



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**EFFECTOS NEUROREGENERATIVOS ASOCIADOS A LA HORMONA DE CRECIMIENTO
EN NEURORETINA DE POLLO**

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

DAVID EPARDO ARGAIZ

DIRIGIDA POR

DR. CARLOS GUILLERMO MARTÍNEZ MORENO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO 2020

RESUMEN

La neuroregeneración es un proceso conservado en vertebrados inferiores pero parcial o ausente en vertebrados superiores. Específicamente la retina de las aves después de un daño por excitotoxicidad, se regenera de manera parcial y reintegra un bajo porcentaje de células neurales originadas a partir de las células gliales de Müller a través del proceso de transdiferenciación. Factores como FGF2, IGF-1, Sox2, Ascl1 y Notch1 tienen una participación importante durante este proceso. En el presente estudio, se propone que la hormona de crecimiento (GH) es capaz de potenciar la regeneración de la retina después de un daño por excitotoxicidad. El protocolo para inducir regeneración incluyó una única inyección intravitreal de kainato (KA) (20 μ g) para inducir excitotoxicidad al día posnatal 1 (P1), seguido por 10 inyecciones de GH (300 ng) del P2 al P16. Las retinas se colectaron al P21 para su análisis por medio de histoquímica, cuantificación de ARNm y cuantificación de proteínas. También se analizaron los cambios en la proliferación celular después del daño con KA y con el tratamiento con GH, usando un marcaje con BrdU en un protocolo de ocho días con daño agudo con KA y tratamiento crónico con GH. Se confirmó el efecto regenerativo de la GH por medio de morfometría de la retina, en donde se vio que la capa nuclear interna (INL) y la capa plexiforme interna (INP) se recuperaron parcialmente con el tratamiento con GH. Se cuantificaron los cambios relativos en la expresión de ARNm de marcadores de transdiferenciación (Sox2, FGF2, PCNA), marcadores sinaptogénicos (DLG1, SNAP25 y NRXN1), receptores a glutamato (NR1 y GRIK4), factores de protección (BDNF y BMP4) y se analizó la participación de la vía de señalización Notch (Notch1, Ascl-1 y Hes5). Por otro lado, se analizó la inmunoreactividad por Western Blot, de factores de supervivencia (TNF-R2 y Bcl-2) y el

marcador sinaptogénico GAP43. Los resultados mostraron que después del daño con excitotoxicidad, la GH es capaz de promover la recuperación de la retina, incrementando la expresión del ARNm de FGF2 y Sox2, aunque no de Ascl1. Además se incrementó la expresión de Notch1 así como de Hes5. La GH también incrementó los niveles de BDNF, NR1, GRIK4 y DLG1, pero no de los demás genes analizados. Por otro lado se observó el incremento de la inmunoreactividad de Bcl-2, GAP43 y TNF-R2 con el tratamiento crónico de GH. A través del marcaje con BrdU se confirmó que la GH promueve la proliferación después del daño. En resumen, este trabajo muestra que el tratamiento crónico con GH después de un daño por excitotoxicidad, es capaz de potenciar e inducir efectos neuregenerativos y protectores, asociados con la transdiferenciación de la glia de Müller en la retina de pollo.

ABSTRACT

Neuroregeneration is a conserved process in lower vertebrates, but partially or completely lost in upper vertebrates. Specifically, after an excitotoxic insult, the avian retina is able to partially regenerate and re-integrate neural cells originated from transdifferentiated Müller glial cells. Different factors, such as FGF2, IGF-1, Sox2, Ascl1, Notch1, among others, are very important for this process. In this work, we propose that growth hormone (GH) enhances retinal regeneration in the chicken after an excitotoxic event. The protocol to induce regeneration was: a single intravitreal kainic acid injection (KA) (20 μ g) at post-natal day 1 (P1), followed by 10 GH injections (300ng) from P2 to P16. Retinas were collected at p21 for histochemistry, mRNA quantification and protein quantification. We also analyzed cell proliferation after KA excitotoxicity damage and with the GH treatment using BrdU labeling in an eight day protocol including acute KA-induced damage and chronic GH treatment. We confirmed the regenerative effect of GH through retinal morphometry, from which we saw partial recovery of the inner nuclear layer and the inner plexiform layer after GH treatment. We quantified relative changes on the mRNA expression of transdifferentiation markers (Sox2, FGF2 & PCNA), synaptogenic markers (DLG1, SNAP25 & NRXN1), glutamate receptor subunits (NR1 & GRIK4), neuroprotection factors (BDNF & BMP4) and the participation of the Notch pathway (Notch1, Ascl-1 & Hes5). On the other hand, we analyzed the immunoreactivity by Western Blot, of survival factors (TNG R2, Bcl-2) and the synaptogenic marker GAP43. Our results show that after an excitotoxic event, GH is able to promote retinal regeneration, increasing the expression of FGF2 and Sox2 mRNA, but not Ascl1. Notch1 and Hes5 mRNA expression were also increased. GH also upregulated BDNF, NR1, GRIK4 and DLG1 mRNA levels, but not the

ones of the other analyzed genes. Bcl-2, GAP43 and TNF R2 immunoreactivity were also increased with the GH treatment. Through BrdU labeling we confirmed that GH treatment enhances proliferation after excitotoxic damage. In summary, this work demonstrates that chronic GH treatment after excitotoxic damage is able to induce neuroregenerative and protective effects, associated with Müller glia transdifferentiation in the chicken retina .

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano, quienes me dieron todo el apoyo de inicio a fin.

A toda mi familia, que me ha escuchado, ayudado y alentado en todo lo que hago.

A Jara, Rafa y Jaky

A mis amigos, no hace falta decir nombres

A Alan, que fue quien me llevó al laboratorio donde me han adoptado y criado

A todo el laboratorio D-01

Al Dr. Carlos Arámburo que me permitió formar parte de su equipo de trabajo

A mi jefe, el Dr. Carlos G. Martínez Moreno, que ha sido un gran jefe y me ha hecho crecer enormemente

ÍNDICE

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Hormona de crecimiento</i>	1
1.1.1 <i>Función</i>	2
1.1.2 <i>Hormona de crecimiento en el SNC del pollo (<u>Gallus gallus</u>)</i>	2
1.1.3 <i>Hormona de crecimiento en la neuroregeneración y neuroprotección</i>	3
1.2 <i>Neuroregeneración</i>	4
1.2.1 <i>Neuroregeneración en la retina de las aves</i>	5
1.3 <i>Ojo de pollo</i>	6
1.3.1 <i>Estructura y elementos oculares</i>	7
1.3.2 <i>Ojo de pollo como modelo de investigación</i>	8
1.4 <i>Factores asociados a la neuroprotección y neuroregeneración</i>	9
II. HIPÓTESIS	11
III. OBJETIVOS	12
3.1 <i>General</i>	12

3.2 Particulares	12
IV. METODOLOGÍA	13
4.1 Animales experimentales	13
4.2 Tratamientos y diseño experimental	13
4.3 Colecta de ojos y procesamiento de las muestras	15
4.4 Extracción de ARN total	16
4.5 Retrotranscripción	17
4.6 qPCR	17
4.7 Extracción de proteínas	19
4.8 Western blot	19
4.9 Cortes histológicos	21
4.10 Tinción con Hematoxilina	21
4.11 Medición de la retina	21
4.12 Inmunohistoquímica	22
4.13 Análisis estadístico	22
V. RESULTADOS	24
5.1 Efecto excitotóxico del KA sobre la morfología de la retina a los 8, 15 y 21 días posteriores al daño	24
5.2 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre la morfología de la retina dañada por excitotoxicidad con KA	26
5.3 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre factores de supervivencia y neurotróficos, y la expresión endógena de GH	28

<i>5.4 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre la expresión de factores de transdiferenciación y proliferación</i>	30
<i>5.5 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre marcadores sinaptogénicos y receptores a glutamato</i>	32
<i>5.6 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre la proliferación celular</i>	34
VI. DISCUSIÓN	37
VII. CONCLUSIÓN	45
VIII. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Factores asociados a la neuroregeneración en la retina de las aves	10
Tabla 2	Lista de oligonucleótidos iniciadores (primers)	18
Tabla 3	Lista de anticuerpos y diluciones	20
Tabla 4	Efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre la expresión de marcadores de regeneración después del daño excitotóxico inducido con kainato (KA)	43

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Representación esquemática como línea del tiempo del protocolo para evaluar la morfología de la retina después de un daño agudo con kainato (KA) a 8, 15 y 21 días. 14
- Figura 2** Representación esquemática como línea del tiempo del protocolo para evaluar el tratamiento crónico con hormona de crecimiento (GH) en la retina después de un daño agudo con kainato (KA) a 21 días. 14
- Figura 3** Representación esquemática como línea del tiempo del protocolo para evaluar el tratamiento crónico con hormona de crecimiento (GH) sobre la proliferación en la retina después de un daño agudo con kainato (KA) a 8 días. 15
- Figura 4** Efectos del daño agudo con kainato (KA) en la morfología de retinas de pollo evaluadas a 8, 15 y 21 días posteriores a la inyección intravitreal de KA (20ug). 25
- Figura 5** Efecto del tratamiento crónico con hormona de crecimiento (GH) en la morfometría de la retina después de daño excitotóxico agudo con kainato (KA) en retinas de pollo. 27

Figura 6	Efecto del tratamiento con hormona de crecimiento (GH) después de daño excitotóxico con kainato (KA) sobre la inmunoreactividad de Bcl-2 y TNF R2, y la expresión del ARNm de BDNF, BMP4 y GH.	29
Figura 7	Efecto del tratamiento con hormona de crecimiento (GH) sobre la expresión del ARNm de FGF2, Sox2, ASCL1, Notch1, Hes5 y PCNA en retinas dañadas por excitotoxicidad aguda con kainato (KA).	31
Figura 8	Efectos del tratamiento con hormona de crecimiento (GH) sobre la expresión del ARNm de DLG1, NRXN1, SNAP25, NR1 y GRIK4, y la inmunoreactividad de GAP43, después de daño excitotóxico con kainato (KA) en retinas de pollo.	33
Figura 9	Efectos proliferativos del tratamiento con hormona de crecimiento (GH) en retinas dañadas por excitotoxicidad con kainato (KA) mediante marcaje de inmunoreactividad a BrdU.	35

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Hormona de crecimiento

La hormona del crecimiento (GH por sus siglas en inglés) es una hormona peptídica presente en todos los vertebrados; está formada de una sola cadena de 191 aminoácidos (aunque el número puede variar según la especie), y su peso aproximado es de 22 kDa (Miller y Eberhardt, 1983; Kostyo y Reagan, 1976). Esta se sintetiza principalmente en los somatotropos localizados en la sección anterior de la hipófisis, y se secreta a la circulación sanguínea para ejercer efectos endócrinos mayoritariamente en el hígado y cartílago además de otros tejidos blanco, a través de un receptor de citoquinas tipo 1 (GHR) que activa la vía JAK/STAT (Grumbach, Bin-Abbas y Kaplan, 1998; Brooks, *et al.* 2008). De igual manera se sabe que diversos órganos y tipos celulares producen GH de forma local, que actúa de manera paracrina, autocrina e intracrina y ejercen efectos variados, no solo de crecimiento y a diferentes etapas de desarrollo (Harvey *et al.* 2012). La regulación de la GH se da principalmente a través de dos moléculas cuya secreción es regulada por el hipotálamo: 1) la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH, growth hormone releasing hormone) y 2) la somatostatina u hormona inhibidora de la hormona de crecimiento (GHIH, growth hormone inhibitor hormone). Además, existen otras moléculas que modulan su síntesis y expresión a diferentes niveles, como PACAP, GnRH, ghrelina, leptina y TRH (Ranke y Wit, 2018). Por otro lado, el principal efector de la GH es el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1 (IGF1, insuline-like growth factor 1), cuyo efecto principal es de crecimiento y su síntesis se da mayoritariamente en el hígado (Ranke y Wit, 2018).

1.1.1 Función

La GH tiene acciones pleiotrópicas involucradas en distintos fenómenos, principalmente pero no únicamente relacionados con el crecimiento (Bartke, 2011). Mayoritariamente los efectos que la GH ejerce son de manera endócrina, fomentando la expresión y síntesis de IGF-1 en el hígado, elevando la retención de calcio y mineralización de huesos, promoviendo la lipólisis, modulando el crecimiento somático, la maduración sexual, reduciendo la internalización de glucosa en el hígado y más recientemente descrito, teniendo efectos inmuomoduladores y neuroprotectores (Ranke y Wit, 2018; Martínez-Moreno, *et al.* 2018a). El dogma de la GH que describe funciones puramente relacionadas con crecimiento ha cambiado gracias a la caracterización de funciones diversas y producción local de la GH en diferentes tejidos y etapas de desarrollo (Sanders, *et al.* 2005).

1.1.2 Hormona de crecimiento en SNC del pollo (*Gallus gallus*)

Se ha caracterizado la presencia de la GH y el ARNm de GH en la espina dorsal, cerebro, nervios periféricos, retina, y otros tejidos del sistema nervioso en etapas adultas y prenatales del pollo (Arámburo *et al.*, 2014; Martínez-Moreno *et al.*, 2018a). Además ciertos tejidos no nerviosos (ej. Inmune y reproductor) también son capaces de sintetizar y responder a la administración de GH exógena en diferentes grupos de vertebrados (Baudet, *et al.* 2003; Harvey y Hull, 2003; Harvey *et al.* 2016).

La regulación de la GH en el pollo se comporta de manera muy similar a los mamíferos, siendo la GHRH la hormona liberadora principal y la somatostatina la hormona inhibidora

principal, a través del eje hipofisiario (Scanes y Harvey, 1981). La GH en aves cumple funciones metabólicas y de crecimiento principalmente, y además, es particularmente necesaria para la vitelogénesis y desarrollo reproductivo para la puesta de huevos, actuando de manera conjunta con la prolactina (Scanes y Harvey, 1981).

1.1.3 Hormona de crecimiento en la neuroregeneración y neuroprotección

Actualmente está bien caracterizada la expresión de la GH y su receptor en tejidos neurales, esta producción local además se suma con la GH que de manera circulante es capaz de llegar al sistema nervioso (Harvey, 2010). Se han reportado efectos de la GH durante el desarrollo y que participan en el mantenimiento de la homeostasis y organización del tejido nervioso, proliferación, diferenciación, formación de sinapsis, crecimiento dendrítico, neuroprotección, neuroregeneración y establecimiento cognitivo en diferentes estructuras del sistema nervioso de mamíferos y aves (Martínez-Moreno *et al.* 2018a). La GH exógena tiene efectos neurotróficos en el sistema nervioso central y periférico donde además favorece la supervivencia neuronal y modula la muerte celular por necrosis y apoptosis (Bianchi, *et al.* 2017). En ratas, se ha demostrado que la GH reduce las lesiones provocadas por hipoxia y disminuye las deficiencias cognitivas, mejora la recuperación motora después de lesiones en la corteza frontal, induce la proliferación de precursores neurales en el hipocampo posterior a daño excitotóxico con kainato (KA) y promueve la proliferación en cerebros de ratas adultas hipofisectomizadas, entre otras evidencias que sugieren un gran potencial terapéutico en el sistema nervioso (Aberg, *et al.* 2009; Li, *et al.* 2011; Devesa, *et al.* 2011a; Heredia, *et al.* 2013). Además, en humanos la GH ha sido utilizada exitosamente como tratamiento en pacientes con traumas cerebrales por contusiones y ante lesiones de nervios periféricos, siendo capaz

de recuperar parcialmente funciones motoras y cerebrales (Devesa, *et al.* 2012; Bianchi, *et al.* 2017).

