

Tesis Doctoral

# Rol del sistema Eph/ephrinas en el desarrollo del sistema nervioso central y su posible utilidad en estrategias de regeneración de las conexiones topográficamente ordenadas

Di Napoli, Jennifer

2016-04-08

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Di Napoli, Jennifer. (2016-04-08). Rol del sistema Eph/ephrinas en el desarrollo del sistema nervioso central y su posible utilidad en estrategias de regeneración de las conexiones topográficamente ordenadas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Di Napoli, Jennifer. "Rol del sistema Eph/ephrinas en el desarrollo del sistema nervioso central y su posible utilidad en estrategias de regeneración de las conexiones topográficamente ordenadas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-04-08.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Rol del sistema Eph/ephrinas en el desarrollo del sistema nervioso central y su posible utilidad en estrategias de regeneración de las conexiones topográficamente ordenadas.**

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

Licenciada Jennifer Di Napoli

Directores de Tesis: Dr. Gabriel E. Scicolone

Dr. Néstor G. Carri

Consejera de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. E. De Robertis" (UBA-CONICET), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2015

Fecha de Defensa: 8 de abril de 2016

## **Rol del sistema Eph/ephrinas en el desarrollo del sistema nervioso central y su posible utilidad en estrategias de regeneración de las conexiones topográficamente ordenadas.**

### Resumen

El objetivo central de este trabajo es estudiar los mecanismos moleculares que regulan la potencialidad evolutiva de las células madre/progenitoras de la retina, haciendo hincapié en el rol del sistema Eph/ephrinas. Se pretende que los hallazgos de este trabajo aporten: a) conocimientos básicos sobre los mecanismos celulares y moleculares del desarrollo del SNC y del sistema visual y b) conocimientos que sirvan de base para el diseño de estrategias de terapias regenerativas en la retina.

Para tal efecto se emplea el sistema retinotectal del embrión de pollo como modelo experimental. El principal nicho de células madre/progenitoras de la retina reside en un anillo tisular que rodea a la retina llamado margen ciliar (MC). Éste contiene a las células madre/progenitoras del cuerpo ciliar (CC) y las células madre/progenitoras localizadas en la zona marginal ciliar (ZMC). Esta zona provee células retinianas durante la vida postnatal en peces y anfibios, permitiendo el crecimiento de la retina y su regeneración. Las aves y los mamíferos en cambio, pierden esta capacidad regenerativa. En aves, donde el crecimiento retiniano se produce durante el desarrollo, un pequeño MC persiste postnatalmente pero carece de la potencialidad evolutiva para aportar todos los tipos celulares de la retina.

Las células madre/progenitoras del MC son capaces de 1) proliferar *in vitro* formando neuroesferas ó 2) de proliferar *in vivo* al ser estimuladas formando nueva retina neural. Sin embargo, se ha mostrado que no todas las células madre “son iguales” y que varían en su potencialidad evolutiva.

En el presente trabajo: 1. Se evalúa si las células madre del MC se diferencian *in vitro* en células ganglionares de la retina (CGR) que posean información posicional y que sean competentes para responder a las moléculas del sistema Eph/ephrinas que guían el crecimiento axonal durante la formación del mapa retinotectal. 2. Se investiga si las retinas regeneradas a partir del MC y de la transdiferenciación expresan las moléculas del sistema Eph/ephrinas y

presentan información posicional. 3. Se determina si la estimulación de la vía de señalización de Shh con su análogo activador SAG permite obtener retinas con regeneración completa a partir de las células madre/progenitoras del MC.

En este trabajo se han establecido las condiciones *in vitro* que permiten obtener un alto grado de diferenciación de CGR a partir de células madre provenientes del MC. Estas CGR expresan moléculas del sistema Eph/ephrinas en forma topográficamente específica y son competentes para responder a moléculas del sistema Eph/ephrinas que guían a los axones durante la formación del mapa retinotectal.

Se ha demostrado que la activación de la vía canónica de Shh con SAG induce la regeneración completa de la retina a partir de las células madre/progenitoras del MC *in vivo* y que las CGR de la misma tienen información posicional expresando el sistema Eph/ephrinas en forma de gradiente como las retinas en desarrollo. Nuestros resultados aumentan las probabilidades de obtener una eferencia que establezca conexiones topográficamente ordenadas en el tectum.

Palabras clave: sistema nervioso central, desarrollo, células madre de la retina, regeneración, neuroesferas, sistema Eph/ephrinas.

## **Role of the Eph/ephrin system in the development of the central nervous system and its possible utility in strategies to regenerate the topographic ordered connections**

### Abstract

The central aim of this work is to study the molecular mechanisms that regulate the evolutionary potential of the stem/progenitor cells of the retina, focusing on the role of the Eph/ephrin system. It is intended for the findings on this work to provide: a) basic knowledge on the cellular and molecular mechanisms of the CNS and visual system development, and b) knowledge to be used to design of regenerative therapy strategies for the retina.

For this work we used the chick embryo retinotectal system is used as experimental model. The retina stem/progenitor cell niche resides in a ring around the retina called the ciliary margin (CM), which holds the stem/progenitor cells of the ciliary body (CB) and of the ciliary margin zone (CMZ). This zone provides retinal cells during the postnatal life in fish and amphibians, allowing for retinal growth and regeneration. However, avian and mammals have lost this regenerative capability. In avian, where retina growing takes place during development, a small CM persists postnatally, but it lacks of potential to generate all the cellular types of retina.

The stem/progenitor cells of the CM are capable of 1) proliferating *in vitro* forming neurospheres, or 2) proliferating *in vivo* when stimulated forming new neural retina. However, it has been shown that not all the stem cells are 'equal' and that they vary in their evolutionary potentiality.

In the present work: 1. Stem/progenitor cells of the CM are evaluated for their differentiation potential *in vitro* into retinal ganglion cells (RGC) which have positional information and are competent to respond to molecules of the Eph/ephrin system which guides axonal growth during the retinotectal map formation. 2. The expression patterns of Eph/ephrin and their positional information are studied during retina regeneration initiated from the CM and from retinal pigmented epithelium (RPE) transdifferentiation. 3. The sonic hedgehog (Shh) pathway and its analog activator SAG are evaluated for their

potential to induce complete retina regeneration from the stem/progenitor cells of the CM.

In this work we defined *in vitro* conditions that optimized for a high degree of RGC differentiation from the stem/progenitor cells present in the CM. These RGCs express molecules of the Eph/ephrin system in a topographic specific way and respond to the cues that guide the axons during the formation of the retinotectal map.

We also show that activating the Shh canonical with SAG induces the complete retina regeneration from the CM stem/progenitor cells *in vivo* and that the RGCs from this regenerated retina have the same positional information expressing the Eph/ephrin system in a gradient form just as the retinas during development. Our results increase the probability of obtaining an efference that establishes a topographic order of connections in the tectum.

Key words: central nervous system, development, retinal stem cells, regeneration, neurospheres, Eph/ephrin system.

## Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mi director de tesis Gabriel Scicolone, quien además de enseñarme y guiarme durante todo el trabajo me ayudó a crecer como persona e investigadora.

A mi codirector Nestor Carri. Gracias por todo lo que me enseñaste y alentaste en nuestro camino juntos.

A todos los miembros del laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, especialmente a Viviana Sánchez, a “Rebeca” Teruel, a Ana Ortalli, a Cindy, Mara y Luana. Pero especialmente agradezco a mi gran amigo Luciano Fiore, gracias Lulu porque en vos no sólo encontré un gran compañero sino que a mi hermanito del alma.

Al grupo de trabajo de Katia Del Río-Tsonis. Gracias Katia por el tiempo que dedicaste a enseñarme todo sobre la regeneración y haberme dado una cálida estadía en tu laboratorio. Especialmente quiero agradecer a mi otra hermanita del alma Nancy por toda su ayuda y su apoyo, de USA no sólo me llevé conocimiento sino que más que una amistad.

A todo el IBCN, a mi Facultad y a CONICET, por haberme instruído y alentado a hacer esta hermosa carrera.

A la IBRO, por las becas concedidas para mi estadía en USA y para los cursos realizados.

A todos mis profesores de la Facultad y externos por haberme enseñado y hecho disfrutar tanto esta carrera.

Sobre todo a mi mamá y a mi papá! Gracias no sólo por haberme dado la vida, sino por haber estado y estar al lado mío siempre. Gracias por guiarme, apoyarme, enseñarme, bancarme...pero sobre todas las cosas gracias por amarme tanto. Sin ustedes hoy no sería la persona que soy...sin ustedes no sería tan feliz. Los amo!

A mis hermanas...qué les puedo decir que ya no sepan? Gracias por ser las mejores hermanas y amigas que me dio la vida. Gracias por tanto apoyo, por estar conmigo en cada momento, siempre asegurándose de que sea feliz. Las amo!

A mis cuñados, que son mis hermanos de la vida, gracias por cuidarme, por apoyarme y por haberme dado junto a mis hermanas a las 6 personitas que tanto amo: Alec, Matías, Delfina, Lourdes, Santiago e Ignacio.

A Luciano, mi amor, gracias por haberme acompañado tanto en la carrera como en el doctorado. Gracias por haberte bancado tantos momentos difíciles, pero sobre todo gracias por tantos momentos felices y llenos de amor. Te amo mapachito!

Y por último, gracias a mis amigas, quienes siempre están a mi lado tanto en los buenos como en los malos momentos. Las adoro!

Este trabajo fue realizado con subsidios de la Universidad de Buenos Aires y del CONICET.



Dedicatoria

A mis padres

Índice	Página
Portada	1
Resumen en castellano	2
Resumen en inglés	4
Agradecimientos	6
Dedicatoria	8
Índice general	9
Índice de figuras	12
Índice de abreviaturas	16
Introducción	18
Desarrollo morfológico del SNC	23
Sistema retinotectal	24
Desarrollo morfológico de la retina	24
Estructura de la retina	28
Desarrollo del tectum	29
Estructura del tectum	30
Desarrollo de conexiones nerviosas	31
Crecimiento y guía axonal	32
Mapas neuronales	34
Mapa retinotectal	35
Moléculas de guía axonal	36
Sistema Eph/ephrinas	37
Rol del sistema Eph/ephrinas en la guía axonal y en la formación de las conexiones retinotectales	39
Regeneración de la retina	43
Mecanismos celulares de regeneración de la retina	47
Regeneración a partir de células madre/progenitoras	47

Regeneración por transdiferenciación del epitelio pigmentario de la retina	47
Moléculas inductoras de regeneración de la retina	48
Regeneración inducida por Shh y FGF2	48
Regeneración inducida por la vía de señalización de BMP	51
Regeneración inducida por C3a	51
Regeneración inducida por $\beta$ -catenina	52
Objetivos	55
Materiales y Métodos	56
Resultados	70
Determinación y diferenciación neuronal de células progenitoras provenientes del MC. Estudios in vitro	71
Producción y expansión de neuroesferas obtenidas a partir del MC de la retina de embriones de pollo	72
Diferenciación de CGR a partir de células madre/progenitoras expandidas en neuroesferas	74
Estudio de la expresión del sistema EphA/ephrinas-A	80
Respuesta ante estímulos de crecimiento axonal	88
Regeneración in vivo	93
Expresión del sistema Eph/ephrinas en retinas regeneradas a partir del MC y de la transdiferenciación del EP	96
Expresión del Sistema EphA/ephrinas-A	98
Expresión del Sistema EphB/ephrinas-B	102
Regeneración retiniana con distintos estímulos: evaluación de la eficacia para obtener regeneración a partir de las células madre/progenitoras del MC	113

Expresión de ephrina-B2 en embrión E4D7 tratado con SAG 10 $\mu$ M	127
Discusión y Conclusiones	130
Determinación y diferenciación neuronal de células progenitoras provenientes del MC. Estudios in vitro	131
Regeneración in vivo	135
Expresión del sistema Eph/ephrinas en retinas regeneradas a partir del MC y de la transdiferenciación del EP	137
Regeneración retiniana con distintos estímulos: evaluación de la eficacia para obtener regeneración a partir de las células madre/progenitoras del MC	138
Conclusiones finales y perspectivas futuras	140
Bibliografía	142

## Índice de figuras

Figura R1. Neuroesfera en flotación obtenida a partir del MC de la retina de pollo de embriones de E7.

Figura R2. Fotografías de microscopía confocal de dos neuroesferas formadas por células obtenidas del MC

Figura R3. Fotografías de microscopía confocal de dos neuroesferas formadas por células obtenidas del MC.

Figura R4. Reconstrucción de una neuroesfera en condiciones de diferenciación, en la que se observa el tamaño de la neuroesfera y la cantidad y longitud de los axones.

Figura R5. Porcentaje de neuroesferas cultivadas en condiciones de diferenciación que presentan axones.

Figura R6. Medición de la densidad axonal en neuroesferas.

Figura R7. Medición de la longitud axonal en neuroesferas.

Figura R8. Expresión de Eph A3 en neuroesferas que presentan diferenciación de CGR.

Figura R9. Expresión de Eph A3 en axones de neuroesferas en diferenciación.

Figura R10. Expresión de ephrina-A2 en neuroesferas que presentan diferenciación de CGR.

Figura R11. Expresión de ephrina-A2 en axones de neuroesferas en diferenciación.

Figura R12. Expresión de Eph A4 en neuroesferas que presentan diferenciación de CGR.

Figura R13. Expresión de EphA4 en axones de neuroesferas en diferenciación.

Figura R14. Microfotografía confocal de EphA4.

Figura R15. El ectodominio de EphA3 estimula in vitro el crecimiento axonal de las CGR nasal y temporal.

Figura R16. La ephrina-A2 disminuye in vitro el crecimiento axonal de las CGR T y provoca un leve aumento en la longitud de los axones de las CGR N.

Figura R17. Retinas de embriones de pollo en desarrollo (A-H) y en regeneración por efecto de FGF2 (I-N). Cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina.

Figura R18. Expresión de Eph A3 en embrión de E4D3.

Figura R19. Expresión de EphA3 en embrión de E4D7.

Figura R20. Expresión de EphA4 en embrión de E4D3.

Figura R21. Expresión de EphA4 en embrión de E4D7.

Figura R22. Expresión de ephrina-A2 en embrión de E4D3.

Figura R23. Expresión de ephrina-A2 en embrión de E4D7.

Figura R24. Expresión de ephrina-B1 en embrión de E4D3.

Figura R25. Expresión de ephrina-B1 en embrión de E4D7.

Figura R26. Expresión de ephrina-B2 en embrión de E4D3.

Figura R27. Expresión de ephrina-B2 en embrión de E4D7.

Figura R28. Expresión de EphB2 en embrión de E4D3.

Figura R29. Expresión de EphB2 en embrión de E4D7.

Figura R30. Expresión de EphB3 en embrión de E4D3.

Figura R31. Expresión de EphB3 en embrión de E4D7.

Figura R32. Vistas generales de ojos retinectomizados en E4 y fotografiados 3 días postretinectomía (E4D3) (A) y 7 días postretinectomía (E4D7) (B).

Figura R33. Regeneración de retina con FGF2.

Figura R34. Infección con RCAS-Shh.

Figura R35. Regeneración con RCAS-Shh en embrión de E4D3.

Figura R36. Regeneración con RCAS-Shh en embrión E4D7.

Figura R37. Regeneración con RCAS-Shh y FGF2 en embrión de E4D3.

Figura R38. Regeneración con RCAS-Shh y FGF2 en embrión E4D7.

Figura R39. Tratamiento con SAG 500 nM.

Figura R 40. Tratamiento con SAG 500 nM y FGF2 en embrión de E4D3.

Figura R41. Tratamiento con SAG 500 nM y FGF2 en embrión E4D7.

Figura R42. Tratamiento con SAG 5  $\mu$ M.

Figura R43. Tratamiento con SAG 5  $\mu$ M y FGF2.

Figura R44. Tratamiento con SAG 10  $\mu$ M.

Figura R45. Tratamiento con SAG 10  $\mu$ M y FGF2.

Figura R46. Expresión de ephrina-B2 en embrión E4D7 tratado con SAG 10 $\mu$ M.



## Índice de abreviaturas

3dPR: 3 días post-retinectomía

7dPR: 7 días post-retinectomía

BMP: Bone morphogenic protein

C3a: Complemento 3a

C5a: Complemento 5a

CC: Cuerpo ciliar

CGR: Células ganglionares de la retina

CNE: Capa nuclear externa

CNI: Capa nuclear interna

CPE: Capa plexiforme externa

CPI: Capa plexiforme interna

E4D3: embrión de 3dPR

E4D7: embrión de 7dPR

EGFP: Proteína verde fluorescente

Ep: Epitelio endotelial

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

Fc: Fragmento C de inmunoglobulinas

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico-2

GEFs: Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina.

GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol

HH: Estadío de Hamburger y Hamilton

IgG: Inmunoglobulina G

IL-6: Interleuquina-6

MAPK: Quinasas activadas por mitógenos

MC: Margen ciliar

N: Nasal

RCAS-EGFP: Replication-Competent ASLVirus con inserto de EGFP

RCAS-Shh: Replication-Competent ASLVirus con inserto de Shh

RGM: Repulsive guidance molecule

SAC: Stratum album centrale

SAG: Smoothed agonist

SFP: Stratum fibrosum periventriculare

SGC: Stratum griseum centrale  
SGFS: Stratum griseum et fibrosum superficiale  
SGP: Stratum griseum periventriculare  
Shh: Sonic hedgehog  
SNC: Sistema nervioso central  
SNCA: Suero normal de cabra  
SNP: Sistema nervioso periférico  
SO: Stratum opticum  
T: Temporal  
Tr: Transdiferenciación  
TO: Tectum óptico  
ZMC: Zona Marginal Ciliar  
ZT: Zona de terminación

# Introducción

Las células madre exhiben dos características definidas, la capacidad de auto-renovarse indefinidamente por proliferación y de generar células especializadas a través del proceso de diferenciación. Las células madre participan en el mantenimiento de los tejidos sirviendo de reservorio celular y soporte trófico, constituyendo la fuente de los procesos regenerativos (Yu y col., 2008). El sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados superiores mantiene una limitada capacidad regenerativa, y el descubrimiento de que el mismo conserva un número limitado de células madre en nichos selectivos (Ihrie y col., 2011), ha abierto las puertas para la planificación de terapias de regeneración en enfermedades degenerativas o lesiones traumáticas con el objeto de repoblar las células perdidas, reestablecer los circuitos neuronales y restituir la función perdida (Aboody y col., 2011; Yu y col., 2008). Este enfoque puede ejecutarse mediante dos estrategias: a) la manipulación de las células madre *in vitro* para realizar implantes o b) la estimulación y atracción *in vivo* de células madre residentes en nichos celulares para reparar zonas dañadas. Para esto es necesario conocer los mecanismos de regulación del ciclo celular que posibiliten activar de su estado quiescente a las células madre e inducir su proliferación y posterior diferenciación en el tipo celular requerido que reestablezca las conexiones neuronales que permitan recuperar la función perdida (Aboody y col., 2011).

La retina es una parte del SNC que ofrece algunas ventajas para el estudio de la biología de las células madre y su empleo en terapias de regeneración. Así, la retina es un órgano de fácil acceso en el cual residen células madre/progenitoras multipotentes (Moshiri y col., 2004) a partir de las cuales se determinan y diferencian células gliales y neuronas. Éstas incluyen neuronas de circuito local y las células ganglionares de la retina (CGR), que establecen conexiones retinotópicas en el tectum o el núcleo geniculado lateral. Estas células madre/progenitoras están siendo estudiadas para tratar patologías como el glaucoma y algunas degeneraciones vítreoretinianas que producen degeneración de las CGR y del nervio óptico, o la degeneración macular y la retinitis pigmentaria que producen la pérdida progresiva de fotorreceptores y células del epitelio pigmentario (Locker y col., 2010; Yu y col., 2008).

El principal nicho de células madre/progenitoras de la retina reside en un anillo alrededor de la retina llamado margen ciliar (MC), que contiene a las células

madre/progenitoras del cuerpo ciliar (CC) de la retina y las células madre/progenitoras localizadas en la zona marginal ciliar (ZMC). Esta zona provee células retinianas durante la vida posnatal en peces y anfibios, permitiendo el crecimiento retiniano y su regeneración. En aves, donde el crecimiento retiniano se produce durante el desarrollo, un pequeño MC persiste pero carece de la potencialidad evolutiva para aportar todos los tipos celulares de la retina (Moshiri y col., 2004; Reh y col., 2006). En mamíferos, la ZMC no fue detectada postnatalmente, pero se han detectado células madre/progenitoras en el epitelio de los cuerpos ciliares. También pueden funcionar como fuente de células madre/progenitoras, las células del epitelio pigmentario del iris y las células de Müller (Locker y col., 2010; Moshiri y col., 2004; Reh y col., 2006).

Las células madre/progenitoras del MC son capaces de 1) proliferar *in vitro* formando neuroesferas (Locker y col., 2010) ó 2) de proliferar *in vivo* al ser estimuladas formando nueva retina neural. Sin embargo, se ha mostrado que no todas las células madre “son iguales” y que varían en su potencialidad evolutiva (Irimia y col., 2011).\* (ver nota al pie).

**En este trabajo se emplea a las células madre/progenitoras del MC como modelo experimental para obtener conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo del SNC y como potencial fuente de terapéutica regenerativa.**

Las células madre/progenitoras del MC del embrión de pollo tienen la capacidad de dar origen a todos los tipos neuronales de la retina. Sin embargo,

\* Clásicamente se define como células madres a aquellas que exhiben dos características definidas, la capacidad de auto-renovarse indefinidamente por proliferación y de generar células especializadas a través del proceso de diferenciación. Las células progenitoras, en cambio, se expanden por proliferación y terminan generando células especializadas por diferenciación sin mantener la capacidad de autorrenovarse (Yu y col., 2008, Azari et al., 2011, Louis et al, 2008). Como: a) por los métodos empleados en este trabajo no se puede tener certeza de la proporción de células madres y células progenitoras que participan de los eventos celulares y moleculares evaluados (Azari et al., 2011, Louis et al, 2008), pero como b) la obtención de CGR a partir de células madres o progenitoras tiene el mismo valor práctico para poder emplear estas células como fuentes de trasplante intrarretinianos; de forma práctica se utilizarán indiferentemente los términos células madre/progenitoras, células madres y células progenitoras.

postnatalmente estas células madre no conservan la capacidad para aportar todos los tipos celulares de la retina. Así, el MC de pollo sólo puede generar células bipolares y amácrinas postnatalmente (Reh y col., 2006). Sin embargo, Fisher y col. (2002) demostraron que la combinación *in vivo* de insulina y factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) estimula la producción de CGR, sugiriendo que los tipos celulares producidos por el MC de las aves adultas están limitados por el microambiente más que por limitaciones celulares intrínsecas que restringen su multipotencialidad.

*In vivo* la regeneración de la retina de embriones de pollo puede darse en un estrecho margen temporal (durante el día 4 de desarrollo –E4-) por proliferación y diferenciación de las células madre/progenitoras del MC o a través de la transdiferenciación de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Se ha demostrado que luego de una retinectomía (remoción de la retina) puede inducirse regeneración de porciones parciales de retina a partir del MC y de la transdiferenciación del EPR mediante la estimulación con: FGF2, Sonic hedgehog (Shh), proteína morfogenética del hueso (BMP), moléculas inflamatorias como complemento 3a (C3a), complemento 5a (C5a) e interleuquina-6 (IL-6), y también mediante la inhibición de la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina/TCF/Lef1 (Spence y col., 2004; Haynes y col., 2004; Haynes y col., 2007; Spence y col., 2007; Haynes y col., 2013; Zhu y col., 2014). La regeneración por transdiferenciación da una retina de eje radial invertido y sin epitelio pigmentario, mientras que la regeneración a partir del MC da una retina de orientación normal (Spence y col., 2004). En ninguno de estos casos sin embargo, se ha logrado una retina completa que produzca una eferencia que pueda establecer conexiones con su órgano blanco, el tectum.

Durante el desarrollo normal, el establecimiento de las conexiones topográficamente ordenadas entre la retina y el tectum, depende de moléculas de guía axonal, entre las cuales la familia de receptores tirosinquinasa Eph y sus ligandos, las ephrinas, cumplen un rol central (Feldheim y O'Leary, 2010; Scicolone y col., 2009). Por tal motivo, el estudio de la expresión y del rol de estas moléculas durante la regeneración retiniana podría tener una importancia central para definir las posibilidades de que se reestablezcan conexiones retinotópicas en el tectum, requisito para la recuperación de la función visual en estos animales.

El objetivo central de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares que regulan la potencialidad evolutiva de las células madre/progenitoras de la retina, haciendo hincapié en el rol del sistema Eph/ephrinas. Los hallazgos de este trabajo pueden aportar: a) conocimientos básicos sobre los mecanismos celulares y moleculares del desarrollo del SNC y del sistema visual y b) conocimientos que sirvan de base para el diseño de estrategias de terapias regenerativas del SNC y del sistema visual.

Específicamente, los conocimientos obtenidos pueden servir de base para:

1. Mantener poblaciones de células madre/progenitoras de la retina *in vitro*, regular su nivel de proliferación y dirigir su determinación y diferenciación hacia CGR competentes para responder a las señales de guía axonal (sistema Eph/ephrinas). Esto permitiría manipular dichas células para transplantarlas y utilizarlas como fuentes de CGR que reemplacen las poblaciones devastadas por enfermedades de origen degenerativo, cerebrovascular o traumático.
2. Obtener regeneraciones retinianas completas a partir de células madre/progenitoras del MC, que expresen información posicional a partir del sistema Eph/ephrinas y que puedan formar una eferencia que establezca conexiones topográficamente ordenadas con el tectum.

Para arribar a estos propósitos, se emplean dos estrategias experimentales:

- Estrategia experimental *in vitro* para:
  - a) Inducir la diferenciación de CGR a partir de células madre/progenitoras que proliferan en neuroesferas obtenidas del MC.
  - b) Determinar si el sistema Eph/ephrinas se expresa en neuroesferas en las cuales se induce la diferenciación de CGR.
  - c) Establecer si las CGR diferenciadas a partir de las células madre/progenitoras de las neuroesferas expresan el sistema Eph/ephrinas y son competentes para responder a moléculas de este sistema, que es el que dirige la guía axonal durante la formación del mapa de conexiones retinotectales.
- 
- Estrategia experimental *in vivo* para:

- a) Determinar si las retinas regeneradas tanto a partir de células madre/progenitoras del MC como a partir de la transdiferenciación del EPR expresan el sistema Eph/ephrinas.
  
- b) Inducir la regeneración de una retina completa exclusivamente a partir de células madre/progenitoras del MC.

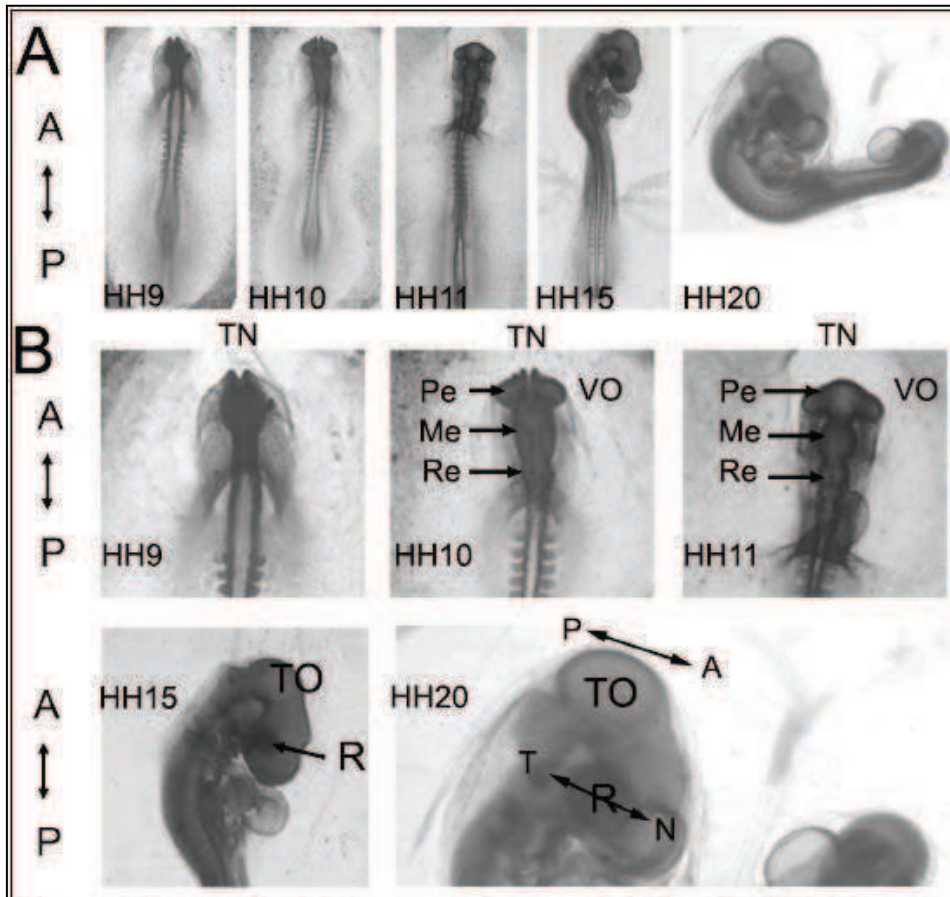
Para comprender las implicancias de este trabajo, es necesario establecer algunos conceptos específicos del tema:

### **1. Desarrollo morfológico del SNC.**

El SNC de los vertebrados se forma a partir del neuroectodermo, que al plegarse sobre sí mismo forma el tubo neural. La porción anterior del mismo aumenta de tamaño y se divide en tres vesículas: prosencéfalo (cerebro anterior), mesencéfalo (cerebro medio) y rombencéfalo (cerebro posterior) (Hamburger, y Hamilton, 1951) mientras que la porción posterior del tubo neural conserva su morfología tubular y da origen a la médula espinal.

El prosencéfalo se subdivide en las vesículas telencefálicas y en el diencefalo, mientras que el rombencéfalo se subdivide en metencéfalo y mielencéfalo. Las vesículas ópticas, precursoras de la retina neural y del epitelio pigmentario del ojo, surgen como evaginaciones bilaterales del diencefalo (Saja et al., 1992) mientras que el tectum óptico deriva de la porción dorsal del mesencéfalo (Mey y Thanos, 2000) (figura I1).





**Figura 11.** Desarrollo del sistema retino-tectal. A. Vistas panorámicas del desarrollo temprano de embriones de pollo. HH: Estadios de Hamburger y Hamilton (1951). B. Detalles de la compartimentalización cefálica del tubo neural (TN) y de la rotación de los ejes anatómicos del mismo. A: anterior; P: posterior; Pe: prosencéfalo; Me: mesencéfalo; Re: rombencéfalo; VO: vesícula óptica; TO: tectum óptico; R: retina; N: nasal; T: temporal (Extraído de Estadios de Hamburger y Hamilton, 1951).

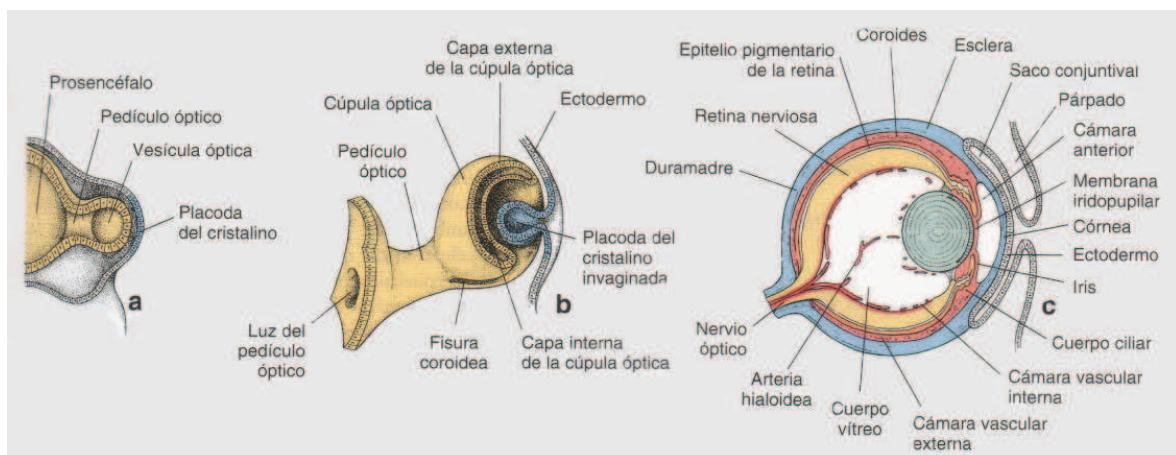
## 2. Sistema retinotectal.

### 2.1. Desarrollo morfológico de la retina.

Todo el proceso de desarrollo de la retina dura aproximadamente 3 semanas y queda esencialmente completo al momento de la eclosión. Aunque la actividad eléctrica puede registrarse por primera vez en la retina pocos días antes, puede obtenerse un retinograma maduro sólo recién el día 19 de desarrollo (E19). En ese momento, dos días antes de la eclosión, la estimulación con luz evoca movimientos del pico y de los párpados (Rager y col., 1979; Oppenheim,

1978; Rager, 1979; Rogers, 1975).

La vesícula óptica (esbozo de la retina) protruye lateralmente del prosencéfalo a las 30 horas de incubación. En el estadio HH10 (33 a 38 horas, figura I1), el esbozo de la retina se extiende hacia la epidermis lateral del embrión. Luego, sus conexiones con el tubo neural se angostan y se convierten en los tallos ópticos. Las vesículas ópticas primarias se invaginan desde los extremos laterales formando las copas ópticas o vesículas ópticas secundarias. A medida que las copas ópticas se aproximan al ectodermo epidérmico, se induce la invaginación de las placodas cristalinas (figura I2).



**Figura I2- Esquemas que ilustran el desarrollo embrionario del globo ocular.** a) Cerebro anterior y vesícula óptica. b) Cúpula óptica bilaminar y vesícula del cristalino en proceso de invaginación. c) Ojo en desarrollo (Ross y col. 2004).

La copa óptica es una estructura bilaminada. La retina neural deriva de la capa interna engrosada de la copa óptica mientras que la capa externa, en contacto con el mesénquima, origina el EPR. La pigmentación de los ojos comienza a observarse luego del día 3 (E3) (figura I1) (Hamburger y Hamilton, 1951). El humor vítreo se origina de células mesenquimáticas que migran hacia el interior de la copa óptica.

El proceso de la invaginación de la copa óptica comienza mientras las vesículas primarias en crecimiento entran en contacto con el ectodermo circundante (Patten, 1971), lo que parece desencadenar la diferenciación entre retina y EPR. En este estadio temprano, las células de las vesículas ópticas entran en fase de determinación y formarán parte del EPR o se desarrollarán

en células de la retina neural.

En la retina neural presuntiva, las células madre continúan dividiéndose después del final de la etapa de proliferación del EPR. El patrón básico de mitosis, migración radial y diferenciación se asemeja al proceso del tubo neural temprano.

En E5, se distinguen dos estratos en la retina neural, la zona de la matriz ventricular y la capa neuroblástica interna. La zona ventricular, adyacente al futuro epitelio pigmentario, contiene muchas células proliferativas. Luego de su última mitosis, los neuroblastos migran hacia el lado del humor vítreo y se diferencian en neuronas, formando así un estrato adicional, la capa del manto (Horder, y Mashkas, 1982).

### **i. Proliferación.**

Inicialmente la actividad mitótica es uniforme en toda la superficie de la retina, más tarde se desarrolla en forma de gradiente centrífugo, la actividad es mayor en el centro y hacia el lado temporal de la cisura óptica. Alrededor del día 5 la actividad mitótica se desacelera en una pequeña área central. Esta zona de baja proliferación avanza hacia la periferia hasta que en E8 la mayoría de las divisiones celulares quedan confinadas al MC, la ora serrata (Dutting, 1983; Kahn, 1973; Kahn, 1974; Meller y Tetzlaff, 1976). Solapado a la dirección de maduración centro-periferia, existe otro gradiente de temporal a nasal, de manera tal que la retina nasal continúa su crecimiento y se expande mucho más que la temporal (Rager y col., 1993).

### **ii. Migración y diferenciación.**

A medida que más células se convierten en postmitóticas, la retina pasa de una fase de proliferación a una de diferenciación. Todas las neuronas de la retina se desarrollan desde un tipo común de progenitor retiniano. Las células neuroepiteliales en división producen una serie de células que migran radialmente y que se diferencian en neuronas o glía. Los grupos radiales están acompañados por células individuales que se dispersan tangencialmente (Fekete, D.M y col., 1994). La distribución en columnas refleja el origen clonal desde los ancestros pluripotentes (Turner y Cepko, 1987).

A medida que avanza el desarrollo, disminuye el número de tipos celulares que

pueden derivar de un solo progenitor (Williams y Goldowitz, 1992). Por regla, el primer neuroblasto que se diferencia en un determinado lugar tiende a convertirse en una neurona de proyección mientras que las células vecinas que continúan dividiéndose se desarrollarán en interneuronas más pequeñas. Esto es cierto para la retina y también para el tectum. (Williams y Goldowitz, 1992).

La adquisición del destino celular estaría regulada tanto por los cambios temporales en la competencia del progenitor como por los factores ambientales que actúan sobre las células postmitóticas (Austin y col., 1995; Belliveau, y Cepko, 1999; Harris, 1997). La fecha de nacimiento de una célula, es decir, el momento de la última mitosis, influye en su identidad fenotípica hasta el punto de determinar la capacidad de la célula para responder a estímulos externos que cambian con el tiempo.

A nivel morfológico, la diferenciación neuronal se caracteriza por los movimientos migratorios del soma de la célula y el crecimiento de las neuritas. Estos procesos celulares transforman la retina del pollo de un neuroepitelio pseudoestratificado en una estructura sensorial multilaminar, cuyo patrón de estratificación queda establecido desde E16.

Las células neuroepiteliales de la retina dejan el ciclo celular en un orden específico con respecto al tipo celular prospectivo. Las primeras células en diferenciarse son las CGRs, seguidas por las neuronas horizontales, los conos fotorreceptores, luego las amácrinas, las bipolares, los bastones y las células de Müller –principal tipo celular glial de la retina- (Figura I3),(Doh y col., 2010). La producción de fotorreceptores continúa durante un período mayor (Fekete y col., 1994, Meller, 1984, Prada y col., 1991]. Si bien esta secuencia es típica, tiene mucho solapamiento, mayor aún que en las demás partes del SNC (Kahn, 1974; Meller y Tetzlaff, 1976; Prada y col., 1991; Spence, y Robson, 1989). Las CGR emiten axones que abandonan la retina formando el nervio óptico. Este tema se describe con mayor detalle en el punto 2.2 de la Introducción.

## 2.2. Estructura de la retina.

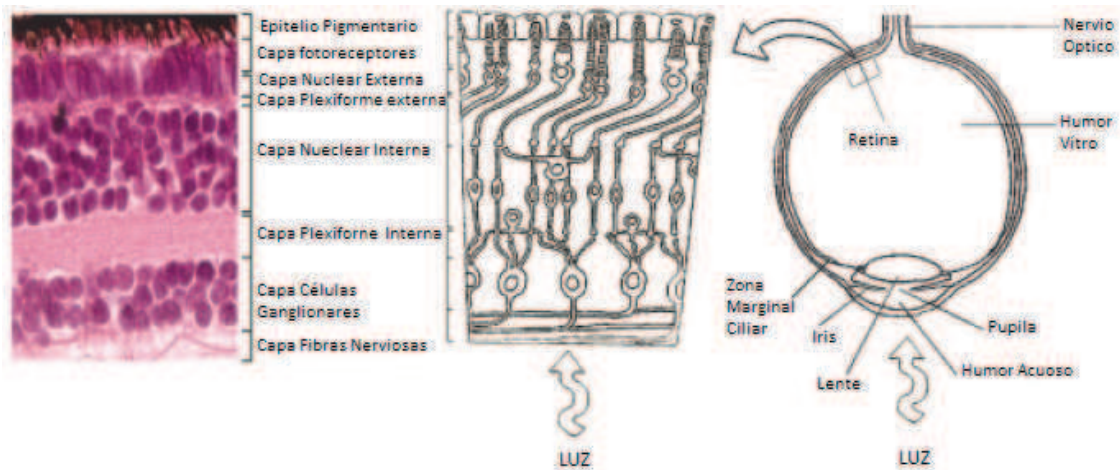
Desde la zona externa a la interna del ojo, las capas de la retina son las siguientes (figura I3):

La primera capa, el EPR, consiste en células epiteliales pigmentadas que están altamente especializadas para actuar como células de soporte para las otras células de la retina, especialmente para los fotorreceptores que se encuentran internamente a esta capa. La capa de fotorreceptores contiene los segmentos externos e internos de los conos y los bastones. Los núcleos de estos fotorreceptores (conos y bastones) residen en la capa nuclear externa (CNE) y sus axones en la capa plexiforme externa (CPE). La capa nuclear interna (CNI) contiene los núcleos de las células bipolares, las células horizontales, las células gliales de Müller, y la mayoría de las células amácrinas. Entre ambas capas nucleares se encuentra la capa plexiforme externa (CPE) que contiene a las prolongaciones de los fotorreceptores, neuronas horizontales, bipolares y de las células de Müller. En ella se establecen las conexiones sinápticas entre los fotorreceptores, las neuronas bipolares y las horizontales. Las prolongaciones externas de las células de Müller forman la limitante externa entre la capa de fotorreceptores y la CNE. La capa plexiforme interna (CPI) se encuentra internamente a la CNI y contiene las prolongaciones de las neuronas bipolares, amácrinas, las CGR y las células de Müller. En esta capa se establecen las conexiones sinápticas entre las neuronas bipolares, amácrinas y las CGR. La capa de CGR se encuentra internamente a la CPI y contiene los cuerpos celulares de las CGR así como células amácrinas desplazadas. Las dendritas de las CGR se extienden hacia la CPI, mientras que sus axones se extienden en la dirección opuesta para formar la capa de fibras nerviosas que finalmente formarán el nervio óptico. La capa limitante interna está formada por las prolongaciones internas de las células radiales de Müller y una lámina basal. Ésta separa a la retina neural del humor vítreo.

El principal nicho de células madre/progenitoras reside en un anillo alrededor de la retina llamado MC, que contiene a las células madre/progenitoras del CC de la retina y las células madre/progenitoras localizadas en la ZMC. Esta zona provee células retinianas durante la vida posnatal en peces y anfibios, permitiendo el crecimiento retiniano y su regeneración. En aves, donde el



crecimiento retiniano se produce durante el desarrollo, un pequeño MC persiste pero carece de la potencialidad evolutiva para aportar todos los tipos celulares de la retina (Fisher y Reh, 2000; Reh y Fisher, 2001).



**Figura I3.** Representación de la estructura de la retina de vertebrados. Todas las capas retinianas están representadas en la ilustración y corresponden a las capas de la sección adyacente de un ojo. (Modificado de Katia del Río Tsonis y Panagiotis Tsonis, 2003).

