares estarían involucrados en la activación mitótica de células proliferativas luego de la inducción de una lesión global de la retina con 10 μM de ouabaína.

14. Tratamiento con antagonistas de receptores purinérgicos sobre la proliferación celular en retinas globalmente lesionadas

Posteriormente, se estudió cuál es el nucleótido extracelular que podría estar involucrado en la regulación de la proliferación de las células precursoras retinianas, luego de la inducción de un daño global de la retina. Con dicho fin, se trató durante 6 días a retinas previamente lesionadas con diferentes antagonistas de receptores purinérgicos y se cuantificó el número de células proliferativas en el día 7 posterior a la inducción de la lesión (ver protocolo en **Tabla I**). Se observó que el tratamiento con MRS2179 (antagonista de receptores P2Y₁ con alta afinidad por el ADP) inhibió completamente el aumento de la proliferación celular inducido por la lesión, ya sea en la retina madura (**figura 22**) como en la CMZ (**figura 23**).

Por el contrario, el tratamiento con otros antagonistas de receptores principalmente activados por ADP (MRS2211), ATP (NF110 + NF157) o adenosina (8-SPT) no tuvo efecto significativo sobre la proliferación celular inducida por la lesión.

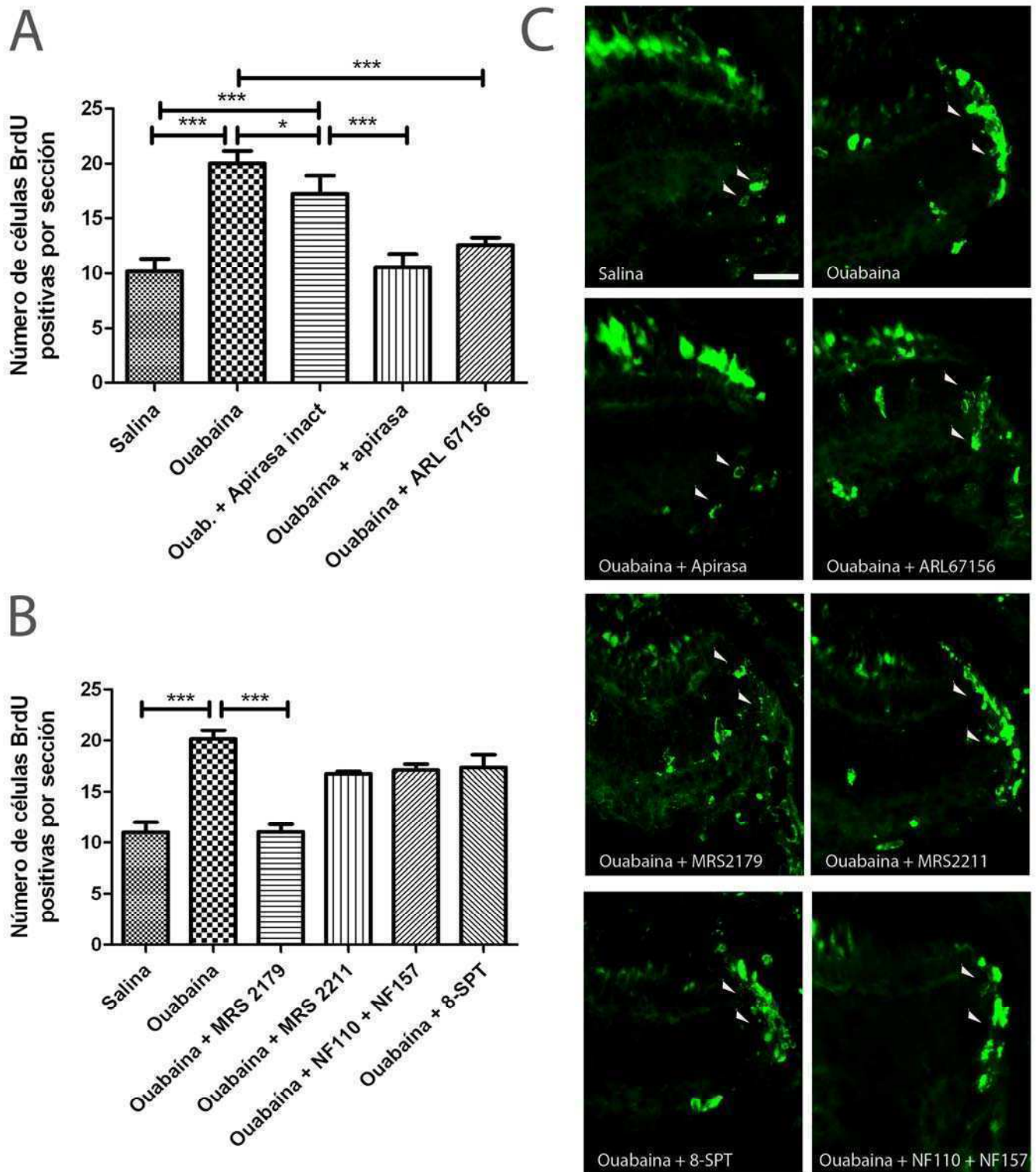


Figura 23. Células proliferativas detectadas en la CMZ de la retina de pez cebra luego de 6 días de exposición a BrdU. Los peces fueron inyectados intraocularmente con solución salina o con 10 μ M de ouabaína (día 0). Luego, los peces tratados con ouabaína fueron inyectados con solución salina, apirasa inactivada, apirasa, ARL67156, MRS2179, MRS2211, 8-SPT o NF110+NF157 por 6 días.

A, B: Cuantificación del número de células proliferativas. Los valores indican el número de células positivas para BrdU por sección y por CMZ, expresados como la media \pm el desvío estándar (n=4-5 peces cebra). *p<0,05, ***p<0,001 (ANOVA seguido por Tukey-Kramer). **C:** Microfotografías confocales representativas de secciones de retinas en las cuales se observan los núcleos positivos para BrdU en la CMZ. La barra indica 20 μ m.

En los paneles **C** de las **figuras 22** y **23** se muestran proyecciones planas en dos dimensiones de microfotografías confocales de cortes de retina, tomadas en el eje z, y en las que se observan los núcleos marcados con BrdU en la retina madura (**figura 22**) y en la CMZ (**figura 23**) en retinas controles y lesionadas luego del tratamiento con los diferentes antagonistas de receptores purinérgicos (P2Y, P2X ó P1).

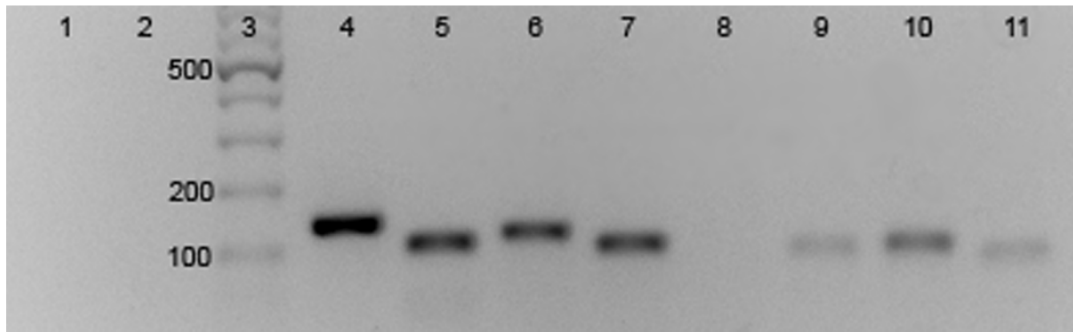
Estos resultados sugieren que la activación mitótica de las células progenitoras retinianas inducida por la lesión global estaría mayoritariamente mediada por el ADP extracelular a través de su unión a receptores específicos de tipo P2Y₁ y, además, que la actividad ecto-ATPasa sería necesaria para que ocurra dicha activación.

15. Receptores purinérgicos que se expresan en la retina de pez cebra

Se estudió, a través de RT-PCR, la expresión transcripcional de diferentes receptores purinérgicos en la retina adulta de pez cebra.

Como primer paso, se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos y se encontró que los receptores P2Y₁₃ y P2Y₁₁ no estarían presentes en el genoma de pez cebra o, al menos, no han sido descritos hasta ahora.

Por otro lado, se observó que el ARN mensajero de los receptores metabotrópicos P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₁₂ y el de los receptores ionotrópicos P2X₁, P2X₂ y P2X₇ está expresado en la retina adulta de pez cebra. Por el contrario, no se detectó el ARNm del receptor P2X₃ (**figura 24**).



- | | |
|--|------------------|
| 1: Sin primers | 6: P2X7, 130 bp |
| 2: Sin cDNA | 7: P2Y12, 110 bp |
| 3: Fragmentos de ADN
de longitud conocida | 8: P2X3 |
| 4: β -Actina, 147 bp | 9: P2X1, 101 bp |
| 5: P2Y1, 115 bp | 10: P2X2, 107 bp |
| | 11: P2Y2, 93 bp |

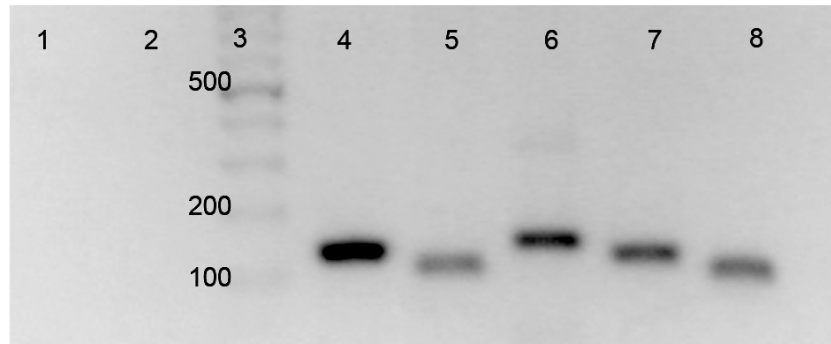
Figura 24. Expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de diferentes receptores purinérgicos de tipo P2Y y P2X en la retina adulta de pez cebra, detectados por RT-PCR. Los números 100, 200 y 500 representan las escalas de fragmentos de ADN de longitud conocida en pares de bases (bp), utilizadas para estimar los tamaños de los amplicones. Sin *primers* y sin cDNA corresponden a controles negativos de la PCR. β -actina se utilizó como control positivo. En la parte inferior de la figura, se indica el tamaño de cada amplicón calculado de manera teórica.

16. Enzimas NTPDasas expresadas en la retina de pez cebra

Se estudió en la retina adulta de pez cebra, a través de RT-PCR, la expresión de los ARN mensajeros de las NTPDasas con actividad catalítica extracelular (NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3), con excepción de la NTPDasa8.

Se halló en las bases de datos que el genoma de pez cebra contenía 3 genes codificantes de la secuencia de la NTPDasa2 (tres isoformas de la enzima previamente descritas en cerebro: mq, mv y mg), un gen para la NTPDasa1 y otro gen para la NTPDasa3. La NTPDasa8 fue la última descrita de esta familia de enzimas con actividad catalítica extracelular. Una secuencia similar a dicha enzima está presente en el genoma de pez cebra. Sin embargo, ésta no fue hallada hasta la fecha en el sistema nervioso de vertebrado.

En este trabajo se estudiaron la NTPDasa1, dos isoformas de la NTPDasa2 (mq, mv) y la NTPDasa3. La isoforma mg de la NTPDasa2 no fue estudiada ya que antecedentes del laboratorio (Ricatti y col, 2011) indicaron que su expresión en la retina es mucho más baja que la de las otras isoformas. Se observó que los ARNm de todas las enzimas estudiadas se expresan en la retina adulta de pez cebra (**figura 25**).



- | | |
|--|------------------------|
| 1: Sin primers | 5: NTPDasa1, 111bp |
| 2: No RT | 6: NTPDasa2 mq, 149 bp |
| 3: Fragmentos de ADN
de longitud conocida | 7: NTPDasa2 mv, 130 bp |
| 4: 18S, 137 bp | 8: NTPDasa3, 107bp |

Figura 25. Expresión de los ARN mensajeros de los receptores purinérgicos en la retina adulta de pez cebra, detectados por RT-PCR. Los números 100, 200 y 500 representan las escalas de fragmentos de ADN de longitud conocida en pares de bases (bp), utilizadas para estimar los tamaños de los amplicones. Sin *primers* y No RT corresponden a controles negativos de la PCR. No RT indica que se realizaron todas las reacciones para la identificación del ARNm aunque se omitió la enzima transcriptasa reversa en el medio de reacción correspondiente. El ARN ribosomal 18S se utilizó como control positivo. En la parte inferior de la figura, se indica el tamaño de cada amplicón calculado de manera teórica.

17. Cambios en el nivel de expresión de los ARNm de los receptores purinérgicos y las NTPDasas luego de la lesión

Una vez detectada la expresión de los ARNm de los receptores purinérgicos y de las NTPDasas en la retina adulta de pez cebra, se estudiaron, por RT-qPCR, los posibles cambios cuantitativos en su expresión luego de la inducción de la lesión global de la retina.

Como se describió previamente en la sección de Materiales y Métodos, para el análisis de los experimentos de PCR cuantitativa se seleccionó un gen de referencia endógena. En un principio, se examinó, como posibles genes de referencia, la expresión del ARN mensajero del gen CNG1 (del inglés *cyclic nucleotide-gated channel*), expresado en los segmentos externos de los fotorreceptores de tipo bastones, y del gen que codifica para la subunidad ribosomal 18S. En la **figura 26**, se muestran los valores obtenidos (expresados como media \pm desvío estándar de triplicados) del ciclo umbral de detección de fluorescencia (Ct), en tres experimentos independientes, tanto para el gen CNG1 como para el gen 18S.

Se observó que el Ct obtenido para CNG1 presentó variaciones entre los diferentes días posteriores a la lesión examinados para cada experimento. Por el contrario, cuando se evaluó la expresión del gen 18S, se observó que el número de Ct obtenido en los diferentes días posteriores a la lesión estudiados se mantuvo constante en cada experimento. Esto indicó que el tratamiento con ouabaína o el ambiente regenerativo no modifican significativamente su expresión. Esta característica resultó adecuada para utilizar este gen endógeno como gen de referencia. En consecuencia, se utilizó el gen 18S como gen referencia para los ensayos que se describen a continuación.

Se examinó, como posible gen de referencia, además, a β -actina. Sin embargo, este gen no fue utilizado ya que los valores obtenidos de ciclo umbral de detección de fluorescencia entre los diferentes días posteriores a la lesión examinados presentaron variaciones más grandes que los valores correspondientes al gen 18S.

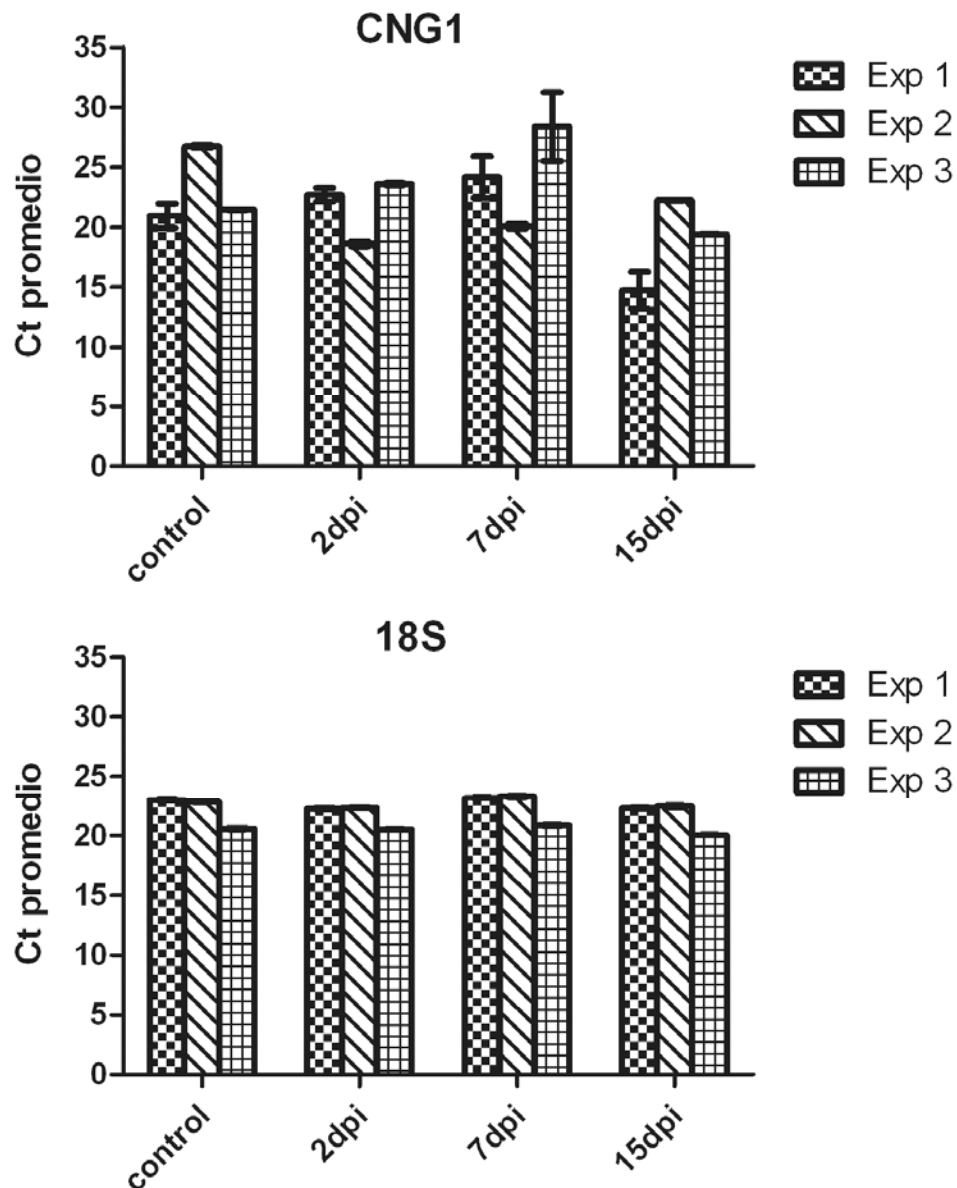


Figura 26. Número de ciclos umbrales de detección de fluorescencia (Ct) en función del día luego de la lesión (dpi) estudiado, obtenido en tres experimentos independientes, para los genes CNG1 y 18S. Los valores de Ct se obtuvieron tomando un valor arbitrario de fluorescencia (umbral) de 0,06 para cada ensayo. El Ct promedio corresponde al valor obtenido como media \pm desvío estándar de la misma muestra por triplicado para cada gen amplificado por RT-qPCR. Exp 1, 2 y 3 representan experimentos realizados en días distintos y con 3 muestras independientes.

Por otro lado, como se describió en Materiales y Métodos, en cada experimento se calculó la eficiencia de la duplicación del ADN en cada ciclo de la qPCR para cada tubo de reacción. La **figura 27** ejemplifica la forma en que se estimaron las pendientes a partir de las cuales se calcularon las eficiencias para los genes 18S y P2Y₁.

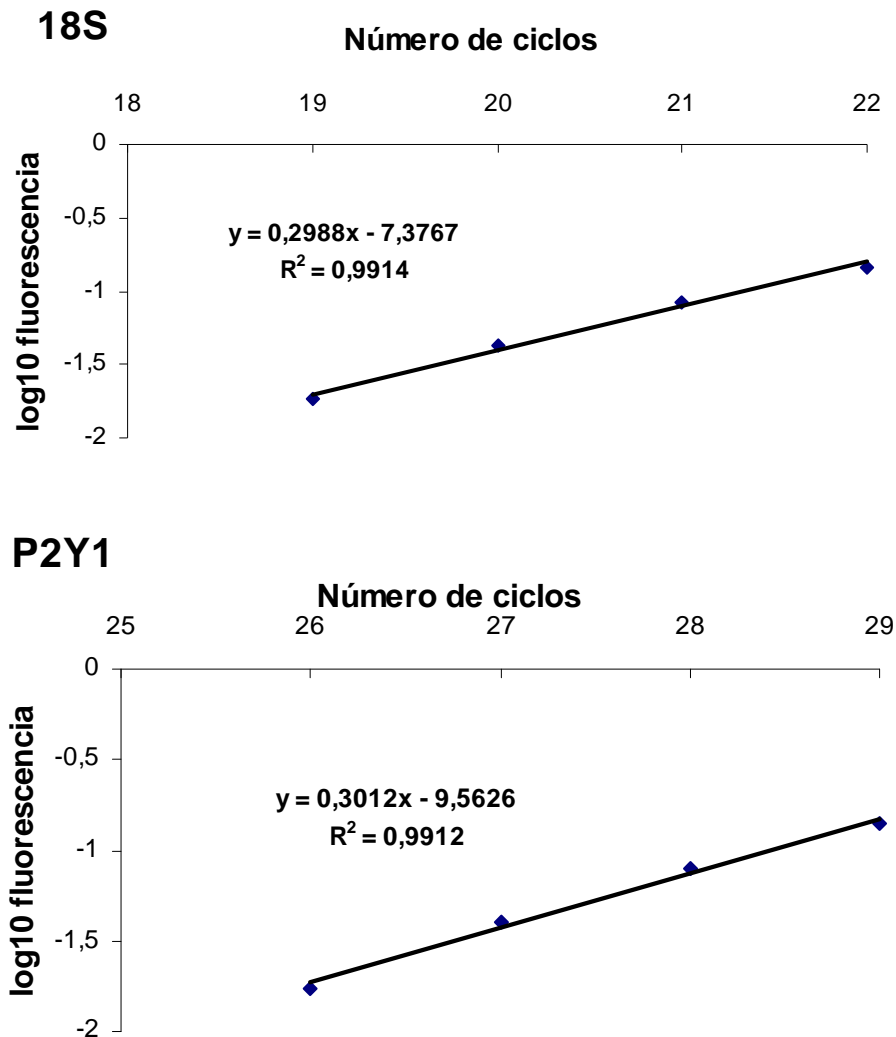


Figura 27. Representación gráfica del cálculo de las pendientes obtenidas para 18S y P2Y₁ a partir del logaritmo (log10) de la fluorescencia relativa emitida al final de cada ciclo de amplificación. Se tomó en cuenta exclusivamente la fluorescencia detectada en la parte exponencial de la curva de amplificación, obtenida a partir de cada medición de RT-qPCR. En todos los casos se tomaron entre 4 y 5 puntos, seleccionando la mejor pendiente (la más cercana a 0,3, que indicaría una eficiencia igual a 1, es decir, la eficiencia máxima) y el mayor coeficiente de correlación posibles.