1.2 Neuroregeneración

El desarrollo del sistema nervioso es un proceso complejo y altamente regulado a través de eventos de formación y eliminación de células e interacciones (Goda y Davis, 2003). En vertebrados, la neurogénesis ocurre en el desarrollo embrionario tardío a partir del ectodermo, que da origen a la cresta neural que formará al sistema nervioso periférico, y el tubo neural que formará al sistema nervioso central (Gilbert, 2003). Este proceso está finamente regulado por la interacción de diversas vías de señalización como Wnt, FGF y BMP, además de la interacción entre las células y microambientes que determinan los destinos celulares o prevalencia de células progenitoras (Gilbert, 2003). Dicha dinámica permanece estable una vez que el sistema nervioso se ha desarrollado completamente, y durante la adultez, poca es la neurogénesis basal que se presenta en vertebrados; sin embargo, existen diferencias muy marcadas entre los distintos grupos en cuanto a la capacidad de regeneración de tejido neural posterior a un daño (Hua y Smith, 2004). La mayoría de los anfibios y peces óseos son capaces de regenerar completamente tejidos nerviosos en etapa embrionaria, tejidos inmaduros y algunos como adultos, siendo limitados en su capacidad regenerativa únicamente por la senescencia (Vanhunsel, *et al.* 2017; Tazaki, *et al.* 2017). Los mamíferos han perdido casi toda capacidad de regeneración en etapas adultas y durante mucho tiempo se pensó que no poseían poblaciones de células progenitoras neurales en ninguna parte del sistema nervioso. Sin embargo, reciente evidencia sugiere que sí existen poblaciones de progenitores neurales en el sistema nervioso central de los mamíferos y también existe cierta capacidad de

renovación y regeneración neuronal en el bulbo olfatorio e hipocampo del giro dentado de algunos mamíferos pero dicha capacidad es limitada (Caroni, 1998; Armstrong y Barker, 2001; Aldskogius, 2001; Barnea y Pravosudov, 2011;Ulloa, *et al.* 2018). Las aves en cambio, son capaces de regenerar ciertos tejidos nerviosos en etapas embrionarias y como adultos solo muestran una respuesta insuficiente de regeneración en comparación a anfibios y peces (Barnea y Pravosudov, 2011). Se ha reportado una alta capacidad de reemplazamiento de neuronas en el centro vocal superior de diversas aves y procesos regenerativos posteriores a un daño en el neocórtex, giro parahipocámpico, región paraolfatoria y la retina (Barnea y Pravosudov, 2011; Gallina, *et al.* 2014; Scharff y Adam, 2013; Hang-Chen, *et al.* 2015).

1.2.1 Neuroregeneración en la retina de las aves

En los diferentes grupos de vertebrados, la regeneración de la retina se presenta gracias a diferentes fuentes de células progenitoras: 1) el epitelio pigmentado, 2) células progenitoras en la zona marginal ciliar y 3) las células gliales de Müller (Fischer y Reh, 2001; Gallina, *et al.* 2014). La retina de las aves es capaz de regenerarse totalmente en etapas embrionarias y existe evidencia creciente de una modesta regeneración posterior a la eclosión, generada principalmente por las células de Müller (Fischer y Reh, 2001). Contrario a los peces y anfibios, la zona marginal ciliar no contribuye a la regeneración en aves posterior a la eclosión ni siquiera cuando sometida a estímulos exógenos, sin embargo tanto este como el epitelio pigmentado sí poseen capacidades regenerativas en etapas embrionarias, perdidas cuando se completa la diferenciación y desarrollo de la retina; por lo tanto, actualmente se sabe que las células gliales de Müller son la fuente

regenerativa en la retina de las aves después de la eclosión (Park y Hollenberg, 1991; Gallina, *et al.* 2014; Fischer, *et al.* 2014).

Evidencia reciente ha demostrado que ante un daño excitotóxico, se activa un proceso de transdiferenciación de la glia de Müller el cual genera células progenitoras, las cuales son capaces de proliferar, sin embargo hasta ahora no se ha demostrado su reintegración funcional (Fischer y Bongini, 2010; Gallina, *et al.* 2014). Distintos factores de crecimiento, como FGF2, GH, IGF1 e insulina, han demostrado tener importantes efectos neuroprotectores ante un daño excitotóxico en la retina y en cultivos primarios de neuroretina de pollo, reduciendo la muerte celular y promoviendo la transcripción de proteínas con acciones neurotróficas (Fleming, *et al.* 2018; Martínez-Moreno, *et al.* 2018b; Fischer, *et al.* 2002). Además, la insulina y FGF2 en conjunto son capaces de activar y potenciar el proceso de transdiferenciación de la glia de Müller y su proliferación aún en ausencia de daño neurotóxico, (Fischer, *et al.* 2002).

1.3 Ojo de pollo

Los ojos son una extensión del cerebro que esencialmente permiten convertir estímulos lumínicos en impulsos electroquímicos (Hubel, 1995). Los elementos neurales de los ojos de los vertebrados se comienzan a desarrollar durante la gastrulación a partir del ectodermo cefálico prospectivo adyacente, que bajo la inducción del endodermo en involución y el mesodermo, forma la vesícula óptica y primordio ocular. La vesícula óptica se divide en la región próximo-ventral que dará origen al nervio óptico y la región dorso-distal que dará origen a la neuroretina y al epitelio pigmentado; el cristalino y córnea se forman a partir del ectodermo superficial (Chow y Lang, 2001; Gilbert, 2003). Algunas aves son animales precociales y otras son altriciales, los pollos son precociales y al

eclosionar tienen completamente desarrollada la capacidad de visión, ya no presentan crecimiento por hiperplasia y tienen un escaso crecimiento hipertrófico, por lo que el ojo de un pollo al día uno post-natal está totalmente desarrollado (Jones, *et al.* 2007).

1.3.1 Estructura y elementos oculares

Los ojos del pollo son anatómicamente muy similares al resto de los mamíferos, formados de manera general por el iris, cristalino, córnea, humor acuoso, pupila, humor vítreo, la retina, coroides, nervio óptico y pecten, este último no presente en mamíferos (Willis y Wilkie, 1999). Las diferencias principales encontradas entre aves y mamíferos son: un adelgazamiento de la córnea, abundantes músculos estriados que permiten un control parcialmente voluntario de la pupila y una retina avascular que es alimentada principalmente por la coroides subyacente y el pecten oculi, el cual es una extensión de la coroides formada por vasos sanguíneos (Willis y Wilkie, 1999; Jones, *et al.* 2007). Los ojos de los pollos ocupan más del 50% de su cavidad craneal total, mucho mayor a lo comúnmente encontrado en mamíferos y en el caso específico de los pollos, el volumen de humor vítreo es equivalente a más de dos tercios del volumen total del ojo (Willis y Wilkie, 1999).

La retina es una extensión del sistema nervioso central formado básicamente por tejido nervioso sensible a la luz (Martín, 1985). Posee seis tipos de neuronas que a su vez pueden dividirse en subtipos: Fotorreceptores (conos y bastones), células bipolares, células amacrinas, células horizontales y células ganglionares, que junto con la glia de Müller y astrocitos, se disponen en tres capas principales que pueden subdividirse: la capa ganglionar que contiene a las células ganglionares, la capa nuclear interna que

contiene a las células bipolares, amacrinas y horizontales y se subdivide en la capa nuclear interna y la plexiforme interna, y la capa externa que contiene a los fotorreceptores y sus segmentos y se subdivide en la capa nuclear externa y plexiforme externa; la parte más externa de la retina es el epitelio pigmentado que se encuentra posterior a la capa de los fotorreceptores (Cheng, *et al.* 2006; Masland, 2001). Cuando se genera un daño por excitotoxicidad, específicamente por inyecciones intraoculares agudas de KA, que es un análogo al glutamato y activa sus receptores provocando una sobreexcitación y muerte principalmente por necrosis; las capas mayormente afectadas son la nuclear interna y plexiforme interna, generando una pérdida de células amacrinas (McGeer *et al.* 1978). Sin embargo, se ha observado que a dosis bajas (6 nmoles o menos), solo se afectan las capas nuclear interna y plexiforme interna, pero a dosis de más de 60 nmoles, el daño se extiende hacia la capa plexiforme externa y se genera muerte de las células horizontales y bipolares además de las amacrinas (Morgan e Ingham, 1981).

1.3.2 Ojo de pollo como modelo de investigación

Los ojos del pollo han sido utilizados por décadas como modelo de investigación para entender las dinámicas y mecanismos del desarrollo de la retina, retinopatías diversas, fenómenos de neurogénesis y las respuestas celulares ante posibles tratamientos contra patologías cuya aplicación es facilitada además por la naturaleza avascular de la retina (Wiedemann y Hanke, 1997; Vergara y Canto-Soler, 2012). Con solo seis tipos neuronales, alto volumen de humor vítreo y un gran tamaño en proporción al cerebro, los ojos del pollo son la extensión del sistema nervioso de mayor simplicidad y accesibilidad (Agathocleous y Harris, 2009). Además, al pertenecer al grupo de endotermos con

mayores capacidades regenerativas, representan al modelo no mamífero más útil para entender la dinámica de neuroregeneración y su ausencia en mamíferos (Hamon, *et al.* 2016). Es por ello que crecientes estudios se han enfocado a dilucidar los mecanismos moleculares del fenómeno de transdiferenciación, proliferación y diferenciación de las células gliales de Müller, que parecen ser la clave para la regeneración aún imposible de las neuronas de la retina en los mamíferos (Gallina, *et al.* 2014; Agathocleous y Harris, 2009).

1.4 Factores asociados a la neuroregeneración y neuroprotección

Numerosos estudios han mostrado la dinámica de expresión de genes y proteínas a través del proceso de transdiferenciación de las células gliales de Müller, además de marcadores típicos de protección y neurogénesis en la retina, que se encuentran resumidos en la Tabla 1 y su medición nos indica las acciones que el tratamiento con GH tiene sobre la retina posterior a un daño.

Tabla 1: Factores asociados a la neuroregeneración en la retina de las aves

Nombre	Descripción	Marcador	Referencias
Discs large homolog 1 (DLG1)	Proteína post-sináptica	Sinaptogénico	[Le Grevès, <i>et al.</i> , 2006; Kumar, <i>et al.</i> , 2014]
Neurexin 1 (NRXN1)	Proteína sináptica de superficie celular	Sinaptogénico	[Uchigashima, <i>et al.</i> , 2019; Paraoanu, <i>et al.</i> , 2006]
Synaptosomal nerve-associated protein 25 (SNAP25)	Proteína sináptica de fusión de vesículas	Sinaptogénico	[Fleming, <i>et al.</i> , 2018; Lawrence, <i>et al.</i> , 2014; Ulloa, <i>et al.</i> 2018]
Growth associated protein 43 (GAP43)	Proteína expresada en la regulación del crecimiento axonal	Axogénico	[Wang, <i>et al.</i> , 2018; Leon, <i>et al.</i> , 2000]
NR1	Subunidad del receptor a NMDA (NMDA-R)	Sinaptogénico	[Ramis, <i>et al.</i> , 2013; Nylander, <i>et al.</i> , 2016; Elias, <i>et al.</i> , 2018; McAllister, 2000]
GRIK4	Subunidad del receptor a KA (KA-R)	Sinaptogénico	[Elias, <i>et al.</i> , 2018; McAllister, 2000; Lee, <i>et al.</i> , 2012]
Tumor necrosis factor receptor 2 (TNF-R2)	Receptor pro-supervivencia	Neurotrófico	[Wajant y Siegmund, 2019; Fontaine, <i>et al.</i> , 2002; Nakazawa, <i>et al.</i> , 2006]
B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	Proteína anti-apoptótica	Anti-apoptótico	[Martínez-Moreno, <i>et al.</i> , 2019; Wang, <i>et al.</i> , 2018; Leon, <i>et al.</i> , 2000]
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	Factor neurotrófico	Neurotrófico	[Martínez-Moreno, <i>et al.</i> , 2018b; Mysona, <i>et al.</i> , 2017]
Bone morphogenic protein 4 (BMP4)	Factor de crecimiento y supervivencia	Neurotrófico	[Fischer, <i>et al.</i> , 2004; Todd, <i>et al.</i> , 2017; Seydewitz, <i>et al.</i> , 2004]
Fibroblast growth factor (FGF2)	Factor de crecimiento	Proliferación y transdiferenciación	[Liu, <i>et al.</i> , 2019; Fischer, <i>et al.</i> , 2002]
Sex determining Region Y-box 2 (Sox2)	Factor de transcripción asociado a pluripotencialidad	Transdiferenciación	[Gallina, <i>et al.</i> , 2014; Zelinka, <i>et al.</i> , 2016]
Achaete-scute homolog 1 (Ascl1)	Factor de transcripción asociado a desdiferenciación	Transdiferenciación	[Elsaeidi, <i>et al.</i> , 2018; Wilken y Reh, 2016]
Notch Receptor 1 (Notch1)	Receptor membranal de la vía de Notch	Transdiferenciación	[Elsaeidi, <i>et al.</i> , 2018; Ghai, <i>et al.</i> , 2010; Hayes, <i>et al.</i> , 2007; Mills y Goldman, 2017; Li, <i>et al.</i> , 2018; Fleming, <i>et al.</i> , 2019]
Hes5	Factor de transcripción responsivo a vía de Notch	Transdiferenciación	[Ghai, <i>et al.</i> , 2010; Hayes, <i>et al.</i> , 2007; Mills y Goldman, 2017; Li, <i>et al.</i> , 2018; Fleming, <i>et al.</i> , 2019]
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	Proteína de proliferación	Proliferación	[Fischer y Reh, 2000; Boehm, <i>et al.</i> , 2016]

II. HIPÓTESIS

La administración crónica intravitreal de hormona de crecimiento exógena promueve la neuroregeneración y neuroprotección posterior a un daño agudo por excitotoxicidad en la retina de pollo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

II. OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de la administración crónica de GH después de un daño excitotóxico en la retina de pollo

Particulares

- 1) Determinar los efectos morfológicos del daño agudo con KA (20 µg) a 8, 15 y 21 días posteriores en la retina de pollo
- 2) Evaluar el efecto de la GH sobre marcadores neurotróficos, de proliferación, antiapoptóticos, sinaptogénicos y de transdiferenciación después del daño por excitotoxicidad en la retina de pollo
- 3) Analizar el efecto de la GH sobre la proliferación después del daño excitotóxico en la retina de pollo
- 4) Determinar cambios morfológicos inducidos por el daño excitotóxico y el tratamiento con GH en la retina de pollo

IV. METODOLOGÍA

4.1 Animales experimentales

Huevos fertilizados de 15 días de desarrollo de *Gallus gallus* (Raza Leghorn) fueron donados por Pilgrim's Pride (Querétaro, México) y se mantuvieron en incubación a 39 °C con humedad constante (IAMEX, México), con rotación de un cuarto de revolución cada 50 minutos hasta su eclosión. Posterior al tratamiento los pollos fueron sacrificados por decapitación de acuerdo a lo establecido por el comité bioético del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todos los animales se anestesiaron con una inyección subcutánea de xylazina (1 mg/kg) y ketamina (2.2 mg/kg) previas a cada aplicación de tratamientos.