### 2.3. Desarrollo del tectum.

Como ocurre en la gran mayoría de las estructuras del SNC, el desarrollo del TO puede ser representado por la sucesión de cuatro fases superpuestas: proliferación; migración y diferenciación de los neuroblastos; crecimiento de prolongaciones y sinaptogénesis; muerte celular y refinamiento de conexiones. Particularmente, entre E3 y E6 el tectum consiste en neuroepitelio y las primeras células diferenciadas adyacentes a la membrana limitante interna. En este período se encuentra la mayor proliferación celular y como resultado el tectum crece considerablemente en superficie aunque muy poco en espesor. A partir de E6 se desarrolla la estratificación, producida por la migración de un gran número de células diferenciadas desde el epitelio neural. Para el final de E12, los seis estratos pueden ser identificados y varias láminas de estos estratos son diferenciables. En esta fase el tectum incrementa su espesor en cuatro veces. Entre E12 y E18 se completa la diferenciación citoarquitectónica en todo el tectum, debido al crecimiento y extensión de prolongaciones de las

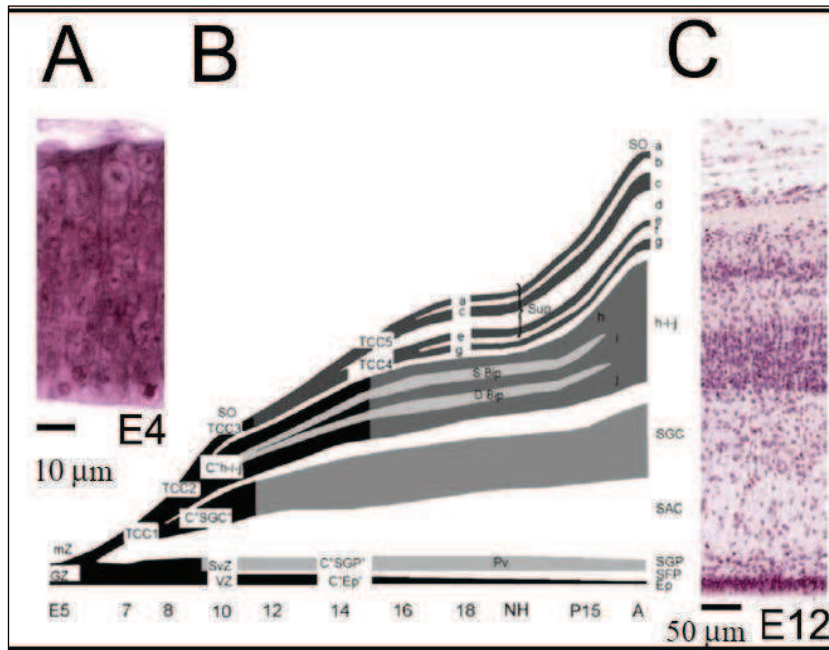
neuronas en cada lámina (LaVail y Cowan, 1971a; LaVail y Cowan, 1971b; Rapacioli y col., 2012; Scicolone y col., 1995 ).

#### **2.4. Estructura del tectum.**

El tectum óptico (TO) del pollo es una estructura multilaminar bilateral ubicada en el mesencéfalo dorsal y que cumple un rol fundamental en el procesamiento de la información visual proveniente de la retina contralateral, su principal aferencia (figura I5). Su organización laminar sigue un gradiente de desarrollo que se extiende desde su extremo anterior al posterior (Mey y Thanos, 2000; LaVail y Cowan, 1971; Scicolone y col., 1995). La estructura del TO está organizada en múltiples láminas neuronales y fibrosas alternadas. De acuerdo a la nomenclatura más aceptada, las láminas se denominan desde la superficie pial al ventrículo: stratum opticum (SO), stratum griseum et fibrosum superficiale (SGFS), stratum griseum centrale (SGC), stratum album centrale (SAC), stratum griseum periventriculare (SGP), stratum fibrosum periventriculare (SFP) y epitelio endimario (Ep) (Cowan y col., 1961).

El SO es una gruesa capa fibrosa subpial compuesta por los axones de las CGR del ojo contralateral. El SGC está poblado por neuronas multipolares grandes, cuyos axones forman parte del SAC y constituyen la principal eferencia tectal. Interpuesto entre el SO y el SGC se encuentra un complejo circuito local compuesto por neuronas intrínsecas organizadas como una estructura concéntrica multilaminar, el SGFS, subdividido en diez láminas designadas con las letras "a" a "j" (figura I4).

Los axones de las CGR contralateral invaden el tectum siguiendo su gradiente de desarrollo arquitectural rostrocaudal y establecen conexiones topográficamente ordenadas a lo largo de los ejes antero-posterior y ventro-dorsal en las láminas superficiales del SGFS (Scicolone y col., 2006; Thanos y Mey, 2001; Scicolone y col., 1995; Yamagata y Sanes, 1995).



**Figura 14.** Estructura y desarrollo del tectum óptico. A y C. Cortes histológicos de TO de embriones de pollo de 4 y 12 días. B. Esquema de la laminación del TO del pollo. (Scicolone y col, 1995).

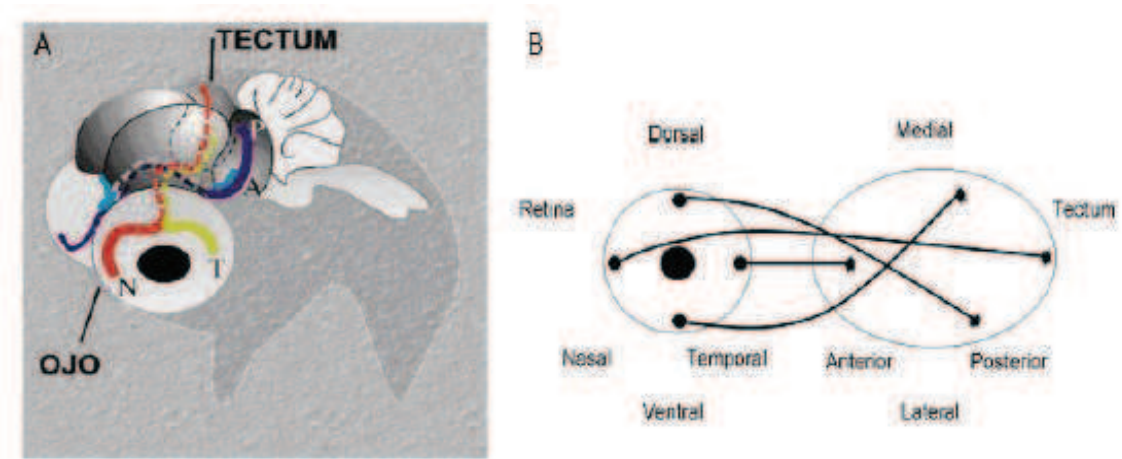
## 2.5. Desarrollo de conexiones nerviosas.

Muchas proyecciones axonales dentro del cerebro establecen un arreglo ordenado en sus campos blanco. Estos campos están organizados de tal manera que el arreglo espacial del soma es reflejado en el orden de sus terminaciones axonales. Por lo tanto, células vecinas proyectan a regiones vecinas del blanco, formando una construcción biológica continua que puede ser ilustrada como un mapa. El orden espacial de las terminaciones axonales de las CGR) en el TO está organizado en dos ejes orientados ortogonalmente (Figura 15). Las RGC nasal proyectan sus terminaciones a la región caudal (o posterior) del TO, mientras que las temporales proyectan hacia la región rostral (o anterior) del mismo. En el otro eje, las RGCs dorsales contactan con el TO ventral (o lateral) y las RGCs ventrales contactan con la parte dorsal (o medial) del mismo.

El desarrollo de estas conexiones en aves y mamíferos engloba dos etapas: la formación de un patrón básico y su refinamiento (Scicolone y col., 2009). La primera etapa es guiada por señales posicionales y en la segunda etapa predomina la competencia interaxonal mediada por la actividad del sistema en



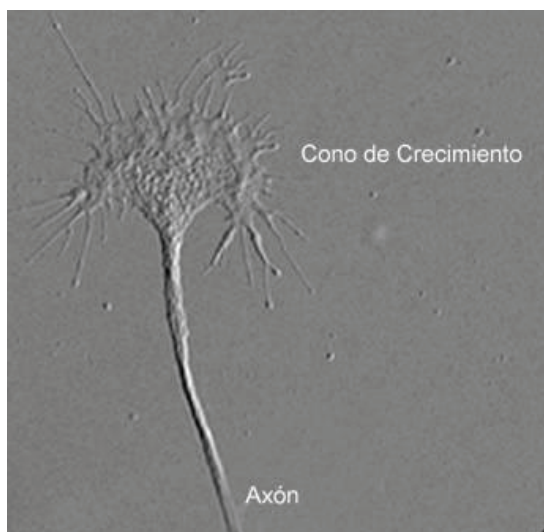
la cual participan moléculas de señalización intercelular (Scicolone y col., 2009).



**Figura 15.** Esquema de las conexiones retinotectales del pollo. A. Posición anatómica mostrando que las conexiones retinotectales son totalmente cruzadas. Rojo: axones de las CGR nasal izquierda; amarillo: axones de las CGR temporal izquierda; violeta: axones de las CGR nasal derecha; celeste: axones de las CGR temporal derecha. B. Detalle lineal de las conexiones retinotectales de un solo ojo. (Tesis Doctoral Ortalli, 2009).

## 2.6. Crecimiento y guía axonal.

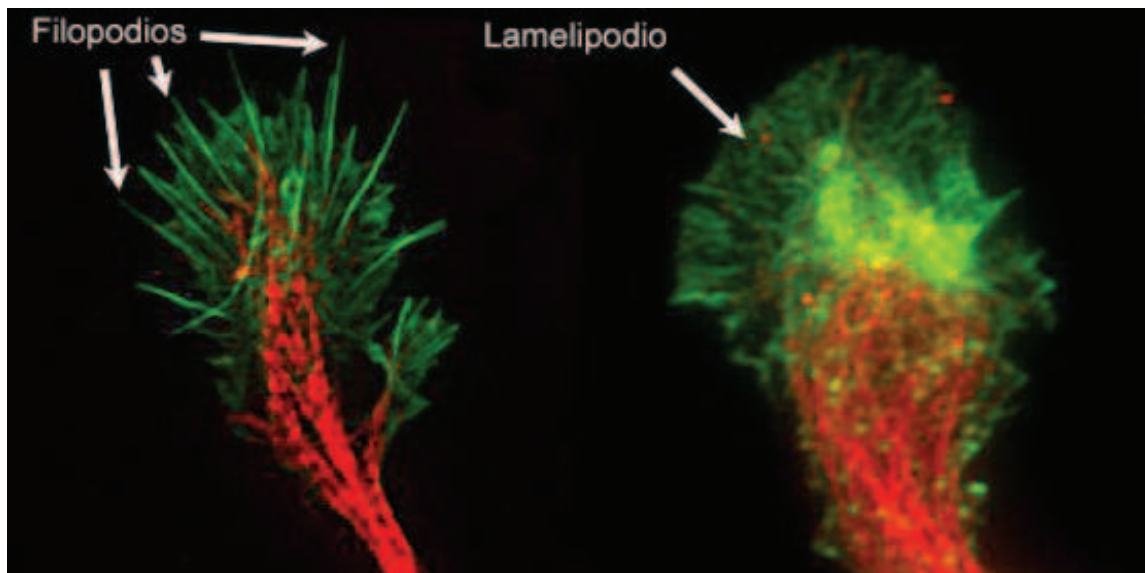
Los conos de crecimiento (Figura 16) son los extremos móviles de los axones en desarrollo. Son estructuras sensorio-motoras que guían a los axones respondiendo a un complejo patrón de señales microambientales, entre ellas, las moléculas de guía axonal. (Kalil y Dent, 2005).



**Figura 16.** Neurona en cultivo. Detalle del cono de crecimiento. (Tesis Doctoral Fiore 2014).

Estas moléculas regulan la conducta de los conos de crecimiento al estimular sus receptores, que desencadenan cascadas de señalización intracelular que regulan la dinámica de la organización de los componentes de su citoesqueleto. Los distintos tipos de movimiento del cono, tales como avance, retroceso, giro y ramificación, están mediados por la dinámica y reorganización del citoesqueleto.

Los microtúbulos ocupan la región central del cono de crecimiento mientras que los filamentos de actina están ubicados en la periferia del mismo.



**Figura 17.** Fotografía de fluorescencia de dos conos de crecimiento. Uno con filopodios y lamelipodio, y el otro con lamelipodio. Inmunocitoquímica para actina (verde) y tubulina (rojo). (Tesis Doctoral Fiore 2014).

La motilidad y guía del cono requieren de las interacciones regulatorias y estructurales entre ambos sistemas. Debido a las propiedades dinámicas del citoesqueleto, es decir, la habilidad de polimerizarse/despolimerizarse y a la capacidad del mismo de asociarse a distintas moléculas adaptadoras, permite a los conos de crecimiento adquirir una gran diversidad de formas. Se producen protrusiones de la membrana plasmática, denominadas lamelipodios y filopodios (microespículas). En los lamelipodios, estructuras en forma de velo,

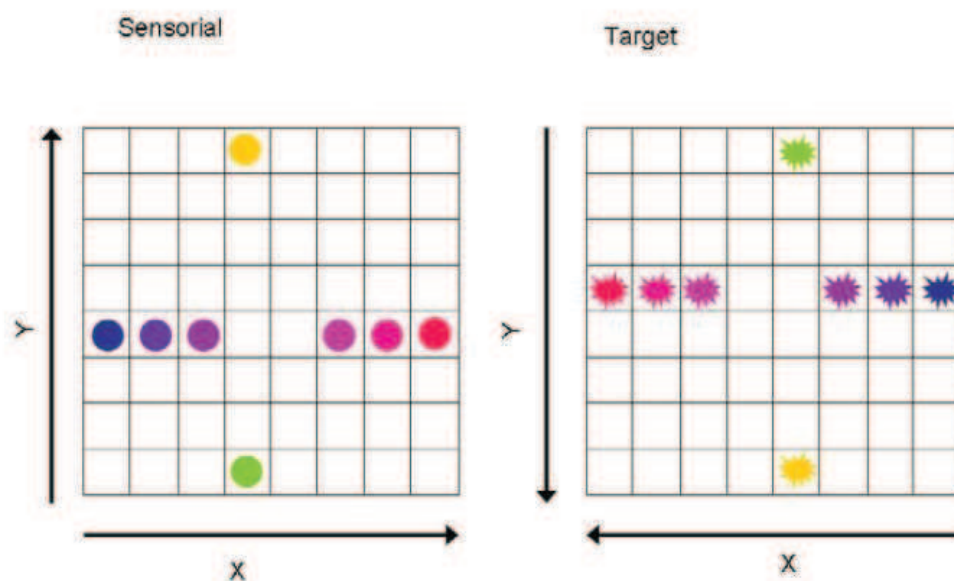
los filamentos de actina forman redes. En los filopodios, estructuras en forma de dedo, la actina forma haces paralelos (Figura I7).

### 3. Mapas neuronales.

En los animales multicelulares complejos, la conexión entre órganos distantes del sistema nervioso confiere la capacidad de coordinar las funciones de percepción y movimiento. Esta coordinación permite responder a los estímulos externos de manera adecuada, es decir, propiciando la supervivencia del animal y su descendencia.

La percepción es la transmisión de información desde los órganos receptores de estímulos externos hacia los órganos capaces de procesar e integrar esta información.

Sin embargo, los órganos receptores no captan la información en su conjunto sino en partes a través de células individuales o pequeños grupos de células. La información debe ser reconstruida en el órgano blanco y organizada de manera eficiente. Esta capacidad de reconstruir se debe a la ubicación relativa de las conexiones. Por esta razón se puede considerar que la característica más importante de esta etapa del desarrollo es la formación de los mapas neuronales, proyecciones ordenadas del órgano aferente en el órgano blanco (Figura I8).



**Figura I8.** Esquema teórico de mapas neuronales. Las figuras del mismo color

representan el soma en el órgano sensorial y la zona de conexión en el órgano blanco. (Tesis Doctoral Ortalli, 2009).

Los mapas ordenados se encuentran en muchas áreas del cerebro. En el sistema auditivo existe un mapa tonotópico en el que las neuronas del cerebro están ordenadas por tono. El mapa del sistema somato-sensorial en la corteza cerebral es uno de los más reconocidos debido a su representación gráfica, el “homunculus” (Kandel col., 2000).

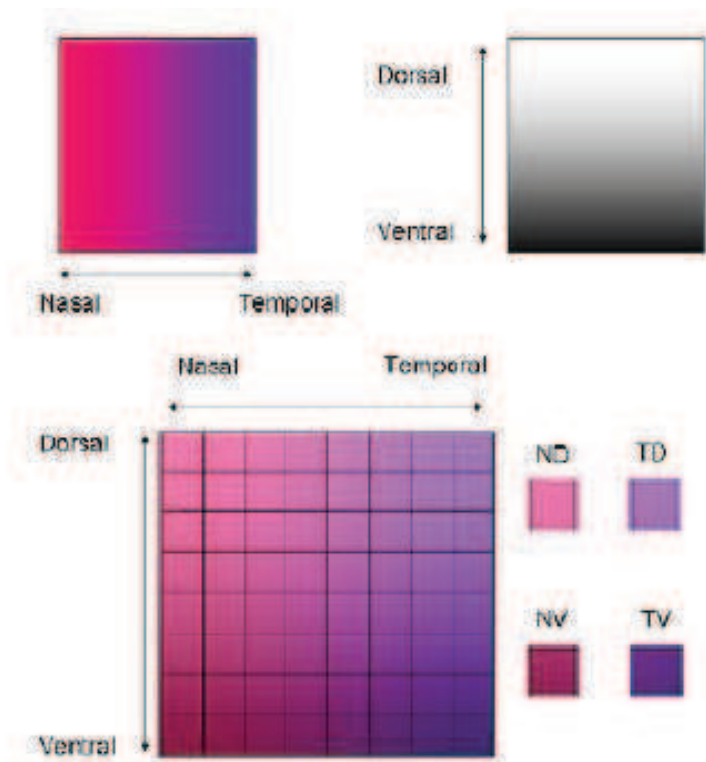
En el caso del sistema visual, existen marcadas diferencias entre los mapas retinotópicos de animales con visión monocular o binocular, estos últimos son mucho más complejos. Si bien la retina detecta intensidad de luz y colores, el cerebro debe procesar patrones y sucesiones de imágenes. Sin embargo, la proyección visual primaria formada por los axones de la retina (el colículo superior de los mamíferos y el tectum óptico de los demás vertebrados) forma mapas básicamente bidimensionales.

### **3.1. Mapa retinotectal.**

La hipótesis de la quimioafinidad, formalmente propuesta por Roger Sperry hace medio siglo, presagió el surgimiento de la era molecular en los mecanismos de desarrollo de los mapas neuronales. Sperry propuso que etiquetas moleculares en los axones y en sus células blanco determinan la especificidad de las conexiones axonales dentro del mapa neural. Más aún, sugirió que estas etiquetas moleculares estarían distribuidas en gradientes complementarios que marcarían puntos correspondientes en ambas estructuras (sensorial y blanco) (Sperry, 1963). Sobre la base de la hipótesis de la quimioafinidad, cada punto del TO tendría una etiqueta molecular única determinada por la distribución en gradiente de moléculas de guía topográfica a lo largo de los ejes tectales, y similarmente cada CGR tendría un perfil único de receptores para esas moléculas que resultaría en una respuesta diferencial y dependiente de la posición.

Esta hipótesis fue muy resistida en su momento con el argumento de que no existían genes suficientes para codificar la cantidad de moléculas necesarias para etiquetar cada punto del TO y de la retina. Sin embargo, en la retina y el tectum, dos moléculas distintas (establecidas en 2 ejes ortogonales) pueden

formar cuatro gradientes superpuestos de tal forma que cada célula presente un patrón de expresión propio (Figura I9).



**Figura I9.** Representación del efecto de dos gradientes ortogonales en la identificación de zonas en un plano. (Tesis Doctoral Ortalli, 2009).

### 3.2. Moléculas de guía axonal.

Las señales moleculares pueden ser de corto o largo alcance (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). Las de largo alcance incluyen moléculas solubles como las semaphorinas, slits, netrinas y neurotrofinas (Huber y col. 2003; Mortimer y col. 2008) mientras que las de corto alcance incluyen moléculas asociadas a la matriz extracelular como la laminina (Cohen y col., 1986; McKerracher y col., 1996) o proteoglicanos (Brittis y col., 1992; Hattori y col., 2000; Thanos y Mey, 2001) y otras asociadas a la membrana celular como las moléculas de adhesión (CAM) (Buhusi y col., 2008; Zelina y col., 2005), cadherinas (Inoue y Sanes, 1997; Takeichi, 2007) y ephrinas (McLaughlin y col., 2003b; Palmer y Klein, 2003; Scicolone y col., 2009).

Las moléculas de guía pueden ser bifuncionales dependiendo de factores tales como los receptores con los que interactúan y el estado del sistema de señalización intracelular del cono de crecimiento (Noren y Pasquale, 2004).

La capacidad de las moléculas de guía de controlar el movimiento de los conos de crecimiento les permite también delimitar una zona dentro de la que los axones establecerán sus conexiones. El conjunto de señales de una zona se puede considerar como información posicional. Las señales dinámicas de guía axonal son censadas por los conos de crecimiento a través de sus receptores. La respuesta de cada cono al conjunto de señales depende de la identidad celular, que determina el conjunto de receptores de la célula. La identidad celular depende a su vez, de la posición y momento de la mitosis que le da origen a la CGR. Por lo tanto, la ubicación final de las conexiones en el tectum dependerá de la ubicación del soma en la retina. Una vez activados los receptores axonales, éstos activan vías de señalización que incluyen miembros de la familia de Rho GTPasas (Rho, Rac1, Cdc42), proteínas de la familia de las Ras y proteínas G heterotriméricas (Dail y col., 2006; Egea y Klein, 2007; Huber y col., 2003), quinasas de la familia Src (Knoll y Drescher, 2004), quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Elowe y col., 2001; Gu y col., 2005) y quinasas de adhesión focal (FAK) (Bourgin y col., 2007; Lino y col., 2014; Marquardt y col., 2005; Miao y col., 2000; Murai y Pasquale, 2003) entre otras. Estas vías de señalización regulan la función de moléculas efectoras que modelan la morfología axonal mediante la modificación estructural del citoesqueleto, la membrana plasmática, la matriz extracelular y la adhesión de la célula (Dupraz et al., 2009; Lino et al., 2014; Scicolone et al., 2009).

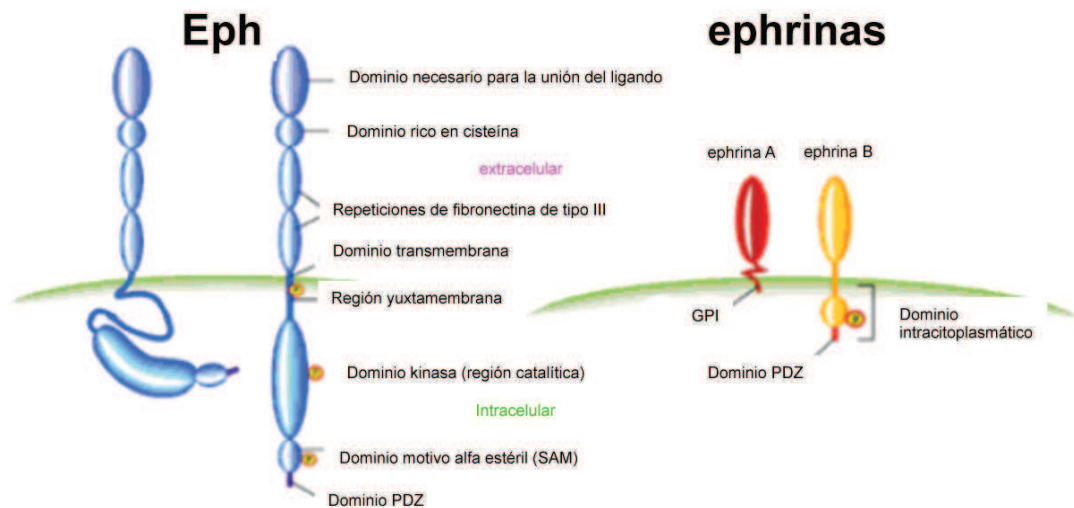
El descubrimiento de que las proteínas de membrana ephrinas se expresan en gradientes que son más elevados en el TO posterior (caudal) y disminuyen hacia anterior (rostral) sugirió que estas moléculas podrían constituir las moléculas de guía axonal en el TO.

### **3.3. Sistema Eph/ephrinas.**

La familia Eph/ephrinas se divide en dos subfamilias: EphA/ephrinas A y EphB/ephrinas B (Figura I10). Esta separación se basa en la estructura molecular de las ephrinas: las A están ancladas a la monocapa externa de la membrana plasmática por un puente de glicosil fosfatidil inositol (GPI), por lo



tanto sus dominios proteicos son sólo extracelulares; las B son proteínas de transmembrana por lo que poseen dominios extra e intracelulares y de transmembrana. Los receptores se clasifican según su afinidad por las dos clases de ephrinas -Eph Nomenclature Committee (1997)-. Las cuatro clases de moléculas actúan formando agregados de tal manera que las moléculas aisladas son inactivas (Himanen y Nikolov, 2003).



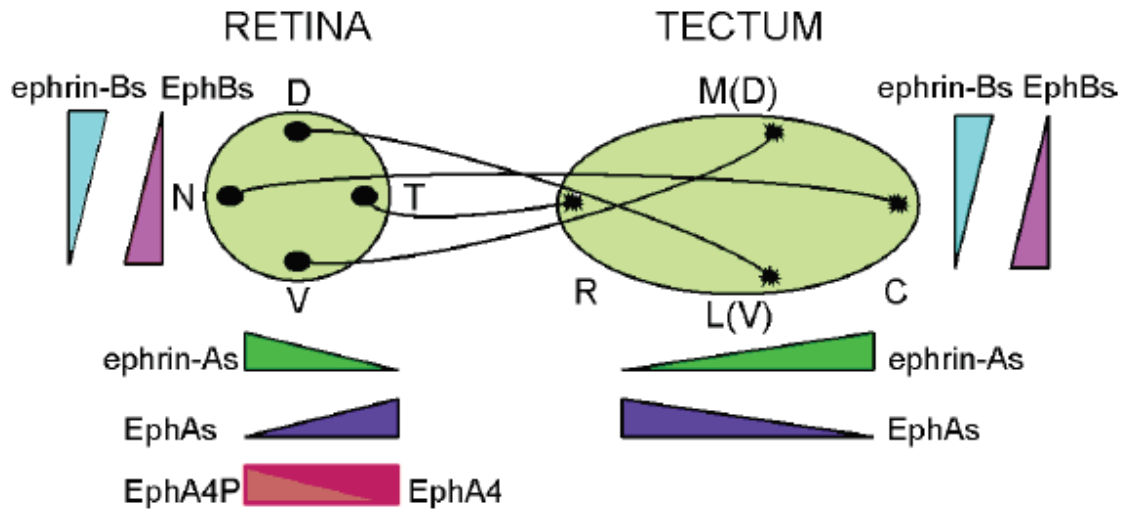
**Figura I10.** Esquema de la estructura básica del receptor Eph (inactivo a la izquierda, desfosforilado, y activo a la derecha, fosforilado) y de las ephrinas A y B. (Modificado de Himanen y Nikolov, 2003).

En el pollo se expresan las ephrinas A2; A5; A6; B1; B2; B3 y los Eph A2; A3; A4; A7; A9; B1; B2; B3 (Baker y Antin, 2003; Lisabeth y col., 2013; Pasquale, 2005). Debido a su expresión en forma de gradiente (Lisabeth y col. 2013; O'Leary y Wilkinson, 1999; Ortalli y col. 2012; Scicolone y col. 2009), estas moléculas son capaces de actuar como etiquetas posicionales de las células tanto en la retina como en el tectum (Figura I11). Al mismo tiempo están involucrados directamente en la regulación del crecimiento de los axones de las CGR (Ernst y col., 1998).

La diversidad y complejidad espacial y temporal de los patrones de expresión de los receptores tirosinquinasa Ephs y de sus ligandos, las ephrinas, y las características de sus funciones proveen un vasto arreglo de posibilidades de señalización y por lo tanto de actividad de guía axonal.

Como otras moléculas de guía, los Ephs y las ephrinas tienen actividades múltiples y muchas veces opuestas. La dominancia de uno u otro tipo de

actividad en un determinado contexto es crítico para el desarrollo de los mapas neurales.



**Figura I11.** Representación del gradiente de expresión de Eph/ephrinas en el sistema retinotectal del pollo. (Modificado Scicolone y col, 2009).

La unión a ligando es el paso crítico y punto de mayor regulación para la mayoría de los receptores tirosinquinasa (Goh y Sorkin, 2013).

La activación de estos receptores generalmente sigue un esquema común a partir de la unión del ligando. Esto inicia la reorientación y oligomerización de las cadenas de receptor, lo que permite la autofosforilación intermolecular de residuos de tirosina específicos. La fosforilación de la tirosina dentro del segmento de activación del dominio quinasa puede estimular directamente la actividad catalítica, mientras que la fosforilación de elementos no catalíticos adyacentes normalmente crea sitios de anclaje para efectores de señalización corriente abajo (Hubbard, 1999; Pawson, 1995).

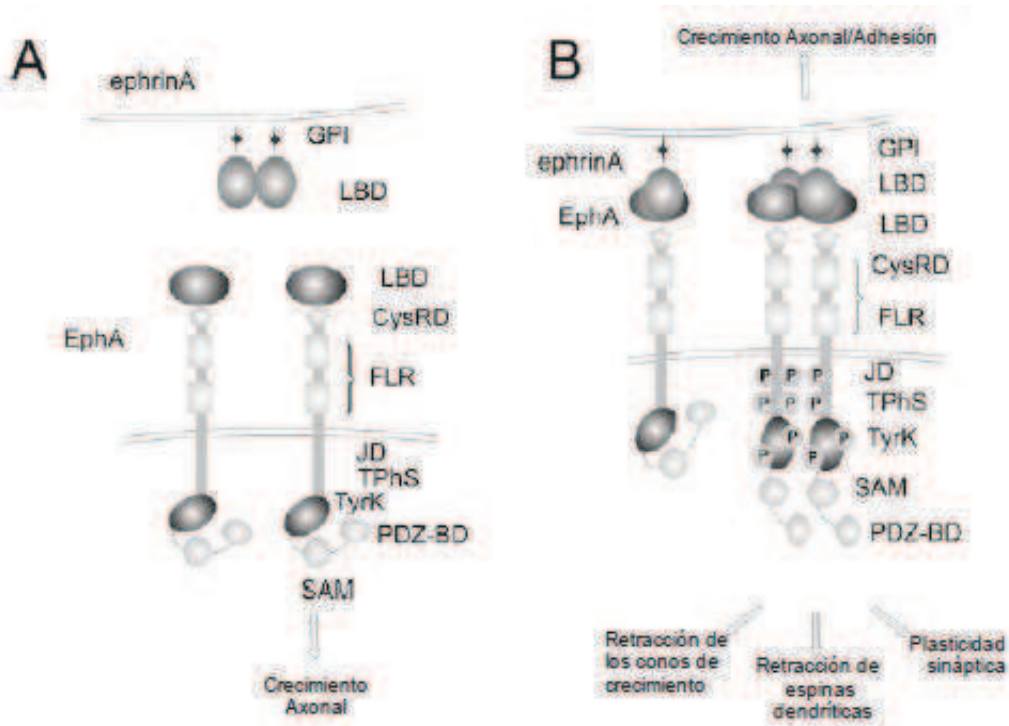
### 3.4. Rol del sistema Eph/ephrinas en la guía axonal y en la formación de las conexiones retinotectales.

Los conos de crecimiento portadores de Eph, al interactuar con células tectales que expresan ephrinas, reciben una señal de retracción (Nakamoto y col. 1996). Esto explica la restricción del crecimiento de los axones de las CGR temporal al sector rostral del tectum (Figuras I10 e I11). Sin embargo, no explica la preferencia de los axones nasales por la zona caudal del tectum como se observa in vivo.



Una particularidad del par Eph/ephrina es la bidireccionalidad de las señales (Figura I12) (Kullander y Klein, 2002; Lisabeth y col., 2013).

Está demostrado que las ephrinas también pueden funcionar como receptores ante el estímulo con Eph, el cual estaría funcionando como ligando. Por lo tanto, en una interacción axón-célula mediada por Eph/ephrina, ambas células son estimuladas. Las ephrinas-B median la fosforilación y activación de las quinasas de la familia Src, a través de su dominio intracelular, el cual es fosforilado en tirosinas (Murai y Pasquale, 2003).



**Figura I12.** Señalización vía EphsA/ephrinas-A. A. Estado basal, sin contacto entre moléculas ni oligomerización. B. Activación de receptores y señalización directa y reversa con oligomerización (Modificado de Scicolone y col. 2009).

Si bien las ephrinas-A carecen de dominios citoplasmáticos también pueden mediar la señal reversa y modificar el comportamiento celular al activar otras moléculas que transducen señales como por ejemplo las familias de quinasas Src y Akt (Cowan y Henkemeyer, 2001; Holen y col., 2008; Palmer y col., 2002). También se observaron respuestas a nivel de la superficie extracelular, como la activación de la proteasa Adam10/Kuzbanian que cliva a la misma ephrina-A y la desprende de la membrana, de esta manera la ephrina pierde su capacidad de transducir señales y su función como ligando (Hattori y col.,

2000; Janes y col. 2005; Janes y col. 2009). Finalmente también se las ha relacionado con los receptores transmembrana de neurotrofinas p75, TrkB y Ret conformando complejos moleculares que permiten la señalización reversa por ephrinas-A (Bonanomi y col., 2012; Lim y col., 2008; Marler y col., 2008).

La señal directa o forward, a través de los receptores EphA ha sido caracterizada por varios autores (Marston y col., 2003; Pitulescu y Adams, 2010; Zimmer y col., 2003). La señal recibida por los receptores EphA determina la retracción del cono de crecimiento. Así, las ephrinas-A del tectum caudal repelen a los axones de las CGR temporal e inhiben la formación de ramificaciones que puedan originar zonas de terminación (ZT) localizadas caudalmente al área blanco correspondiente. Este efecto lo producen activando a los receptores EphA3 y EphA4 (Brown y col., 2000; Cheng y col., 1995). Los axones nasales son menos sensibles a la repulsión de las ephrinas-A tectales porque expresan menos EphsA. Esto permitiría a los axones nasales invadir el tectum caudal pero no explica por qué las fibras ópticas nasales no se ramifican en el tectum rostral (Figura I11).

Trabajos previos de nuestro laboratorio han puesto en evidencia la existencia de un estímulo del crecimiento axonal a lo largo de un gradiente antiparalelo a la expresión de las ephrinas, el gradiente de EphA3 tectal. Éste, actuando como ligando estimula el crecimiento axonal de las CGR nasal hacia el tectum caudal (Ortalli y col., 2012).

Otros trabajos de nuestro laboratorio han puesto en evidencia que el efecto del EphA3 en la guía axonal durante la formación del mapa de conexiones retinotectales estaría mediado por su competencia con el EphA4 axonal por la unión con las ephrinas-A axonales, produciendo una disminución de la activación del EphA4 axonal. Cuando los axones de las CGR arriban al tectum rostral encuentran una alta concentración de EphA3 que compite con el EphA4 por la unión a las ephrinas-A axonales, disminuyendo el nivel de señalización del EphA4, liberando así a los axones de un freno relativo a su crecimiento y disminuyendo la formación de filopodias axonales relacionadas con la formación ZT en la región proximal del TO. Como los axones de las CGR temporal expresan menores niveles de ephrinas-A y de EphA4 activado, son menos sensibles al efecto del gradiente del EphA3 tectal y a medida que las concentraciones de EphA3 disminuyen, su crecimiento axonal va disminuyendo

por el menor estímulo del EphA3 y por la inhibición producida por las ephrinas-A tectales a las cuales son más sensibles por poseer mayor nivel de EphsA libres. Paralelamente la mayor activación de los EphsA favorecería la formación de las ZT en regiones rostrales del tectum. Por el contrario, como los axones de las CGR nasal expresan mayores niveles de ephrinas-A y de EphA4 activado, son más sensibles al efecto del gradiente del EphA3 tectal y menos sensibles al efecto repelente de las ephrinas-A tectales (poseen menor cantidad de EphsA axonales libres). Como consecuencia de estos dos factores, los axones de las CGR nasal siguen creciendo en zonas con menores concentraciones de EphA3 y con mayores concentraciones de ephrina-A2. Paralelamente la menor activación de los EphsA impediría la formación de las ZT en regiones rostrales del tectum.

En síntesis, está demostrado que la familia de Eph-A-ephrinas-A es un conjunto de moléculas de guía axonal del cual se conocen muchos de sus mecanismos de acción a nivel de los conos de crecimiento. Sin embargo, cuando se observa el sistema completo a nivel del tejido e incluyendo los patrones de expresión y activación, aparece una propiedad emergente, la capacidad de distribuir los axones y sus zonas de terminación en el órgano blanco. Esta propiedad ha sido definida como una fuerza positiva o negativa según como afecte el crecimiento axonal y la formación de ZT sobre el eje antero- posterior (céfalo-caudal) del tectum.

Hasta el momento se han descrito funciones correspondientes a tres de los gradientes estudiados:

- a) Los gradientes crecientes de ephrinas-A en el eje rostro-caudal del tectum constituyen una fuerza repelente que impide que las fibras ópticas sobrepasen el área donde deben establecer conexiones, impidiendo que los axones temporales lleguen al tectum caudal.
- b) Los gradientes de ephrinas-A retinianas regulan la respuesta de los EphAs axonales diferencialmente en el eje naso-temporal disminuyendo el conjunto de receptores libres y capaces de unirse a las ephrinas-A tectales. Esto disminuye la sensibilidad de los axones nasales hacia las ephrinas-A tectales (Dutting y col., 1996; Hornberger y col., 1999). Por este motivo los axones temporales son más sensibles que los nasales y forman sus conexiones en la región rostral del tectum, mientras que las nasales son estimuladas a crecer por sobre la región

rostral y formar sus conexiones en el tectum caudal (Scicolone y col., 2009; Ortalli y col., 2012).

c) El gradiente de EphA3 tectal, como segunda fuerza opuesta al gradiente de ephrinas que permite explicar el crecimiento de las fibras nasales y la formación de sus conexiones en tectum caudal (Ortalli y col., 2012). Este efecto del EphA3 podría depender de dos mecanismos: 1) de la señalización reversa a través de las ephrinas-A axonales o 2) de la disminución indirecta de la señalización del EphA4 axonal.

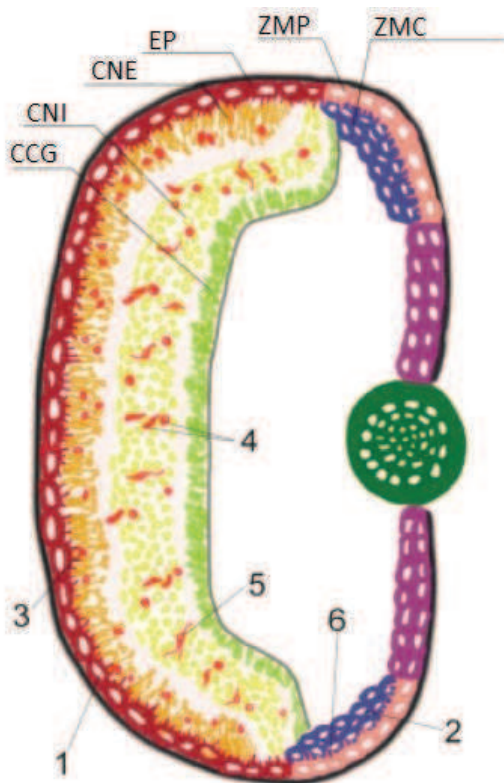
d) El EphA3 tectal estimula el crecimiento axonal de las CGR nasal hacia el tectum caudal e inhibe la formación de zonas de terminación en el tectum rostral, disminuyendo la activación del EphA4 axonal al desplazarlo de su unión con las ephrinas axonales.

#### **4. Regeneración de la retina.**

La regeneración es la capacidad de los organismos de reemplazar tejidos, órganos y apéndices mediante crecimiento o reestablecimiento del patrón del tejido somático (Wolpert y col., 2007).

La regeneración de la retina se produce en una variedad de organismos durante un período restringido en el desarrollo temprano. Estos animales incluyen a los peces, anfibios, aves y mamíferos. La regeneración de la retina en estos embriones puede ocurrir por transdiferenciación del EPR (Fig. I13, #1). Sólo algunos urodeles retienen la capacidad de regenerar sus retinas por medio de la transdiferenciación en estado adulto (Lopashov y Stroevea, 1964; Mitashov, 1996, 1997; Raymond y Hitchcock, 2000; Fischer y Reh, 2001a). Se ha demostrado que otros anfibios, peces y aves pueden regenerar parcialmente sus retinas a partir de precursores presentes en la ZMC (I13, #2), en otras áreas de la retina (Fig. I13, #3 y #4) o por células de Müller (Fig. I13, #5; Lapashov y Stroevea, 1964; Johns y Fernald, 1981; Johns, 1982; Raymond y col., 1988; Braisted y col., 1994; Mitashov, 1996, 1997; Raymond y Hitchcock, 1997, 2000; Julian y col., 1998; Reh y Levine, 1998; Fischer y Reh, 2000, 2001b; Vihtelic y Hyde, 2000; Reh y Fischer, 2001; Otteson y col., 2001; Wu y col. 2001). La posibilidad de que pueda inducirse algún grado de regeneración

retiniana en mamíferos ha surgido con el descubrimiento de células pigmentarias del margen ciliar (PMC) de ratas adultas que tienen la capacidad de transdiferenciarse *in vitro* en células específicas de retina (Figura I13, #6; Ahmad y col., 2000; Tropepe y col., 2000).



**Figura I13.** Diagrama de un ojo de vertebrado señalando las regiones de la retina que contribuyen al proceso de regeneración en los diferentes organismos modelo. #1: El Epitelio Pigmentario (EP, rojo) se puede transdiferenciar en retina neural en embriones de varias especies, pero en adultos sólo en tritón. #2: La Zona Marginal Ciliar (ZMC, azul) es una fuente de células madre y precursoras que pueden contribuir al crecimiento continuo de la retina como así también a la regeneración en varios organismos. #3: Los precursores de bastones (rojos/esféricos) contribuyen a la regeneración de fotorreceptores en peces teleosteos. #4: Células madre intrínsecas

(rojas/fusiformes) presentes en la capa nuclear interna (CNI) proliferan y dan lugar a progenitores neurales que migran a la capa nuclear externa (CNE) y reemplazan las células retinianas dañadas. #5: Células de Müller (rojas/cuerpo celular y prolongaciones) que proliferan y migran a la CNE para reemplazar retina dañada. #6: células pigmentarias de la zona marginal periférica (ZMP, rosas) se pueden transdiferenciar *in vitro* en ratones. CCG, células ganglionares de la retina. (Katia del Río Tsonis y Panagiotis Tsonis, 2003).

Se ha demostrado que los pollos postnatales tienen células madre retinianas tipo embrionarias localizadas en el CC y células progenitoras retinianas en la ZMC que son capaces de generar algunas neuronas de la retina. Las células madre retinianas del CC del pollo adulto sólo proliferan en respuesta a factores de crecimiento y el epitelio no pigmentario en el CC puede proliferar y dar neuronas de la retina en respuesta a una injuria (Fischer y Reh, 2000; Fischer y Reh, 2003).

