

ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA DE LA RETINA DE RATA A LA SECCIÓN DEL NERVIO ÓPTICO: EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE DIVERSAS SUSTANCIAS NEUROPROTECTORAS



PALOMA SOBRADO CALVO

**Departamento de Ciencias Morfológicas y Psicobiología
Universidad de Murcia
2001**

**Tesis presentada en la Universidad de Murcia para acceder
al grado de Doctor en Farmacia**



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DPTO. DE OFTALMOLOGÍA
OTORRINOLARINGOLOGÍA
Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Facultad de Medicina

D^a M^a PAZ VILLEGAS PÉREZ, Profesora Titular de la Universidad de Murcia,

D. JAIME MIRALLES DE IMPERIAL MORA-FIGUEROA, Catedrático de la
Universidad de Murcia y

D. MANUEL VIDAL SANZ, Catedrático de la Universidad de Murcia.

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: "Estudio de la respuesta de las células de microglía de la retina de rata a la sección del nervio óptico: efectos de la administración de diversas sustancias neuroprotectoras", realizada por **D^a Paloma Sobrado Calvo**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en el Laboratorio de Oftalmología Experimental del Departamento de Oftalmología, Anatomía Patológica y Otorrinolaringología, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 11 de junio de 2001

Fdo.: Prof. María Paz Villegas Pérez

Fdo.: Prof. Jaime Miralles de Imperial Mora-Figueroa

Fdo.: Prof. Manuel Vidal Sanz



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
MORFOLÓGICAS Y PSICOBIOLOGÍA

Facultad de Medicina

D. LUIS PUELLES LÓPEZ, Catedrático del Departamento de Ciencias Morfológicas y Psicobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, autoriza, en calidad de Tutor de Dña. Paloma Sobrado Calvo, la presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada **“Estudio de la respuesta de las células de microglía de la retina de rata a la sección del nervio óptico: efectos de la administración de diversas sustancias neuroprotectoras”**, realizada por la anteriormente citada Dña. Paloma Sobrado Calvo.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia, a veintinueve de mayo de dos mil uno.



Fdo.: Prof. D. Luis Puelles López



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
MORFOLÓGICAS Y PSICOBIOLOGÍA

Facultad de Medicina

D. LUIS PUELLES LÓPEZ, Catedrático del Departamento de Ciencias Morfológicas y Psicobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, autoriza, en calidad de Director del Departamento, la presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada **“Estudio de la respuesta de las células de microglía de la retina de rata a la sección del nervio óptico: efectos de la administración de diversas sustancias neuroprotectoras”**, realizada por Dña. Paloma Sobrado Calvo.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Murcia, a veintinueve de mayo de dos mil uno.



Fdo.: Prof. D. Luis Puelles López

RESUMEN

Se ha documentado que la sección del nervio óptico induce la degeneración y muerte de aproximadamente el 40% de la población de las células ganglionares de la retina de la rata adulta a los 7 días de la lesión y de más del 80% de estas células a los 14 días de la lesión. Al menos una parte de las células ganglionares de la retina que mueren como consecuencia de la sección del nervio óptico lo hacen por apoptosis. Después de la sección del nervio óptico se produce una activación de las células de microglía de la retina, que fagocitan los desechos de las células ganglionares muertas como consecuencia de la lesión. Se ha documentado que el empleo de diversas neurotrofinas y de algunos péptidos que intervienen en la apoptosis o en la activación de las células microgliales induce un aumento transitorio de la supervivencia de las células ganglionares de la retina tras la sección del nervio óptico.

Se postula que la fagocitosis de las neuronas degeneradas no es la única función de las células de microglía en la retina de mamífero durante la lesión. Este hecho se ve apoyado tanto porque su inactivación aumenta la supervivencia de las células ganglionares de la retina después de la sección del nervio óptico, como por la capacidad que tienen estas células para secretar neurotrofinas a la vez que sustancias que inducen la muerte celular, y por presentar receptores para factores neurotróficos, como han documentado diversos autores. Por ello, en el presente trabajo el principal objetivo fue el estudio de la implicación de las células de microglía de la retina de la rata adulta en la supervivencia de las células ganglionares de la retina tras la sección del nervio óptico y tras la administración de diversas sustancias: factores neurotróficos, sustancias antiapoptóticas y una sustancia que impide la activación de los macrófagos.

Para el estudio de las células de microglía pusimos a punto dos técnicas para el marcaje de las células de microglía: la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa y el marcaje con fluorogold.

La técnica de la NDPasa fue empleada para el marcaje de las células de microglía de la retina en un primer grupo de animales (grupo I). En este grupo estudiamos la localización de las células de microglía en las diferentes capas de la retina en condiciones normales, entre 7 y 40 días después de la sección del nervio

óptico izquierdo y entre 7 y 30 días después de la sección del nervio óptico izquierdo y administración intravítrea de varias sustancias: PBS, MIF, NGF, BDNF y NT3.

El análisis cualitativo y cuantitativo de las retinas del grupo I nos permitió documentar los siguientes hallazgos:

- 1.- Las células de microglía NDPasa+ de la retina de la rata adulta se localizan en la capa de fibras nerviosas (CFN), capa de células ganglionares (CCG), capa plexiforme interna (CPI) y capa plexiforme externa (CPE), teniendo en cada capa una morfología y distribución característica, siendo la densidad de células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI de la retina de la rata adulta un rasgo característico de cada animal.
- 2.- Tras la sección del nervio óptico se produce un aumento de la densidad de células de microglía NDPasa+ en la CFN desde los 7 a los 30 días después de la sección del nervio óptico y en la CCG y CPI durante todo el periodo de estudio (40 días).
- 3.- Tras la sección del nervio óptico se mantiene la distribución de las células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI en forma de mosaico regular, sin que se produzcan solapamientos entre los procesos de células situadas en la misma capa o en ambas capas.
- 3.- La punción simple del globo ocular o la administración intravítrea de vehículo, MIF, NGF, BDNF o NT3 induce un incremento de la densidad de células de microglía NDPasa+ en la CCG y CPI de las retinas contralaterales o controles.
- 4.- La administración intravítrea de algunas sustancias induce diferentes cambios en la población de células de microglía NDPasa+ de la CFN, CCG y CPI. Así, la administración de MIF disminuye significativamente las densidades de células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI a los 7 días de la sección del nervio óptico. La administración de BDNF disminuye el incremento de densidad de las células de microglía NDPasa+ de la CFN a los 7 días de la sección del nervio óptico, mientras que la administración de NT3 disminuye la activación de las células de microglía de la CFN a los 7 y 14 días de la lesión. Además, la administración de NT3 aumenta la densidad de células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI a los 7 días de la sección del NO.

En un segundo grupo de animales (grupo II) se marcaron las células ganglionares de la retina mediante la aplicación del trazador neuronal fluorescente fluorogold en ambos colículos superiores. A los 7 días, se seccionó el nervio óptico izquierdo de todos los animales e, inmediatamente después, algunos fueron tratados

con diferentes sustancias, administradas por vía intravítrea (MIF, BDNF, NGF, PIH, IGF-I, IGF-I+NT3, PIH+NT3, Bcl-xL, Bcl-xS, Bcl-2, Z-DEVD-cmk) o subcutánea (PIH). Estos animales fueron procesados 7 o 14 días después de la sección del nervio óptico y en ellos se determinaron las densidades de células ganglionares supervivientes y también las densidades de células microgliales que, como consecuencia de la fagocitosis de las células ganglionares muertas, se habían marcado.

El análisis cualitativo y cuantitativo de las retinas del grupo II nos permitió documentar los siguientes hallazgos:

- 1.- En las retinas derechas o controles se observaban escasas células de microglía marcadas con fluorogold, lo que sugiere que algunas células ganglionares de la retina proyectan al ojo contralateral y a su vez envían proyecciones colaterales al colículo superior.
- 2.- En las retinas experimentales se observaba un descenso de las densidades de células ganglionares de la retina marcadas con fluorogold que aumentaba a medida que lo hacía el intervalo de supervivencia.
- 3.- En las retinas experimentales se observaban abundantes células de microglía marcadas con fluorogold, aumentando las densidades de las mismas según lo hacía el intervalo de supervivencia.
- 4.- Las células de microglía marcadas con fluorogold se localizaban en las retinas experimentales en la CFN, CCG y CPI, siendo la morfología de las mismas sensiblemente diferente en cada una de las capas.
- 5.- En las retinas experimentales, existía una correlación entre las densidades de células de microglía marcadas con FG y los porcentajes de muerte de CGR a los 7 días de la sección del nervio óptico, pero no 14 días después de la sección.
- 6.- La aplicación intravítrea de BDNF, Z-DEVD-cmk, IGF-I+NT3, PIH o Bcl-xL, o la administración subcutánea de PIH aumentaban la supervivencia de las células ganglionares de la retina a los 7 días de la sección del nervio óptico, y la administración intravítrea de BDNF, Z-DEVD-cmk, MIF y NGF o la administración subcutánea de PIH aumentaban la supervivencia de las células ganglionares de la retina a los 14 días de la sección del nervio óptico.

7.- En las retinas experimentales de los animales tratados que mostraban un incremento de la supervivencia de las células ganglionares de la retina, las densidades de células de microglía fagocítica eran menores que en animales no tratados, mientras que en los que mostraban una disminución de la supervivencia de las células ganglionares de la retina, las densidades de células de microglía eran mayores que en los animales no tratados, por lo que las densidades de células de microglía marcadas con fluorogold en animales tratados estaban relacionadas con los porcentajes de muerte de células ganglionares y esto podía ser demostrado por métodos estadísticos al menos a los 7 días después de la sección del nervio óptico. Estos resultados indicaban que los tratamientos utilizados no modificaban la respuesta de las células de microglía sino la supervivencia de las células ganglionares.

8.- En dos grupos experimentales, los que recibieron tratamiento intravítreo con NGF y Z-DEVD-cmk, no se observaba una relación entre los porcentajes de muerte de células ganglionares y las densidades de células de microglía marcadas con fluorogold. El tratamiento con NGF producía un incremento de la densidad de células de microglía marcadas con fluorogold que, al menos a los 14 días de la sección del nervio óptico, no estaba relacionado con el porcentaje de muerte de células ganglionares en estas retinas. El tratamiento con Z-DEVD-cmk producía una disminución de la densidad de células de microglía fagocítica que tampoco estaba relacionada con el porcentaje de muerte de células ganglionares de la retina a los 7 días de la sección del nervio óptico. Estos resultados sugieren que el NGF y el Z-DEVD-cmk pueden tener una acción directa sobre la actividad fagocítica de las células de microglía.

Un trabajo de investigación nunca es fruto de los esfuerzos de un solo individuo, sino de la colaboración próxima de un grupo de personas que buscan un objetivo común. El desarrollo de mi trabajo me ha permitido crear sólidos vínculos de amistad con algunas personas, que espero duren toda la vida. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que han colaborado de distinta forma en la elaboración de esta Tesis, o me han apoyado en el transcurso de la misma.

A la Profesora María Paz Villegas Pérez, alma mater de este trabajo, por su capacidad para transmitir sus conocimientos y su entusiasmo por la ciencia. Por el tiempo dedicado desde el comienzo hasta los últimos momentos de esta Tesis, y por su capacidad de diálogo. Nunca agradeceré suficientemente todo lo que me ha enseñado.

Al Profesor Manuel Vidal Sanz, por haber hecho posible la realización de este trabajo en el Laboratorio de Oftalmología Experimental. Por su constante apoyo científico y técnico, sin el cual no se hubiera llevado a cabo esta Tesis, por su inagotable capacidad de trabajo y su contagioso entusiasmo investigador. Ha sabido crear un ambiente agradable de trabajo en el que todos formamos parte de una gran familia, compartiendo alegrías y preocupaciones.

Al Profesor Jaime Miralles de Imperial, por brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo, por la confianza que ha depositado en mí, y que espero no defraudar jamás, y por animarme a comenzar esta Tesis.

A la Dra. Inmaculada Sellés, quien me enseñó una de las técnicas quirúrgicas empleadas en esta Tesis. Por su entrañable amistad, su entrega a los demás y por la dulzura con lo que hace todas las cosas.

A la Dra. María Lafuente, con la que he compartido tantos momentos durante la realización de nuestras Tesis. Siempre he admirado su disciplina en el trabajo y su capacidad de organización, que le permite aprovechar cada minuto del día.

A la Dra. Elena Rodríguez, compañera de fatigas, con la que he compartido momentos buenos y malos a durante la realización de nuestras Tesis. Su buen carácter me ha permitido disfrutar también de los momentos difíciles.

Al Dr. Marcelino Avilés, por su colaboración científica y técnica.

A Sergio Mayor, infatigable colaborador, capaz de ayudar en cualquier circunstancia. A veces no sé cómo ha podido atender a todos los que hemos solicitado su ayuda, y no ha sucumbido en el intento. Muchas gracias por todo.

A María Elena Aguilera y a Antonio García, por su constante afán de superación en el desarrollo de su trabajo. La exactitud con que desempeñan su labor, y su extraordinaria forma de ser en todo momento hacen que nuestra tarea resulte más sencilla.

A los Dres. Enrique de la Rosa y Flora de Pablo, por facilitarme dos de los productos empleados en esta Tesis: la proinsulina humana y el factor de crecimiento similar a insulina I.

Al Departamento de Ciencias Morfológicas y Psicobiología, por la ayuda técnica prestada para la elaboración de las imágenes de esta Tesis.

A la Dra. Mercedes Salvador, por su colaboración en la puesta a punto de la técnica de la NDPasa empleada en esta Tesis.

Al Dr. Edmundo Usón, por su apoyo en los momentos difíciles y sus buenos consejos.

A Remedios Rosell, por su colaboración en la revisión bibliográfica y en todos los trámites burocráticos necesarios para la lectura de la Tesis.

A Lidia Coll, por todos los buenos momentos compartidos en el Laboratorio.

A la Dra. Ana María Gómez por su arrolladora personalidad que tantos buenos ratos nos ha proporcionado.