En la **tabla 1** se muestran, a modo de ejemplo, los valores de eficiencia, pendiente, y coeficiente de correlación obtenidos durante los ensayos de RT-qPCR, en un experimento, tanto para el gen de referencia 18S como para el gen de interés P2Y₁, en retinas controles o lesionadas a diferentes dpi.

18S	P2Y₁	Tratamiento
S: 0,2988 R ² : 0,9914 E: 0,98975681	S: 0,3012 R ² : 0,9912 E: 1,0007835	Control no lesionado
S: 0,3029 R ² : 0,9903 E: 1,00863026	S: 0,304 R ² : 0,9911 E: 1,01372425	2 dpi
S: 0,3005 R ² : 0,9943 E: 0,99756077	S: 0,299 R ² : 0,9927 E: 0,99067334	7 dpi
S: 0,2999 R ² : 0,9896 E: 0,99204892	S: 0,2987 R ² : 0,9973 E: 0,9892987	15 dpi

Tabla 1: Eficiencia (E), pendiente (S) y coeficiente de correlación (R²) obtenidos durante los ensayos de RT-qPCR. Esta tabla compara el gen de referencia 18S con el gen de interés P2Y₁. A la derecha, se indica el día posterior a la lesión correspondiente (dpi). Los valores expresados en la tabla corresponden a la pendiente, el coeficiente de correlación y la eficiencia calculada en un tubo de reacción (para una explicación más detallada ver Materiales y Métodos).

Con respecto a los receptores purinérgicos, se estudió la expresión cuantitativa relativa del receptor P2Y₁, puesto que era el receptor involucrado en la regulación de la proliferación de las células progenitoras de la ONL, INL y CMZ. Se estudiaron, además, los receptores purinérgicos P2X₇ y P2Y₁₂, detectados en la retina con un aparentemente más elevado nivel de expresión, como se observó mediante la técnica de RT-PCR estándar que, por ejemplo, los otros receptores P2X o P2Y también detectados en este tejido en el pez cebra.

Se cuantificaron los niveles de expresión relativa de los ARNm a los días 2, 7 y 15 posteriores a la lesión, con respecto a los valores detectados en las retinas controles (no lesionadas).

Los niveles de expresión del ARN mensajero del receptor P2Y₁ mostraron un aumento significativo, de aproximadamente 7,5 veces respecto al control no lesionado, luego de 7 días de inducida la lesión (**figura 28**).

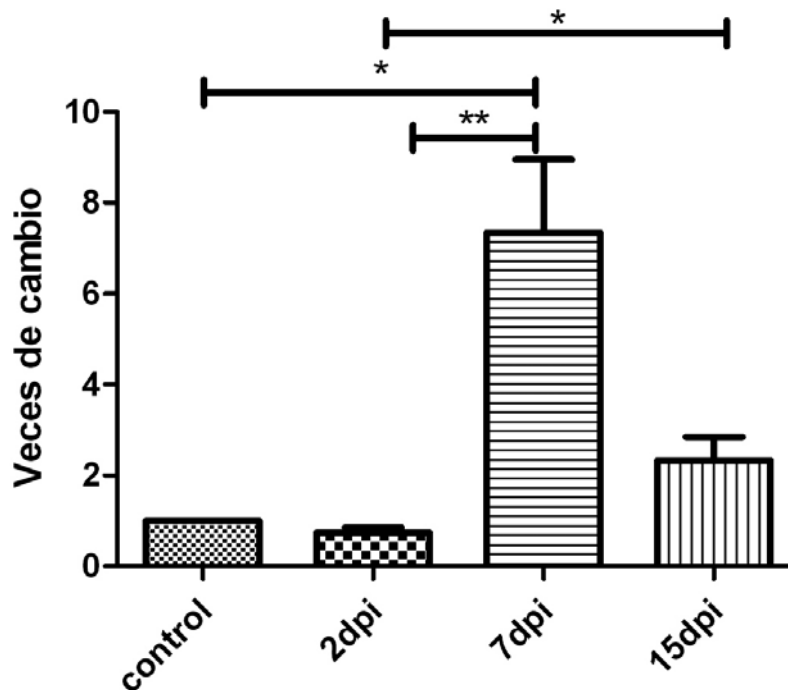


Figura 28. Cambios en la expresión del ARNm del receptor purinérgico P2Y₁ a diferentes días luego de la lesión (dpi) con 10 μ M de ouabaína, detectados por RT-qPCR, en retinas neurales de pez cebra. 18S fue utilizado como gen de referencia, mientras que P2Y₁ se examinó como gen de interés. Las veces de cambio representan la expresión de un gen en una muestra de interés (2, 7 ó 15 dpi) relativa a su expresión en una muestra calibradora (control no lesionado). La expresión de dicho gen, tanto en la muestra calibradora como en las muestras de interés, fue previamente normalizada con respecto a la expresión del gen de referencia (18S). Las veces de cambio se expresaron como la media \pm el desvío estándar de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn's de comparaciones múltiples).

En el día 15 posterior a la lesión, los niveles de expresión de dicho ARNm no fueron significativamente diferentes a los de las retinas controles. Sin embargo, estos valores fueron significativamente más elevados que los niveles cuantificados a los 2 dpi.

En contraste, los niveles de expresión de los ARNm de los receptores P2Y₁₂ y P2X7 (aparentemente no involucrados en la regulación de la proliferación celular inducida por la lesión) no mostraron cambios significativos en los distintos días posteriores a la lesión examinados (**figura 29**).

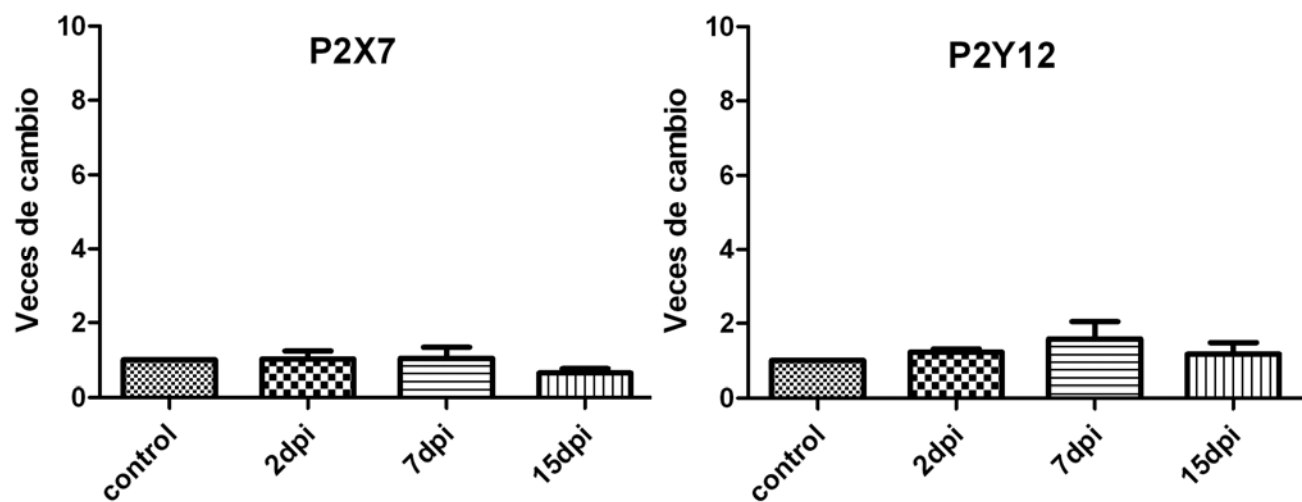


Figura 29. Expresión relativa de los ARNm de los receptores purinérgicos P2Y₁₂ y P2X7 en retinas tratadas con 10 μ M de ouabaína a diferentes días luego de la lesión (dpi) y detectados por RT-qPCR. 18S fue usado como gen de referencia, mientras que P2Y₁₂ y P2X7 fueron utilizados como genes de interés. Las veces de cambio representan la expresión del gen de interés en la muestra de interés (2, 7 ó 15 dpi), relativa a la muestra calibradora (control no lesionado), y ambas expresiones fueron también previamente normalizadas con respecto al gen de referencia (18S). Las veces de cambio se expresaron como la media \pm el desvío estándar de tres experimentos independientes. $P=0,1426$, P2X7; $p=0,1191$, P2Y₁₂ (Kruskal-Wallis).

Posteriormente, se estudiaron cambios en los niveles de expresión de los ARNm de las enzimas NTPDasas luego de inducida la lesión con una inyección intraocular de 10 μ M de ouabaína. Se observó que el nivel de expresión del ARNm de la NTPDasa1 aumentó significativamente 3,9 y 3,8 veces aproximadamente a los 2 y 7 dpi, respectivamente (**figura 30**). A los 15 días luego de la lesión, el nivel de expresión de esta enzima no fue significativamente distinto al de las retinas controles.

Si bien el nivel de expresión del ARNm de la NTPDasa3 aumentó significativamente en el día 7 posterior a la lesión con respecto al observado en el día 2 luego del daño, éste no resultó estadísticamente diferente al nivel de expresión de esta enzima en las retinas controles. No obstante, el valor de expresión relativa a 7 dpi fue aproximadamente 3,5 veces más elevado que en las retinas controles (**figura 30**).

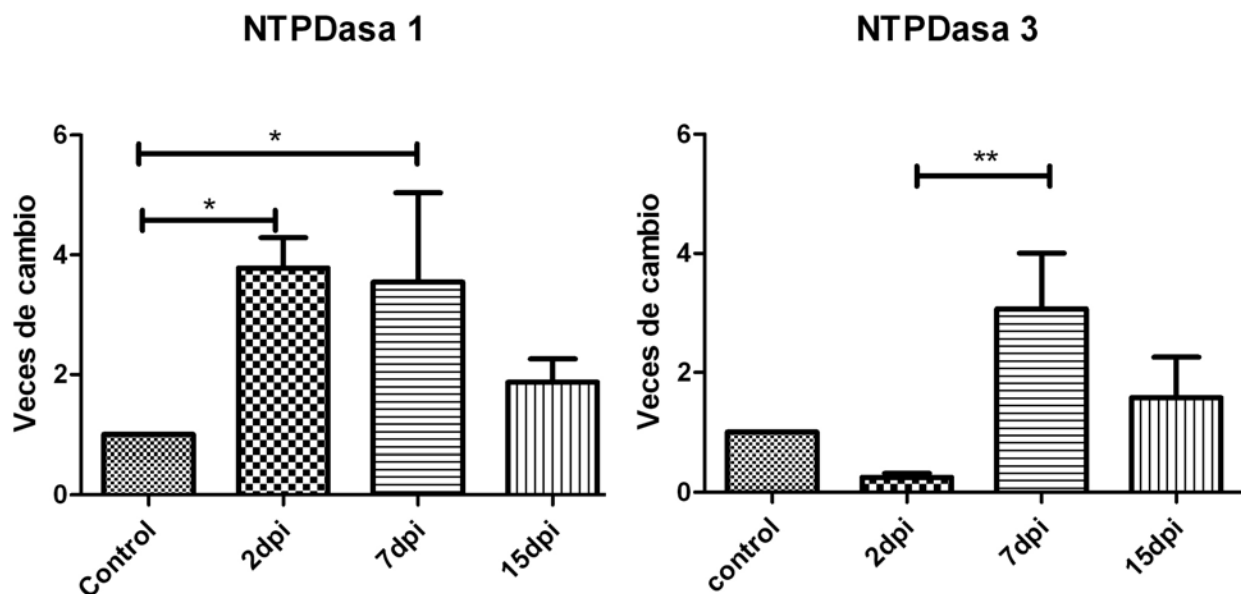


Figura 30. Cambios en la expresión de los ARNm de las enzimas NTPDasas 1 y 3, a diferentes días posteriores a la lesión (dpi), detectados a través de RT-qPCR, en retinas neurales de pez cebra. 18S fue utilizado como gen de referencia, mientras que NTPDasa1 y NTPDasa3 fueron examinados como genes de interés. Las veces de cambio representan la expresión del gen de interés en la muestra de interés (2, 7 ó 15 dpi) relativa a dicha expresión en la muestra calibradora (control no

lesionado) y ambos valores fueron previamente normalizados con respecto al gen de referencia (18S). Las veces de cambio se expresaron como la media \pm el desvío estándar, de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn's de comparaciones múltiples).

En el caso de la isoforma mq de la NTPDasa2, el nivel de expresión de su ARNm mostró un aumento significativo de aproximadamente 3 veces a los 2 dpi comparado con el control no lesionado. En el día 15 luego de la lesión, los valores de expresión del ARNm de esta enzima no mostraron diferencias significativas con respecto al control. A día 7, si bien los niveles de expresión no son estadísticamente diferentes con respecto al control no lesionado, resultaron significativamente más elevados que a los 15 dpi, con un cambio de 2,5 veces respecto al control (**figura 31**).

La isoforma mv de la NTPDasa2 mostró también un aumento significativo, de alrededor de 2,8 veces, en el nivel de expresión de su ARNm a los 2 días luego de inducida la lesión (**figura 31**).

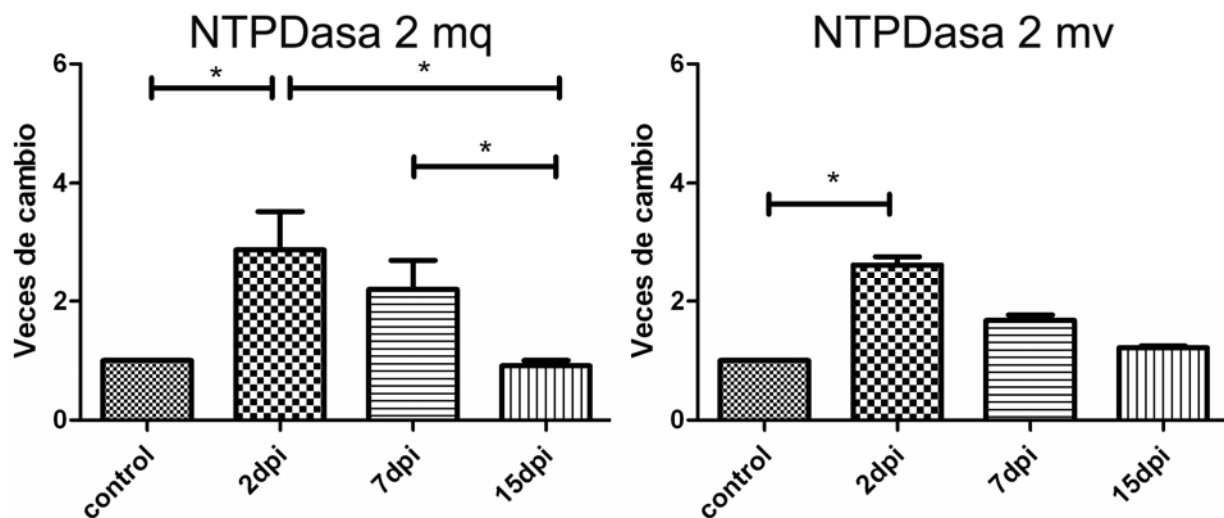


Figura 31. Cambios en la expresión de los ARNm de la enzima NTPDasa2 isoformas mq y mv, a diferentes días posteriores a la lesión (dpi), detectados a través de RT-qPCR, en retinas neurales de pez cebra. 18S fue utilizado como gen de referencia, mientras que la expresión de los genes de la NTPDasa2 mq y la NTPDasa2 mv fueron estudiados como genes de interés. Las veces de cambio representan la expresión del gen de interés en la muestra de interés (2, 7 ó 15 dpi) relativa a la

expresión de dicho gen en la muestra calibradora (control no lesionado). Dichos valores fueron a su vez normalizados con respecto a la expresión del gen de referencia (18S). Las veces de cambio se expresaron como la media \pm el desvío estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis seguido por el test de Dunn's de comparaciones múltiples).

18. Cambios en el patrón de expresión proteica del receptor P2Y₁ durante las etapas de degeneración y regeneración de la retina

A fin de obtener evidencias de la presencia de la proteína del receptor P2Y₁ en la retina de pez cebra, se realizaron ensayos de detección por el método de Western blot. Como tejido de control positivo se utilizaron homogenatos de cerebro de ratas wistar adultas.

En este ensayo, se esperaba observar una única banda específica correspondiente al peso molecular (PM) aparente de 63 kDa, según lo indicado por la compañía que comercializa el anticuerpo utilizado en este trabajo (Invitrogen). En la **figura 32**, se puede observar que se obtuvo una banda densa de PM aparente correspondiente a 63 kDa en la "calle 1", donde se sembró el homogenato de proteínas proveniente de cerebro de rata.

Además, se obtuvieron en dicha "calle", dos bandas adicionales, detectadas con muy baja intensidad, de PM aparente de 80-82 y 40-42 kDa. Se utilizó, además, una muestra correspondiente a homogenatos de cerebro de pez cebra. En este caso, se obtuvo una única banda de PM aparente de 63 kDa (**figura 32**, "calle 2").

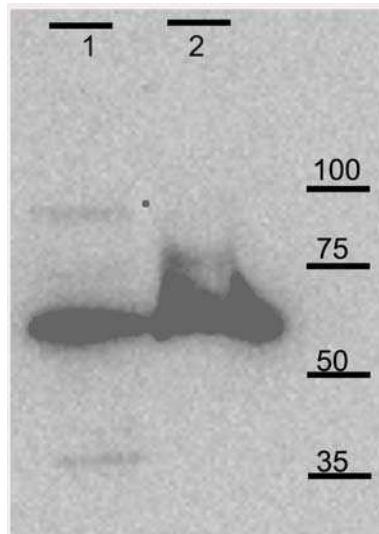


Figura 32. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa a la que se transfirió 25 μg de un homogenato conteniendo proteínas de cerebro de rata (calle 1) y de pez cebra (calle 2), separadas por electroforesis en SDS-PAGE. Las proteínas se detectaron a través de un anticuerpo policlonal dirigido contra el extremo carboxilo terminal del receptor P2Y₁ humano. Se utilizaron condiciones reductoras en la electroforesis (en presencia de β -mercaptoetanol). Los números 35, 50, 75 y 100 corresponden al marcador de peso molecular en kDa. El experimento fue repetido 4 veces con diferentes homogenatos de retinas.

Cuando se utilizaron homogenatos de retina intacta (no lesionada) de pez cebra, se observó una única banda de PM aparente de 80-82 kDa, en lugar de la banda de 63 kDa observada en el cerebro de esta especie y en el cerebro de rata (**figura 33, A**).

Debido a que la forma proteica desprovista de modificaciones postraduccionales del receptor P2Y₁, en pez cebra, correspondería a una banda de PM de aproximadamente 40 kDa, se repitió el experimento utilizando el doble de concentración de β -mercaptoetanol en el buffer de siembra. Sin embargo, la banda de 80-82 kDa no pudo ser dividida en bandas de menor PM aparente (**figura 33, B**).

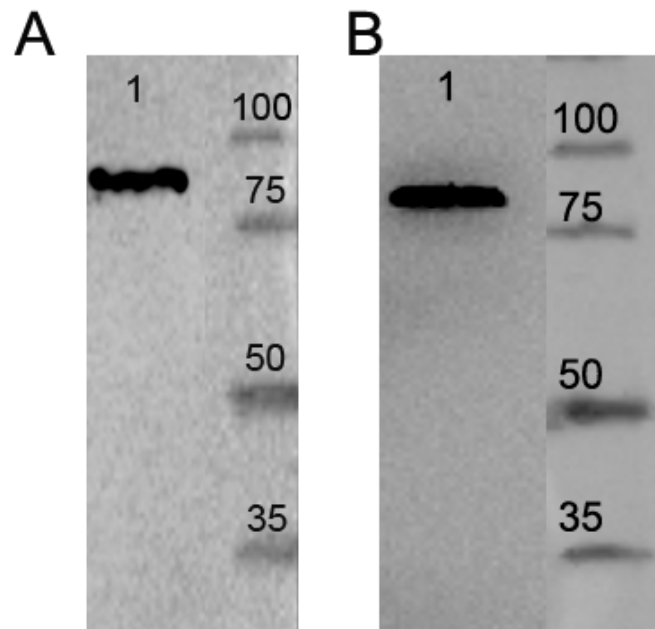


Figura 33. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa a la que se transfirió 80 μ g de un homogenato de proteínas proveniente de retinas no lesionadas de pez cebra (“calle 1” en A y B) separadas por electroforesis en SDS-PAGE. Las proteínas se detectaron a través de un anticuerpo policlonal dirigido contra el extremo carboxilo terminal del receptor P2Y₁ de humano. En A, se utilizó 10% de β -mercaptoetanol, mientras que en B se utilizó 20% de β -mercaptoetanol en el buffer de siembra en el PAGE. Los números 35, 50, 75 y 100 corresponden al marcador de peso molecular en kDa.

Posteriormente, se utilizaron homogenatos de retina de pez cebra obtenidos luego de 2, 7 y 15 días de inducida la lesión con 10 μ M de ouabaína (**figura 34**). En los días 2 (“calle 2”) y 7 (“calle 3”) luego de inducida la lesión, se obtuvieron tres bandas de PM aparente de 40-42, 63 y 80-82 kDa, siendo la más intensa la banda de 80-82 kDa y la menos intensa la de 63 kDa en ambos casos. En el día 15 posterior a la lesión, se obtuvo una única banda de PM aparente de 80-82 kDa (“calle 4”), al igual que en las retinas de pez cebra controles no lesionadas (“calle 1”).