Un trabajo de Reh y colaboradores ha sugerido que aves adultas tienen/podrían tener la capacidad de regenerar sus retinas luego de un daño. Se ha mostrado que los pollos adultos poseen una ZMC que contiene células progenitoras y células madre neurales que podrían potencialmente reemplazar retina dañada. Estas células son activas mitóticamente (Morris y col., 1976; Fischer y Reh, 2000) y responden a factores de crecimiento incrementando su proliferación (Fischer y Reh, 2000; Fischer y col., 2002). Estas mismas células coexpresan marcadores celulares presentes en progenitores de retina neural como Pax-6 y Chx10 (Belecky-Adams y col., 1997; Fischer y Reh 2000; Reh y Fischer, 2001). Estas células finalmente dan células amácrinas y bipolares pero no fotorreceptores ni células ganglionares. Aparentemente el repertorio de células que puede producir la ZMC está limitada por su microambiente, ya que la exposición de ojos de pollo postnatales a factores de crecimiento, como FGF-2 e insulina, genera células ganglionares (Fischer y col., 2002). Aunque las células de la ZMC en pollos adultos comparten algunas de las propiedades de las células de la ZMC de peces y anfibios, las células de pollo no pueden reemplazar retina dañada (Fischer y Reh, 2000; Reh y Fischer, 2001; Fischer y col., 2002).

Las células pigmentarias presentes en el MC o ZMP (Figura I13, #6) también son mitóticamente activas y expresan marcadores celulares que son expresados transitoriamente en el EPR en desarrollo, incluyendo Pax-6 y Mitf (Fischer y Reh, 2001a). La exposición a ciertos factores de crecimiento inducen su proliferación y despigmentación (signos iniciales de transdiferenciación). Desafortunadamente, el microambiente postnatal no provee factores esenciales que puedan llevar a estas células a reemplazar retina dañada. De hecho, la población de células despigmentadas finalmente experimenta muerte celular (Fischer y Reh, 2001a).

Por otro lado, células de la CNI en la retina central, específicamente células de Müller responden a daño agudo de la retina (Figura I13, #5). Estas células re-ingresan al ciclo celular, se desdiferencian produciendo precursores neuronales que expresan Pax-6, Chx10 y Cash1 (marcadores celulares para precursores



neurales embrionarios) y finalmente se diferencian en neuronas y células de la glia (Fischer y Reh, 2001b; Reh y Fischer, 2001).

A diferencia del pollo adulto, el embrión de pollo puede regenerar todas las capas de la retina luego de haber sido removida completamente a través de una retinectomía durante una pequeña ventana temporal durante E4 (estadios - 22-24.5 de Hamburger y Hamilton, 1951) (Coloumbre y Coloumbre, 1965). La retina de los embriones de pollo pueden regenerarse mediante dos mecanismos celulares distintos; por transdiferenciación del EPR, o mediante la activación de las células que se encuentran en la región marginal anterior del ojo, que incluye al CC y a la ZMC (Coloumbre y Coloumbre, 1965). El CC consiste de dos capas de células, el epitelio ciliar pigmentado y no pigmentado (EP y EC, respectivamente). Como no hay marcadores moleculares que puedan distinguir claramente entre el CC y la ZMC durante los estadios tempranos del desarrollo, nos referiremos a esta región como MC.

Aunque la regeneración de la retina es posible en el embrión de pollo, no ocurre espontáneamente, sino que debe ser inducida por la adición de factores exógenos. El ojo del embrión de pollo provee un modelo único para evaluar factores y drogas por su potencial para inducir la regeneración neural, y para analizar los mecanismos moleculares que participan en el proceso. La información obtenida puede luego ser usada para analizar otros modelos de vertebrados incluyendo mamíferos. Hasta el momento se sabe que se necesitan miembros de la familia del FGF (FGF1 ó 2) para inducir la regeneración de la retina luego de ser removida. Otros factores de crecimiento como TGF $\beta$ , insulina, IGF1 y 2 y NGF $\beta$  no promueven la regeneración (Park y Hollenberg, 1989; Park y Hollenberg, 1991). También se ha demostrado que la regeneración de la retina a través de ambos mecanismos celulares puede inducirse con Shh, BMP, así como con moléculas inflamatorias como C3a, C5a e IL-6. La inhibición de la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina/TCF/Lef1 es suficiente para inducir la regeneración de la retina de embriones de pollo.

## **4.1. Mecanismos celulares de regeneración de la retina.**

### **4.1.1. Regeneración a partir de células madre/progenitoras.**

Luego de la retinectomía, empieza a regenerarse la retina neural desde el margen anterior del EP como consecuencia de la activación de las células madre/progenitoras del MC. Este evento comienza un día luego de la retinectomía (post-retinectomía). La retina se diferencia muy rápidamente con los segmentos externos de los fotorreceptores localizados lejos del cristalino, en la orientación normal y asociados al EPR que no se transdiferenció (Coulombre y Coloumbre, 1965; Park y Hollenbreg, 1991, 1993).

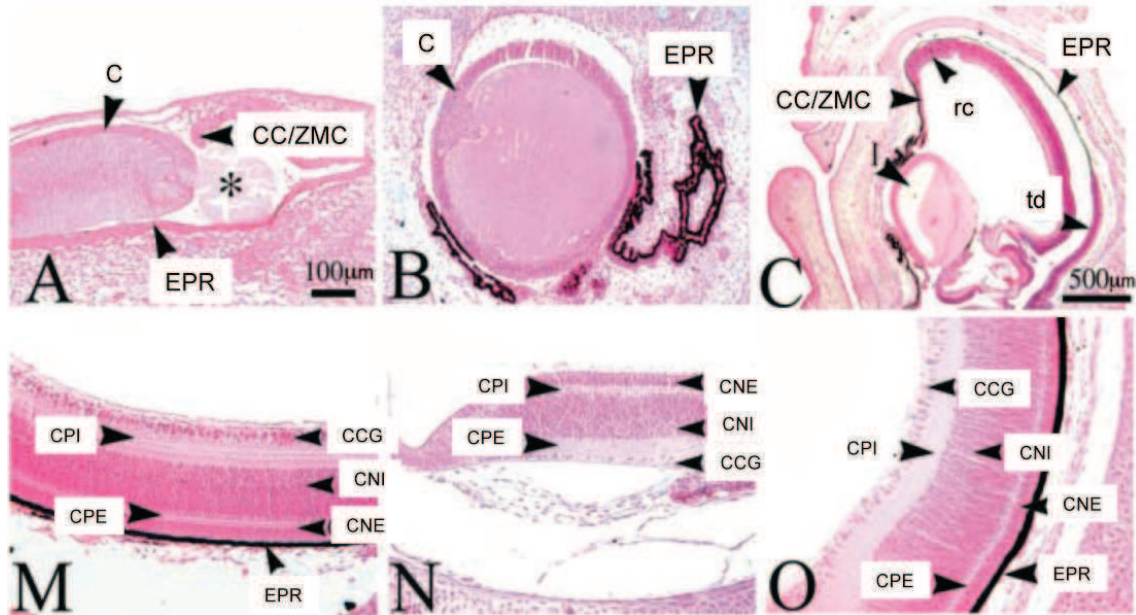
### **4.1.2. Regeneración por transdiferenciación del epitelio pigmentario de la retina.**

Luego de una retinectomía (Figura I14 B) las células del EPR experimentan un proceso de transdiferenciación. En este proceso las células pigmentarias de la retina, un “tipo celular terminalmente diferenciado”, pierden sus características de origen (pérdida del pigmento y despegamiento de la membrana basal) y entran al ciclo celular para formar una capa de células neuroepiteliales que finalmente se diferenciará a todos los tipos celulares de la retina.

En los pollos, durante los estadios HH22-24 del desarrollo (Hamburguer y Hamilton, 1951), las células de la retina se regeneran luego de una retinectomía por medio de la transdiferenciación si son estimuladas con FGF2 (Park y Hollenberg, 1989, 1991, 1993). (Figura I14 C). Durante este proceso, primero hay un cambio de los gránulos de pigmento hacia el ápice de las células pigmentarias de la retina (cPR), seguido de proliferación y desdiferenciación de las cPR a varias capas de células neuroblásticas en las primeras 24 a 48 horas. La diferenciación de la retina en regeneración se observa por la aparición de fibras nerviosas y células ganglionares durante el tercer día de regeneración. La retina se regenera siguiendo una secuencia similar al desarrollo normal, pero con una polaridad invertida (Figura I14 N). Como resultado, los bastones y conos de la capa de fotorreceptores se localizan en la capa más interna de la retina. La desaparición de las cPR también se observa durante este proceso de regeneración (Figura I14 N,



Coulombre y Coulombre, 1965; Park y Hollenberg, 1991). Sin embargo, una vez que el EPR se transdiferencia, se pierde en esa área del ojo y no se regenera a sí mismo (Spence y col., 2004).



**Figura 114.** El FGF-2 induce la regeneración de la retina por dos vías diferentes: por transdiferenciación del EPR y a través de la proliferación de células madre/progenitoras del MC. A) En E4 la retina es removida quirúrgicamente dejando el EPR y el MC. Luego se coloca una esfera de heparina bañada en FGF2 (\*) en la copa óptica. B) Una esfera de heparina sola (no se observa en esta imagen) no causa regeneración luego de 7 días (E11). C) El FGF2 induce regeneración desde el MC (cr) y por transdiferenciación del EPR (td) (E11). M) Retina en E15. N) Retina transdiferenciada en E15. O) Retina regenerada a partir del MC en E15. CC/ZMC: cuerpo ciliar/zona marginal ciliar; EPR: epitelio pigmentario de la retina; C: cristalino; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. (Modificado de Spence y col., 2004).

## 4.2. Moléculas inductoras de regeneración de la retina.

### 4.2.1. Regeneración inducida por Shh y FGF2.

Se ha demostrado que Shh tiene un rol muy importante en el desarrollo de la retina en una gran variedad de organismos modelo (Levine et al., 1997; Greenwood y Struhl, 1999; Neumann y Nusslein-Volhard, 2000; Stenkamp y

col., 2000; Zhang y Yang, 2001a; Zhang y Yang, 2001b; Wang y col., 2002; Dakubo y col., 2003; Perron y col., 2003; Stenkamp y Frey, 2003; Shkumatava y col., 2004). Se ha demostrado que la expresión ectópica de Shh en ojos de pollo en desarrollo causa la transdiferenciación de la retina en EPR, y la inhibición de la vía de Shh causa que el EPR se transdiferencie en neuroepitelio (Zhang y Yang, 2001a). La señalización de Hedgehog también está implicada en la especificación del eje proximodistal y de la diferenciación del EPR en embriones en desarrollo de *Xenopus* (Perron y col., 2003); ayuda a establecer el eje proximodistal durante el desarrollo del ojo de zebrafish (Takeuchi y col., 2003) y es necesario para la normal laminación y organización de la retina (Wang y col., 2002; Shkumatava y col., 2004). También se ha demostrado que Shh regula la proliferación de progenitores neurales *in vitro* e *in vivo* (Lai y col., 2003). Además, los efectores cascada abajo de la vía de hedgehog-Patched-Smoothened (Smo), Gli2 y Gli3- se expresan fuertemente en las células progenitoras de la retina de la ZMC de *Xenopus* (Perron y col., 2003) sugiriendo que la vía de hedgehog puede desarrollar un rol en la regeneración que ocurre a partir del MC. Se ha demostrado que una sobreexpresión de Shh permite que el EPR mantenga su fenotipo e inhibe la transdiferenciación que se produce con la estimulación con FGF2. (Spence y col., 2004).

En el desarrollo temprano del ojo, la secreción ectodérmica de FGF1 y FGF2 son necesarias para la determinación de la retina y del EPR (Hyer y col., 1998; Pittack y col., 1997). Estudios acerca del patrón de expresión de los receptores del FGF tipo 1 (FGFR1) y tipo 2 (FGFR2) durante el desarrollo embrionario del ojo del pollo mostraron que la retina tiene los mayores niveles de expresión de estos receptores alrededor de E4, y que los mismos disminuyen progresivamente hasta alrededor de E18. Específicamente, hay una tendencia en el EPR de disminuir los niveles del receptor de FGF luego de E4. La expresión que se mantiene en el ojo luego de E4 tiende a ser más alta en las CGR y los fotorreceptores (Tcheng y col., 1994; Ohuchi y col., 1994). La reducción de la expresión del receptor de FGF puede ayudar a explicar por qué el EPR pierde su capacidad de responder al FGF2 y de transdiferenciarse *in vivo* luego de E4.5. Puede ser que como el EPR tiene la capacidad de transdiferenciarse *in vivo* hasta E4.5, exista un estado transicional en el cual el

EPR sea capaz de responder a las señales de FGF desde la superficie del ectodermo para un desarrollo normal, y que luego pierda esta capacidad de responder para convertirse en un EPR totalmente comprometido y diferenciado. También se ha reportado que la activación constitutiva de la molécula de señalización cascada abajo del FGF -MEK1- activa la molécula de transducción de señal de MAPK, ERK e induce la transdiferenciación del EPR a retina en ojos en desarrollo. Esta transdiferenciación se correlaciona con una inhibición de Mitf en el EPR causada por su proteólisis, la cual es estimulada por la fosforilación de Mitf mediada por ERK (Galy y col., 2002). La pérdida de respuesta del EPR al FGF puede ser necesaria para que el EPR se diferencie totalmente (Spence et al., 2004).

La inhibición de la vía de Shh causa la expansión del dominio de transdiferenciación en el ojo en regeneración (Spence y col., 2004). La transdiferenciación observada en los ojos tratados con Shh y FGF2 ocurre en una manera dependiente del FGF2, ya que sólo el EPR cercano a la fuente de FGF2 se transdiferencia, probablemente porque estas áreas están en contacto con las mayores concentraciones de FGF2.

La sobreexpresión de Shh es suficiente para que las células madre/progenitoras originen retina regenerada a través de la vía de FGF. Se ha demostrado que Shh sobreexpresado con el vector RCAS promueve la regeneración de la retina a través del MC en ausencia de FGF en un 60-80% (Spence y col., 2004).

Además, estudios en pollos postnatales han mostrado que Shh está presente en la ZMC y que esta región responde a Shh ectópico proliferando. La vía Shh es esencial para el desarrollo y el mantenimiento del MC y probablemente participe en la proliferación y la regeneración de nuevas neuronas desde este área.

Shh también parece controlar el número de CGR que se diferencian en la retina regenerada. Algunos vertebrados como el pez cebra y los pollos necesitan olas de expresión de Shh para que se produzca una normal diferenciación de todos los tipos celulares de la retina (Neumann y Nusslein-Volhard, 2000; Stenkamp y col., 2000; Zhang y Yang, 2001b; Stenkamp y Frey, 2003; Shkumatava y col., 2004). Específicamente, Zhang y Yang (2001b) han

demostrado que Shh es necesario para la diferenciación de las CGR y para inhibir la diferenciación de células progenitoras vecinas en más CGR durante el desarrollo de la retina en pollos.

#### **4.2.2. Regeneración inducida por la vía de señalización de BMP.**

La vía de señalización de BMP regula la vía de señalización del FGF y su activación es capaz de inducir la regeneración de la retina a través de las células madre/progenitoras presentes en el MC en ausencia de FGF ectópico. Además, la vía de señalización de BMP induce proliferación en etapas tempranas de la regeneración y apoptosis en etapas más tardías a través de un intrincado entrecruzamiento con la vía de señalización del FGF, regulando selectivamente las vías canónicas/no-canónicas de BMP (Haynes y col., 2007) El receptor 1A de BMP (BMPR1A) activa a Smad a los 3 días post-retinectomía y éste activaría a la proteinquinasa p38 a los 7 días post-retinectomía durante la regeneración de la retina.

Se ha postulado que BMP regula los procesos de proliferación y apoptosis de manera contexto dependiente durante el desarrollo de la retina. Inicialmente, la vía de señalización de BMP activa a Smad y dirige la activación de Erk dependiente de FGF al incrementar la expresión de FGFR1 y de FGFR2, resultando en proliferación y diferenciación. A medida que ocurre la regeneración, la vía de BMP disminuye la activación de FGFR1 y FGFR2 y activa a p38, induciendo apoptosis en este estadio (Haynes y col., 2007).

#### **4.2.3. Regeneración inducida por C3a.**

Luego de una retinectomía, el agregado del fragmento del complemento C3a en la copa óptica es suficiente para inducir la regeneración completa de la retina del embrión de pollo a partir de células madre/progenitoras presentes en el ojo, independientemente de la señalización del receptor de FGF. En su lugar, C3a induce la regeneración de la retina vía la activación de STAT3, la cual activa los factores que responden a daño- inflamación-, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ . La activación de los mismos establece la regulación de Wnt2b, Six3 y Sox2,

genes asociados con células madre y progenitoras de la retina. Haynes et al han establecido un mecanismo para la regeneración de la retina basado en señales de daño e inflamación.

Haynes y col., (2013) mostraron un nuevo mecanismo de inducción de la regeneración de la retina que no requiere señalización del FGF2. Este nuevo modo de inducción muestra que la señalización por el C3a a través de su receptor acoplado a proteína G, C3aR, estimula la regeneración de la retina inicialmente incrementando la citoquina inflamatoria, IL-6, a través de la activación de MAPK-STAT3, llevando a una expresión regulada de genes de células madre y progenitoras de la retina que conducen a la regeneración de la retina.

#### **4.2.4. Regeneración inducida por $\beta$ -catenina.**

La sobreexpresión de  $\beta$ -catenina durante el desarrollo temprano de la retina de pollo, promueve que las células de la retina cambien su destino y adquieran identidad periférica. La  $\beta$ -catenina también se requiere para la especificación del EPR durante el desarrollo del ojo de las aves y de los mamíferos por regulación directa de dos genes específicos del EPR: Mitf y Otx2. La disrupción de la  $\beta$ -catenina causa que el EPR pierda su fenotipo y comience a expresar marcadores de progenitores de la retina; mientras que la sobreexpresión de la  $\beta$ -catenina y de Otx2 es suficiente para inducir la expresión de Mitf en progenitores de la retina (Zhu y col., 2014).

Se ha demostrado que la  $\beta$ -catenina se asocia con células que tienen bajo estado proliferativo en el MC y en el EPR y que el bloqueo de la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina es necesaria para la regeneración de la retina (Zhu y col., 2014).

La  $\beta$ -catenina nuclear es detectada en una subpoblación celular que presenta proliferación baja o ausente en el MC y en el EPR durante el desarrollo.

La inhibición de la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina/TCF/Lef1 es suficiente para inducir la regeneración de la retina de embriones de pollo a través del MC (82%) y a través de la transdiferenciación del EPR (30%) (Zhu y col., 2014).

En los tratamientos descritos previamente (4.2.1. a 4.2.4.) se obtuvo regeneración mixta con segmentos de retina originados a partir del MC y a partir de la transdiferenciación del EPR. En algunos casos, se obtuvo también regeneración exclusivamente a partir de la transdiferenciación del EPR. En cambio, la eficacia de obtener regeneración exclusivamente desde el MC ha sido muy baja en todos los tratamientos evaluados.

Como la retina neural regenerada por transdiferenciación presenta una estructura radialmente invertida, no produce eferencia y no presenta EPR, que es necesario para la vitalidad y funcionalidad de los fotorreceptores, se **evaluaron tratamientos que tengan una alta eficacia en obtener una regeneración retiniana total a partir del MC.**

Dado que se ha descrito que la regeneración con RCAS-Shh ha dado una retina completa y exclusiva desde el MC (Spence y col., 2004), pero con una eficacia muy baja, uno de los **objetivos** de este trabajo fue **evaluar un nuevo tratamiento con un agonista de Smoothed -SAG- que actúa cascada abajo en la vía de señalización de Shh-Patched.** Se pretendió, con este tratamiento obtener la regeneración de la retina exclusivamente a partir de las células madre/progenitoras del MC.

El **objetivo** ulterior es **conseguir la regeneración de la retina completa con formación de nervio óptico para poder estudiar si se forman conexiones retinotectales topográficamente ordenadas.**

Para esto se realizaron los siguientes tratamientos: a) FGF2, b) RCAS-Shh, c) RCAS-Shh + FGF2, d) SAG 500 nM, e) SAG 5  $\mu$ M, f) SAG 10  $\mu$ M, g) SAG 500 nM + FGF2, h) SAG 5  $\mu$ M + FGF2, y i) SAG 10  $\mu$ M + FGF2.

Como el sistema Eph/ephrinas mantiene la información posicional del sistema retinotectal y guía el crecimiento axonal durante la formación del mapa retinotectal, otro **objetivo** de este trabajo fue **determinar si los segmentos de retina regenerada a partir de transdiferenciación y del MC expresan las moléculas de este sistema.**

Los tratamientos analizados previamente se basan en obtener regeneración a partir de la activación de células madre endógenas. Otro procedimiento que ofrece ventajas para restituir poblaciones celulares específicas que hayan sido devastadas por enfermedades de distinto origen, es el empleo de células madre que se expanden *in vitro* y se utilizan como trasplante. Por tal motivo, y con el **objeto de evaluar la potencialidad evolutiva de células madre/progenitoras provenientes del MC**, se realizaron cultivos de células madre/progenitoras disociadas obtenidas del MC favoreciendo la formación de neuroesferas. Se investigó si el manejo del microambiente *in vitro* permite obtener CGR a partir de las células madre/progenitoras. El resultado positivo de estos experimentos permitió investigar si estas CGR expresan las moléculas del sistema Eph/ephrinas y presentan información posicional. Por último, se evaluó si los axones de las CGR diferenciadas *in vitro* responden al sistema Eph/ephrinas, que guían el crecimiento axonal de las CGR durante el desarrollo. Esto sugeriría que estas CGR son capaces de establecer conexiones topográficamente ordenadas en el tectum. Esto tiene una gran importancia práctica porque la imposibilidad de establecer conexiones locales y de proyección es uno de los principales obstáculos en las terapias de regeneración neural.



## **Objetivos:**

Los **objetivos generales** de este proyecto son básicamente dos:

1. Manipular el microambiente de las células madre-progenitoras del MC para estimular su diferenciación en CGR que posean información posicional y sean competentes para responder a las señales de guía axonal del sistema Eph/ephrinas.
  
2. Obtener in vivo la regeneración completa de una retina que exprese moléculas de información posicional y que forme una eferencia que pueda establecer conexiones topográficamente ordenadas con el tectum contralateral.

Para lograr estos objetivos generales, se pretende concretar los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.1. Inducir la diferenciación de CGR a partir de células madre/progenitoras provenientes del MC y que proliferan in vitro formando neuroesferas.
  
- 1.2. Determinar si el sistema Eph/ephrinas se expresa en las CGR diferenciadas a partir de células madre/progenitoras que forman neuroesferas in vitro.
  
- 1.3. Establecer si las CGR diferenciadas a partir de las células madre/progenitoras de las neuroesferas son competentes para responder a moléculas de guía axonal del sistema Eph/ephrinas.
  
- 2.1. Determinar si las retinas regeneradas tanto a partir de células madre/progenitoras del MC como a partir de la transdiferenciación del EPR expresan el sistema Eph/ephrinas y presentan información posicional.
  
- 2.2. Crear las condiciones in vivo para inducir la regeneración de una retina completa exclusivamente a partir de células madre/progenitoras del MC, y que la misma:
  - 2.2.1. Exprese información posicional y
  - 2.2.2. Forme una eferencia que plantee la posibilidad de establecer conexiones con su órgano blanco.



# Materiales y Métodos

## **1. Animales.**

Se utilizaron embriones de pollo (*gallus gallus*) cepa Leghorn blanco libre de patógenos (SPF) provenientes del Instituto Rosenbusch de Medicina Veterinaria (Ciudad Autónoma de Buenos Aires). Los huevos fueron incubados en condiciones controladas a 38° C y 60% de humedad. Previamente a su utilización, los embriones fueron estadificados según la tabla de Hamburger y Hamilton (1951).

Los embriones fueron utilizados siguiendo estrictamente el código de ética y experimentación animal de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (CICUAL FMED-UBA).

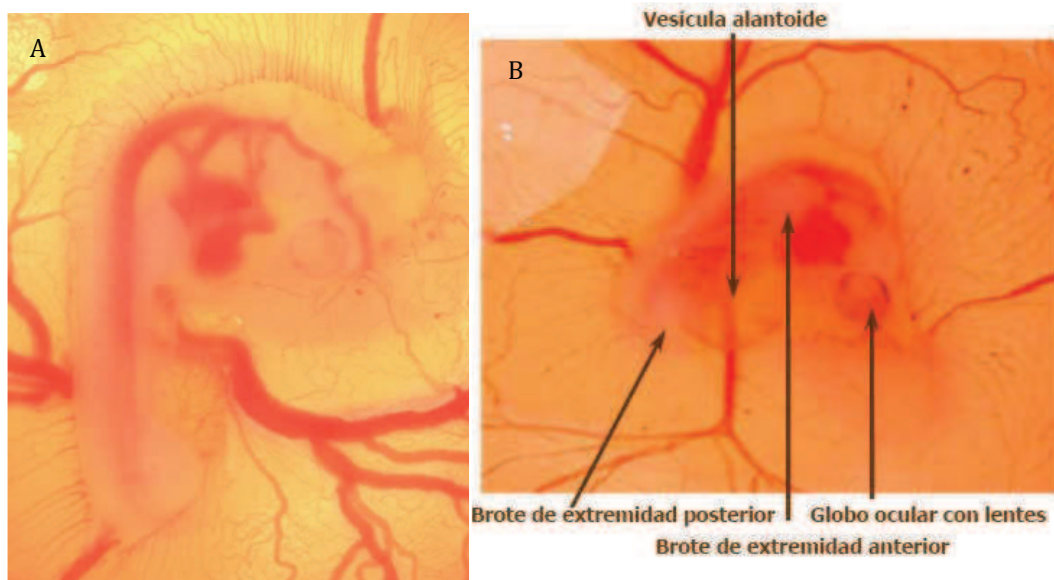
## **2. Cortes histológicos.**

Los embriones utilizados para realizar cortes histológicos con crióstato para tinción con Hematoxilina-Eosina o para inmunohistoquímica fueron sacrificados por decapitación a los 7 y 11 días de desarrollo embrionario (E7 y E11) e inmediatamente colocados en solución de fijación paraformaldehído al 4% a 4°C por 12 horas. Previo a la fijación, se realizó una disección parcial del SNC. Luego de la fijación, las muestras fueron lavadas con PBS + glicina al 1% a 4°C en agitación por tres períodos de 15 minutos cada uno. Luego se las colocó en solución crioprotectora (sucrosa 25%) durante 24 hs. Por último las muestras fueron retiradas de la solución, secadas en papel secante, incluidas en recipientes resistentes a bajas temperaturas embebidas en medio de inclusión (Tissue Teck). Inmediatamente se las expuso a nitrógeno líquido hasta observar su total congelación. Las muestras fueron preservadas a -80°C hasta su procesamiento.

Se realizaron criosecciones de 20  $\mu$ m (crióstato Leica, LANAIS) sobre portaobjetos previamente bigelatinados.

### 3. Experimentos in vivo.

Se utilizaron embriones de pollo E3.5 para las inyecciones subretinales y E4 para las retinectomías (Figura M1). Se colocó el huevo en posición horizontal (apoyándolo sobre una cara del eje mayor del huevo) en la incubadora sin rotación automática por 15 minutos. Luego, se ubicó la cámara de aire por ovoscopía y, en condiciones de esterilidad, se realizó una pequeña perforación con una aguja en el límite entre la cámara de aire y la membrana interna de la cáscara con el objetivo de desplazar la cámara de aire a una posición horizontal justo por encima del embrión. Durante este procedimiento el embrión se desprende de la membrana interna de la cáscara. Luego, se realizó una abertura en el lado superior de la cáscara, justo por encima de la posición del embrión, se retiraron la membrana de la cáscara, el corion y el amnios justo por encima del ojo del embrión con cuidado de no romper ningún vaso sanguíneo. Debido a la posición del embrión, el ojo derecho queda siempre visible (del lado de la cámara de aire). A continuación se realizó una **inyección subretinal** o la **retinectomía**.



**Figura M1.** Imagen de un embrión de pollo en día 3.5 (A) y 4 (B) de desarrollo embrionario.

### **3.1. Inyección subretinal.**

Se realizó una microinyección del virus RCAS-Shh o RCAS-EGFP (control) en PBS con 0.05% de Fast green (Sigma), mediante el uso de un microinyector (Picospritzer II, Parker Hannifin corporation) y agujas de vidrio de capilares estirados por medio de un puller (0, 78 mm).

La inyección se realizó en embriones de E3.5 entre la retina pigmentaria y la retina neural. Luego, se cubrió la ventana con una cinta adhesiva y se lo colocó en incubación por 12 horas a 38°C y 60% de humedad, y a continuación se realizó la retinectomía en E4.

### **3.2. Retinectomía.**

Se punzó el ojo por la zona dorsal y se cortó el ojo en forma circular hacia la zona ventral hasta dejar una tapa, la cual se levantó, dejando a la vista la parte interna del ojo. Luego se extrajo la retina de la cavidad del ojo y de la tapa con cuidado de no extraer el MC, lugar donde se encuentran las células progenitoras de la retina. A continuación se le agregó el tratamiento correspondiente (Ver tratamientos), se cerró la tapa, se cubrió la ventana con cinta adhesiva y se dejó el huevo nuevamente en incubación a 38°C y con una humedad del 60% por 3 ó 7 días en posición horizontal y sin rotación automática.

#### **Tratamientos:**

- RCAS-EGFP
- RCAS-Shh
- RCAS-EGFP + perla de heparina
- RCAS-Shh + FGF 2µg/µl en perla de heparina
- Perla de heparina
- FGF 2µg/µl en perla de heparina
- SAG 500 nM
- SAG 5 µM
- SAG 10 µM
- SAG 500 nM + FGF 2µg/µl en perla de heparina
- SAG 5 µM + FGF 2µg/µl en perla de heparina

- SAG 10  $\mu$ M + FGF 2 $\mu$ g/ $\mu$ l en perla de heparina

Se utilizó SAG (Enzo Life Sciences) restituído en agua MiliQ.

Para la preparación de las perlas de heparina embebidas en FGF se tomó 100  $\mu$ l del stock en 100% etanol y se los colocó en un tubo tipo Eppendorf. Se colocó el tubo con las perlas en un calentador a 50-60 °C para deshidratarlas. Luego se colocó las perlas en la solución de FGF 2 $\mu$ g/ $\mu$ l (10 perlas cada 20  $\mu$ l de solución) y se las dejó a 4°C.

### **3.3. Producción de vectores:**

#### **3.3.1. Producción de bacterias competentes.**

El trabajo con ADN y bacterias se realizó bajo condiciones de esterilidad al lado de un mechero Bunsen. Las soluciones se prepararon con agua ultrapura (sistema MilliQ de Millipore) y se esterizaron en autoclave o por filtración mediante filtros de 0,22  $\mu$ m de diámetro de poro.

El protocolo de obtención de bacterias competentes que se utilizó en este trabajo es una adaptación del protocolo descrito por Cohen en 1972. Las bacterias se tratan con una solución de cloruro de calcio para alterar la pared bacteriana y facilitar la entrada de ADN exógeno (Cohen y col., 1972).

1. Se inocularon 3ml de medio LB -Luria Broth- (Sigma) con la cepa bacteriana Top10 (Invitrogen-Life Technology) y se incubó a 37°C en agitación toda la noche.
2. Se tomó 0,5ml del cultivo bacteriano y se añadió a 100ml de medio LB sin antibióticos. Se incubó a 37°C en agitación. Cada 30 minutos, se extrajo 1ml de medio y se leyó su absorbancia a 600nm. Se repitió este paso hasta que el cultivo llegó a una densidad óptica de 0,4-0,5 unidades de absorbancia (2-4 horas). Esta densidad óptica se corresponde con una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml y con un estado de crecimiento exponencial del cultivo.
3. Se distribuyó el cultivo en dos tubos de 50ml estériles y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos.
4. Se centrifugó a 2500g a 4°C durante 10 minutos.

5. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 40ml de solución TB1 (AcK 30 mM; CaK 2H<sub>2</sub>O 100mM; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 10mM y MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 50 mM glicerol 0,2% (v/v) ph: 5,8) y se dejó reposar en hielo.
6. Se centrifugó nuevamente la suspensión a 2500g a 4°C durante 10 minutos.
7. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 4ml de solución TB2 (MOPS 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 75uM y glicerol 0,03% (v/v) ph: 6).
8. Las bacterias se transformaron a continuación o se congelaron a -80°C en alícuotas de 100 µl para su uso posterior.

### **3.3.2. Transformación de bacterias competentes.**

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* Top10 mediante el protocolo de choque térmico, que se describe a continuación:

1. Se añadió aproximadamente 50 ng del ADN de interés a 100 µl de bacterias competentes descongeladas en hielo. Se mantuvo la mezcla en hielo durante 30 minutos. Esto permitió la adsorción del ADN a la superficie de las bacterias.
2. Se realizó el choque térmico incubando la mezcla a 42°C durante 45 segundos.
3. Se añadió 900 µl de medio LB y se incubó a 37°C en agitación durante 1 hora. Durante este tiempo las bacterias que han incorporado el plásmido expresan la resistencia al antibiótico que permitirá su selección.
4. Se sembró parte del cultivo en una placa de LB agarosa que contenía el antibiótico que permite la selección de las bacterias transformadas. Se dejó que el agar absorba la mezcla y se incubó la placa en posición invertida a 37°C hasta la aparición de las colonias bacterianas (12-18 horas).

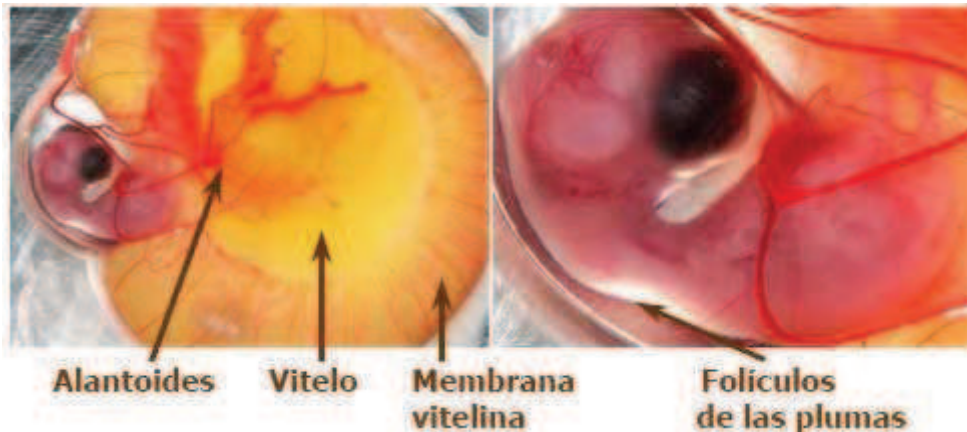
### **3.3.3. Recuperación de ADN plasmídico.**

Para purificar los plásmidos a partir de cultivos bacterianos se utilizó el kit comercial en función de la cantidad y de la calidad de ADN que se necesitaba obtener. Como la preparación era a pequeña escala con fines analíticos (minipreparaciones o minipreps) (Sigma).

### **3.3.4. Producción de fibroblastos.**

Para la extracción de fibroblastos se utilizó el tronco de embriones de pollo de E10 (Fig. M2). Se trozó todo el tronco, extrayendo previamente el hígado y el

bazo, luego se los puso en solución de Tripsina 0.25% EDTA durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió en medio de cultivo DMEM con suero normal bovino al 10 % y ampicilina 500 ul/ml. Luego se los cultivó en placas de 100 mm hasta llegar a un 80 -90 % de confluencia.



**Figura M2.** Embrión de pollo de día 10 de desarrollo embrionario.

### **3.3.5. Producción de virus RCAS-Shh.**

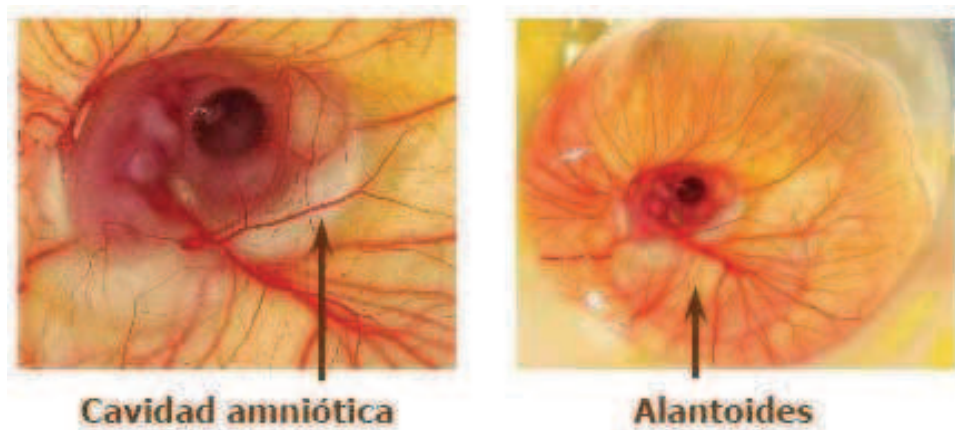
Se levantaron fibroblastos de una placa de Petri de 35 mm con 80-100% de confluencia con tripsina durante 5 minutos. Se mezclaron 4 µg de plásmido RCAS-Shh con 250 µl de medio de cultivo de fibroblastos (DMEM, Sigma), con 10% de suero fetal bovino (SFB). En otro tubo Eppendorf se mezclaron 7 µl de Lipofectamina (Invitrogen) con 250 µl de medio de cultivo de fibroblastos completo. Se dejaron ambos eppendorfs incubando durante 5 minutos, luego se mezclaron los contenidos. A continuación, en un recipiente Falcon de 15 ml se colocaron 2.750 ml de medio de cultivo de fibroblastos completo, se agregó 1.5 ml de fibroblastos tripsinizados y la solución de lipofectamina más el plásmido. Se incubó por 45 minutos a 37°C y luego se pusieron las células en una placa de petri de 35 mm por 48 hs, hasta confluencia del 80-90%. Una vez alcanzada dicha confluencia se pasaron las células a placas de 100 mm y se las dejó otras 48 hs en incubadora a 37°C. Una vez alcanzada una confluencia del 80-90% se pasaron las células a una botella de 15 ml con 10 ml de medio de cultivo y se dejaron 5 días en incubación a 37°C. Luego se recolectó el medio de cultivo y se centrifugó por 10 minutos a 3000 g. Luego se colectó el sobrenadante y se lo colocó en un Falcon de 50 ml con una columna para filtrar el virus (Centrifugal Filter Units, Millipore). Se centrifugó durante 30 minutos a



10000 g. El sobrenadante de la columna se alicuotó y se lo dejó a -80°C. Para constatar que los fibroblastos se hayan infectado efectivamente, se realizó una inmunocitoquímica con el anticuerpo AMV3C2 contra la cápside del virus.

Por último se realizó la determinación de la concentración del virus. Para ello se infectaron fibroblastos con diluciones de la solución de virus de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ , se los incubó durante 2 días y luego se realizó una inmunocitoquímica contra la cápside del virus para contabilizar las células infectadas en cada solución.

#### 4. Experimentos in vitro.

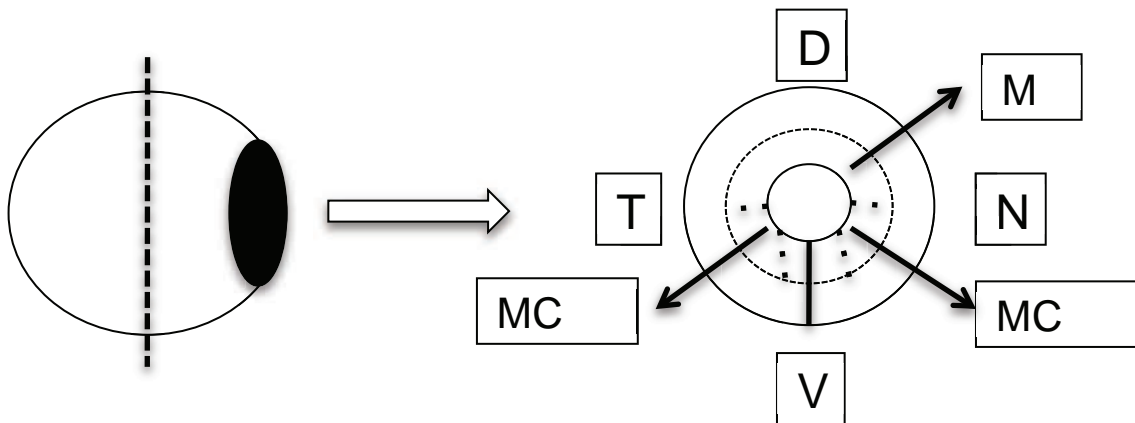


**Figura M3.** Imagen de embrión de pollo en día 7 embrionario

##### 4.1. Producción de neuroesferas.

Se realizaron disecciones de embriones de E7 (Fig. M3). Se quitó el lente y el humor vítreo y se cortaron pequeños trozos de la zona marginal ciliar del sector nasal o temporal. Luego se realizó una disociación mecánica con micropipeta de 200 ul y se pusieron en botellas de cultivo de 15 ml con DMEM, F12-DMEM, EGFP y B27. Se las dejó crecer en flotación por 24 horas y luego se expandieron por 24-48 horas más, para aumentar la población de células madre en las neuroesferas (Figura M4) (Cruz Gaitán y col., 2014; Khodosevich y col., 2011; North y col., 2009).





**Figura M4.** Esquema de la obtención del MC para la producción de neuroesferas

#### **4.2. Expansión de neuroesferas.**

Se tomó el medio de cultivo con las neuroesferas y se lo colocó en tubos de 15 ml. Se centrifugó a 1000 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió con una solución de 600 ul tripsina 0.1 % EDTA por 2 minutos. Luego se agregaron 600 ul del inhibidor de tripsina 250 µg/ml y se volvió a centrifugar por 5 min a 1000g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en el medio de cultivo de neuroesferas nombrado en la sección anterior. Ese volumen se dividió en dos nuevas botellas y se las dejó en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron cultivos desde 3 días hasta cultivos con 7 pasajes cada 3 días (Cruz Gaitán y col., 2014; Khodosevich y col., 2011; North y col., 2009).

#### **4.3. Diferenciación de neuroesferas.**

##### **Curva de estímulos.**

Se obtuvieron neuroesferas de la parte Nasal y Temporal del MC de ojos de embriones de pollo E7 y se los cultivó en flotación para su proliferación y expansión. Luego se cultivaron las neuroesferas sobre sustratos de polilisina-laminina y se realizó una curva con diferentes concentraciones de la combinación de Insulina/FGF2 para determinar la concentración que produce el mayor porcentaje de CGR dentro de la población. El medio de cultivo contenía

Insulina/FGF2 en una combinación de 20:1 (Fischer y col., 2002), y las concentraciones utilizadas se muestran en la siguiente tabla:

Condición	Insulina (µg/ml)	FGF (µg/ml)
0	0	0
1	5	0.25
2	25	1.25
3	50	2.5
4	75	3.75
5	100	5

Se dejaron en incubadora a 37°C por 24 hs y luego se fijaron las neuroesferas diferenciadas en paraformaldehído al 2% con sucrosa al 2%. Estas condiciones de fijación permiten retener la morfología de los axones. Las CGR son reconocidas por expresar neurofilamentos y por ser las únicas neuronas que presentan axones mayores de 100 µm de longitud.

#### **4.4. Estimulación de los axones de las neuroesferas con miembros del sistema Eph/ephrinas (con EphA3-Fc o con ephrina A2-Fc)**

Se obtuvieron neuroesferas de la parte Nasal y Temporal del MC de ojos de embriones de pollo E7 y se los cultivó en flotación para su proliferación y expansión. Luego se cultivaron las neuroesferas sobre sustratos de polilisina-laminina y se las dejó en incubadora a 37°C por 24 hs para su diferenciación hacia CGR.