A Natalia Hurtado y José Martínez, por su simpatía y buen humor.

A nuestros amigos, Paco, Cari y Pablo, por todos los buenos momentos vividos, por ser parte de nuestra familia.

A Paul y Lore Gombert, por abrirnos los ojos a horizontes distintos.

A mi hermana Cristina, por estar incondicionalmente a mi lado en todo momento y ocasión, y por ser una segunda madre para mi hija. Muchas gracias.

A Joaquín y a Ana Cristina, por haberme soportado en los momentos más tensos. En especial a mi hija Ana Cristina, por darle sentido a todo.

A mis padres, por todo lo que han hecho por mí, y en especial a mi padre, que siempre me apoyó en todo.

INDICE

RESUMEN

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
HALLAZGOS ORIGINALES.....	iii
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES.....	viii

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL SISTEMA VISUAL DE LA RATA ADULTA.....	1
1.1.1. EL GLOBO OCULAR.....	1
1.1.2. LA RETINA.....	1
1.1.3. LOS TERRITORIOS DE PROYECCIÓN DE LAS CGR DE RATA	5
1.2. EFECTOS DE LA LESIÓN DEL NERVIO ÓPTICO SOBRE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	7
1.2.1. RESPUESTA DE LAS NEURONAS CENTRALES A LA LESIÓN AXONAL.....	7
1.2.2. RESPUESTA DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA A LA SECCIÓN DEL NERVIO ÓPTICO.....	8
1.2.2.1. Factores que median las diferentes respuestas de las CGR tras la sección del nervio óptico.....	9
1.2.2.2. Mecanismos de muerte de las células ganglionares de la retina tras la sección del nervio óptico.....	10
1.2.2.3. Estrategias para aumentar la supervivencia de las CGR tras la sección del nervio.....	10
1.3. FACTORES TRÓFICOS.....	12
1.3.1. NEUROTROFINAS.....	12
1.3.1.1. Breve revisión histórica.....	12
1.3.1.2. Características de las Neurotrofinas.....	13
1.3.1.3. Receptores para Neurotrofinas.....	13
1.3.1.4. Funciones de las Neurotrofinas en el sistema nervioso.....	17
1.3.1.5. Neurotrofinas en el sistema visual: localización y efectos..	21
1.3.1.6. Funciones de las Neurotrofinas en el sistema visual.....	23
1.3.1.7. Interacciones entre las Neurotrofinas y las células de microglía.....	29
1.3.2. OTROS FACTORES TRÓFICOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS..	31
1.3.2.1. Proinsulina humana.....	31
1.3.2.2. Factor de crecimiento similar a la insulina-1.....	32
1.4. LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA.....	35
1.4.1. INTRODUCCIÓN.....	35
1.4.2. ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA.....	39
1.4.3. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA EN EL TEJIDO NERVIOSO.....	39
1.4.3.1. Papel de las células de microglía en el desarrollo y homeostasis del SNC.....	40

1.4.3.2. Papel de las células de microglía en las lesiones y enfermedades del tejido nervioso.....	41
1.4.3.3. Células de microglía y citotoxicidad.....	44
1.4.3.4. Células de microglía y neuroprotección.....	46
1.4.4. LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA DE LA RETINA.....	49
1.4.4.1. Células de microglía de la retina adulta.....	49
1.4.4.2. Respuesta de las células de microglía de la retina adulta a la lesión.....	51
1.4.4.3. Implicación de las células de microglía en enfermedades degenerativas de la retina.....	54
1.5. EL FACTOR INHIBIDOR DE MACRÓFAGOS.....	55
1.6. APOPTOSIS.....	56
1.6.1. INTRODUCCIÓN.....	56
1.6.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE APOPTOSIS.....	57
1.6.2.1. Mecanismos extrínsecos que desencadenan el proceso...	59
1.6.3. MECANISMOS CELULARES DEL PROCESO.....	61
1.6.3.1. Mecanismos genéticos de regulación de la apoptosis.....	63
1.6.3.2. Familia de cisteína-proteasas (caspasas).....	76
1.6.4. LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	79
1.6.4.1. Implicación de las caspasas en la muerte por apoptosis de las CGR.....	80
2. OBJETIVOS.....	81
2.1. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	81
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
3.1. INTRODUCCIÓN.....	83
3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA.....	84
3.3. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	85
3.3.1. GRUPO I: SECCIÓN DEL NERVIO ÓPTICO Y TÉCNICA DE LA NDPASA.....	85
3.3.1.1. Subgrupo I.1: Grupo control.....	85
3.3.1.2. Subgrupo I.2: Sección del nervio óptico.....	85
3.3.1.3. Subgrupo I.3: Sección del nervio óptico e inyección intravítrea de diversos factores.....	85
3.3.2. GRUPO II: MARCAJE DE CGR CON FLUOROGOLD Y SECCIÓN DEL NERVIO ÓPTICO.....	87
3.3.2.1. Subgrupo II.1: Sección del nervio óptico.....	87
3.3.2.2. Subgrupo II.2: Sección del nervio óptico e inyección de factores.....	88
3.4. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS.....	91
3.4.1. MARCAJE DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA CON EL TRAZADOR NEURONAL FLUORESCENTE FLUOROGOLD.....	91

3.4.2. SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO.....	92
3.4.3. INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE FACTORES.....	93
3.4.4. INYECCIÓN SUBCUTÁNEA DE FACTORES.....	94
3.5. PROCESADO DE ANIMALES.....	95
3.5.1. REACCIÓN ENZIMO-HISTOQUÍMICA DE LA NDPASA.....	95
3.6. DETERMINACIÓN DE DENSIDADES CELULARES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	95
3.6.1. GRUPO I: RETINAS PROCESADAS POR LA TÉCNICA ENZIMO-HISTOQUÍMICA DE LA NDPASA.....	96
3.6.2. GRUPO II: RETINAS MARCADAS CON FLUOROGOLD.....	97
3.6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	98
4. RESULTADOS.....	100
4.1. RESULTADOS CUANTITATIVOS.....	100
4.1.1. RESULTADOS GRUPO I: Retinas procesadas por la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa.....	100
4.1.1.1. Subgrupo I.1: Grupo control.....	100
4.1.1.2. Subgrupo I.2: Sección del nervio óptico.....	103
4.1.1.3. Subgrupo I.3: Sección del nervio óptico e inyección de diversos factores.....	105
4.1.2. RESULTADOS GRUPO II: Retinas marcadas con fluorogold.....	115
4.1.2.1. Resultados del estudio de las CGR marcadas con fluorogold.....	116
4.1.2.2. Resultados del estudio de las células de microglía marcadas con fluorogold.....	126
4.2. RESULTADOS CUALITATIVOS.....	138
4.2.1. OBSERVACIONES CUALITATIVAS EN EL GRUPO I: Retinas procesadas por la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa.....	138
4.2.1.1. Observaciones cualitativas en el subgrupo I.1.....	139
4.2.1.2. Observaciones cualitativas en el subgrupo I.2.....	143
4.2.1.3. Observaciones cualitativas en el subgrupo I.3.....	147
4.2.2. OBSERVACIONES CUALITATIVAS EN EL GRUPO II: Retinas marcadas con fluorogold.....	149
4.2.2.1. Observaciones cualitativas en el subgrupo II.1.....	149
4.2.2.2. Observaciones cualitativas en el subgrupo II.2.....	152
5. DISCUSIÓN.....	159
5.1. CÉLULAS DE MICROGLÍA MARCADAS CON NDPASA.....	160
5.1.1. CÉLULAS DE MICROGLÍA MARCADAS CON NDPASA EN LA RETINA DE LOS ANIMALES CONTROLES.....	161
5.1.2. CÉLULAS DE MICROGLÍA NDPASA+ DESPUÉS DE LA SECCIÓN DEL NO.....	162
5.1.3. CÉLULAS DE MICROGLÍA NDPASA+ TRAS LA SECCIÓN DEL NO E INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE DIFERENTES SUSTANCIAS.....	165

5.1.3.1. Células de microglía NDPasa+ en las retinas derechas o controles.....	165
5.1.3.2. Células de microglía NDPasa+ en las retinas experimentales de los animales con sección del NO e inyecciones intravítreas.....	165
5.2. RETINAS DE LOS ANIMALES MARCADOS CON FLUOROGOLD.....	170
5.2.1. RETINAS CONTROLES.....	170
5.2.2. RETINAS DE LOS ANIMALES CON SECCIÓN DEL NO IZQUIERDO.....	170
5.2.2.1. Células ganglionares en las retinas de los animales con sección del NO.....	171
5.2.2.2. Células de microglía fagocítica en las retinas de los animales con sección del NO.....	171
5.2.3. RETINAS DE LOS ANIMALES CON SECCIÓN DEL NO IZQUIERDO E INYECCIONES INTRAVÍTREAS O SUBCUTÁNEAS.....	174
5.2.3.1. Retinas de los animales tratados con BDNF.....	175
5.2.3.2. Retinas de los animales tratados con NGF.....	177
5.2.3.3. Retinas de los animales tratados con MIF.....	179
5.2.3.4. Retinas de los animales tratados con pro-insulina humana.....	183
5.2.3.5. Retinas de los animales tratados con factor de crecimiento similar a Insulina-I.....	185
5.2.3.6. Retinas de los animales tratados con IGF-I+NT3 y PIH+NT3.....	187
5.2.3.7. Retinas de los animales tratados con los péptidos Bcl-x... ..	189
5.2.3.8. Retinas de los animales tratados con el péptido Bcl-2.....	191
5.2.3.9. Retinas de los animales tratados con el inhibidor irreversible de la caspasa 3 (Z-DEVD-cmk).....	193
6. CONCLUSIONES.....	196
7. BIBLIOGRAFÍA.....	199

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín-monofosfato cíclico
Apaf	Del inglés, Apoptotic protease activator factor, factor activador de la proteasa apoptótica
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATPasa	Enzima Adenosín-trifosfatasa
BDNF	Del inglés, Brain Derived Neurotrophic Factor, factor de crecimiento derivado del cerebro
bFGF	Del inglés, basic-Fibroblast Growth Factor, Factor básico de crecimiento de los fibroblastos
Ca ²⁺	Ión Calcio
CCG	Capa de células ganglionares
CFN	Capa de fibras nerviosas
CGR	Células ganglionares de la retina
ChAT	Del inglés, Cholin-Acetil Transferase, acetil colina transferasa
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
DMSO	Dimetil sulfóxido
FasL	Ligando Fas
FG	Fluorogold (trazador neuronal fluorescente)
HDNF	Del inglés, Hippocampal-Derived Neurotrophic Factor, Factor de crecimiento derivado del hipocampo
i.v.	Intra-vítrea
ICE	Del inglés, Interleukin-1 Converting Enzyme, enzima convertidor de la interleucina-1
IFN γ	Interferon gamma
IGFBPs	Del inglés, Insulin-like Growth Gactor Binding Protein, proteínas ligadoras del factor de crecimiento similar a la insulina
IGF-I	Del inglés, Insulin-like Growth Factor-I, factor de crecimiento similar a insulina-I
IGF-IR	Del inglés, Insulin-like Growth Factor-I Receptor, Receptor del factor de crecimiento similar a insulina-I

KDa	Kilo Dalton, unidad de masa
M	Molar
MIF	Del inglés, Macrophage Inhibitor Factor, Factor inhibidor de macrófagos
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
NDPasa	Enzima Nucleótido-difosfatasa
NGF	Del inglés, Nerve Growth Factor; factor de crecimiento nervioso
NO	Nervio óptico
NT3	Neurotrofina 3
NT4	Neurotrofina 4
NT6	Neurotrofina 6
p75	Receptor de baja afinidad para las neurotrofinas
PBS	Del inglés, Phosphate Buffer Saline, Tampón fosfato salino
PIH	Pro-insulina humana
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TNF	Del inglés, Tumor Necrosis Factor, Factor de necrosis tumoral
TNFR	Del inglés, Tumor Necrosis Factor Receptor, Receptor del factor de necrosis tumoral
TP	Tampón fosfato
TrKA	Receptor de alta afinidad A para las neurotrofinas
TrKB	Receptor de alta afinidad B para las neurotrofinas
TrKC	Receptor de alta afinidad C para las neurotrofinas
X	Aumentos de un instrumento óptico
Z-DEVD-cmk	Inhibidor irreversible de la caspasa 3

HALLAZGOS ORIGINALES

El desarrollo de este trabajo nos ha permitido documentar una serie de hallazgos originales relativos a las células de microglía de la retina de la rata adulta normal y después de la sección del nervio óptico, así como de los efectos de diversas sustancias sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina tras la sección del nervio óptico y sobre las densidades de células de microglía que fagocitan los desechos de las células ganglionares de la retina que mueren tras la lesión.

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS:

1. Este estudio es el primero que cuantifica las densidades de células de microglía NDPasa+ de la retina de la rata adulta en la CCG y CPI.
2. Este estudio documenta que la densidad de células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI de la retina de la rata adulta es un rasgo característico de cada animal.
3. Este estudio documenta que la población de células de microglía NDPasa+ de la retina control o derecha no sufre cambios cuando se secciona el nervio óptico de la retina experimental o izquierda y que, sin embargo, su densidad aumenta cuando se lleva a cabo una punción del globo ocular izquierdo.
4. Este es el primer estudio que documenta los cambios sufridos por las células de microglía NDPasa+ de la CFN, CCG y CPI de la retina de la rata adulta tras la sección del NO. Así, este estudio documenta que:
 - 4.1 Se produce un incremento en el marcaje y la densidad de las células de microglía NDPasa+ de la CFN y de la CCG y CPI a partir de los 7 días de la lesión, que ha sido el primer periodo de supervivencia investigado en este estudio.
 - 4.2 Estos incrementos comienzan a disminuir a partir de los 22 días de la lesión en la CFN, mientras que en la CCG y CPI se mantienen hasta los 40 días, que ha sido el último periodo de supervivencia investigado en este estudio.