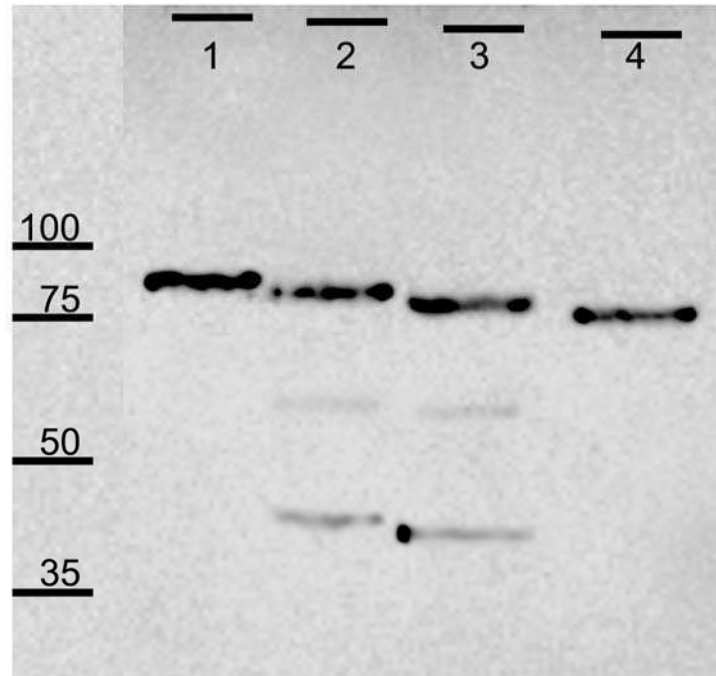


Figura 34. Fotografía de una membrana de nitrocelulosa a la que se transfirió 80 μg de un homogenato de proteínas de retina no lesionada de pez cebra (“calle 1”) y de retinas de pez cebra a día 2 (“calle 2”), 7 (“calle 3”) y 15 (“calle 4”) luego de la lesión intraocular con ouabaína, separadas por electroforesis en SDS-PAGE. Las proteínas se detectaron a través de un anticuerpo policlonal dirigido contra el extremo carboxilo terminal del receptor P2Y_1 humano. Se utilizaron condiciones reductoras (en presencia de 10 μM β -mercaptoetanol). Los números 35, 50, 75 y 100 corresponden al marcador de peso molecular en kDa. El experimento fue repetido 3 veces con diferentes homogenatos de retinas.

En la **tabla 2** se muestra la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) del receptor P2Y_1 en pez cebra, rata, ratón y humano. En esta última, se marcaron en negrita los 30 aminoácidos correspondientes a la secuencia utilizada para producir el anticuerpo. Los aminoácidos marcados en negrita en las secuencias de rata, ratón y pez cebra corresponden a los aminoácidos compartidos con la secuencia de humano, dentro de los 30 aminoácidos correspondientes a la secuencia utilizada para producir el anticuerpo.

Especie	Secuencia proteína P2Y ₁
Pez cebra	mtaefnntslisnatdspnqtsgcsltktgfgyylptvyilvltgfignslaiwmfvchmrpwwssi svymfnlaladfcyvlslpfllyyyfnktdwifgdvclrlqrfifhvnlygsilftcisvhrsgvvhplk slgrlkkknavrvalvwfivvagiapilyysrtrkkehhtcydtsqdelpgyfiysmcltvgfciplf iiilscyggivkalicndmdnaplrkksiyliiivltvfvavsyilpvhvmknlnmrarlyfqsdpdmacf ndrvyatyqvtrglaslnscvdpilyflagdtfrrrlsratkksrkgdhp lqskseetalnslpesv qngenrm
Humano	mtevlwpavpngtdaafllagpgsswgnstvastaavsssfkcaltktgfgyylpavyilvfiigfl gnsvaiwmfvfhmkpwsgisvymfnlaladflyvltlpalifyyfnktdwifgdamcklqrfifhv nlygsilftcisahrysgvvyplkslgrlkkknaiyvsvlwlvvvaipilfysgtgvrknktticydt sdeylrsyfiysmcttvamfcvplvliilgcyglivraliykdldnsplrksiyliiivltvfvavsyipfhv mktmnlrarldfqtamcafnrvyatyqvtrglaslnscvdpilyflagdtfrrrlsratkarr se anlqsksedmtlnilpefkqngdtsl
Rata	mtevpwsavpngtdaafllaglgslwgnstiaastaavsssfrcaliktgfyylpavyilvfiigflg nsvaiwmfvfhmkpwsgisvymfnlaladflyvltlpalifyyfnktdwifgdvmcklqrfifhvn ygsilftcisahrysgvvyplkslgrlkkknaiyvsvlwlvvvaipilfysgtgvrknktticydst sdeylrsyfiymcttvamfcvplvliilgcyglivraliykdldnsplrksiyliiivltvfvavsyipfhv ktmnlrarldfqtamcafnrvyatyqvtrglaslnscvdpilyflagdtfrrrlsratkarr sea nlqskseemtnilsefkqngdtsl
Ratón	mtevpwsvvpngtdaafllaglgslwgnstvastaavsssfqcaltktgfyylpavyilvfiigflg nsvaiwmfvfhmkpwsgisvymfnlaladflyvltlpalifyyfnktdwifgdamcklqrfifhvn ygsilftcisahrysgvvyplkslgrlkkknaiyvsvlwlvvvaipilfysgtgvrknktticydts ndylrsyfiysmcttvamfcvplvliilgcyglivkalyndldnsplrksiyliiivltvfvavsyipfhv ktmnlrarldfqtamcafnrvyatyqvtrglaslnscvdpilyflagdtfrrrlsratkarr sea nlqskseemtnilsefkqngdtsl

Tabla 2. Secuencia proteica del receptor P2Y₁ en diferentes especies de vertebrado. La homología dentro de los últimos 30 aminoácidos, utilizados para producir el anticuerpo, entre las secuencias de humano, rata y ratón es de 93 %, mientras que la homología entre las secuencias de humano y pez cebra es de 50%. Fuente: programa Blast de ZFIN (<http://zfin.org/action/blast/blast>).

19. Localización del receptor P2Y₁ en la retina de pez cebra

Seguidamente, se estudió la localización del receptor P2Y₁, a través de inmunohistoquímica de fluorescencia, en retinas controles y en retinas lesionadas a diferentes días luego de la inducción de la lesión con ouabaína.

En retinas no lesionadas (**figura 35, A**), el receptor P2Y₁ se expresa en las capas sinápticas (particularmente en la IPL), en las dendritas proximales, somas y axones de las células

ganglionares, así como en la capa de fibras. La marca observada en la IPL se distribuye de manera laminar y corresponde, probablemente, a los contactos sinápticos entre las dendritas de las células ganglionares y los terminales presinápticos de diferentes tipos de células bipolares y/o amácrinas, que se disponen en distintos estratos dentro de la IPL.

En retinas tratadas con ouabaína y examinadas a los 5 y 7 dpi (**figura 35 C, E**) se observó un aumento en la expresión del receptor P2Y₁, siendo éste más evidente en la INL (formando agregados alrededor de los somas de las interneuronas), en la OPL y alrededor de los segmentos de membrana de los fotorreceptores conos y bastones. La expresión en la IPL, luego de la lesión, mostró un patrón de expresión menos ordenado que en las retinas controles.

Se observó también la expresión del receptor P2Y₁ en la CMZ de retinas controles (**figura 35, B**) y lesionadas (**figura 35, 5 dpi: D y 7 dpi: F**). Al igual que en el tejido diferenciado, aunque más moderado, en la CMZ se observó un aumento en la expresión del receptor a los 5 y 7 dpi.

La fluorescencia correspondiente al receptor P2Y₁ luego de la lesión, observada alrededor de los segmentos de los fotorreceptores, presenta una textura granular y punteada, al igual que ocurre con la marca observada en la INL alrededor de los somas de las interneuronas. En contraste, la marca observada en los segmentos de los fotorreceptores, con una textura lisa y homogénea, corresponde a autofluorescencia característica de esa región de este tipo celular, que es evidente incluso en los controles negativos en los cuales se omitió el anticuerpo primario o secundario. Esta autofluorescencia puede observarse en todos los cortes, aunque en ciertos casos es más evidente, como por ejemplo en el panel A, correspondiente a retinas no lesionadas.

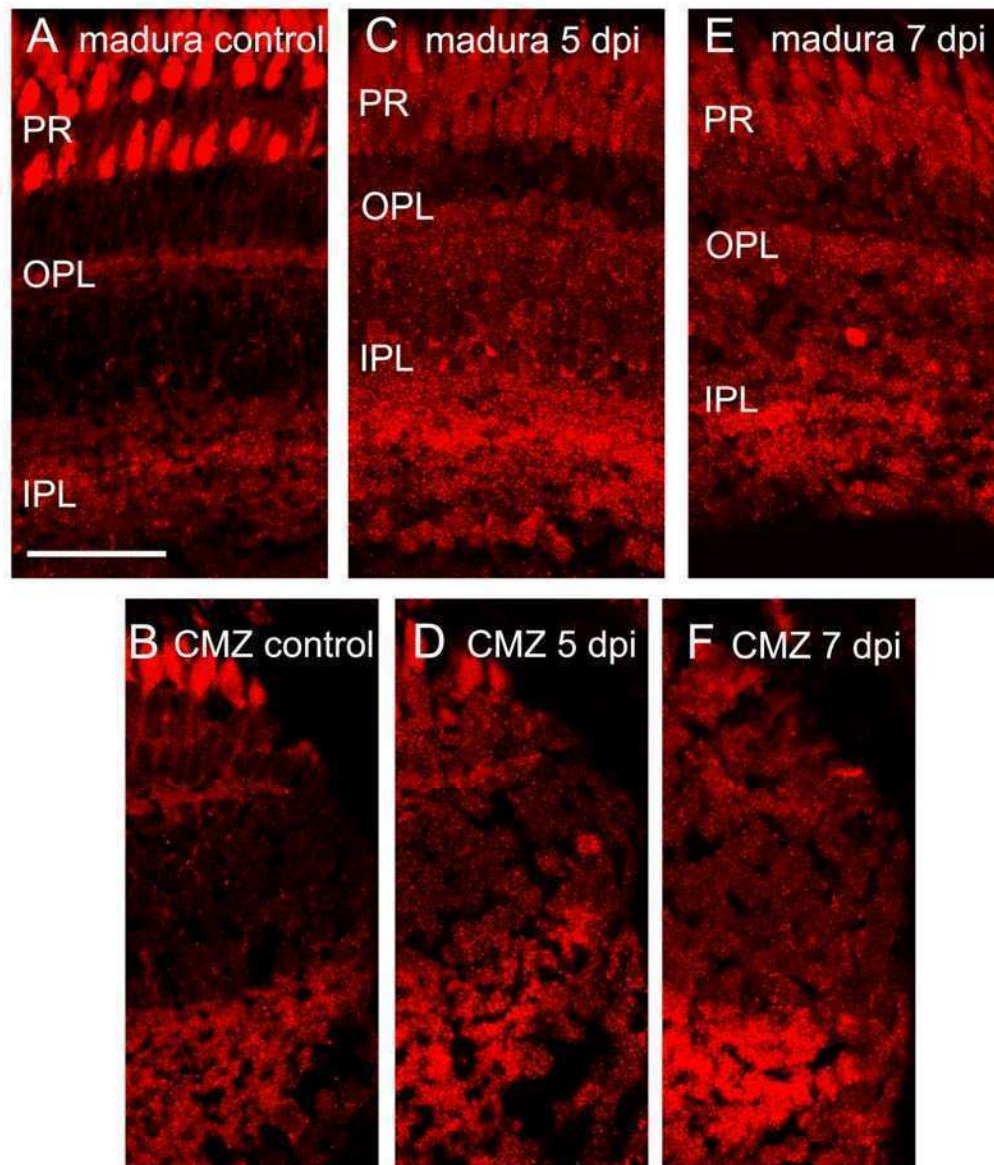


Figura 35. Microfotografías confocales de secciones transversales de retinas de pez cebra en regiones de tejido diferenciado (A, C, E) o en la CMZ (B, D, F). Las imágenes representan la localización del receptor $P2Y_1$, detectado mediante inmunohistoquímica de fluorescencia.

A y B: control. C y D: 5 dpi. E y F: 7 dpi. PR: capa de fotorreceptores, OPL: capa plexiforme externa, IPL: capa plexiforme interna. La barra indica 30 μ m. La fluorescencia homogénea (no punteada) en los fotorreceptores (segmentos internos y externos) se debe a autofluorescencia del tejido, que se observa también en los controles negativos en ausencia de anticuerpos.

Posteriormente, se realizó una serie de experimentos para estudiar la co-expresión del receptor P2Y₁, con algunos marcadores de tipos celulares o de estructuras retinianas, con el objeto de identificar con mayor detalle la localización del receptor P2Y₁ en la retina intacta o luego de haber sido lesionada con 10 μM de ouabaína.

En este sentido, el doble marcaje por inmunofluorescencia del receptor P2Y₁ con la proteína calretinina demostró que el receptor co-localiza en algunos tipos celulares con dicho marcador. Por lo tanto, el receptor purinérgico sería expresado por algunas células positivas para calretinina tales como células amácrinas (en sus terminales sinápticos, indicado por la marca punteada en la IPL) y varias células ganglionares (**figura 36**). En las retinas controles, el receptor parece estar localizado principalmente en la parte apical de los somas de las células ganglionares. Esta co-localización en la zona apical desaparece a los 5 dpi, al mismo tiempo que la marca del receptor purinérgico se hace más densa y se desorganiza en la IPL (**figura 36**, B y E). A los 7 días de inducida la lesión, la marca del receptor continúa siendo densa y desorganizada en la IPL y se comienza a expresar nuevamente en los somas de las células ganglionares.

Por otro lado, se realizó un doble marcaje del receptor P2Y₁ con el marcador de células de Müller, glutamina sintetasa, una enzima citoplasmática que se expresa específicamente en este tipo celular en la retina, permitiendo la detección de prácticamente todo su soma y proyecciones en las distintas capas retinianas. Estos ensayos indicaron, debido a la ausencia de co-localización de ambos marcadores, que el receptor purinérgico no sería expresado por este tipo celular glial en la retina de pez cebra, ya sea en retinas controles o en retinas lesionadas y examinadas luego de 5 y 7 días de inducida la lesión con ouabaína (**figura 37**).

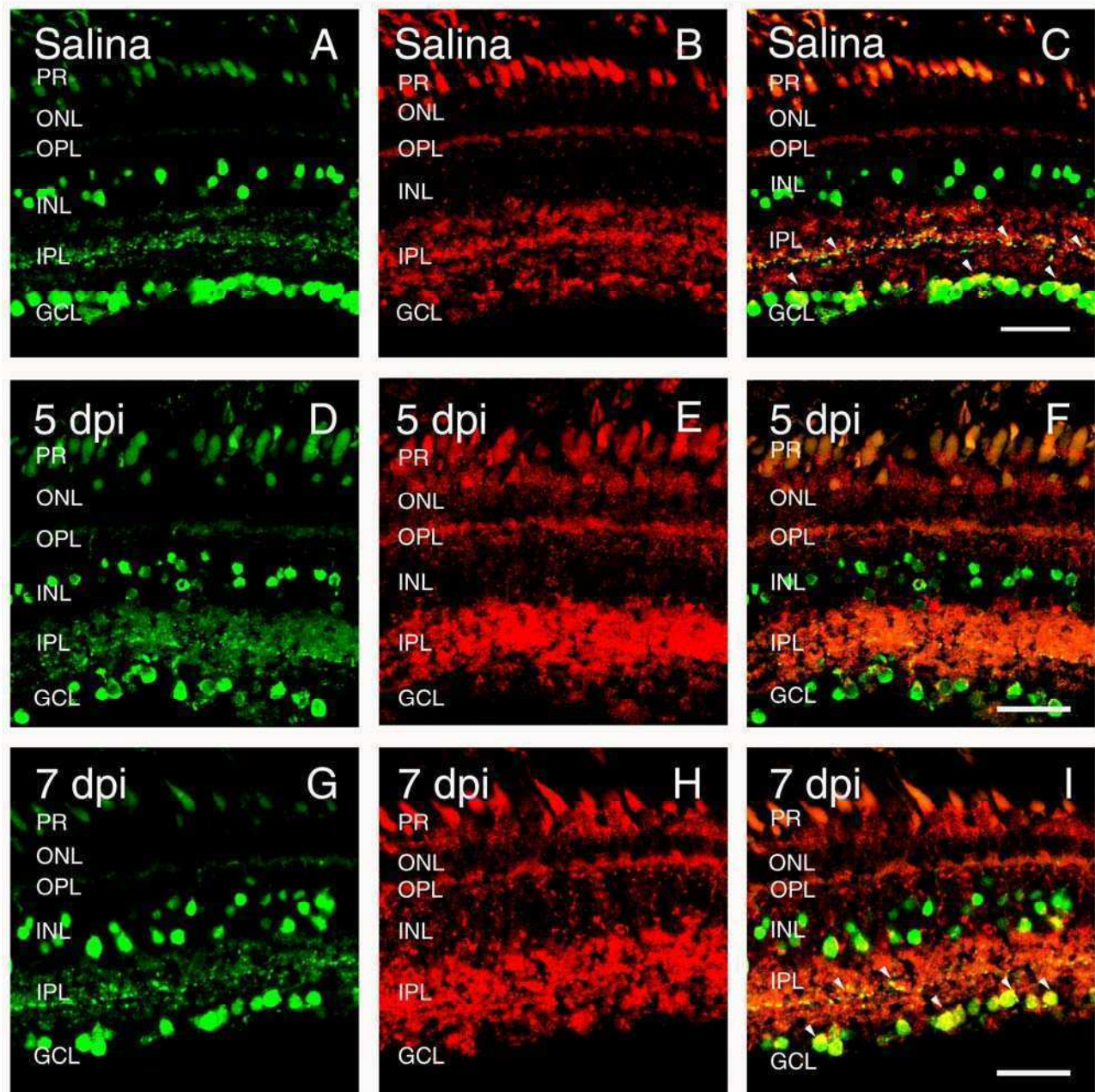


Figura 36. Microfotografías confocales de secciones transversales de retinas de pez cebra. A-C: control. D-F: retinas lesionadas a los 5 dpi. G-I: retinas lesionadas a los 7 dpi. La inmunodetección correspondiente al receptor P2Y₁ se observa en color rojo (B, E, H). Calretinina (marcador de la mayoría de las células ganglionares y algunas amácrinas) se observa en color verde (A, D, G). C, F, I: superposición de las imágenes en cada fila. Las barras indican 30 μ m. Las puntas de flecha muestran los sitios de co-localización. De forma homogénea, aunque en ciertos casos más fuertemente, la fluorescencia de color rojo en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores se debe a autofluorescencia, que se observa también en los controles negativos. PR:

fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa sináptica externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa sináptica interna, GCL: células ganglionares. dpi: días posteriores a la lesión.

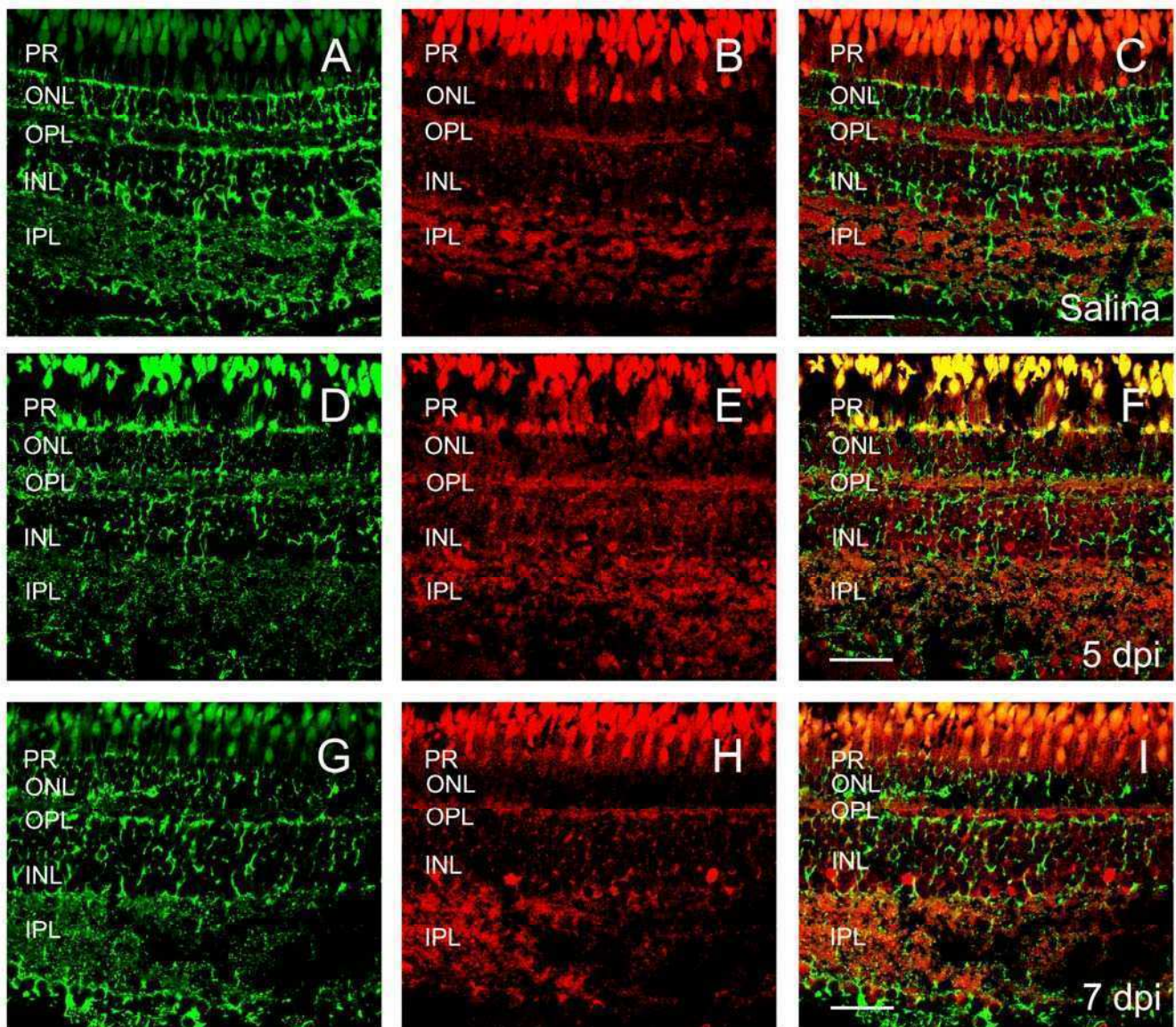


Figura 37. Microfotografías confocales de secciones transversales de retinas de pez cebra. A-C: control. D-F: retinas lesionadas a los 5 dpi. G-I: retinas lesionadas a los 7 dpi. La inmunodetección correspondiente al receptor P2Y₁ se observa en color rojo (B, E, H). Glutamina sintetasa (marcador de células de Müller) se observa en color verde (A, D, G). C, F, I: superposición de las imágenes en cada fila. Las barras indican 30 μ m. En ciertos casos más fuertemente (por ejemplo en el panel B o D), la fluorescencia de color rojo o verde en los fotorreceptores se debe a autofluorescencia, que se observa también en los controles negativos. PR: fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa sináptica externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa sináptica interna. dpi: días posteriores a la lesión.