4.2 Tratamientos y diseño experimental

Se llevaron a cabo tres protocolos distintos; para todos, la aplicación de los tratamientos con inyecciones intravitreales se realizaron en el ojo izquierdo, y los ojos derechos fueron utilizados como grupo control sin tratamiento. Todos los grupos en todos los experimentos se mantuvieron en condiciones controladas con un ciclo de luz/obscuridad 12/12 y agua y alimento *ad libitum*.

El primer protocolo fue para la evaluación morfométrica de la retina a los 8, 15 y 21 días posterior a una única inyección intravitreal de KA (20 µg) en el día posnatal uno (P1) (Figura 1), en 12 animales en total; cuatro se sacrificaron al día ocho, cuatro al día quince y cuatro al día veintiuno

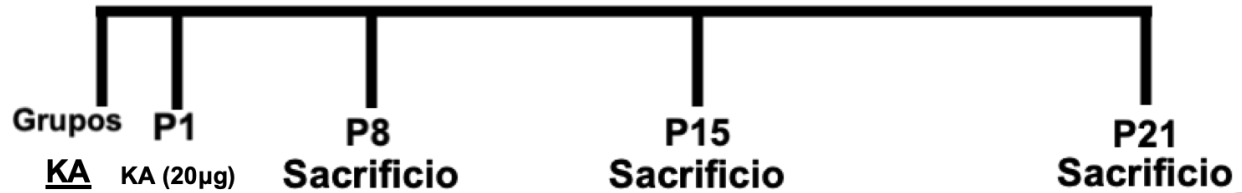


Figura 1: Representación esquemática como línea del tiempo del protocolo para evaluar la morfología de la retina después de un daño agudo con kainato (KA) a 8, 15 y 21 días. Unidades en microgramos (μg); P: Posnatal.

El segundo protocolo se realizó para evaluar el tratamiento crónico de GH (300ng) posterior a una única inyección intravitreal de KA (20 μg) en el P1 (Figura 2). Este protocolo se llevó a cabo dos veces, la primera para realizar morfometría y cuantificación de ARNm, y la segunda vez para realizar extracción de proteínas y Western Blot. Al final del experimento los grupos resultaron de tres individuos para el grupo de GH, cuatro para el grupo de KA+GH y cinco para el grupo de KA en la primera repetición, y en la segunda repetición de cuatro individuos por grupo.

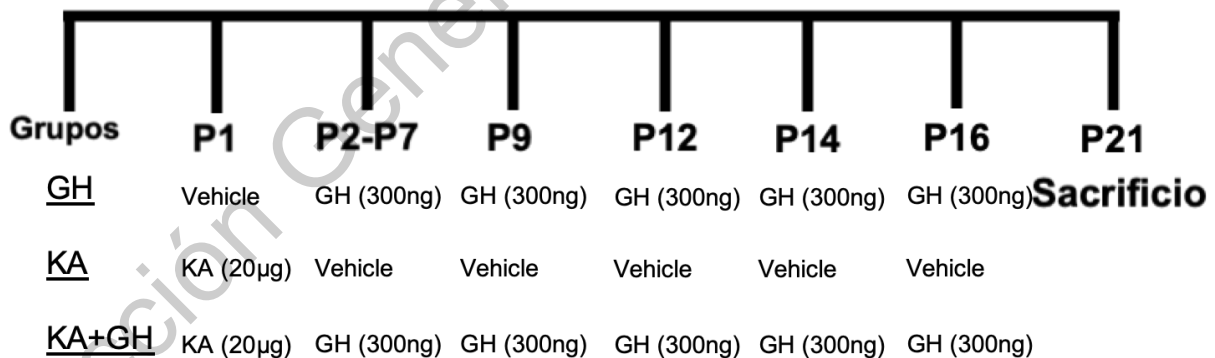


Figura 2: Representación esquemática como línea del tiempo del protocolo para evaluar el tratamiento crónico con hormona de crecimiento (GH) en la retina después de un daño agudo con kainato (KA) a 21 días. Unidades en microgramos (μg) y nanogramos (ng); P: Post-natal.

Por último, se llevó a cabo un tercer protocolo para identificar la proliferación celular ante el daño con KA (20 µg) y con daño y tratamiento crónico con GH (300 ng), a través del uso de inyecciones de BrdU de manera intravitreal (I.V.) e intraperitoneal (I.P.) (Figura 3). Todos los grupos fueron de cuatro individuos cada uno.

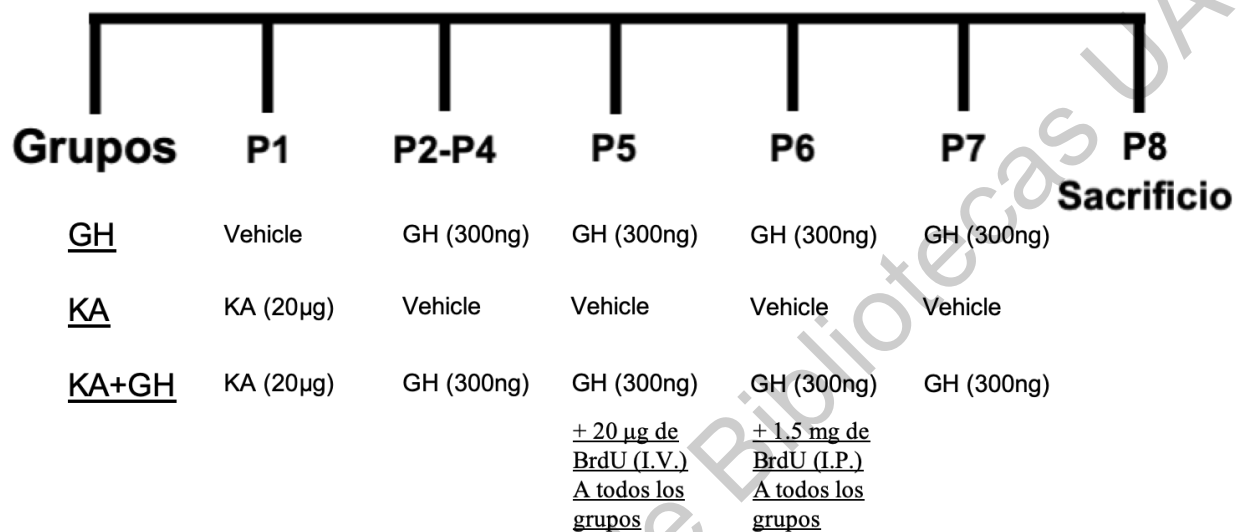


Figura 3: Representación esquemática como línea del tiempo del protocolo para evaluar el tratamiento crónico con hormona de crecimiento (GH) sobre la proliferación en la retina después de un daño agudo con kainato (KA) a 8 días. Unidades en microgramos (µg), miligramos (mg) y nanogramos (ng); P: Post-natal; I.V. Intra vitreal; I.P. Intra peritoneal; BrdU: bromodesoxiuridina.

4.3 Colecta de ojos y procesamiento de las muestras

En el correspondiente día de sacrificio se procedió a extraer los ojos completos de cada animal. Para las muestras que serían utilizadas para histoquímica, los ojos se cortaron longitudinalmente. Posteriormente se extrajo el vítreo y se fijaron en paraformaldehído al 4%, pH 7.4 durante 24 horas, después se lavaron dos veces con PBS (0.05 M buffer fosfato salino, 195 mM NaCl, y 3 mM NaN₃, pH 7.4) y se mantuvieron en sacarosa al 30% en PBS por al menos 24 horas y hasta el momento de realizar los cortes en criostato.

Para las muestras que serían utilizadas para inmunohistoquímica, los ojos se cortaron longitudinalmente. Posteriormente se extrajo el vítreo y se fijaron en paraformaldehído al 4% con 3% de sacarosa, pH 7.4 durante 25 minutos, después se enjuagaron con PBS y se mantuvieron en sacarosa al 30% por al menos 24 horas y hasta el momento de realizar los cortes. Para los ojos que serían utilizados para extracción de ARN o cuantificación de proteínas, inmediatamente después de ser disectados se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta ser utilizados para realizar las extracciones.

4.4 Extracción de ARN total

A cada mitad de ojo le fue extraído el ARN total utilizando el kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research) de acuerdo a las indicaciones del fabricante: Se agregó 1 ml de TRIZOL a cada mitad de ojo en un tubo de ensaye, y se homogenizó con ayuda de un homogenizador Polytron® durante 60 segundos. El homogenizado se centrifugó por dos minutos a 10,000 rpm en una centrifuga (Sorvall RMC), se recuperó el sobrenadante y se descartó el pellet. Del sobrenadante, se transfirieron 500 µl a un tubo eppendorf de 1.5ml, se agregaron otros 500 µl de TRIZOL y 200 µl de cloroformo. Posteriormente se centrifugó durante diez minutos a 12,000 rpm a 5 °C. Después se colectaron 400 µl de la fase acuosa y se transfirió a una columna con tubo colector donde se le adicionaron 200 µl de etanol (95-100%). La mezcla se centrifugó por un minuto a 5 °C a 10,000 rpm. Posteriormente se agregaron 400 µl de amortiguador de lavado para ARN en la columna y se centrifugó nuevamente por un minuto a 5°C a 10,000 rpm. Se aplicó luego un tratamiento con ADNasa (Zymo Research DNase I) durante 15 minutos directo en las columnas. Seguidamente se añadieron 400 µl de solución pre-lavado Directo-zol ARN a la columna y se centrifugó a 5 °C a 10,000 rpm. El paso anterior se repitió dos veces. A

continuación se agregaron 700 µl de amortiguador de lavado de ARN a la columna y se centrifugó a 5 °C por dos minutos a 12,000rpm. Posteriormente se desechó el tubo colector y se transfirió la columna a un tubo estéril eppendorf de 1.5 ml. Se le agregaron 50 µl de agua libre de ARNasas y ADNasas directamente a la matriz y se centrifugó por dos minutos a 5 °C a 10,000 rpm, obteniendo así el ARN total. De cada muestra se cuantificó el ARN utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific).

4.5 Retrotranscripción

A partir del ARN total extraído, se generó el ADN complementario de la siguiente manera: de la cuantificación del ARN, se obtuvo el volumen necesario para tener 1.5 mg de cada muestra. Se agregó a cada muestra 1 µl de oligos DT (10 mM), 1 µl de dNTP's, 1 µl de hexámeros y 8 µl de amortiguador de reacción 5X (TRIS-HCL [50 mM, pH 8.3], KCl [75 mM], MgCl₂ [3 mM] y DTT [10 mM], esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos, posteriormente se realizó un choque térmico colocándolos en hielo durante 5 minutos y se agregó a cada muestra 0.25 µl de Inhibidor de ARNasas, 4 µl de DTT (0.1M) y 1µl de transcriptasa reversa (200 U/µl Promega), y se incubaron a 42 °C por 60 minutos, seguidamente a 70 °C por diez minutos y finalmente a 4 °C. Una vez terminado el ciclo, los ADNc se mantuvieron almacenados a -20 °C.

4.6 PCR cuantitativa (qPCR)

Del ADNc obtenido, se realizaron PCRs en tiempo real agregando por muestra 5µl de mezcla Maxima SYBR Green (Thermo Scientific) (Maxima Taq ADN polimerasa, dNTP's y amortiguador de PCR) 0.5 µl de los oligonucleótidos sentido y anti-sentido para el gen

de interés (ver Tabla 1), 3 μ l del ADNc diluido 1:3 para todos los genes excepto 18S, que fue diluido 1:20, y 1 μ l de agua libre de ARNasas y ADNasas, dejando un volumen de reacción final de 10 μ l. Las condiciones de amplificación en el termociclador (Step one, Real Time PCR System, Applied Biosystems Foster, CA, USA) fueron: diez minutos a 95 $^{\circ}$ C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 $^{\circ}$ C, 30 segundos a 60 $^{\circ}$ C y 30 segundos a 72 $^{\circ}$ C, seguidos de la amplificación final a 95 $^{\circ}$ C por quince segundos y 60 $^{\circ}$ C por un minuto. La abundancia relativa de RNAm se calculó usando el valor Ct (Comparative threshold cycle) y empleando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), expresando la cuantificación relativa a la media geométrica del RNAm del gen ribosomal 18S (Bas, et al. 2004; Kozera y Rapacz, 2013).

Tabla 2: Lista de oligonucleótidos iniciadores (*primers*).

Blanco	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Número de acceso
cNotch1	Fwd	GGCTGGTTATCATGGAGTTA	155bp	NM_001030295.1
	Rev	CATCCACATTGATCTCACAG		
cHes5	Fwd	GGAGAAGGAGTTCCAGAGAC	171bp	NM_001012695.1
	Rev	ATTTGCAGAGCTTCTTTGAG		
cBDNF	Fwd	AGCAGTCAAGTGCCTTTGGA	167bp	NM_001031616
	Rev	TCCGCTGCTGTTACCCACTCG		
cASCL	Fwd	AGGGAACCACGTTTATGCAG	188bp	NM_204412.1
	Rev	TTATACAGGGCCTGGTGAGC		
cSox2	Fwd	AGGCTATGGGATGATGCAAG	163bp	NM_205188.2
	Rev	GTAGGTAGGCGATCCGTTCA		
cFGF2	Fwd	TGCAGCTTCAAGCAGAAGAA	173bp	NM_205433.1
	Rev	CTTCCGTGACCGGTAAGTGT		
cDLG1	Fwd	ACCAGCCAGAAGAGATCCCT	162bp	XM_025153616.1
	Rev	TGGAGTTACCTGCCGTGCTT		
cBMP4	Fwd	CGCTGGGAGACCTTTGATGT	153bp	NM_205237.3
	Rev	CCCCTGAGGTAAAGATCGGC		
cSNAP25	Fwd	GCCTGCCCGTGTGGTAGAT	185bp	NM_205458.1
	Rev	TCTGGCGATTCTGTGTGTCG		
cNRXN1	Fwd	CCACTCTGATCATTGACCGGG	392bp	NM_001198975.1
	Rev	CGCCAGACCTTCCACATAGT		
c18S	Fwd	CTCTTTCTCGATTCCGTGGGT	100bp	M59389
	Rev	TTAGCATGCCAGAGTCTCGT		

cNR1	Fwd	ACGGTCCCACCATACTCTCA	156bp	NM_206979.1
	Rev	AGCCTTGGACTCTCTCTCCT		
cGH	Fwd	CGCACCTATATTCCGGAGGAC	128bp	NM_204359
	Rev	GGCAGCTCCATGTCTGACT		
cGRIK4	Fwd	AAATGTCCCAAGGAGGAGGACCAC	215bp	XM_015298177.2
	Rev	AAACTGTCCTTGCAGAGGATGATG TTGCGC		

Fwd: Forward (sentido); Rev: Reverse (anti sentido).

4.7 Extracción de proteínas

Los ojos previamente disectados y almacenados a -80 °C, se homogeneizaron en un homogeneizador Polytron® junto con 300µl de Buffer de extracción (HCL-Tris 0.05 M, pH 9.0 con Inhibidor de proteasas ProOmega). Se utilizó el método de Bradford para cuantificar la concentración total de proteínas en los homogeneizados de retina realizando una extrapolación de valores a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas por duplicado, utilizando BSA (Albúmina de suero bovino) en intervalos de concentraciones de 0 a 20 µg/ml. El volumen usado para cuantificar las muestras fue de 800 µl y se le adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se dejó incubar la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se cuantificó utilizando un espectrofotómetro de luz UV/Vis (Beckman Coulter DU 730) (Bradford, 1976).