- 4.3 El aumento en la densidad de células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI no altera el mantenimiento de los territorios de proyección de estas células, de forma que siguen sin producirse solapamientos ni entre procesos de células de una misma capa ni entre procesos de células situadas en ambas capas.
5. Este es el primer estudio que documenta que la administración intravítrea de las neurotrofinas BDNF o NT3 o del factor inhibidor de macrófagos (MIF), modifican la respuesta de las células de microglía NDPasa+ entre 7 y 30 días después de la sección del nervio óptico. Así, este estudio documenta que:
- 5.1 La administración intravítrea de BDNF disminuye la activación de las células de microglía bipolar NDPasa+ de la CFN a los 7 días de la sección del NO.
- 5.2 La administración intravítrea de NT3 disminuye la activación de las células de microglía bipolar NDPasa+ de la CFN a los 7 y 14 días de la sección del NO.
- 5.3 La administración intravítrea de NT3 aumenta las densidades de células de microglía NDPasa+ en la CCG y CPI de las retinas experimentales a los 7 días de la sección del nervio óptico, de forma que las densidades de células en ambas capas eran mayores a los 7 días en las retinas tratadas con NT3 que en las retinas con sección simple del nervio óptico.
- 5.4 La administración intravítrea de MIF induce una disminución en la respuesta de las células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI que se traduce en un descenso significativo de la densidad de las células NDPasa+ en las citadas capas a los 7 días de la sección del NO.
6. Este es el primer estudio que documenta que la sección del NO en la rata adulta induce la aparición de células de microglía fagocítica en la retina contralateral, lo que sugiere que existen CGR que proyectan en la retina contralateral y envían también proyecciones colaterales al colículo superior.

7. Este estudio documenta que la sección del NO induce en la retina lesionada la aparición de células de microglía fagocítica, y que las densidades de estas células aumentan entre 7 y 14 días después de la sección del nervio óptico, que es el periodo estudiado, siendo la densidad menor a los 7 que a los 14 días de la lesión. También documenta que existe una correlación significativa entre las densidades de células de microglía fagocítica y los porcentajes de muerte de CGR a los 7 días de la sección del NO, pero no a los 14 días de la lesión.
8. Este estudio documenta que la administración de diversas sustancias aumenta la supervivencia de las CGR tras la sección del NO, y que modifica las densidades de células de microglía fagocítica en estas mismas retinas.
 - 8.1 La administración de BDNF rescata la totalidad de la población de CGR a los 7 días de la sección del NO, y por tanto, impide casi totalmente la aparición de células de microglía fagocítica en estas retinas. Si consideramos que el BDNF no impedía la activación de las células de microglía NDPasa+ de la CFN, CCG y CPI a los 7 días de la sección del NO, nuestros resultados documentan por primera vez que la activación de las células de microglía NDPasa+ de la retina de la rata adulta producida como consecuencia de la lesión retiniana no induce la transformación de estas células de microglía en fagocíticas, mientras que esta lesión no provoque la muerte de las CGR.
 - 8.2 Este es el primer estudio que documenta que la administración de PIH muestra efectos neuroprotectores sobre las CGR cuando se administra intravítrea o subcutáneamente después de la sección del NO, siendo este efecto mucho mayor a los 7 que a los 14 días de la lesión.
 - 8.3 La administración intravítrea de NGF muestra un efecto neuroprotector sobre las CGR a los 14 días de la sección del NO pero no a los 7 días.
 - 8.4 La administración de diversas sustancias intravítrea o subcutáneamente no modifica la relación entre las densidades de células de microglía fagocítica y los porcentajes de muerte de las CGR, ni a los 7 ni a los 14 días de la sección del NO.

8.5 La administración de NGF induce un aumento en las densidades de células de microglía fagocítica a los 7 y 14 días de la sección del NO que no está relacionado con la supervivencia de las CGR en estas retinas, sobre todo a los 14 días de la sección del NO. Estos resultados documentan que el incremento de la densidad de células de microglía fagocítica inducido por el NGF en estas retinas no disminuye la supervivencia de las CGR.

8.6 La administración de Z-DEVD-cmk induce una disminución en las densidades de células de microglía fagocítica a los 7 días de la sección del NO.

CONTRIBUCIONES TÉCNICAS:

1. Este es el primer estudio que ha puesto a punto la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa para caracterizar y cuantificar las células de microglía en montajes globales de retina de rata adulta. Para ello hemos introducido modificaciones personales a la técnica enzimo-histoquímica desarrollada por Novikoff y Goldfischer (1961), y modificada por Murabe y Sano (1982), conducentes a potenciar la penetración de la reacción en todas las capas de la retina. El procesamiento de las retinas por medio de esta técnica nos ha permitido conocer: la distribución de las células de microglía NDPasa+ en la retina de la rata adulta, las densidades de las mismas en CCG y CPI, los cambios cualitativos y cuantitativos sufridos por las células de microglía NDPasa+ tras la sección del nervio óptico y los efectos de la administración intravítrea de diversas sustancias en la respuesta de las células de microglía NDPasa+ a la sección del nervio óptico.
2. Este es el primer estudio que ha utilizado el fluorogold como marcador de las células de microglía fagocítica de la retina de la rata adulta tras la sección del NO. Para ello se aplicaba dicho trazador neuronal en ambos colículos superiores y tras seccionar el nervio óptico, se producía el marcaje de las células de microglía fagocítica porque estas englobaban el trazador de las células ganglionares de la retina muertas. Este marcaje nos permitía observar el cuerpo celular y algunos procesos de las células de microglía, y mediante el mismo pudimos saber: la localización de las células de microglía marcadas con fluorogold en la retina de la rata adulta después de la sección del nervio

3. óptico, las densidades de células de microglía fagocítica a los 7 y 14 días de la sección del nervio óptico, que fueron los dos periodos de tiempo analizados y los efectos de la administración intravítrea o subcutánea de diversas sustancias en las densidades de las células de microglía fagocítica a los 7 o 14 días de la sección del nervio óptico.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

Este estudio se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, y parte de los resultados del mismo han sido divulgados en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

CAPÍTULOS DE LIBROS

Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., **Sobrado-Calvo, P.**, Sellés Navarro, I., Rodríguez, E., Mayor-Torroglosa, S. y Villegas-Pérez, M.P. (2001) "Muerte y neuroprotección de las células ganglionares de la retina tras diversos tipos de lesión" En prensa.

Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., **Sobrado-Calvo, P.**, Sellés-Navarro I. and M.P. Villegas-Pérez (2000) "Modèles in vivo d'évaluation de la neuroprotection des cellules ganglionnaires de la rétine". En: 7 symposium Recherche & Glaucome (Laboratoires Allergan France, Eds). Éditiones E.D.K 10, Villa d'Orleans, 75014 Paris (ISBN: 2-84254-033-6) Pp: 121-134.

Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., **Sobrado-Calvo, P.**, Sellés-Navarro, I., Rodríguez, E., Mayor-Torroglosa, S. and M.P. Villegas-Pérez (2001) "Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury". En "Strategies for studying Brain Disorders: neurodegenerative Brain Disorders". Pp: 521-536.

ARTÍCULOS

Lafuente M., Villegas-Pérez M.P., **Sobrado-Calvo P.**, García-Avilés A., Miralles de Imperial J. and M. Vidal-Sanz (2001) "Alpha-2 selective adrenergic agonist protect against ischemia-induced retinal ganglion cell death". Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. En prensa.

Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., **Sobrado-Calvo, P.**, Sellés-Navarro, I., Rodríguez, E., Mayor-Torroglosa, S. and M.P. Villegas-Pérez (2000) "Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury". Neurotoxicity Research. Vol.2. Pp 215-227.

RESÚMENES

Sobrado-Calvo, P., Villegas-Pérez, M.P., Mayor-Torroglosa, S., de la Rosa, E., de Pablo, F. and M. Vidal-Sanz (2000) "Retinal ganglion cell survival after optic nerve section: neuroprotective effects of several substances". (ARVO Abstract). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41(4):S15. Abstract nr 77.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Sobrado Calvo, P., Villegas Pérez, M.P. y M. Vidal Sanz, "El Factor Inhibidor de Macrófagos modifica la respuesta de la microglía de la retina tras la sección del nervio óptico". 73 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Granada, 1997.

Sobrado Calvo, P., Vidal Sanz, M. y M.P. Villegas Pérez "Estudio cualitativo y cuantitativo de la microglía de la retina de la rata adulta tras la sección del nervio óptico". Establecimiento y consolidación de la Red Glial Española. Barcelona, 1997.

Sobrado Calvo, P., Villegas Pérez, M.P., Miralles de Imperial, J. y M. Vidal Sanz "Efectos de la inyección intravítrea del factor inhibidor de macrófagos y diversas neurotrofinas en las densidades de células de microglía en la capa de células ganglionares tras la sección del nervio óptico". Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Alicante, 1998.

Villegas-Pérez, M.P., **Sobrado-Calvo, P.** and M. Vidal-Sanz "Microglia of the adult rat retina. Responses to axotomy". The Biomed-2 meeting. Murcia, 1998.

Sobrado-Calvo, P., De la Rosa, E.J., de Pablo, F., Villegas-Pérez, M.P.,; Miralles de Imperial, J. y M. Vidal-Sanz "Efectos de la administración intravítrea de Proinsulina, IGF-I, Proinsulina+NT3 y Bcl-2 en la supervivencia de las CGR". VIII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia. Murcia, 1999.

Sobrado-Calvo, P., Villegas-Pérez, M.P., Mayor-Torroglosa, S. y M. Vidal-Sanz "Caracterización de las células de microglía de la retina de rata mediante la técnica de la NDPasa y marcaje con fluorogold: respuesta a la sección del nervio óptico". Sixth International Meeting. American Academy of Optometry. Madrid, 2000.

A mi padre

A mi querida hija

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL SISTEMA VISUAL DE LA RATA ADULTA

1.1.1 EL GLOBO OCULAR

El órgano de la visión de la rata, el ojo, como en el resto de los mamíferos, se encarga de recibir el estímulo luminoso, transformarlo y conducirlo hasta centros superiores del cerebro, donde la información se procesa y se produce la percepción visual. Esencialmente, el globo ocular de la rata es similar al del resto de los mamíferos, aunque presenta ciertas peculiaridades. Está constituido por tres capas: la túnica externa, la capa intermedia o úvea y la más interna o retina.

La túnica externa en su parte anterior es transparente y está formada por la córnea, que en la rata es muy grande en relación al tamaño total del globo ocular, mientras que en su parte posterior está formada por la esclera, que es opaca y se recubre de la conjuntiva.

La úvea está formada en su parte más externa por la coroides, que se encarga de la nutrición del tercio más externo de la retina, y en su parte más anterior por el cuerpo ciliar, que contiene el músculo ciliar, que en la rata es muy fino (Janes y Bounds, 1955) y el iris. El cuerpo ciliar se une al cristalino por medio del ligamento suspensor del cristalino, que en la rata está muy desarrollado (Janes y Bounds, 1955). Este cristalino en la rata es casi esférico y de gran tamaño. El iris, la estructura más anterior de la úvea, en la rata es muy delgado y cubre prácticamente toda la cara anterior del cristalino. En las ratas albinas Sprague-Dawley utilizadas en esta tesis, el iris no está pigmentado y se pueden observar por transiluminación los vasos del iris. La pupila en la rata tiene un diámetro pequeño, aunque varía según la iluminación ambiental y se contrae como consecuencia de la iluminación directa (reflejo fotomotor directo) o por iluminación del otro ojo (reflejo fotomotor consensual).

La retina es la capa más interna del ojo y por tanto, la más próxima al vítreo. En ella comienza el procesamiento del estímulo visual. Dada la importancia de la retina para este estudio, pasaremos a desarrollarla en el siguiente apartado.

1.1.2 LA RETINA

La retina de la rata, como en el resto de los mamíferos, es la capa sensible

OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL SISTEMA VISUAL DE LA RATA ADULTA

1.1.1 EL GLOBO OCULAR

El órgano de la visión de la rata, el ojo, como en el resto de los mamíferos, se encarga de recibir el estímulo luminoso, transformarlo y conducirlo hasta centros superiores del cerebro, donde la información se procesa y se produce la percepción visual. Esencialmente, el globo ocular de la rata es similar al del resto de los mamíferos, aunque presenta ciertas peculiaridades. Está constituido por tres capas: la túnica externa, la capa intermedia o úvea y la más interna o retina.

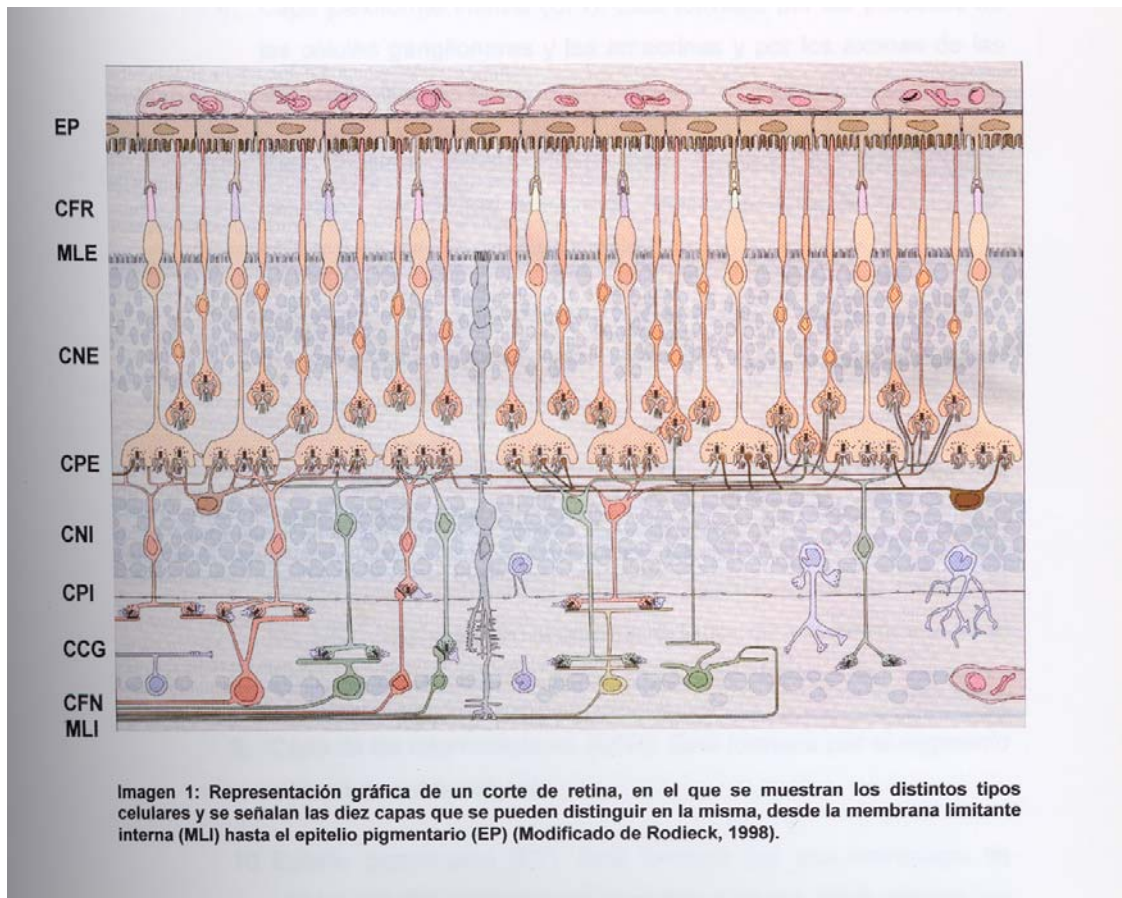
La túnica externa en su parte anterior es transparente y está formada por la córnea, que en la rata es muy grande en relación al tamaño total del globo ocular, mientras que en su parte posterior está formada la esclera, que es opaca y se recubre de la conjuntiva.