Además, la ausencia de co-localización en las retinas controles con el marcador de vesículas presinápticas SV2, una proteína asociada a las membranas de dichas estructuras subcelulares, indicó que el receptor P2Y₁ sería principalmente expresado en las regiones postsinápticas tanto en la IPL como en la OPL (**figura 38 A-C**).

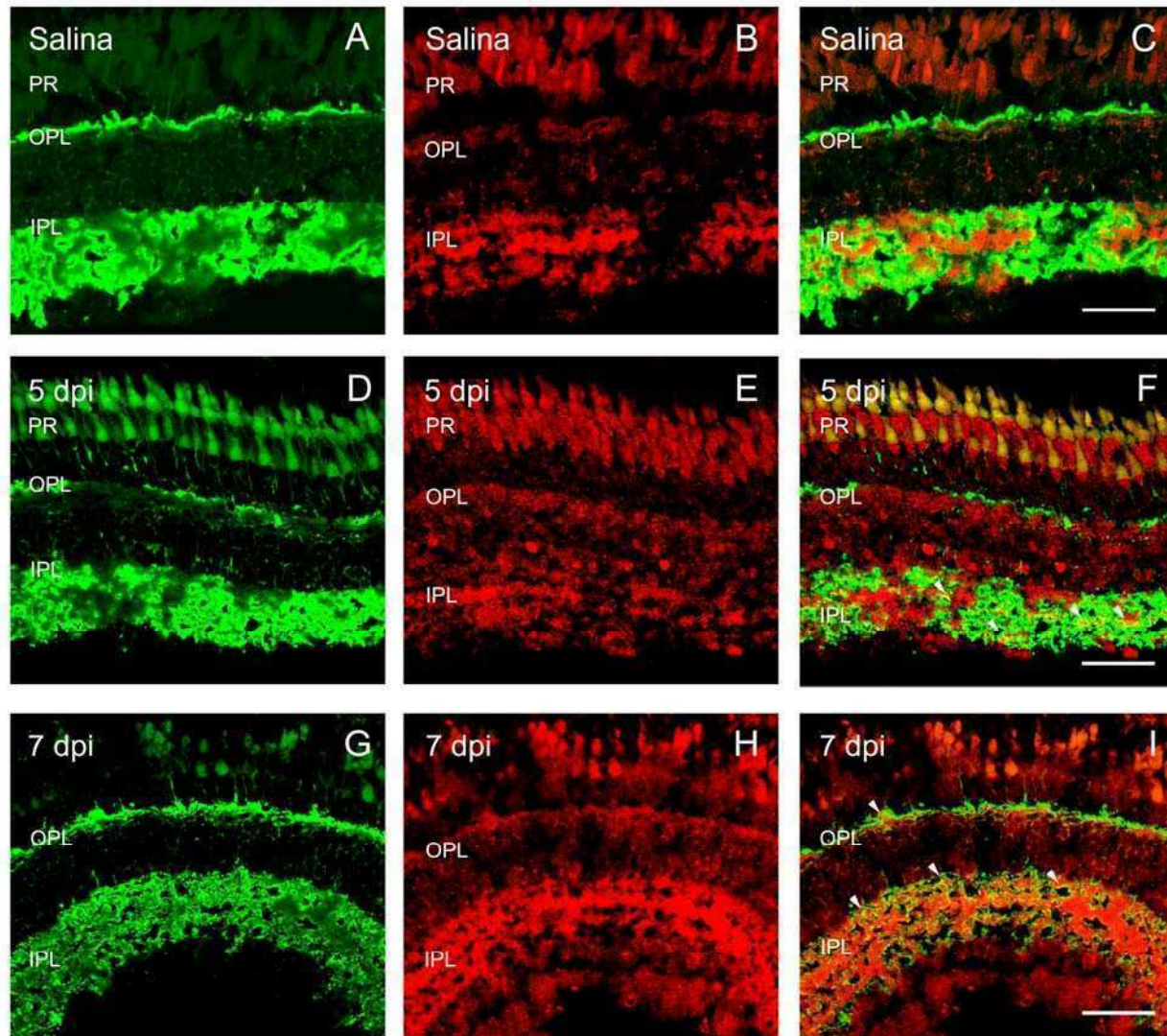


Figura 38. Microfotografías confocales de secciones transversales de retinas de pez cebra. Los paneles A-C muestran retinas controles no lesionadas, mientras que los paneles D-I muestran retinas lesionadas, a los 5 (D-F) y 7 (G-I) días posteriores a la lesión. La inmunodetección fluorescente correspondiente al receptor P2Y₁ se observa en color rojo (B, E, H). SV2 se observa en color verde (A, D, G) y señala la localización de las capas sinápticas externa e interna (OPL e IPL, respectivamente), en particular las regiones presinápticas. En C, F, I se muestra la superposición de las imágenes de cada fila. La barra indica 30 μ m. Las puntas de flecha muestran los sitios de co-

localización. La fluorescencia de color rojo o verde, observada en algunas imágenes (panel B o D) en la capa de fotorreceptores (PR) se debe a autofluorescencia que se observa también en los controles negativos. OPL: capa sináptica externa, IPL: capa sináptica interna.

Luego del daño, principalmente a los 5 días posteriores a la lesión, se observó un escaso grado de co-localización, indicando que el receptor se expresaría también, aunque en menor medida, en algunas regiones presinápticas (**figura 38 D-I**).

Posteriormente, y con el fin de evidenciar si el efecto de los nucleótidos extracelulares sobre la proliferación celular ocurriría a través de su acción directa sobre las células progenitoras retinianas, se estudió la expresión del receptor P2Y₁ en estas células, tanto en el área proliferativa de crecimiento, es decir la zona ciliar marginal, como en las poblaciones de células proliferativas interpuestas con el tejido diferenciado. Los ensayos se realizaron a través de inmunohistoquímica de fluorescencia, en retinas controles y lesionadas examinadas a los 7 días posteriores a la inducción de la lesión con ouabaína.

En la CMZ (**figura 39**), el doble marcaje del receptor P2Y₁ con BrdU demostró una co-localización parcial entre ambos marcadores en algunas células, tanto en retinas controles no lesionadas (A-D) como en retinas lesionadas, luego de 7 días de inducida la lesión (E-H). Se observó que la marca del receptor purinérgico (A, E) se dispondría alrededor de varios de los núcleos positivos para BrdU.

Esta observación sugiere que las células progenitoras, aún o recientemente proliferativas, de la CMZ expresarían el receptor P2Y₁ en sus membranas celulares.

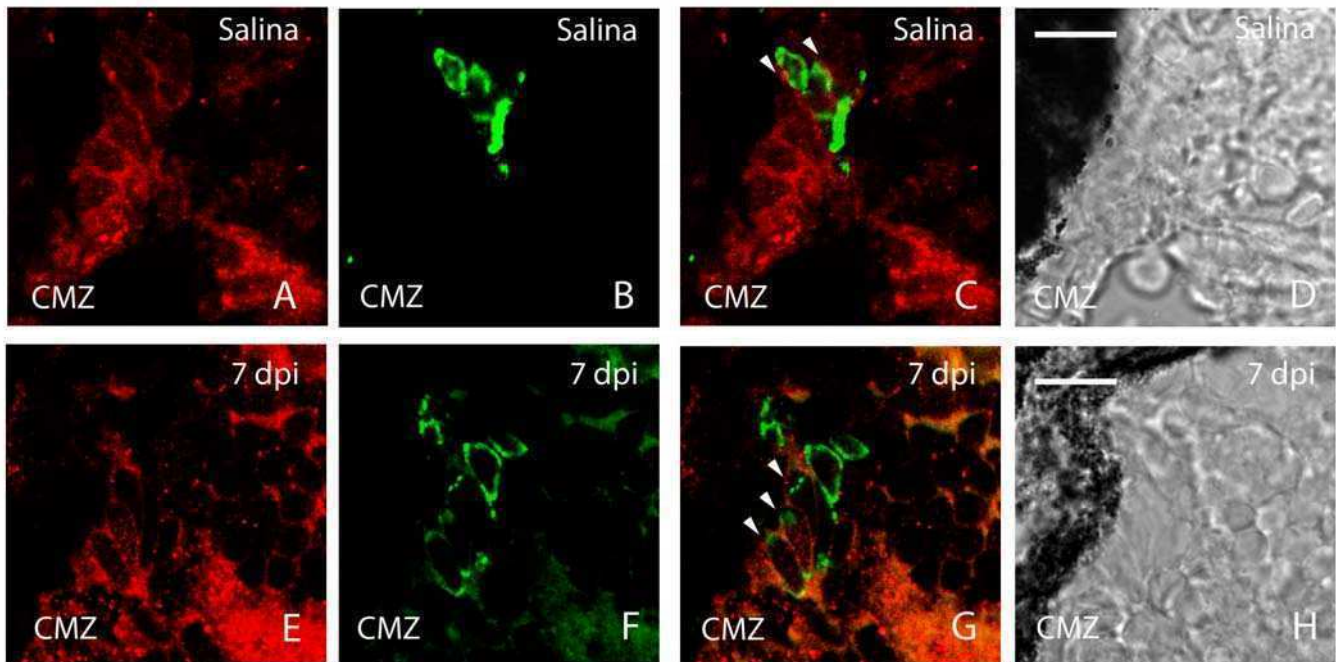


Figura 39. Microfotografías confocales de secciones transversales de la zona ciliar marginal (CMZ) de retinas de pez cebra controles (A-D) o a los 7 días posteriores a la lesión (E-H), mostrando el doble marcaje de células positivas para BrdU (en verde, B, F) y el receptor P2Y₁ (en rojo, A, E). Los paneles C y G muestran la superposición de las imágenes en la misma fila. Las puntas de flecha indican la marca del receptor alrededor de núcleos proliferativos. Los paneles D y H muestran imágenes tomadas con filtros DIC, para mostrar la estructura celular de la CMZ con luz transmitida. Las barras indican 10 μm .

En la retina madura (o tejido neural diferenciado) (**figura 40**), no se observó co-expresión de ambos marcadores (P2Y₁ y BrdU) en ninguna de las pocas células proliferativas observadas en las retinas no lesionadas, ni en la ONL ni en la INL (A-D). Por el contrario, luego de 7 días de inducido el daño, se observó una co-expresión parcial de la marca del receptor purinérgico (en la membrana plasmática) y los núcleos positivos para BrdU en las células proliferativas localizadas en la INL (I-L). En la ONL, en cambio, no se observó co-expresión del receptor con el marcador de proliferación celular, en retinas lesionadas y examinadas a los 7 días luego de la lesión (E-H).

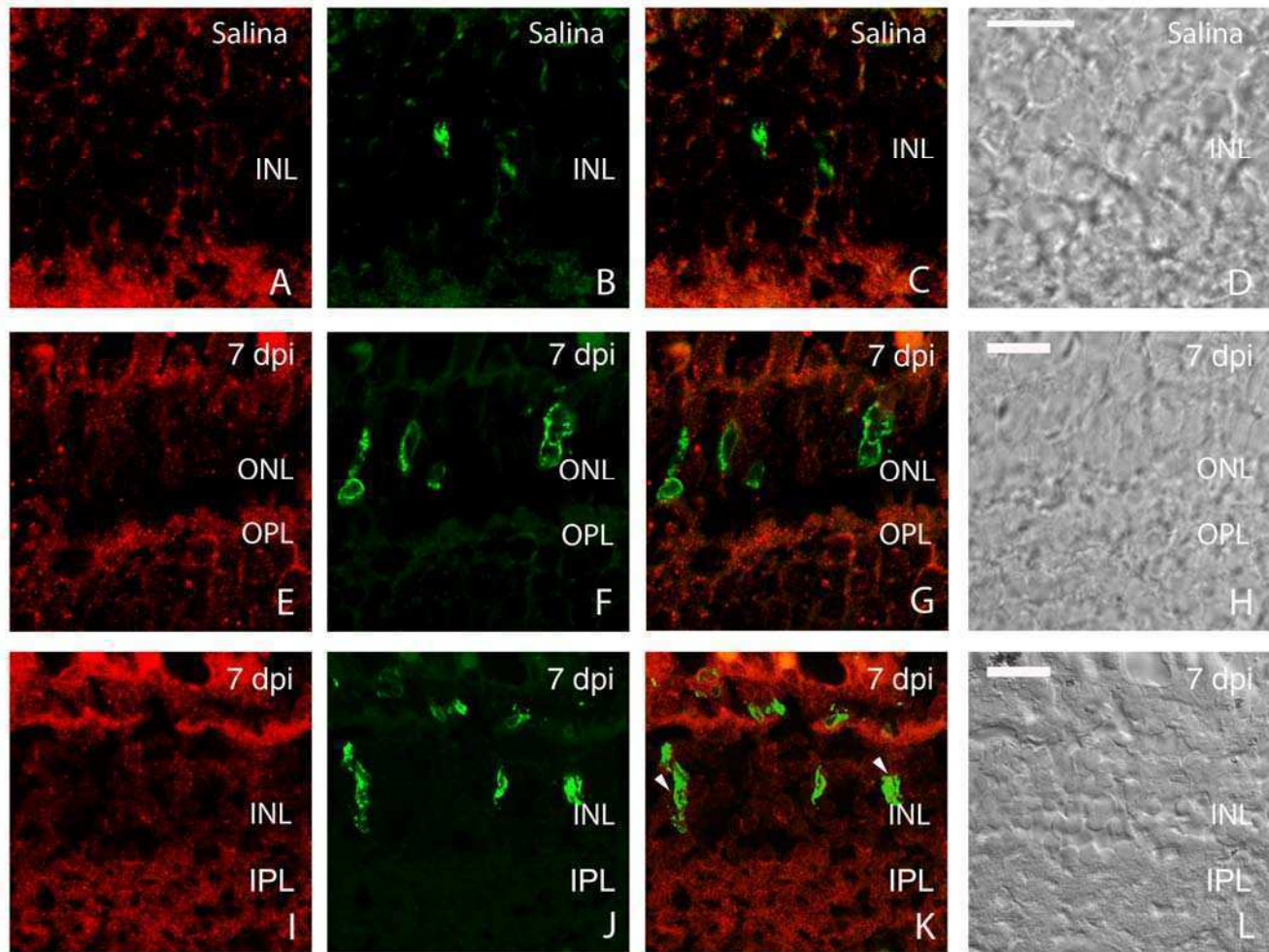


Figura 40. Microfotografías confocales de secciones transversales de retinas de pez cebra controles (A-D) o luego de 7 días de inducida la lesión (E-L). Las imágenes muestran las células positivas para BrdU (en verde, B, F, J) y el receptor P2Y₁ (en rojo, A, E, I). Los paneles C, G, K muestran la superposición de las imágenes en la misma fila. Las puntas de flecha indican la marca del receptor alrededor de los núcleos proliferativos en la INL. Los paneles D, H, L muestran imágenes tomadas con filtros DIC, para observar la estructura del tejido con luz transmitida. Las barras indican 10 μ m. ONL: capa nuclear externa; OPL: capa sináptica externa; INL: capa nuclear interna; IPL: capa sináptica interna.

DISCUSSION

El presente trabajo de tesis presenta evidencias consistentes con la hipótesis de que la señalización purinérgica poseería un rol crucial en la regulación de la actividad proliferativa de las células progenitoras y la regeneración tisular de la retina de pez cebra. Además, las señales purinérgicas jugarían un papel muy importante en el proceso de neuroprotección luego de inducida la lesión. En particular, el ADP extracelular, a través de su unión a receptores P2Y₁, representaría un mecanismo de señalización fundamental en inducir el incremento de la proliferación de células mitóticamente activas presentes en la retina madura y la zona ciliar marginal, que llevaría a la reparación del tejido retiniano, independientemente de la magnitud de la lesión.

1. La regeneración retiniana ocurre independientemente del grado de lesión

Diferentes grupos han propuesto que la muerte de los fotorreceptores es crucial para desencadenar el proceso de regeneración retiniana (Negishi y col, 1987; Braisted y Raymond, 1992; Otteson y Hitchcock, 2003). Por ejemplo, se reportó que el daño selectivo de las células ganglionares o células dopaminérgicas no provoca regeneración retiniana a menos que resulten dañadas también las células de la ONL (Hitchcock, 1989; Braisted y Raymond, 1992). Sin embargo, otros autores demostraron que la regeneración de las capas internas de la retina puede ocurrir aún cuando no se produzca muerte celular en la capa de fotorreceptores (Reh y Fischer, 2001; Fimbel y col, 2007).

Se cree que la regeneración retiniana involucraría mecanismos generales que requieren del daño de la capa de los fotorreceptores y/o de las células de la INL. Éstas podrían incluir varios tipos de células maduras y/o células progenitoras específicas. Entre ellas estaría incluida una subpoblación de células de Müller (Bernardos y col, 2007), que reingresaría al ciclo celular luego del daño tisular. Tampoco se elucidó hasta el momento si el daño debe involucrar a las células progenitoras presentes en la INL en el tejido maduro intacto, que son

responsables de la continua formación de los fotorreceptores de tipo bastones durante el crecimiento normal de la retina (Julian y col, 1998; Faillace y col, 2002; Otteson y Hitchcock, 2003).

Por consiguiente, todavía no está claro si el daño únicamente de progenitores presentes en la INL, o de la subpoblación de las células de Müller previamente mencionada, o el daño exclusivo de ciertos tipos de neuronas pueden, o no, inducir la regeneración retiniana (Zhao y col, 2009).

En dicho contexto, es posible que la inducción de una lesión con una dosis alta de ouabaína represente un nicho de regeneración distinto al generado por una dosis baja de la misma droga. En este sentido, se demostró que la dosis baja de ouabaína utilizada en este trabajo genera muerte celular exclusivamente en las capas internas (Fimbel y col, 2007; Battista y col, 2009), mientras que la dosis alta, también utilizada, origina muerte celular en todas las capas retinianas (Serpa y col, 2008).

En este trabajo de tesis se describió que la retina de pez cebra es capaz de regenerarse independientemente del grado de daño que se le provoque, es decir luego de una lesión parcial o de un daño global.

Además, se observó que luego de la lesión del tejido retiniano, las células proliferativas presentes en la retina se activan mitóticamente, alcanzándose un pico de proliferación a los 7 días luego de inducida la lesión. Este pico de proliferación fue observado tanto en la retina madura como en la CMZ, en retinas lesionadas ya sea de forma total o parcial.

Las células positivas para BrdU observadas a los 7 días luego de la lesión se ubican en la ONL principalmente y una menor cantidad en la INL. Esto coincide con lo descrito en trabajos previos, que indican que luego de dañar la retina, la activación mitótica ocurre principalmente en la ONL (Otteson y Hitchcock, 2003). Una posibilidad es que el aumento de

células proliferativas observado en la ONL sea el resultado de la migración de células progenitoras de la INL que migraron hacia la ONL para regenerar fotorreceptores (Julian y col, 1998; Wu y col, 2001). Otra posibilidad es que los precursores de los bastones presentes en la ONL se activen mitóticamente luego de la lesión en respuesta a una señal difusible, como, por ejemplo, el ADP extracelular.

Resulta interesante que luego de 60 días de inducida la lesión, ya sea parcial o global, la retina presente un alto, aunque incompleto, grado de regeneración y, además, no se observen diferencias perceptibles en la apariencia del tejido en ambos casos, al menos a nivel morfológico (comparar paneles F y G de las Figuras 1 y 19, respectivamente). Sin embargo, no se puede saber con certeza si existen diferencias funcionales luego de 60 días entre retinas que han sido lesionadas de forma parcial o de manera más global. Trabajos previos realizados en *goldfish* mostraron una recuperación funcional del tejido retiniano, estudiada a través de electrorretinogramas, de aproximadamente un 25% luego de 60 días de inducida la lesión (Mensingher y Powers, 1999). Otro estudio, realizado en retina de pez cebra, reportó que el proceso de regeneración se completó a los 100 dpi (Sherpa y col, 2008). Sin embargo, a diferencia de lo descrito en este trabajo de tesis, dichos estudios se refieren a la regeneración en términos de la recuperación de la función visual y no a la regeneración morfológica del tejido retiniano.

Asimismo, estos autores mostraron que luego de inducida la lesión con 10 μ M de ouabaína ocurre una destrucción casi completa de las capas retinianas (Sherpa y col, 2008). En contraste, en este trabajo de tesis, si bien todas las capas retinianas resultaron muy dañadas luego de la injuria global, las mismas fueron discernibles, es decir que se mantuvo la estructura laminar del tejido, incluso luego de 2 días de inducida la lesión de la retina. Por lo tanto, es posible que la preservación de la estructura laminar observada en el presente

trabajo haya permitido una reparación morfológica más rápida. Asimismo, es probable que las retinas no hubieran recuperado su funcionalidad luego de 60 días de inducido el daño (Mensingher y Powers, 2007; Sherpa y col, 2008). De hecho, la recuperación funcional, que también implica crecimiento axonal y reconexión de los terminales sinápticos de las células ganglionares con las neuronas del tectum óptico, se completaría posteriormente a la regeneración morfológica retiniana observada en este trabajo.