Se emplearon las moléculas de fusión EphA3-Fc (R&D Systems) – el dominio extracelular y de transmembrana de EphA3 de ratón (Met1-His541) fusionado a Fc- y ephrina-A2-Fc –la molécula de ephrina-A2 fusionada a Fc- para estimular o inhibir el crecimiento axonal de las CGR diferenciadas en las neuroesferas. El Fc (R&D Systems) fue usado como control. En los tres casos, EphA3-Fc, ephrina-A2-Fc y Fc fueron agregados previamente durante una hora a 37°C con un anticuerpo policlonal anti-Fc humano (Cappel) para simular las condiciones de agregación en que actúan estas moléculas: Para esto, se mantuvieron las condiciones estequiométricas entre EphA3-Fc o ephrina A2-Fc

y anti-Fc o entre el control Fc y anti-Fc (12:1) en medio de cultivo de diferenciación de la condición 2 de la curva de diferenciación mencionada en el punto anterior (Ortalli y col., 2012).

Se incubaron las neuroesferas en condiciones de diferenciación y que habían presentado crecimiento axonal de CGR, durante 7 horas con EphA3-Fc agregado con anti-Fc o con ephrina-A2-Fc agregada con anti-Fc o con Fc agregado con anti-Fc como control.

Los ensayos se realizaron a una concentración de EphA3-Fc de 0.25 µg/ml (equivalente a 2nM, anti-Fc 1 nM) ya que la misma es la que produce un mayor estímulo de crecimiento axonal en las CGR (Ortalli y col., 2012). Sin embargo, la ephrina A2-Fc se utilizó en una concentración de 0.114 µg/ml.

Luego de la incubación, las neuroesferas fueron fijadas con paraformaldehído al 2% con sucrosa al 2%. Estas condiciones permiten retener la morfología de los axones.

#### **4.5. Inmunohistoquímicas**

##### **4.5.1. Inmunohistoquímicas de cortes histológicos.**

Se realizaron inmunohistoquímicas en cortes de crióstato de embriones de 3 y 7 días post-retinectomía (E4D3 y E4D7).

Secciones de los distintos grupos etarios fueron procesadas simultáneamente bajo las mismas condiciones. Se descongelaron los preparados en la estufa de secado (37° C) durante 20 minutos. Se realizaron 2 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno, en agitación (en coplin) y posteriormente se permeabilizaron con una solución de Tritón 1% en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos incubando los cortes con una solución conteniendo suero normal de cabra (snca) 2% (v/v) y Tritón 0,5% (v/v) en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente para luego incubar con los anticuerpos primarios diluidos en una solución de snca 1% (v/v) y Tritón 0,05% (v/v) en PBS toda la noche a 4°C en cámara con alguna de las siguientes concentraciones finales de anticuerpos primarios.

- ephrina A2 (Santa Cruz), conejo policlonal a 2µg/ml
- EphA3 (Santa Cruz) conejo policlonal a 2µg/ml

- EphA4 (Santa Cruz) conejo policlonal a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- EphB2 (Santa Cruz) conejo policlonal a 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- EphB3 (Santa Cruz) conejo policlonal a 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- ephrina B1 (Santa Cruz) conejo policlonal a 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- ephrina B2 (Santa Cruz) conejo policlonal a 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 4-H6 (anti-neurofilamentos) ratón monoclonal a 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Pax6 (DSHB) ratón monoclonal 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Chx10 (Exalpha) oveja policlonal 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- AMV3C2 (DSHB) ratón monoclonal 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Nestina (DSHB) ratón monoclonal 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Luego los cortes fueron lavados 3 veces con una solución de Tritón 0,025% (v/v) en PBS en agitación. Posteriormente fueron incubados con anticuerpos secundarios (generados en cabra, específicos para conejo o ratón y conjugados con el fluorocromo AlexaFluor488 (verde) o AlexaFluor594 (rojo) (Molecular Probes) en solución de snca 1% (v/v) y Tritón 0,3% (v/v) en PBS en cámara húmeda en oscuridad durante 4 horas. Se agregó Hoechst 1:1000 durante 10 minutos. Posteriormente los cortes fueron lavados 3 veces con PBS durante 15 minutos cada uno en agitación a temperatura ambiente.

Se realizaron los siguientes controles en cada experimento: sin anticuerpo (sólo el anticuerpo secundario); con un anticuerpo irrelevante y control positivo en una muestra que presenta el antígeno que se pretende detectar.

Las secciones de tejido procesadas para inmunohistoquímica fueron montadas con Fluoromount-G (SouthernBiotech) y visualizadas en microscopio óptico de fluorescencia Zeiss Axiophot equipado con cámara digital Olympus Q5. Las fotomicrografías capturadas fueron almacenadas en formato digital para su posterior análisis.

#### **4.5.2. Inmunocitoquímica de neuroesferas en cultivo.**

Los cubreobjetos redondos sobre los que se colocaron las neuroesferas en diferenciación fueron pasados individualmente a los pocillos de una placa de 24 pocillos y se los lavó 2 veces con PBS. Se aspiró la solución del pocillo donde se encontraba el cubreobjeto y se añadió una solución de Glicina 20 mM en PBS durante 15 minutos para disminuir la autofluorescencia. Se

permeabilizaron las muestras mediante la incubación con Tween 20 0.1 % en PBS durante 10 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con solución de bloqueo (10% suero normal de cabra en PBS) durante 60 minutos. Se incubaron las neuroesferas con la solución de anticuerpo primario (ver soluciones de anticuerpos primarios en la sección Inmunohistoquímica) durante toda la noche a 4°C (se utilizó un control negativo al cual se omitió la incubación con el anticuerpo primario). Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Se incubaron las muestras con dilución del anticuerpo secundario durante 2 horas (ver sección Inmunohistoquímica) a temperatura ambiente y protegidas de la luz ya que el fluorocromo unido al anticuerpo secundario es fotosensible. Desde este paso del procedimiento las muestras se mantuvieron protegidas de la luz. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Luego se incubaron las muestras con DAPI 1/1000 por 5 minutos. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Finalmente se procedió al montaje de los cubreobjetos, añadiendo gotas de 5-10µl de medio de montaje (FluoromountG) sobre el portaobjetos, y colocando el cubreobjetos con las células hacia la solución de montaje, sobre cada gota. Se dejaron secar durante 2 horas en posición horizontal y luego se guardaron a 4°C protegidos de la luz hasta su observación.

La observación de las muestras se realizó en un microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS 4D láser, con un objetivo de 63 aumentos o en un microscopio invertido motorizado para campo claro, contraste de fase, Nomarsky y epifluorescencia IX81F3 (Olympus).

Los ensambles de las fotos de contraste de fase se realizaron en Photoshop. La longitud axonal, el diámetro de las neuroesferas y la intensidad de fluorescencia de las inmunocitoquímicas se midieron utilizando el software Image J.

## **5. Análisis estadísticos.**

Todas las cuantificaciones fueron realizadas sin conocimiento de la condición analizada. Los datos fueron presentados como la media y su error estándar. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Prisma 5.1. La comparación estadística de los diferentes grupos se realizó utilizando ANOVA

de una vía seguido del posttest de comparación múltiple de Tukey si la distribución de las muestras era normal. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis con posttest de comparación múltiple de Dunn cuando las muestras no presentaban una distribución normal. En los casos en donde sólo se compararon dos tratamientos, la diferencia entre estos fue evaluada utilizando la prueba t de Student si la distribución de las muestras era normal. Se utilizó el test no paramétrico de Mann Whitney cuando las muestras no presentaban una distribución normal. En la comparación de proporciones se utilizó el test de Chi cuadrado. Una  $p < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa. Los distintos grados de significancia entre los grupos comparados fueron indicados con asteriscos en los gráficos (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

# Resultados

## **1. Determinación y diferenciación neuronal de células progenitoras provenientes del MC. Estudios in vitro.**

Con el objetivo de determinar si las células madre del MC tienen la capacidad de originar CGR, se cultivaron células disociadas del MC de embriones de pollo de E7. Se utilizaron embriones de E7, ya que se ha visto que en explantos de retina obtenidos en esta etapa del desarrollo se obtiene el mayor crecimiento axonal de las CGR (Ortalli y col., 2012). Se facilitó la formación de neuroesferas para amplificar la población celular. Posteriormente se cultivaron las neuroesferas sobre un sustrato con polilisina y laminina y se las estimuló con insulina y FGF2 para definir si esta combinación de factores tróficos promueve la diferenciación a CGR. Se evaluaron distintas concentraciones de insulina y FGF2 para determinar qué concentraciones ejercen el mayor efecto sobre la diferenciación hacia CGR.

Con el objeto de definir si las células madre del MC poseen información posicional en E7, se obtuvieron neuroesferas a partir del MC nasal y temporal. Se comparó la expresión de moléculas que determinan o mantienen la información posicional.

Con el objetivo de estudiar si las CGR obtenidas expresan las moléculas del sistema Eph/ephrinas y son competentes para responder a estímulos de este sistema, se evaluó la respuesta axonal de las CGR -derivadas de las células madre de las neuroesferas- ante el ectodominio de EphA3 y ephrina-A2.



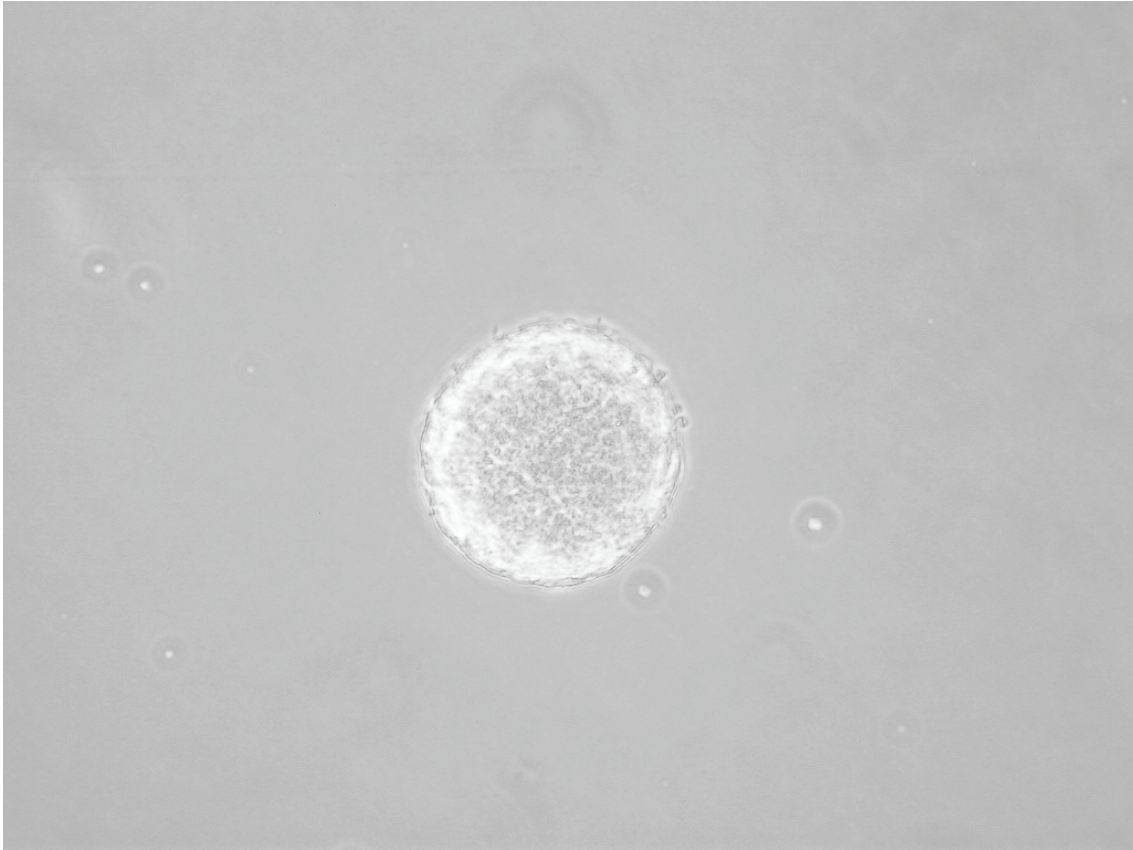
### **1.1. Producción y expansión de neuroesferas obtenidas a partir del MC de la retina de embriones de pollo.**

Con el objetivo de obtener neuroesferas a partir del MC de la retina de embriones de pollo, se extrajo el MC de la parte nasal (N) y temporal (T) de ojos de embriones de E7, y se realizaron cultivos en flotación de células disociadas. En la Figura R1 se observa un ejemplo de las neuroesferas obtenidas con esta metodología.

Con el objetivo de corroborar que las células en expansión son células madre/progenitoras de la retina:

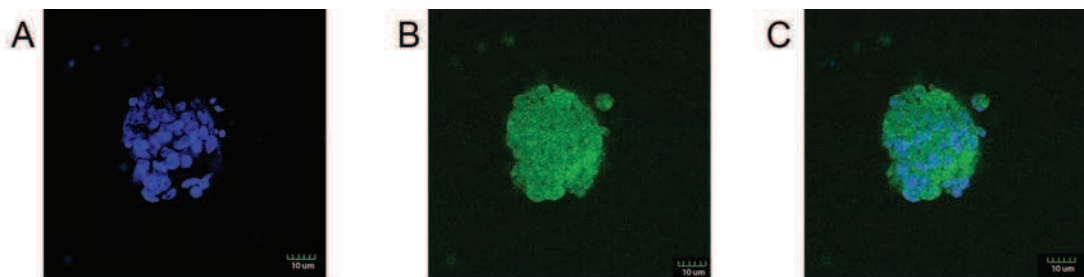
a) Se realizaron pasajes sucesivos . El mantenimiento de las neuroesferas a través del tiempo corrobora que las mismas están formadas por células madre/progenitoras (Louis y col., 2008; Azari y col., 2011).

b) Se realizaron inmunocitoquímicas con anticuerpos anti-nestina y anti- Pax6 combinado con anti-Chx10. El hecho de que todas las células observadas en las neuroesferas expresan nestina muestra que las mismas son células neurales indiferenciadas (Figura R2). El hecho de que una alta proporción de las células de las neuroesferas coexpresan Pax6 y Chx10 muestra que por lo menos las células con doble marca son células madre/progenitoras de la retina neural (Figura R3) (Spence y col., 2004).



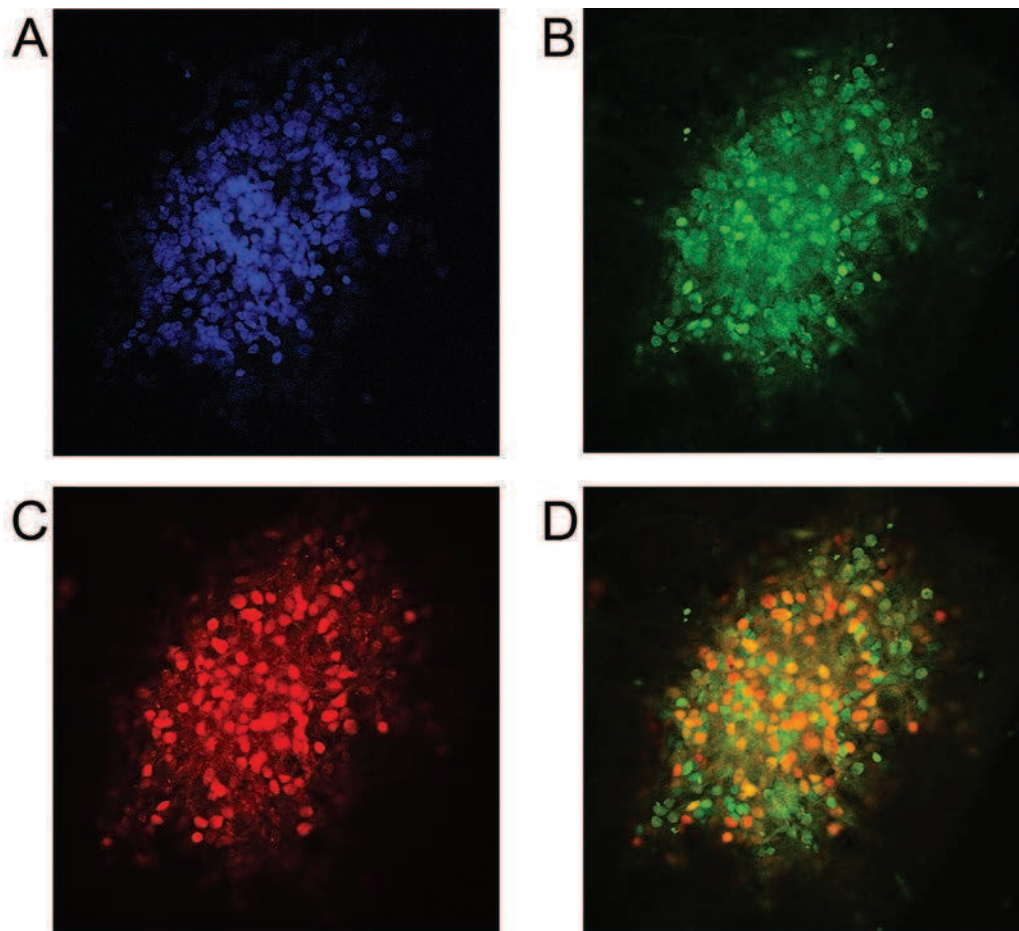
**Figura R1.** Neuroesfera en flotación obtenida a partir del MC de la retina de pollo de embriones de E7. Fotografía tomada con contraste de fase.

---



**Figura R2.** Fotografías de microscopía confocal de una neuroesfera formada por células obtenidas del MC. A. Tinción nuclear con Hoechst (azul). B. Inmunocitoquímica contra nestina (verde). C. Superposición de A y B. Todas las células expresan nestina.

---



**Figura R3.** Fotografías de microscopía confocal de una neuroesfera formada por células obtenidas del MC. A. Tinción nuclear con Hoescht. B-C. Inmunocitoquímica contra Chx10 (verde) (B) y Pax6 (rojo) (C). D. Superposición de B y C. Se observa superposición de Pax6 y Chx10 en una alta proporción de células.

---

Una vez expandidas las neuroesferas, se procedió a tratarlas para inducir la diferenciación de las células madre/progenitoras hacia CGR.

### **1.2. Diferenciación de CGR a partir de células madre/progenitoras expandidas en forma de neuroesferas.**

Fisher y col. (2000) demostraron que la combinación *in vivo* de insulina y FGF2 estimula la producción de CGR. Por este motivo, se cultivaron neuroesferas en sustrato de polilisina-laminina y se realizó una curva con concentraciones

crecientes de una combinación de FGF2/Insulina (relación 1:20, utilizada por Fisher y col, 2000) con el objetivo de determinar la concentración que produzca la mayor proporción de CGR dentro de la población. Las concentraciones utilizadas pueden verse en la Tabla R1.

Condición	Insulina ( $\mu\text{g/ml}$ )	FGF2 ( $\mu\text{g/ml}$ )
0	0	0
1	5	0.25
2	25	1.25
3	50	2.5
4	75	3.75
5	100	5

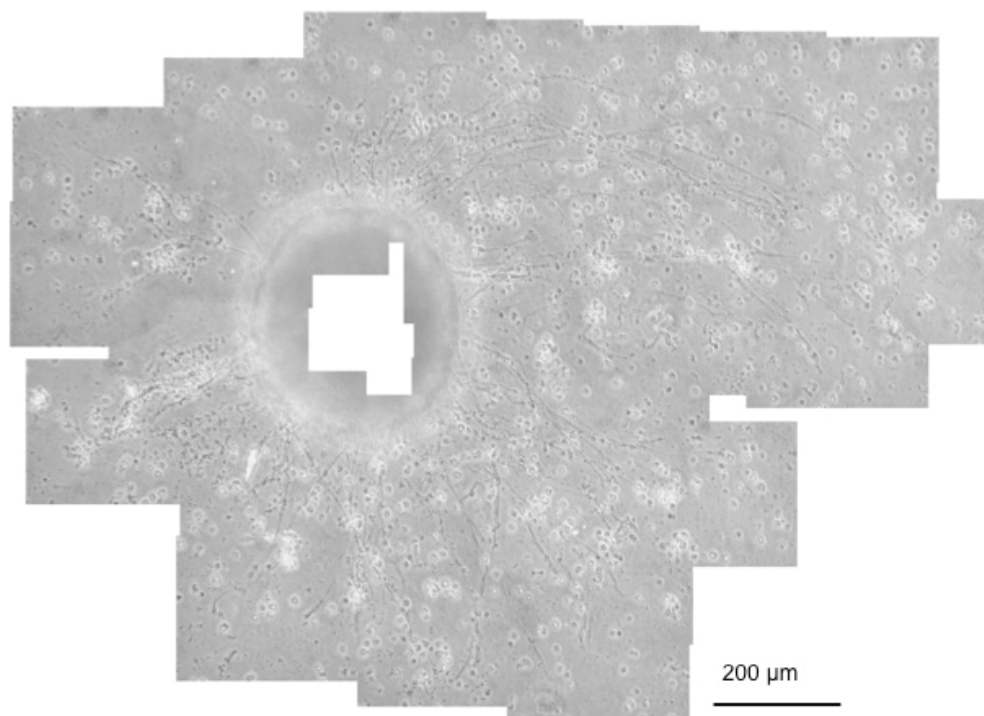
**Tabla R1.** Concentraciones de Insulina y FGF2 utilizadas en los cultivos de neuroesferas en condiciones de diferenciación.

---

En la Figura R4 se observa un ejemplo de una neuroesfera en condiciones de diferenciación, en la cual se obtuvo un alto grado de diferenciación de CGR. A partir de las neuroesferas se realizaron las siguientes mediciones: a) Presencia de axones que abandonan la neuroesfera. Se consideraron axones con una longitud mayor a 100  $\mu\text{m}$ . Esto define la presencia de neuronas de proyección (CGR). b) Densidad axonal (número de axones por cada 100  $\mu\text{m}$  del perímetro de las neuroesferas). c) Longitud axonal.

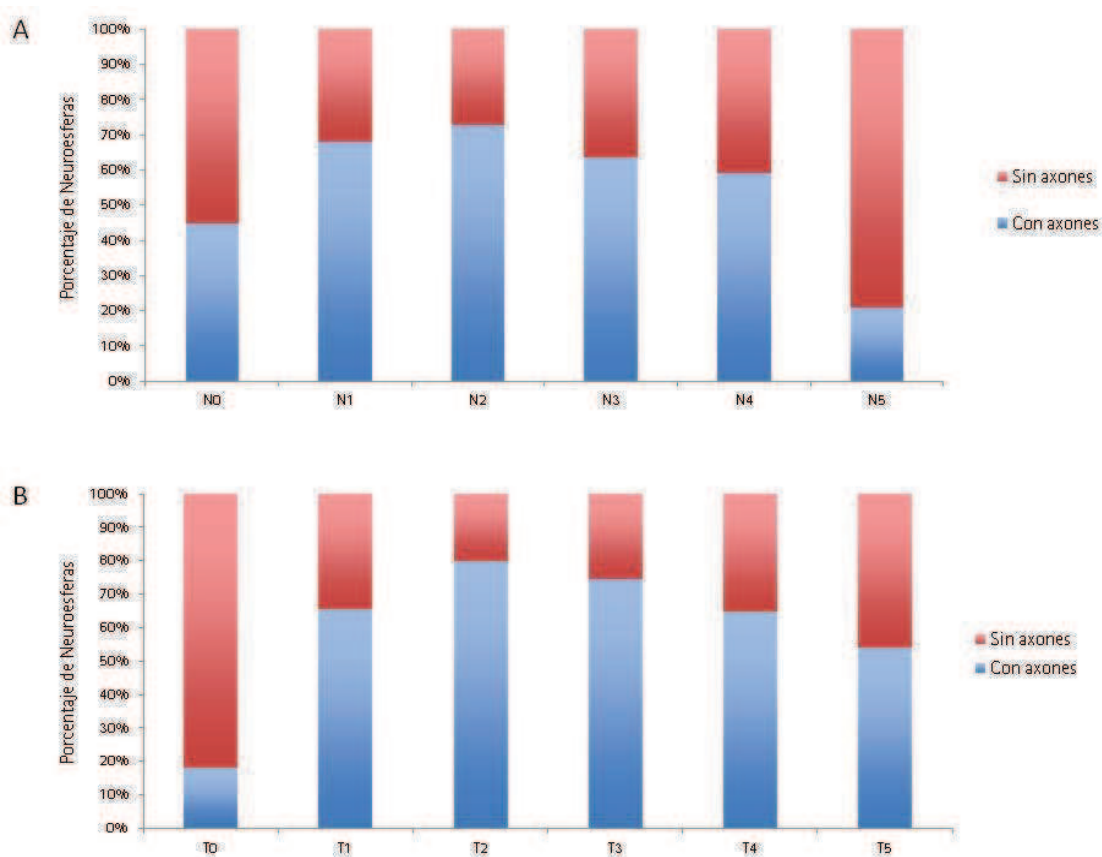
Lo primero que se determinó fue la presencia o ausencia de axones en todas las neuroesferas presentes en cada una de las condiciones de cultivo. En la Figura R5 se observa que en todas las condiciones se encontraron

neuroesferas con neuronas con axones de proyección (n=443 neuroesferas). La proporción de neuroesferas con axones presentó una variación dependiente de las concentraciones de insulina y FGF2. Tanto en las neuroesferas obtenidas del MC nasal como temporal, la proporción de neuroesferas con axones presentó un ascenso hasta la condición 2 (insulina: 25  $\mu\text{g/ml}$ , FGF2: 1.25  $\mu\text{g/ml}$ ) en la cual se registró la mayor proporción de neuroesferas con axones. La proporción de neuroesferas con axones presentó un descenso paulatino a mayores concentraciones de insulina y FGF2. La curva de neuroesferas de origen temporal está levemente desplazada hacia la derecha con respecto a la de origen nasal.



**Figura R4.** Reconstrucción de microfotografías de una neuroesfera en condiciones de diferenciación (contraste de fase). Se observa el tamaño de la neuroesfera y la cantidad y longitud de los axones.

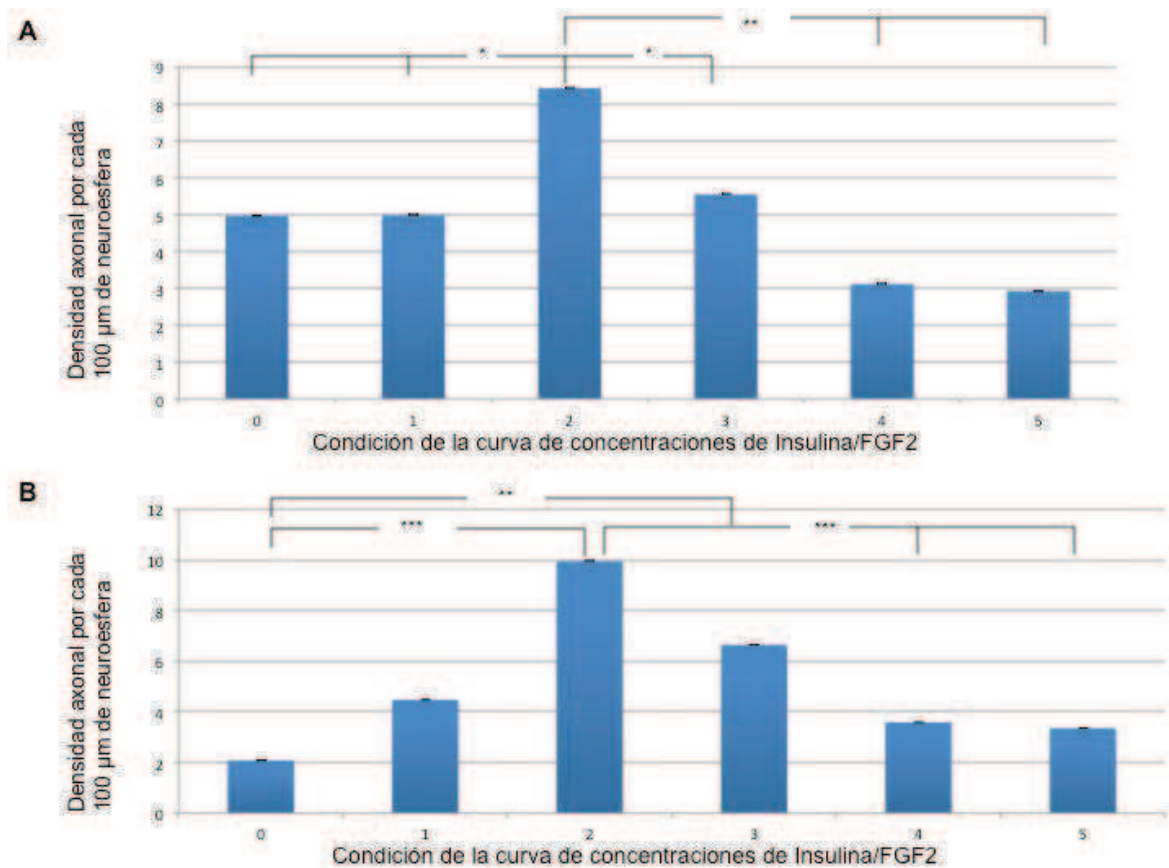
Luego, se midió la densidad axonal, contando la cantidad de axones totales por neuroesfera y relativizando el número de los mismos por cada 100  $\mu\text{m}$  del perímetro de las neuroesferas. Esto permite neutralizar la diferencia del número de axones debida a la diferencia de tamaño de las neuroesferas. En la Figura R6 se muestran los resultados obtenidos. En todas las condiciones de cultivo se obtuvieron axones, pero la mayor densidad axonal se obtuvo en la condición 2, tanto para las neuroesferas obtenidas a partir de la zona N como para las obtenidas desde la zona T. La curva de neuroesferas de origen temporal está levemente desplazada hacia la derecha con respecto a la de origen nasal.



**Figura R5.** Porcentaje de neuroesferas cultivadas en condiciones de diferenciación que presentan axones. A. Neuroesferas provenientes de la zona N del MC de la retina. B. Neuroesferas provenientes de la zona T del MC de la retina. N y T:  $p < 0,0001$  (Chi cuadrado).

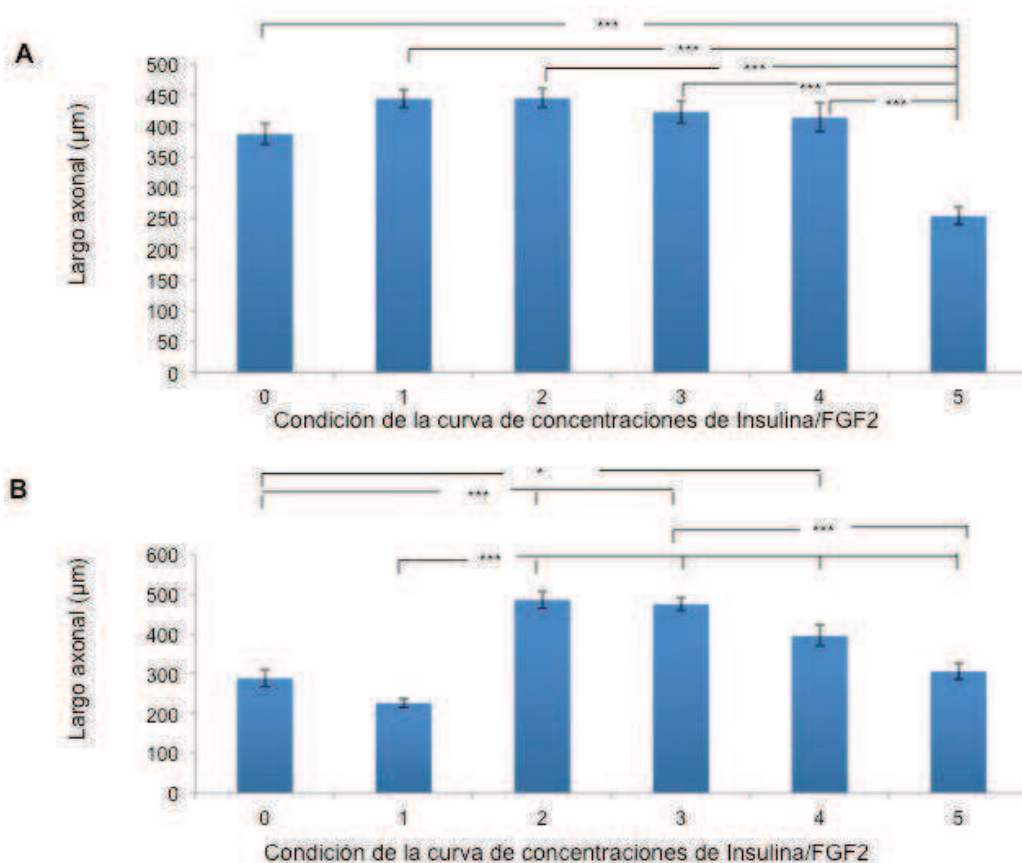


Por último se midió la longitud de cada uno de los axones de las CGR diferenciadas en las neuroesferas. Se midió desde el cono de crecimiento hasta la periferia de la neuroesfera. En la Figura R7 se observa que para las neuroesferas provenientes de la zona T las mayores longitudes axonales se encontraron en la condiciones 2 y 3 del medio de cultivo de diferenciación, mientras que para las neuroesferas provenientes de la zona N las mayores longitudes axonales se encontraron en las condiciones 1 y 2 . Si bien se



**Figura R6.** Medición de la densidad axonal en neuroesferas de origen nasal (A) y temporal (B) en cada una de las condiciones de la curva de diferenciación. 0-5: condición del medio de cultivo (ver tabla R1). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Esto es similar para todas las figuras (ANOVA y posttest de Tukey).

observó un pequeño descenso en las condiciones 3 y 4, esta variación en el crecimiento axonal no fue estadísticamente significativa. La curva de respuesta de las neuroesferas de origen temporal está levemente desplazada hacia la derecha con respecto a la curva de las neuroesferas de origen nasal.



**Figura R7.** Medición de la longitud axonal en neuroesferas de origen nasal (A) y temporal (B) en cada una de las condiciones de la curva de diferenciación (Kruskal-Wallis con posttest de Dunn).

Tanto al evaluar la proporción de las neuroesferas con axones, como la densidad y la longitud axonal, se observó que en la condición 0, donde las



neuroesferas no reciben FGF2 y solamente la insulina aportada por el suplemento B27, las células de las neuroesferas provenientes del MC nasal presentaron una mayor respuesta que las temporales. En coincidencia con esto, a bajas concentraciones de insulina y FGF2 (condiciones 1 y 2) las células de las neuroesferas provenientes del MC nasal presentaron una mayor respuesta que las temporales. Esta diferencia desaparece y se invierte a mayores concentraciones de insulina y FGF2. Este experimento permitió demostrar que la condición 2 de la curva de concentraciones de Insulina/FGF2 (Insulina: 25 µg/ml, FGF2: 1.25 µg/ml) es la óptima para la obtención de CGR a partir de neuroesferas obtenidas del MC. Esto fue coincidente para las neuroesferas provenientes del MC nasal y temporal. Por este motivo, para las siguientes series de experimentos se tomó a la condición 2 como medio de cultivo más adecuado para inducir diferenciación de CGR a partir de células madre/progenitoras.

El hecho de que en los tres parámetros evaluados, las neuroesferas nasales presenten mayor respuesta que las temporales a menores concentraciones de insulina y FGF2, mientras que las temporales presenten mayor respuesta a mayores concentraciones, demuestra que las células madre/progenitoras obtenidas de las dos regiones se comportan como poblaciones diferentes.

### **1.3. Estudio de la expresión del sistema EphA/ephrinas-A.**

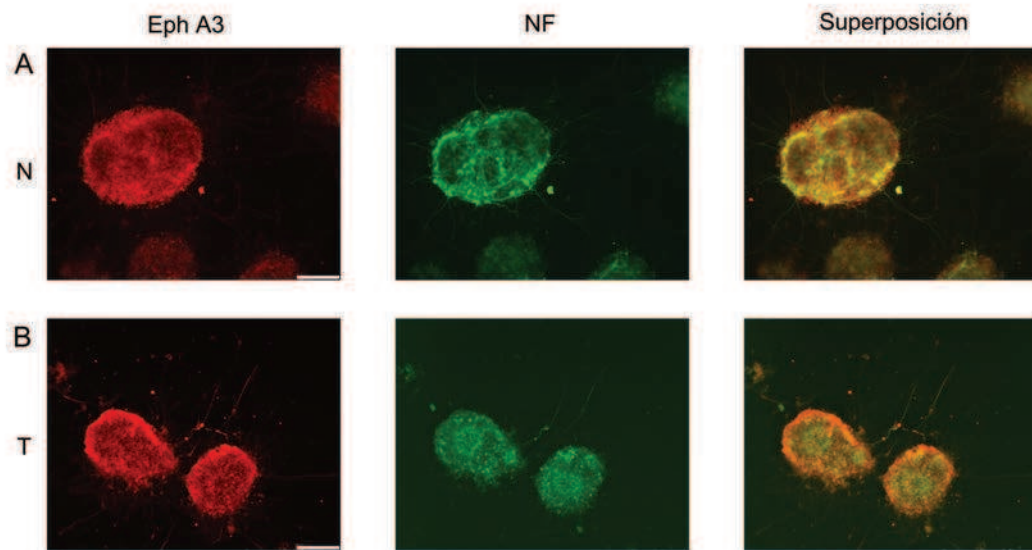
Mediante inmunocitoquímica se estudió el patrón de expresión de las moléculas del sistema EphA/ephrinas-A en las neuroesferas en diferenciación y

específicamente en los axones de las CGR diferenciadas a partir de las células madre/progenitoras de las neuroesferas provenientes de la zona N y T del MC por separado. Los objetivos de este estudio fueron: a) Confirmar que las CGR derivadas de las células/madre progenitoras del MC expresan información posicional y b) determinar si estos axones expresan las moléculas que guían la formación del mapa de conexiones retinotectales.

Se observó la presencia de EphA3 (Figura R8), ephrina-A2 (Figura R10) y EphA4 (Figura R12) tanto en neuroesferas provenientes de la región N (Figuras R8, 10 y 12 A) como de la zona T (Figuras R8 10 y 12.B) del MC. Se realizó una doble marca para neurofilamentos (Figuras R8-14 medio). La presencia de neurofilamentos (NF) confirma que las moléculas del sistema EphA/ephrinas-A se expresan en neuronas y la longitud de los axones que expresan estas moléculas demuestra que éstos corresponden a CGR (únicas neuronas de axón largo de la retina). En todos los casos la expresión de EphA3, ephrina-A2 y EphA4 es mayor en la periferia de las neuroesferas, sector donde predominan las CGR.

Para determinar si existe una diferencia significativa en el nivel de expresión de EphA3, ephrina-A2 y EphA4 entre los axones de las neuroesferas provenientes del MC N y T se midió la intensidad de fluorescencia en los axones de las mismas (Figuras R9, 11 y 13).

Los resultados observados en la Figura R9 muestran que los axones de las CGR provenientes de células madre/progenitoras del MC T presentan una expresión de EphA3 significativamente mayor que los provenientes del MC N (Figura R9B).

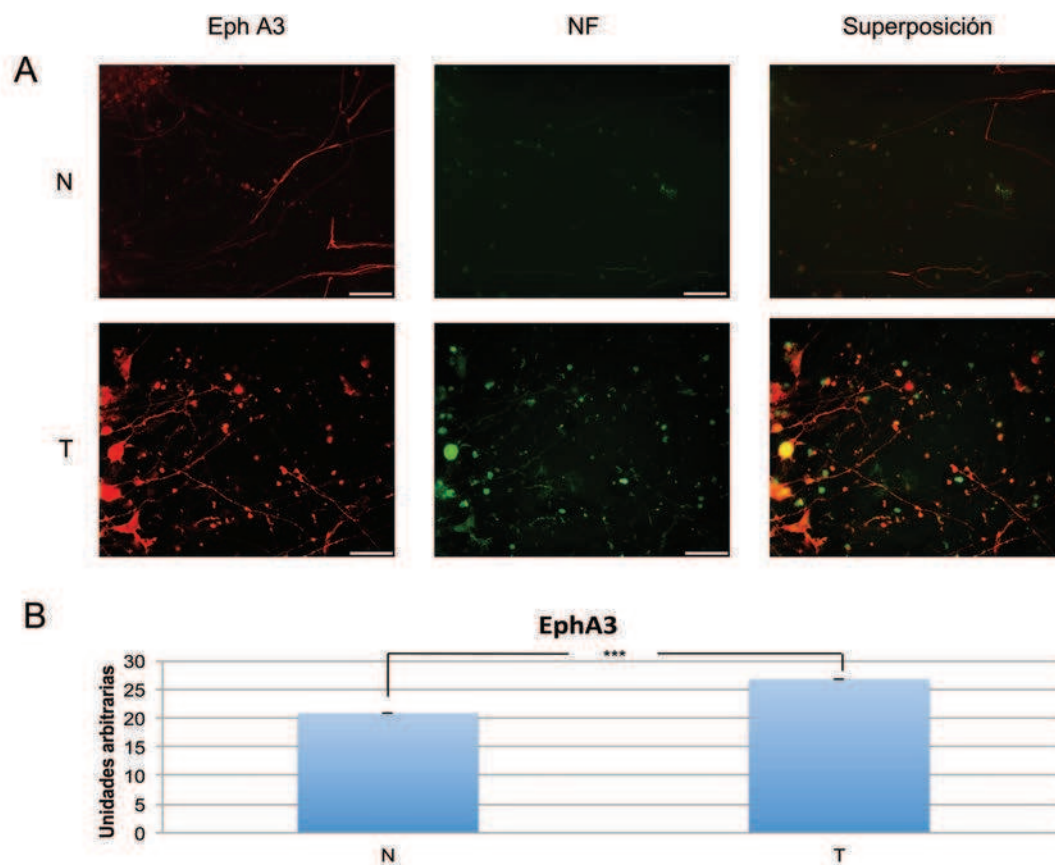


**Figura R8. Expresión de EphA3 en neuroesferas que presentan diferenciación de CGR.**

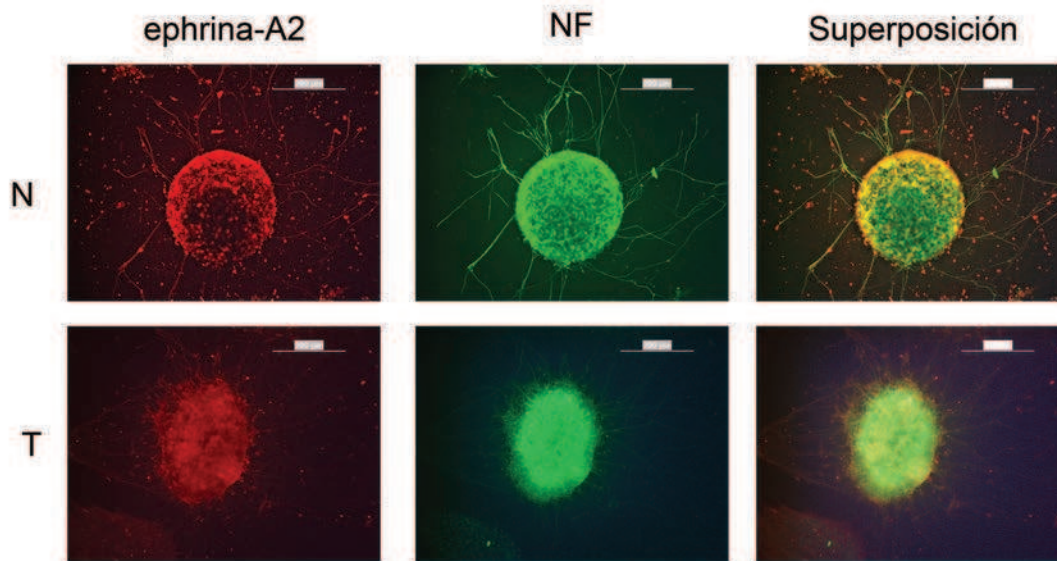
A. Neuroesferas provenientes de la región N del MC (arriba) y de la región T del MC (abajo). Inmunofluorescencia contra EphA3 (rojo) (izquierda); contra neurofilamentos (verde) (medio); superposición de ambas imágenes (derecha). Las imágenes presentan una alta intensidad de fluorescencia en las neuroesferas porque se escogió una exposición que permitiera observar la marca en los axones. Los axones de las CGR T presentan mayor nivel de expresión que los N. Barra: 100µm.