La úvea está formada en su parte más externa por la coroides, que se encarga de la nutrición del tercio más externo de la retina, y en su parte más anterior por el cuerpo ciliar, que contiene el músculo ciliar, que en la rata es muy fino (Janes y Bounds, 1955) y el iris. El cuerpo ciliar se une al cristalino por medio del ligamento suspensor del cristalino, que en la rata está muy desarrollado (Janes y Bounds, 1955). Este cristalino en la rata es casi esférico y de gran tamaño. El iris, la estructura más anterior de la úvea, en la rata es muy delgado y cubre prácticamente toda la cara anterior del cristalino. En las ratas albinas Sprague-Dawley utilizadas en esta tesis, el iris no está pigmentado y se pueden observar por transiluminación los vasos del iris. La pupila en la rata tiene un diámetro pequeño, aunque varía según la iluminación ambiental y se contrae como consecuencia de la iluminación directa (reflejo fotomotor directo) o por iluminación del otro ojo (reflejo fotomotor consensual).

La retina es la capa más interna del ojo y por tanto, la más próxima al vítreo. En ella comienza el procesamiento del estímulo visual. Dada la importancia de la retina para este estudio, pasaremos a desarrollarla en el siguiente apartado.

1.1.2 LA RETINA

La retina de la rata, como en el resto de los mamíferos, es la capa sensible



del ojo y se considera una prolongación sensorial del SNC dentro del globo ocular. Está formada por diversos tipos de neuronas y células no neuronales, que se distribuyen a lo largo de 10 capas, que ordenadas desde la superficie más interna, es decir, aquella en contacto con el vítreo, hasta la más externa o escleral, son las siguientes:

1. Membrana limitante interna: es la capa que contacta con el vítreo y está formada por los procesos internos de las células de Müller.
2. Capa de fibras nerviosas (CFN): Está formada por los axones de las células ganglionares de la retina (CGR) en su trayecto hasta llegar al disco óptico.
3. Capa de células ganglionares (CCG): Está constituida por las CGR y las células amacrinas desplazadas.

4. Capa plexiforme interna (CPI): Está formada por los procesos de las células ganglionares y las amacrinas y por los axones de las células bipolares.
5. Capa nuclear interna (CNI): Está formada por los cuerpos celulares de células amacrinas, bipolares, interplexiformes, de Müller y de las células horizontales.
6. Capa plexiforme externa (CPE): Está formada por los pies de los fotorreceptores y los procesos de las células bipolares, horizontales e interplexiformes.
7. Capa nuclear externa (CNE): Está formada por los cuerpos celulares de los fotorreceptores.
8. Membrana limitante externa (MLE): Separa el cuerpo celular de los fotorreceptores del segmento externo de los mismos y es el límite externo de los pies de las células de Müller.
9. Capa de los fotorreceptores: Está formada por el segmento externo de estas células.
10. Epitelio pigmentario (EP): Está formado por una monocapa de células del EP, limita con la coroides y en las ratas albinas, ya que este epitelio no contiene gránulos de melanina, permite ver a su través la circulación coroidea.

La percepción visual comienza cuando el estímulo luminoso que llega a la retina es recibido por los segmentos externos de los fotorreceptores, que están situados en la segunda capa más externa de la retina. Los fotorreceptores transmiten la señal luminosa a través de otras células retinianas a las CGR, las cuales, a través de sus axones, que forman el nervio óptico (NO), van a llevar el estímulo hasta los centros nerviosos superiores. Los principales territorios de proyección cerebrales de las CGR en la rata son el colículo superior (CS) y el núcleo geniculado dorsolateral (nGDL) (Linden y Perry, 1983; Dreher y cols., 1984 y 1985; Martin, 1986).

Para nuestro estudio es de relevancia el conocimiento de las CGR de la rata y de sus proyecciones en el cerebro, por lo que pasamos a describirlos a continuación.

1.1.2.1 Las células ganglionares de la retina de la rata adulta

Las CGR son neuronas cuyos cuerpos celulares se localizan en la CCG y sus axones forman el NO. En la retina de la rata existe una zona central con mayor densidad de CGR denominada *area centralis* (Sefton y Dreher, 1985). De hecho, se ha documentado que la distribución de los somas de las CGR en la retina de la rata sigue un gradiente de densidad, de forma que la zona de retina englobada en un área de 3 mm alrededor del disco óptico posee una densidad media de CGR alrededor de 2500 células/mm² (Perry, 1981; Vidal-Sanz y cols., 1988; Peinado-Ramón y cols., 1996), mientras que en la periferia la densidad desciende hasta 1600 células/mm² (Perry, 1981). La retina de la rata adulta posee en total entre 109.000 y 115.000 CGR (Fukuda, 1977; Perry, 1981; Perry y Linden, 1982; Potts y cols., 1982; Perry y cols., 1983; Dreher y cols., 1984).

Atendiendo al tamaño y extensión de sus campos dendríticos, en la retina de la rata adulta se distinguen tres tipos de CGR:

- 1) Las CGR grandes constituyen el 1% de la población total de estas células, y se caracterizan por tener un soma grande, árboles dendríticos extensos, y axones gruesos (Fukuda, 1977; células tipo I-Perry, 1979; Dreher y cols., 1984, 1985).
- 2) Las CGR medianas representan el 28% del total de la población de CGR y se caracterizan por tener somas y campos dendríticos de tamaño medio (Fukuda, 1977; células tipo II-Perry, 1979; tipo IIa de Ni y Dreher, 1981) y por encontrarse cercanas al disco óptico. Ni y Dreher (1981) describieron un segundo subtipo de estas células medianas, las células IIb, que poseen somas pequeños o medianos, axones finos y campos dendríticos pequeños.
- 3) Las CGR pequeñas representan el 67% del total de esta población y se caracterizan por tener cuerpos celulares medianos y pequeños y campos dendríticos extensos (Fukuda, 1977; células tipo III-Perry, 1979; tipo IIIa-Ni y Dreher, 1981), y se distribuyen a lo largo de toda la retina. Ni y Dreher (1981) nombraron como células tipo IIIb a las células pequeñas que tienen somas y axones de tamaño medio y campos dendríticos extensos.

1.1.3 LOS TERRITORIOS DE PROYECCIÓN DE LAS CGR DE LA RATA ADULTA

Los axones de las CGR convergen en el disco óptico y forman, a su salida del globo ocular, el NO. En la rata albina el NO contiene más de 100.000 axones (Fukuda y cols., 1982; Lam y cols., 1982; Sefton y Lam, 1984), en concordancia con las densidades de CGR. La posición relativa de los axones que provienen de los cuatro cuadrantes retinianos se mantiene dentro del NO (Yamadori, 1981).

Los NOs de los dos ojos confluyen en el quiasma óptico, donde se produce la decusación de aproximadamente el 98% de los axones que forman el NO (Lund, 1965; Dreher y cols., 1985), de forma que a partir del quiasma la mayor parte de las fibras procedentes de cada ojo discurrirán por el tracto óptico contralateral. Por tanto, en la rata la mayor parte de la información visual recibida por un ojo va a ser procesada por el hemisferio cerebral contralateral. Menos del 2 ó 3% de las CGR de la rata albina proyectan ipsilateralmente (Lund, 1965; Dreher y cols., 1985; rev. Sefton y Dreher, 1985). Las fibras que proyectan ipsilateralmente proceden fundamentalmente de la zona infero-temporal de la retina (Jeffery y cols., 1981; Dreher y cols., 1985; Moriya y Yamador, 1993), y el 1% de éstas envían proyecciones colaterales al tracto óptico contralateral (Jeffery y cols., 1981).

La información procedente de las CGR de rata y conducida a través de los tractos ópticos, proyecta fundamentalmente en dos núcleos cerebrales: el CS y el nGDL (Linden y Perry, 1983; Dreher y cols., 1984; Martin, 1986). Aproximadamente un 95% de las CGR de la rata proyectan al CS (Linden y Perry, 1983; Dreher y cols., 1984, 1985), mientras que alrededor del 35% lo hacen también en nGDL (Dreher y cols., 1985; Martin, 1986). Por ello se piensa que algunos axones de las CGR se dividen para proyectar al CS y al nGDL. Se ha documentado que las CGR cuyos axones no decusan en el quiasma óptico proyectan fundamentalmente al nGDL (Moriya y Yamador, 1993).

La mayor parte de las neuronas del nGDL proyectan en las áreas 17, 18a y 18b de la corteza cerebral homolateral a través de las radiaciones ópticas.

No todas las CGR de la rata adulta tienen proyecciones en el cerebro. Así, existe un escaso número de CGR de rata cuyos axones no salen de la retina, y que se denominan células ganglionares de asociación (Dräger y cols., 1984). Por otra parte, un 1% de las CGR de la rata adulta establecen conexiones retino-retinianas, es decir, su territorio de proyección es la retina contralateral (Müller y Hollander, 1988). No se ha podido documentar en la rata que estas CGR que proyectan sus axones a

la retina contralateral envíen proyecciones colaterales a CS (Müller y Hollander, 1988).

En la rata adulta se ha documentado que existen diferencias en las proyecciones de las CGR a CS y nGDL entre los distintos tipos de CGR (rev. Sefton y Dreher, 1985). Así, las células grandes, es decir, las células de tipo I, transmiten la información recibida por los bastones hasta el CS y nGDL (Fukuda, 1977). Las células tipo II (Perry, 1979) o IIa (Ni y Dreher, 1981) envían la información a nGDL y/o a CS (Martin, 1986). Sin embargo, las células de tipo IIb (Ni y Dreher, 1981; Martin, 1986) proyectan al CS. Las células tipo IIIa (Ni y Dreher, 1981), transmiten la información que procede de los conos fundamentalmente hasta el CS aunque también proyectan a nGDL (Cleland y Levick, 1974). Por último, las células tipo IIIb (Ni y Dreher, 1981), transportan la información hasta el CS y nGDL (Martin, 1986).

1.2 EFECTOS DE LA LESIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO SOBRE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

1.2.1 RESPUESTA DE LAS NEURONAS CENTRALES A LA LESIÓN AXONAL

La interrupción del axón de una neurona induce por una parte, la degeneración anterógrada del axón separado del cuerpo neuronal, conocida como *degeneración Walleriana* (rev. Lieberman, 1971), y por otra, la aparición de una serie de cambios histológicos y metabólicos en el segmento del axón unido al soma neuronal y en el mismo soma neuronal, que en ocasiones acaban por producir la degeneración y muerte de la neurona. A este último proceso se la ha denominado *degeneración retrógrada o reacción axonal*. La diferencia entre la lesión neuronal en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso periférico (SNP) es que, tras una secuencia de cambios neuronales común en los dos sistemas (Barron, 1989), las neuronas centrales, salvo excepciones (Barron, 1983a y b), terminan por degenerar y morir, mientras que las neuronas del SNP son capaces en su mayoría de sobrevivir a la lesión, regenerar y restablecer su conectividad y sus funciones normales (rev. Lieberman, 1971; Barron, 1989).

Una de las hipótesis que se barajan como posible causa de la degeneración del soma neuronal tras la rotura de conexión entre soma y axón, es la pérdida de aporte trófico que los territorios diana o territorios de proyección de su axón realizan sobre la neurona antes de ser lesionada (Hendry, 1975a; Bray y cols., 1992). Esta hipótesis se ve apoyada por diferentes estudios en los que se ha documentado el aumento en la supervivencia de neuronas centrales lesionadas tras la administración de diversos factores neurotróficos (Hendry, 1975b; Yip y cols., 1984; Williams y cols., 1986; Otto y cols., 1987; Mey y Thanos, 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; DiPolo y cols., 1998; rev. Levin, 1999). La importancia de los factores neurotróficos en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso, y su papel en la supervivencia y regeneración axonal tras la lesión, serán expuestos en el apartado 1.3 de esta Introducción.

Las alteraciones del soma neuronal que tienen lugar como consecuencia de la degeneración retrógrada de las neuronas tras la axotomía, y que conducen a la muerte de las neuronas del SNC, se han identificado a través de diversos cambios histológicos, como son la translocación del núcleo, que se desplaza a posiciones excéntricas, el aumento del tamaño del soma, la existencia de cambios cromatolíticos citoplasmáticos y, finalmente, la muerte de las células (rev. Lieberman, 1971; Barron,

1989). Estos cambios histológicos, junto con los observados ultraestructuralmente (rev. Lieberman, 1971), son en algunos casos compatibles con los descritos en células que mueren por apoptosis (rev. Wyllie, 1981; rev. Wyllie y cols., 1981). En concreto, se ha documentado que la muerte de las CGR tras la sección de su axón ocurre, al menos en parte, por apoptosis (Berkelaar y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994; Quigley y cols., 1995). Las características de este proceso serán descritas en el apartado 1.5 de este capítulo.