2. Los nucleótidos extracelulares endógenos mediarían la activación mitótica inducida por la lesión

Se describieron previamente efectos de los nucleótidos extracelulares sobre la proliferación celular en la retina. Sin embargo, dichos trabajos no utilizaron modelos *in vivo* o se basaron en estudios del desarrollo embrionario de las estructuras oculares, incluyendo la retina. Por ejemplo, varios estudios sobre el rol de los nucleótidos extracelulares fueron realizados en cultivos celulares de origen embrionario (con el agregado exógeno de ATP) o en explantos de retinas de pollo aisladas durante el desarrollo (Pearson y col, 2005; Nunes y col, 2007). En el presente trabajo de tesis, en cambio, se utilizó un modelo de degeneración y reparación del tejido retiniano en un organismo vertebrado adulto y se describió, por primera vez, un rol fundamental de las señales purinérgicas sobre el proceso de proliferación celular que subyace a la regeneración *in vivo* de la retina.

En condiciones fisiológicas, el ATP en la retina puede ser liberado al espacio extracelular por diversos mecanismos, como se describió en la Introducción, por ejemplo, a través de conexinas o pannexinas. En este sentido, se reportó en la retina liberación de ATP desde el epitelio pigmentario hacia la capa de fotorreceptores (Pearson y col, 2005). Otros autores describieron la liberación de ATP desde las células de la glía, ya sea células de Müller u otros tipos gliales presentes en la capa de células ganglionares, y desde las células

ganglionares en respuesta a diversos estímulos mecánicos, eléctricos u osmóticos (Newman, 2006). De hecho, el ATP puede ser liberado por exocitosis de vesículas sinápticas, ya sea como molécula neurotransmisora única o como co-neurotransmisor. Se ha descrito incluso, en el sistema nervioso, liberación vesicular de ATP desde las células gliales (Abbracchio y col., 2009).

Asimismo, un importante mecanismo de liberación de ATP, entre otros nucleótidos y nucleósidos, al medio extracelular ocurre cuando existe lisis celular (Pafundo y col, 2008), en particular cuando la muerte celular resulta significativa, ya que la concentración intracelular de ATP es al menos 2 a 3 órdenes mayor a la observada en el espacio extracelular en condiciones fisiológicas. En estas condiciones, en la retina adulta de pez cebra, no se observa muerte celular de manera significativa. En cambio, luego de inducida una lesión, como la citotóxica descrita en este trabajo, la muerte celular aumenta significativamente volviéndose una fuente importante de ATP extracelular.

En dicho contexto, se observó que el tratamiento con apirasa (una enzima que hidroliza nucleótidos di y trifosfato) inhibió completamente el aumento de la proliferación celular observado luego del daño, ya sea parcial o global, del tejido retiniano. Al ser hidrolizados por esta enzima, los nucleótidos di y trifosfato ya no están disponibles en el espacio extracelular para unirse a sus receptores purinérgicos específicos. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la apirasa sobre la activación mitótica de las células proliferativas retinianas durante la regeneración tisular podría ser el resultado de la ausencia de acción de los nucleótidos endógenos sobre los receptores P2.

En contraste, el tratamiento con hexoquinasa, una enzima que hidroliza ATP extracelular, no afectó los niveles de proliferación celular observados luego del daño. Este resultado sugirió que el ATP no sería la principal señal involucrada en la regulación de la proliferación celular

inducida por la lesión. Por lo tanto, otro posible candidato es el ADP, que es también rápidamente hidrolizado por la apirasa. Sin embargo, el ADP es un producto de hidrólisis de la hexoquinasa y, en consecuencia, si la concentración de ADP extracelular aumentara significativamente por acción de la hexoquinasa, se esperaría un incremento del número de células proliferativas luego de dicho tratamiento, aunque esto no fue observado experimentalmente. La falta de efecto de esta enzima sobre la proliferación celular podría deberse a que la producción de ADP por parte de la hexoquinasa podría resultar redundante comparada a la cantidad de ADP ya sea producido en otras reacciones enzimáticas endógenas o liberado al medio extracelular por lisis celular en las retinas dañadas. Es decir, luego de la lesión, los niveles de ADP extracelular endógeno podrían ser ya suficientemente elevados.

Por otro lado, podría ocurrir que la hexoquinasa no presentara actividad dentro del ojo, o que su actividad no se prolongara el tiempo suficiente como para observarse un efecto significativo, por ejemplo, por falta de un sustrato como la glucosa. Sin embargo, se demostró que la hexoquinasa, al igual que la apirasa, conserva al menos parte de su actividad dentro del ojo incluso luego de 20 horas de haber sido inyectada. De hecho, la actividad de la hexoquinasa se evaluó en presencia exclusivamente de la glucosa endógena proveniente de los “*eyecups*” en el medio de reacción.

Por lo tanto, ya que durante los experimentos realizados para evaluar el efecto de los nucleótidos extracelulares endógenos sobre la proliferación celular, dichas enzimas fueron inyectadas cada 24 horas durante 6 días, la ausencia de efecto de la hexoquinasa sobre este parámetro no podría explicarse por falta de actividad de dicha enzima dentro del vítreo.

Es importante destacar que cuando se determinó la actividad ATPasa de la apirasa y hexoquinasa en el vítreo, se observó que los ojos no lesionados, e inyectados ya sea con apirasa o con hexoquinasa inactivadas, también mostraron un nivel de consumo elevado de ATP luego de 20 horas de la inyección, observado por el decaimiento en la concentración de ATP en función del tiempo. Esto evidenció la presencia de una elevada actividad ecto-ATPasa endógena en la retina.

En trabajos de otros autores, se describió la presencia de ecto-nucleotidasas, particularmente NTPDasas, asociadas a la membrana plasmática de células gliales presentes en zonas neurogénicas, como la zona subventricular o el giro dentado en el cerebro de rata (Braun y col, 2003), así como en progenitores neurales y gliales presentes en la CMZ de la retina de pez cebra (Ricatti y col, 2009). Además, se demostró actividad ecto-ATPasa, atribuible a las NTPDasas, asociada a las capas sinápticas de la retina de rata y pez cebra (Puthussery y Fletcher, 2007; Ricatti y col, 2009). Por consiguiente, la actividad ATPasa endógena, descrita en el presente trabajo, es posiblemente debida a la presencia de NTPDasas en el tejido retiniano (y/o en el vítreo y otros tejidos oculares), además de otras enzimas que podrían hidrolizar ATP, tales como las fosfatasas alcalinas o ectonucleótido pirofosfatasas (Abbracchio y col, 2009). De hecho, esta actividad podría hidrolizar rápidamente al ADP producido por la hexoquinasa en el vítreo, impidiendo su acción sobre receptores purinérgicos y la activación de las células proliferativas presentes en la retina. Esta podría ser otra razón por la cual no se observa un aumento de la proliferación celular luego del tratamiento con hexoquinasa.

Como se describió previamente, luego de inducida la lesión se observó un aumento en la proliferación celular tanto en la retina madura como en la CMZ. En su trabajo de 2008, luego de la inducción de una lesión global con ouabaína, Sherpa y sus colaboradores sólo evaluaron proliferación celular en zonas de la retina completamente diferenciada, pero no en

la CMZ. Estos autores postularon que los posibles efectos observados en la CMZ corresponderían a un crecimiento exacerbado de la retina, pero no al mecanismo de regeneración retiniana. Luego de la inducción de una lesión localizada, como por ejemplo mecánica o por ablación transgénica, podría esperarse que no ocurriera activación de las células de la CMZ, a diferencia de lo que se espera luego de una lesión por causa de un factor difusible como la ouabaína. En este trabajo de tesis, se describió activación mitótica de las células localizadas en la CMZ, al igual que de las células presentes en la retina madura. Además, la activación mitótica de ambos grupos de células fue regulada por las mismas señales, es decir por las señales purinérgicas. De hecho, los resultados sugirieron que la activación mitótica en la CMZ también subyace a mecanismos reparativos desencadenados por la injuria y no sería apropiado identificarla con un crecimiento exacerbado.

3. El ADP β S incrementa la proliferación celular en retinas no lesionadas a través de la activación de los receptores P2Y₁

El tratamiento con ADP β S fue un estímulo suficiente para provocar un aumento significativo de la proliferación celular en las retinas no lesionadas, tanto en la retina completamente diferenciada como en la CMZ. En presencia de apirasa (es decir en ausencia de nucleótidos extracelulares endógenos), una concentración de 25 μ M de ADP β S fue igualmente efectiva en regular la proliferación celular que una concentración de 5 μ M del mismo agonista. Sin embargo, en ausencia de apirasa (es decir en presencia de nucleótidos extracelulares endógenos) una concentración de 25 μ M de ADP β S indujo un incremento significativamente mayor de la proliferación celular que 5 μ M de ADP β S (con o sin apirasa) o que 25 μ M de ADP β S en presencia de apirasa. Esto sugiere que los nucleótidos extracelulares endógenos, en condiciones fisiológicas en retinas intactas, podrían estar presentes a niveles subumbrales (o bajos) y actuar de forma sinérgica con concentraciones de ADP β S mayores

a 5 μ M. Alternativamente, concentraciones de ADP β S mayores a 5 μ M podrían inducir liberación de ATP endógeno (Pafundo y col, 2008) que a través de su hidrólisis a ADP podría causar un incremento adicional de la proliferación celular. Esto sería sólo posible en ausencia de apirasa, ya que, de otra manera, ésta hidrolizaría rápidamente tanto ATP como ADP en el medio extracelular.

Para la realización de esta serie de experimentos, en retinas intactas, se utilizaron como agonistas de los receptores purinérgicos ATP γ S y ADP β S en lugar de ATP o ADP, ya que éstos son rápidamente hidrolizados en el medio extracelular y, por lo tanto, la identificación de sus efectos individuales resultaría equívoca. Por ejemplo, el ATP agregado exógenamente sería hidrolizado a ADP y no podría diferenciarse entre los efectos de ambos nucleótidos. Del mismo modo, el tratamiento del tejido retiniano utilizando dichos agonistas modificados, junto con la inyección de apirasa, nos permitió individualizar el efecto ejercido exclusivamente por el agonista inyectado.

Adicionalmente, se observó que el tratamiento con MRS2179 inhibió de forma completa el incremento en la proliferación celular inducido por ADP β S, ya sea en las capas de retina madura como en la CMZ. En el mismo sentido, se reportó que la formación de estructuras oculares en embriones de *Xenopus laevis* depende de la activación de receptores P2Y₁ por el ADP que inducirían la expresión de *pax6*, como se describió en la Introducción de este trabajo. Si bien el ATP es capaz de unirse a los receptores P2Y₁, éstos presentan mayor afinidad por ADP que por ATP (Burnstock, 2007b). Acorde con estos antecedentes, en este trabajo se observó que el ADP β S, pero no el ATP γ S, fue capaz de activar a los receptores P2Y₁ y provocar un aumento en la proliferación celular en retinas no lesionadas, a concentraciones extracelulares que podrían considerarse fisiológicas.

Estos resultados coinciden con las evidencias obtenidas por otros autores durante el desarrollo embrionario retiniano. La expresión de señales purinérgicas en la retina, principalmente en etapas tempranas del desarrollo, sustentaron su rol como moduladores de la proliferación y diferenciación celular. Además, la respuesta celular a la estimulación purinérgica es máxima durante la etapa proliferativa. Por ejemplo, la sensibilidad de los progenitores celulares a la estimulación purinérgica, así como la liberación de ATP desde el epitelio pigmentario, son mayores durante los primeros días del desarrollo embrionario y disminuyen posteriormente, hasta desaparecer en el estadio E8, en embriones de pollo (Sugioka y col, 1996; Pearson y col, 2002 y 2005). Estas evidencias apoyan la idea de que las señales purinérgicas son importantes en la regulación de la proliferación de las células progenitoras retinianas, tanto durante el desarrollo embrionario como en los procesos regenerativos del tejido adulto.

Además, se describió que el agregado de ATP exógeno, a través de su unión a receptores purinérgicos, provoca aumentos transitorios en la concentración intracelular de calcio, y que este efecto causa un aumento en la proliferación de los progenitores retinianos, dando como resultado ojos de mayor tamaño (Sugioka y col, 1999; Sanches y col, 2002; Pearson y col, 2002, 2005). Estudios en sistemas celulares *in vitro* sugirieron al ciclo celular como “blanco” de las señales purinérgicas (Heo y Han, 2006), aunque los mecanismos moleculares que median su efecto no han sido todavía elucidados.

Por consiguiente, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el ADP, a través de la activación de receptores P2Y₁, representa una señal suficiente y necesaria para que ocurra activación mitótica de las células progenitoras presentes tanto en la CMZ como en la retina madura del pez cebra adulto.

Otra serie de evidencias de nuestro laboratorio indicaron, a su vez, que el ADP, actuando vía receptores P2Y₁, es una señal clave para que los progenitores retinianos presentes en la MZ de la retina de pez cebra ingresen a la fase S del ciclo celular durante el ciclo diario de luz-oscuridad. Estas señales permitirían el crecimiento retiniano, que ocurre principalmente durante la etapa diurna, a lo largo de la vida adulta de este animal (Ricatti y col, 2011).

4. El ADP media la proliferación celular inducida por la lesión a través de su unión a los receptores P2Y₁

En este trabajo de tesis se obtuvieron evidencias que indicaron que el ADP juega un importante rol como señal extracelular en la regulación de la proliferación celular en retinas lesionadas, actuando a través de su unión a los receptores metabotrópicos P2Y₁, ya que el tratamiento con MRS2179 inhibió completamente el aumento en la proliferación celular inducido por la lesión.

A partir de los resultados obtenidos, se postula que el ATP, liberado por las células dañadas luego del tratamiento con ouabaína, es defosforilado por NTPDasas, particularmente, la NTPDasa2, cuya expresión sufrió una relocalización luego de inducido el daño. Cuando se examinó la distribución de la NTPDasa2 en las retinas lesionadas con una baja dosis de ouabaína, se observó un cambio considerable en su distribución. Esta enzima hidroliza rápidamente ATP, finalizando su acción sobre receptores purinérgicos de tipo P2X (ionotrópicos), P2Y₂ o P2Y₁₁ (metabotrópicos), pero posee muy baja actividad ADPásica, por lo que provoca acumulación de ADP en el medio extracelular, causando activación de receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃. Notablemente, la expresión de la NTPDasa2 aumentó significativamente alrededor de las zonas más afectadas por el daño citotóxico, es decir, en la capa nuclear interna, la IPL y la capa de células ganglionares. La presencia de esta proteína disminuyó en la capa sináptica externa (OPL), dónde se expresa principalmente en

la retina intacta. A los 30 días luego de la lesión, la NTPDasa2 retomó su ubicación normal en la capa sináptica externa (OPL). Si bien no es posible establecer una relación causal entre la lesión y la redistribución de la ectoenzima, estas observaciones podrían sugerir un rol para la NTPDasa2 en el proceso de regeneración celular en la retina de pez cebra.

Como resultado de la hidrólisis de ATP por la NTPDasa2, el ADP producido en el espacio extracelular (y quizás también el ADP, de origen intracelular, directamente liberado por la lisis celular) se uniría a receptores específicos de membrana plasmática, regulando la proliferación celular (Battista y col, 2009).

Se describió previamente que los receptores activados por ATP son capaces de regular la síntesis de ADN y la proliferación de astrocitos (Neary y Zhu, 1994; Ciccarelli y col, 1994), células nerviosas (Ryu y col, 2003; Heo y Han, 2006; Mishra y col, 2006), células de Müller (Milenkovic y col, 2003) y progenitores neuronales corticales (Weissman y col, 2004) durante el desarrollo embrionario.

En base a estos antecedentes y los mencionados previamente, referentes a las acciones del ATP en la regulación de la proliferación celular durante el desarrollo embrionario de la retina, se podría postular que el ATP a través de su unión a los receptores P2Y₁, es la señal más relevante en regular la proliferación celular. Sin embargo, en este trabajo, también se observó que luego de tratar retinas lesionadas con ARL67156 (un inhibidor de la actividad ecto-ATPasa) disminuyó significativamente el número de células proliferativas. La presencia de actividad ecto-ATPasa, principalmente debida a las NTPDasas, es crucial para la hidrólisis de nucleótidos extracelulares y para la producción de ADP y/o adenosina en el espacio extracelular. Según las evidencias que se aportaron en este trabajo, dicha actividad sería también necesaria para generar un aumento de la proliferación celular, luego de la inducción de la lesión. Esto apoya fuertemente las evidencias halladas en este trabajo de

tesis, que sugieren que es el ADP el nucleótido extracelular más importante involucrado en la regulación de la proliferación celular inducida por la lesión en la retina del pez cebra adulto.

Además, el hecho de que el aumento de la proliferación celular inducido por ADP β S en retinas no lesionadas sea bloqueado por el antagonista de los receptores P2Y₁ (cuyo principal agonista biológico es el ADP), y que este antagonista sea el único entre los antagonistas examinados que provoca la inhibición completa del incremento en la proliferación celular inducido por la lesión, apoya aún más esta hipótesis.

En el mismo sentido, se ha descrito previamente que la expresión del homeobox maestro *pax6*, y la consecuente formación de las estructuras oculares incluyendo la retina, dependen de la expresión y actividad de la enzima NTPDasa2, del ADP extracelular y de su acción sobre los receptores P2Y₁, durante el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis* (Massé y col, 2007).

La acción de la enzima apirasa, mencionada anteriormente, produce AMP, favoreciendo la formación de adenosina. Sin embargo, a partir de la ausencia de efecto de la adenosina en los experimentos realizados sobre retinas no lesionadas, así como del antagonista de receptores P1 sobre retinas lesionadas, se podría concluir que la adenosina no parecería jugar un rol importante en la regulación de la proliferación celular durante la regeneración retiniana. Esto coincide con antecedentes en los cuales se describe que los receptores de adenosina restringen su expresión a progenitores postmitóticos o células diferenciadas. Además, se ha descrito que la adenosina no tiene efecto sobre la proliferación de células retinianas embrionarias de pollo en cultivo (Sanches y col, 2002). El efecto de la adenosina, por el contrario, podría estar más relacionado con la supervivencia celular (Fredholm, 1997; Dunwiddie y Masino, 2001). Los resultados de este trabajo, por lo tanto, concuerdan con lo descrito en el desarrollo embrionario, donde la adenosina no tendría un rol preponderante

en regular la proliferación celular (Fredholm, 1997; Sanches y col, 2002; Martins y Pearson, 2008).

Es importante mencionar que en los experimentos farmacológicos descritos previamente, en los cuales se utilizaron agonistas y antagonistas de los receptores purinérgicos, se utilizaron dosis de alrededor de 10 veces los valores de K_i descritos en la bibliografía para los diferentes receptores. Mitchell y colaboradores en 1998, describieron que la concentración de ATP en el área inmediata al epitelio ciliar, desde donde es liberado, alcanza valores de 4 a 8 μM . Sin embargo, las concentraciones de ATP y ADP descritas en el humor acuoso del ojo de conejo son de 1.07 μM y 1.93 μM , respectivamente (Pintor y col, 2003). La diferencia entre ambos valores podría ser una consecuencia de un efecto de dilución o debida a la actividad de las ecto-nucleotidasas (Pintor y col, 2003). Estos son los únicos datos disponibles sobre la concentración de nucleótidos extracelulares en el interior del ojo de vertebrado, aunque, estimativamente, las concentraciones extracelulares en las capas retinianas y en la zona del vítreo, cercana a la retina, serían similares a las determinadas en la región del epitelio ciliar. Por consiguiente, las concentraciones de ADP βS y ATP γS , utilizadas en el presente trabajo, fueron de alrededor de 1 a 6 veces los valores de las concentraciones de ADP y ATP descritos en la literatura. No obstante, no existen datos publicados que indiquen los valores aproximados de nucleótidos extracelulares en el ojo de pez cebra. Aunque la dosis más elevada utilizada fue la de ATP γS , no se obtuvo efecto sobre la proliferación celular.

5. La muerte celular inducida por una lesión parcial citotóxica se prolonga durante toda la etapa proliferativa y ocurre sólo en la INL y la GCL.

El método de TUNEL detecta principalmente, pero no exclusivamente, muerte celular por apoptosis (Gorczyca y col, 1993). Este método detecta mellas o brechas en la cadena de

ADN, por lo tanto, la detección de muerte celular mediante esta técnica podría resultar subestimada, ya que la muerte celular puede ocurrir también sin que se observe ruptura de las moléculas de ADN (Cohen y col, 1992). Sin embargo, independientemente del mecanismo específico de muerte celular, en este trabajo se buscó identificar un posible efecto de los nucleótidos extracelulares sobre dicho parámetro luego de la inducción de un daño del tejido retiniano.

Trabajos previos describieron que no se produce muerte celular en la capa de fotorreceptores luego de la inducción de una lesión parcial del tejido retiniano, mediante la inyección intraocular de 2 μ M de ouabaína (Fimbel y col, 2007). En este trabajo de tesis, luego de 2 días de inducido el daño tisular parcial, se observaron agujeros en el tejido en la zona de los núcleos de los fotorreceptores. Sin embargo, al igual que lo descrito previamente, no se detectó muerte celular en dicha capa por esta metodología. Estos resultados indicaron que si bien los fotorreceptores se ven afectados por una baja dosis de ouabaína, que podría provocar que dichas células se desorganicen y exhiban inflamación, como se observa en los preparados histológicos a los 2 dpi, no sufrirían muerte celular evidente luego de este tipo de lesión.

En contraste con lo descrito por Fimbel en su trabajo del año 2007, en esta tesis de doctorado se observó un alto índice de muerte celular a los 7 y 14 días luego de inducido el daño parcial del tejido. Esto podría sugerir que parte de los núcleos proliferativos que incorporaron BrdU, sufrieron muerte celular en los días subsiguientes. Sin embargo, los núcleos identificados mediante el método de TUNEL el día 7, luego de la inducción de la lesión, se encuentran principalmente en la capa de células ganglionares y en la porción interna de la INL, mientras que los núcleos marcados con BrdU se localizan en la ONL y en la parte externa de la INL. Además, los núcleos proliferativos en la INL exhiben un aspecto

fusiforme, se orientan verticalmente y se encuentran generalmente agrupados. Esto indica que la proliferación y la muerte ocurrirían en diferentes poblaciones celulares, al menos luego de una lesión parcial de la retina.