---

Se observó que la ephrina-A2, se expresa tanto en las neuroesferas extraídas y diferenciadas de la zona N como T del MC (Figura R10). Los axones de las CGR diferenciadas a partir de células madre/progenitoras del MC N presentan una expresión de ephrina-A2 significativamente mayor que los provenientes del MC T (Figura R11).

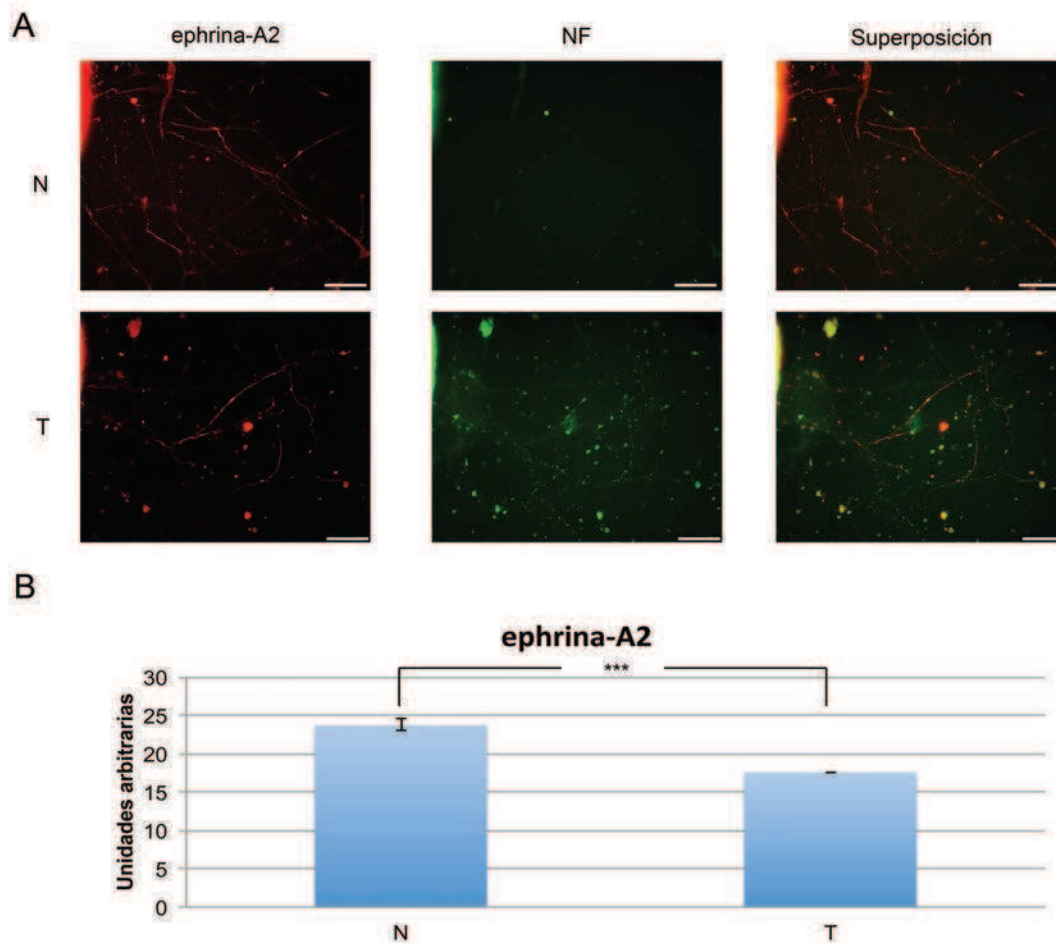


**Figura R9. Expresión de EphA3 en axones de neuroesferas en diferenciación.** A. Axones de neuroesferas provenientes de la región N del MC (arriba) y de la región T del MC (abajo). Inmunofluorescencia contra EphA3 (rojo) (izquierda); contra neurofilamentos (verde) (medio); superposición de ambas imágenes (derecha). B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia medida como densidad óptica integral (DOI). Se observa que los axones T presentan mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney). El gráfico representa uno de 3 experimentos independientes. Se cuantificaron por lo menos 5 neuroesferas por experimento. Los resultados de los otros experimentos son similares.



**Figura R10. Expresión de ephrina-A2 en neuroesferas que presentan diferenciación de CGR.** A. Neuroesferas provenientes de la región N del MC (arriba) y de la región T del MC (abajo). Inmunofluorescencia contra ephrina-A2 (rojo) (izquierda); contra neurofilamentos (verde) (medio); superposición de ambas imágenes (derecha). Los axones de las CGR N presentan mayor nivel de expresión que los T.

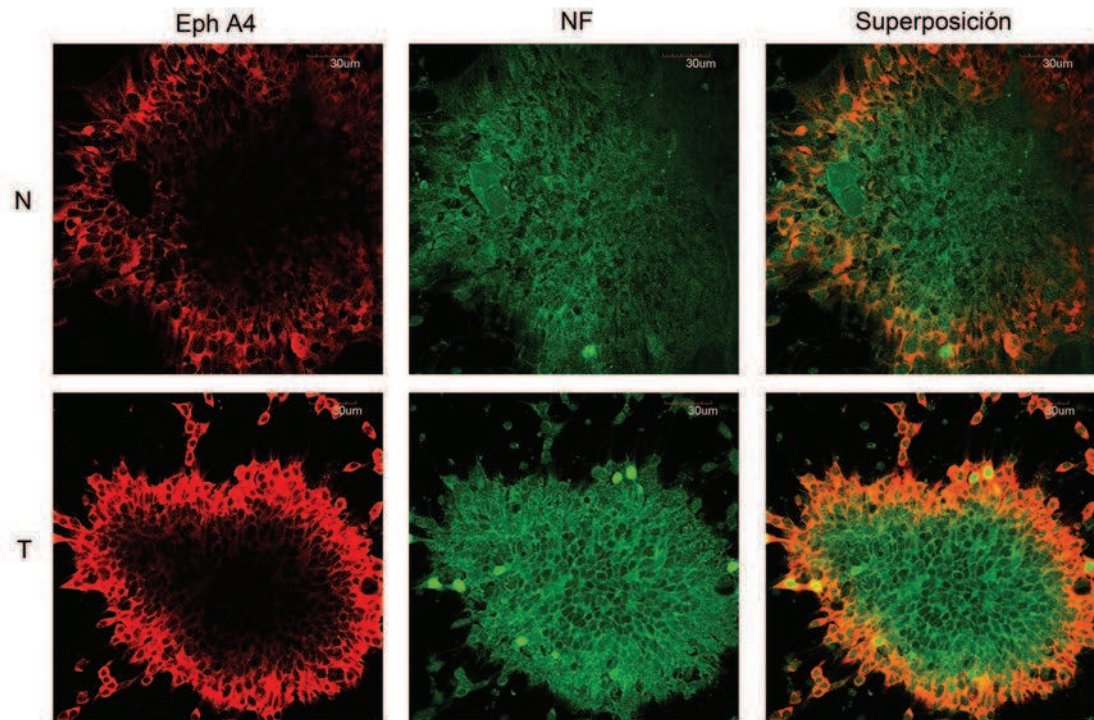
El EphA4 también se expresa tanto en las neuroesferas extraídas de la zona N como T del MC (Figura R12). Utilizando microscopía confocal se puede apreciar que la distribución de EphA4 es casi exclusivamente periférica, expresándose predominantemente en las CGR. En el centro de la neuroesfera se aprecian neuronas que no expresan EphA4. No se hallaron diferencias significativas en la expresión de EphA4 entre los axones de origen N y T midiendo la intensidad de fluorescencia de los mismos (Figura R13).



**Figura R11. Expresión de ephrina-A2 en axones de neuroesferas en diferenciación.** A. Axones de neuroesferas provenientes de la región N del MC (arriba) y de la región T del MC (abajo). Inmunofluorescencia contra ephrina-A2 (rojo) (izquierda); contra neurofilamentos (verde) (medio); superposición de ambas imágenes (derecha). B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia medida como densidad óptica integral (DOI). Se observa que los axones N presentan mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney). Se cuantificaron por lo menos 5 neuroesferas por experimento. Los resultados de los otros experimentos son similares.

En la Figura R14 se observan imágenes tomadas con microscopía confocal para EphA4 y neurofilamentos de neuroesferas N (Figura R14 A y B, respectivamente) y de neuroesferas temporales (Figura R14 D y E, respectivamente).



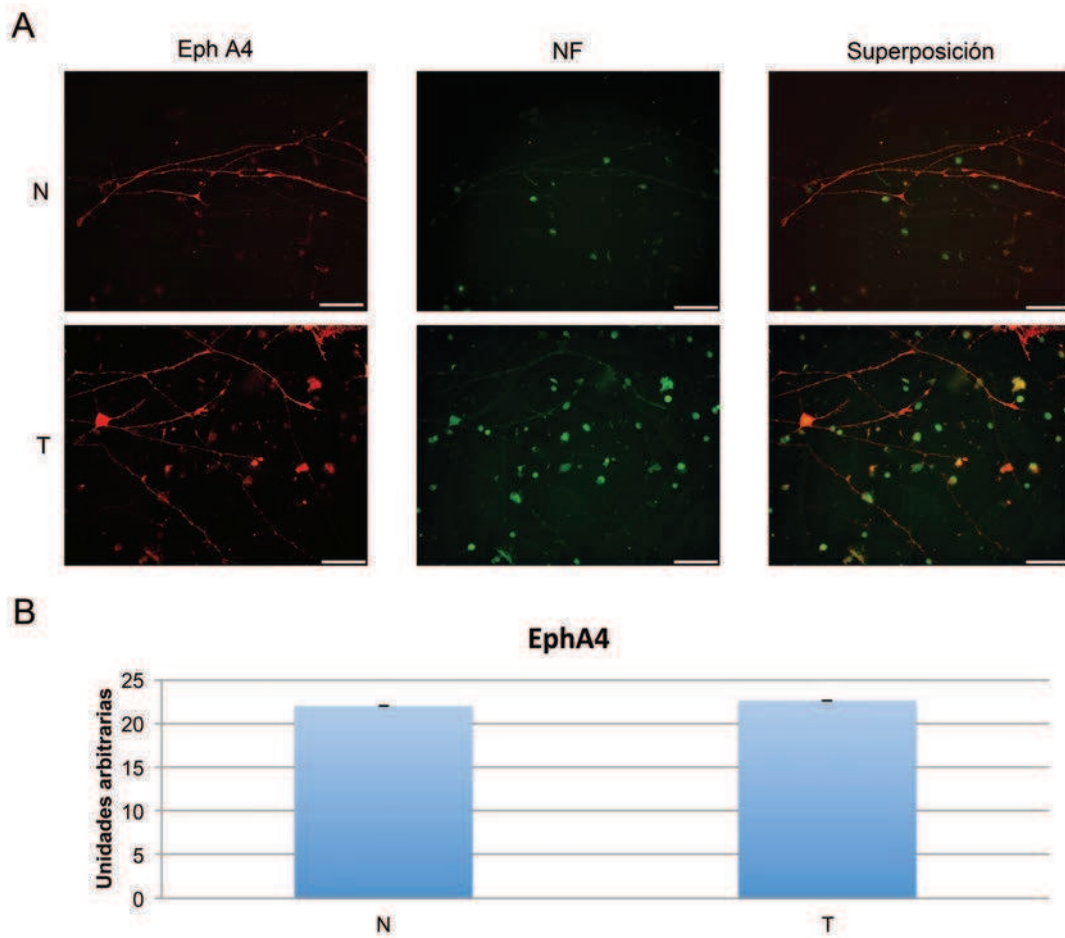


**Figura R12. Expresión de Eph A4 en neuroesferas que presentan diferenciación de CGR.**

A. Neuroesferas provenientes de la región N del MC (arriba) y de la región T del MC (abajo). Inmunofluorescencia contra EphA4 (rojo) (izquierda); contra neurofilamentos (verde) (medio); superposición de ambas imágenes (derecha). Microscopía confocal. Se observa la distribución periférica de EphA4 en coincidencia con las CGR.

---

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que las CGR diferenciadas a partir de células madre/progenitoras del MC expresan las moléculas de guía axonal EphA3, A4 y ephrina-A2. Además, se observa que estas moléculas se expresan de manera diferencial de acuerdo a la zona del MC de la cual se extrajeron las células madre/progenitoras. Así, el EphA3 presenta mayor expresión en CGR T que en N, el EphA4 no presenta diferencias significativas en los niveles de expresión en ambas regiones y la ephrina-A2 se expresa en

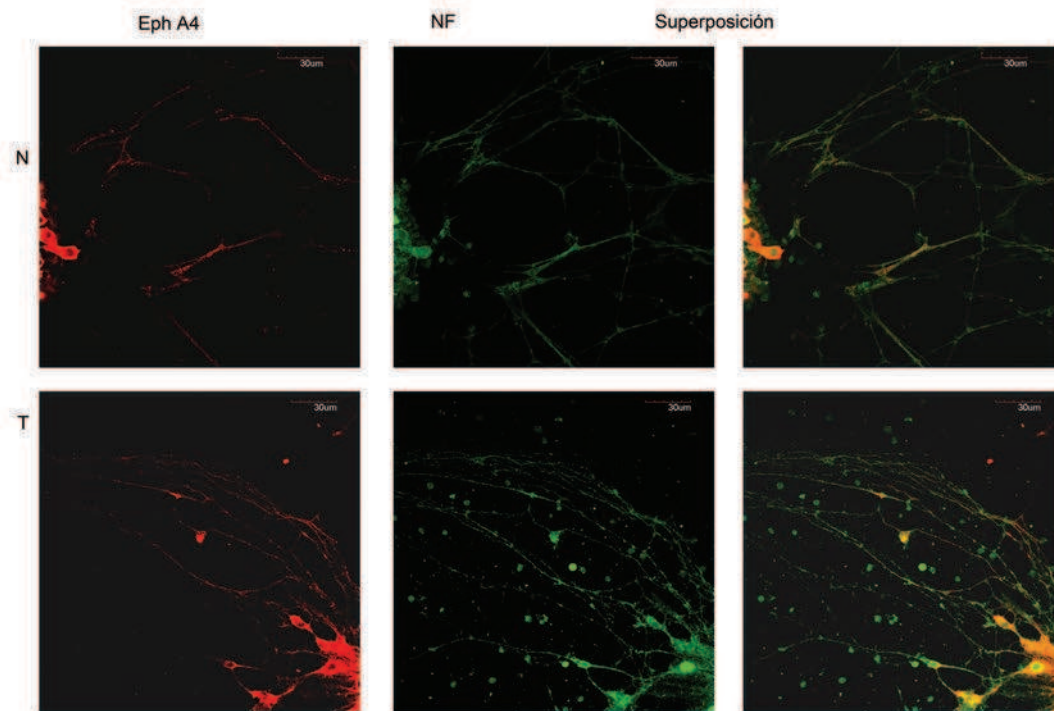


**Figura R13. Expresión de EphA4 en axones de neuroesferas en diferenciación.** A. Axones de neuroesferas provenientes de la región N del MC. B. Axones de neuroesferas provenientes de la región T del MC. Inmunofluorescencia contra EphA4 (rojo) (izquierda); contra neurofilamentos (verde) (medio); superposición de ambas imágenes (derecha). Microscopía confocal. B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia medida como densidad óptica integral (DOI). No se observan diferencias significativas entre los axones de la región N y T (test de Mann Whitney). Se cuantificaron por lo menos 5 neuroesferas por experimento. Los resultados de los otros experimentos son similares.

mayor medida en las CGR N que en las T. Este patrón de expresión es el mismo que el encontrado en las CGR de retina de embriones de pollo, lo cual sugiere que las células madre/progenitoras del MC ya poseían identidad



posicional al momento en que se las extrajo de la retina (E7) para formar las neuroesferas.



**Figura R14.** Microfotografía confocal. Inmunofluorescencia contra EphA4 (rojo) en somas neuronales y axones de neuroesferas nasales (A) y temporales (D). Inmunofluorescencia contra neurofilamentos en somas neuronales y axones nasales (B) y temporales (E). C y F. Superposición de las imágenes A y B (C) y D y E (F).

---

#### 1. 4. Respuesta ante estímulos de crecimiento axonal.

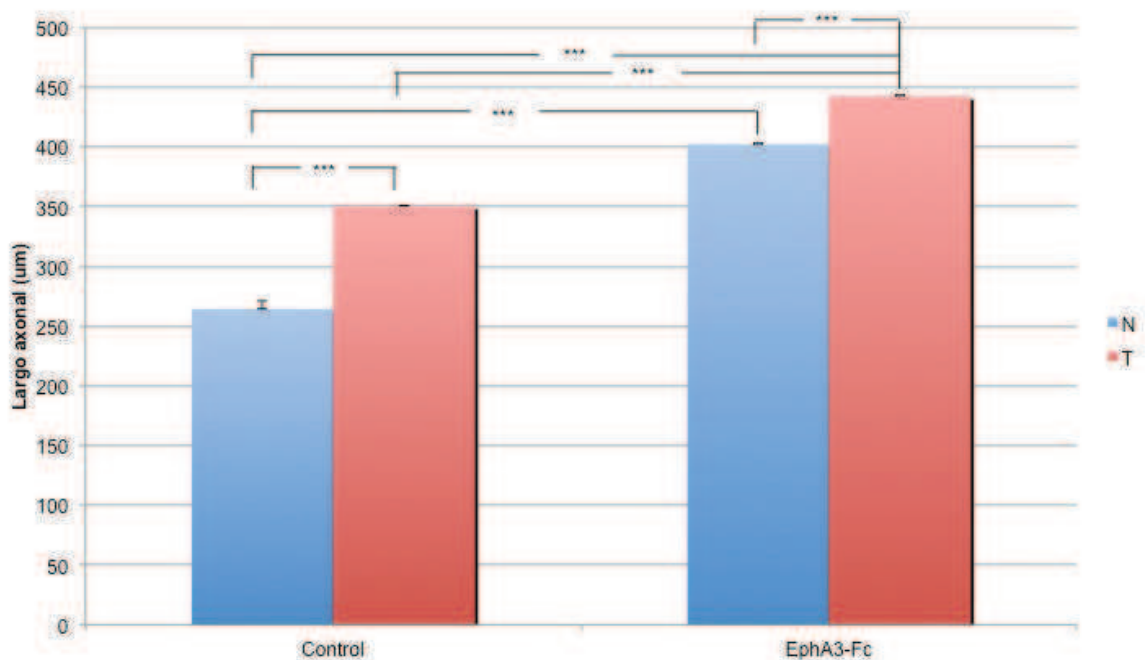
Con el objetivo de estudiar si los axones de las CGR obtenidas por diferenciación de las células madre/progenitoras presentes en las neuroesferas, son competentes para responder a moléculas del sistema de guía axonal Eph/ephrinas, se realizaron dos experimentos de estimulación de los axones en crecimiento con EphA3-Fc y con ephrina-A2-Fc.

#### **1.4.1. Estimulación con EphA3-Fc.**

En explantos de retina de embriones de pollo de E7 se ha demostrado que los axones en crecimiento reaccionan ante estímulos de guía axonal. Particularmente, Ortalli y col. 2012, demostraron que los axones N crecen en mayor medida que los temporales al ser estimulados con EphA3-Fc.

Con el objetivo de estudiar si los axones de las CGR diferenciadas reaccionan ante este estímulo, las neuroesferas fueron sembrados sobre un sustrato de polilisina y laminina, permitiéndose la diferenciación de las CGR durante 24 hs. La molécula híbrida EphA3-Fc (2 nM) (o el fragmento Fc) fue pre-incubada con el anticuerpo anti-Fc en condiciones saturantes de EphA3 (relación 12:1), antes de ser agregada al medio de cultivo (Ortalli y col, 2012). Los neuroesferas fueron cultivados con el estímulo durante 7 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se evaluó el crecimiento axonal como largo axonal promedio.

En la figura R15 se muestra el crecimiento axonal de las CGR de neuroesferas en diferenciación extraídas a partir de la zona N y T del MC. Se observó que los axones de ambos tipos de neuroesferas aumentan su crecimiento al ser estimulados con EphA3-Fc agregado con anti-Fc, siendo la respuesta mayor en los axones de las CGR N.

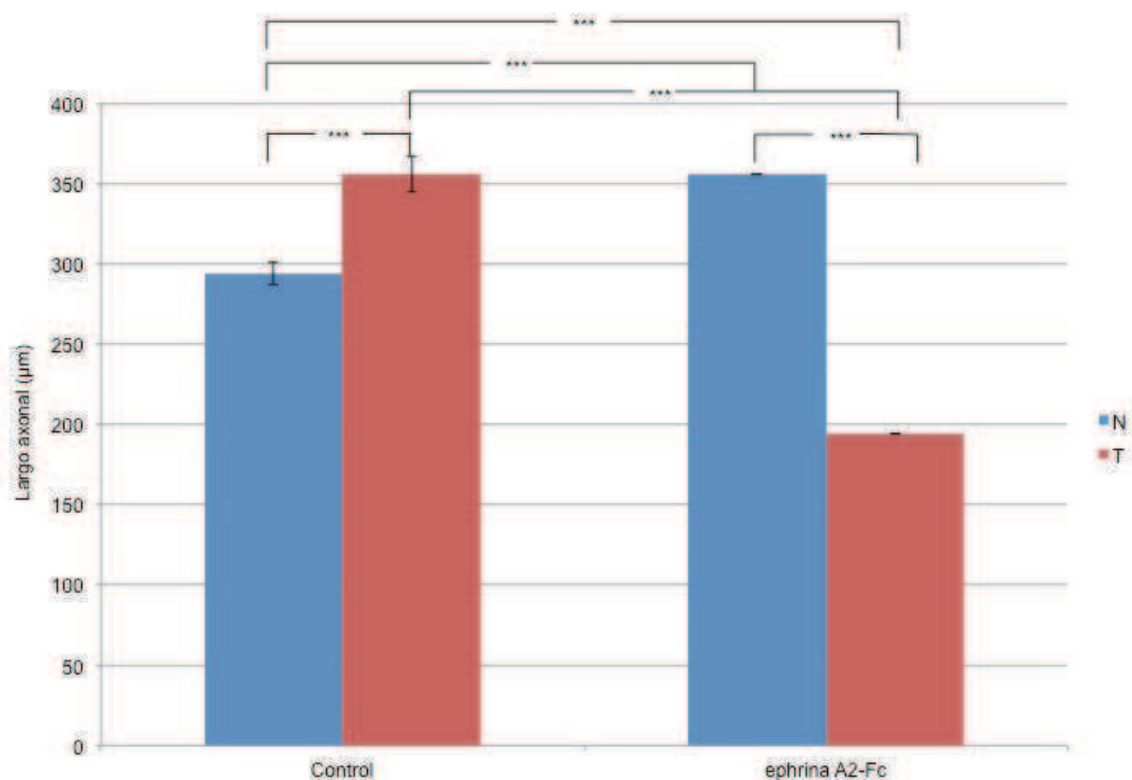


**Figura R15. El ectodominio de EphA3 estimula *in vitro* el crecimiento axonal de las CGR nasal y temporal.** Cuantificación del largo axonal de CGR diferenciadas en neuroesferas obtenidas del MC N o T expuestas a EphA3-Fc agregado (2nM) versus Fc agregado (7 nM) (control). ANOVA y postest de Tukey. Se muestra la cuantificación de uno de 3 experimentos independientes en los que se consideró la longitud de todos los axones medidos en cada neuroesfera. Se cuantificaron por lo menos 3 neuroesferas por condición. Los resultados de los otros experimentos son similares.

#### 1.4.2. Estimulación con ephrina-A2-Fc.

Siguiendo la línea del experimento del punto anterior, se sembraron las neuroesferas sobre polilisina-laminina, se las dejó diferenciar por 24 hs y luego se realizó una incubación por 7 horas con el fragmento Fc (control) o con ephrina-A2-Fc (estímulo) agregados con el anticuerpo anti-Fc. Para este experimento se utilizó una solución 2 nM de ephrina-A2-Fc con la misma relación ephrina- A2-Fc anti Fc (12:1) que en el experimento realizado con EphA3 (Ortalli y col., 2012).

En la Figura R16 se muestra el largo axonal de las CGR diferenciadas en las neuroesferas formadas a partir de la zona N o T del MC y tratadas con Fc-anti-Fc (control) o con ephrina-A2-Fc-anti Fc. Se observó que los axones N aumentaron levemente su crecimiento, mientras que los axones T redujeron en una forma muy marcada su longitud.



**Figura R16. La ephrina-A2 disminuye *in vitro* el crecimiento axonal de las CGR T y provoca un leve aumento en la longitud de los axones de las CGR N.** Cuantificación del largo axonal de CGR diferenciadas en neuroesferas obtenidas del MC N o T expuestas a ephrina-Fc (2nM) agregada con anti-Fc (2nM) versus Fc (7 nM) agregado con anti-Fc (control). ANOVA y postest de Tukey. Se cuantificaron por lo menos 3 neuroesferas por condición. Los resultados de los otros experimentos son similares.

En conclusión, los experimentos de estimulación demuestran que las CGR diferenciadas en las neuroesferas obtenidas del MC responden a estímulos de

guía axonal de forma similar a las CGR de embriones de pollo de E7. Principalmente, los axones N aumentan su crecimiento con la estimulación con EphA3-Fc y los axones T disminuyen su crecimiento con la estimulación con ephrina-A2-Fc.

## **2. Regeneración *in vivo*:**

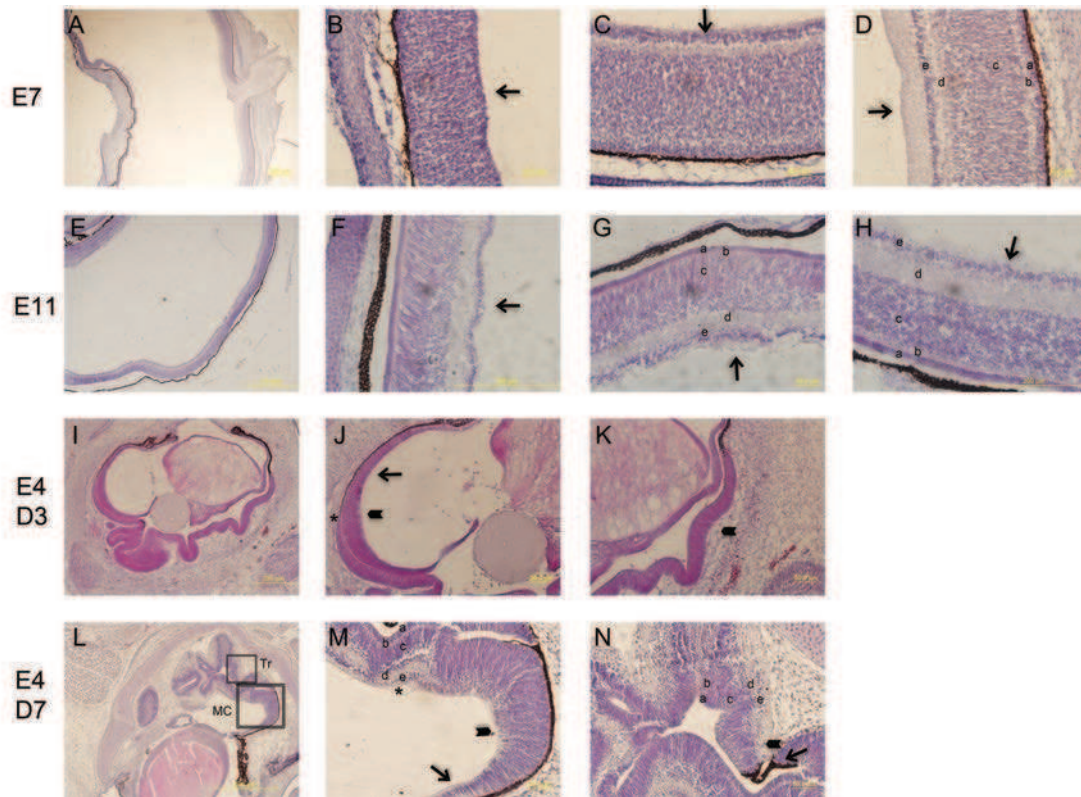
Como se mencionó en la introducción, existen dos formas de regeneración de la retina de embriones de pollo *in vivo* luego de la realización de una retinectomía . La primera es a partir de proliferación y posterior diferenciación de las células madre/progenitoras presentes en el MC del ojo (Figura R17 J y M). La segunda es a partir de la transdiferenciación del EPR (Figura R17 K y N). Este tipo de regeneración se obtuvo inicialmente mediante el agregado de una perla de heparina embebida con FGF2 (Spence y col., 2004).

La regeneración a partir del MC da como resultado una retina semejante a la retina de embriones en desarrollo, mientras que la transdiferenciación del EPR da como resultado una retina con polaridad invertida en el eje radial. Así, las CGR quedan orientadas hacia el mesénquima y los fotorreceptores hacia el humor vítreo. Otra característica de la transdiferenciación es que se pierde el EPR. Una vez que el EPR comienza a transdiferenciarse, las células pierden el pigmento y originan todas las células presentes en la retina neural.

En la transdiferenciación no se observa la formación de nervio óptico. Una de las posibles razones de este fenómeno podría ser la polaridad invertida de las capas celulares de la retina. Además, en este tipo de regeneración se pierde el EPR, que es necesario para el mantenimiento de la vitalidad y para la funcionalidad de los fotorreceptores de la retina neural (Strauss, 2005).

En la Figura R17 A-D se observa la retina de embriones de pollo en E7. Allí se observa el gradiente de desarrollo centro-periferia, siendo la retina de la región periférica la menos desarrollada y la retina central la que posee más capas de células diferenciadas. Lo mismo se observa en la retina de embriones de E11 (Figura R17 E-H). En la Figura R17 también se muestra que la retina

regenerada durante 3 días luego de la retinectomía en E4 (E4D3), tanto a partir del MC como a partir de la transdiferenciación del EPR, se asemeja a la



**Figura R17. Retinas de embriones de pollo en desarrollo (A-H) y en regeneración por efecto de FGF2 (I-N).** Cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina. A-D. Retina en E7. A) Vista general del ojo. B. Región periférica de la retina formada por un neuroepitelio. C. Región intermedia de la retina. Ésta posee una lámina de proliferación externa, una lámina plexiforme, una capa de CGR (flecha) y una delgada capa de fibras provenientes de las CGR. D. Región central de la retina. Ésta presenta una capa nuclear externa, interna y de CGR (flecha) , con capas plexiformes interna y externa y capa de fibras ópticas. E-H. Retina en E11. E. Vista general del ojo. F. Región periférica de la retina. G. Región intermedia de la retina. Ésta presenta una capa nuclear externa, interna y de CGR (flecha), con capas plexiformes interna y externa y capa de fibras ópticas. H. Región central de la retina. I-K. Retina en regeneración 3 días posteriores a la retinectomía realizada en E4 (E4D3). I. Visión general de un ojo en el que se observa regeneración a partir del MC (recuadro) y a partir de transdiferenciación (Tr) (recuadro). J) Regeneración a partir del MC. Detalle de la foto I. Se observa que la retina neural proviene del MC (flecha) y progresa de un neuroepitelio delgado a

una retina más gruesa con una capa de CGR (cabeza de flecha). La retina en regeneración se separa del EPR cuando éste se transdiferencia en retina neural (asterisco), C: Cristalino K. Transdiferenciación. Detalle de la foto I. Se muestra una zona periférica de la retina regenerada en la cual sólo se observa un neuroepitelio. Esta organización tisular coincide con la de la retina periférica normal en E7. Pero el neuroepitelio contacta directamente con el mesénquima externo (punta de flecha). L-N. Retina en regeneración 7 días posteriores a la retinectomía realizada en E4 (E4D7). L. Visión general de un ojo en el que se observa regeneración a partir del MC (recuadro) y a partir de transdiferenciación (Tr) (recuadro). M. Regeneración a partir del MC. Detalle de la foto L. Se observa la progresión de la regeneración desde el MC (flecha), pasando por una retina en forma de neuroepitelio (cabeza de flecha) hasta una retina que presenta una capa nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de CGR (CGR), con capas plexiformes externa (CPE) e interna (CPI) y capa de fibras ópticas (FO) (asterisco). N. Transdiferenciación. Detalle de la foto L. Hacia derecha se observa la transdiferenciación del EPR formando una retina que en un corto trayecto progresa de un neuroepitelio (flecha) a un neuroepitelio con una capa de CGR (cabeza de flecha). Hacia la izquierda se observa una transdiferenciación de más rápida progresión hacia una retina formada por una capa nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de CGR (CGR), con capas plexiformes externa (CPE) e interna (CPI) y capa de fibras ópticas (FO) (asterisco). Obsérvese que las CGR están normalmente orientadas hacia el interior del ojo en la regeneración a partir del MC (M) mientras que se orientan hacia el mesénquima externo en la transdiferenciación –retina de estructura radial invertida-(N) H: perla de heparina con FGF2. En ambos tipos de regeneración se observa que el desarrollo retiniano en la zona más avanzada se asemeja a la estructura laminar de la zona intermedia de una retina en E11 normal.

---

retina periférica de embriones en E7 (comparación entre Figura R17 B, J y K). Se evidencia la desaparición del EPR en la transdiferenciación. Asimismo, la retina regenerada durante 7 días (E4D7), a partir del MC y por transdiferenciación, presenta una estructura laminar parecida a la retina



intermedia de embriones en E11. Se evidencia la orientación radial invertida de la retina regenerada por transdiferenciación.

Para lograr una estrategia regenerativa que dé como resultado un ojo funcional, es necesario que la retina conserve la vitalidad de los fotorreceptores, forme el nervio óptico y establezca conexiones topográficamente ordenadas con el tectum óptico contralateral. Para lograr estos objetivos es de suma importancia:

- 1) Que la retina regenerada presente información posicional y exprese el conjunto de moléculas que dirigen la guía axonal durante su trayecto al tectum y durante la formación de las conexiones topográficamente ordenadas en el mismo. Esto implica que es necesario que las CGR y sus axones expresen el sistema Eph/ephrinas.

- 2) Inhibir la transdiferenciación del EPR y lograr una regeneración de la retina exclusivamente a partir de las células madre/progenitoras presentes en el MC del ojo.

En base a estas dos ideas, se propuso:

- 1) Investigar si la retina regenerada a partir del MC y de la transdiferenciación del EPR expresa el sistema Eph/ephrinas.

- 2) Comparar la eficacia de diferentes tratamientos en producir una retina regenerada exclusivamente a partir de las células madre/progenitoras del MC.

### **2.1. Expresión del sistema Eph/ephrinas en retinas regeneradas a partir del MC y de la transdiferenciación del EPR.**

Por su rol fundamental durante la formación del mapa de conexiones retinotectales, se estudió la expresión de las moléculas del sistema

Eph/ephrinas en la retina regenerada tanto desde el MC como a partir de la transdiferenciación del EP. El objetivo buscado fue determinar si las CG de las retinas regeneradas por ambos mecanismos celulares son competentes para responder al sistema Eph/ephrinas, y presentan por lo tanto, la posibilidad de establecer conexiones retinotectales topográficamente ordenadas, base del funcionamiento del sistema visual.

Con el propósito de analizar la expresión del sistema Eph/ephrinas en retinas regeneradas, se realizaron retinectomías en embriones de pollo de día 4 (E4), y se estimuló su regeneración depositando perlas de heparina cubiertas con FGF2 en la copa óptica luego de la cirugía. Se comparó la expresión de los EphsA3, A4, B2 y B3, y de las ephrinas-A2, B1 y B2 usando inmunohistoquímica en ojos de 3 días de desarrollo postretinectomía (E4D3) y ojos de 7 días de desarrollo postretinectomía (E4D7). Las retinas de los embriones de E4D3 tienen un desarrollo laminar un poco más atrasado que el de las retinas controles de igual edad (E7). Dichas retinas regeneradas presentan una estructura laminar más parecida a la de embriones controles de E5. Las retinas de embriones de E4D7 tienen un desarrollo laminar intermedio entre retinas controles de E9 y E11 (edad equivalente a la de las retinas regeneradas) (Spence y col., 2004). En ambos casos las láminas celulares de las retinas regeneradas por transdiferenciación del epitelio pigmentario son más delgadas que las de las retinas regeneradas a partir del MC. Esto sugiere que la retina transdiferenciada se encuentra en un estado de desarrollo más temprano que la retina regenerada a partir del MC.

En las siguientes figuras se observa la expresión de las moléculas evaluadas en retinas control y en las distintas condiciones de regeneración.

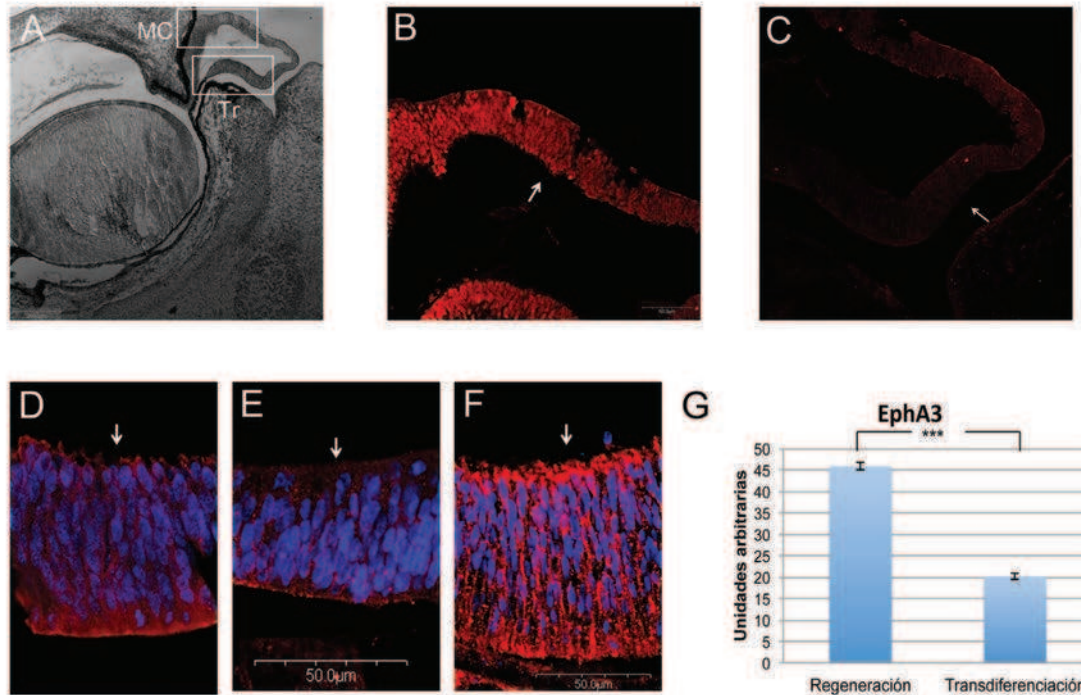
En los paneles A de las Figuras R18-R31 se observan los cortes histológicos de ojos de embriones de pollo que presentan regeneración de la retina tanto a partir del MC como a partir de la transdiferenciación del EP. En los paneles F (E en la figura R20) se observan las inmunocitoquímicas de cortes de retinas control de edades equivalentes.

### **2.1.1. Expresión del Sistema EphA/ephrinas-A.**

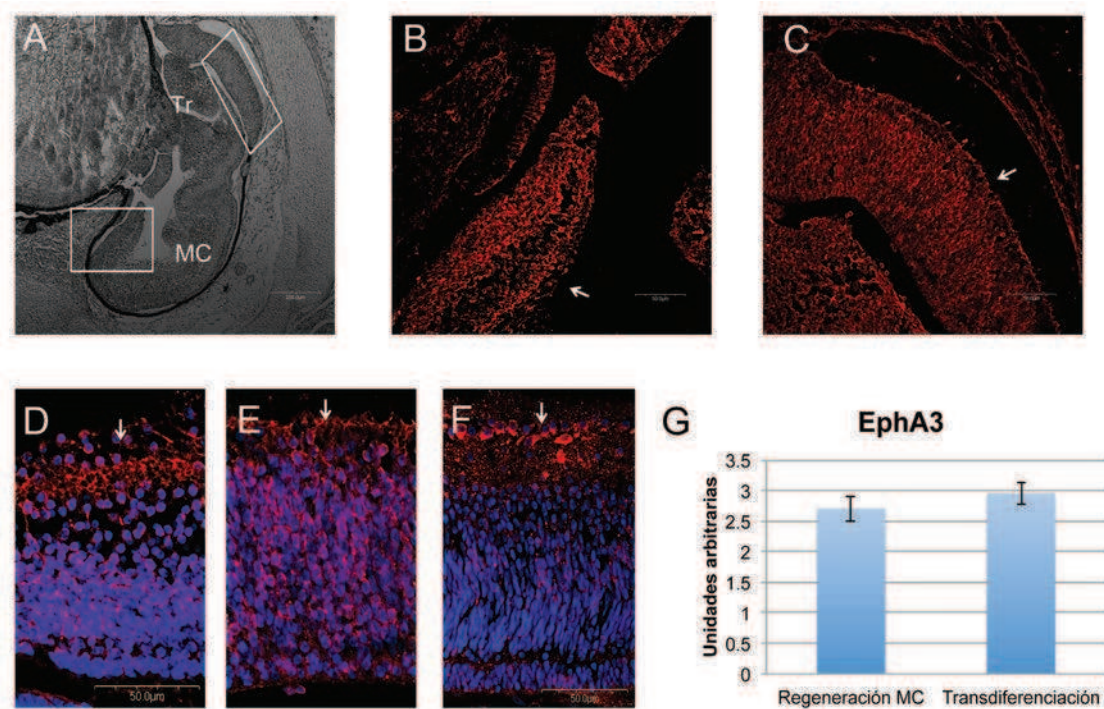
La expresión del EphA3 se observa en la regeneración a partir del MC (Figura R18. B y D, y Figura R19. B y D) y en la retina transdiferenciada (Figura R18. C y E, Figura R19. C y E) tanto en embriones de E4D3 (Figura R18) como en embriones de E4D7 (Figura R19). Sin embargo, se observa que en los embriones E4D7 el EphA3 se expresa en mayor medida en la retina regenerada a partir del MC que en la retina obtenida por transdiferenciación del EP (Figura R18. G), mientras que en los embriones de E4D7 la expresión de esta molécula no presenta diferencias significativas entre ambos tipos de regeneraciones (Figura R19. G).

La expresión del EphA3 se observa en todas las capas de las retinas regeneradas.