4.8 Western Blot

Se cargaron 60 µg de proteína por muestra, determinados por la cuantificación de proteínas con el método de Bradford, en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 12.5% (SDS-PAGE) para realizar la electroforesis (150V hasta que el frente llegara al fondo del gel). Se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) aplicando corriente en húmedo a 200 mA por dos horas. Las membranas se

bloquearon con leche sin grasa al 5% (Bio-Rad) en buffer Tris-salino (TBS) por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con TBS dos veces por cinco minutos y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3) diluido en TTBS (1X TBS con 0.05% de Tween 20 [Bio-Rad]) con leche sin grasa al 1% durante toda la noche en agitación constante y temperatura ambiente. En seguida se lavaron las membranas con TTBS tres veces por cinco minutos y se incubaron por dos horas con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 3) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) diluido en TTBS con leche sin grasa al 1%. Finalmente se lavaron una vez con TTBS y una vez con TBS por dos minutos. Las bandas fueron visualizadas utilizando el reactivo de detección de blottings ECL (Amersham-Pharmacia) en películas de autorradiografía (Fujifilm). En todos los geles se utilizaron marcadores de peso molecular (Bio-Rad) como referencia para determinar el peso molecular de las bandas detectadas. Las imágenes de cada luminograma fueron capturadas con el equipo Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad) y se analizaron por densitometría en el programa ImageLab (Bio-Rad). La inmunoreactividad de cada banda fue corregida a la inmunoreactividad de β -actina utilizada como control de carga en re-blots realizados para cada membrana.

Tabla 3: Lista de anticuerpos y diluciones

Blanco	Animal/tipo	Dilución	Marca	No. Catálogo
Bcl-2	Ratón/policlonal	1:1000	Invitrogen	138800
β -Actina	Ratón/monoclonal	1:5000	Santa cruz	SC-47778
TNF-R2	Cabra/policlonal	1:1000	Santa Cruz	SC-1072
GAP 43	Ratón/monoclonal	1:2000	Sigma-Aldrich	GAP-7B10
BrdU	Rata/monoclonal	1:100	Abcam	AB-6326
IgG de ratón	Cabra/HRP conjugado	1:6000	Abcam	AB-20043
IgG de rata	Cabra/ Alexa fluor 488	1:1000	Abcam	AB-150157
IgG de cabra	Conejo/HRP conjugado	1:6000	Life technologies	811620

IgG: Inmunoglobulina G

4.9 Cortes histológicos

Las mitades de ojos previamente fijadas y procesadas, se congelaron y montaron con OCT (TissueTek) en bloques de montaje de aluminio para criostato, orientados de manera que se obtuvieran cortes sagitales. Se dejaron estabilizar a -20 °C por veinte minutos y se procedió a obtener las secciones. De cada ojo, se obtuvieron un total de nueve cortes de 15 µm utilizando un crióstato (Leica CM3050 S) dispuestas de tres cortes por portaobjetos en portaobjetos pretratados (Fisherbrand, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los portaobjetos se dejaron reposar 24 horas a 37 °C y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta ser utilizados para histoquímica o Inmunohistoquímica.

4.10 Tinción con Hematoxilina

Los cortes fueron teñidos con hematoxilina durante dos minutos, y posteriormente enjuagados con agua destilada por cinco minutos. Se eliminó el exceso de agua y se montaron con Entellan® (MERCK).

4.11 Medición de la retina

De cada corte se midió el grosor de las capas de la retina: capa de células ganglionares (GCL), plexiforme interna (IPL), nuclear interna (INL), plexiforme externa (OPL), nuclear externa (ONL), fotorreceptores (PR) y el grosor total (de fotorreceptores a capa de células ganglionares), en un microscopio óptico (Olympus BX51) con objetivo 20X. Todas las mediciones de la misma retina fueron promediadas (tres mediciones por corte en nueve cortes por muestra).

4.12 Inmunohistoquímica

Los cortes se dejaron estabilizar a temperatura ambiente durante diez minutos, posteriormente se le colocó al tejido una solución de HCl 2M durante una hora para realizar hidrólisis del ADN. En seguida se lavaron con PBS 1X (10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl y 2.7 mM KCl, pH 7.4) dos veces y una vez con TPBS 1X (PBS 1X con 0.05% TritonX). A continuación se bloquearon con leche descremada (Bio-Rad) al 5% en PBS durante 45 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS 1X de cinco minutos y un lavado con TPBS 1X de 5 minutos. Después de incubaron durante 24 horas a 4 °C con la solución del primer anticuerpo en leche descremada al 1% en TPBS (ver Tabla 2), dejando un corte por portaobjetos como control negativo, sin el anticuerpo primario y únicamente con la solución de leche descremada al 1% en TPBS (se utilizó un plumón hidrofóbico para delimitar cada corte y evitar que las soluciones se mezclaran entre el control negativo y los cortes con el anticuerpo primario). Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron tres veces con TPBS 1X. Posteriormente se incubaron por dos horas a temperatura ambiente con la solución del anticuerpo secundario en leche descremada al 1% con TPBS 1X (Ver Tabla 2). Se llevaron dos veces con TPBS e incubaron durante veinte minutos con DAPI y luego se enjuagaron dos veces con PBS 1X. Finalmente se montaron con glicerol al 100%.

4.13 Análisis estadístico

Para cada diseño experimental se utilizó el ojo izquierdo para aplicar el tratamiento y el ojo derecho como control contralateral para calcular los cambios relativos (delta). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de comparaciones

múltiples (*post hoc* Šidák) para cada grupo de resultados. Se tomó un valor de alfa de 0.05. Las barras de las gráficas representan la media aritmética \pm el error estándar.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

V. RESULTADOS

5.1 Efecto excitotóxico del KA sobre la morfología de la retina a los 8, 15 y 21 días posteriores al daño

Las retinas fueron dañadas en pollos de un día postnatal, con una dosis aguda de KA (20 μ g) y colectadas a los 8, 15 y 21 días posteriores a la inyección intravitreal de acuerdo al protocolo de la Figura 1. El análisis histológico de las retinas teñidas con hematoxilina (Figura 4H, I, J y K) muestran una clara disminución ($p < 0.0001$) del grosor total (de fotorreceptores a capa ganglionar [Figura 4G]) en comparación al control a los tres tiempos medidos, siendo esta diferencia dada por la disminución en el grosor de las capas nuclear interna ($p < 0.0001$ y $p < 0.001$), y plexiforme interna ($p < 0.0001$) (Figura 4E y F) con respecto al control. En ninguna otra capa se observó una disminución del grosor y no hubo diferencias entre los grupos de los diferentes tiempos (Figura 4A, B, C y D).

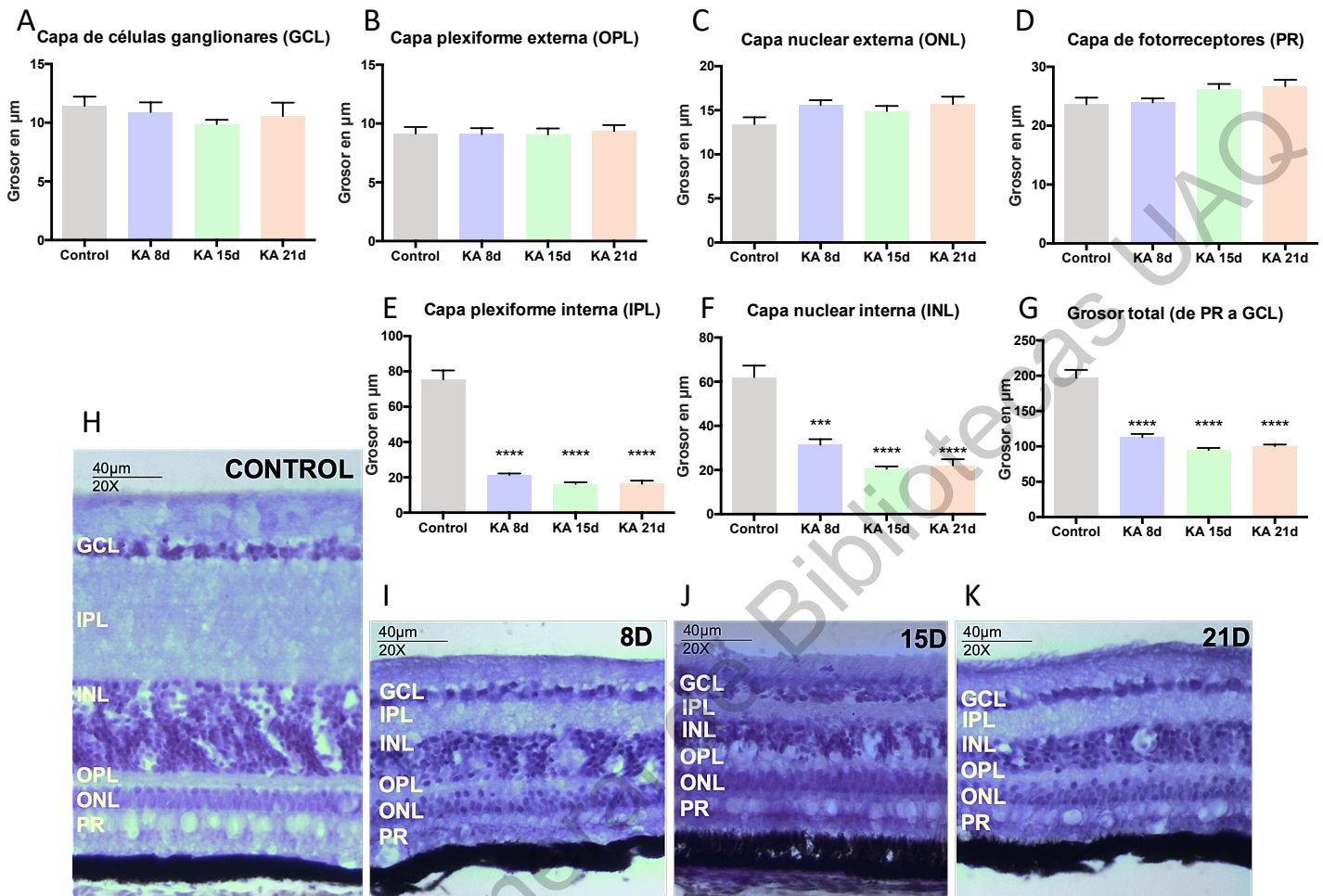


Figura 4. Efectos del daño agudo con kainato (KA) en la morfología de retinas de pollo evaluadas a 8, 15 y 21 días posteriores a la inyección intravitreal de KA (20ug). Se muestra el promedio del grosor de las capas **(A)** Capa de células ganglionares (GCL), **(B)** Capa plexiforme externa (OPL), **(C)** Capa nuclear externa (ONL), **(D)** Capa de fotorreceptores (PR), **(E)** Capa plexiforme interna (IPL), **(F)** Capa nuclear interna (INL) y **(G)** el grosor total de la capa de fotorreceptores a la capa de células ganglionares. Los imágenes representativas muestran **(H)** Una retina control no dañada, **(I)** Retina a 8 días posteriores del daño con KA **(J)** Retina a 15 días posteriores del daño con KA y **(K)** Retina a 21 días posteriores del daño con KA. Las barras representan la media aritmética \pm el error estándar ($n=4$ analizado por triplicado). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación al control (***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$) determinado por ANOVA de una vía y Šidák como prueba *post-hoc* para múltiples comparaciones.

5.2 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre la morfología de la retina dañada por excitotoxicidad con KA

Las retinas de pollos a 1 días post-natal fueron dañadas con una única inyección intravitreal de KA (20 μ g) y tratadas con 10 inyecciones intravitreales de GH (300 ng por dosis) a lo largo de tres semanas, de acuerdo al protocolo establecido en la Figura 2. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y se midieron las capas de la retina. Al analizarlas se observa una clara desorganización de la estructura celular de las capas nuclear interna y nuclear externa en el grupo de KA en comparación al control, parcialmente recuperadas en el grupo de KA+GH (Figura 5A). Se observa una disminución significativa en el grupo de KA comparado al control en el grosor de la capa nuclear interna ($p < 0.0001$) y plexiforme interna ($p < 0.0001$) así como el grosor total de los fotorreceptores a la capa de células ganglionares ($p < 0.0001$) sin embargo, en las mismas capas, el grupo de KA+GH recupera parcialmente el grosor, aumentándolo significativamente en comparación al grupo de KA ($p < 0.05$ y $p < 0.0001$) (Figura 5D, C y H). Por otro lado, las capas de células ganglionares ($p < 0.01$), nuclear interna ($p < 0.001$) y el total de fotorreceptores a capa de células ganglionares ($p < 0.05$) mostraron un aumento significativo en el grosor con el tratamiento solo de GH (Figura 5B, D y H). La capa nuclear externa (Figura 5F) mostró un aumento significativo tanto para el grupo de KA como para KA+GH en comparación al control ($p < 0.05$). La capa de fotorreceptores mostró un aumento significativo en el grupo de KA ($p < 0.05$), disminuido comparado con el grupo

de KA+GH ($p < 0.001$) (Figura 5G). La capa plexiforme externa no mostró diferencias para ninguno de los grupos (Figura 5E).

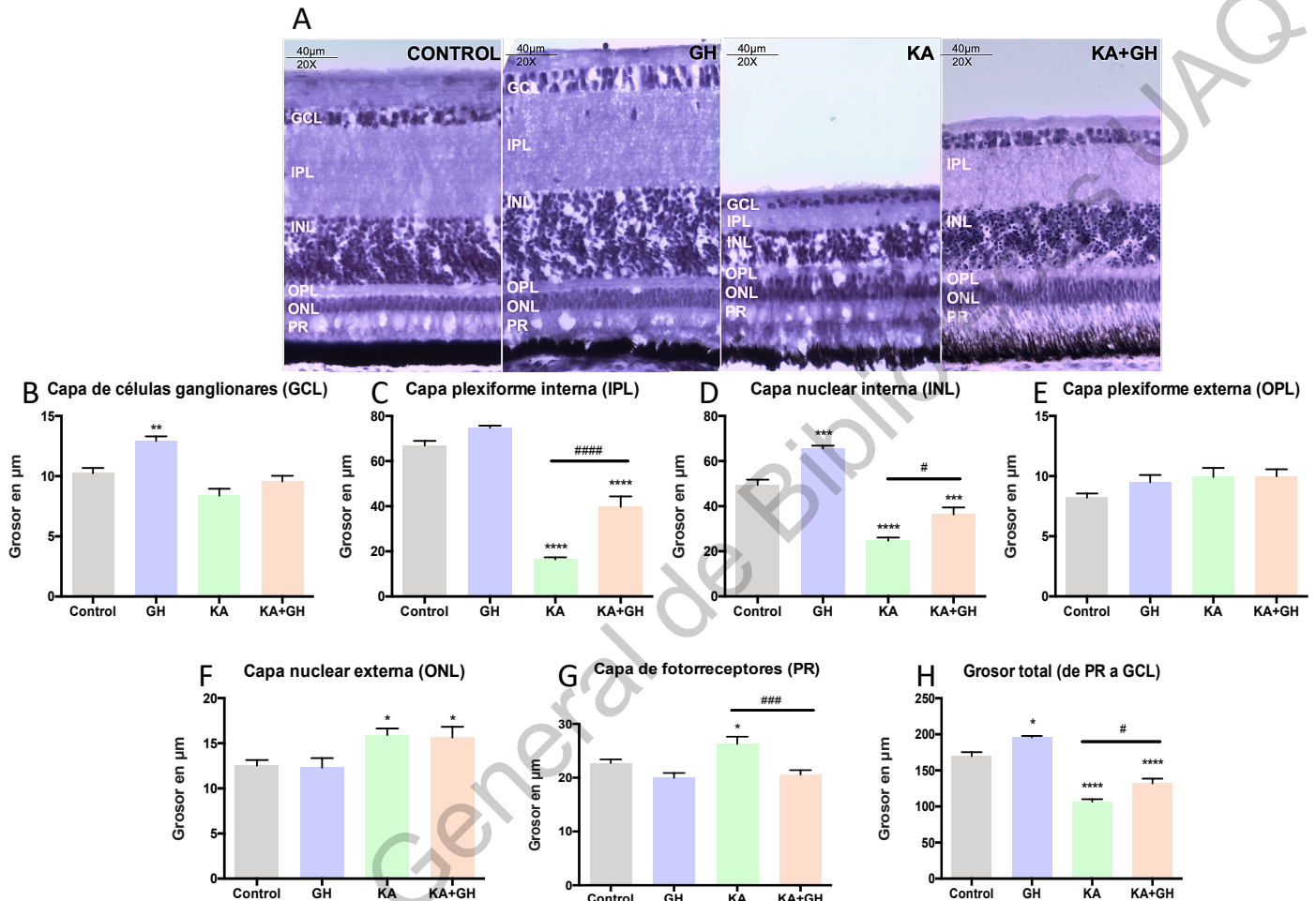


Figura 5. Efecto del tratamiento crónico con hormona de crecimiento (GH) después de daño excitotóxico agudo con kainato (KA) en retinas de pollo. Se muestran **(A)** imágenes representativas del análisis histológico en cortes teñidos con hematoxilina de un grupo control (ojo derecho), el grupo con GH, el grupo dañado con KA y el grupo con el tratamiento neuroprotector (KA+GH) (Tratamientos aplicados en los ojos izquierdos). Las gráficas muestran el promedio del grosor de las capas **(B)** Capa de células ganglionares (GCL), **(E)** Capa plexiforme externa (OPL), **(F)** Capa nuclear externa (ONL), **(G)** Capa de fotorreceptores (PR), **(C)** Capa plexiforme interna (IPL), **(D)** Capa nuclear interna (INL) y **(H)** el grosor total de la capa de