Es interesante destacar que en nuestro modelo de lesión parcial, la muerte celular se mantuvo elevada hasta por lo menos 14 dpi, indicando que este proceso, que se continúa durante toda la etapa proliferativa posterior a la lesión, podría representar una potencial fuente de ATP y ADP hacia el medio extracelular.

Si bien en este trabajo no se examinó la presencia de núcleos apoptóticos cuando la extensión del daño provocado a la retina fue global, otros autores describieron la presencia de muerte celular (también por la metodología de TUNEL) en todas las capas retinianas, incluyendo la de los fotorreceptores, luego de la lesión global de la retina con 10 μ M de ouabaína (Sherpa y col, 2008).

Al comparar la distribución de los núcleos apoptóticos detectados por Sherpa, con los núcleos proliferativos detectados con PCNA en el mismo trabajo, o con los detectados mediante BrdU en la presente tesis doctoral, al igual que lo descrito para el caso de la lesión parcial de la retina, se observa que ambas poblaciones celulares no coinciden. Esto indicaría que las células proliferativas no sufrirían muerte celular, debido probablemente al efecto neuroprotector de los nucleótidos.

6. Los nucleótidos extracelulares moderan la muerte celular inducida por el daño citotóxico

Se ha descrito que el ATP a altas concentraciones (en el orden mM) provoca muerte celular a través de su unión a receptores P2X7, mientras que la adenosina ejerce un rol neuroprotector en cultivos de células ganglionares (Zhang y col, 2006). Asimismo, se ha

descrito en cultivos de células neuronales embrionarias retinianas de pollo que la muerte celular puede ser reducida luego del tratamiento con adenosina (Paes-de-Carvalho, 2002).

En el presente trabajo, si bien los antagonistas de los receptores de ATP P2Y₁₁, P2X₁, P2X₂, P2X₃ no afectaron los niveles de muerte celular inducidos por la lesión a las dosis utilizadas, no sería adecuado descartar un efecto del ATP sobre los receptores P2X₇ sobre este proceso. Dicho efecto no pudo verificarse por la ausencia de un antagonista específico para estos receptores. Tampoco se puede descartar su efecto sobre la proliferación celular en retinas no lesionadas, ya que se ha descrito que estos receptores se activan a concentraciones de ATP mayores a 100 μ M (Volonté y col, 2006). En este trabajo, sin embargo, se utilizó 50 μ M de ATP γ S, en lugar de ATP, y al ser un análogo poco hidrolizable sería posible que los receptores P2X₇ resultaran activados a dicha concentración. No obstante, no se observó un efecto de este análogo sobre la proliferación celular como se describió más arriba.

En contraste con el efecto neuroprotector descrito previamente para la adenosina durante la etapa de diferenciación en el desarrollo embrionario, en este trabajo no se observó un efecto neuroprotector de este nucleósido sobre el tejido retiniano adulto luego de la lesión con ouabaína. Esto se evidenció por la ausencia de efecto del antagonista 8-SPT (bloqueante de los receptores P1) sobre el aumento en el número de núcleos apoptóticos inducido por la lesión citotóxica. Estas diferencias podrían deberse a que la adenosina cumpla un rol neuroprotector en la etapa de diferenciación del desarrollo embrionario retiniano, pero que éste no perdurara en la retina adulta de vertebrado. Alternativamente, la adenosina podría carecer de efecto neuroprotector en la retina de pez cebra.

Por otra parte, el tratamiento con apirasa durante 6 días posteriores a la lesión parcial de la retina con ouabaína provocó un importante incremento de la muerte celular, observado en el día 7 posterior a la lesión, exclusivamente en la INL y GCL, posiblemente debido a una significativa reducción en los niveles de nucleótidos extracelulares. Estas evidencias también sustentan la ausencia de efecto de la adenosina como señal neuroprotectora en la retina adulta de pez cebra, puesto que, la hidrólisis de nucleótidos di y trifosfato por acción de la apirasa favorecería la formación de AMP, sustrato para la formación de adenosina en el espacio extracelular. Sin embargo, el tratamiento con apirasa provocó un efecto contrario al de la neuroprotección. Estos resultados sugirieron una participación relevante de los nucleótidos extracelulares en disminuir la muerte celular inducida por el tratamiento con ouabaína.

El tratamiento con MRS2179 también provocó un aumento, aunque más moderado, de la muerte celular. Es de notar que, en este caso, el aumento de las células apoptóticas ocurrió tanto en las capas internas como externas de la retina (GCL, INL, ONL), incluyendo a la capa de los fotorreceptores. Por lo tanto, la muerte celular en la capa de los fotorreceptores, en el caso de la lesión parcial con ouabaína, sólo se evidenció cuando se antagonizaron los receptores P2Y₁, sugiriendo un importante papel del ADP como molécula neuroprotectora en general, y en particular de los conos y/o los bastones retinianos.

El hecho de que no se observe muerte celular en la ONL luego del tratamiento con apirasa, podría deberse a que el ATP, posiblemente liberado desde el epitelio pigmentario y convertido localmente en ADP, pueda actuar sobre los fotorreceptores antes de interactuar con la apirasa. De hecho, ésta es una molécula proteica de un tamaño mucho mayor que el antagonista MRS2179 y, por consiguiente, la apirasa actuaría principalmente en el vítreo y las capas más internas de la retina.

En conjunto, los resultados sugieren un importante rol neuroprotector principalmente del ADP, atenuando en gran medida la muerte celular y el daño luego de la lesión, ya que los antagonistas de los receptores de ATP o receptores P1 examinados no exhibieron efectos significativos sobre los núcleos apoptóticos. Sin embargo, es interesante mencionar que la muerte celular inducida luego del tratamiento con apirasa fue mayor que la inducida por el tratamiento con MRS2179. Esto podría sugerir la participación de otros nucleótidos en la regulación de la muerte celular, que actúen sinérgicamente con el ADP extracelular y potencien su efecto.

7. El tratamiento con apirasa o MRS2179 interfiere con la reparación del tejido

Las retinas tratadas durante los 6 días posteriores a la lesión con apirasa o MRS2179 mostraron un excesivo grado de daño tisular, un número mucho más escaso de núcleos celulares y una completa desorganización del tejido, comparado con las retinas lesionadas y posteriormente tratadas con solución salina o la enzima inactivada, como se observó en los preparados histológicos a los 7 dpi.

Luego del tratamiento con MRS2179 sobre las retinas lesionadas, se observó daño en todas las capas retinianas aunque éste fue más evidente en los segmentos externos, con desaparición de los mismos, y en la capa de núcleos de los fotorreceptores. Esto coincidió con la aparición de núcleos apoptóticos, detectados mediante el método de TUNEL en la ONL luego de dicho tratamiento.

El efecto del tratamiento con apirasa sobre la morfología retiniana resultó más severo que el efecto observado con MRS2179. Dicho tratamiento provocó una destrucción y desorganización masiva del tejido retiniano, de un grado aún mayor que el causado por el tratamiento con ouabaína durante la etapa degenerativa a los 2 dpi.

Estos resultados indicaron que el incremento en la proliferación celular dependiente de nucleótidos extracelulares (principalmente de ADP) observado luego del daño es indispensable para la reparación tisular. Por otro lado, estos resultados evidenciaron un importante efecto neuroprotector de los nucleótidos extracelulares, principalmente del ADP a través de su unión a receptores P2Y₁, en la reparación tisular. Sin embargo, el efecto de la apirasa sobre la morfología retiniana también sugirió que no sólo el ADP sino que otros nucleótidos podrían estar implicados en atenuar el proceso de muerte celular inducido en la retina lesionada.

Asimismo, otra serie de experimentos indicó que la morfología de retinas lesionadas, tratadas durante los primeros 6 días posteriores a la lesión con apirasa o MRS2179, y evaluadas a los 14 días luego del daño, mostraron un significativo grado de recuperación con respecto a retinas tratadas de igual manera pero evaluadas en el día 7 posterior a la lesión. Sin embargo, estas retinas exhibieron un menor grado de recuperación con respecto a retinas lesionadas, tratadas durante 6 días con solución salina, y evaluadas a los 14 dpi. En este caso también el grado de recuperación de las retinas tratadas con MRS2179 fue mayor que el de retinas tratadas con apirasa. Estas observaciones sugirieron que a pesar de haberse bloqueado la señalización purinérgica durante la primera semana posterior a la lesión, los mecanismos de regeneración tisular pudieron ser nuevamente inducidos durante la segunda semana.

8. Activación de la expresión del receptor P2Y₁ inducida por la lesión retiniana

Los receptores purinérgicos se expresan y cumplen importantes funciones, durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Laasberg, 1990). Durante la retinogénesis, el ATP, a través de su unión a receptores P2Y, actúa sobre las células progenitoras, activando la vía de señalización PLC/IP₃, resultando en un incremento del Ca²⁺ intracelular y en la

modulación de genes que median el reingreso de la célula a la fase-S del ciclo celular (Sanchez y col, 2002). La puesta en marcha de esta cascada intracelular promueve la progresión de la división mitótica y en consecuencia, la proliferación de los precursores que darán origen a los distintos tipos celulares retinianos (Martins y Pearson, 2008).

Por lo tanto, se evaluó la expresión transcripcional, en la retina de pez cebra, de diferentes receptores purinérgicos previamente descritos en el sistema nervioso central de vertebrado, ya sea durante el desarrollo embrionario o en el adulto (Burnstock y Ulrich, 2011), y que fueron antagonizados farmacológicamente en este trabajo de tesis, con excepción de los receptores P2X7 y P2Y₂.

Entre los receptores analizados por RT-PCR, expresados por la retina neural de pez cebra, se encontraron los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂, que son principalmente activados por ADP, y los receptores P2X1, P2X2, P2X7 y P2Y₂, principalmente activados por ATP (Burnstock, 2007b).

No se ha descrito hasta el momento la secuencia de un ortólogo del receptor P2Y₁₃ en el genoma de pez cebra y, por consiguiente, no fue analizado por RT-PCR.

Por el contrario, el ARNm del receptor P2X3, que está descrito en el genoma de pez cebra y que fue antagonizado en el presente trabajo, no fue detectado en la retina neural de este organismo. Se ha informado que dicho receptor se expresa transitoriamente durante el desarrollo embrionario de roedores y de pez cebra en cerebro, médula espinal y ganglios sensoriales (Norton y col, 2000; Boldogkői y col, 2002; Cheung y col, 2005). Sin embargo, tampoco se detectó el ARNm de dicho receptor en retinas lesionadas a los 2, 7 o 15 dpi. De todos modos, no puede descartarse que el receptor P2X3 se exprese en la retina durante etapas tempranas del desarrollo embrionario.

A excepción del receptor P2X7, los receptores con mayor afinidad por el ATP, es decir los receptores P2X1, P2X2, P2Y₂, si bien la técnica de RT-PCR estándar no es una técnica cuantitativa, parecerían tener un nivel de expresión menor en la retina de pez cebra que los receptores activados principalmente por ADP (P2Y₁ y P2Y₁₂).

Los experimentos realizados en este trabajo utilizando la técnica de RT-PCR cuantitativa, demostraron un aumento significativo en el nivel de expresión del ARN mensajero del receptor P2Y₁, que coincide con el día 7 posterior a la lesión, cuando se observaron los valores máximos de proliferación celular, como se describió previamente. Otros receptores como el P2X7 y P2Y₁₂, en cambio, no mostraron variaciones significativas en su nivel de expresión transcripcional en ninguna de las etapas siguientes a la lesión examinadas. Estos resultados, sumados a las evidencias farmacológicas, sugirieron un importante rol del receptor P2Y₁ en el control de la proliferación de las células progenitoras retinianas.

A partir de los resultados de los experimentos realizados con el antagonista MRS2211, y de la constancia en el nivel de expresión del ARNm del receptor P2Y₁₂ durante los diferentes días luego de inducida la lesión, se infirió que dicho receptor no estaría involucrado en la regulación de la proliferación celular. Se ha descrito que MRS2211 en mamíferos antagoniza con mayor potencia a los receptores P2Y₁₃ que a los receptores P2Y₁₂ (Abbraccio y col, 2009). Estos dos receptores comparten varias características que los hacen difíciles de identificar uno del otro a través de estudios farmacológicos. Estas características incluyen que ambos receptores son fisiológicamente activados por ADP, presentan una estructura proteica similar, y ambos actúan intracelularmente a través de proteínas G inhibitorias (Burnstock, 2007b). Por otro lado, la secuencia del receptor P2Y₁₃ no está presente (o al menos no fue descrita hasta la fecha) en el genoma del pez cebra y, por consiguiente, este receptor no se expresaría en esta especie. En conjunto, estas

observaciones sugirieron que en la retina de pez cebra, el antagonista MRS2211 podría antagonizar a los receptores P2Y₁₂, evidenciando su ausencia de efecto sobre la proliferación celular.

Con respecto al receptor P2X7, otros trabajos han descrito que estos receptores se unen formando poros a altas concentraciones de ATP extracelular (mM), que no son normalmente encontradas en condiciones fisiológicas, y que permiten la entrada de calcio y provocan la muerte celular, por ejemplo, de las células ganglionares retinianas (Zhang y col, 2006b; Hu y col, 2010). Si bien luego de la lesión global de la retina se espera que las concentraciones de ATP extracelular se encuentren más elevadas que en condiciones fisiológicas, se desconoce la magnitud de dicho aumento. Por otro lado, el nivel de expresión del ARN mensajero del receptor P2X7 no mostró cambios entre los diferentes días posteriores a la lesión evaluados. Esto sugirió que la expresión transcripcional del receptor P2X7 no sería inducida durante las etapas de mayor proliferación y actividad apoptótica posteriores a la lesión.

9. Cambios en el patrón de expresión proteica del receptor P2Y₁ durante las etapas de degeneración y regeneración retiniana

9.1. Detección de la expresión proteica del receptor P2Y₁ en la retina de pez cebra

En los ensayos de western blot realizados con homogenatos de cerebro de rata se obtuvo una banda de peso molecular aparente de 63 kDa, acorde a lo indicado por Invitrogen, compañía que comercializa el anticuerpo contra el receptor P2Y₁. Del mismo modo, cuando se utilizaron homogenatos de cerebro de pez cebra, se obtuvo también una banda de peso molecular aparente de 63 kDa. Sin embargo, en cerebro de pez cebra esta fue la única banda detectada, mientras que en los homogenatos de cerebro de rata también se obtuvieron dos bandas proteicas muy tenues de alrededor de 80-82 y 40-42 kDa. Estos

resultados podrían indicar que el anticuerpo detectaría específicamente al receptor P2Y₁ en homogenatos de cerebro de pez cebra.

Por otro lado, al realizar los experimentos con homogenatos correspondientes a retinas de pez cebra, utilizando el mismo anticuerpo, se detectó una única banda de 80-82 KDa.

Un estudio previo utilizó otro anticuerpo contra el receptor P2Y₁, similar al empleado en el presente trabajo, ya que estaba también dirigido contra el extremo C-terminal de la secuencia humana. En dicho estudio, se detectó también una banda de 63 kDa en homogenatos de cerebro de rata y cultivos celulares transfectados con el receptor P2Y₁ (Moore y col, 2000). Además, otros autores, utilizando un tercer anticuerpo, detectaron en células de músculo liso humanas, tres bandas de 45, 90 y 180 kDa resistentes a tratamientos en condiciones reductoras (Wang y col, 2002). Como se mencionó en la sección de Resultados, la banda de 80-82 kDa obtenida en homogenatos de retina de pez cebra también fue resistente a diferentes concentraciones de β -mercaptoetanol. Según las bases de datos, el peso molecular esperado para la proteína del receptor P2Y₁ de pez cebra es de 40,43 kDa (XP_00134355). En consecuencia, la proteína detectada en este trabajo en homogenatos de retina de pez cebra podría corresponder a un dímero resistente a condiciones reductoras. De hecho la formación de homodímeros se ha descrito para los receptores P2Y₁ humanos (Choi y col., 2005).

Alternativamente, el retraso en la migración observado en el gel de poliacrilamida podría deberse a un alto grado de glicosilación de la proteína o a alguna otra modificación postraduccional. De hecho, el retardo en la migración provocado por la glicosilación resulta mucho mayor que el esperado por el aumento del peso molecular de la proteína, ya que cuanto mayor es el grado de glicosilación, menos cargas negativas del SDS se adhieren a la

superficie proteica, incrementando el retardo en la migración de manera no lineal con el peso molecular adicional otorgado por los grupos glicosilos.

Se descarta la alternativa de que se hubieran observado isoformas específicas de tejido entre la retina y el cerebro de pez cebra, ya que la única secuencia génica de este receptor en pez cebra presenta un solo exón (no exhibe intrones) impidiendo el mecanismo de “*splicing*” alternativo.

Asimismo, la forma de 63 kDa observada en los cerebros de rata, ratón, humano y pez cebra también correspondería al receptor P2Y₁ modificado postraduccionalmente, posiblemente glicosilado, ya que su secuencia presenta varios sitios consenso para la glicosilación y también se reportó sólo un gen, y la ausencia de isoformas, en los mamíferos.

Si bien la secuencia exacta del péptido inmunogénico utilizado para producir el anticuerpo comercial dirigido contra el receptor P2Y₁ no puede ser divulgada por la compañía que lo comercializa, se sabe que se encuentra dentro de los últimos 30 aminoácidos del C-terminal de la secuencia del receptor P2Y₁ de humano. Se sabe también que esta secuencia de 30 aminoácidos posee un 93% de homología con la secuencia del receptor de rata y ratón y un 50% de homología con la secuencia del receptor de pez cebra.

Además, cuando se comparó la secuencia de 30 aminoácidos de humano con el genoma completo de pez cebra, ésta mostró el mayor grado de homología con la secuencia correspondiente al receptor P2Y₁. En segundo lugar en cuanto al nivel de homología, se encontró a la proteína galectina 1 de tan sólo 15 kDa.

Estos resultados, sumados a que el anticuerpo detectó una banda de 63 kDa en el cerebro de pez cebra, al igual que en el cerebro de rata, y a lo descrito también para cerebro de

ratón y humano, sugieren que el anticuerpo utilizado también detectó de manera específica al receptor P2Y₁ en la retina de pez cebra.

9.2. Efectos de la lesión sobre la expresión proteica del receptor P2Y₁

En la retina de pez cebra, luego de 2 y 7 días de inducida la lesión con 10 µM de ouabaína, se detectaron dos bandas adicionales, una de 63 y otra de 40-42 kDa. También se detectó una banda nítida de 80-82 kDa, aunque levemente más tenue que en las retinas intactas.

Este cambio en el patrón de expresión coincidió temporalmente con las etapas de degeneración tisular y proliferación celular. La banda de 40-42 kDa coincidió con el peso molecular esperado para la proteína nativa en pez cebra, sin modificaciones postraduccionales en su estructura, mientras que la banda de 63 kDa coincidió con la banda más conspicua obtenida en homogenatos de cerebro tanto de rata como de pez cebra. Luego de 15 días de inducida la lesión, es decir ya en el comienzo de la etapa de diferenciación celular, se detectó, al igual que en las retinas controles no lesionadas, una única banda de 80-82 kDa.

Las evidencias obtenidas podrían indicar que luego de la lesión retiniana, cambios en la tasa de transcripción y traducción generarían una mayor proporción de formas inmaduras del receptor, mientras es procesado postraduccionalmente dentro de las células donde se expresa.

10. Aumento en los niveles de expresión proteica del receptor P2Y₁ luego de la lesión retiniana

Se describió, a través de inmunohistoquímica de fluorescencia, que el receptor P2Y₁ se expresa en la retina madura totalmente diferenciada, así como en la CMZ, en retinas no lesionadas. Luego de 5 y 7 días de inducida la lesión se observó un aumento en los niveles de expresión, así como un cambio en la localización de dicho receptor. Además, los ensayos

inmunohistoquímicos demostraron que el receptor es expresado por diferentes tipos de neuronas retinianas y procesos sinápticos, pero no por las células gliales de Müller, ya que no se observó colocalización del receptor con el marcador glutamina sintetasa. Esto coincide con resultados obtenidos previamente que reportaron la expresión del receptor P2Y₁ en el cerebro humano. Éste se detectó ampliamente distribuido en los somas neuronales y procesos sinápticos pero no en las células de la glia (Moore y col, 2000).

Sin embargo, podría ocurrir que una subpoblación de células de Müller expresara al receptor P2Y₁ inmediatamente después de inducida la lesión, momento en el que, según reportes previos, se activarían mitóticamente y darían origen a los precursores retinianos responsables de la regeneración. De hecho, la subpoblación de células de Müller que se activa en respuesta a la lesión lo hace dentro de las 24 a 48 horas luego de inducido el daño (Bernardos y col, 2007; Thummel y col, 2008).

Debido a que en este trabajo de tesis sólo se evaluó la distribución del receptor P2Y₁ en las capas retinianas a los 5 y 7 días luego de la injuria, no fue posible verificar si el receptor P2Y₁ se expresa en las células de Müller en los primeros días luego de inducida la lesión con ouabaína. Esto se debe a que en algunas oportunidades durante la realización de este trabajo de tesis se intentó detectar células de Müller con actividad proliferativa luego de 2 días de inducida la lesión, pero no se observó coexpresión de marcadores de proliferación con marcadores de células de Müller. Asimismo, la detección de la proliferación celular resultó muy escasa a los 2 dpi, al menos con la metodología utilizada en este trabajo. Los pocos núcleos positivos para BrdU observados se encontraban casi exclusivamente en la ONL y, evidentemente, éstos no correspondían a núcleos de las células de Müller activados mitóticamente.

Por consiguiente, las evidencias obtenidas indicaron que las células de Müller no proliferativas no expresaron el receptor P2Y₁, en los intervalos posteriores a la lesión

examinados. De todas formas, no puede descartarse que la ausencia de expresión del receptor P2Y₁ en las células de Müller mitóticamente activas esté relacionada con la dificultad de encontrar células proliferativas a los 2 días luego de inducida la lesión.