El EphA4 se expresa en la regeneración a partir del MC y en la retina transdiferenciada tanto en embriones de E4D3 (Figura R20) como en embriones de E4D7 (Figura R21). Sin embargo, en los embriones E4D3 EphA4 se expresa con mayor intensidad en la retina regenerada a partir del MC que en la retina obtenida por transdiferenciación del EP (Figura R20. F),



**Figura R18. Expresión de Eph A3.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D3. B y C. Inmunohistoquímica para EphA3 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para EphA3 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E7 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. Las flechas indican la posición de las CGR.. En D-F las retinas se colocaron con las CGR orientadas hacia la parte superior. Esto es igual para todas las figuras del capítulo. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (medida como densidad óptica integrada -DOI-) del EphA3 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada a partir del MC presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney). MC: Margen Ciliar; Tr: transdiferenciación. Igual para todas las figuras de este capítulo.



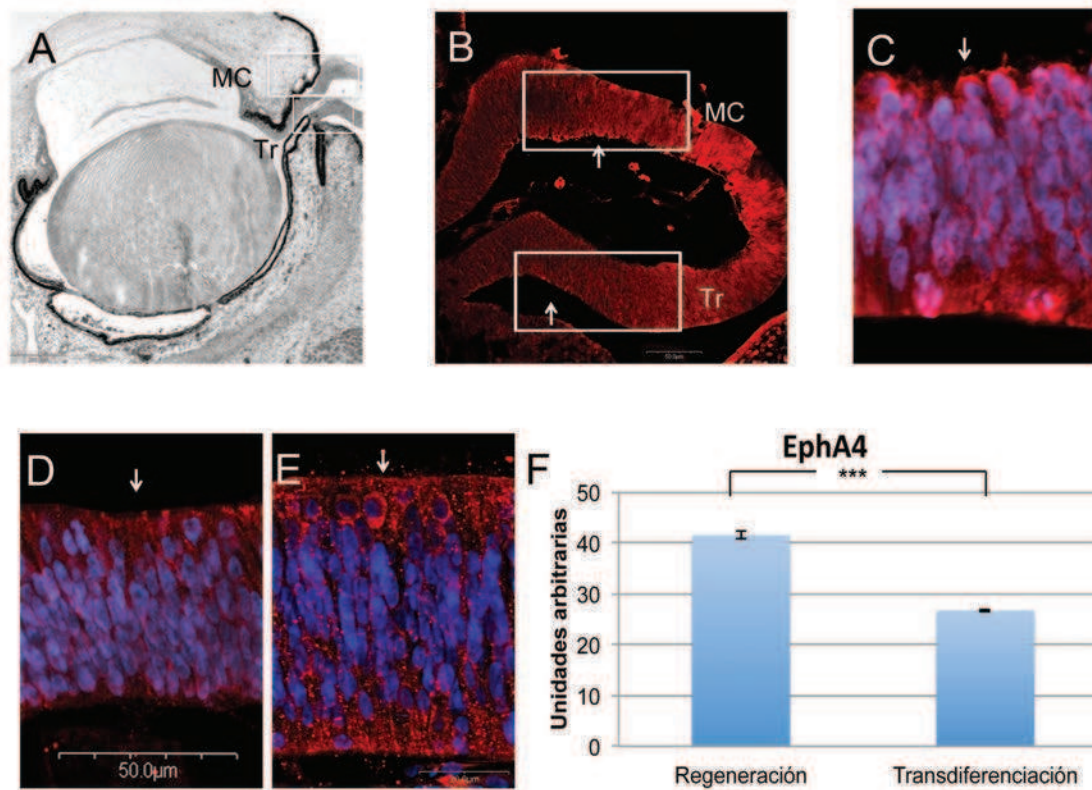
**Figura R19. Expresión de EphA3.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D7. B y C. Inmunohistoquímica para EphA3 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para EphA3 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E11 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) del EphA3 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. No hay diferencias significativas en la intensidad de marca entre las dos condiciones (test de Mann Whitney).

mientras que en los embriones E4D7 la expresión de esta molécula no presenta diferencias significativas entre ambos tipos de regeneraciones (Figura R21. G). La expresión del EphA4 se observa en todas las capas de las retinas regeneradas y disminuye en E4D7.

En las Figuras R22 y R23 se observa la expresión de la ephrina-A2 en embriones E4D3 y E4D7 respectivamente. La ephrina-A2 presenta mayores



niveles de expresión en la retina regenerada a partir del MC en embriones de E4D3 (Figura R22), mientras que no presenta diferencias significativas en sus

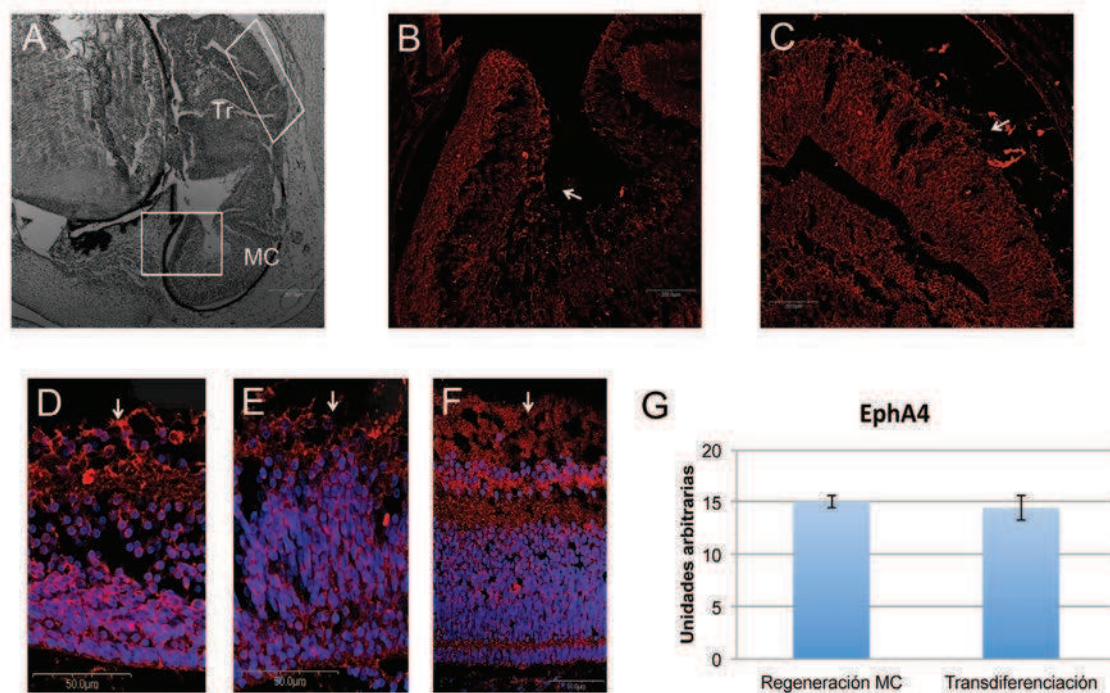


**Figura R20. Expresión de EphA4.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D3. B. Inmunohistoquímica para EphA4 en retina regenerada a partir del MC (recuadro) y por transdiferenciación (Tr) (recuadro). C-E. Superposición de inmunohistoquímica para EphA4 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (C) y por transdiferenciación del EP (D) y en retina en E7 (E). C y D son detalles de B. B-E. Microscopía confocal. F. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de EphA4 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada a partir del MC presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).

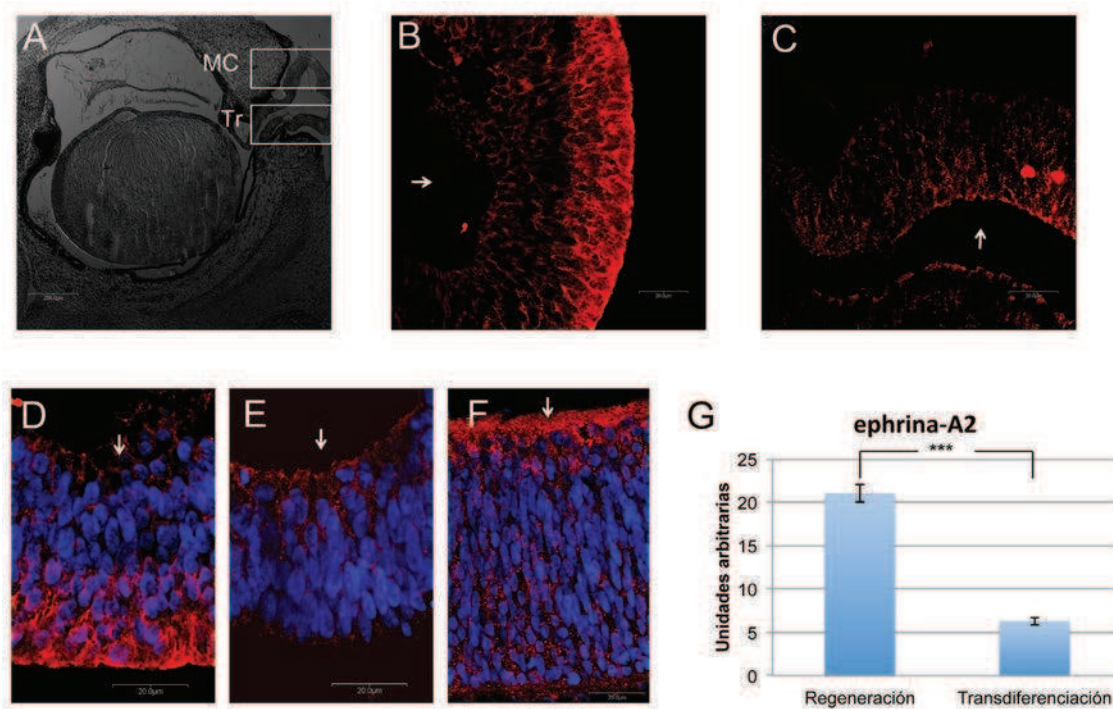
niveles de expresión entre las dos formas de regeneración en E4D7 (Figura R23).

### 2.1.2. Expresión del Sistema EphB/ephrinas-B.

En embriones E4D3, la ephrina-B1 se expresa tanto en la retina regenerada a partir del MC como en la retina transdiferenciada, pero su expresión es mayor en la primera (Figura R24).



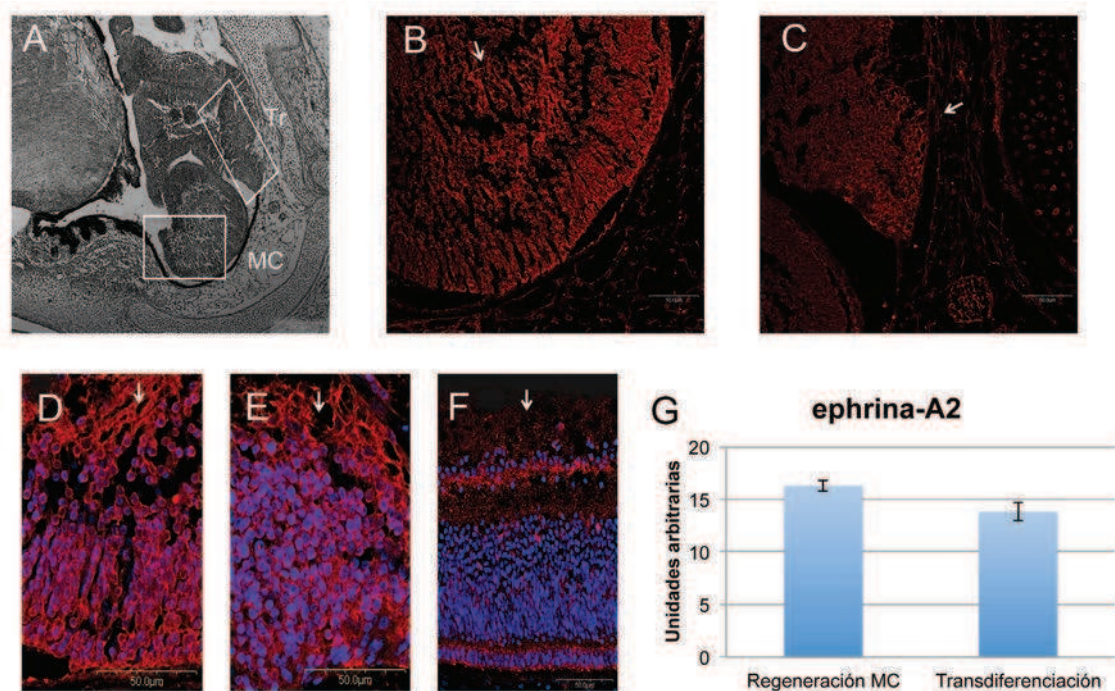
**Figura R21. Expresión de EphA4.** A. Corte de un ojo de embrión de pollo de E4D7. B y C. Inmunohistoquímica para EphA4 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para EphA4 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E11 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) del EphA4 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. No hay diferencias significativas en la intensidad de marca entre las dos condiciones (test de Mann Whitney).



**Figura R22. Expresión de ephrina-A2.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D3. B y C. Inmunohistoquímica para ephrina-A2 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para ephrina-A2 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E7 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de ephrina-A2 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada a partir del MC presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).

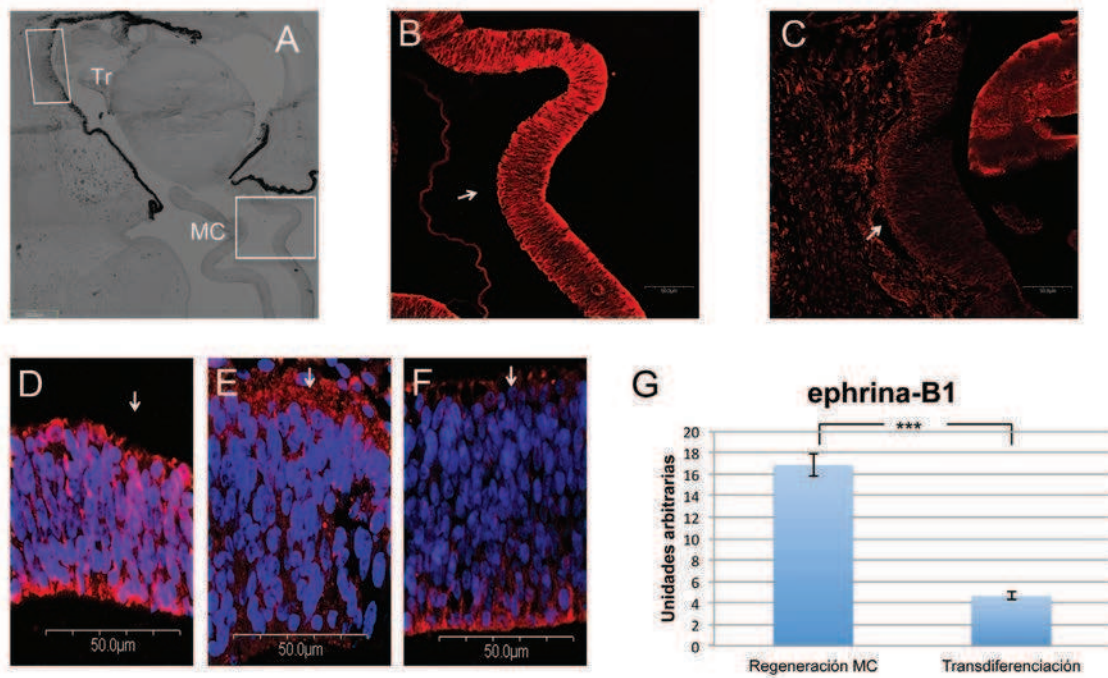
En embriones E4D7, la relación de la intensidad de la expresión de la ephrina-B1 entre las retinas regeneradas a partir del MC y de transdiferenciación del EP, se invierte respecto de los embriones de E4D3, siendo su intensidad mayor en la retina transdiferenciada (Figura R25). Tanto en la retina regenerada a partir del MC como en la retina obtenida por transdiferenciación del EP se observa mayor expresión de ephrina-B1 en la capa de CGR.





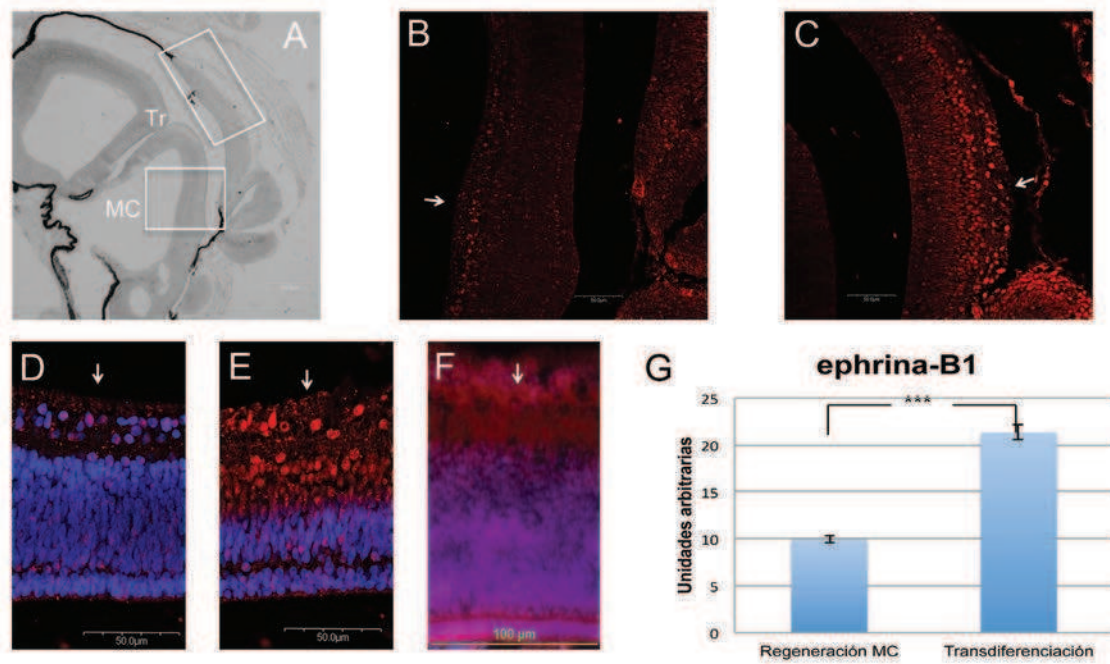
**Figura R23. Expresión de ephrina-A2.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D7. B y C. Inmunohistoquímica para ephrina-A2 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para ephrina-A2 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E11 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de ephrina-A2 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. No hay diferencias significativas en la intensidad de marca entre las dos condiciones (test de Mann Whitney).

En embriones E4D3, la ephrina-B2 se expresa con mayor intensidad en la retina regenerada a partir del MC que en la retina transdiferenciada (Figura R26). En la retina obtenida a partir del MC se observa una mayor expresión de la molécula en la zona más externa de las células neuroepiteliales y en la capa de CGR (Figura R26. B y C). En la retina transdiferenciada existe una mayor expresión de la ephrina-B2 en la capa de CGR (Figura R26. C y E).



**Figura R24. Expresión de ephrina-B1.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D3. B y C. Inmunohistoquímica para ephrina-B1 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para ephrina-B1 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E7 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de ephrina-B1 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada a partir del MC presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).

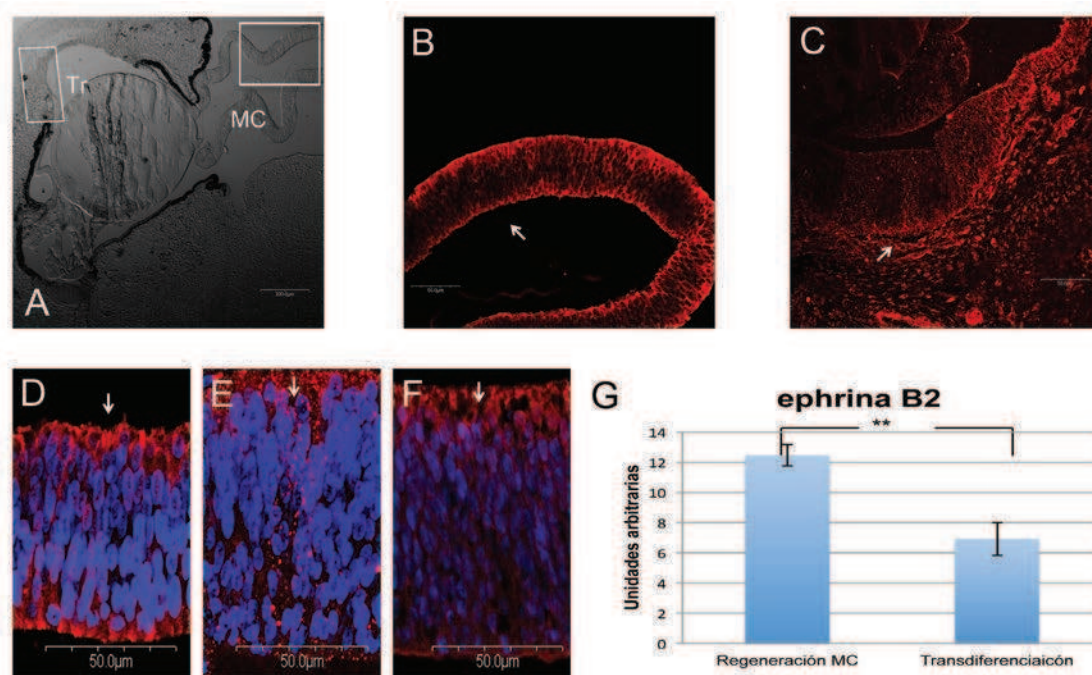
En embriones E4D7 se invierte la relación de la intensidad de expresión de la ephrina-B2 en la retina regenerada a partir del MC respecto de la retina transdiferenciada, siendo mayor en la retina transdiferenciada (Figura R27). En ambos tipos de regeneración se observa una mayor expresión de la molécula en la capa de CGR (Figura R27.B,C,D y E).



**Figura R25. Expresión de ephrina-B1.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D7. B y C. Inmunohistoquímica para ephrina-B1 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para ephrina-B1 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E11 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-E. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de ephrina-B1 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada por transdiferenciación presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).

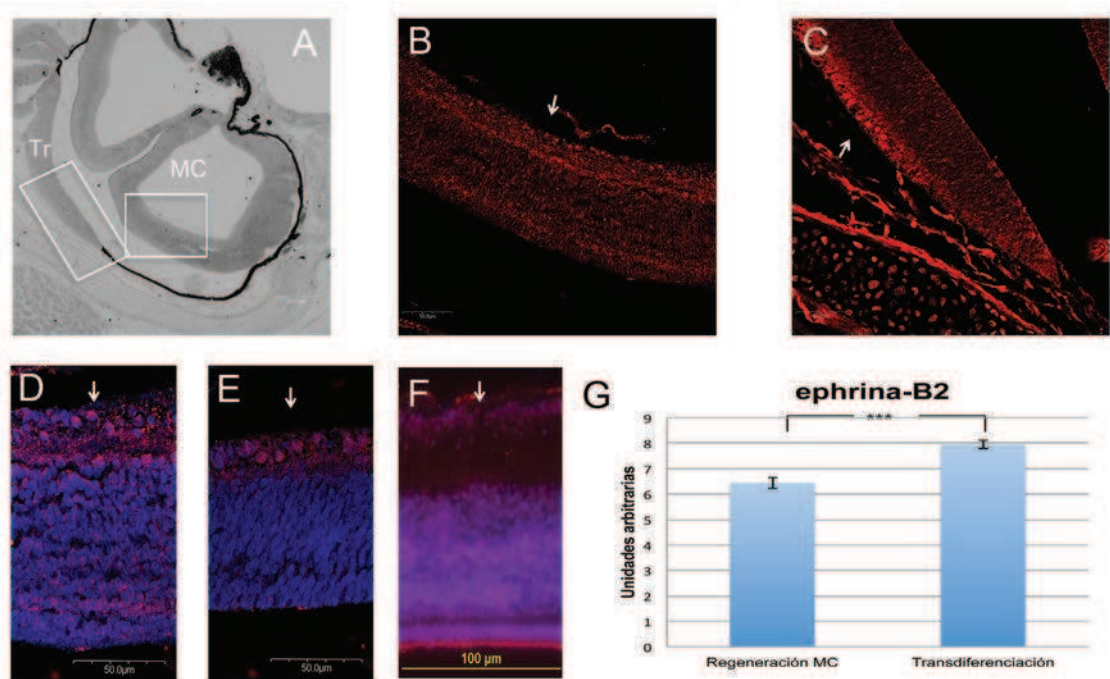
En embriones E4D3 se observa una mayor expresión de EphB2 en la retina regenerada a partir del MC (Figura R28). En esta retina, la molécula en estudio se expresa en mayor medida en la zona más externa de las células neuroepiteliales y en la capa de CGR (Figura R28. B y D), mientras que en la retina transdiferenciada presenta una expresión leve a lo largo de todo el eje radial (Figura R28. C y E).





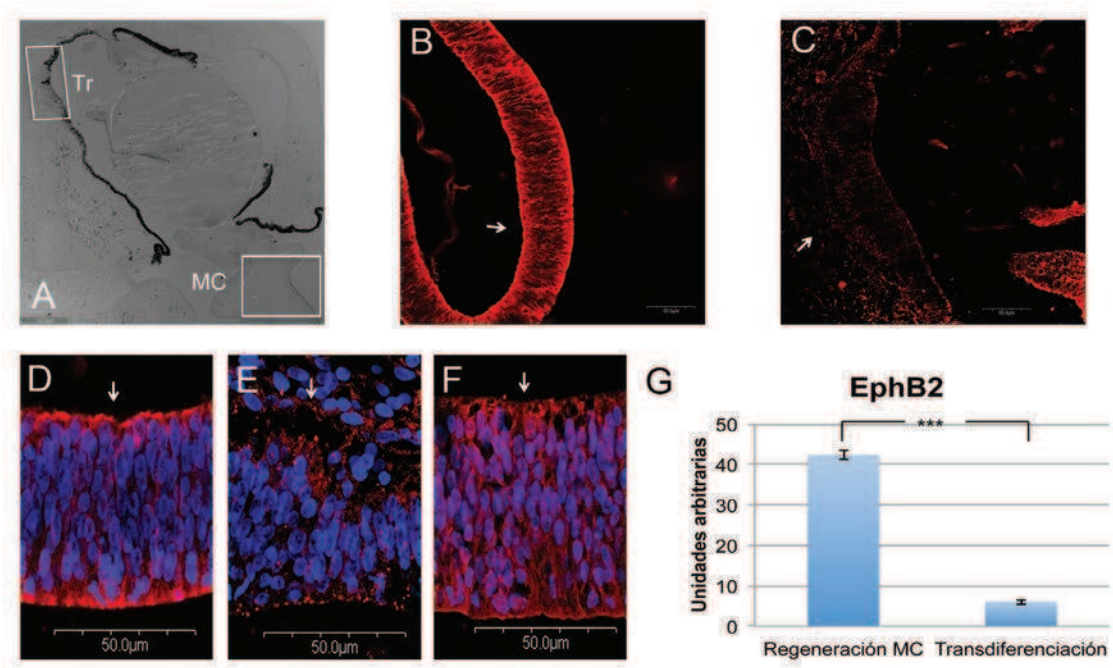
**Figura R26. Expresión de ephrina-B2.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D3. B y C. Inmunohistoquímica para ephrina-B2 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para ephrina-B2 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E7 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de ephrina-B2 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada a partir del MC presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).

En embriones E4D7, se invierte la relación de la intensidad de expresión de EphB2, entre retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación, siendo en este caso mayor en la retina transdiferenciada (Figura R29). Tanto en la retina regenerada a partir del MC (Figura R29. B y D) como en la retina obtenida por transdiferenciación (Figura R29. C y E) se observa mayor expresión de la molécula en la capa de CGR.



**Figura R27. Expresión de ephrina-B2.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D7. B y C. Inmunohistoquímica para ephrina-B2 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para ephrina-B2 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E11 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-E. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de ephrina-B2 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada por transdiferenciación presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).

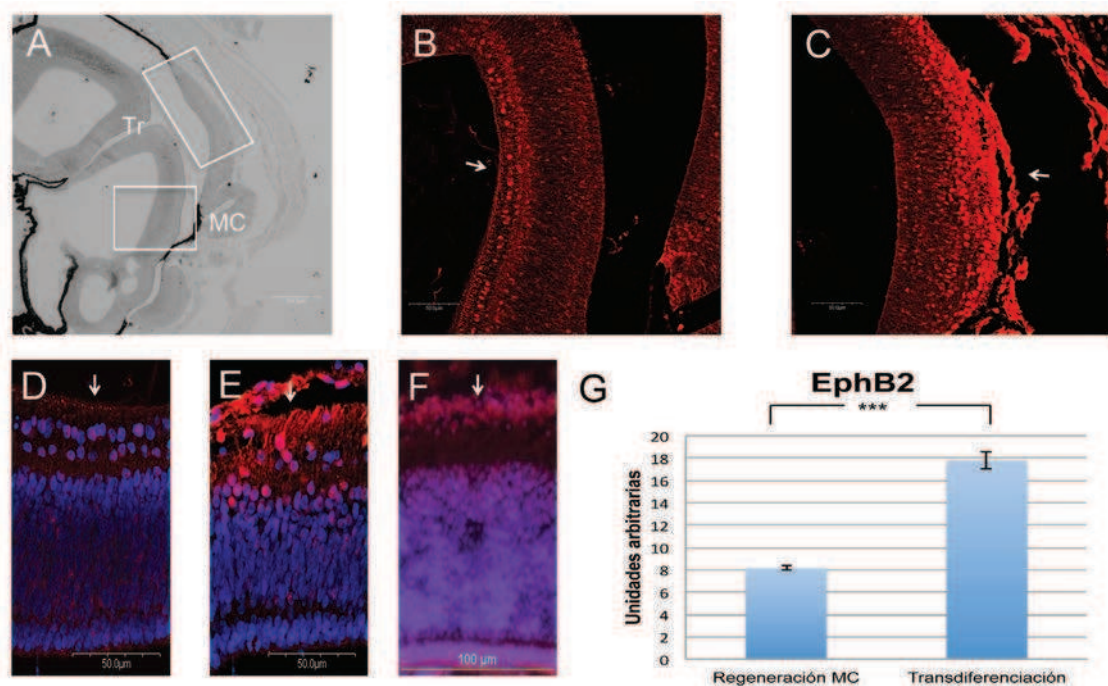
En la Figura R30 se observa que en embriones E4D3, el EphB3 se expresa con mayor intensidad en la retina regenerada desde el MC. En esta retina, la expresión del EphB3 es mayor en la capa más externa de células neuroepiteliales y en la capa de CGR (Figura R30. B y D). Sin embargo, en la retina obtenida por transdiferenciación se observa una expresión homogénea a través de todo el eje radial de la retina (Figura 30. C y E).



**Figura R28. Expresión de EphB2.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D3. B y C. Inmunohistoquímica para EphB2 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para EphB2 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E7 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de EphB2 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada a partir del MC presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).

En embriones E4D7, la expresión de EphB3 no presenta diferencias significativas de intensidad entre ambos tipos de regeneración (Figura R31). En ambos casos, la expresión se observa a lo largo de todo el eje radial de la retina (Figura R31. B-E).

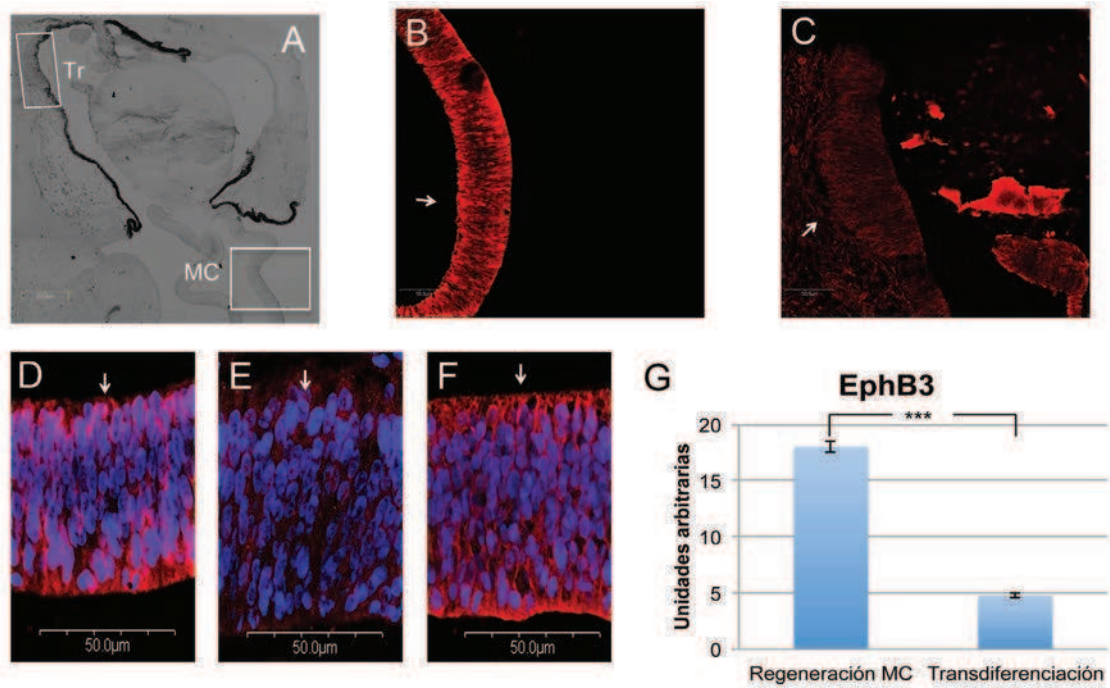
Estos resultados muestran que en ambos tipos de regeneración se expresa el sistema Eph/ephrina. Esto plantea la posibilidad de que los axones de las CGR



**Figura R29. Expresión de EphB2.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D7. B y C. Inmunohistoquímica para EphB2 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para EphB2 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E11 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-E. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de EphB2 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada por transdiferenciación presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).

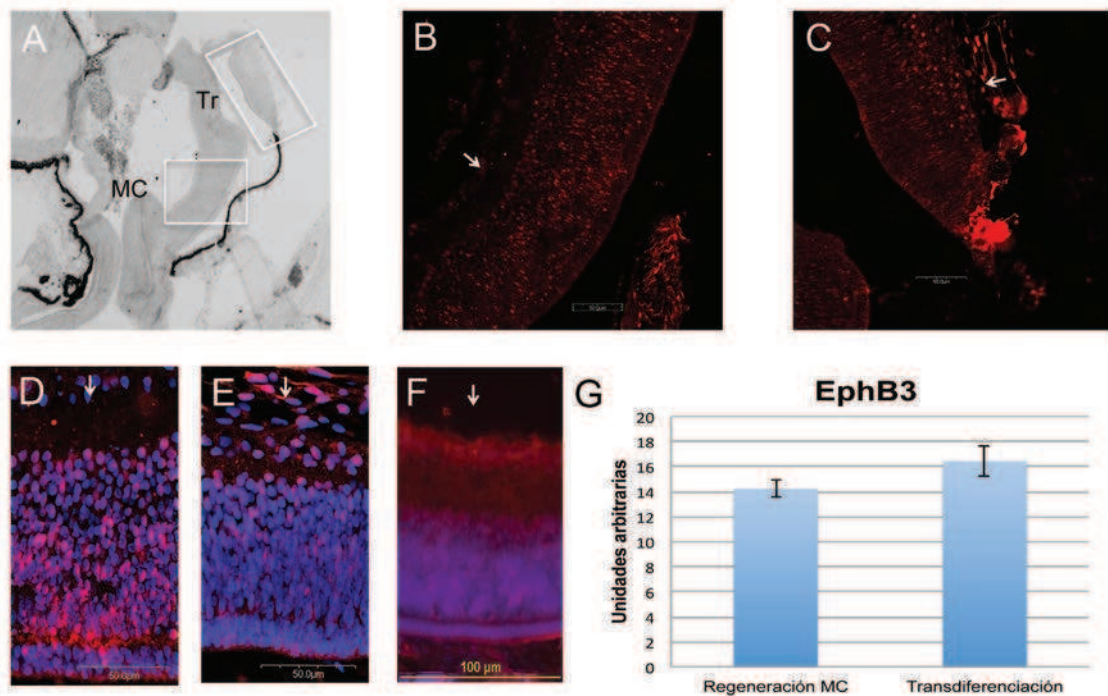
puedan ser competentes para responder a las señales de guía axonal que les permiten establecer conexiones topográficamente ordenadas con el TO.





**Figura R30. Expresión de EphB3.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D3. B y C. Inmunohistoquímica para EphB3 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para EphB3 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E7 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-F. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de EphB3 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. La retina regenerada a partir del MC presenta mayor nivel de expresión (test de Mann Whitney).





**Figura R31. Expresión de EphB3.** A. Corte de un ojo de un embrión de pollo E4D7. B y C. Inmunohistoquímica para EphB3 en retina regenerada a partir del MC (B) y por transdiferenciación (C). D-F. Superposición de inmunohistoquímica para EphB3 y Hoescht en retina regenerada a partir del MC (D) y por transdiferenciación del EP (E) y en retina en E11 (F). D y E son detalles de B y C respectivamente. B-E. Microscopía confocal. G. Gráfico de intensidad de fluorescencia (DOI) de EphB3 en retinas regeneradas a partir del MC y por transdiferenciación. No presenta diferencias significativas (test de Mann Whitney).

## **2.2. Regeneración retiniana con distintos estímulos: evaluación de la eficacia para obtener regeneración a partir de las células madre/progenitoras del MC.**

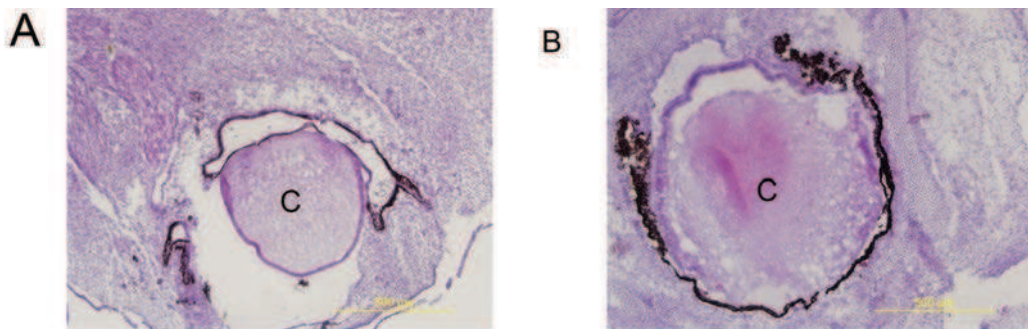
El objetivo de esta parte del trabajo fue inhibir la transdiferenciación del EPR y lograr una regeneración de la retina exclusivamente a partir de las células madre/progenitoras presentes en el MC del ojo.

Se ha observado que la regeneración de la retina a partir de las células madre/progenitoras presentes en el MC del ojo es inducida, luego de una retinectomía, con la sobreexpresión de Shh o de BMP utilizando un vector retroviral -RCAS-Shh (Spence et al., 2004) o RCAS-BMP (Haynes et al., 2007), y con el agregado del complemento C3a (Haynes et al 2013). Sin embargo, las eficacias de dichos tratamientos en lograr la regeneración de la retina exclusivamente a partir de células madre es baja.

Por esta razón, en el presente trabajo de tesis se han realizado estudios utilizando diferentes tratamientos con el fin de aumentar las probabilidades de obtener una regeneración retiniana completa a partir de las células madre/progenitoras del MC. Se realizaron experimentos evaluando los siguientes tratamientos: a) FGF2, b) RCAS-Shh, c) RCAS-Shh + FGF2, d) SAG (un agonista de Smoothend, mensajero presente cascada abajo en la vía de señalización de Shh-Patch) 500 nM, e) SAG 5  $\mu$ M, f) SAG 10  $\mu$ M, g) SAG 500 nM + FGF2, h) SAG 5  $\mu$ M + FGF2, y por último, i) SAG 10  $\mu$ M + FGF2. FGF2 fue introducido con una perla de heparina -en la cual fue previamente embebido- en la cavidad óptica postretinectomía. RCAS-Shh fue introducido mediante inyecciones subretinianas preretinectomías y por inyecciones intracavitarias postretinectomía. El SAG fue introducido mediante inyecciones

intracavitarias postretinectomía. Como controles se realizaron retinectomías solas o con el agregado de perlas de heparina, o la inyección de RCAS-GFP o PBS. Para los resultados se utilizó un n=6, de acuerdo a las publicaciones citadas (Spence 2007, Haynes 2007, Haynes 2013). En todos los casos se obtuvieron muestras de embriones E4D3 y E4D7.

1. Se realizaron retinectomías sin la utilización de los estímulos para la regeneración, a fin de disminuir los errores en las cirugías. Se demostró un 100% en la eficacia en la eliminación completa de la retina, observándose que en ningún caso hubo regeneración a partir de retina remanente (Figura R32).



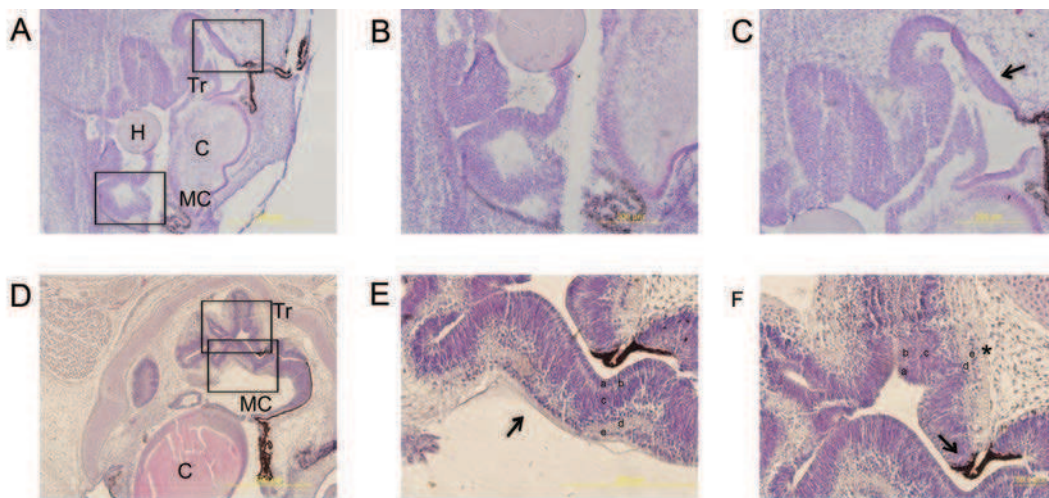
**Figura R32. Vistas generales de ojos retinectomizados** en E4 y fotografiados 3 días postretinectomía (E4D3) (A) y 7 días postretinectomía (E4D7) (B). Cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina. La técnica histológica empleada es similar para las figuras R32, 33, 35-45 de este capítulo. En ambos casos se observan ojos pequeños con cristalino (C) y EPR. No se observa retina neural en ninguno de los dos casos.

---

2. Con el tratamiento de FGF2 algunos embriones presentaron regeneración a partir del MC y transdiferenciación del EPR (50%) mientras que otros sólo presentaron transdiferenciación del EPR (50%). En ningún caso se observó regeneración exclusivamente a partir del MC.

En la Figura R33 se observan dos ejemplos de embriones tratados con FGF2 en los cuales se obtuvo ambos tipos de regeneración. En la Figura R33 A-C se

muestra un embrión E4D3 y en la Figura R33 D-F se muestra un embrión E4D7. En la Figura R33 A y D se observa vistas panorámicas en las cuales se aprecia la regeneración tanto a partir del MC como a partir de la transdiferenciación. Las figuras R33 B-C y E-F muestran con mayor aumento las regeneraciones. Allí puede observarse la estructura de la retina en ambos tipos de regeneración.