fotorreceptores a la capa de células ganglionares. Las barras representan la media aritmética \pm el error estándar ($n=3, 4$ o 5 ; analizados por triplicado). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación al control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$) y el símbolo numeral representa diferencias significativas entre grupos(#, $p < 0.05$; ###, $p < 0.001$; ####, $p < 0.0001$) determinado por ANOVA de una vía y Šidák como prueba *post-hoc* para múltiples comparaciones.

5.3 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre factores de supervivencia y neurotróficos, y la expresión endógena de GH

Los efectos de la GH sobre factores de crecimiento, neurotróficos y la expresión endógena de GH después de un daño con KA se exploraron mediante qPCR y Western blot de diferentes moléculas (Figura 6). Puesto que las actividades de supervivencia de TNF α están mediadas por el receptor TNF-R2, se midió la inmunoreactividad de este, mostrando una disminución significativa en el grupo de retinas dañadas con KA ($p < 0.01$), el grupo de KA+GH restauró los niveles control del mismo (Figura 6A, B). La inmunoreactividad de Bcl-2 incrementó significativamente ($p < 0.05$) para el grupo de KA+GH en comparación con el grupo de KA (Figura 6A, C).

De la misma manera, la expresión del ARNm de BDNF incrementó significativamente en el grupo de KA+GH en comparación con el grupo control ($p < 0.001$) (Figura 6D). La expresión del ARNm de BMP4 incrementó significativamente únicamente en el grupo con solo el tratamiento con GH en comparación al control ($p < 0.05$), pero no se mostró diferencias cuando aplicada la GH en conjunto con el daño (Figura 6E). La expresión endógena del ARNm de GH se incrementó significativamente en respuesta al daño con KA en comparación al control ($p < 0.0001$), esta diferencia desapareció cuando el daño fue tratado con GH en el grupo KA+GH (Figura 6F).

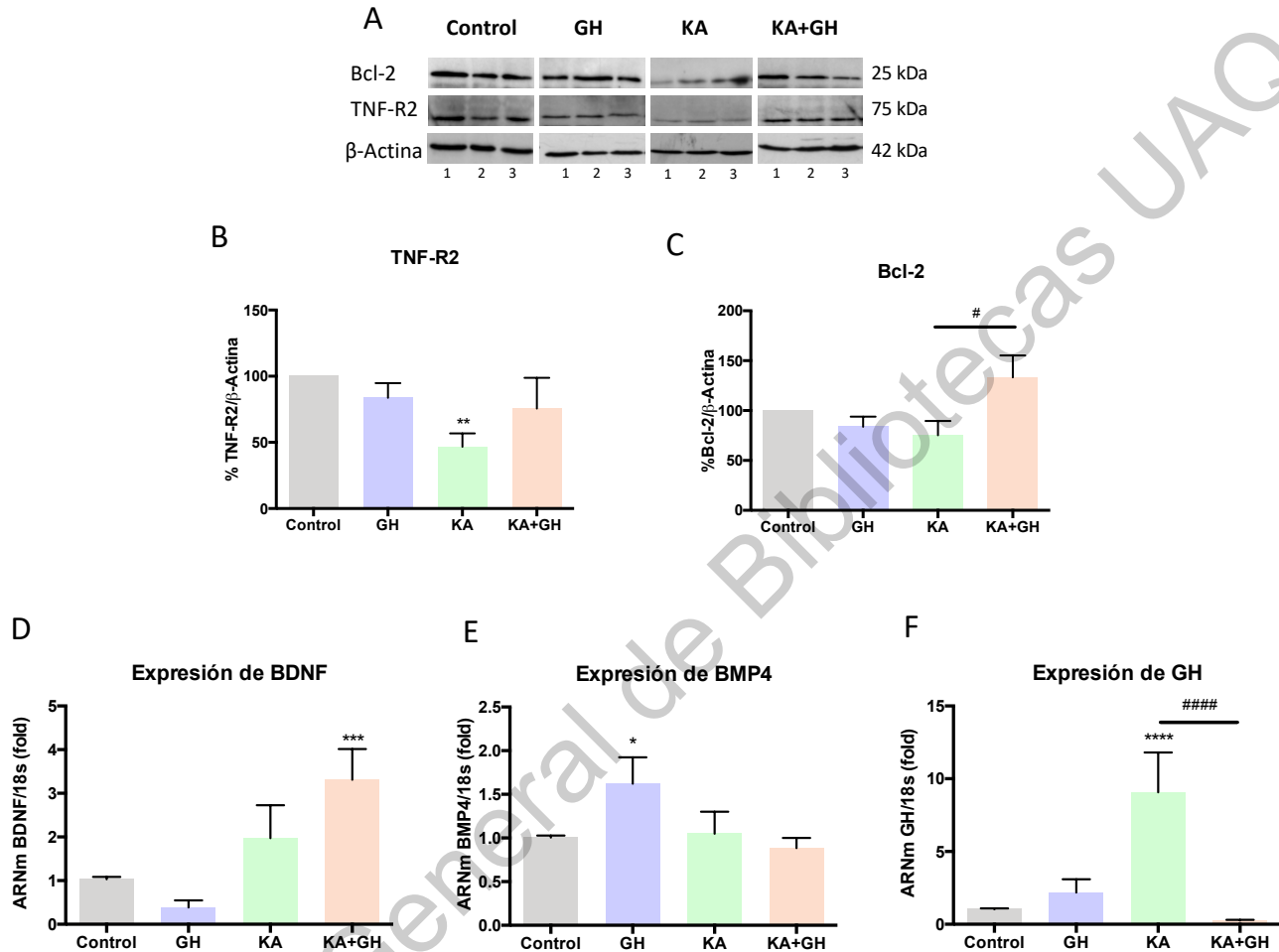


Figura 6. Efecto del tratamiento con hormona de crecimiento (GH) después de daño excitotóxico con kainato (KA) sobre la inmunoreactividad de Bcl-2 y TNF R2, y la expresión del ARNm de BDNF, BMP4 y GH. Se muestran **(A)** luminogramas representativos para Bcl-2 y TNF-R2 para cada grupo experimental y el control de carga (β -Actina) con base al cual se realizó la normalización. Los número 1, 2 y 3 representan diferentes muestras. El análisis por densitometría de las bandas se ilustra en las gráficas **(B)** TNF-R2 y **(C)** Bcl-2. La expresión relativa de los ARNm de **(D)** BDNF, **(E)** BMP4 y **(F)** GH se determinó mediante RT-qPCR y se corrigió utilizando el valor Ct en la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ al valor del gen ribosomal 18s. Las barras representan la media aritmética \pm el error estándar ($n=3, 4$ o 5 ; analizados por duplicado). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación al control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p <$

0.0001) y el símbolo numeral representa diferencias significativas entre grupos (#, $p < 0.05$; #####, $p < 0.0001$) determinado por ANOVA de una vía y Šidák como prueba *post-hoc* para múltiples comparaciones.

5.4 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre la expresión de factores de transdiferenciación y proliferación

Se analizaron marcadores de transdiferenciación para explorar los efectos neuroregenerativos de la GH después del daño excitotóxico con KA (Figura 7). Se observó un incremento significativo en la expresión del ARNm de FGF2 y Sox2 en el grupo de KA+GH en comparación al grupo dañado con KA ($p < 0.05$ y $p < 0.01$) (Figura 7A y B). Los tratamientos con GH o KA no tuvieron diferencias con el control. Para determinar la activación de la vía de señalización de Notch, se determinaron los niveles expresados del ARNm para Notch1 y Hes5. Estos mostraron un incremento significativo en el grupo de Ka+GH en comparación al grupo tratado con KA ($p < 0.0001$ y $p < 0.001$), además, la expresión de Hes5 disminuyó dramáticamente ($p < 0.01$) en el daño con KA en comparación al control, mientras que el tratamiento con KA+GH incrementó significativamente su expresión en comparación al control ($p < 0.001$) (Figura 7D y E). La

expression de los ARNm e Ascl1 y PCNA no mostraron diferencias significativas para ningún grupo (Figura 7C y F).

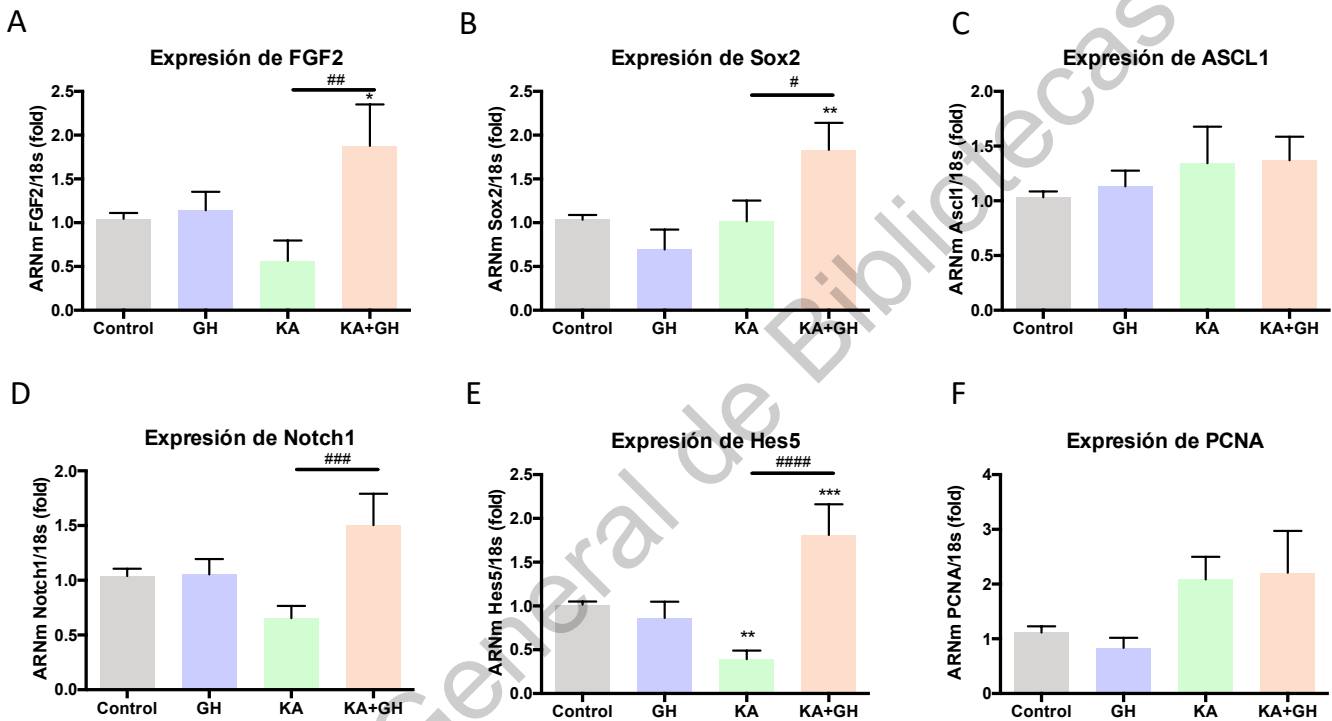


Figura 7. Efecto del tratamiento con hormona de crecimiento (GH) sobre la expresión del ARNm de FGF2, Sox2, ASCL1, Notch1, Hes5 y PCNA en retinas dañadas por excitotoxicidad aguda con kainato (KA). Las gráficas muestran la expresión relativa del ARNm de (A) FGF2, (B) Sox2, (C) ASCL1, (D) Notch1, (E) Hes5 y (F) PCNA, determinada mediante RT-qPCR corregida utilizando el valor Ct en la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ al valor del gen ribosomal 18s. Las barras representan la media aritmética \pm el error estándar ($n=3, 4$ o 5 ; analizados por duplicado). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación al control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) y el símbolo numeral representa diferencias significativas entre grupos(#, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$; ####, $p < 0.0001$) determinado por ANOVA de una vía y Šidák como prueba *post-hoc* para múltiples comparaciones.

5.5 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre marcadores sinaptogénicos y

receptores a glutamato

Se analizó el efecto del tratamiento con GH sobre diversos marcadores sinaptogénicos y los receptores a glutamato NMDA y KA por medio de RT-qPCR o Western Blot (Figura 8). La expresión del ARNm de la proteína post-sináptica DLG1 se incrementó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo correspondiente a KA+GH (Figura 8A). De igual manera el ARNm de la proteína presináptica NRXN1 se vió contundentemente elevado en el grupo de KA+GH en comparación al control ($p < 0.0001$) y al grupo de KA ($p < 0.01$) (Figura 8B). Por otro lado, los niveles del ARNm del componente post-sináptico SNAP25 incrementaron significativamente ($p < 0.01$) solamente en el grupo de KA en comparación al control (Figura 8C). Para los receptores a glutamato NMDA y KA, medidos a través del ARNm de las subunidades NR1 y GRIK4, los grupos de KA y KA+GH mostraron aumentos significativos en comparación al control ($p < 0.05$ y $p < 0.0001$), además la administración de GH después del daño ocasionó aumentos aún mayores en comparación al grupo solamente dañado con KA ($p < 0.001$ y $p < 0.0001$), por otro lado, la GH por sí sola disminuyó el ARNm de GRIK4 ($p < 0.05$) (Figura 8 E y F). Por último, mediante Western Blot, se observó un incremento en la inmunoreactividad de la proteína GAP 43 en el grupo dañado y tratado con GH (KA+GH) con respecto al grupo control ($p < 0.05$) (Figura 8D).