Por otro lado, se observó un incremento en la expresión del receptor P2Y₁ luego de la lesión durante los intervalos examinados en todas las capas retinianas, incluyendo a los fotorreceptores, avalando la posible participación del ADP como una señal neuroprotectora. Esta señal evitaría la excesiva muerte celular en las etapas de degeneración tisular y proliferación celular. De hecho, se demostró, como se describió previamente, que el tratamiento con MRS2179 luego de inducida la lesión, provocó un aumento en el índice de muerte celular también en la capa de los fotorreceptores.

Se observó que, previamente a la lesión, el receptor se expresa en las capas sinápticas de forma ordenada en estructuras laminares, que podrían corresponder a las distintas regiones de contactos sinápticos entre las células ganglionares y las interneuronas de la INL. La ubicación del receptor se detectó más precisamente en las regiones postsinápticas como lo evidenció la ausencia de co-localización con el marcador de vesículas presinápticas SV2. Luego de inducida la lesión, se observó una sobreexpresión del receptor también en algunas regiones presinápticas.

Además, en las retinas lesionadas, una distribución menos ordenada del receptor en estructuras laminares de las capas plexiformes coincidió con la desorganización sináptica observada en la IPL y OPL. A su vez, se observó que el receptor desaparecería de la porción apical de las células ganglionares (detectadas con calretinina) y sus proyecciones dendríticas proximales como se observó a los 5 dpi, mientras que se comenzaría a expresar nuevamente, a partir del día 7 posterior la lesión, en dicha región de la IPL y GCL, coincidiendo con el comienzo de la reorganización de las capas sinápticas.

Por otro lado, el aumento en el nivel de expresión proteica luego de 5 días de inducida la lesión podría sugerir un aumento a nivel transcripcional que ocurriría previamente al que se describió en este trabajo, ya que éste fue examinado y observado a los 7 días posteriores a la lesión, o alternativamente, a un incremento en la expresión traduccional del receptor o a una mayor expresión del mismo en la membrana plasmática.

El incremento del receptor P2Y₁ inducido por la lesión, junto con otras evidencias obtenidas en el presente trabajo, sugieren la participación de este receptor en la activación de la proliferación de las células progenitoras retinianas. Esta activación podría ser ejercida de forma directa sobre dichas células, ya que se describió que el receptor es expresado al menos por algunas células proliferativas tanto en la CMZ como en la capa nuclear interna (INL) en la retina diferenciada. En la CMZ, el receptor sería expresado por los progenitores proliferativos tanto en condiciones fisiológicas, que involucran sólo el crecimiento retiniano, como luego de inducida la lesión, implicando al proceso de regeneración. En la INL, la expresión del receptor P2Y₁ en las células proliferativas sólo se observó luego de inducido el daño. Sin embargo, no es posible afirmar que las células marcadas con BrdU en la retina madura fuesen todavía proliferativas cuando los peces fueron sacrificados 24 horas más tarde. De todos modos, los resultados indicaron que dichas células eran aún, o habían sido recientemente proliferativas y representaban a células progenitoras retinianas.

Por otro lado, la activación de las células progenitoras podría ser también ejercida de forma indirecta, ya que gran cantidad de células presentes en la retina madura, y que no fueron marcadas con BrdU, también expresaron el receptor P2Y₁. Podría ocurrir que el ADP actúe sobre los receptores P2Y₁, en las membranas plasmáticas de células retinianas diferenciadas y que ellas liberen una segunda señal extracelular que active la proliferación de los progenitores retinianos.

En retinas controles o lesionadas, el hecho de que el receptor P2Y₁ no sea expresado por las células proliferativas presentes en la ONL, y que corresponden a precursores de los fotorreceptores, indicaría que podría no ser el ADP el nucleótido responsable de la proliferación en dicha capa. Podría ser que las células proliferativas dejaran de expresar el receptor purinérgico al ubicarse en la ONL (luego de migrar desde la INL), donde se convierten en precursores de los fotorreceptores, y una vez allí responden a otro tipo de señales tales como el CNTF u otros factores de crecimiento como el IGF-1 (Faillace y col., 2002; Otteson y col., 2002).

El ATP o la adenosina tampoco parecen estar involucrados en el control de la proliferación celular de retinas intactas o lesionadas. No obstante, no puede descartarse un posible rol del UTP o UDP, puesto que su potencial efecto no ha sido todavía examinado.

11. Importancia de las NTPDasas en la regulación de la proliferación celular

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos luego del tratamiento con ARL67156 indicaron que la actividad de dichas ecto-enzimas es fundamental para la regulación de la actividad proliferativa de los precursores retinianos. Asimismo, los cambios observados en los niveles de expresión de los ARN mensajeros para las NTPDasas luego de la injuria, obtenidos en los experimentos de PCR cuantitativa, avalarían esta hipótesis.

En todos los organismos vivos, las células regulan su función, morfología y metabolismo mediante la activación o represión de la expresión génica. El nivel de expresión de sus genes es proporcional al número de copias de ARN mensajero de un gen determinado, el cual es traducido para formar proteínas. Por lo tanto, si bien no puede establecerse una correlación entre niveles más elevados de ARN mensajero, una mayor expresión proteica y, para el caso particular de una enzima, una mayor actividad, se espera generalmente que

estos procesos (transcripción-traducción-actividad enzimática) correlacionen de forma positiva.

Los niveles relativos de ARN mensajero de las isoformas mq y mv de la NTPDasa2 mostraron un perfil similar luego de la lesión, aumentando principalmente en los días previos al pico de proliferación (2 dpi). Sin embargo, el ARNm de la isoforma mq exhibió un incremento más marcado de su nivel de expresión que el mensajero de la isoforma mv. La actividad de la NTPDasa2, independientemente de su isoforma, provoca la acumulación de ADP por hidrólisis de ATP en el medio extracelular. El aumento de ARNm de dicha enzima previamente al pico de proliferación podría indicar un incremento del número de estas enzimas y un posible aumento de los niveles de ADP extracelular, previamente y durante el intervalo de máxima proliferación inducida por la lesión.

Asimismo, se observó un aumento en el nivel de expresión del ARNm de la NTPDasa1, que hidroliza ATP y ADP en igual proporción (Zimmermann, 2006), luego de la lesión. Dicho incremento se mantuvo elevado hasta el día donde ocurre el máximo en la proliferación celular. Esta enzima provoca la acumulación de AMP en el medio extracelular y, por lo tanto, podría estar involucrada en la regulación de procesos relacionados con la finalización del efecto del ATP y del ADP sobre los receptores purinérgicos, en particular evitando su desensibilización. Por otro lado, la regulación ejercida por esta enzima podría ocurrir sobre diferentes tipos celulares, o sobre otros procesos no relacionados con la proliferación celular, no examinados durante este trabajo.

Por último, la NTPDasa3, que posee una actividad intermedia, hidrolizando tres veces más ATP que ADP (Kukulski y col, 2005), mostró un aumento en la expresión del ARNm en el intervalo donde se observó un máximo de proliferación celular (7 dpi).

Resulta complejo analizar como se correlacionaría el incremento en la expresión de las distintas NTPDasas con el aumento en la proliferación celular inducido por la lesión y mediado por el ADP. Sin embargo, los cambios de expresión de estas enzimas observados durante las fases degenerativas y proliferativas, sumado a lo observado como consecuencia del tratamiento de retinas lesionadas con el inhibidor de la actividad ecto-ATPasa, pondrían de manifiesto la importancia de la actividad NTPDasa durante el proceso de regeneración retiniana.

Si bien no puede establecerse una relación causal entre los cambios en los niveles de expresión de los ARNm y la expresión proteica de las NTPDasas, o su nivel de actividad, sería posible que un incremento en el nivel de transcripción resultara en un aumento del número de enzimas y éste, a su vez, representara una mayor actividad enzimática.

Una mayor actividad de las NTPDasas luego de la lesión sería consistente con una más precisa regulación de los niveles de nucleótidos extracelulares que, según evidencias indirectas, serían más elevados en las etapas mencionadas. Por consiguiente, una expresión enzimática más elevada, sumada a una presunta mayor liberación de ATP hacia el medio extracelular inducida por la lesión, podría subyacer al aumento de la proliferación celular luego de la lesión retiniana.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la NTPDasa2 también sufrió cambios en su patrón de expresión proteica luego del daño, cuando fue examinada por inmunohistoquímica de fluorescencia. Este cambio podría evidenciar la importancia de esta enzima en la regulación de la proliferación celular inducida por la lesión, ya que, si bien no implicaría una relación causal entre la redistribución de la expresión de la enzima y el aumento de proliferación celular y/o el efecto neuroprotector de los nucleótidos extracelulares, la expresión aumentó en las capas retinianas más lesionadas y disminuyó en las capas

sinápticas. Se observó, además, un aumento en la capa de fotorreceptores, que junto con el aumento de la expresión del receptor P2Y₁, podría estar relacionado con un rol neuroprotector del ADP en esa zona de la retina.

La disminución de la enzima de las capas plexiformes podría estar relacionada con la desorganización sufrida por las proyecciones sinápticas durante la degeneración tisular. Esta desorganización posiblemente provocó una disminución en la expresión de esta y otras proteínas sinápticas. Sin embargo, cuando se evaluó la localización de SV2, no se observaron variaciones significativas en su localización, indicando que, al menos las presinapsis de las capas retinianas internas, no se desorganizaron completamente, en el caso de la lesión parcial.

Esto sugirió que los cambios observados en la localización de la NTPDasa2 corresponderían a variaciones que podrían tener una implicancia funcional y no a cambios generales relacionados únicamente con la desorganización tisular.

El conjunto de evidencias de la literatura científica sugiere que el sistema de señalización purinérgico es fundamental en la neurogénesis retiniana que ocurre durante el desarrollo embrionario de vertebrado (Sugioka y col, 1996; Ulrich y Burnstock, 2011).

Consiguientemente, a partir de las evidencias proporcionadas en este trabajo de tesis, se podría proponer que, así como el ATP interviene en la regulación de la retinogénesis, habría una participación de los nucleótidos extracelulares, sus receptores y las enzimas que regulan sus concentraciones, en la regulación de los mecanismos neurogénicos y neuroprotectores que ocurren durante la regeneración, inducida por una lesión, de la retina adulta del pez cebra (Battista y col, 2009).

CONCLUSIONES

Las evidencias obtenidas a lo largo de este trabajo de tesis avalan la utilización de la retina de pez cebra como un excelente modelo de tejido neural adulto que posee la capacidad de regenerar todos sus tipos celulares y sus conexiones sinápticas.

En este sentido, se propone que la regeneración retiniana estaría regulada por mecanismos generales e independientes del grado de lesión y que los nucleótidos extracelulares jugarían un rol fundamental como señales autócrinas y parácrinas luego del daño, activando mitóticamente a las células progenitoras presentes en la retina neural. Los progenitores retinianos fueron estimulados tanto en las regiones de la retina madura como en la zona ciliar marginal. Estas señales actuarían ya sea estimulando la tasa de proliferación o induciendo la entrada de progenitores quiescentes a la fase S del ciclo celular.

El presente trabajo, realizado en un modelo *in vivo*, aporta información novedosa y relevante acerca del rol de las señales purinérgicas en la regeneración de la retina adulta de pez cebra. En particular, se demostró que si alguna de estas señales (producción de ADP en el espacio extracelular a partir de ATP, presencia y actividad de las NTPDasas, expresión y activación de los receptores P2Y₁) no se encuentra disponible, no ocurriría el aumento de la proliferación celular inducido por la lesión, y por lo tanto, la reparación del tejido retiniano se vería impedida, al menos hasta que estos mecanismos de señalización estuvieran nuevamente activos.

Se postula que una vez lesionado el tejido retiniano, se liberaría ATP al medio extracelular principalmente desde las células dañadas. Sin embargo, podrían coexistir, o incluso más tardíamente predominar, otros mecanismos de liberación, por ejemplo a través de hemicanales, a partir del epitelio pigmentario, neuronas y células de Müller así como desde el vítreo y/o desde vasos sanguíneos presentes en la retina.

El aumento descrito en los niveles de ARN mensajero de las NTPDasas y la relocalización de la expresión proteica sufrida por la NTPDasa2 en los días posteriores a la lesión, permitirían postular que, una vez en el medio extracelular, el ATP sería hidrolizado a ADP.

Tanto la liberación de ATP como su hidrólisis extracelular por las NTPDasas, modificaría la disponibilidad extracelular de nucleótidos/nucleósidos que actuarían sobre los receptores purinérgicos, descritos en la retina de pez cebra en este trabajo.

En consecuencia, la mayor concentración extracelular de ADP y la unión de éste a los receptores P2Y₁, podría promover un aumento del Ca²⁺ intracelular, la activación de genes que codifican para ciclinas y otros factores involucrados en el control del ciclo celular, permitiendo que las células progenitoras ingresen al ciclo celular. Así, aumentaría el número de precursores que se diferenciarán posteriormente en los distintos tipos celulares retinianos, llevando a la regeneración del tejido.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el ADP, a través de su unión a los receptores P2Y₁, actuaría directamente sobre algunas células progenitoras o también sobre los tipos celulares diferenciados, produciendo éstos, a su vez, un segundo mensajero intercelular que activaría la proliferación de los precursores.

Por otro lado, el ADP actuando sobre los receptores P2Y₁ podría atenuar o inhibir la muerte celular de las células retinianas maduras, como por ejemplo los fotorreceptores retinianos, que expresarían este receptor principalmente luego de la lesión.

En conjunto, se evidenció un importante rol neuroprotector del ADP y del receptor P2Y₁, además de la posible participación de otros nucleótidos en este mecanismo, luego de la injuria.

La línea de trabajo desarrollada en esta tesis podría contribuir al conocimiento de los factores que estimulan, o inhiben, el crecimiento y la proliferación de neuronas y células gliales en la retina de vertebrado. Estos conocimientos podrían ser de utilidad para reproducir ambientes favorables para la proliferación celular y, por ejemplo, estimular la reparación del tejido retiniano también en los vertebrados mamíferos, quienes han perdido evolutivamente dicha capacidad durante su vida posnatal y adulta. Asimismo, sería posible que estudios de este tipo sentaran las bases teóricas para la futura aplicación de tratamientos terapéuticos basados en el trasplante de *stem cells*, que involucrarían tanto la caracterización génica y funcional de estas células como de los ambientes (o nichos) extracelulares adecuados para su proliferación y diferenciación.

Otra posible aplicación derivada de los resultados de este estudio incluiría el potencial uso del sistema de señalización purinérgica en ensayos que intentarían inhibir los procesos neurodegenerativos para detener la pérdida de neuronas y células de la glía en el tejido dañado por patologías o accidentes.

BIBLIOGRAFIA

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhatsky A y Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 2009, Jan, 32 (1):19-29.

Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA y Burnstock G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* 2003, Feb, 24 (2):52-5.

Ahmad I, Tang L y Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, Apr 13, 270 (2):517-21.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM y Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2001, 2:287-293.

Alvarez-Buylla A y Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 2004, 41:683-686.

Battista AG, Ricatti MJ, Pafundo DE, Gautier MA y Faillace MP. Extracellular ADP regulates lesion-induced in vivo cell proliferation and death in the zebrafish retina. *J Neurochem.* 2009, 111: 600-613.

Bhattacharya S, Dooley C, Soto F, Madson J, Das AV y Ahmad I. Involvement of Ath3 in CNTF-mediated differentiation of the late retinal progenitors. *Mol Cell Neurosci.* 2004, Sep, 27 (1):32-43.

Bhattacharya S, Das AV, Mallya KB y Ahmad I. Ciliary neurotrophic factor-mediated signaling regulates neuronal versus glial differentiation of retinal stem cells/progenitors by concentration-dependent recruitment of mitogen-activated protein kinase and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathways in conjunction with Notch signaling. *Stem Cells.* 2008, 26(10):2611-24.

Bhatia B, Singhal S, Lawrence J M, Khaw PT y Limb GA. Distribution of Müller stem cells within the neural retina: Evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Experimental Eye Research.* 2009, 89:373–382.

Beigi R, Kobatake E, Aizawa M y Dubyak R. Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *Am J Physiol.* 1999, 276:267-278.

Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR y Raymond PA. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci.* 2007, Jun 27, 27 (26):7028-4.

Boldogkői Z, Schütz B, Sallach J, Zimmer A (2002) P2X3 receptor expression at early stage of mouse embryogenesis. *Mech Dev* 118: 255-260.

Bowmaker JK y Hunt DM. Evolution of vertebrate visual Pigments. *Current Biology.* 2006, (16):13.

Braisted JE, Essman TF y Raymond PA. Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina. *Development.* 1994, 120(9):2409-19.

Braisted JE y Raymond PA. Regeneration of dopaminergic neurons in goldfish retina. *Development.* 1992, 114: 913-919.

Braun N, Sévigny J y Enyoji K. Localization of ecto-NTP diphosphohydrolase 1 on blood vessels and microglial cells in the central nervous system. *Drugs Dev Res.* 2000, 50:49.

- Braun N, Sévigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, Hammer K y Zimmermann H.** Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci.* 2003, Apr, 17 (7):1355-64.
- Brown A. M.** ATP and ATPase determinations in red blood cells. In *Red cell membranes. A metodological approach*, ed. Ellory. 1980, 223-238.
- Bucheimer RE y Linden J.** Purinergic regulation of epithelial transport. *J Physiol.* 2004, Mar 1, 555 (2):311-21.
- Burnstock G.** A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach.* Raven Press, New York. 1978, 107-118.
- Burnstock G.** Purinergic signalling an overview. *Novartis Found Symp.* 2006, 276:26-48.
- Burnstock G.** Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007a, 64:1471-1483.
- Burnstock G.** Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* 2007b, 87:659-797.
- Burnstock G y Ulrich H.** Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Apr;68(8):1369-94. Epub 2011 Jan 8.
- Cameron DA y Easter J.** Cone Photoreceptor regeneration in adult zebra fish retina: phenotypic determination and mosaic pattern formation. *J Neurosci.* 1995, 15(3pt2): 2255-2271.
- Cameron DA y Carney LH.** Cell mosaic patterns in the native and regenerated inner retina of zebrafish: Implications for retinal assembly *J Comp Neurol.* 2000, 416: 356-367.
- Chen JF y Chern Y.** Impacts of methylxanthines and adenosine receptors on neurodegeneration: human and experimental studies. *Handb Exp Pharmacol.* 2011, 200:267-310.
- Cheung KK, Chan WY, Burnstock G.** Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience.* 2005, 133: 937-945.
- Choi JY, Shin JH, Kim JL, Jung SH, Son EJ, Song MH, Kim SH y Yoon JH.** P2Y2 agonist induces mucin secretion via Ca²⁺- and inositol 1,4,5-triphosphate-dependent pathway in human middle ear epithelial cells. *Hear Res.* 2005 Nov;209(1-2):24-31.
- Chow RL, Altmann CR, Lang RA y Hemmati-Brivanlou A.** *Pax6* induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development.* 1999, Oct, 126 (19):4213-22.
- Ciccarelli R, Di Iorio P, Ballerini P, Ambrosini G, Giuliani P, Tiboni GM y Caciagli F.** Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 1994 Dec 1;39(5):556-66.
- Cicero SA, Johnson D, Reyntjens S, Frase S, Connell S, Chow LM, Baker SJ, Sorrentino BP y Dyer MA.** Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009, Apr 21, 106 (16):6685-90.
- Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA y Sellins KS.** Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol.* 1992; 10:267-93.

- Culic O, Lemmens R, Teuchy H y Vanduffel L.** Autoradiography-based cytochemical detection of ecto-ATPase, ecto-ADPase, 5'-nucleotidase, and extracellular adenosine production, employing $^{141}\text{Ce}^{3+}$ as a capturing agent. *Histochem J.* 1995, Jul, 27 (7):555-64.
- Cunha RA y Ribeiro JA.** ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci.* 2000 Dec 1;68(2):119-37. Review.
- Dale N.** Dynamic ATP signalling and neural development. *J Physiol.* 2008, May 15, 586 (10):2429-36.
- Daly JW, Padgett W, Shamim MT, Butts-Lamb P y Waters J.** 1,3-Dialkyl-8-(psilfophenyl)-xanthines: Potent water-soluble antagonists for A1 and A2 adenosine receptors. *J Med Chem.* 1985, Apr, 28 (4):487-92.
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Bultynck G y Himpens B.** Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions?. *Bioessays.* 2009, Sep, 31 (9):953-74.
- Doetsch F.** A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2003, 13:543-550.
- Dowling JE.** Information processing by local circuits: The vertebrate retina as a model system. In: Schmitt FO, Worden FG, editors. *Neurosciences: Fourth study program.* Cambridge, MA: MIT. 1979, Press. p 163–181.
- Driever W, Stemple D, Schier A y Solnica-Krezel L.** Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.* 1994;10(5):152-9.
- Dunwiddie TV y Masino SA.** The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:31-55. Review.
- Dyer MA.** Regulation of proliferation, cell fate specification and differentiation by the homeodomain proteins Prox1, Six3, and Chx10 in the developing retina. *Cell Cycle.* 2003, Jul-Aug, 2 (4):350-7.
- Ever L y Gaiano N.** Radial 'glial' progenitors: neurogenesis and signaling. *Curr Opin Neurobiol.* 2005, 15:29-33.
- Fadool JM.** Development of a rod photoreceptor mosaic revealed in transgenic zebrafish. *Dev Biol.* 2003, 258:277-290.
- Fadool JM y Dowling JE.** Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Prog Retin Eye Res.* 2008, 27(1):89-110.
- Faillace MP, Julian D y Korenbrot JI.** Mitotic activation of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina: regulatory signals and molecular markers. *J Comp Neurol.* 2002, Sep 16, 451 (2):127-41.
- Fausett BV y Goldman D.** A role for alpha 1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci.* 2006, 26:6303–6313.
- Fausther M, Lecka J, Kukulski F, Lévesque SA, Pelletier J, Zimmermann H, Dranoff JA y Sévigny J.** Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007, Mar, 292 (3):G785-95.
- Fernald RD.** Teleost vision: seeing while growing. *J Exp Zool Suppl.* 1990, 5:167-80.
- Fields RD y Burnstock G.** Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 2006, Jun, 7 (6):423-36.