1.2.2 RESPUESTA DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA A LA SECCIÓN DEL NERVIO ÓPTICO

Para cuantificar el número de CGR que sobreviven tras la sección del NO en animales de experimentación se han empleado técnicas de marcaje retrógrado de estas células con trazadores neuronales fluorescentes, que permiten distinguir las CGR de las células amacrinas desplazadas. Estos trazadores pueden aplicarse, bien en el muñón del NO tras la sección (Vidal-Sanz y cols., 1988), o bien en el CS, que como hemos visto es el principal territorio de proyección de las CGR en la rata adulta.

La sección del NO en mamíferos induce en pocos días la degeneración y muerte de parte de la población de CGR, y las células no mueren inmediatamente tras la lesión sino que siguen muriendo durante meses después de la lesión (Madison y cols., 1984; Barron y cols., 1986; Thanos, 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993). El estudio de los patrones de muerte de las CGR tras la sección del NO a su salida del globo ocular en la rata adulta ha permitido conocer que dicha lesión induce una fase de muerte rápida durante las dos semanas siguientes a la sección del NO, en la que se pierde el 80% de la población de las CGR, y posteriormente una fase de muerte más lenta que afecta a las neuronas que sobrevivieron en la primera fase. Esta fase de muerte parece detenerse a los 6 meses ya que un 5% de CGR sobreviven entre 6 y 20 meses después de la lesión (Mey y Thanos, 1993; Villegas-Pérez y cols., 1993).

Aunque la sección del NO induce siempre la degeneración retrógrada de una parte de las CGR, se ha documentado que en la rata adulta los porcentajes de muerte neuronal tras la lesión del NO varían, para los mismos periodos de supervivencia, dependiendo de la distancia a la que se seccione el NO con respecto al globo ocular (Domenici y cols., 1991b; Villegas-Pérez y cols., 1988; rev. Vidal-Sanz, 1990). Así, la sección a 0,5 mm del ojo induce mayor porcentaje de muerte que la sección a 3 mm del ojo, cuando se comparan periodos de supervivencia iguales (Villegas-Pérez y cols., 1993).

En la rata adulta, el 5% de CGR sobreviven a las dos fases de muerte que se observan después de la sección del NO a 0,5 mm del ojo. El que un 5% de la población de CGR sobrevivan entre 6 y 20 meses después de esta lesión ha llevado a algunos autores a postular que puede tratarse de una población de CGR con requerimientos tróficos diferentes a las demás, o que sobreviven por el aporte trófico proveniente de la propia retina (Giestal de Araujo y Linden, 1993; Gao y cols., 1997; rev. So y Yip, 1998)

En la actualidad se postula que el daño retiniano inducido por lesión del NO de un ojo produce cambios relacionados con la muerte en la retina contralateral. A este respecto, Bodeutsch y cols. (1999) han documentado que el aplastamiento del NO de la rata adulta induce en la retina contralateral la expresión del factor de transcripción c-jun por parte de las CGR, así como la aparición de un moderado anabolismo y la expresión por parte de las células de microglía de la retina del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y del receptor del complemento tipo 3 (RC3), lo que generalmente se observa cuando las células de microglía se activan (ver apartado 1.4 de esta Introducción). Una de las hipótesis que se barajan para explicar los cambios ocurridos en la retina contralateral, es la existencia de una pequeña proporción de CGR que proyectan sus axones en la retina contralateral (Müller y Hollander, 1988), y que ser verían afectadas por el aplastamiento del NO. También se postula que puede ser consecuencia de una lesión de la microvasculatura inducida por el aplastamiento del NO (Bodeutsch y cols., 1999). En la actualidad no se conoce si también existe respuesta de las CGR del ojo contralateral tras la sección del NO.

1.2.2.1 Factores que median las diferentes respuestas de las CGR tras la sección del nervio óptico

Se postula que existen diversas causas que determinan la aparición de las dos fases de muerte de las CGR de la rata adulta, así como las diferencias en la supervivencia de las CGR de rata tras la lesión según la distancia de la misma al globo ocular. Así, mientras que para la fase de muerte lenta se ha postulado que la causa fundamental puede ser la interrupción definitiva del aporte de factores tróficos provenientes de los territorios diana (Bray y cols., 1992), se ha postulado que la fase inicial rápida de muerte neuronal puede producirse porque la lesión neuronal induzca otras alteraciones que resulten letales para las neuronas, como son: el aumento del Ca^{2+} intracelular (Strautman y cols., 1990), la liberación excesiva al medio extracelular de amino ácidos excitotóxicos (Rothman y Oltny, 1987) o la liberación de citocinas

por parte de los macrófagos circundantes a la lesión (Berkelaar y cols., 1991).

1.2.2.2 Mecanismos de muerte de las células ganglionares de la retina tras la sección del nervio óptico

Se ha documentado que al menos una parte de las CGR que mueren tras la sección del NO en mamíferos adultos lo hacen por apoptosis (Berkelaar y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994; Rabacchi y cols., 1994; Quigley y cols., 1995; Porciatti y cols., 1996). A este respecto, Isenman y cols. (1997) han documentado que la lesión del NO en la rata adulta da lugar a la aparición de cuerpos apoptóticos en la CCG a partir del cuarto día tras la sección del NO, y que la densidad máxima de dichos cuerpos apoptóticos se alcanza a los 7 días de la lesión (Isenman y cols., 1997). La apoptosis de las CGR inducida por la sección del NO en la rata adulta está mediada por la vía de las caspasas (Chaudhary y cols., 1999; Kermer y cols., 1999a b) y por genes que intervienen en el proceso (Isenman y cols., 1997; rev. Nickels, 1999), y en retina de gato se ha documentado la implicación del glutamato en la muerte de las CGR tras la sección del NO (Russelakis-Carneiro, y cols., 1996). Además, se postula que podría deberse a la formación de especies de oxígeno reactivo como consecuencia de la lesión. Así, se ha documentado el aumento de expresión de la ceruloplasmina en la CCG de la retina tras el aplastamiento del NO (Levin y Geszvain, 1998; rev. Levin, 1999), proteína plasmática que inhibe la formación de especies de oxígeno reactivo, lo que se interpreta como un mecanismo de protección de las CGR tras la lesión del NO.

1.2.2.3 Estrategias para aumentar la supervivencia de las CGR tras la sección del nervio óptico

Todos los estudios realizados en animales de experimentación encaminados a impedir la muerte de las CGR tras la lesión del NO han conseguido aumentar la supervivencia de las CGR tan solo durante un periodo de tiempo limitado. En la actualidad se ensayan métodos para prolongar el rescate de CGR por encima de las dos semanas de la lesión, así como para promover la regeneración y recuperación funcional de las CGR. Las estrategias de trabajo desarrolladas a tal fin han sido, entre otras: la administración de factores neurotróficos que suplen la pérdida de aporte trófico desde los territorios de proyección; la realización de injertos de nervio periférico, en retina o muñón del NO, que tienen como misión crear las condiciones ambientales adecuadas para que los axones de las CGR regeneren y restablezcan sus conexiones; la inhibición de la actividad de los macrófagos que responden en el

lugar de la lesión, concretamente de las células de microglía, a fin de impedir los posibles efectos citotóxicos de las mismas sobre las CGR, tales como la producción de proteasas, óxido nítrico, etc.; por último, el empleo de inhibidores de caspasas que bloquean el mecanismo de muerte por apoptosis en estadios tempranos del proceso. Todos estos temas van a ser tratados en otros apartados de esta Introducción, por lo que no los revisaremos aquí.

1.3 FACTORES TRÓFICOS

1.3.1 NEUROTROFINAS

1.3.1.1 Breve revisión histórica

Las Neurotrofinas (NT) son macromoléculas originadas en el microambiente de las neuronas, que juegan un papel fundamental en la supervivencia y diferenciación de las neuronas del SNC y del SNP (rev. Ebadi y cols., 1997) y en la formación de las conexiones sinápticas durante el desarrollo del sistema nervioso (rev. Purves, 1988). De hecho, muchas neuronas dependen durante el desarrollo para su supervivencia del aporte neurotrófico procedente de sus territorios de inervación (Levi-Montalcini, 1987; Openheim, 1991a; Yip y Johnson, 1984; rev. Macaya, 1996). Además de estas funciones durante el desarrollo, las NTs intervienen también en la supervivencia de las neuronas y en el mantenimiento y plasticidad de las conexiones sinápticas del sistema nervioso adulto (rev. Purves, 1988; rev. Thoenen, 1991; Hefti y cols., 1989).

La primera NT que se aisló e identificó fue el Factor de Crecimiento Nervioso (Nerve Growth Factor, NGF; Levi-Montalcini y Hamburger, 1951; Cohen, 1960; rev. Angeletti y Bradshaw, 1971; rev. Levi Montalcini y Angeletti, 1968), a partir de glándula submaxilar de ratón, tejido en el que se encuentra en altas concentraciones. En el año 1968, Levi-Montalcini y Angeletti describieron las características químicas del NGF y los efectos biológicos de esta NT. Posteriormente, se han aislado otros factores neurotróficos de características bioquímicas y de efectos biológicos similares al NGF, que además comparten con este último aproximadamente el 50% de su secuencia de aminoácidos, y que por ello se han agrupado en la denominada “familia de las neurotrofinas” (rev. von Barthled, 1999). Forman parte de esta familia: el Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF; Barde y cols., 1982; Leibrock y cols., 1989); la Neurotrofina 3 (NT-3; Hohn y cols. 1990; Maisonpierre y cols., 1990a, Rosenthal y cols., 1990) o Factor Neurotrófico Derivado del Hipocampo (HDNF; Ernfors y cols., 1990a), la Neurotrofina 4/5 (NT-4/5; Hallböök y cols., 1991; Berkemeier y cols., 1991), la Neurotrofina 6 (NT-6; Götz y cols., 1994) y la Neurotrofina 7 del pez cebra (zNT-7; Nilsson y cols., 1998). Profundizaremos tan solo en el conocimiento del **NGF, BDNF y NT3**, por ser éstas las NTs empleadas en nuestro estudio.

1.3.1.2 Características de las Neurotrofinas

Todas las NTs tienen una estructura proteica muy similar. Así, en humanos las secuencias de aminoácidos del BDNF y de la NT3 son idénticas en un 50% a la del NGF. Además, dicha estructura proteica se ha conservado a lo largo de la evolución, por lo que existe gran similitud entre las mismas NTs de diferentes especies (Halböök y cols., 1991; Götz y cols., 1992). Los aminoácidos que las distintas NTs comparten se encuentran concentrados en dominios conservados que incluyen seis residuos de cisteína. Éstos, a su vez, forman puentes disulfuro que son necesarios para el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína que, a su vez, es fundamental para su actividad biológica (rev. Thoenen, 1991). La especificidad de sus funciones depende de los dominios de aminoácidos conservados, cuya posición puede variar dentro de la estructura proteica (Hohn y cols., 1990), y de su unión con receptores específicos.

A pesar de su similitud, las distintas NTs ejercen su acción sobre poblaciones celulares diferentes (Hohn y cols., 1990; Maisonpierre y cols., 1990b; Rosenthal y cols., 1990; Kaisho y cols., 1990; Ernfors y cols., 1990a) y su expresión varía tanto con la edad, como con el tejido donde se sintetizan (Ip y cols., 1992). Así, la expresión de la NT3 es abundante en regiones del cerebro en desarrollo y disminuye con la maduración, contrariamente a lo que ocurre con la expresión del BDNF.

1.3.1.3 Receptores para Neurotrofinas

1.3.1.3.1 Tipos

El efecto biológico de todas las NTs está mediado por la unión de las mismas a receptores de membrana existentes en las células que responden a las mismas, de los cuales se han identificado dos tipos, según su constante de disociación: receptor de **baja afinidad** (p75), que se puede unir al NGF, BDNF y NT3 con afinidades muy bajas pero similares (Rodríguez-Tébar y cols., 1990, 1992; Ernfors y cols., 1992; Halböök y cols., 1991; rev. Meakin y Shooter, 1992; rev. Glass y Yancopoulos, 1993; rev. Ebadi y cols., 1997), por lo que su unión no es específica; y receptores de **alta afinidad** tirosina quinasa (TrK), de los cuales se han identificado tres distintos: el TrKA, el TrKB y el TrKC. Estos últimos receptores son mucho más específicos en cuanto a su unión a las distintas NTs (Kaplan y cols., 1991a; rev. Meakin y Shooter, 1992; rev. Glass y Yancopoulos, 1993). Todas las NTs tienen capacidad para unirse al receptor p75 (Johnson y cols., 1986; Rodríguez-Tébar y

cols., 1990, 1992), mientras que son mucho más selectivas en su unión a los receptores TrK (rev. Ebadi y cols., 1997). Además, la unión de las NTs NGF, BDNF y NT3 con los receptores TrK parece ser más específica para sus efectos sobre las neuronas que su unión al receptor p75. Así, mientras que su unión a receptores TrK promueve diferenciación y supervivencia neuronal, los efectos de su unión al receptor p75 no están bien definidos (-ver más adelante- rev. Glass y Yancopoulos, 1993).

El **receptor de baja afinidad** o p75 (Radeke y cols., 1987) es un receptor de membrana que se expresa en todas aquellas neuronas que responden al NGF, incluyendo las neuronas colinérgicas sensoriales, simpáticas y de encéfalo anterior (Buck y cols., 1987; Patil y cols., 1990), así como en neuronas de hipocampo de rata en cultivo (Cheng y Mattson, 1991). Sin embargo, también se expresa en células no neuronales, como las células de melanoma humano y las células de Schwann, las cuales no se ha demostrado que respondan al NGF (rev. Barker y Murphy, 1992). El receptor p75 ha sido identificado como una glicoproteína de 75kDa (Chao y cols., 1986; Radeke y cols., 1987) que pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral.