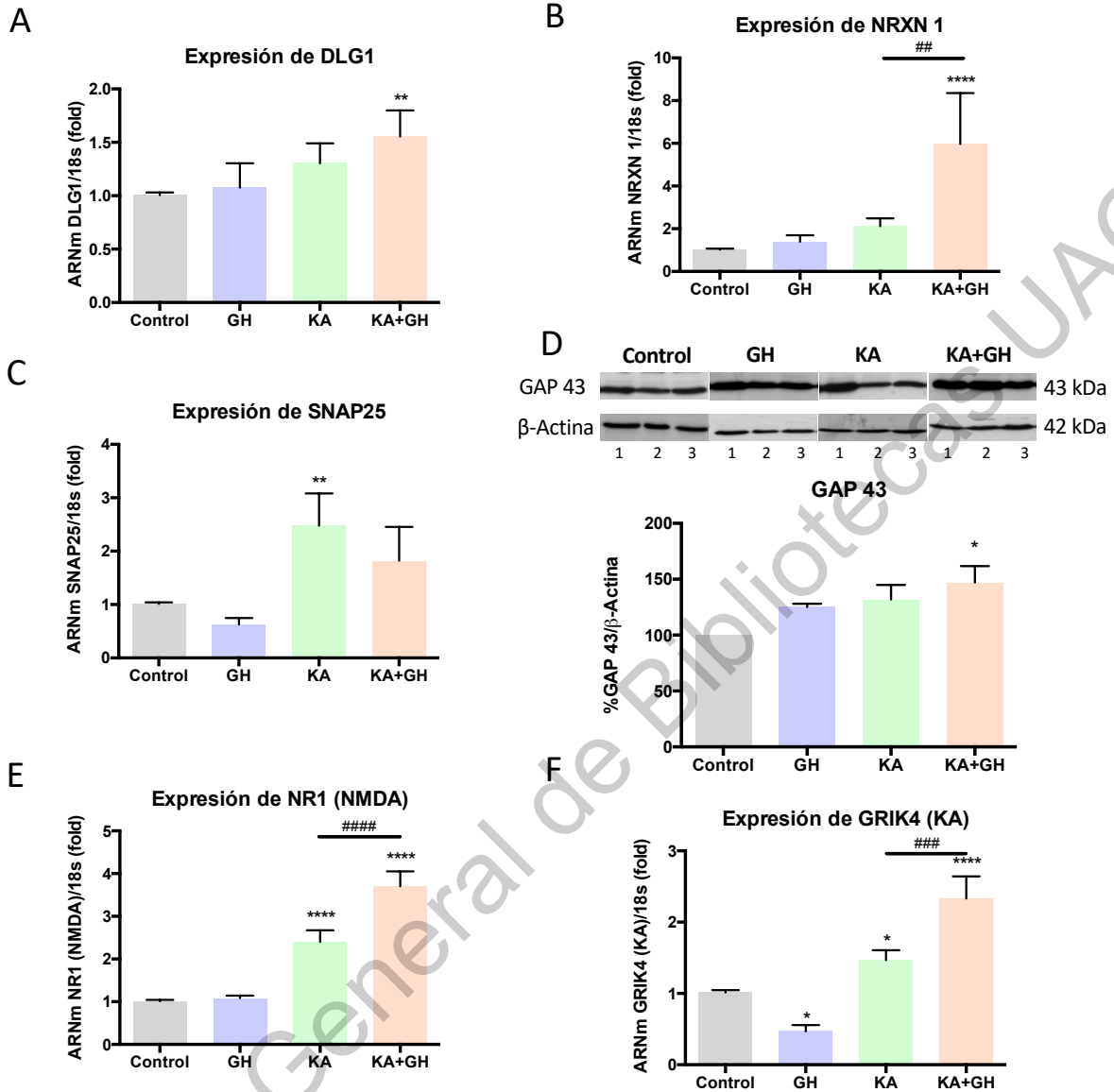


Figura 8. Efectos del tratamiento con hormona de crecimiento (GH) sobre la expresión del ARNm de DLG1, NRXN1, SNAP25, NR1 y GRIK4, y la inmunoreactividad de GAP43, después de daño excitotóxico con kainato (KA) en retinas de pollo. Se muestra la expresión relativa de **(A)** DLG1, **(B)** NRXN1, **(C)** SNAP25, **(E)** NR1 y **(F)** GRIK4, determinada mediante RT-qPCR corregida utilizando el valor Ct en la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ al valor del gen ribosomal 18s. La inmunoreactividad de **(D)** GAP43 fue analizada mediante densitometría y normalizada al control de carga β -actina, los números 1,2 y 3 representan diferentes muestras, se presentan luminogramas representativos para cada grupo. Las barras representan la media aritmética \pm el error estándar ($n=3, 4$ o 5 ; analizados por duplicado). Los asteriscos indican diferencias

significativas en comparación al control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$) y el símbolo numeral representa diferencias significativas entre grupos (##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$ #####, $p < 0.0001$) determinado por ANOVA de una vía y Šidák como prueba *post-hoc* para múltiples comparaciones.

5.6 Efecto del tratamiento crónico con GH sobre la proliferación celular

Se determinó el efecto proliferativo de la GH después de daño excitotóxico con KA por medio de marcaje con BrdU conforme al protocolo establecido en la Figura 3 (Figura 9). Las flechas señalan células positivas a BrdU en cortes de retina (Figura 9 B-P). Una semana posterior al daño, encontramos un aumento notorio del número de células positivas a BrdU en los grupos de KA (Figura 9A, H-J) y KA+GH (Figura 9A, K-M) en comparación al control (Figura 9A, B-D) ($p < 0.0001$), que no mostró ninguna célula positiva. Esta proliferación se vio aumentada cuando el daño se trató con GH (KA+GH) en comparación al grupo solamente dañado con KA ($p < 0.05$) (Figura 9A). Los controles negativos incubados sin el anticuerpo primario no mostraron ninguna célula positiva a BrdU (Figura 9N-P). El tratamiento únicamente con GH muestra un bajo porcentaje de células positivas a BrdU, sin embargo, no es estadísticamente significativo (cuando analizado por ANOVA de una vía y Šidák como prueba *post-hoc* para múltiples comparaciones) (Figura 9A, E-G).

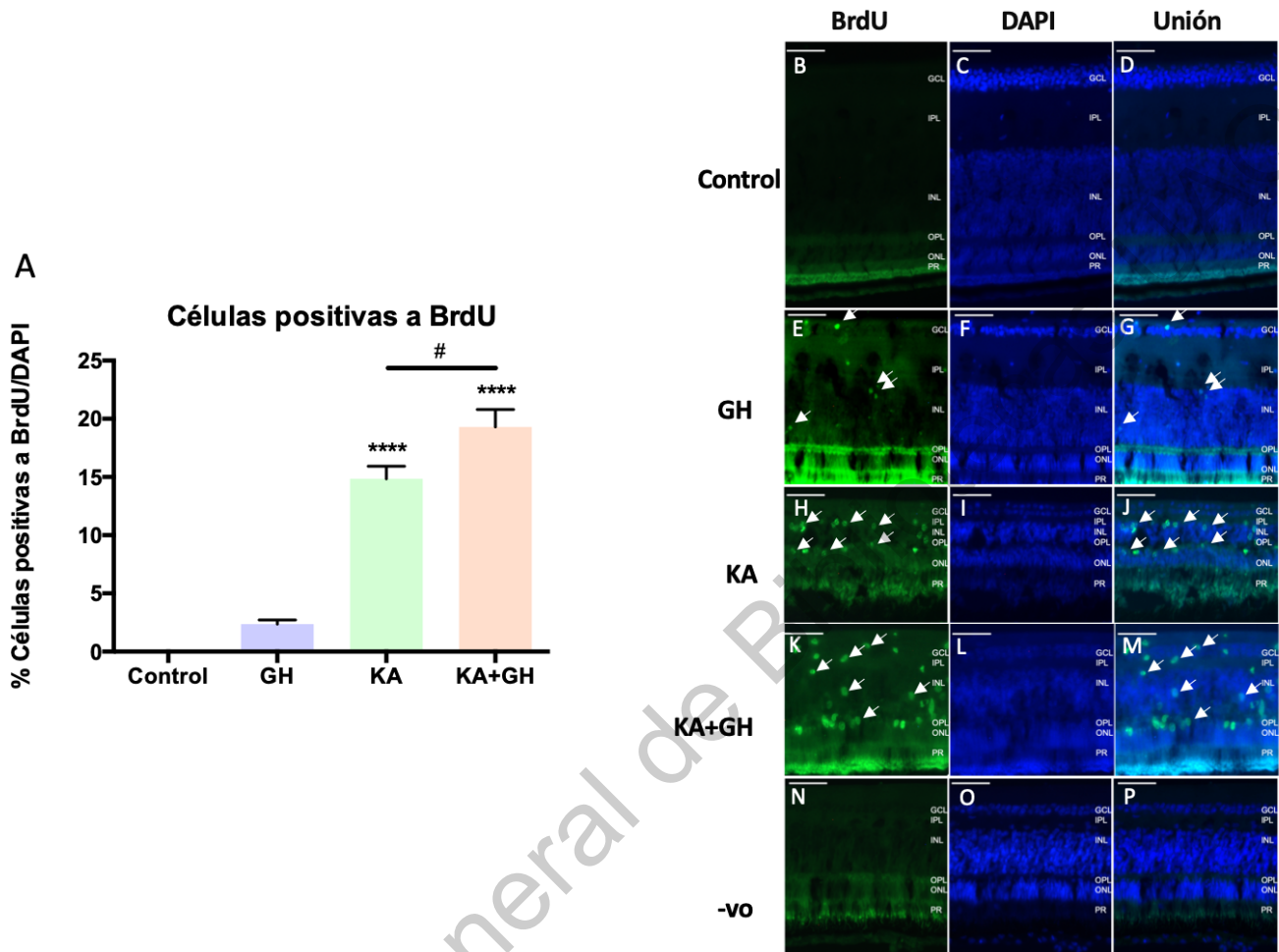


Figura 9. Efectos proliferativos del tratamiento con hormona de crecimiento (GH) en retinas dañadas por excitotoxicidad con kainato (KA) mediante marcaje de inmunoreactividad a BrdU. **(A)** Células positivas a BrdU por grupo, cuantificadas como porcentaje relativo en relación a las células totales marcadas con DAPI. Se muestran imágenes representativas de cortes de retina para cada grupo, en azul (C, F, I y J) marcaje con DAPI, en verde (B, E, H y K) la inmunoreactividad a BrdU y (D, G, J y M) la unión de ambos canales. N, O y P muestran el control negativo sin anticuerpo primario. Las flechas señalan marcaje positivo y co-localización de BrdU con DAPI. Las barras de cada panel representan 40µm de largo. Las barras representan la media aritmética \pm el error estándar ($n=4$; analizados por triplicado). Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación al control (****, $p < 0.0001$) y el símbolo numeral representa

diferencias significativas entre grupos (#, $p < 0.05$) determinado por ANOVA de una vía y Šidák como prueba *post-hoc* para múltiples comparaciones.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio exploró los efectos del tratamiento crónico con hormona de crecimiento (GH) en la retina de pollo dañada por excitotoxicidad con kainato (KA) a tres semanas del daño a través de la evaluación de la expresión de marcadores sinaptogénicos, neuroprotectores, de supervivencia, receptores a glutamato y factores relacionados con la activación de la vía de Notch y al proceso de transdiferenciación de las células gliales de Müller; proceso que se relaciona con la neuroregeneración de la retina en aves y otros grupos de vertebrados. También, se exploró la influencia de la GH sobre la proliferación basal provocada por un daño excitotóxico con KA a ocho días posteriores, y se determinó la morfometría de la retina dañada con KA a los ocho, 15 y 21 días después del daño. Los resultados obtenidos, muestran por primera vez un efecto positivo de la GH sobre la neuroregeneración de la retina de pollo.

El primer acercamiento para corroborar un efecto de la GH sobre el daño excitotóxico fue a través de la observación de la morfología retiniana. Se ha reportado que la GH y otros factores de crecimiento actúan eficazmente como neuroprotectores y previenen el daño neurotóxico evitando la muerte celular y disminución del grosor de las capas plexiforme interna y nuclear interna, las cuales son las principalmente dañadas cuando existe excitotoxicidad por KA (Morgan e Ingham, 1981; Martínez-Moreno, *et al.* 2016; Martínez-Moreno, *et al.* 2018b; Fleming, *et al.* 2018). Se comprobó que no existe ningún tipo de recuperación en la morfología de la retina después de el daño excitotóxico a los 8, 15 y 21 días posteriores, sin embargo, por primera vez se reporta que el tratamiento crónico con GH después del daño, con diez dosis durante tres semanas, es capaz de recuperar parcialmente el grosor de las capas más severamente dañadas por el KA: la capa

plexiforme interna (IPL) y capa nuclear interna (INL). La capa plexiforme interna, al estar formada principalmente por conexiones dendríticas de las neuronas bipolares, amacrinas y ganglionares, representa una estructura fundamental para el correcto funcionamiento de la transmisión de impulsos nerviosos hacia el nervio óptico y por tanto, una correcta capacidad de visión (Balasubramanian y Gan, 2014). La GH tiene acciones neurotróficas conocidas, *in vitro* e *in vivo* se ha comprobado que promueve la transcripción de genes relacionados con la neuroprotección y previene la degeneración de axones (Bianchi, *et al.* 2017; Martínez-Moreno, *et al.* 2018b; Fleming, *et al.* 2019). Esto concuerda con lo observado en la restauración parcial de la IPL, que además puede sugerir una regeneración incompleta de interconexiones neuronales, como se ha observado en el tratamiento de distintos tipos de daños nerviosos al aplicar tratamiento con GH (Nyberg y Hallberg, 2013; Martínez-Moreno, *et al.* 2018b; Devesa, *et al.* 2018). Aunado a esto, observamos un aumento significativo en la expresión de BDNF con el tratamiento de GH; BDNF es una neurotrofina clásica expresada en todo el sistema nervioso, la cual se ha visto que es responsiva a la GH en las células ganglionares de la retina (Martínez-Moreno, *et al.* 2018b). Las acciones protectoras de BDNF son amplias y por lo tanto se especula que juega un papel importante en la regeneración observada por morfometría, pues además se ha observado que en conjunto con CNTF regulan la formación de MGPCs en la retina de pollo (Fischer, *et al.* 2004). BMP4 se sabe que puede actuar como factor de supervivencia y protector en el sistema nervioso, sorprendentemente la GH por sí sola promueve su expresión en la retina, pero no cuando se aplica en conjunto con daño por KA (Fischer, *et al.* 2004). Otros factores protectores y de supervivencia explorados, fueron TNF-R2 y Bcl-2; el papel de TNF R2 es controversial en cuanto a su relación con muerte o supervivencia, sin embargo, creciente evidencia parece mostrar

que, salvo ciertas condiciones celulares, en general TNF R2 está involucrado con el papel protector en la retina a través de TNFa (Fontaine, *et al.* 2002; Nakazawa, *et al.* 2006). Se observó que los niveles control de TNF-R2 se restauraron con el tratamiento con GH en condiciones de daño. Por otro lado, la proteína antiapoptótica por excelencia Bcl-2, se vió incrementada con el tratamiento con GH, complementando evidencia ya existente de que la GH promueve efectos antiapoptóticos mediados por esta proteína (Alba-Betancourt, *et al.* 2013; Luna-Acosta, *et al.* 2015; Martínez-Moreno, *et al.* 2016). Analizando la expresión retiniana de GH, se observó que ante el daño con KA hay un gran aumento en la expresión de la misma, por lo que probablemente la GH endógena participe en el proceso normal de regulación de las células progenitoras derivadas de la glia de Müller (MGPCs) y regeneración ante un daño excitotóxico. Es importante destacar que la expresión local de GH es extremadamente baja, por lo cual no es suficiente para promover un proceso regenerativo como el observado por la administración de GH exógena. Este incremento de la expresión de GH en la retina concuerda con lo ya reportado en el modelo de iguana verde (*Iguana iguana*) ante daño excitotóxico inducido por la administración intravitreal de KA (Ávila-Mendoza, *et al.* 2016).