- Fimbel S, Montgomery J, Burket C y Hyde D.** Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J. Neurosci.* 2007, 27, 1712-1724.
- Fischer AJ y Reh TA.** Transdifferentiation of pigmented epithelial cells: a source of retinal stem cells?. *Dev Neurosci.* 2001. 23 (4-5):268-76.
- Fischer AJ, Hendrickson A y Reh TA.** Immunocytochemical characterization of cysts in the peripheral retina and pars plana of the adult primate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001, 42:3256-3263.
- Fitz JG.** Regulation of cellular ATP release. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2007, 118:199-208.
- França GR, Freitas RC y Ventura AL.** ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture. *Int J Dev Neurosci.* 2007, 25:283-291.
- Fredholm BB, Jzerman AP, Jacobson KA, Klotz K y Linden J.** International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev.* 2001, 53:527.
- Fredholm BB.** Adenosine and neuroprotection. *Int Rev Neurobiol.* 1997, 40:259-80.
- Gehring W e Ikeo K.** *Pax6* mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 1999, 15:371:377.
- Goldman N, Chen M, Fujita T, Xu Q, Peng W, Liu W, Jensen TK, Pei Y, Wang F, Han X, Chen JF, Schnermann J, Takano T, Bekar L, Tieu K y Nedergaard M.** Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat Neurosci.* 2010, Jul, 13 (7):883-8.
- Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A., Ahmed T, Gong J, Melamed N, Darzynkiewicz Z.** Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia,* 1993, 7, 659-670.
- Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE y Bains JS.** Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci.* 2005, 8, 1078-1086.
- Grinthal A y Guidotti G.** Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner. *Biochemistry.* 2000, 39:9-16.
- Hamilton N, Vayro S, Kirchhoff F, Verkhratsky A, Robbins J, Gorecki DC y Butt AM.** Mechanisms of ATP- and glutamate-mediated calcium signaling in white matter astrocytes. *Glia.* 2008, 56, 734-749.
- Harris WA y Perron M.** Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina. *Int J Dev Biol.* 1998, 42, 299-304.
- Hartwick AT, Lalonde MR, Barnes S y Baldrige WH.** Adenosine A1-receptor modulation of glutamate-induced calcium influx in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Oct;45(10):3740-8.
- Hatakeyama J y Kageyama R.** Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin. Cell Dev Biol.* 2004, 15: 39–83.
- Hawryshyn CW, Martens G, Allison WT y Anholt BR.** Regeneration of ultraviolet-sensitive cones in the retinal cone mosaic of thyroxin-challenged post-juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol.* 2003, Aug, 206 (15):2665-73.

- Heo JS y Han HJ.** ATP stimulates mouse embryonic stem cell proliferation via protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Stem Cells*. 2006, Dec, 24 (12):2637-48.
- Hitchcock, PF.** Exclusionary dendritic interactions in the retina of the goldfish. *Development*. 1989, 106: 589-598.
- Hitchcock PF y Raymond PA.** Retinal regeneration. *Trends Neurosci*. 1992, 15(3):103-8.
- Hitchcock PF y Kakuk-Atkins.** The basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD is expressed in the rod lineage of the teleost retina *J Comp Neurol*. 2004, 477(1): 108-117.
- Holt CE, Bertsch TW, Ellis HM y Harris WA.** Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron*. 1988, Mar 1 (1):15-26.
- Housley G y Gale J.** Purinergic signalling in the inner ear-perspectives and progress. *Purinergic Signal*. 2010, Jun, 6 (2):151-3.
- Hu H, Lu W, Zhang M, Zhang X, Argall AJ, Patel S, Lee GE, Kim YC, Jacobson KA, Laties AM, Mitchell CH.** Stimulation of the P2X7 receptor kills rat retinal ganglion cells in vivo. *Exp Eye Res*. 2010 Sep;91(3):425-32. Epub 2010 Jul 1.
- Iwabuchi S y Kawahara K.** Functional significance of the negative-feedback regulation of ATP release via pannexin-1 hemichannels under ischemic stress in astrocytes. *Neurochem Int*. 2010, Feb, 58 (3):376-84.
- Jans D, Srinivas SP, Waelkens E, Segal A, Larivière E, Simaels J y Van Driessche W.** Hypotonic treatment evokes biphasic ATP release across the basolateral membrane of cultured renal epithelia (A6). *J Physiol*. 2002, 545:543-555.
- Johns PR y Fernald RD.** Genesis of rods in the retina of teleost fish. *Nature*. 1981, 141-142.
- Joseph SM, Pifer MA, Przybylski RJ y Dubyak GR.** Methylene ATP analogs as modulators of extracellular ATP metabolism and accumulation. *Br J Pharmacol*. 2004, Jul, 142 (6):1002-14.
- Julian D, Ennis K y Korenbrot J.** Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol*. 1998, 394, 271-282.
- Kassen SC, Ramanan V, Montgomery JE, T Burket C, Liu CG, Vihtelic TS y Hyde DR.** Time course analysis of gene expression during light-induced photoreceptor cell death and regeneration in albino zebrafish. *Dev Neurobiol*. 2007, 67: 1009-1031.
- Kataoka S, Toyono T, Seta Y, Ogura T y Toyoshima K.** Expression of P2Y1 receptors in rat taste buds. *Histochem Cell Biol*. 2004, May, 121 (5):419-26.
- Kolb H, Nelson R, Ahnelt P y Cuenca N.** Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res*. 2001, 131:3-26.
- Kubota R, Hokoc JN, Moshiri A, McGuire C y Reh TA.** A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002, 134, 31-41.
- Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL y Sévigny J.** Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*. 2005, Jun 1, (2):193-204.

- Laasberg T.** Ca²⁺(+)-mobilizing receptors of gastrulating chick embryo. *Comp Biochem Physiol C.* 1990, 97(1):9-12.
- Lazarowski ER, Boucher RC y Harden TK.** Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P₂X- and P₂Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol.* 2003, 64:785-795.
- Lazarowski ER, Boucher RC y Harden TK.** Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem.* 2000, Oct 6, 275 (40):31061-8.
- Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F y Sévigny J.** Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol.* 2007, Sep, 152 (1):141-50.
- Lillien L.** Neural progenitors and stem cells: mechanisms of progenitor heterogeneity. *Curr Opin Neurobiol.* 1998 Feb;8 (1):37-44.
- Livesey R y Cepko C.** Neurobiology. Developing order. *Nature.* 2001, Oct 4, 413 (6855):471, 473.
- Lombardo F.** Time course and localization of mitosis during the regeneration of the retina of an adult teleost. *Accademia Lincei-Reniconnti Scienze Fisicali Matematiche e Naturale.* 1972, 53, 323-327.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193.
- Machida T, Heerdt PM, Reid AC, Schäfer U, Silver RB, Broekman MJ, Marcus AJ y Levi R.** Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1/CD39, localized in neurons of human and porcine heart, modulates ATP-induced norepinephrine exocytosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005, May, 313 (2):570-7.
- Martins RA y Pearson RA.** Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* 2008, Feb 4, 1192:37-60.
- Marquardt T y Gruss P.** Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci.* 2002, Jan;25(1):32-8.
- Masland RH.** The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci.* 2001, 4:877-886.
- Massé K, Bhamra S, Eason R, Dale N y Jones EA.** Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature.* 2007, 449:1058-1062.
- Mensinger A y Powers M.** Visual function in regenerating teleost retina following surgical lesioning. *Vis. Neurosci.* 2007, 24, 299-307.
- Mensinger A y Powers M.** Visual function in regenerating teleost retina following citotoxic lesioning. *Visual Neuroscience.* 1999, 16, 241-251.
- Milenkovic I, Weick M, Wiedemann P, Reichenbach A y Bringmann A.** P₂Y receptor-mediated stimulation of Müller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003, Mar, 44 (3):1211-20.
- Mishra SK, Braun N, Shukla V, Füllgrabe M, Schomerus C, Korf HW, Gachet C, Ikehara Y, Sévigny J, Robson SC y Zimmermann H.** Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development.* 2006 Feb;133(4):675-84

- Moore D, Chambers J, Waldvogel H, Faull R y Emson P.** Regional and Cellular Distribution of the P2Y1 Purinergic Receptor in the Human Brain: Striking Neuronal Localization. *J Comp Neurol.* 2000, 421: 374–384.
- Moshiri A y Reh TA.** Persistent progenitors at the retinal margin of *ptc*+/- mice. *J Neurosci.* 2004, 24:229-237.
- Müller CE y Jacobson KA.** Xanthines as adenosine receptor antagonists. *Handb Exp Pharmacol.* 2011, 200:151-99.
- Mullins MC y Nüsslein-Volhard C.** Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Curr Opin Genet Dev.* 1993, 3(4):648-54.
- Neary JT y Zhu Q.** Signaling by ATP receptors in astrocytes. *Neuroreport.* 1994, 5;5(13):1617-20.
- Negishi K, Teranishi T, Kato S y Nakamura Y.** Paradoxical induction of dopaminergic cells following intravitreal injection of high doses of 6-hydroxydopamine in juvenile carp retina. *Brain Res.* 1987, 430: 67-79.
- Neumann CJ y Nüsslein-Volhard C.** Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science.* 2000 Sep 22; 289 (5487):2137-9.
- Newman EA.** A dialogue between glia and neurons in the retina: modulation of neuronal excitability. *Neuron Glia Biol.* 2004, Aug, 1 (3):245-252.
- Newman EA.** Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. *J Neurosci.* 2005, 25:5502-5510.
- Newman EA.** A purinergic dialogue between glia and neurons in the retina. *Novartis Found Symp.* 2006, 276:193-202.
- Ninkovic J y Bally-Cuif L.** The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods.* 2006, Jul, 39 (3):262-74.
- Norton WH, Rohr KB, Burnstock G** (2000) Embryonic expression of a P2X(3) receptor encoding gene in zebrafish. *Mech Dev* 99: 149-152.
- Nunes P, Calaza K, Albuquerque L, Fragel-Madeira L, Sholl-Franco A y Ventura A.** Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2007, 25, 499-508.
- Ohsawa R y Kageyama R.** Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res.* 2008, Feb, 4: 1192:90-8
- Otteson DC y Hitchcock PF.** Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vis Res.* 2003, 43:927-36.
- Otteson DC, Cirenza PF y Hitchcock PF.** Persistent neurogenesis in the teleost retina: evidence for regulation by the growth-hormone/insulin-like growth factor-I axis. *Mech Dev.* 2002, 117(1-2):137-49.
- Otteson DC, D'Costa AR y Hitchcock PF.** Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev Biol.* 2001, 232: 62-76.
- Quiring R, Walldorf U, Kloter U y Gehring WJ.** Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science.* 1994, Aug 5, 265 (5173):785-9.

- Paes-De-Carvalho R.** Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. *An Acad Bras Cienc.* 2002 Sep;74(3):437-51.
- Pafundo DE, Mut P, Pérez Recalde M, González-Lebrero RM, Fachino V, Krumschnabel G y Schwarzbaum PJ.** Effects of extracellular nucleotides and their hydrolysis products on regulatory volume decrease of trout hepatocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004, Oct, 287 (4):R833-43.
- Pafundo DE, Chara O, Faillace MP, Krumschnabel G y Schwarzbaum PJ.** Kinetics of ATP release and cell volume regulation of hyposmotically challenged goldfish hepatocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008, Jan, 294 (1):R220-33.
- Pankratov Y, Lalo, U, Verkhatsky A y North RA.** Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 2006, 452, 589-597.
- Pearson R, Catsicas M, Becker D y Mobbs P.** Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *J Neurosci.* 2002, 22: 7569-7579.
- Pearson RA, Dale N, Llaudet E y Mobbs P.** ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron.* 2005, 46,731-744.
- Perron M, Kanekar S, Vetter ML y Harris WA.** The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol.* 1998, 185-200.
- Pintor J, Peral A, Peláez T, Martín S y Hoyle CH.** Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jan;304(1):342-8.
- Plesner L.** Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol.* 1995, 158:141-214.
- Puthussery T, Yee P, Vingrys AJ y Fletcher EL.** Evidence for the involvement of purinergic P2X receptors in outer retinal processing. *Eur J Neurosci.* 2006, Jul, 24 (1):7-19.
- Puthussery T y Fletcher EL.** Neuronal expression of P2X3 purinoceptors in the rat retina. *Neuroscience.* 2007, 146:403-414.
- Ralevic V y Burnstock G.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998 50(3):413-92.
- Ramachandran R, Fausett BV y Goldman D.** *Ascl1a* regulates Müller glia dedifferentiation and retina regeneration via a *Lin-28*-dependent, *let-7* miRNA signaling pathway. *Nature Cell Biol.* 2010, 12: 1101-1107.
- Ramón y Cajal S.** La retina des vertébrés. *La Cellule.* 1892, 9:119-259.
- Raymond PA, Reifler MJ y Rivlin PK.** Regeneration of goldfish retina: rod precursors are a likely source of regenerated cells. *J Neurobiol.* 1988, 19: 431-463.
- Raymond P, Reifler M y Rivlin P.** Regeneration of goldfish retina: rod precursors are a likely source of regenerated cells. *J. Neurobiol.* 1998, 19, 431-463.
- Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL y Perkowski JJ.** Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol.* 2006, Jul 26, 6:36.
- Raymond PA y Hitchcock PF.** Retinal regeneration: common principles but a diversity of mechanisms. *Adv Neurol.* 1997;72:171-84.

Reh TA y Fischer AJ. Stem Cells in the Vertebrate Retina. *Brain Behav Evol.* 2001, 58: 296-305.

Reigada D, Lu W, Zhang X, Friedman C, Pendrak K, McGlenn A, Stone RA, Laties AM y Mitchell CH. Degradation of extracellular ATP by the retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005, Sep, 289 (3):C617-24.

Ribeiro JA. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol Toxicol.* 1995 Nov; 77(5):299-305.

Ricatti MJ, Alfie LD, Lavoie EG, Sévigny J, Schwarzbaum PJ y Faillace MP. Immunocytochemical localization of NTPDases1 and 2 in the neural retina of mouse and zebrafish. *Synapse.* 2009, Apr, 63 (4):291-307.

Ricatti MJ, Battista AG, Zorrilla Zubilete M y Faillace MP. Purinergic Signals Regulate Daily S-Phase Cell Activity in the Ciliary Marginal Zone of the Zebrafish Retina. *J Biol Rhythms.* 2011, March 30, 26 (2):107-117.

Rinkwitz S, Mourrain P y Becker TS. Zebrafish: An integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Prog Neurobiol.* 2011, Feb, 93 (2):231-43.

Rockhill RL, Euler T y Masland RH. Spatial order within but not between types of retinal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97:2303-2307.

Ryu JK, Choi HB, Hatori K, Heisel RL, Pelech SL, McLarnon JG y Kim SU. Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. *J Neurosci Res.* 2003 May 1;72(3):352-62.

Sanches G, de Alencar LS y Ventura AL. ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. *Int J Dev Neurosci.* 2002, Feb, 20 (1):21-7.

Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T y Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med.* 2006, Nov, 84 (11):901-10.

Sévigny J, Côté YP y Beaudoin AR. Purification of pancreas type-I ATP diphosphohydrolase and identification by affinity labelling with the 5'-p-fluorosulphonylbenzoyl-adenosine ATP analogue. *Biochem J.* 1995, Dec 1, 312 (Pt 2):351-6.

Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H y Robson SC. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood.* 2002, Apr 15, 99 (8):2801-9.

Shah U y Hodgson R. Recent progress in the discovery of adenosine A (2A) receptor antagonists for the treatment of Parkinson's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2010, Jul, 13 (4):466-80.

Sherpa T, Fimbel SM, Mallory DE, Maaswinkel H, Spritzer SD, Sand JA, Li L, Hyde DR y Stenkamp DL. Ganglion cell regeneration following whole-retina destruction in zebrafish. *Dev Neurobiol.* 2008, 68: 166-181.

Shukla V, Zimmermann H, Wang L, Kettenmann H, Raab S, Hammer K, J, Robson SC y Braun N. Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J Neurosci Res.* 2005, 80:600-610.

- Simoni RD, Hill RL y Vaughan M.** The determination of phosphorus and the discovery of phosphocreatine and ATP: the work of Fiske and SubbaRow. *J Biol Chem.* 2002, 9;277(32):21e.
- Smith TM, Lewis Carl SA y Kirley TL.** Mutagenesis of two conserved tryptophan residues of the E-type ATPases: inactivation and conversion of an ecto-apyrase to an ecto-NTPase. *Biochemistry.* 1999, May 4, 38 (18):5849-57.
- Solnica-Krezel L, Schier AF y Driever W.** Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics.* 1994;136(4):1401-20.
- Stanley JC, Markovic J, Gutknecht AM y Lozeman FJ.** Stimulation of glycogenolysis in isolated hepatocytes by adenosine and one of its analogues is inhibited by caffeine. *Biochem J.* 1987, Nov 1, 247 (3):779-83.
- Stenkamp DL y Frey RA.** Extraretinal and retinal hedgehog signaling sequentially regulate retinal differentiation in zebrafish. *Dev Biol.* 2003 Jun 15;25 8(2):349-63.
- Stenkamp DL.** Neurogenesis in the Fish Retina. *Int Rev of Cytol.* 2007, Vol. 259
- Steurmer CA, Niepemberg A y Wolburg H.** Aberrant axonal paths in regenerated goldfish retina and tectum opticum following intraocular injection of ouabain. *Neurosci Letters.* 1985, 58, 333-338.
- Sugioka M, Fukuda Y y Yamashita M.** Ca²⁺ responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. *J Physiol.* 1996, Jun 15, 493 (Pt 3):855-63.
- Sugioka M, Zhou WL, Hofmann HD y Yamashita M.** Involvement of P2 purinoceptors in the regulation of DNA synthesis in the neural retina of chick embryo. *Int J Dev Neurosci.* 1999, Apr, 17 (2):135-44.
- Sullivan SA, Barthel LK, Largent BL y Raymond PA.** A goldfish Notch-3 homologue is expressed in neurogenic regions of embryonic, adult, and regenerating brain and retina. *Dev Genet.* 1997, 20: 208-23.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR y van der Kooy D.** Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000, Mar 17, 287 (5460):2032-6.
- Thummel R, Kassen SC, Enright JM, Nelson CM, Montgomery JE y Hyde DR.** Characterization of Müller glia and neuronal progenitors during adult zebrafish retinal regeneration. *Exp Eye Res.* 2008, 87:433-444.
- Turner DL, Snyder EY y Cepko CL.** Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron.* 1990, Jun, 4 (6):833-45.
- Turner DL y Cepko CL.** A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature.* 1987, Jul 9-15, 328 (6126):131-6.
- Verderioa C y Matteolia M.** ATP in neuron-glia bidirectional signalling. *Brain Res Rev.* 2011, Jan 7, 66 (1-2):106-14.
- Vlajkovic SM, Thorne PR, Sévigny J, Robson SC y Housley GD.** NTPDase1 and NTPDase2 immunolocalization in mouse cochlea: implications for regulation of P2 receptor signaling. *J Histochem Cytochem.* 2002, 50:1435-1442.
- Vihtelic TS y Hyde DR.** Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *J Neurobiol.* 2000, 44(3):289-307.

- Volonté C, Amadio S, D'Ambrosi N, Colpi M y Burnstock G.** P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther.* 2006 Oct;112(1):264-80.
- von Kugelgen I y Wetter A.** Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000, 362:310-23.
- Wang TFy Guidotti G.** Widespread expression of ecto-apyrase (CD39) in the central nervous system. *Brain Res.* 1998, 790:318-322.
- Wang L, Karlsson L, Moses S, Hultgårdh-Nilsson A, Andersson M, Borna C, Gudbjartsson T, Jern S y Erlinge D.** P2 Receptor Expression Profiles in Human Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002, 40: 841–853.
- Wässle H.** *Nat Rev Neurosci.* Parallel processing in the mammalian retina. 2004. Oct; 5 (10):747-57.
- Wässle H y Riemann HJ.** The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1978, Mar 22; 200 (1141):441-61.
- Wawersik S y Maas RL.** Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Hum Mol Genet.* 2000, 9 (6):917-925.
- Weick M, Wiedemann P, Reichenbach A y Bringmann A.** Resensitization of P2Y receptors by growth factor-mediated activation of the phosphatidylinositol-3 kinase in retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005, Apr, 46 (4):1525-32.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC y Kriegstein AR.** Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron.* 2004 Sep 2;43(5):647-61.
- Wetts R y Fraser SE.** Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science.* 1988, Mar 4, 239 (4844):1142-5.
- Wheeler-Schilling TH, Marquardt K, Kohler K, Jabs R y Guenther E.** Expression of purinergic receptors in bipolar cells of the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000, Mar 29, 76 (2):415-8.
- Wheeler-Schilling TH, Marquardt K, Kohler K, Guenther E y Jabs R.** Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001, Aug 15, 92 (1-2):177-80.
- Wu D, Schneiderman T, Burgett J, Gokhale P, Barthel L y Raymond P.** Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001, 42, 2115–2124.
- Yurco P y Cameron DA.** Responses of Müller glia to retinal injury in adult zebrafish. *Vis Res.* 2005, Apr, 45 (8):991-1002.
- Zhang M, Budak MT, Lu W, Khurana TS, Zhang X, Laties AM y Mitchell CH.** Identification of the A3 adenosine receptor in rat retinal ganglion cells. *Mol Vis.* 2006, Aug 16, 12:937-48.
- Zhang X, Zhang M, Laties AM y Mitchell CH.** Balance of purines may determine life or death of retinal ganglion cells as A3 adenosine receptors prevent loss following P2X7 receptor stimulation. *J Neurochem.* 2006b, 98: 566-575.
- Zhang X, Chen Y, Wang C y Huang LY.** Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, Jun 5, 104 (23):9864-9.

Zhao XF, Ellingsen S, Fjose A. Labelling and targeted ablation of specific bipolar cell types in the zebrafish retina. *BMC Neurosci.* 2009, 10:107.

Ziganshin AU, Hoyle CH, Ziganshina LE y Burnstock G. Effects of cyclopiazonic acid on contractility and ecto-ATPase activity in guinea-pig urinary bladder and vas deferens. *Br J Pharmacol.* 1994, Nov, 113 (3):669-74.

Zimmermann H y Braun N. Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res.* 1999, 120:371-85.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drugs Dev Res.* 2001, 52:44-56.

Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp.* 2006, 276:113-128.