**Figura R33. Regeneración de retina con FGF2.** A) Vista general del ojo de embrión E4D3 en el que se observa regeneración a partir del MC (recuadro) y por transdiferenciación (Tr) (recuadro). B) Detalle de la zona de regeneración a partir del MC correspondiente a la foto A. La retina presenta una estructura de neuroepitelio similar a la de la retina periférica de E7 (figura R17 B). C) Detalle de la zona de transdiferenciación del EPR correspondiente a la foto A. Se observa cómo el EPR se diferencia en un neuroepitelio que forma retina neural (flecha). Ésta se presenta como un neuroepitelio semejante al de la regeneración a partir del MC, pero de orientación radial invertida. D) Vista general del ojo de embrión E4D7 en el que se observa regeneración a partir del MC (recuadro) y por transdiferenciación (Tr) (recuadro). E) Detalle de la zona de regeneración a partir del MC correspondiente a la foto D. Se observa una retina que presenta una capa nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de CGR (CGR), con capas plexiformes interna (CPE) e interna (CPI) y capa de fibras ópticas (FO) (flecha). Ésta se encuentra enfrentada a un segmento de EPR que se transdiferencia en sus dos extremos. F)

Detalle de la zona de transdiferenciación del EPR correspondiente a la foto D. Se observa la transdiferenciación del EPR formando una retina que progresa de un neuroepitelio (flecha) a una retina formada por una capa nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de CGR (CCG), con capas plexiformes externa (CPE) e interna (CPI) y capa de fibras ópticas (FO) (asterisco). H: perla de heparina con FGF2; Tr: transdiferenciación; MC: Margen ciliar; C: cristalino; a: CNE; b: CPE; c: CNI; d: CPI; e: CCG. Las abreviaturas de esta figura son similares a las utilizadas en las siguientes figuras del presente capítulo.

---

3. Con el tratamiento de RCAS-Shh mediante una inyección subretinal previa a la retinectomía y otra intraocular postretinectomía, se observó regeneración sólo a partir del MC en un 67% de los casos. Un 33% de los embriones presentó regeneración tanto a partir del MC como a partir de la transdiferenciación del EPR. En la Figura R34 se observa la inmunohistoquímica contra la proteína retroviral Gag que demuestra la producción de la infección con el virus RCAS.

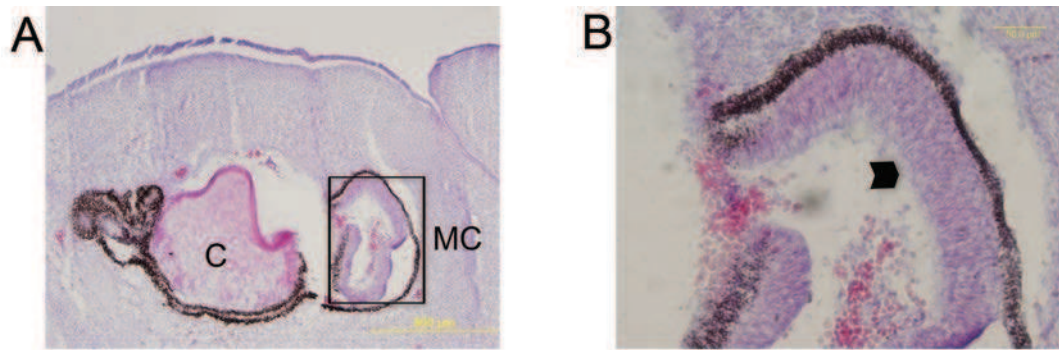


**Figura 34. Infección con RCAS-Shh.** A) Tinción nuclear con Hoescht (azul). B) Inmunohistoquímica contra la proteína Gag (precursora de la proteína de cápside del virus RCAS). C) Superposición de A y B.

---

En la Figura R35 se observa un ejemplo de un embrión E4D3 que presenta regeneración sólo a partir del MC.

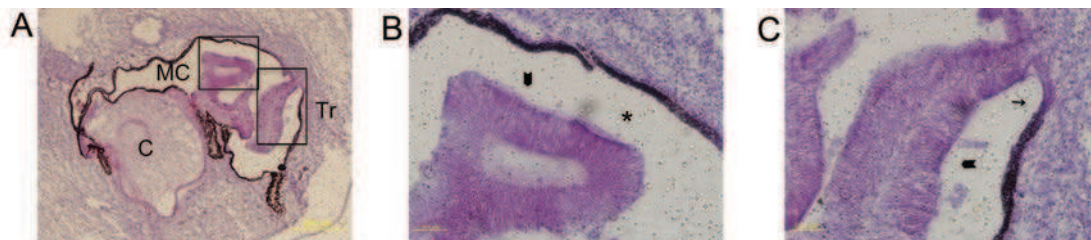




**Figura R35. Regeneración con RCAS-Shh.** Cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina. A) Vista general de un ojo de embrión E4D3 con regeneración a partir del MC (recuadro). B) Detalle de la retina en regeneración. La misma presenta un neuroepitelio (cabeza de flecha).

---

En la Figura R36 se observa un embrión E4D7 con ambos tipos de regeneración.

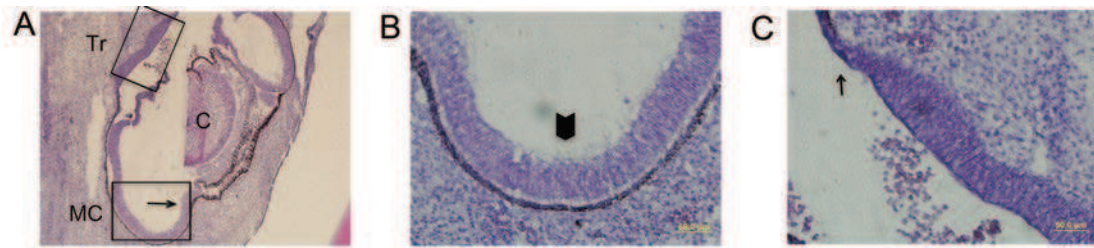


**Figura R36. Regeneración con RCAS-Shh en embrión E4D7.** A) Vista general del ojo donde puede apreciarse regeneración a partir del MC (recuadro) (MC) y por transdiferenciación del EPR (recuadro) (Tr). B) Detalle de la regeneración a partir del MC. El corte pasa por una zona periférica de la retina regenerada en la cual sólo se observa un neuroepitelio (cabeza de flecha). La retina en regeneración se pliega separándose (asterisco) del EPR. C). Detalle de la transdiferenciación a partir del EPR correspondiente a la foto A. Se observa cómo el EPR se diferencia en un neuroepitelio que forma retina neural (flecha). El corte pasa por una zona periférica de la retina regenerada en la cual sólo se observa un neuroepitelio que se pliega (cabeza de flecha).

---

4. Con el tratamiento de RCAS-Shh y FGF2 se encontró que el 80% de los embriones presentaron regeneración tanto a partir del MC como por transdiferenciación, mientras que el 20% restante presentó sólo transdiferenciación del EPR. En la Figura R37 se muestra un ejemplo de un embrión E4D3 que presenta regeneración a partir del MC y por transdiferenciación.

En la figura R38 se observan distintos cortes de un embrión E4D7 que presenta ambos tipos de regeneración. En este caso la transdiferenciación y la regeneración a partir de células madre/progenitoras se encuentran en sectores distintos del ojo. En la Figura R38 A y B se observa la transdiferenciación, mientras que en la Figura R38 C y D se muestra la regeneración a partir del

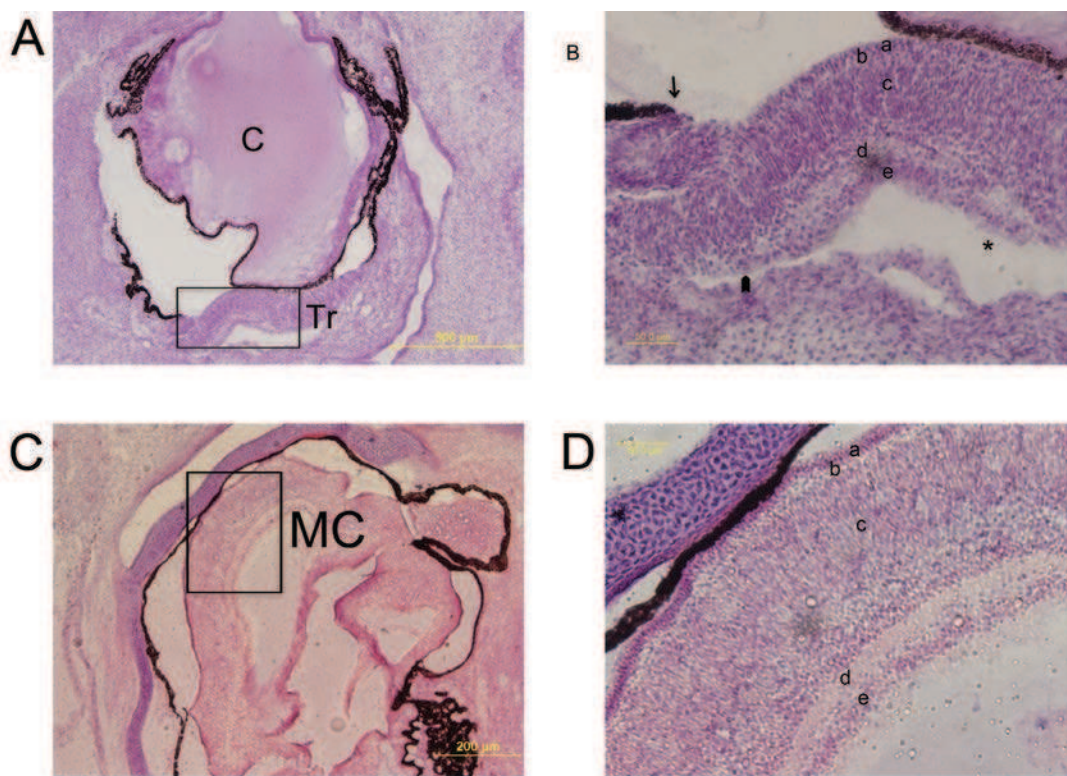


**Figura R37. Regeneración con RCAS-Shh y FGF2.** A) vista general del ojo de embrión E4D3. Se observa que la retina neural proviene del MC (flecha). B) Detalle de la zona de regeneración a partir del MC. Imagen correspondiente al recuadro (MC) de la foto A. La retina regenerada presenta una morfología de neuroepitelio (cabeza de flecha). C) Detalle de la zona de transdiferenciación a partir del EPR. Se observa cómo el EPR se diferencia en un neuroepitelio que forma retina neural (flecha). Ésta se presenta como un neuroepitelio. En ambos casos (B y C) la organización de la retina coincide con la de la retina periférica normal en E7.

---

MC, en la cual puede observarse que la estructura de la retina regenerada es similar a la de la retina intermedia de embriones E11 (Figura R17 G).

5. Con SAG 500 nM no se encontró regeneración. Esto puede deberse a: a) que esta concentración de SAG no llegó a activar la vía canónica de Shh en forma similar a lo que se logra con la sobreexpresión de Shh con el vector RCAS, o b) que el efecto producido por la sobreexpresión de Shh está mediado por la vía no canónica del mismo. En la figura R39 se observa un ojo E4D3 (A) y un ojo E4D7 (B).

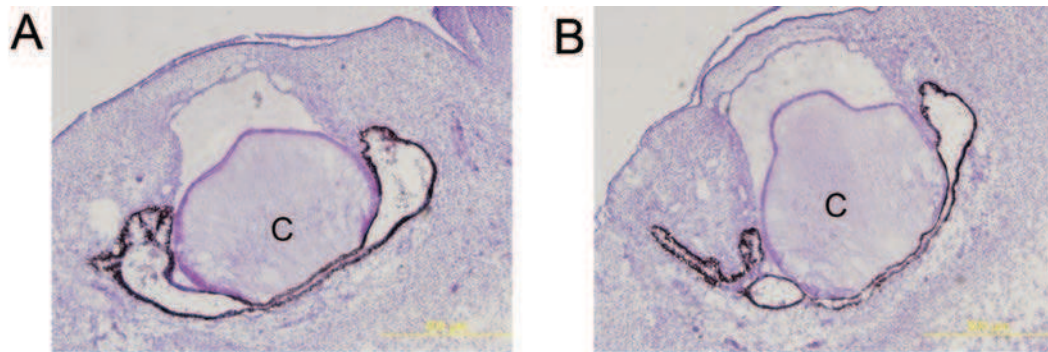


**Figura R38. Regeneración con RCAS-Shh y FGF2 en embrión E4D7.** A) Vista general del ojo con transdiferenciación. B) Detalle de la zona de transdiferenciación. De derecha a izquierda se observa la transdiferenciación del EPR formando una retina que progresa de un neuroepitelio (flecha) a un neuroepitelio con una capa de CGR y fibras ópticas (cabeza de flecha) y luego a una retina formada por una capa nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de CGR (CGR), con capas plexiformes externa (CPE) e interna (CPI) y capa de fibras ópticas (FO) (asterisco). La nomenclatura corresponde a la normal de la retina aunque las capas presentan una ubicación radialmente opuesta a la normal, con las CGR hacia el lado externo y la CNE hacia el sector interno. C) Vista general del ojo con regeneración a partir del MC. D) Detalle de



la zona de regeneración a partir de células madre/progenitoras. La retina neural regenerada presenta una capa nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de CGR (CGR), con capas plexiformes externa (CPE) e interna (CPI) y capa de fibras ópticas (FO). a: CNE; b: CPE; c: CNI; d: CPI; e: CCG.

---



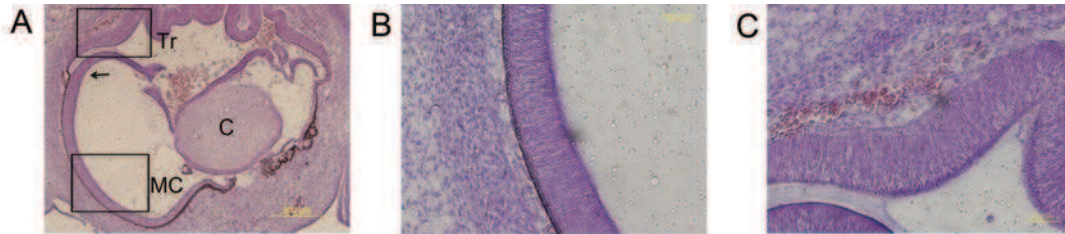
**Figura R39.** Tratamiento con SAG 500 nM. A) ojo de E4D3. B) Ojo de E4D7. En ambos casos se observan ojos pequeños con cristalino (C) y EPR. No se aprecia la presencia de retina neural en ninguno de los dos casos.

---

6. Cuando se trató a los embriones con SAG 500nM y FGF2, se observó que el 67% presentó ambos tipos de regeneración, mientras que el 33% restante presentó sólo transdiferenciación. Esto puede atribuirse a la presencia del FGF2, que se ha demostrado que estimula tanto la regeneración a partir de las células madre/progenitoras del MC como la transdiferenciación del EPR. En la Figura R40 A se observa un embrión E4D3 con ambos tipos de regeneración. En las Figura R40 B y C se observan con más detalle la regeneración a partir del MC y de la transdiferenciación, respectivamente.

En la Figura R41 se observa un embrión E4D7 tratado con SAG 500nM y FGF2 que muestra ambos tipos de regeneración. En la Figura R41 A y B se muestra la transdiferenciación evaginada hacia fuera del ojo. Esto sucede cuando la

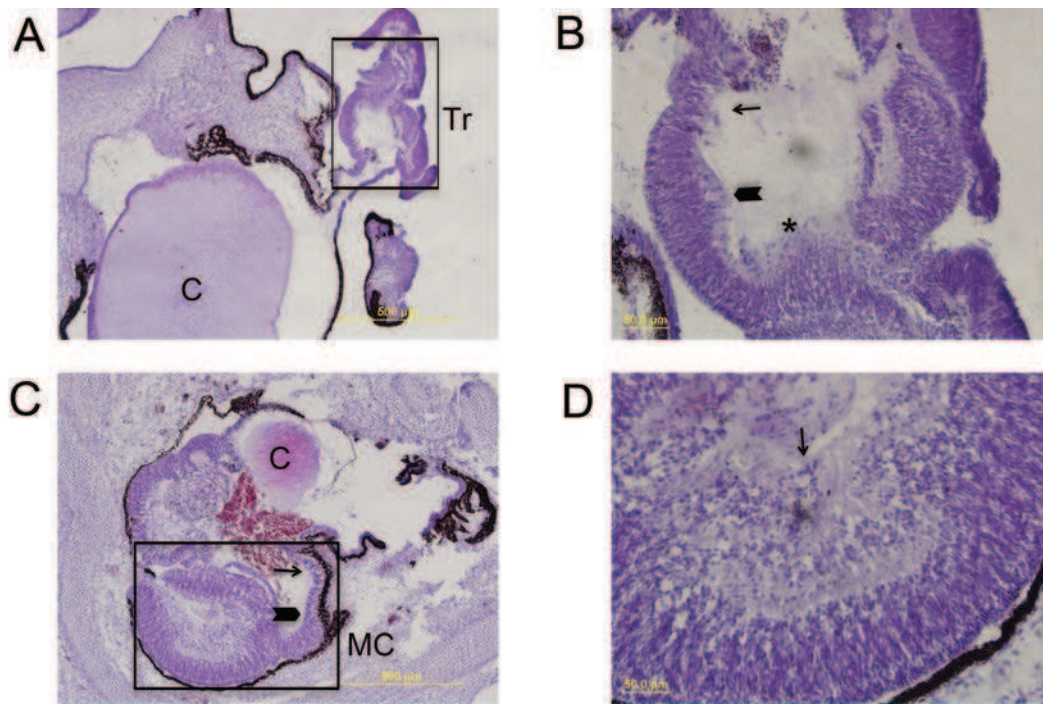
tapa que se produce al hacer la cirugía no se cierra por completo. En la Figura R41 C y D se observa la regeneración a partir del MC.



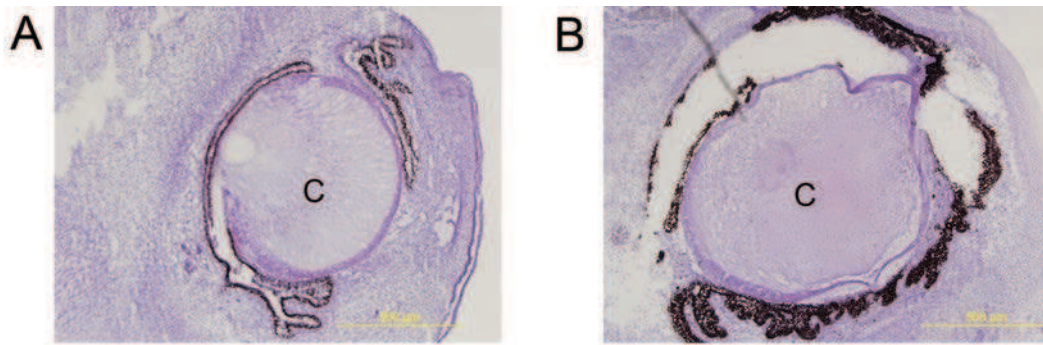
**Figura R 40. Tratamiento con SAG 500 nM y FGF2 .** A) Vista general del ojo de un embrión E4D3 con ambos tipos de regeneración. Se observa cómo el EPR se diferencia en un neuroepitelio que forma retina neural (flecha). Nótese cómo la retina regenerada a partir del MC se pliega y se separa del EPR cuando éste se transdiferencia. B) Detalle de la regeneración a partir del MC.(MC). C) Detalle de la regeneración por transdiferenciación a partir del EPR. Esta retina se presenta como un neuroepitelio cuya organización coincide con la de la retina periférica normal en E7.

---

7. El tratamiento con SAG 5  $\mu$ M no generó regeneración de ningún tipo. Al igual que en el caso del tratamiento con SAG 500 nM, esto puede deberse a: a) que esta concentración de SAG no llegó a activar la vía canónica de Shh en forma similar a lo que se logra con la sobreexpresión de Shh con el vector RCAS, o b) que el efecto producido por la sobreexpresión de Shh está mediado por la vía no canónica del mismo.. En la Figura R42 se observa un ejemplo de un ojo de embrión E4D3 (A) y un ojo de embrión E4D7 (B). En ambos casos se demuestra la ausencia de regeneración con este tratamiento.

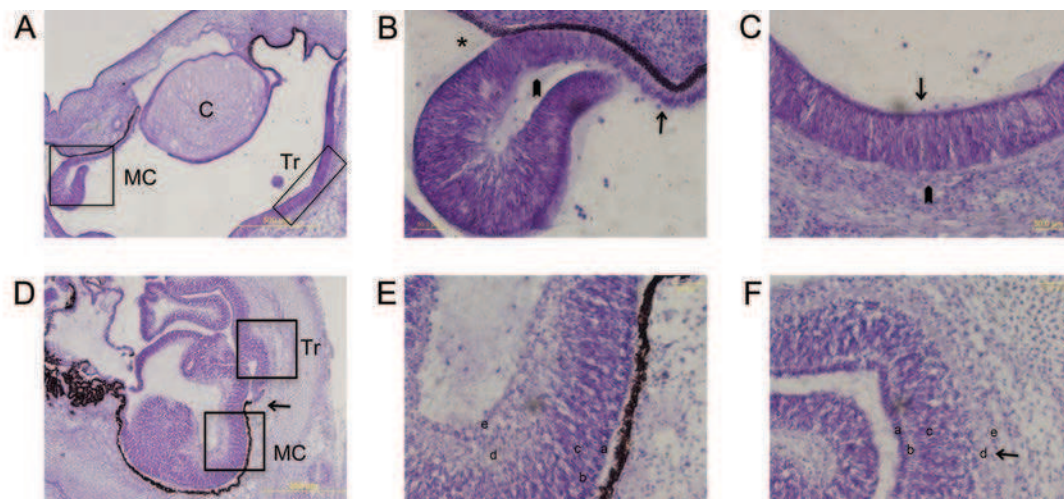


**Figura R41. Tratamiento con SAG 500 nM y FGF2 en embrión E4D7. A y B) Transdiferenciación del EPR. C y D) Regeneración a partir del MC. A) Vista general del ojo con transdiferenciación. La retina regenerada se evagina hacia fuera del ojo. B) Detalle de la zona de transdiferenciación. De arriba hacia abajo se observa la transdiferenciación del EPR formando una retina que progresa de un neuroepitelio (flecha) a una retina formada por una capa nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de CGR (CGR), con capas plexiformes externa (CPE) muy fina e interna (CPI) y capa de fibras ópticas (FO) (cabeza de flecha). Las CGR se orientan hacia el interior de la evaginación donde se encuentra el mesénquima (asterisco). C) Vista general del ojo con regeneración a partir del MC. D) Detalle de la zona de regeneración a partir de células madre/progenitoras. Se observa una retina que se pliega y que luego presenta una estructura formada por una capa nuclear externa (CNE), interna (CNI) y de CGR (CGR), una capa plexiforme externa (CPE) e interna (CPI) y una capa de fibras ópticas (FO) (flecha).**



**Figura R42.** Tratamiento con SAG 5  $\mu$ M. A) Ojo de embrión E4D3. B) Ojo de embrión E4D7. En ambos casos se observan ojos pequeños con cristalino (C) y EPR. No se aprecia la presencia de retina neural en ninguno de los dos casos.

8. Sin embargo, el tratamiento con SAG 5  $\mu$ M y FGF2 produjo la regeneración a partir del MC y de la transdiferenciación en el 50% de los embriones, mientras que el otro 50% presentó sólo transdiferenciación. Este resultado se asemeja al tratamiento con FGF2. En la Figura R43 se representan los resultados obtenidos con este tratamiento.



**Figura R43. Tratamiento con SAG 5  $\mu$ M y FGF2.** A) Vista general del ojo de E4D3. B) Detalle de la regeneración obtenida a partir de células madre/progenitoras. Se observa que la retina neural se origina a partir del MC (flecha). La misma es un neuroepitelio (cabeza de flecha) que se desprende del EPR (asterisco) luego de un corto trayecto por la presencia de retina

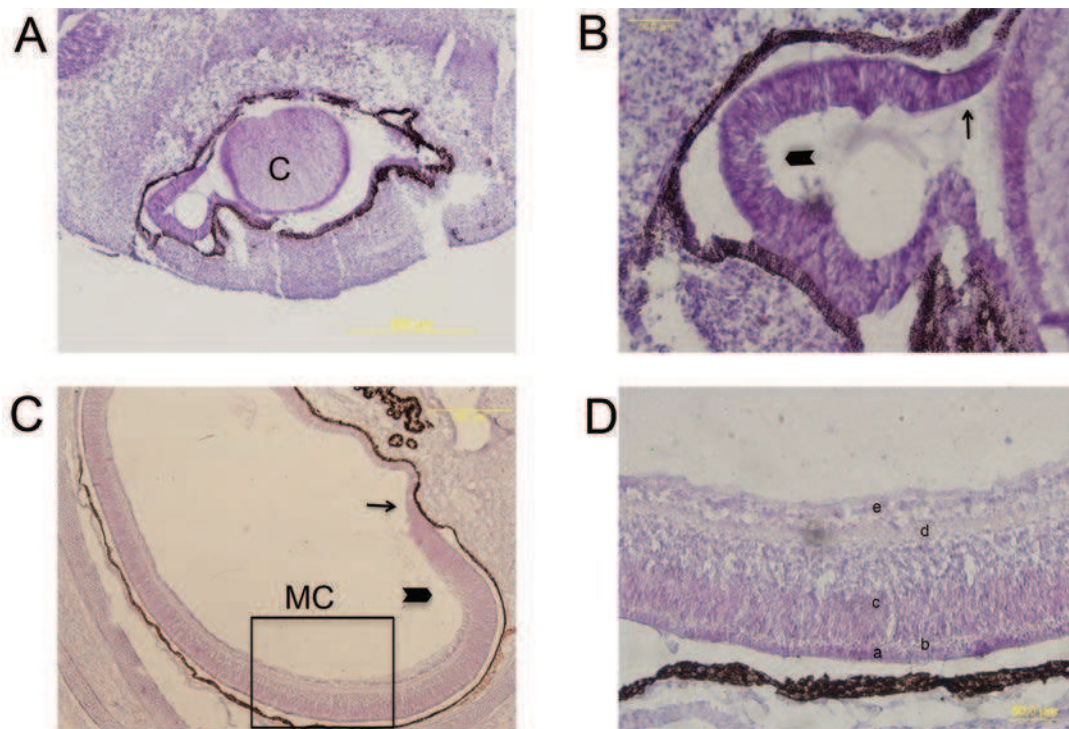


transdiferenciada. C) Detalle de la zona con transdiferenciación. Se observa un neuroepitelio (flecha) apoyado directamente sobre el mesénquima (cabeza de flecha). D) Vista general de un ojo de embrión E4D7. La retina regenerada a partir del MC se depende del EPR cuando este se transdiferencia (flecha). E) Detalle de la zona de regeneración a partir del MC. Se observa la retina regenerada formada por una capa nuclear externa (CNE), plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI) capa de CGR (CGR) y capa de fibras ópticas (FO). F) Detalle de la zona de transdiferenciación..Se observa la formación de una capa de CGR y de dos capas nucleares separadas por una capa plexiforme (flecha). a: CNE; b: CPE; c: CNI; d: CPI; e: CCG.

---

En las Figura R43 A, B y C se muestra la regeneración obtenida en un embrión E4D3. Allí se observa que casi toda la extensión del EPR se transdiferenció hacia retina neural (A), mientras que en un margen aparece un pequeño sector de regeneración dada por las células madre/progenitoras presentes en el MC. En las Figuras R43 D, E y F se muestra la regeneración obtenida en un embrión E4D7. Allí se observa que ambas regeneraciones dieron una retina similar a la de embriones E11.

9. El tratamiento con SAG 10 $\mu$ M dió como resultado que el 100% de los embriones estudiados presentara exclusivamente regeneración a partir de las células madre/progenitoras presentes en el MC. Es más, en el 80% de los embriones la retina se regeneró completamente. En la Figura R44 A y B se muestra un ejemplo de la regeneración obtenida en un embrión E4D3. En la Figura R44 C y D se muestra un embrión E4D7 con la retina completamente regenerada. La misma presenta una estructura laminar semejante a la retina de embriones E11.

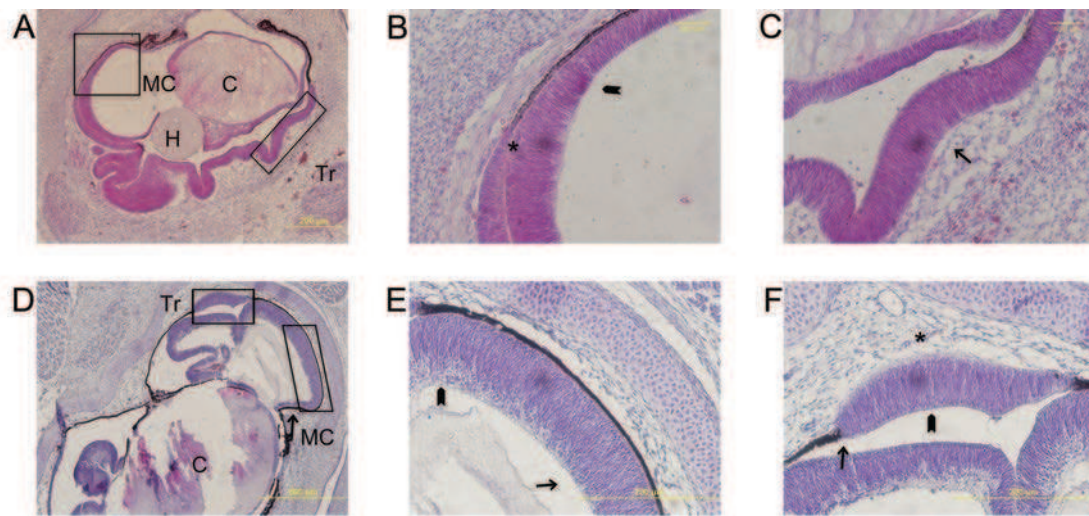


**Figura R44. Tratamiento con SAG 10  $\mu$ M.** A) Vista general del ojo de un embrión E4D3. Se observa únicamente regeneración a partir del MC (MC). B) Detalle de la regeneración obtenida a partir del MC. De abajo hacia arriba se observa el MC (flecha) a partir del cual continúa una retina en forma de neuroepitelio (cabeza de flecha). C) Vista general del ojo de un embrión E4D7, con la retina completamente regenerada a partir del MC. Se observa el MC (flecha) a partir del cual continúa una retina que se va engrosando (cabeza de flecha) y laminando progresivamente hasta adquirir la estructura de una retina de E11 (asterisco). D) Detalle de la regeneración a partir del MC. Se observa la estructura laminar de la retina formada por la capa nuclear externa (CNE), la capa plexiforme externa (CPE), la capa nuclear interna (CNI), la capa plexiforme interna (CPI), la capa de CGR (CGR) y la capa de fibras ópticas (FO). a: CNE; b: CPE; c: CNI; d: CPI; e: CCG.

10. Por último, el tratamiento con SAG 10  $\mu$ M y FGF2 dió como resultado que el 100% de los embriones presenten ambos tipos de regeneración. En todos los casos, la transdiferenciación se observó sólo en la retina cercana a la fuente de FGF2 (perla de heparina con FGF2). En las

Figuras R45 A, B y C se observa la regeneración obtenida en un embrión E4D3, en el cual se observa que la retina obtenidas tanto a partir del MC como a partir de la transdiferenciación del EPR se asemeja en su estructura a la zona periférica de embriones E7.

En la Figura R45 D, E y F se observa la regeneración obtenida en ojos de embriones E4D7.



**Figura R45. Tratamiento con SAG 10  $\mu$ M y FGF2.** A) Vista general del ojo de un embrión E4D3 con ambos tipos de regeneración. B) Detalle de la regeneración a partir del MC. Se observa una retina en forma de neuroepitelio (cabeza de flecha). Esta retina se separa de la pared ocular cuando EPR se transdiferencia a retina neural (asterisco) C) Detalle de la transdiferenciación obtenida a partir del EPR. De abajo hacia arriba se observa el EPR (flecha) que se transdiferencia dando origen al neuroepitelio retiniano (cabeza de flecha). D) Vista general del ojo de un embrión E4D7 con ambos tipos de regeneración. Se observa que el MC (flecha) da origen a una retina en forma de neuroepitelio. E) Detalle de la regeneración a partir del MC. Se observa cómo el neuroepitelio (flecha) se continúa con una retina en la cual aparecen la capa plexiforme interna (CPI), la capa de CGR (CGR) y la capa de fibras ópticas (FO) (cabeza de flecha). F) Detalle de la zona de transdiferenciación a partir del EPR. Se observa cómo el EPR se diferencia en un neuroepitelio que forma retina neural (flecha). Ésta se presenta como un neuroepitelio (cabeza de flecha). H: perla de heparina con FGF2

El hecho de que SAG 10  $\mu$ M de lugar a una regeneración total a partir del MC demuestra que la falta de eficacia de los tratamientos con SAG 500 nM y 5  $\mu$ M se debió a que la dosis empleada fue insuficiente para activar en forma adecuada la vía canónica de Shh y no al hecho de que la regeneración inducida por Shh esté mediada por una vía no canónica.

En conclusión, se ha logrado encontrar un tratamiento con el cual se obtiene un 100% de eficacia de regeneración exclusivamente a partir de las células madre/progenitoras presentes en el MC. Éste es el tratamiento con SAG 10  $\mu$ M. Además, la retina obtenida con dicho tratamiento en embriones E4D3 se asemeja estructuralmente a la retina periférica de embriones E7, y la retina obtenida en embriones E4D7 es similar a la retina intermedia de embriones E11.

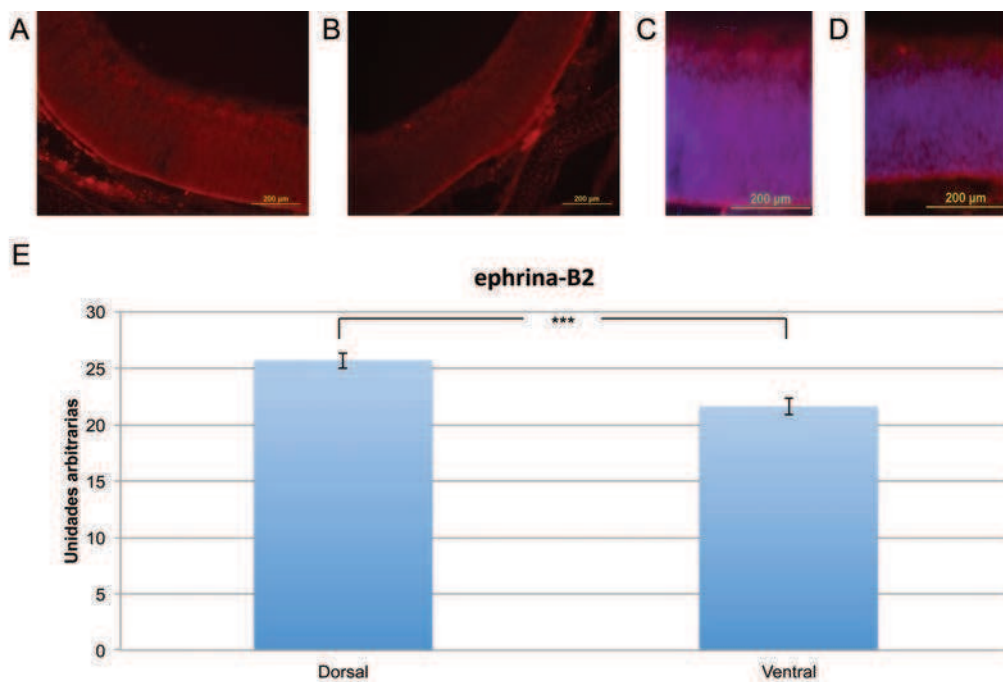
En general se observa que las retinas obtenidas en embriones E4D3 con todos los tratamientos con resultados positivos se asemejan a retinas de la zona periférica de embriones E7, mientras que las retinas obtenidas por ambos tipos de regeneración en embriones E4D7 son similares a la retina intermedia de embriones E11. Esto puede implicar que a medida que la regeneración se va produciendo, estas retinas vayan alcanzando una estructura similar a la que tendría un embrión de esa edad, de acuerdo a Spence y col, 2004.

### **2.3. Expresión de ephrina-B2 en embrión E4D7 tratado con SAG 10 $\mu$ m.**



Uno de los objetivos de la obtención de una retina regenerada completamente a partir de las células madre/progenitoras es que la misma exprese moléculas de posicionamiento de manera similar a la retina de embriones en desarrollo.

En la Figura R46 se observa una inmunomarcación para evaluar la expresión de la ephrina-B2 en retina de embrión E4D7 tratado con SAG 10 $\mu$ M, en la cual se obtuvo la regeneración completa de la retina a partir del MC.



**Figura R46. Expresión de ephrina-B2 en embrión E4D7 tratado con SAG 10 $\mu$ M.** A-B) Inmunohistoquímica contra ephrina.B2 (rojo). A) Región dorsal de la retina. B) Región ventral de la retina. C) Superpocición de A con la tinción de Hoescht para ilustrar las capas celulares. D) Superpocición de B con la tinción de Hoescht para ilustrar las capas celulares. E) Gráfico de la intensidad de fluorescencias (OID) de A y B. La expresión de ephrina-B2 es significativamente mayor en la retina dorsal que en la ventral (test de Mann Whitney).

Este resultado muestra no sólo la presencia de la ephrina-B2, sino también que existe una expresión diferencial entre los sectores dorsal y ventral de la retina, de manera similar a como se expresa en las retinas de embriones en desarrollo

de edad equivalente. Esto sugiere que la retina regenerada tiene información posicional y por lo tanto, los axones de las CGR podrían responder a las señales de guía axonal del sistema Eph/ephrinas.

# Discusión y Conclusiones

Las células madre/progenitoras del MC del embrión de pollo tienen la capacidad de dar origen a todos los tipos neuronales de la retina. Sin embargo, esta multipotencialidad se va perdiendo progresivamente a medida que el desarrollo avanza (Reh y col., 2006). La capacidad de diferenciación hacia CGR es la primera que se pierde ya que estas neuronas son las primeras en diferenciarse. La importancia funcional de las CGR reside en el hecho de que constituyen la única eferencia de la retina que, al formar el mapa de conexiones retinotectales permiten la reconstrucción del campo visual en la superficie tectal (Kandel y col., 2000). Por otro lado, lograr la restitución de esta población celular tiene importancia terapéutica ya que las CGR degeneran en patologías como el glaucoma, la diabetes, en algunas degeneraciones vítreoretinianas y en las lesiones del nervio óptico de origen traumático, tumoral o degenerativo (Knöll y col., 2004; Sahin y col., 2005). Así, el MC de pollo sólo puede generar células bipolares y amácrinas postnatalmente (Reh y Fischer, 2006). Sin embargo, Fisher y col. (2002) demostraron que la combinación in vivo de insulina y FGF2 estimula la producción de CGR, sugiriendo que los tipos celulares producidos por el MC de las aves adultas están limitados por el microambiente más que por limitaciones celulares intrínsecas que restringen su multipotencialidad.

1. Determinación y diferenciación neuronal de células progenitoras provenientes del MC. Estudios in vitro.

Uno de los interrogantes a resolver es conocer los mecanismos moleculares que regulan el ciclo celular y la potencialidad de diferenciación de las células troncales con el objeto de manipular epigenéticamente estas dos propiedades para obtener un linaje celular determinado que pueda ser empleado como terapia de reemplazo celular en patologías que presentan pérdidas de un tipo celular específico (Locker y col., 2010).

Este trabajo utiliza a las células madre del MC como modelo experimental para investigar los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo de la retina neural y como potencial fuente de terapia regenerativa.

Con el objetivo de inducir in vitro la diferenciación de CGR a partir de células madre/progenitoras del MC cuando la diferenciación de CGR ha declinado, se realizaron cultivos primarios de células disociadas del MC en E7 favoreciendo el desarrollo de neuroesferas. Para evaluar si las células madre obtenidas del MC poseían información posicional al momento de la obtención de las células, se realizaron cultivos de células provenientes de la región nasal y temporal del MC.

Evaluando distintas concentraciones de insulina y FGF2 (Fisher y col. 2002) y favoreciendo la adhesión sobre un sustrato formado por polilisina y laminina se determinaron las mejores condiciones para obtener un mayor nivel de diferenciación de CGR. Esto confirma que la regulación del microambiente de las células madre es fundamental para regular la capacidad de diferenciación de las mismas. Esto tiene una gran importancia práctica porque demuestra que la potencialidad de las células madre puede direccionarse in vitro para obtener un tipo celular específico que se pretenda restituir en una retina dañada.

Debido a que el empleo de un sustrato formado por polilisina-laminina y de un medio de cultivo que contiene 25  $\mu\text{g/ml}$  de insulina y 1.25  $\mu\text{g/ml}$  de FGF2 produjo el mayor nivel de diferenciación de CGR en las células madre provenientes del MC nasal y temporal, dichas condiciones fueron utilizadas para obtener CGR a partir de neuroesferas obtenidas del MC.

El hecho de que en los tres parámetros evaluados (Figuras R5-7), las neuroesferas nasales presenten mayor respuesta que las temporales a menores concentraciones de insulina y FGF2, mientras que las temporales presenten mayor respuesta a mayores concentraciones, demuestra que las células madre/progenitoras obtenidas de las dos regiones se comportan como poblaciones diferentes. Esto coincide con el hecho de que el desarrollo de la retina temporal es levemente más temprano que el nasal (Scicolone y col., 2009), motivo por el cual la menor capacidad del MC temporal en originar CGR es coherente con su mayor nivel de desarrollo, requiriendo mayor nivel de estímulo para emparejar la respuesta de las neuroesferas nasales.

Esto sugiere que las células madre/progenitoras del MC poseen información posicional (por lo menos a partir de E7) que determina su respuesta diferencial ante los estímulos de diferenciación hacia CGR, siendo la población nasal más sensible que la temporal. Estos hallazgos coinciden con el trabajo de Goolsby y

col., (2012) en el cual se describe que el transplante de células madre extraídas en E8 establece conexiones topográficas con el tectum de acuerdo a su sitio de origen.

También se demostró que las CGR diferenciadas a partir de las células madre del MC expresan las moléculas del sistema Eph/ephrinas de guía axonal, y que los axones de estas CGR diferenciadas a partir de células madre, que forman neuroesferas in vitro, expresan de manera diferencial las moléculas EphA3 y ephrina-A2 de acuerdo al sitio de extracción de las células madre/progenitoras del MC (nasal versus temporal). Esto demuestra que los axones de CGR diferenciadas in vitro a partir de células madre, mantienen una expresión similar a la retina de embriones en desarrollo de acuerdo a la zona estudiada (Figuras R8-13). Estos resultados confirman que las células madre obtenidas del MC ya poseen información posicional en E7 y las CGR que se diferencian a partir de ellas conservan dicha información mediante la expresión de niveles diferenciales del sistema Eph/ephrinas.

Para determinar si las CGR diferenciadas a partir de células madre del MC son competentes para responder a las señales del sistema Eph/ephrinas de igual forma que los axones de las CGR de embriones de E7, se estimularon los axones con el ectodominio de EphA3 (Ortalli y col., 2012) y con ephrina-A2 (Cheng y col., 1995; Hensen y col., 2004; Scicolone y col. 2012).