En adición a los efectos protectores y de supervivencia mediados por la GH, exploramos los efectos sobre los cambios de expresión de marcadores sinaptogénicos. DLG1, el homólogo de las aves para DLG4, que en mamíferos codifica para la proteína PSD95, mostró aumento con el tratamiento con GH después del daño, esto es consistente con previos reportes en los que se evaluó la inmunoreactividad de la proteína PSD95 en retinas dañadas con KA, relacionando esto con efectos neuroprotectores puesto que PSD95 es una proteína post-sináptica del tipo scaffold comúnmente encontrada en

asociación a receptores a glutamato en sinapsis excitatorias (Kumar, *et al.* 2014; Fleming, *et al.* 2018). NRXN 1 es una molécula presináptica de adhesión, y su presencia en el sistema nervioso central así como su papel durante la formación de sinápsis está bien establecida (Uchigashima, *et al.* 2019). Sin embargo, esta es la primera vez que se reporta la expresión de NRX1 en la retina de pollo, la cual parece estar relacionada con los efectos sinaptogénicos promovidos por la GH, mostrando una alta regulación con el tratamiento después del daño. GAP43 también mostró un incremento con el tratamiento de GH, esta proteína es un marcador de crecimiento axonal. El aumento de GAP43 inducido por GH ya se había reportado *in vitro* en la línea celular derivada de neuroretina de codorniz QNR/D, además se ha demostrado que es una proteína muy importante posterior al daño y apoptosis en la retina, pues su inhibición incrementa la muerte celular en lesiones de la retina (Fleming, *et al.* 2016; Wang, *et al.* 2018). Los receptores a glutamato fueron evaluados a través de la expresión del ARNm de las subunidades NR1 para NMDA y GRIK4 para KA, estos mostraron un incremento con el daño con KA, y un mayor aumento con el tratamiento de GH posterior al daño, esto nos hace pensar que los receptores a glutamato están involucrados positivamente en el proceso de regeneración y mediación del daño en la retina, seguramente relacionado con las funciones ya reportadas de los mismos con respecto a crecimiento de neuritas y formación de sinapsis (McAllister, 2000; Lee, *et al.* 2012; Elias, *et al.* 2018). Contrario a lo encontrado en estudios previos que muestran una inhibición considerable de SNAP 25, una proteína presináptica, a corto tiempo después de un daño excitotóxico con KA, nosotros encontramos que a tres semanas del daño, hay una regulación a la alta con el daño con KA, mientras que la GH no ejerce ningún efecto sobre esta, en concordancia con estudios previos donde tampoco se encontró efecto (Fleming, *et al.* 2018).

Existe amplia evidencia de que el daño excitotóxico inducido por la inyección intravitreal de agonistas de receptores al glutamato en el día postnatal 1 en la retina de pollo es capaz de inducir el proceso de transdiferenciación de las células gliales de Müller; en el que estas se desdiferencian y vuelven a entrar al ciclo celular, para de nuevo proliferar en un intento insuficiente por reparar el daño provocado por la excitotoxicidad (Gallina, *et al.* 2014). Este proceso, si el daño es agudo, cesa significativamente después de 14 días, parando la proliferación y probablemente sin ninguna reparación funcional del tejido (Fischer y Reh, 2001). Diversos factores son regulados positivamente para permitir la transición de células gliales a células progenitoras derivadas de la glia de Müller (MGPCs), entre ellos un factor fundamental es Sox2 (Zelinka, *et al.* 2016). Las MGPCs son capaces de proliferar pero no logran re-diferenciarse en neuronas funcionales que se reintegren al tejido como ocurre en peces, y a tres semanas posteriores al daño excitotóxico (como en nuestro modelo) el proceso de transdiferenciación y proliferación ya debería haber terminado. De acuerdo a nuestros resultados, el tratamiento con GH logra prolongar los niveles del ARNm de Sox2 y de FGF2, el cual es un factor de crecimiento también importante para la transdiferenciación y además factor promotor de proliferación; lo que nos lleva a especular que pasadas tres semanas del daño, el fenotipo progenitor de la glia de Müller podría seguir presente, extendido gracias al tratamiento con GH, cuando con solo el daño inducido con KA a este tiempo ya no parece haber el fenotipo a pesar de que en las primeras etapas del daño sí se genera la transdiferenciación (Gallina, *et al.* 2014; Zelinka, *et al.* 2016; Liu, *et al.* 2019). No podemos afirmar que estos factores provengan directamente de las células gliales de Müller, sin embargo, existe mucha evidencia de que la expresión de Sox2 se relaciona

principalmente con las células gliales de Müller, además se ha utilizado como marcador para identificar MGPCs después de daño excitotóxico con NMDA (Hayes, *et al.* 2007; Zelinka, *et al.* 2016).

De igual manera, se ha visto que la activación de la vía de Notch juega un papel muy importante para el proceso de transdiferenciación de la glia de Müller, y aunque existe evidencia controversial sobre si promueve o inhibe el proceso, parece ser que todo recae en los tiempos de activación, el grupo de vertebrados del cuál se trate y las condiciones celulares bajo las cuales se da la activación (Schweisguth, 2004; Hayes, *et al.* 2007; Ghai, *et al.* 2010). En nuestro caso, encontramos una regulación positiva importante cuando el daño fue tratado con GH, esto se suma a reciente evidencia que establece que la activación de la vía de Notch es esencial para la neuroprotección contra daño excitotóxico con KA, y esta protección se ve considerablemente disminuida cuando se bloquea la vía de Notch con DAPT (Fleming, *et al.* 2019).

Finalmente, se midió la expresión de PCNA para evaluar proliferación, sin embargo, no se encontraron diferencias para ningún grupo; esto coincide con el hecho de que a 14 días posteriores al daño, baja contundentemente la proliferación de la retina (Gallina, *et al.* 2014). Basándonos en esto y en que el pico de proliferación reportado por Gallina, *et al.* 2014 después de un daño excitotóxico fue a los ocho días, se realizó el protocolo con BrdU para observar proliferación de acuerdo a dichos tiempos. Aquí, se encontró como era de esperarse, una gran proliferación después del daño, incrementada aún más por el tratamiento con GH, sin embargo, es el primer reporte de proliferación en la retina con solamente aplicación de GH, por lo que un porcentaje pequeño de la

proliferación observada en el grupo de KA+GH, podría ser de células no relacionadas al proceso de regeneración. Hasta ahora, no se ha podido identificar ni inducir la reconexión funcional de estas células al circuito neuronal de la retina. Este trabajo presenta nuevos datos relacionados con el proceso de transdiferenciación de la retina de pollo, además, reporta el papel positivo que tiene la GH como factor neuroprotector y promotor de neuroregeneración después del daño excitotóxico en la retina de pollo. Estos datos pueden ayudar a dilucidar los factores clave para poder llegar a promover una regeneración de la retina completa en aves o mamíferos así como los procesos moleculares que ocurren durante este proceso.

En la Tabla 4, se presenta un resumen de los resultados obtenidos para cada marcador y tratamiento.

Tabla 4: Efecto de la hormona de crecimiento (GH) sobre la expresión de marcadores de regeneración después del daño excitotóxico inducido con kainato (KA)

		Respuesta por tratamiento			
		GH vs C	KA vs C	KA+GH vs C	KA+GH vs KA
Sinaptogénicos	DLG1	s/e	s/e	↑↑	s/e
	NRXN1	s/e	s/e	↑↑↑↑	↑↑
	SNAP25	s/e	↑↑	s/e	s/e
	GAP43	s/e	↓	↑	s/e
	NR1	s/e	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑
	GRIK4	↓	↑	↑↑↑↑	↑↑↑
Pro-supervivencia	TNF-R2	s/e	↓↓	s/e	s/e
	Bcl-2	s/e	s/e	s/e	↑
	BDNF	s/e	s/e	↑↑↑	s/e
	BMP4	↑	s/e	s/e	s/e
Transdiferenciación	FGF2	s/e	s/e	↑	↑↑
	Sox2	s/e	s/e	↑↑	↑
	Ascl1	s/e	s/e	s/e	s/e

Notch1	s/e	s/e	s/e	↑↑↑
Hes5	s/e	↓↓	↑↑↑	↑↑↑↑
PCNA	s/e	s/e	s/e	s/e

s/e: sin efecto; Regulación postiva: ↑ (P < 0.05); ↑↑ (P < 0.01); ↑↑↑ (P < 0.001); ↑↑↑↑ (P < 0.0001); Regulación negativa: ↓ (P < 0.05); ↓↓ (P < 0.01).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VII.CONCLUSIÓN

El tratamiento crónico con GH en la retina de pollo dañada por excitotoxicidad inducida con KA fue capaz de recuperar parcialmente el grosor de la capa nuclear interna y la capa plexiforme interna, y promovió el incremento de receptores a glutamato (KA y NMDA), factores antiapoptóticos (Bcl-2, TNF R2 y BDNF), factores sinaptogénicos (GAP 43, NRXN 1 y DLG1) y marcadores de transdiferenciación (FGF2 y Sox2), además de la proliferación celular. Estos resultados apoyan la idea de que la GH promueve la regeneración de la neuroretina después de un evento neurotóxico.

VIII. REFERENCIAS

- Åberg, N.D., Johansson, I., Åberg, M.A.I., Lind, J., Johansson, U.E., Cooper-Kuhn, C.M., Kuhn, H.G., Isgaard, J., 2009. Peripheral administration of GH induces cell proliferation in the brain of adult hypophysectomized rats. *J Endocrinol* 201, 141–150. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0495>
- Agathocleous, M., Harris, W.A., 2009. From Progenitors to Differentiated Cells in the Vertebrate Retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 45–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113259>
- Alba-Betancourt, C., Luna-Acosta, J.L., Ramírez-Martínez, C.E., Ávila-González, D., Granados-ávalos, E., Carranza, M., Martínez-Coria, H., Arámburo, C., Luna, M., 2013. Neuroprotective effects of growth hormone (GH) after hypoxia-ischemia injury in embryonic chicken cerebellum. *Gen Comp Endocrinol* 183, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.12.004>
- Aldskogius, H., 2001. Microglia in neuroregeneration. *Microsc Res Tech* 54, 40–46. <https://doi.org/10.1002/jemt.1119>
- Arámburo, C., Alba-Betancourt, C., Luna, M., Harvey, S., 2014. Expression and function of growth hormone in the nervous system: a brief review. *Gen Comp Endocrinol* 203, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.035>
- Armstrong, R.J., Barker, R.A., 2001. Neurodegeneration: A failure of neuroregeneration? *Lancet* 358, 1174–1176. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06260-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06260-2)
- Ávila-Mendoza, J., Mora, J., Carranza, M., Luna, M., Arámburo, C., 2016. Growth hormone reverses excitotoxic damage induced by kainic acid in the green iguana neuroretina. *Gen Comp Endocrinol* 234, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.04.004>
- Balasubramanian, R., Gan, L., 2014. Development of Retinal Amacrine Cells and Their Dendritic Stratification. *Curr Ophthalmol Rep* 2, 100–106. <https://doi.org/10.1007/s40135-014-0048-2>
- Barnea, A., Pravosudov, V., 2011. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. *Eur J Neurosci* 34, 884–907. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07851.x>
- Bartke, A., 2011. Pleiotropic effects of growth hormone signaling in aging. *Trends Endocrinol Metab* 22, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.07.004>
- Bas, A., Forsberg, G., Hammarström, S., Hammarström, M.L., 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene

- expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 59, 566–573.
<https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01440.x>
- Baudet, M.L., Sanders, E.J., Harvey, S., 2003. Retinal Growth Hormone in the Chick Embryo. *Endocrinology* 144, 5459–5468. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0651>
- Bianchi, V.E., Locatelli, V., Rizzi, L., 2017. Neurotrophic and neuroregenerative effects of GH/IGF1. *Int J Mol Sci* 18, 1–25. <https://doi.org/10.3390/ijms18112441>
- Boehm, E.M., Gildenberg, M.S., Washington, M.T., n.d. The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *Enzym* 39, 231–54.
<https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.03.003>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brooks, A.J., Wooh, J.W., Tunny, K.A., Waters, M.J., 2008. Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1984–1989.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.008>
- Caroni, P., 1998. Neuro-regeneration: Plasticity for repair and adaptation. *Essays Biochem* 33, 53–64. <https://doi.org/10.1042/bse0330053>
- Chen, Jong-Han. Chen, Mei-Shu. Chen, Su-Liang. Chiu, I.-M., 2015. Neural Stem Cells and their Niches in Neuroregeneration. *Int J Stem cell Res Ther* 2. <https://doi.org/10.23937/2469-570X/1410015>
- Cheng, H., Nair, G., Walker, T.A., Kim, M.K., Pardue, M.T., Thulé, P.M., Olson, D.E., Duong, T.Q., 2006. Structural and functional MRI reveals multiple retinal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17525–17530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605790103>
- Chow, R.L., Lang, R.A., 2001. Early eye development in vertebrates. *Annu rev cell dev Biol* 17, 255–296.
- Devesa, J., Núñez, I., Agra, C., Bejarano, A., Devesa, P., 2018. Treatment with Growth Hormone (GH) Increased the Metabolic Activity of the Brain in an Elder Patient, Not GH-Deficient, Who Suffered Mild Cognitive Alterations and Had an ApoE 4/3 Genotype. *Int J Mol Sci* 19, 2294. <https://doi.org/10.3390/ijms19082294>
- Devesa, P., Gelabert, M., González-Mosquera, T., Gallego, R., Relova, J.L., Devesa, J., Arce, V.M., 2012. Growth hormone treatment enhances the functional recovery of sciatic nerves after transection and repair. *Muscle and Nerve* 45, 385–392.
<https://doi.org/10.1002/mus.22303>