Se han identificado tres **receptores de alta afinidad** o TrK, todos ellos derivados del proto-oncogen TrK, conocidos como receptores TrKA, TrKB y TrKC. Son proteínas localizadas en la membrana celular, que presentan un dominio extracelular y un dominio citoplasmático (Barbacid y cols., 1991). Estos receptores son más específicos en su unión a las NTs que el p75, pero alguno de ellos se puede unir a varias NTs, como veremos a continuación.

El **TrKA** (Martín-Zanca y cols., 1989) es una glicoproteína de aproximadamente 140kDa (Cordón-Cardo y cols., 1991; Kaplan y cols., 1991a,b), que se une específicamente al NGF (Martín-Zanca y cols., 1989; Kaplan y cols., 1991a y b; Ip y cols., 1993), aunque también puede unirse a la NT3 (Cordón Cardo y cols., 1991), la NT4/5 (Kumar y cols., 1993) y la zNT7 (Nilsson y cols., 1998), si bien la afinidad para unirse a la NT3 es menor que para unirse al NGF.

El **TrKB** es una glicoproteína de 145 kDa (Klein y cols., 1991b; Soppet y cols., 1991; Squinto y cols., 1991), que se une al BDNF y a la NT4/5 con la misma afinidad, y con menor afinidad a la NT3 (Berkemeier y cols., 1991; Klein y cols., 1991 b; Soppet y cols., 1991; Squinto y cols., 1991; Ip y cols., 1993).

El **TrKC** es una glicoproteína de 145 kDa, que se une específicamente a la NT3 (Lamballe y cols., 1991; Ip y cols., 1993).

1.3.1.3.2 Mecanismo de acción de las Neurotrofinas, mediado por su unión a receptores

Los efectos biológicos que muestran las NTs se producen como consecuencia de la unión de las mismas a sus receptores de alta y baja afinidad.

Así, los efectos biológicos del **NGF** se producen por la unión de esta NT al p75 y al TrKA (Kaplan y cols., 1991a y b). El **BDNF** ejerce sus efectos biológicos cuando se une al p75 y al TrKB (Klein y cols., 1991b; Soppet y cols., 1991; Squinto y cols., 1991). Por último, la **NT3** actúa a través de la unión con el p75 y con el TrKC, aunque también se puede unir a TrKA y TrKB, requiriéndose en estos dos últimos casos para que tenga efecto una concentración mayor de la NT3 que para su unión a TrKC (Lamballe y cols., 1991; Soppet y cols., 1991; Tsoulfas y cols., 1993).

Se postula que una vez que la NT se ha unido al receptor de membrana que media en su efecto biológico, el complejo NT-receptor es englobado y transportado retrógradamente a lo largo del axón hasta el soma de la neurona, como se ha demostrado en embrión de rata (Watson y cols., 1999) y pollo (von Bartheld y cols., 1996; rev. Beck, 1994). Es a nivel del núcleo celular donde las NTs, regulando la expresión de genes, ejercen sus efectos neurotróficos (Segal y Greenberg, 1996; Castellano y cols., 1998). Se postula que el NGF es producido en los territorios diana de las neuronas y transportado retrógradamente hasta el cuerpo celular de las mismas (Thoenen y cols., 1987; Whittemore y Seiger, 1987; Hefti y cols., 1989; rev. Beck, 1994), mientras que el BDNF puede actuar de esta forma o de manera autocrina, es decir, ser sintetizado por las propias neuronas sobre las que actúa, que además, expresan receptores TrKB (Hofer y cols., 1990; Phillips y cols., 1990; Wetmore y cols., 1990; Klein y cols., 1991b; rev. Beck, 1994). Se ha documentado también que la unión de las NTs a los receptores TrK induce la estimulación de la actividad tirosina-quinasa intrínseca de estos receptores, lo que a su vez da lugar a la aparición en el dominio citoplasmático del receptor de puntos de anclaje con proteínas intracelulares que pueden actuar como transductoras de la señal de las NTs (Schelessinger y Ullrich, 1992).

1.3.1.3.2.1 Efectos mediados por la unión de neurotrofinas a receptores de baja afinidad

Una de las hipótesis más apoyadas en la actualidad respecto al papel que juega el p75 en las funciones de las NTs es la intervención del mismo en las uniones de las NTs a sus receptores TrK. Así, se postula que una de las funciones del p75

sería la de asegurar la especificidad de la unión de cada NT a su correspondiente receptor de alta afinidad (Hempstead y cols., 1990, 1991; Ip y cols., 1993; rev. Glass y Yancopoulos, 1993). A este respecto, se postula que el receptor p75 ayuda a la discriminación de las distintas NTs (Rodríguez-Tébar y cols., 1992) en su unión a los receptores de alta afinidad, pues a pesar de ligarse a NGF, BDNF y NT3 con la misma afinidad, la constante de disociación de estas uniones es diferente para las tres NTs, de forma que se disocia más rápidamente de NGF, seguido de BDNF y por último de NT3 (Rodríguez-Tébar y cols., 1992). Esta circunstancia influiría en la disponibilidad de las tres NTs para su unión a los receptores de alta afinidad TrK. Además, el p75 actúa como receptor de presentación del NGF a su receptor de alta afinidad (Taniuchi y cols., 1988) e interviene en el transporte retrógrado del NGF (Johnson y cols., 1986) y del BDNF (von Bartheld y cols., 1996) hacia los lugares de unión a sus receptores TrK.

Se ha postulado también que el p75 interviene modulando la actividad de los receptores de alta afinidad (Ragsdale y Woodgett, 1991; Chao, 1992; Mc Donald y Chao, 1995). Así, por ejemplo, se ha observado que al unirse al NGF induce un aumento de la señal de transducción del receptor TrKA (Verdi y cols., 1994); Por otra parte, se postula que es necesaria la expresión simultánea de los receptores p75 y TrK en la misma célula para que las NTs se unan a sus receptores de alta afinidad (Hempstead y cols., 1990, 1991), requiriéndose para ello una relación de 10 a 1 en la expresión de p75 respecto de TrK. Estas observaciones concuerdan con los niveles de ambos receptores encontrados *in vivo* en las neuronas sobre las que actúan las NTs, y con estudios que han documentado que para que el NGF manifieste efectos neurotróficos sobre neuronas derivadas de hipocampo de rata es necesario que estas neuronas expresen el receptor p75 (Shigeno y cols., 1991). Además, se ha documentado que las neuronas sensoriales y simpáticas (Lee y cols., 1994) dependientes del NGF, pueden sobrevivir sin receptores p75 si se administra exógenamente NGF, aunque para ello haya que añadir al medio cantidades muy superiores de NGF a las que se necesitarían si existieran dichos receptores (Davies y cols., 1993; Lee y cols., 1994), lo que hace postular a algunos autores que el papel del p75 es el de potenciar la respuesta de las neuronas a esta NT (Davies y cols., 1993; Barbacid, 1995).

En cuanto a los efectos que la expresión del p75 induce en las neuronas se ha documentado que el p75 interviene en el desarrollo y crecimiento axonal de neuronas simpáticas (Lee y cols., 1992). Además, algunos estudios sugieren que puede regular la muerte neuronal durante el desarrollo (Rabizadeh y cols., 1993; Yeo

y cols., 1997) y, de hecho, se ha documentado que en retina de pollo en desarrollo interviene en la muerte neuronal fisiológica de las CGR a través de su unión con el NGF (Frade y cols., 1996; Frade y Barde, 1999) y que *in vitro* puede inducir muerte celular por apoptosis en cultivos de neuronas de cerebelo (Rabizadeh y cols., 1993) en ausencia de NGF.

1.3.1.3.2.2 Efectos mediados por la unión de neurotrofinas a receptores de alta afinidad

Los efectos de la unión de las NTs a los receptores de alta afinidad están ligados fundamentalmente al desarrollo y diferenciación neuronal, así como a la supervivencia neuronal tras diferentes tipos de lesión y son responsables de las distintas funciones desempeñadas por las NTs sobre diferentes poblaciones neuronales. Además, dichos efectos son complejos en cuanto a las interacciones que pueden existir entre las NTs y los tres receptores tirosina quinasa. Por ello, hemos desarrollado este tema en el siguiente apartado.

1.3.1.4 Funciones de las Neurotrofinas en el sistema nervioso

1.3.1.4.1 Papel de las Neurotrofinas sobre las neuronas en desarrollo

Los primeros estudios encaminados a conocer los efectos de las NTs sobre distintas poblaciones celulares se desarrollaron *in vitro*, y permitieron documentar que ciertas poblaciones neuronales dependían de las NTs para su supervivencia. Los efectos *in vivo* de las NTs en distintas poblaciones neuronales durante el desarrollo se han documentado recientemente, cuando la biología molecular ha permitido la producción de animales transgénicos con defectos genéticos, como la ausencia de expresión de genes para las NTs o sus receptores, o la sobre-expresión de los mismos. Así, se ha documentado que ratones homocigóticos carentes de NGF y TrKA manifiestan pérdida masiva de neuronas en ganglio cervical superior (Crowly y cols., 1994), así como afectación de nociceptores y termocceptores, lo cual indica la especificidad de acción del NGF sobre determinadas poblaciones neuronales responsables de estímulos sensoriales; sin embargo, aquellos ratones que carecen de la expresión de la NT3 o TrKC presentan reducida a la mitad la población de neuronas de ganglio cervical superior con respecto a los ratones normales (Ernfors y cols., 1994b; Fariñas y cols. 1994). Se ha documentado que la expresión de los mRNAs para NGF y BDNF aumenta a medida que progresa el desarrollo (Whittemore y cols., 1986; Ernfors y cols., 1990b; Maisonpierre y cols., 1990b), por lo que se

postula que el NGF y el BDNF intervendrían en etapas del desarrollo menos tempranas que otras NTs.

El **NGF** fue la primera NT que se identificó como pieza clave del desarrollo normal del sistema nervioso (Cohen, 1960; rev. Johnson y Deckwerth, 1993). Así, se ha documentado que el NGF es fundamental para el desarrollo y supervivencia de: neuronas simpáticas periféricas (Cohen, 1960, Thoenen y Barde, 1980; Levi-Montalcini, 1987), neuronas sensoriales derivadas de cresta neural, como las neuronas de ganglio dorsal raquídeo (Johnson y cols., 1980; rev. Ebadi y cols., 1997; rev. Johnson y Deckwerth, 1983) y neuronas colinérgicas del encéfalo anterior (Hefti, 1986).

El **BDNF** promueve durante el desarrollo la supervivencia de neuronas de ganglio dorsal raquídeo, de neuronas sensoriales primarias derivadas de cresta neural y placoda ectodérmica (Lindsay y cols., 1985; Davies y cols., 1986; Hofer y Barde, 1988; Sieber-Bloom, 1991; rev. Ebadi y cols., 1997) y de neuronas de hipocampo (Collazo y cols., 1992). Por otra parte, aumenta *in vitro* la supervivencia y crecimiento neurítico de neuronas colinérgicas basales del encéfalo anterior (Alderson y cols., 1990; Knüsel y cols., 1991), de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral (Hyman y cols., 1991; Knüsel y cols., 1991; Beck y cols., 1992, 1993a; rev. Beck, 1994) y de motoneuronas espinales y craneales (Oppenheim y cols., 1992; Sendtner y cols., 1992; Yan y cols., 1992).

La **NT3** juega un papel importante en la supervivencia y diferenciación neuronal en etapas tempranas del desarrollo cerebral, ya que es cuando se encuentran los niveles más altos de expresión de su mRNA (Ernfors y cols., 1990b; Maisonpierre y cols., 1990b), y así, interviene durante el desarrollo en la supervivencia de neuronas sensoriales viscerales y propioceptivas que no responden al NGF (Hohn y cols., 1990). También favorece la supervivencia de neuronas espinales sensoriales y simpáticas derivadas de cresta neural, de neuronas de ganglio nodoso derivadas de la placoda, de neuronas de ganglio dorsal raquídeo y de neuronas parasimpáticas (Barde y cols., 1982; Maisonpierre y cols., 1990a; Hohn y cols., 1990; Rosenthal y cols., 1990; rev. Ebadi y cols. 1997).

Se postula que los efectos de las NTs sobre poblaciones neuronales en desarrollo pueden ser complejos. Así, se ha documentado que la respuesta máxima de las neuronas de ganglios dorsal, nodoso y raquídeo a la administración de una sola de las tres NTs es diferente, a pesar de que las tres NTs tienen efecto sobre estas células. Esto sugiere que pueden existir en estas estructuras sub-poblaciones

celulares con distinta sensibilidad a las tres NTs (Maisonpierre y cols., 1990b; Hohn y cols., 1990; Rosenthal y cols., 1990; rev. Ebadi y cols., 1997). Así, cuando se administran conjuntamente BDNF y NGF, promueven la supervivencia del 100% de la población de neuronas disociadas de ganglio dorsal raquídeo embrionario de pollo, mientras que cuando se administra únicamente el BDNF rescata tan solo el 50% de dicha población (Lindsay y cols., 1985). Esto indica que ambas NTs ejercen su efecto sobre diferentes poblaciones de neuronas (rev. Ebadi y cols., 1997). Por otra parte, la NT3 es capaz de promover la supervivencia de casi el 60% de estas mismas neuronas en pollo (Maisonpierre y cols., 1990a; Rosenthal y cols., 1990), por lo que se postula que la sub-población neuronal que responde a la NT3 lo hace también al BDNF o al NGF.

Además, se ha documentado que los efectos de distintas NTs endógenas en la misma zona de SNC pueden ser antagonistas (McAllister y cols., 1997), que la expresión de las citadas neurotrofinas y sus correspondientes receptores no es simultánea en las distintas neuronas que responden a ellas y depende de la fase del desarrollo en la que se encuentren (Ernfors y cols., 1990b), y que es posible que determinadas poblaciones neuronales expresen receptores para ciertas NTs de las cuales dependen para su supervivencia, mientras que neuronas circundantes expresan dichas NTs (Schechterson y Bothwell, 1992).