En forma similar a lo que ocurre durante el desarrollo, el ectodominio de EphA3 estimuló el crecimiento axonal de las CGR nasal y temporal con franco predominio sobre los nasales (Ortalli y col., 2012), y la ephrina-A2 produjo una gran disminución del crecimiento de los axones de las CGR temporal (Cheng y col., 1995; Hansen y col., 2004; Ortalli y col. 2012). El hecho de que la ephrina-A2 haya producido un pequeño aumento sobre el crecimiento de los axones de las CGR nasal se opone a los resultados de Cheng y col.,(1995) que mostraron falta de efecto de la ephrina-A2 sobre los axones nasales. Sin embargo, al realizar una evaluación de distintas concentraciones de ephrina-A2 sobre el crecimiento de los axones de las CGR temporal y nasal se demostró que a todas las concentraciones disminuye el crecimiento de los axones temporales mientras sobre los axones nasales produce un efecto diferencial según la concentración, induciendo el crecimiento axonal a bajas dosis (las usadas en este trabajo) y teniendo un efecto neutro a mayores dosis (similares a las



empleadas por Cheng y col, 1995). Esto coincide con lo descrito por Hansen y col., (2004) quienes mostraron que la respuesta de los axones nasales a la ephrina-A2 tectal es concentración dependiente.

Esto demuestra que las células madre del MC poseen información posicional y que las CGR derivadas de ellas son competentes para responder a las señales del sistema Eph/ephrinas, que guían a los axones durante la formación del mapa retinotectal de acuerdo a su lugar de origen (Carri y col., 2014; Di Napoli y col., 2012; Di Napoli y col., 2016; Di Napoli y col., 2013). Cabe aclarar que, los experimentos realizados evalúan el efecto del sistema EphA/ephrinas-A sobre el crecimiento axonal, produciendo efectos similares a los que se observan durante el desarrollo (Cheng y col., 1995; Feldheim y O'Leary, 2010; Ortalli y col, 2012; Scicolone y col., 2009). Sin embargo, nuestros experimentos no evalúan el efecto del sistema EphA/ephrinas-A sobre la direccionalidad del crecimiento axonal, característica necesaria para la producción de efectos de guía axonal. Estos experimentos forman parte de la continuidad del plan de trabajo en desarrollo.

Los resultados obtenidos confirman que puede manipularse el microambiente in vitro para obtener CGR diferenciadas a partir de las células madre/progenitoras del MC. Que estas CGR poseen información posicional y responden en forma sitio específico a las señales del sistema Eph/ephrinas. Este modelo permite profundizar los conocimientos sobre los mecanismos moleculares que median la diferenciación celular y tiene importancia para evaluar el uso de células madre/progenitoras de la retina como fuentes de trasplante para reemplazar CGR.

Nuestra hipótesis plantea que la manipulación del microambiente de las células madre in vitro permite transplantarlas para dirigir su diferenciación hacia CGR con posibilidades de integrarse en los circuitos neuronales de la retina.

El hecho de que los axones de las CGR diferenciadas a partir de células madre transplantadas respondan a las señales del sistema Eph/ephrinas abre las puertas para que estas células, luego de integrarse a los circuitos retinianos, puedan establecer conexiones topográficamente ordenadas en el tectum, permitiendo el procesamiento de la información visual y la reconstrucción del campo visula sobre la superficie tectal. Es de destacar que el establecimiento

de estas conexiones constituye una de las mayores dificultades de toda terapia de regeneración (Shingal y col, 2014).

Por otro lado, el conocimiento de la ventana temporal en que las células madre del MC poseen información posicional tiene importancia práctica en los intentos de terapias de regeneración con empleo de trasplantes de células madre. Así Goolsby y col. (2012) han descrito que el trasplante de células madre extraídas en E8 establecían conexiones topográficas de acuerdo a su sitio de origen. Esto implica que si se realizan trasplantes de células madre con información posicional, éstas deben ser implantadas en su lugar de origen para establecer conexiones topográficamente ordenadas. En cambio, la determinación de la edad en que la información posicional aún no está determinada en las células madre del MC, permitiría trasplantar células madre en cualquier localización de la retina sin afectar el orden de sus conexiones, siempre y cuando las mismas adquieren la información posicional del entorno en el cual fueron trasplantadas.

En síntesis, se han establecido las condiciones in vitro que permiten obtener un alto grado de diferenciación de las células madre del MC hacia CGR. Estas CGR expresan moléculas del sistema Eph-ephrinas en forma topográficamente específica (poseen información posicional) y responden al sistema Eph/ephrinas, que es el que guía a los axones durante la formación del mapa retinotectal.

Este modelo permite profundizar los conocimientos sobre los mecanismos moleculares que regulan la adquisición de información posicional y la potencialidad de diferenciación de las células madre. Y tiene importancia para el diseño de terapias de regeneración mediante el trasplante de células madre.

Nuestra hipótesis plantea que la manipulación del microambiente de las células madre in vitro permite trasplantarlas para dirigir su diferenciación hacia CGR con posibilidades de integrarse en los circuitos neuronales de la retina.

## 2. Regeneración in vivo:

Como se mencionó en la introducción, existen dos formas de regeneración de la retina de embriones de pollo in vivo luego de la realización de una

retinectomía . La primera es a partir de proliferación y posterior diferenciación de las células madre/progenitoras presentes en el MC del ojo. La segunda es a partir de la transdiferenciación del EPR (Figura R17). Este tipo de regeneración se obtuvo inicialmente mediante el agregado de una perla de heparina embebida con FGF2 (Spence et al., 2004).

La regeneración a partir del MC da como resultado una retina de estructura laminar semejante a la de embriones en desarrollo, mientras que la transdiferenciación del EPR da como resultado una retina con polaridad invertida en el eje radial. Así, las CGR quedan orientadas hacia el mesénquima y los fotorreceptores hacia el humor vítreo. Otra característica de la transdiferenciación es que se pierde el EPR. Una vez que el EPR comienza a transdiferenciarse, las células pierden el pigmento y originan todas las células presentes en la retina neural (Spence et al., 2004)..

En la transdiferenciación no se observa la formación de nervio óptico. Una de las posibles razones de este fenómeno es la polaridad invertida de las capas celulares de la retina. Además, en este tipo de regeneración se pierde el EPR, que es necesario para el mantenimiento de la vitalidad y para la funcionalidad de los fotorreceptores de la retina neural (Strauss, 2005). Por tal motivo, un objetivo en los experimentos de inducción de regeneración retiniana es lograr una regeneración completa a partir del MC. Sin embargo, en los tratamientos realizados con distintos estímulos - FGF2, Shh, BMP, C3a, C5a, IL-6 e inhibición de la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina/TCF/Lef1 (Spence y col., 2004; Haynes y col., 2004; Haynes y col., 2007; Spence y col., 2007; Haynes y col., 2013; Zhu y col., 2014)- se han logrado resultados mixtos, con porciones de retina regeneradas a partir del MC y otras por transdiferenciación. En escasos casos se ha logrado una retina completa a partir de la proliferación y diferenciación del MC. En consecuencia, no se obtiene en la mayoría de los casos la formación de una referencia que pueda establecer conexiones topográficamente ordenadas con el tectum.

Para lograr una estrategia regenerativa que dé como resultado un ojo funcional, es necesario que la retina presente las dos capas originales de la copa óptica (EPR y retina neural), que la retina neural presente un eje radial normal, que conserve la vitalidad y funcionalidad de los fotorreceptores gracias a la interacción de estos con el EPR, que forme el nervio óptico y establezca

conexiones topográficamente ordenadas con el tectum. Para lograr estos objetivos, es importante:

1) Que la retina regenerada presente información posicional y exprese el conjunto de moléculas que dirigen la guía axonal durante su trayecto al tectum y durante la formación de las conexiones topográficamente ordenadas en el mismo. Esto implica que es necesario que las CGR y sus axones expresen el sistema Eph/ephrinas en forma de gradiente.

2) Inhibir la transdiferenciación del EPR y lograr una regeneración de la retina exclusivamente a partir de las células madre/progenitoras presentes en el MC del ojo.

Con estos objetivos, 1) se investigó si la retina regenerada a partir del MC y de la transdiferenciación del EPR expresan el sistema Eph/ephrinas; y 2) se comparó el efecto de diferentes tratamientos que actúan sobre la vía del FGF2 y/o de Shh con el objeto de lograr la regeneración de una retina completa formada a partir de las células madre/progenitoras del MC.

## 2.1. Expresión del sistema Eph/ephrinas en retinas regeneradas a partir del MC y de la transdiferenciación del EP.

Para comparar la expresión del sistema Eph/ephrinas en regeneración a partir del MC y de la transdiferenciación en un mismo corte histológico, se indujo regeneración con FGF2. Se demostró que el sistema Eph/ephrinas se expresa tanto en la retina regenerada a partir del MC como en la obtenida por transdiferenciación del EPR.

Respecto a las moléculas evaluadas del sistema Eph/ephrinas-A (EphA3, EphA4 y ephrina-A2), se observó que en embriones E4D3 hay una mayor expresión en la regeneración surgida del MC que en la retina transdiferenciada, y que esa diferencia desaparece en embriones E4D7. Respecto a las moléculas evaluadas del sistema Eph/ephrinas-B (EphB2, EphB3, ephrina-B1 y ephrina-B2), se observó una mayor expresión en la regeneración surgida del MC que en la retina transdiferenciada en embriones E4D3 y que esa diferencia se invierte en embriones E4D7 para EphB2 y ephrinas-B1 y -B2, mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de EphB3.

En todos los casos el patrón de expresión radial del sistema Eph/ephrinas en regeneración a partir del MC y de la transdiferenciación simula el patrón de expresión de la retina en desarrollo de edades equivalentes, presentando un atraso temporal en la expresión que es más marcado en embriones E4D3 respecto a embriones E7 y en la transdiferenciación que en la regeneración a partir del MC.

Es posible que esta diferencia cronológica en la expresión del sistema Eph/ephrinas en la transdiferenciación respecto de la regeneración a partir del MC en embriones E4D3 se deba a un leve atraso temporal en los eventos celulares que median la transdiferenciación.

En todos los casos evaluados el sistema Eph/ephrinas se expresa en las CGR, incluyendo sus axones. Esto muestra que los axones de las CGR expresan las moléculas necesarias para guiar su crecimiento durante la formación del mapa de conexiones retinotectales.

Debido a que las zonas de regeneración obtenidas a partir del MC y de la transdiferenciación se extienden por trayectos más cortos que las retinas en desarrollo, es difícil definir si las moléculas del sistema Eph/ephrinas se expresan en gradientes semejantes a los de la retina normal.

2.2. Regeneración retiniana con distintos estímulos: evaluación de la eficacia para obtener regeneración a partir de las células madre/progenitoras del MC.

El objetivo de esta parte del trabajo fue inhibir la transdiferenciación del EPR y lograr una regeneración de la retina exclusivamente a partir de las células madre/progenitoras presentes en el MC del ojo.

Se ha observado que la regeneración de la retina a partir de las células madre/progenitoras presentes en el MC del ojo es inducida, luego de una retinectomía, con la sobreexpresión de Shh o de BMP utilizando un vector retroviral -RCAS-Shh (Spence et al., 2004) o RCAS-BMP (Haynes y col., 2007), y con el agregado del complemento C3a (Haynes y col., 2013). Sin embargo, con dichos tratamientos no se obtiene la regeneración completa de la retina exclusivamente a partir de células madre .

Por esta razón, en el presente trabajo de tesis se han realizado estudios utilizando diferentes tratamientos con el fin de aumentar las probabilidades de obtener una regeneración retiniana completa a partir de las células

madre/progenitoras del MC. Se realizaron experimentos evaluando los siguientes tratamientos: a) FGF2 , b) RCAS-Shh, c) RCAS-Shh + FGF2, d) SAG (un agonista de Smoothend, mensajero presente cascada abajo en la vía de señalización de Shh) 500 nM, e) SAG 5  $\mu$ M, f) SAG 10  $\mu$ M, g) SAG 500 nM + FGF2, h) SAG 5  $\mu$ M + FGF2, y por último, i) SAG 10  $\mu$ M + FGF2.

En general se observa que las retinas obtenidas en embriones E4D3 con todos los tratamientos con resultados positivos se asemejan a retinas de la zona periférica de embriones E7, mientras que las retinas obtenidas por ambos tipos de regeneración en embriones E4D7 son similares a la retina intermedia de embriones E11. Esto puede implicar que a medida que la regeneración se va produciendo, las retinas van alcanzando una estructura laminar más parecida a la que tendría un embrión de esa edad (Spence y col, 2004). Esto coincide con los patrones de expresión del sistema Eph/ephrinas, que se encuentran más atrasados en embriones E4D3 (principalmente en la transdiferenciación) y que se aproximan más al nivel de expresión normal en embriones E4D7.

Como se muestra en las figuras R32 a R45, sólo se logró una regeneración retiniana completa a partir del MC con SAG 10  $\mu$ M. Además, con este tratamiento la eficacia fue del 100%, es decir que todos los embriones tratados presentaron regeneración total de retina a partir del MC (Figura R44).

Esto demuestra que la falta de eficacia de los tratamientos con SAG 500 nM y 5  $\mu$ M se debió a que la dosis empleada fue insuficiente para activar en forma adecuada la vía canónica de Shh y no al hecho de que la regeneración inducida por Shh esté mediada por una vía no canónica. Además sugiere que la estimulación de la vía canónica de Shh puede ser clave para inhibir la transdiferenciación e inducir la regeneración completa de una retina morfológicamente normal a partir del MC (Spence y col., 2004; Haynes y col., 2004; Haynes y col., 2007; Spence y col., 2007).

Por otro lado, el hecho de que se haya detectado una expresión en gradiente decreciente dorsoventral de la ephrina-B2 (Figura R46) simulando el patrón de expresión de esta molécula durante el desarrollo, sugiere que las CGR de la retina regenerada tienen información posicional y por lo tanto podrían ser competentes para responder a las señales de guía axonal del sistema Eph/ephrinas. Esto abre la posibilidad de que este procedimiento permita



obtener una retina con eferencia que establezca conexiones topográficamente ordenadas en el tectum y que por lo tanto pueda ser funcional.

Por otro lado, los procedimientos empleados habían permitido obtener ojos pequeños postretinectomía. La disminución de la presión intraocular producida por la cirugía parece ser la principal causa de este fenómeno. Sin embargo, el hecho de que la regeneración retiniana completa a partir del MC con SAG 10  $\mu$ M se haya observado en ojos de mayor tamaño (Figura R44.C) sugiere que la extensión de la regeneración obtenida puede influir en el tamaño que desarrolla el ojo. Se plantea como estrategia futura intentar mantener la presión intraocular y permitir un mayor crecimiento ocular con el empleo de sustitutos vítreos.

### 3. Conclusiones finales y perspectivas futuras.

3.1. Se han establecido las condiciones in vitro que permiten obtener un alto grado de diferenciación de CGR a partir de células madre provenientes del MC. Estas CGR expresan moléculas del sistema Eph-ephrinas en forma topográficamente específica (poseen información posicional) y responden a las señales del sistema Eph/ephrinas.

Esto sugeriría que estas CGR son capaces de establecer conexiones topográficamente ordenadas en el tectum. Esto tiene una gran importancia práctica porque la imposibilidad de establecer conexiones locales y de proyección es uno de los principales obstáculos de las terapias de regeneración neural (Shingal 2012).

Esto abre las siguientes líneas de trabajo:

- a. Determinar la etapa del desarrollo en que las células madre del MC adquieren información posicional y el período del desarrollo embrionario y de la vida postnatal en el que dichas células conservan la potencialidad para diferenciarse a CGR.
- b. Determinar si las células madre obtenidas del MC y manipuladas in vitro, se diferencian a CGR y se integran en la retina luego de ser transplantadas.
- c. Determinar si el trasplante intraocular de estas células puede restituir la población de CGR en una retina depletada de este tipo celular.

3.2. Se ha demostrado que la activación de la vía canónica de Shh con SAG induce la regeneración completa de la retina a partir de las células madre del MC y que las CGR de la misma tienen información posicional expresando el sistema Eph/ephrinas en forma de gradiente como las retinas en desarrollo. Esto aumenta las probabilidades de obtener una eferencia que establezca conexiones topográficamente ordenadas en el tectum.

Esto abre las siguientes líneas de trabajo:

- a. Intentar mantener la presión intraocular y permitir un mayor crecimiento ocular con el empleo de sustitutos vítreos.
- b. Continuar evaluando el empleo de SAG y otros estimuladores de la vía canónica de Shh sólo y en combinación con moléculas que favorezcan el crecimiento axonal con el objeto de obtener retinas con un nervio óptico que establezca conexiones con el tectum contralateral.
- c. Investigar si se puede ampliar la ventana temporal en que puede lograrse regeneración retiniana a partir del MC.

Estos resultados tienen aplicación para:

- a) La biología del desarrollo y las neurociencias básicas ya que permiten profundizar los conocimientos sobre los mecanismos celulares y moleculares del desarrollo y la regeneración del SNC y del sistema visual.
- b) La medicina regenerativa ya que plantea la posibilidad de:
  - b1) restituir las CGR dañadas y sus conexiones utilizando trasplantes de células madre.
  - b2) obtener regeneraciones de retinas completas a partir de células madre endógenas manipuladas con moléculas que regulan la proliferación y diferenciación celular y la guía axonal.

# Bibliografía

**Aboody K, Capela A, Niazi N, Stern JH, Temple S.** (2011). Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta stone. *Neuron* 70:597-613

**Ahmad I, Tang L, Pham H.** 2000. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun.* 270:517–521.

**Austin, C.P., Feldman D.E.; Ida J.A. Jr.; Cepko C.L.** (1995). Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development.* 121: p. 3637-3650.

**Azari H, Sharififar S, Rahman M, Ansari S, Reynolds BA.** (2011). Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay. *J Vis Exp.* Jan 11;(47)

**Belecky-Adams T, Tomarev S, Li HS, Ploder L, McInnes RR, Sundin O, Adler R.** (1997). Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1293–1303.

**Baker, R. K. and Antin, P. B.** (2003). Ephs and ephrins during early stages of chick embryogenesis. *Dev Dyn* 228, 128-42.

**Belliveau, M.J. and C.L. Cepko.** (1999). Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development* 126: p. 555-566.

**Bonanomi, D., Chivatakarn, O., Bai, G., Abdesselem, H., Lettieri, K., Marquardt, T., Pierchala, B. A. and Pfaff, S. L.** (2012). Ret is a multifunctional coreceptor that integrates diffusible- and contact-axon guidance signals. *Cell* 148, 568-82.

**Bourgin, C., Murai, K. K., Richter, M. and Pasquale, E. B.** (2007). The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways. *J Cell Biol* 178, 1295-307.

**Braisted JE, Essman TF, Raymond PA.** (1994). Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina. *Development* 120:2409–2419.

**Brittis, P. A., Canning, D. R. and Silver, J.** (1992). Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science* 255, 733-6.

**Brusco A, Pecci Saavedra J, Scicolone G, Flores V.**(1995). Development of serotonergic innervation of the chick embryo tectum opticum. *Int J Devl Neurosci* 13:835-843.

**Buhusi, M., Schlatter, M. C., Demyanenko, G. P., Thresher, R. and Maness, P. F.** (2008). L1 interaction with ankyrin regulates mediolateral topography in the retinocollicular projection. *J Neurosci* 28, 177-88.

**Carri NG; Bermúdez SN; Fiore L; DiNapoli JD; Scicolone G.** (2014) Anaglyph of retinal stem cells and developing axons: selective volume enhancement in microscopy images. *Anat Rec*; 297 (4):770-80.

**Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, Flanagan JG.** (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82: 371-381

**Cho SH, Cepko CL** (2006) Wnt2b/beta-catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development* 133: 3167–3177.

**Cohen, J., Burne, J. F., Winter, J. and Bartlett, P.** (1986). Retinal ganglion cells lose response to laminin with maturation. *Nature* 322, 465-7.

**Coles BL, Angenieux B, Inoue T, Del Rio-Tsonis K, Spence JR, McInnes RR, Arsenijevic Y, van der Kooy D.** (2004) Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15772–15777.

**Coulombre JL, Coulombre AJ.** (1965). Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo. *Dev Biol* 12:79–92.

**Cowan, W.M., L. Adamson, and T.P. Powell.** (1961). An experimental study of the avian visual system. *J Anat.* 95: p. 545-63.

**Cowan, C. A. and Henkemeyer, M.** (2001). The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 413, 174-9.

**Cruz Gaitán AM, Torres-Ruiz NM, Carri NG.** 2015. *Brain Res Bull.* 115:37-44. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.04.006.

**Dail, M., Richter, M., Godement, P. and Pasquale, E. B.** (2006). Eph receptors inactivate R-Ras through different mechanisms to achieve cell repulsion. *J Cell Sci* 119, 1244-54.

**Dakubo, G. D., Wang, Y. P., Mazerolle, C., Campsall, K., McMahon, A. P. and Wallace, V. A.** (2003). Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development* 130, 2967-2980.

**Di Napoli J, Fiore L, Castro I, Carri NG, Scicolone G.** (2012) .VI Int Meet LASDev Biol. Uruguay.

**Di Napoli J, Cavallero, Fiore, Medori, Lujilde, Diaz Carrizo, Del Rio-Tsonis, Sanchez, Carri G, Scicolone G.** (2013)-S-8707-SfN

**Di Napoli J, Fiore L, Di Siervi N, Olmos Carreño, Medori, Rapacioli, Flores V, Sanchez V, Carri NG, Scicolone G.** (2015). Para enviar a Dev Biol

**Doh ST, Hao H, Loh SC, Patel T, Tawil HY, Chen DK, Pashkova A, Shen A, Wang H, Cai L.** (2010). Analysis of retinal cell development in chick embryo by immunohistochemistry and in ovo electroporation techniques. *BMC Dev Biol.* 2010 Jan 20;10:8

**Dupraz, S., Grassi, D., Bernis, M. E., Sosa, L., Bisbal, M., Gastaldi, L., Jausoro, I., Caceres, A., Pfenninger, K. H. and Quiroga, S.** (2009). The TC10-Exo70 complex is essential for membrane expansion and axonal specification in developing neurons. *J Neurosci* 29, 13292-301.

**Dutting, D., A. Gierer, and G. Hansmann,** (1983). Self-renewal of stem cells and differentiation of nerve cells in the developing chick retina. *Brain Res.* 312(1): p. 21-32.

**Egea, J. and Klein, R.** (2007). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol* 17, 230-8.

**Elowe, S., Holland, S. J., Kulkarni, S. and Pawson, T.** (2001). Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol Cell Biol* 21, 7429-41.

**Fekete, D.M., Perez-Miguelsanz J., Ryder E.F., Cepko C.L.** (1994). Clonal analysis in the chicken retina reveals tangential dispersion of clonally related cells. *Dev. Biol.* 166: p. 666–682.

**Feldheim DA y O’Leary DDM.** 2010. Cold Spring Harb Perfect Biol. 1-20.

**Fischer AJ, Reh TA.** (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 220:197–210.



**Fischer A, Reh TA.** (2001a). Transdifferentiation of pigmented epithelial cells: a source of retinal stem cells? *Dev Neurosci* 23:268–276.

**Fischer A, Reh TA.** (2001b). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 4:247–252.

**Fischer AJ, Dierks BD, Reh TA.** (2002). Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development* 129:2283–2291.

**Fischer, A. J. and Reh, T. A.** (2003). Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. *Dev. Biol.* 259, 225-240.

**Fuhrmann, S., Levine, E. M. and Reh T. A.** (2000). Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development* 127, 4599-4609.

**Galy A, Neron B, Planque N, Saule S, Eychene A.** (2002). Activated MAPK/Erk kinase (MEK-1) induces transdifferentiation of pigmented epithelium into neural retina. *Dev Biol*; 248:251-64.

**Greenwood, S. and Struhl, G.** (1999). Progression of the morphogenetic furrow in the *Drosophila* eye: the roles of Hedgehog, Decapentaplegic and the Raf pathway. *Development* 126, 5795-5808.

**Goolsby J, Atamas M, Rollor S, Asanuma D, Schuh R, Makar T, Fishman PS, Bever Jr CT, Trisler D.** (2012). Retinal neural progenitors express topographic map markers. *Neurochemistry International* 61 859–865

**Gu, C., Shim, S., Shin, J., Kim, J., Park, J., Han, K. and Park, S.** (2005). The EphA8 receptor induces sustained MAP kinase activation to promote neurite outgrowth in neuronal cells. *Oncogene* 24, 4243-56.

**Hamburger V, Hamilton HL.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49– 92.

**Hansen MJ, Dallal G.E., Flanagan J.G.** (2004) Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition, *Neuron* 42 717–730.

**Harris, W.A.** (1997). Cellular diversification in the vertebrate retina. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: p. 651-658.

**Hattori, M., Osterfield, M. and Flanagan, J. G.** (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, 1360-5.

**Haynes T, Del Rio-Tsonis K** (2004) Retina repair, stem cells and beyond. *Curr Neurovasc Res* 1:231–239.

**Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K.** (2007). BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 18;104(51):20380-5.

**Haynes T, Luz-Madrigal A, Reis ES, Echeverri Ruiz NP, Grajales-Esquivel E, Tzekou A, Tsonis PA, Lambris JD, Del Rio-Tsonis K.** (2013). Complement anaphylatoxin C3a is a potent inducer of embryonic chick retina regeneration. *Nat Commun*; 4:2312

**Himanen, J. P. and Nikolov, D. B.** (2003). Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci* 26, 46-51.

**Holen, H. L., Shadidi, M., Narvhus, K., Kjosnes, O., Tierens, A. and Aasheim, H. C.** (2008). Signaling through ephrin-A ligand leads to activation of Src-family kinases, Akt phosphorylation, and inhibition of antigen receptor-induced apoptosis. *J Leukoc Biol* 84, 1183-91.

**Horder, T.J. and A. Mashkas.** (1982). The developmental programme for retinal embryogenesis with special reference to the chick. *Bibl Anat*, (23): p. 103-23.

**Hubbard, S. R.** (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 343-58.

**Huber, A. B., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D. and Cloutier, J. F.** (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* 26, 509-63.

**Hyer, J., Mima, T. and Mikawa, T.** (1998). Fgf1 patterns the optic vesicle by directing the placement of the neural retina domain. *Development* 125, 869-877.

**Ihrie RA and Alvarez-Buylla.** (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70:674-686.

**Inoue, A. and Sanes, J. R.** (1997). Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science* 276, 1428-31.

**Irimia M, Maeso I, Burguera D, Hidalgo-Sanchez M, Puellas L, Roy SW, Garcia-Fernandez J, Ferran JL.** (2011). Contrasting 5' and 3' evolutionary

histories and frequent evolutionary convergence in Meis/hth gene structures. *Genome Biol Evol* 3:551-64.

**Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J. P., Lackmann, M. and Nikolov, D. B.** (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123, 291-304.

**Janes, P. W., Wimmer-Kleikamp, S. H., Frangakis, A. S., Treble, K., Griesshaber, B., Sabet, O., Grabenbauer, M., Ting, A. Y., Saftig, P., Bastiaens, P. I. et al.** (2009). Cytoplasmic relaxation of active Eph controls ephrin shedding by ADAM10. *PLoS Biol* 7, e1000215.

**Jasoni, C., Hendrickson, A. and Roelink, H.** (1999). Analysis of chicken Wnt-13 expression demonstrates coincidence with cell division in the developing eye and is consistent with a role in induction. *Dev. Dyn.* 215, 215-224.

**Johns PR, Fernald RD.** (1981). Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature* 293: 141–142.

**Johns PR.** (1982). Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *J Neurosci* 2:178–198.

**Julian D, Ennis K, Korenbrot JI.** (1998). Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol* 394:271–282.

**Kahn, A.J.** (1973). Ganglion cell formation in the chick neural retina. *Brain Res.* 63: p. 285-90.

**Kahn, A.J.** (1974). An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev Biol*, 38(1): p. 30-40.

**Kalil, K. and Dent, E. W.** (2005). Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Curr Opin Neurobiol* 15, 521-6.

**Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M.** (2000). “The bodily senses” (p. 430-450) in “Principles of Neural Science”.

**Khodosevich K, Watanabe Y, Monyer H.** (2011). EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *J Cell Science* 124:1268-1279.

**Knoll, B. and Drescher, U.** (2004). Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* 24, 6248-57.

**Kullander, K. and Klein, R.** (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 475-86.

**Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H. and Schaffer, D. V.** (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* 6, 21-27.

**LaVail, J.H. and W.M. Cowan.** (1971). The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Res.* 28(3): p. 391-419.

**Levine, E. M., Roelink, H., Turner, J. and Reh, T. A.** (1997). Sonic hedgehog promotes rod photoreceptor differentiation in mammalian retinal cells in vitro. *J. Neurosci.* 17, 6277-6288.

**Lim, Y. S., McLaughlin, T., Sung, T. C., Santiago, A., Lee, K. F. and O'Leary, D. D.** (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* 59, 746-58.

**Lino, N., Fiore, L., Rapacioli, M., Teruel, L., Flores, V., Scicolone, G. and Sanchez, V.** (2014). uPA-uPAR molecular complex is involved in cell signaling during neuronal migration and neuritogenesis. *Dev Dyn* 243, 676-89.

**Lisabeth, E. M., Falivelli, G. and Pasquale, E. B.** (2013). Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.

**Litzinger T, Del Rio-Tsonis K.** (2001). Eye anatomy. *ELS Encyclopedia of Life Sciences / www.els.net.* Nature Publishing Group. Macmillan Publishers Ltd. Reg. No.785998 England.

**Locker M, El Yakoubi W, Mazurier N, Dullin J-P, Perron M.** (2010). A decade of mammalian retinal stem cell research. *Arch Italiennes de Biologie.* 148:59-72.

**Lopashov GV, Stroeveva OG.** (1964). Development of the eye. Experimental studies. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem.

**Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, Reynolds BA.** (2008). Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells.* 2008 Apr;26(4):988-96.

**Marler, K. J., Becker-Barroso, E., Martinez, A., Llovera, M., Wentzel, C., Poopalasundaram, S., Hindges, R., Soriano, E., Comella, J. and**

**Drescher, U.** (2008). A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J Neurosci* 28, 12700-12.

**Marquardt, T., Shirasaki, R., Ghosh, S., Andrews, S. E., Carter, N., Hunter, T. and Pfaff, S. L.** (2005). Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. *Cell* 121, 127-39.

**Marston, D. J., Dickinson, S. and Nobes, C. D.** (2003). Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol* 5, 879-88.

**Martinez-Morales, J. R., Dolez, V., Rodrigo, I., Zaccarini, R., Leconte, L., Bovolenta, P. and Saule, S.** (2003). OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 21721-21731.

**Mayordomo, R., Valenciano, A. I., de la Rosa, E. J. and Hallbook, F.** (2003). Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspasedependent programmed cell death. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1744-1750.

**McKerracher, L., Chamoux, M. and Arregui, C. O.** (1996). Role of laminin and integrin interactions in growth cone guidance. *Mol Neurobiol* 12, 95-116.

**Meller, K. and W. Tetzlaff,** (1976). Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tissue Res*, 1976. 170(2): p. 145-59.

**McLaughlin T, Hindges R, O'Leary DDM.** (2003). Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain.. *Curr Opinion in Neurobiol* 13:57-69.

**McLaughlin, T., Hindges, R., Yates, P. A. and O'Leary, D. D.** (2003b). Bifunctional action of ephrin-B1 as a repellent and attractant to control bidirectional branch extension in dorsal-ventral retinotopic mapping. *Development* 130, 2407-18.

**McLaughlin, T. and O'Leary, D. D.** (2005). Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annu Rev Neurosci* 28, 327-55.

**Meller, K.** (1984). Morphological studies on the development of the retina. *Progress in Retinal Research*, ed. N. Osborne and J. Chader, Oxford, UK: Pergamon. 1-19.

**Mey, J. and S. Thanos.** (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 32(2-3): p. 343-79.

**Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E. and Wang, B.** (2000). Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol* 2, 62-9.

**Mitashov VI.** (1996). Mechanisms of retina regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol* 40:833–844.

**Mitashov VI.** (1997). Retinal regeneration in amphibians. *Int J Dev Biol* 41:893–905

**Mochii, M., Mazaki, Y., Mizuno, N., Hayashi H. and Eguchi, G.** (1998a). Role of microphthalmia in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell. *Dev. Biol.* 193, 47-62.

**Mochii, M., Ono, T., Matsubara, Y. and Eguchi, G.** (1998b). Spontaneous transdifferentiation of quail pigmented epithelial cell is accompanied by a mutation in the *Mitf* gene. *Dev. Biol.* 196, 145-159.

**Morris VB, Wylie CC, Miles VJ.** (1976). The growth of the chick retina after hatching. *Anat Rec* 184:111–113.

**Mortimer, D., Fothergill, T., Pujic, Z., Richards, L. J. and Goodhill, G. J.** (2008). Growth cone chemotaxis. *Trends Neurosci* 31, 90-8.

**Moshiri A, Close J, Reh TA.** (2004). Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol.* 48:1003-14.

**Murai, K. K. and Pasquale, E. B.** (2003). 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 116, 2823-32.

**Neumann, C. J. and Nusslein-Volhard, C.** (2000). Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289, 2137- 2139.

**Nguyen, M. and Arnheiter, H.** (2000). Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between Fgf and MITF. *Development* 127, 3581-3591.

**North HA, Zhao X, Kolk SM, Clifford MA, Ziskind DM, Donoghue MJ.** 2009. Promotion of proliferation in the developing cerebral cortex by EphA4 forward signaling. *Development* 136:2467-2476.

**Ohuchi, H., Koyama, E., Myokai, F., Nohno, T., Shiraga, F., Matsuo, T., Matsuo, N., Taniguchi, S. and Noji, S.** (1994). Expression patterns of two

fibroblast growth factor receptor genes during early chick eye development. *Exp. Eye Res.* 58, 649-658.

**Oppenheim, R.W.** (1968). Light responsivity in chick and duck embryos just prior to hatching. *Anim Behav.* 16(2): p. 276-80.

**Ortalli AL, Fiore L, Di Napoli J, Rapacioli M, Salierno M, Etchenique R, Flores V, Sanchez V, Carri NG, Scicolone G.** (2012) EphA3 expressed in the chicken tectum stimulates nasal retinal ganglion cell axon growth and is required for retinotectal topographic map formation. *PloS ONE* 7(6): e38566. p1-17.

**Otteson DC, D'Costa AR, Hitchcock PF.** (2001). Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev Biol* 232: 62–76.

**Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K. S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U. and Klein, R.** (2002). EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* 9, 725-37.

**Palmer, A. and Klein, R.** (2003). Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev* 17, 1429-50.

**Park CM, Hollenberg MJ.** (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev Biol* 134:201– 205.

**Park CM, Hollenberg MJ.** (1991). Induction of retinal regeneration in vivo by growth factors. *Dev Biol* 148:322–333.

**Park CM, Hollenberg MJ.** (1993). Growth factor-induced retinal regeneration in vivo. *Int Rev Cytol* 146:49–74.

**Pasquale E.B.** (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour, *Nat.Rev. Mol. Cell. Biol.* 6 462–475.

**Patten, B.M.** (1971). *Early Embryology of the Chick.* 5 ed., New York, USA:McGraw-Hill.

**Pawson, T.** (1995). Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* 373, 477-8

**Perron M, Kanekar S, Vetter ML, Harris WA.** (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol* 199:185– 200.



**Perron, M., Boy, S., Amato, M. A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T. and Harris, W. A.** (2003). A novel function for Hedgehog signaling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* 130, 1565-1577.

**Pittack, C., Grunwald, G. B. and Reh, T. A.** (1997). Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development* 124, 805-816.

**Pitulescu, M. E. and Adams, R. H.** (2010). Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev* 24, 2480-92.

**Prada, C., y col.** (1991). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur. J. Neurosci.* 3: p. 559–569.

**Planque N, Leconte L, Coquelle FM, Martin P, Saule S.** (2001). Specific Pax-6/microphthalmia transcription factor interactions involve their DNA-binding domains and inhibit transcriptional properties of both proteins. *J Biol Chem*; 276:29330-7.

**Rager, G. and B.v. Oeynhaus.** (1979). Ingrowth and ramification of retinal fibers in the developing optic tectum of the chick embryo. *Exp. Brain Res.* 35: p. 213-227.

**Rager, G.** (1979). The cellular origin of the b-wave in the electroretinogram – a developmental approach. *J Comp Neurol.* 188(2): p. 225-44.

**Rager, U., G. Rager, and B. Frei.** (1993). Central retinal area is not the site where ganglion cells are generated first. *J. Comp. Neurol.* 334: p. 529–544.

**Rapacioli M, Duarte S, Rodríguez Celín A, Fiore L, Teruel L, Scicolone G, Sanchez V, Flores V.** 2012. Optic tectum morphogenesis: a step-by-step model based on the temporal-spatial organization of the cell proliferation. Significance of deterministic and stochastic components subsumed in the spatial organization. *Devl Dynamics* 241:1043-61.

**Raymond PA, Reifler MJ, Rivilin PK.** (1988). Regeneration of goldfish retina: rod precursors are a likely source of regenerated cells. *J Neurobiol* 19:431–463.

**Raymond PA, Hitchcock PF.** (1997). Retinal regeneration: common principles but diversity of mechanism. *Adv Neurol* 72: 171–184.

**Raymond PA, Hitchcock PF.** (2000). How the neural retina regenerates. *Results Prob Cell Differ* 31:197–218.

**Reh TA, Levine EM.** (1998). Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J Neurobiol* 36:206–220.

**Reh TA, Fischer AJ.** (2001). Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav Evol* 58: 296–305.

**Reh TA, Fischer AJ.** (2006). Retinal stem cells. *Methods Enzymol.* 419: 52-73.

**Rhee J, Buchan T, Zukerberg L, Lilien J, Balsamo J** (2007) Cables links Robo- bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol* 9: 883–892.

**Rogers, L.J.** (1995). *The Development of Brain and Behaviour in the Chicken.* 1 ed., Wallingford, UK: CAB International.

**Ross, M., Kaye, G. and Pawlina, W.** (2004). *Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular.* Buenos Aires.

**Saha, M.S., M. Servetnick, and R.M. Grainger.** (1992). Vertebrate eye development. *Curr Opin Genet Dev.* 4: p. 582-8.

**Sahin M, Greer PL, Lin MZ, Poucher H, Eberhart J.** (2005). Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron* 46 :191-204.

**Scicolone, G., y col.** (1995). Development of the laminated pattern of the chick tectum opticum. *Int J Dev Neurosci.* 13(8): p. 845-58.

**Scicolone, G., y col.** (2006). Developmental pattern of NADPH-diaphorase positive neurons in chick optic tectum is sensitive to changes in visual stimulation. *J Comp Neurol.* 494(6): p. 1007-30.

**Scicolone, G., Ortalli, A. L. and Carri, N. G.** (2009). Key roles of Ephs and ephrins in retinotectal topographic map formation. *Brain Res Bull* 79, 227-47.

**Singhal Shweta, Bhatia Bhairavi, Jayaram Hari, Becker Silke, Jones Megan F., Cottrill Phillippa B., Khaw Peng T., Salt Thomas E. and Limb G. Astrid.** (2012). Human Müller Glia with Stem Cell Characteristics Differentiate into Retinal Ganglion Cell (RGC) Precursors In Vitro and Partially Restore RGC Function In Vivo Following Transplantation. *Stem Cells Trans Med* 2012, 1:188-199.

**Shkumatava, A., Fischer, S., Müller, F., Strahle, U. and Neumann, C. J.** (2004). Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range

signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development* 131, 3849-3858.

**Singhal S, Bhatia B, Jayaram H, Becker S, Jones MF, Cottrill PB, Khaw PT, Salt TE, Limb GA.** (2012). Human Müller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors in vitro and partially restore RGC function in vivo following transplantation. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Mar;1(3):188-99.

**Spence, S.G. and J.A. Robson.** (1989). An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience.* 32: p. 801–812.

**Spence JR, Madhavan M, Ewing JD, Jones DK, Lehman BM, Del Rio-Tsonis K.** (2004). The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development;* 131:4607-21.

**Spence JR, Madhavan M, Aycinena JC, Del Rio-Tsonis K.** (2007). Retina regeneration in the chick embryo is not induced by spontaneous Mitf downregulation but requires FGF/FGFR/MEK/Erk dependent upregulation of Pax6. *Molecular Vision;* 13:57-65

**Sperry, R. W.** (1963). Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50, 703-10.

**Stenkamp, D. L., Frey, R. A., Prabhudesai, S. N. and Raymond, P. A.** (2000). Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. *Dev. Biol.* 220, 238-252.

**Stenkamp, D. L. and Frey, R. A.** (2003). Extraretinal and retinal hedgehog signaling sequentially regulate retinal differentiation in zebrafish. *Dev. Biol.* 258, 349-363.

**Strauss O.** (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005 Jul;85(3):845-81. Review.

**Takeichi, M.** (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci* 8, 11-20.

**Take-uchi, M., Clarke, J. D. W. and Wilson, S. W.** (2003). Hedgehog signaling maintains the optic stalk-retinal interface through the regulation of Vax activity. *Development* 130, 955-968.

**Tcheng, M., Fuhrmann, G., Hartmann, M. P., Courtois, Y. and Jeanny, J. C.** (1994). Spatial and temporal expression patterns of Fgf receptor

Genes Type 1 and Type 2 in the developing chick retina. *Exp. Eye Res.* 58, 351- 358.

**Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-33.

**Thanos, S. and J. Mey.** (2001). Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res Brain Res Rev.* 35(3): p. 205-45.

**Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D.** (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 287: 2032–2036.

**Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K** (2004) Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications. *Exp Eye Res* 78:161–172.

**Turner, D.L. and C.L. Cepko.** (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature.* 328: p. 131–136.

**van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, Destree O, Clevers H** (2002) Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 277: 17901–17905.

**Vihetic TS, Hyde DR.** (2000). Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *J Neurobiol* 44:289– 307.

**Wang, Y. P., Dakubo, G., Howley, P., Campsall, K. D., Mazarolle, C. J., Shiga, S. A., Lewis, P. M., McMahon, A. P. and Wallace, V. A.** (2002). Development of normal retinal organization depends on Sonic hedgehog signaling from ganglion cells. *Nat. Neurosci.* 5, 831-832.

**Williams, R.S. and D. Goldowitz.** (1992). Lineage versus environment in embryonic retina: a revisionist perspective. *Trends Neurosci.* 15: p. 368-373.

**Wolpert, L., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J.** (2007). Capítulo “Regeneración” (p.475-495) en “Principios de desarrollo”. 3ra edición.

**Wu DM, Schneiderman T, Burgett J, Gokhale P, Barthel L, Raymond PA.** (2001). Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2115–2124.

**Yamagata, M. and J.R. Sanes.** (1995). Lamina-specific cues guide outgrowth and arborization of retinal axons in the optic tectum. *Development*. 121(1): p. 189-200.

**Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, et al.** (1996) The axis- inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10: 1443–1454.

**Yu DBS and Silva GA.** (2008). Stem cell sources and therapeutic approaches for central nervous system and neural retinal disorders. *Neurosurg Focus* 24:1-14.

**Zhang, X. M. and Yang, X. J.** (2001a). Temporal and spatial effects of sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. *Dev. Biol.* 233, 271-290.

**Zhang, X. M. and Yang, X. J.** (2001b). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development* 128, 943-957.

**Zhu J, Luz-Madrigal A, Haynes T, Zavada J, Burke AK, Del Rio-Tsonis K.** (2014).  $\beta$ -Catenin inactivation is a pre-requisite for chick retina regeneration. *PLoS One*. Jul 8;9(7):e101748

**Zelina, P., Avci, H. X., Thelen, K. and Pollerberg, G. E.** (2005). The cell adhesion molecule NrCAM is crucial for growth cone behaviour and pathfinding of retinal ganglion cell axons. *Development* 132, 3609-18.

**Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. and Klein, R. (2003).** EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* 5, 869-78.