- Devesa, P., Reimunde, P., Gallego, R., Devesa, J., Arce, V.M., 2011. Growth hormone (GH) treatment may cooperate with locally-produced GH in increasing the proliferative response of hippocampal progenitors to kainate-induced injury. *Brain Inj* 25, 503–10. <https://doi.org/10.3109/02699052.2011.559611>
- Elias, E., Yang, N., Wang, P., Tian, N., 2018. Glutamate Activity Regulates and Dendritic Development of J-RGCs. *Front Cell Neurosci* 12, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00249>
- Elsaedi, F., Macpherson, P., Mills, E.A., Jui, J., Flannery, J.G., Goldman, D., 2018. Notch suppression collaborates with *Ascl1* and *Lin28* to unleash a regenerative response in fish retina, but not in mice. *J Neurosci* 38, 2126–17. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2126-17.2018>
- Fischer, A.J., Bongini, R., 2010. Turning Müller glia into neural progenitors in the retina. *Mol Neurobiol* 42, 199–209. <https://doi.org/10.1007/s12035-010-8152-2>
- Fischer, A.J., McGuire, C.R., Dierks, B.D., Reh, T.A., 2002. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *J Neurosci* 22, 9387–9398.
- Fischer, A.J., Reh, T.A., 2000. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 220, 197–210. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9640>
- Fischer, A.J., Reh, T.A., 2001. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 4, 247–252. <https://doi.org/10.1038/85090>
- Fischer, A.J., Schmidt, M., Omar, G., Reh, T.A., 2004. BMP4 and CNTF are neuroprotective and suppress damage-induced proliferation of Müller glia in the retina. *Mol Cell Neurosci* 27, 531–542. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.08.007>
- Fischer, A.J., Zelinka, C., Gallina, D., Scott, M.A., Todd, L., 2014. Reactive microglia and macrophage facilitate the formation of müller glia-derived retinal progenitors. *Glia* 62, 1608–1628. <https://doi.org/10.1002/glia.22703>
- Fleming, T., Balderas-Márquez, J.E., Epardo, D., Ávila-Mendoza, J., Carranza, M., Luna, M., Harvey, S., Arámburo, C., Martínez-Moreno, C.G., 2019. Growth Hormone Neuroprotection Against Kainate Excitotoxicity in the Retina is Mediated by Notch/PTEN/Akt Signaling. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 60, 4532. <https://doi.org/10.1167/iovs.19-27473>
- Fleming, T., Martinez-Moreno, C.G., Carranza, M., Luna, M., Harvey, S., Arámburo, C., 2018. Growth hormone promotes synaptogenesis and protects neuroretinal dendrites against kainic acid (KA) induced damage. *Gen Comp Endocrinol* 265, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.02.011>

- Fleming, T., Martínez-Moreno, C.G., Mora, J., Aizouki, M., Luna, M., Arámburo, C., Harvey, S., 2016. Internalization and synaptogenic effect of GH in retinal ganglion cells (RGCs). *Gen Comp Endocrinol* 234, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.025>
- Fontaine, V., Mohand-Said, S., Hanoteau, N., Fuchs, C., Pfizenmaier, K., Eisel, U., 2002. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* 22, RC216. <https://doi.org/20026253>
- Gallina, D., Todd, L., Fischer, A.J., 2014. A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Exp Eye Res* 123, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.06.019>
- Ghai, K., Zelinka, C., Fischer, A.J., 2010. Notch signaling influences neuroprotective and proliferative properties of mature Müller glia. *J Neurosci* 30, 3101–12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4919-09.2010>
- Gilbert, S.F. 2003. *Developmental Biology* (6th Edition). Sunderland (MA). ISBN-10: 0-87893-243-7
- Goda, Y., Davis, G.W., 2003. Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40, 243–264. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00608-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00608-1)
- Grumbach, M.M., Bin-Abbas, B.S., Kaplan, S.L., 1998. The growth hormone cascade: Progress and long-term results of growth hormone treatment in growth hormone deficiency. *Horm Res* 49, 41–57. <https://doi.org/10.1159/000053087>
- Hamon, A., Roger, J.E., Yang, X.J., Perron, M., 2016. Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. *Dev Dyn* 245, 727–738. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24375>
- Harvey, S., 2010. Extrapituitary growth hormone. *Endocrine* 38, 335–59. <https://doi.org/10.1007/s12020-010-9403-8>
- Harvey, S., Hull, K., 2003. Neural growth hormone: an update. *J Mol Neurosci* 20, 1–14. <https://doi.org/10.1385/JMN:20:1:1>
- Harvey, S., Lin, W., Giterman, D., El-Abry, N., Qiang, W., Sanders, E.J., 2012. Release of retinal growth hormone in the chick embryo: Local regulation? *Gen Comp Endocrinol* 176, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.01.021>
- Harvey, S., Martínez-Moreno, C.G., Ávila-Mendoza, J., Luna, M., Arámburo, C., 2016. Growth hormone in the eye: A comparative update. *Gen Comp Endocrinol* 234, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.01.013>

- Hayes, S., Nelson, B.R., Buckingham, B., Reh, T.A., 2007. Notch signaling regulates regeneration in the avian retina. *Dev Biol* 312, 300–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.046>
- Heredia, M., Fuente, A., Criado, J., Yajeya, J., Devesa, J., Riobos, A.S., 2013. Early growth hormone (GH) treatment promotes relevant motor functional improvement after severe frontal cortex lesion in adult rats. *Behav Brain Res* 247, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.012>
- Hua, J.Y., Smith, S.J., 2004. Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci* 7, 327–332. <https://doi.org/10.1038/nn1218>
- Hubel, D.H., 1995. Eye, brain, and vision. *Vertebr eye its Adapt Radiat*. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7369>
- Jones, M.P., Pierce, K.E., Ward, D., 2007. Avian Vision: A Review of Form and Function with Special Consideration to Birds of Prey. *J Exot Pet Med* 16, 69–87. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2007.03.012>
- Kostyo, J.L., Reagan, C.R., 1976. The biology of growth hormone. *Pharmacol Ther Part B Gen Syst Pharmacol* 2, 591–604. [https://doi.org/10.1016/0306-039X\(76\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0306-039X(76)90009-X)
- Kozera, B., Rapacz, M., 2013. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54, 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Kumar, V., Nag, T.C., Sharma, U., Jagannathan, N.R., Wadhwa, S., 2014. Differential effects of prenatal chronic high-decibel noise and music exposure on the excitatory and inhibitory synaptic components of the auditory cortex analog in developing chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Neuroscience* 269, 302–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.061>
- Kumar, V., Nag, T.C., Sharma, U., Jagannathan, N.R., Wadhwa, S., 2014. Differential effects of prenatal chronic high-decibel noise and music exposure on the excitatory and inhibitory synaptic components of the auditory cortex analog in developing chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Neuroscience* 269, 302–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.061>
- Lawrence, G.W., Wang, J., Brin, M.F., Aoki, K.R., Wheeler, L., Dolly, J.O., 2014. Fusion of Golgi-derived vesicles mediated by SNAP-25 is essential for sympathetic neuron outgrowth but relatively insensitive to botulinum neurotoxins in vitro. *FEBS J* 281, 3243–3260. <https://doi.org/10.1111/febs.12858>
- Le Grevès, M., Zhou, Q., Berg, M., Le Grevès, P., Fhølenhag, K., Meyerson, B., Nyberg, F., 2006. Growth hormone replacement in hypophysectomized rats affects spatial performance and hippocampal levels of NMDA receptor subunit and PSD-95 gene transcript levels. *Exp Brain Res* 173, 267–273. <https://doi.org/10.1007/s00221-006-0438-2>

- Lee, J.-G., Lee, K.-P., Jeon, C.-J., 2012. Synaptic Pattern of KA1 and KA2 upon the Direction-Selective Ganglion Cells in Developing and Adult Mouse Retina. *Acta Histochem Cytochem* 45, 35–45. <https://doi.org/10.1267/ahc.11043>
- Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N., Benowitz, L.I., 2000. Lens Injury Stimulates Axon Regeneration in the Mature Rat Optic Nerve. *J Neurosci* 20, 4615–4626. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-12-04615.2000>
- Liu, Y., Wang, C., Su, G., 2019. Cellular Signaling in Müller Glia: Progenitor Cells for Regenerative and Neuroprotective Responses in Pharmacological Models of Retinal Degeneration. *J Ophthalmol* 2019, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2019/5743109>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luna-Acosta, J.L., Alba-Betancourt, C., Martínez-Moreno, C.G., Ramírez, C., Carranza, M., Luna, M., Arámburo, C., 2015. Direct antiapoptotic effects of growth hormone are mediated by PI3K/Akt pathway in the chicken bursa of Fabricius. *Gen Comp Endocrinol* 224, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.07.010>
- Martin, G. R. 1985. Eye, In: *Form and Function in birds*, vol. 3. Eds: A. S. King y J. McLelland, pp. 311-373. Academic Press.
- Martínez-Moreno, C.G., Ávila-Mendoza, J., Wu, Y., Arellanes-Licea, E. del C., Louie, M., Luna, M., Arámburo, C., Harvey, S., 2016. Neuroprotection by GH against excitotoxic-induced cell death in retinal ganglion cells. *Gen Comp Endocrinol* 234, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.023>
- Martínez-Moreno, C.G., Calderón-Vallejo, D., Harvey, S., Arámburo, C., Quintanar, J.L., 2018a. Growth Hormone (GH) and Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in the Central Nervous System: A Potential Neurological Combinatory Therapy? *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19020375>
- Martínez-Moreno, C.G., Fleming, T., Carranza, M., Ávila-Mendoza, J., Luna, M., Harvey, S., Arámburo, C., 2018b. Growth hormone protects against kainate excitotoxicity and induces BDNF and NT3 expression in chicken neuroretinal cells. *Exp Eye Res* 166, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.10.005>
- Masland, R.H., 2001. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4, 877–886. <https://doi.org/10.1038/nn0901-877>
- McAllister, A.K., 2000. Cellular and Molecular Mechanisms of Dendrite Growth. *Cereb Cortex* 10, 963–973. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.10.963>

- McGeer, E.G., Olney, J.W. and McGeer, P.L. (Eds.), 1978. Kainic Acid as a Tool in Neurobiology, Raven Press, New York.
- Miller, WL, Eberhardt, N., 1983. Structure and Evolution of the Growth Hormone Gene Family. *Endocr Rev* 4, 97–129. <https://doi.org/10.1093/nar/11.12.3939>
- Mills, E.A., Goldman, D., 2017. The Regulation of Notch Signaling in Retinal Development and Regeneration. *Curr Pathobiol Rep* 5, 323–331. <https://doi.org/10.1007/s40139-017-0153-7>
- Morgan, I.G., Ingham, C.A., 1981. Kainic acid affects both plexiform layers of chicken retina. *Neurosci Lett* 21, 275–80. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(81\)90216-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(81)90216-0)
- Mysona, B.A., Zhao, J., Bollinger, K.E., 2017. Role of BDNF/TrkB pathway in the visual system: therapeutic implications for glaucoma. *Expert Rev Ophthalmol* 12, 69–81. <https://doi.org/10.1080/17469899.2017.1259566>
- Nakazawa, T., Nakazawa, C., Matsubara, A., Noda, K., Hisatomi, T., She, H., Michaud, N., Hafezi-Moghadam, A., Miller, J.W., Benowitz, L.I., 2006. Tumor Necrosis Factor- Mediates Oligodendrocyte Death and Delayed Retinal Ganglion Cell Loss in a Mouse Model of Glaucoma. *J Neurosci* 26, 12633–12641. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2801-06.2006>
- Nyberg, F., Hallberg, M., 2013. Growth hormone and cognitive function. *Nat Rev Endocrinol* 9, 357–65. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.78>
- Nylander, E., Grönbladh, A., Zellerroth, S., Diwakarla, S., Nyberg, F., Hallberg, M., 2016. Growth hormone is protective against acute methadone-induced toxicity by modulating the NMDA receptor complex. *Neuroscience* 339, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.019>
- Paraoanu, L.E., Becker-Roock, M., Christ, E., Layer, P.G., 2006. Expression patterns of neurexin-1 and neuroligins in brain and retina of the chick embryo: Neuroligin-3 is absent in retina. *Neurosci Lett* 395, 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.10.076>
- Park, C.M., Hollenberg, M.J., 1991. Induction of retinal regeneration in vivo by growth factors. *Dev Biol* 148, 322–333. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90341-Y](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90341-Y)
- Ramis, M., Sarubbo, F., Sola, J., Aparicio, S., Garau, C., Miralles, A., Esteban, S., 2013. Cognitive improvement by acute growth hormone is mediated by NMDA and AMPA receptors and MEK pathway. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 45, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.005>
- Ranke, M.B., Wit, J.M., 2018. Growth hormone-past, present and future. *Nat Rev Endocrinol* 14, 285–300. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.22>

- Sanders, E.J., Parker, E., Arámburo, C., Harvey, S., 2005. Retinal growth hormone is an anti-apoptotic factor in embryonic retinal ganglion cell differentiation. *Exp Eye Res* 81, 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.013>
- Scanes, C.G. Harvey, S., 1981. Growth hormone and prolactin in avian species. *Life Sci* 28, 2895–2902. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Scharff, C., Adam, I., 2013. Neurogenetics of birdsong. *Curr Opin Neurobiol* 23, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.10.001>
- Schweisguth, F., 2004. Regulation of Notch Signaling Activity. *Curr Biol* 14, R129–R138. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.023>
- Seydewitz, V., Rothermel, A., Fuhrmann, S., Schneider, A., DeGrip, W.J., Layer, P.G., Hofmann, H.-D., 2004. Expression of CNTF Receptor- α in Chick Violet-Sensitive Cones with Unique Morphologic Properties. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 45, 655. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0182>
- Tazaki, A., Tanaka, E.M., Fei, J.F., 2017. Salamander spinal cord regeneration: The ultimate positive control in vertebrate spinal cord regeneration. *Dev Biol* 432, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.034>
- Todd, L., Palazzo, I., Squires, N., Mendonca, N., Fischer, A.J., 2017. BMP- and TGF β -signaling regulate the formation of Müller glia-derived progenitor cells in the avian retina. *Glia* 65, 1640–1655. <https://doi.org/10.1002/glia.23185>
- Uchigashima, M., Cheung, A., Suh, J., Watanabe, M., Futai, K., 2019. Differential expression of neurexin genes in the mouse brain. *J Comp Neurol* 527, 1940–1965. <https://doi.org/10.1002/cne.24664>
- Uchigashima, M., Cheung, A., Suh, J., Watanabe, M., Futai, K., 2019. Differential expression of neurexin genes in the mouse brain. *J Comp Neurol* 527, 1940–1965. <https://doi.org/10.1002/cne.24664>
- Ulloa, F., Cotrufo, T., Ricolo, D., Soriano, E., Araújo, S.J., 2018. SNARE complex in axonal guidance and neuroregeneration. *Neural Regen Res* 13, 386–392. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.228710>
- Vanhunsel, S., Van Houcke, J., Bollaerts, I., Beckers, A., Lemmens, K., De Groef, L., Moons, L., 2017. Fish-ing for neuroregenerative strategies in senescent teleosts. *Front Neurosci* 11. <https://doi.org/10.3389/conf.fnins.2017.94.00108>
- Vergara, M.N., Canto-Soler, M.V., 2012. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. *Neural Dev* 7, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-22>

Wajant, H., Siegmund, D., 2019. TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00091>

Wang, N., Yang, W., Xiao, T., Miao, Z., Luo, W., You, Z., Li, G., 2018. Possible role of miR-204 in optic nerve injury through the regulation of GAP-43. *Mol Med Rep* 17, 3891–3897. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8341>

Wiedemann, M., Hanke, W., 1997. The chicken retina as an experimental model for investigation of central nervous lesions. *Neurosci Lett* 232, 99–102. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00578-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00578-8)

Wilken, M.S., Reh, T.A., 2016. Retinal regeneration in birds and mice. *Curr Opin Genet Dev* 40, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.05.028>

Willis, A.M, Wilkie, D.A., 1999. Avian ophthalmology part 1: Anatomy, examination, and diagnostic techniques. *J Avian Med Surg* 13, 160–166. <https://doi.org/10.2307/30130679>

Zelinka, C.P., Volkov, L., Goodman, Z.A., Todd, L., Palazzo, I., Bishop, W.A., Fischer, A.J., 2016. mTor signaling is required for the formation of proliferating Müller glia-derived progenitor cells in the chick retina. *Development* 143, 1859–1873. <https://doi.org/10.1242/dev.133215>