Algunas NTs, como el BDNF y la NT3, pueden intervenir también en la maduración funcional de las sinapsis (Wang y cols., 1995).

1.3.1.4.2 Efectos de las Neurotrofinas en las neuronas del sistema nervioso adulto normal y en la supervivencia y regeneración de las neuronas tras la lesión

El papel que las NTs juegan en el cerebro adulto no se conoce con exactitud, pero para el NGF se postula que interviene en el funcionamiento normal del mismo a través de la modulación de la síntesis de neurotransmisores y de la estructura neuronal del sistema nervioso adulto (Jones y Reichardt, 1990).

Sin embargo, sí están caracterizados algunos de los efectos de ciertas NTs sobre distintas poblaciones neuronales de cerebro lesionado. Así, por ejemplo, se ha documentado que la administración crónica de BDNF protege a las neuronas serotoninérgicas de cerebro de rata adulta del daño neurotóxico (Mamounas y cols., 1995), promoviendo el crecimiento axonal de dichas neuronas (Mamounas y cols., 2000). Se postula que este efecto es consecuencia de la unión del BDNF al TrKB.

Además, se ha documentado *in vitro* que la administración de BDNF impide el daño neurotóxico sobre las neuronas dopaminérgicas del cerebro de la rata (Hyman y cols., 1991; Beck y cols., 1992), y que la administración de BDNF *in vivo* protege de la muerte a las CGR tras la sección del NO (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; DiPolo y cols., 1998).

Estos hechos hacen que se postule que las NTs intervienen en la muerte o supervivencia de las neuronas adultas tras diversos tipos de lesión, y que pueden ser responsables, al menos en parte, de la diferente respuesta a la axotomía del SNC y del SNP.

La sección axonal produce en el SNC la degeneración y muerte de la mayoría de los grupos neuronales axotomizados. Se ha postulado que esta muerte neuronal inducida por sección de los axones de las neuronas en las proximidades de sus somas se debe a la pérdida del aporte trófico neuronal proveniente de los territorios diana de sus axones y de las células gliales que rodean a las proyecciones de las neuronas axotomizadas (Purves y Nja, 1976; Varon y Adler, 1981). La interrupción de aporte trófico neuronal provoca alteración en la expresión de ciertos genes que intervienen en la apoptosis (Martin y cols., 1990; rev. Johnson y Deckwerth, 1993), siendo ésta una de las causas por las que esta lesión induciría la muerte neuronal. Por esta razón, el aporte exógeno de NTs aumenta la supervivencia de algunas poblaciones de neuronas axotomizadas del SNC, aunque este efecto neuroprotector está limitado en el tiempo, salvo que se restablezcan las conexiones con los territorios diana (So y Yip, 1998), y de hecho, cuando dicho aporte externo cesa, muchas de estas neuronas mueren (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; DiPolo y cols., 1998). No se conoce el motivo por el cual el efecto neuroprotector de las NTs sobre diversas poblaciones neuronales lesionadas es transitorio, pero se postula que puede ser debido a una disminución en la expresión de los receptores por parte de las neuronas que tienen que responder a ellas, como se ha documentado *in vitro* en neuronas de hipocampo de rata (Frank y cols., 1996), o a la aparición de radicales libres que dañan irreversiblemente a las células, como se ha documentado en la retina de rata adulta (Klöcker y cols., 1998).

Sin embargo, en **SNP** se produce una escasa muerte neuronal tras la axotomía. Se postula que esto es debido, al menos en parte, a la producción de factores tróficos por las células de Schwann. Así, tras seccionar el nervio ciático, se ha observado un aumento en la expresión del NGF y del BDNF en las células de Schwann en las zonas por debajo de la lesión (Meyer y cols., 1992; Funakoshi y cols., 1993). Se postula que el NGF endógeno producido por las células de Schwann

se une al receptor p75, también existente en estas células, presentándose de esta forma ante los axones lesionados, los cuales a su vez tienen aumentada la síntesis del receptor TrKA. El NGF pasa a unirse entonces al receptor de alta afinidad, internalizándose. Esta podría ser una manera de señalar el camino que debe seguir el axón en su regeneración (Castellano y cols., 1998) y de impedir la muerte neuronal en el SNP ya que se ha documentado que el aporte externo de BDNF tras la sección del nervio ciático evita algunas alteraciones fenotípicas que aparecen en las motoneuronas de rata tras la citada lesión, como la pérdida de la actividad acetilcolin-transferasa (ChAT), y produce a su vez un aumento en la re-expresión del receptor p75 en el núcleo retrodorso-lateral (Friedman y cols., 1995; rev. Ebadi y cols., 1997).

1.3.1.5 Neurotrofinas en el sistema visual: localización y efectos

1.3.1.5.1 Localización de las neurotrofinas en la retina

Se ha documentado la presencia de diversas NTs, así como sus receptores de alta y baja afinidad, en la retina de diversas especies, tanto durante el desarrollo como en tejido adulto y se ha observado que, tanto para las NTs como para sus receptores, existen diferencias en cuanto a los niveles de expresión y a su localización dependiendo del grado de desarrollo del animal. Así, existen NTs que se expresan prácticamente en niveles similares en retina de rata en desarrollo y adulta, como el BDNF (Pérez y Caminos, 1995), siendo en ambos casos los niveles de expresión bajos (Maisonpierre y cols., 1990a y b), mientras que la NT3 no se expresa en retina de embrión de rata (Ernfors y cols., 1992; rev. Von Bartheld, 1998), aunque sí lo hace en retina de rata post-natal y adulta (Chakrabarti y cols., 1990; Maisonpierre y cols., 1990b; Vecino y cols., 1998a).

A continuación vamos a resumir lo que se conoce sobre la localización de las NTs y sus receptores en la retina de rata ya que son datos relevantes para este trabajo.

Se ha documentado expresión del **NGF** en retina de rata en desarrollo y adulta en las siguientes capas: capa de fibras nerviosas (CFN), capa de células ganglionares (CCG), capa plexiforme interna (CPI), capa plexiforme externa (CPE), membrana limitante interna (MLI), membrana limitante externa (MLE) y mitad interna de la capa nuclear interna (CNI) (Caminos, 1998; Chakrabarti y cols., 1990; Vecino y cols., 1998a).

Del **BDNF** se ha documentado expresión en retina de rata en desarrollo y adulta localizada en las siguientes capas: CFN, CCG, CNI y CPE (Caminos, 1998; Chakrabarti y cols., 1990; Jelsma y cols., 1993; Pérez y Caminos, 1995; Vecino y cols., 1998a).

De la **NT3** se ha documentado expresión en retina de rata en desarrollo y adulta localizada en las siguientes capas: CFN, CCG, CNI, CNE, CPE, epitelio pigmentario, segmentos externos de fotorreceptores y MLE (Caminos, 1998; Pérez y Caminos, 1995; Vecino y cols., 1998a).

En cuanto a la expresión de las distintas NTs en las **CGR**, se ha documentado que las CGR de rata neonatal y adulta expresan NGF y su mRNA (Chakrabarti y cols., 1990; Zanellato y cols., 1993; Vecino y cols., 1998a), BDNF (Cellerino y Kohler, 1997; Vecino y cols., 1998a), y NT3 (Vecino y cols., 1998a).

1.3.1.5.2 Localización de los receptores de neurotrofinas en retina

Diversos estudios han documentado la expresión de los receptores de alta y baja afinidad para las NTs en diversas capas de la retina de animal en desarrollo y adulto, así como en las CGR.

Así, se ha documentado que el **receptor de baja afinidad p75** es el que más se expresa en retina de rata en desarrollo (Allendoerfer y cols., 1994), localizándose su expresión en retina de rata en desarrollo y adulta en la CCG (Yan y Johnson, 1988; Carmignoto y cols., 1991; Zanellato y cols., 1993; Ugolini y cols., 1995) y procesos de las células de Müller (Caminos, 1998).

Sin embargo, los receptores TrK se expresan en diversas capas de la retina, y así, se ha documentado expresión de los mRNA para los tres receptores TrK en retina de embrión de rata (Ernfors y cols., 1992).

En retina de rata neonatal y adulta se ha encontrado expresión de **TrKA** en las siguientes capas: CFN, CCG, CPI, CNI, MLE, NO, EP, segmentos internos de los fotorreceptores y procesos de las células de Müller (Caminos, 1998; Chakrabarti y cols., 1990; Carmignoto y cols., 1991; Ernfors y cols., 1992; Zanellato y cols., 1993; Pérez y Caminos, 1995; Rickman y Brecha, 1995; Ugolini y cols., 1995; Vecino y cols., 1998a).

En retina de rata adulta y en desarrollo se han localizado receptores **TrKB** en las siguientes capas: CFN, CCG, CPI, CNI, MLE, segmentos externos e internos de

fotorreceptores, NO y procesos de las células de Müller (Ernfors y cols., 1992; Jelsma y cols., 1993; Pérez y Caminos, 1995; Rickman y Brecha, 1995; Ugolini y cols., 1995; Cellerino y Kohler, 1997; Vecino y cols., 1998a).

En retina de rata en desarrollo y adulta se han localizado receptores **TrKC** en CFN, CCG, CPI, CNI, CPE, MLE, CNE, segmentos internos de los fotorreceptores y procesos de las células de Müller (Caminos, 1998; Ernfors y cols., 1992; Ugolini y cols., 1995; Vecino y cols., 1998a).

En lo que se refiere a la expresión de los distintos receptores en las **CGR**, se ha documentado expresión de TrKA (Jelsma y cols., 1993; Zanellato y cols., 1993; Rickman y Brecha, 1995; Vecino y cols., 1998a) y TrKB (Jelsma y cols., 1993; Zanellato y cols., 1993; Cellerino y Kohler, 1997; Vecino y cols., 1998a) en las CGR de rata neonatal. En retina de ratón en desarrollo se ha documentado la expresión del receptor p75 en CGR (Frade y Barde, 1999). En retina de rata adulta, aunque en principio se postulaba que la expresión del receptor p75 en CCG era debida a la presencia del receptor en las CGR (Carmignoto y cols., 1991), estudios recientes han documentado que el p75 se expresa realmente en los procesos de las células de Müller (Caminos, 1998; Hu y cols., 1998; Vecino y cols., 1998a). Se ha documentado también expresión del receptor p75 en retina de rata adulta tras lesión experimental (Maffei y cols., 1992).

1.3.1.6 Funciones de las NTs en el sistema visual

En principio se pensaba que el efecto de las NTs sobre las CGR, durante el desarrollo o en tejido adulto, se producía por transporte retrógrado de las mismas desde sus territorios diana hasta el soma de dichas células (Beer y cols., 1993), como ocurre para la mayoría de las neuronas que dependen de las NTs para su supervivencia, y que la supervivencia de las CGR dependía del aporte trófico proveniente de sus territorios diana. A este respecto, diversos autores han documentado la capacidad de las CGR de rata adulta y en desarrollo para transportar retrógradamente, aunque también anterógradamente, el receptor p75 (Carmignoto y cols., 1991); también se ha documentado el transporte retrógrado del BDNF desde CS y techo óptico hasta las retinas de rata adulta (Fournier y cols., 1997) y de embrión de pollo (Herzog y von Bartheld, 1997) respectivamente. Posteriormente se ha postulado que aún admitiendo que exista transporte retrógrado desde los territorios de proyección, pueden existir otras vías a través de las cuales las NTs llegan a los lugares donde actúan. Así, el hecho de que existan receptores de alta y baja afinidad en distintas células de la retina en diferentes especies, hace que se

postule que algunas de estas células, como por ejemplo, las CGR, pueden depender de un aporte trófico autocrino o proveniente de células vecinas (Giestal-de Araujo y Linden, 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Ugolini y cols., 1995; Pérez y Caminos, 1995), y no solo del procedente de sus territorios diana. A este respecto, se ha documentado que la expresión de mRNA para BDNF aumenta en la CCG de la retina de rata adulta tras el aplastamiento del NO (Gao y cols., 1997), tras la administración intravítrea de NMDA (Vecino y cols., 1999), y tras la isquemia transitoria retiniana (Vecino y cols., 1998a), mientras que las CGR de la rata adulta pueden responder a esta NT porque expresan receptores TrKB (Jelsma y cols., 1993; Pérez y Caminos, 1995).

También se postula que la dependencia de factores tróficos por parte de las CGR puede variar según el estadio de desarrollo de la retina, de forma que durante el desarrollo y mientras que no realizan conexiones sinápticas dependerían de factores tróficos producidos por células retinianas, para pasar posteriormente a depender del aporte trófico de los territorios diana (Armson y cols., 1987) y que, quizás tras la lesión pasarían a depender nuevamente, al menos de forma transitoria, de factores tróficos producidos en la retina (Giestal-de Araujo y Linden, 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Ugolini y cols., 1995; Pérez y Caminos, 1995; Gao y cols., 1997; Vecino y cols., 1999).

1.3.1.6.1 Funciones de las NTs sobre las células ganglionares de la retina y el sistema visual en desarrollo

Diversos estudios han documentado la importancia de las NTs en el desarrollo del sistema visual. Así, por ejemplo, se ha demostrado que el **BDNF**: aumenta *in vitro* la supervivencia de las CGR de rata embrionaria y neonatal (Johnson y cols., 1986; Castillo y cols., 1994; Ary-Pires y cols., 1997); promueve *in vitro* la elongación de las neuritas de las CGR de rata post-natal (Bosco y Linden, 1999), por lo que puede intervenir en la diferenciación de la morfología neurítica de estas células; modula *in vivo* la arborización axonal de las CGR de *Xenopus* (Cohen-Cory, 1999); promueve el crecimiento neurítico *in vitro* y el crecimiento axonal *in vivo* de las CGR de embrión de ratón (Atkinsons y cols., 1999) interviniendo por tanto, en el desarrollo axonal de estas células; promueve *in vitro* la supervivencia de las CGR de embrión de pollo (Rodríguez-Tébar y cols., 1989). Además, se ha documentado que interviene en la formación de las columnas de dominancia ocular en la rata (Castrén y cols., 1992; Meyer-Franke y cols., 1995; rev. Thoenen, 1995; rev. Von Barthled, 1998) y el gato (Cabelli y cols., 1995). Se postula también que el BDNF

puede producirse en los territorios diana de las CGR de rata neonatal (Leibrock y cols., 1989; Isenmann y cols. 1999) y que su sobre-expresión en estos territorios, si bien no aumenta la supervivencia de las CGR en el periodo de muerte neuronal fisiológica, sí facilita el establecimiento de conexiones topográficas adecuadas de las CGR con sus territorios diana, por lo que se postula que el BDNF interviene en la selección de las CGR que deben ser eliminadas durante el periodo de muerte neuronal fisiológica (Isenmann y cols., 1999).

Respecto al papel que el **NGF** juega en retina en desarrollo y en la estructuración del sistema visual, se ha documentado que el NGF induce *in vitro* el crecimiento neurítico en explantes retinianos de pollo (Hallböök y cols., 1996b). Además, Frade y Barde (1999) han documentado que esta NT interviene en la muerte de neuronas retinianas de retina de ratón en desarrollo en el periodo de muerte neuronal fisiológica a través de su unión al receptor de baja afinidad p75, por lo que se postula que interviene en la selección de las neuronas que deben sobrevivir. También se han encontrado valores altos de expresión del citado receptor en CGR y en sus axones en retina de rata en desarrollo durante el periodo de muerte neuronal fisiológica (Yan y Johnson, 1988; Carmignoto y cols., 1991), por lo que se postula que el NGF tendría un papel similar en retina de rata en desarrollo. Algunos autores han documentado la intervención del NGF en la formación de las columnas de dominancia ocular (Maffei y cols., 1992; Cellerino y Maffei, 1996; rev. Gu, 1995) en sistema visual de rata en desarrollo. Sin embargo, otros autores discuten la intervención del NGF en la formación de las columnas de dominancia ocular por no encontrar expresión de receptores para esta NT en córtex visual (Vázquez y Ebendal, 1991; Castrén y cols., 1992; Cabelli y cols., 1995). Por otra parte, se ha documentado la capacidad del NGF para mantener la funcionalidad de las CGR de rata en desarrollo tras deprivar de la visión a estos animales, siendo efectiva en este sentido tanto la administración intraventricular en dosis repetidas (Domenici y cols., 1991b; Maffei y cols., 1992), como la administración en cortex visual de dosis repetidas de esta NT (Domenici y cols., 1991b), postulando estos autores una acción directa del NGF sobre las CGR (Domenici y cols., 1991b).

En cuanto a la **NT3**, se ha documentado que promueve la diferenciación y supervivencia de las células amacrinas y de las CGR de embrión de pollo (De la Rosa y cols., 1994a), e interviene en el desarrollo de la retina de este animal (Bovolenta y cols., 1996), a través de su unión al receptor. Sin embargo, no tiene efecto en el crecimiento neurítico o axonal de CGR de embrión de ratón, tanto *in vitro* como *in vivo* (Atkinsons y cols., 1999), lo que sugiere que no interviene en el

desarrollo axonal de dichas células en mamíferos. También se postula que interviene en el desarrollo de las columnas de dominancia ocular en mamíferos, ya que su receptor de alta afinidad TrKC se expresa en mamíferos en núcleo geniculado lateral y corteza visual (Chao, 1992) en el periodo en que se forman las citadas columnas de dominancia ocular.

Se postula que las NTs y sus receptores juegan un papel importante en la maduración de las conexiones sinápticas en el sistema visual durante el desarrollo. Así, la falta de estímulos visuales durante el desarrollo provoca una disminución en la síntesis de BDNF y TrKB en corteza visual de rata adulta mientras que la exposición a la luz aumenta nuevamente dicha síntesis (Castrén y cols., 1992), y en retina de pollo la ausencia de luz produce una disminución de la regulación de los receptores TrKB y TrKC mientras que la exposición a la luz produce un aumento en la regulación de los mismos, fundamentalmente en las CGR y en las capas de fotorreceptores (Okazawa y cols., 1994).

1.3.1.6.2 Funciones de las NTs sobre las células ganglionares de la retina adulta normal y lesionada

El **BDNF** promueve *in vitro* la supervivencia de las CGR de rata adulta (Johnson y cols., 1986; Thanos y cols., 1989; Mittal y cols., 1994) y manifiesta *in vivo* efectos neuroprotectores sobre las CGR de la retina de rata adulta tras la lesión del NO (Mey y Thanos, 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado Ramón y cols., 1996; DiPolo y cols., 1998; Isenmann y cols., 1998) o isquemia (Unoki y LaVail, 1994). También tiene un efecto neuroprotector sobre las CGR después de una isquemia retiniana en la rata, ya que cuando se administra dos días antes de inducir la isquemia (Unoki y LaVail, 1994), en el mismo momento de la isquemia (Sellés-Navarro y cols., 2000), el día primero o tercero después de producir la isquemia retiniana (Unoki y LaVail, 1994), o inmediatamente después de la reperusión (Kurokawa y cols., 1999), aumenta la supervivencia de las CGR tras la citada lesión.

Se ha documentado la elevación transitoria de la expresión en retina de rata de la citada NT y su receptor TrKB observada tras isquemia seguida de reperusión (Vecino y cols., 1998a). También aumenta la expresión del BDNF tras lesión inducida por aplastamiento del NO en células de la CCG de la retina de la rata adulta (Gao y cols., 1997) así como en CGR de rata adulta inmediatamente después de la administración intravítrea de NMDA (Vecino y cols., 1999), por lo que se postula que esta NT actúa como neuroprotector endógeno de la retina (Vecino y cols., 1999).

Además de aumentar la supervivencia de las CGR tras diversos tipos de lesión, la administración intravítrea del BDNF estimula *in vivo* el crecimiento axonal de las CGR que regeneran tras la sección del NO (Sawai y cols., 1996), así como la regeneración *in vitro* de los axones de CGR de retinas axotomizadas de ratas adultas (Thanos y cols., 1989). Se postula que la capacidad del BDNF para inducir la regeneración de las CGR es limitada y, a este respecto, se ha documentado que el BDNF induce el crecimiento de los axones de las CGR dentro del ojo más que hacia injertos de nervio periférico colocados en el nervio óptico, por lo que se postula que serían necesarias otras moléculas distintas a los factores tróficos para dirigir el crecimiento axonal hacia sus territorios de proyección (Mansour-Robaey y cols., 1994; rev. Jelsma y Aguayo, 1994). De hecho, se ha documentado que la administración intraocular del BDNF durante la sección del NO no induce un aumento en la expresión de las tubulinas en las CGR, mientras que este aumento sí se produce en las CGR que regeneran sus axones a través de injertos de nervio periférico colocados en el muñón del NO tras la sección del mismo (Fournier y McKerracher, 1997).

Aunque las vías a través de las cuales el BDNF ejerce su acción neuroprotectora sobre las CGR pueden ser diversas, en la actualidad no están totalmente identificadas, pudiendo ser distintas según el tipo de lesión inducida en retina. Así, se postula que los efectos neuroprotectores del BDNF sobre las CGR lesionadas con NMDA pueden ser debidos a su intervención en el proceso de apoptosis, o la neutralización de los efectos lesivos de las especies de oxígeno reactivo (Vecino y cols., 1999), mientras que en el daño producido por isquemia transitoria en CGR de rata adulta, se postula que los efectos neuroprotectores del BDNF sobre las CGR están relacionados con la supresión de la expresión de la caspasa 2 en las citadas células (Kurokawa y cols., 1999), o con el bloqueo de la producción de glutamato (Tomita y cols., 1999).

Los efectos neuroprotectores del BDNF sobre las CGR tras la axotomía no son absolutos, y se ha documentado que tanto administrado intravítreamente en una dosis única como en inyecciones repetidas intravítreas, o con administración mantenida mediante transfección de células de Müller con adenovirus productores de BDNF en retina de rata (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; DiPolo y cols., 1998) se produce un aumento en la supervivencia de las CGR axotomizadas durante un periodo limitado de tiempo, disminuyendo el efecto neuroprotector entre los días décimo y decimosexto de la lesión. No se conocen los motivos por los cuales el efecto neuroprotector del BDNF sobre las CGR es

transitorio, pero algunos autores han documentado que una de las causas podría ser la aparición de radicales libres, que dañaran irreversiblemente a las CGR y anulasen de esta forma el efecto neuroprotector del BDNF (Klöcker y cols., 1998).

En cuanto al **NGF**, Carmignoto y cols. (1989) documentaron que dosis intravítreas repetidas de NGF aumentan la supervivencia de las CGR de rata tras la sección del NO. Así mismo, el NGF administrado intravítreamente en dosis repetidas durante 30 días, rescata de la muerte y mantiene la funcionalidad de las CGR de gato adulto tras isquemia retiniana, prolongándose este efecto hasta los 12 meses tras la lesión (Siliprandi y cols., 1993). En retina de conejo, se ha documentado una elevación de los niveles de NGF en humor vítreo cuando se produce aumento experimental de la tensión intraocular (Lambiase y cols., 1997), teniendo tanto la expresión endógena como la administración exógena de NGF efectos neuroprotectores sobre las CGR en este tipo de lesión (Lambiase y cols., 1997). Se postula que el incremento endógeno de NGF es debido a la producción de dicha NT por células gliales retinianas (Lambiase y cols., 1997).

En cuanto a los mecanismos a través de los cuales el NGF aumenta la supervivencia de las CGR, se han estudiado tan solo en algunos tipos de lesión, y así, en isquemia retiniana algunos autores postulan que los efectos neuroprotectores exhibidos por el NGF pueden ser debidos a que esta NT impide la entrada de Ca^{2+} en las CGR de gato (Siliprandi y cols., 1993), mientras que otros estudios realizados en retina de rata adulta (Tomita y cols., 1999) documentan que la administración de NGF evita la disminución de la enzima glutaminasa fosfato-activada, que interviene en la formación de glutamato y cuyos niveles disminuyen en retina de rata tras la isquemia (Watanabe y cols., 1995), considerándose éste un mecanismo de protección natural contra los efectos de la isquemia. En otros tipos de lesión, como la hipertensión ocular, se postula que el NGF podría actuar directamente sobre las CGR inhibiendo la apoptosis (Lambiase y cols., 1997).

En cuanto a los efectos neuroprotectores de la **NT3**, no se ha podido documentar que esta NT ejerza un efecto neuroprotector sobre las CGR tras la sección del NO (Peinado Ramón y cols., 1996) ni tampoco que promueva el crecimiento y regeneración axonal o dendrítica de estas células tras la lesión en retina de mamífero (Sawai y cols., 1996).

1.3.1.6.3 Funciones de las NTs sobre otras células de la retina adulta normal y lesionada

Algunas NTs ejercen efectos protectores sobre otras poblaciones de células retinianas distintas a las CGR. Por ejemplo, el **BDNF** rescata fotorreceptores en ratas RCS que presentan una degeneración hereditaria y en las que además se ha producido lesión retiniana por sobre-exposición a la luz (LaVail y cols., 1992). La **NT3** tiene un efecto discreto en cuanto al rescate de estas células en la misma lesión (La Vail y cols., 1992), mientras que para el **NGF** no se ha podido probar que aumente la supervivencia de las mismas (LaVail y cols., 1992). En ratones rd, que presentan una mutación recesiva que induce la degeneración retiniana, con pérdida inicial de bastones y posteriormente de conos, se ha documentado un incremento en la expresión de receptores de alta afinidad, concretamente de TrkA y TrKC, en diversas capas de la retina (CPE, CNI, CPI y CCG), con respecto a la que aparece en ratones no mutantes. Este aumento de expresión se interpreta como un mecanismo de defensa ante la degeneración de los fotorreceptores (Llamosas y cols., 1997) y, de hecho, en este modelo experimental la administración intravítrea de NGF disminuye la muerte de los fotorreceptores (Lambiase y Aloe, 1996). En estos mismos ratones rd se ha documentado un incremento en la expresión del receptor de baja afinidad p75 en la CPE, coincidiendo con el periodo en el que se produce muerte masiva de fotorreceptores por apoptosis (Chang y cols., 1993; Llamosas y cols., 1997) postulando algunos autores que la expresión de p75 podría tener un efecto antiapoptótico (Llamosas y cols., 1997).

1.3.1.7 Interacciones entre las Neurotrofinas y las células de microglía

Diversos estudios sugieren que una parte de los efectos neuroprotectores que exhiben las NTs, tanto en SNC en desarrollo como en adulto, así como su intervención en la citoarquitectura del SNC, pueden estar mediados por sus interacciones con las células de microglía. Concretamente, podrían actuar regulando las funciones de las células de microglía o las relaciones entre éstas y las neuronas. Esta hipótesis estaría en concordancia con la capacidad de las células de microglía para expresar distintos receptores para NTs. Así, se ha documentado *in vitro* la expresión de p75 en células de microglía procedentes de embrión humano (Heese y cols., 1998a) y de cerebro de rata neo-natal (Nakajima y cols., 1998; Newmann y cols., 1998). También se ha documentado *in vitro* la expresión de TrkA, TrkB y TrKC

en células de microglía de cerebro de rata neo-natal (Miwa y cols., 1997; Elkabes y cols., 1998) y de TrKB en algunas poblaciones de células de microglía de cerebro de rata embrionaria (Miwa y cols., 1997). Además, las células de microglía de cerebro de rata embrionaria y neonatal activadas *in vitro* e *in vivo* con excitotoxicidad por ácido kaínico o lipolisacárido, expresan p75, TrKA, TrKB y TrKC (Mallat y cols., 1989; Junier y cols., 1994; Elkabes y cols., 1998; Heese y cols., 1998b; Nakajima y cols., 1998), mientras que sufren una disminución en la expresión de TrKA (Elkabes y cols., 1998). Por tanto, las células de microglía, al menos las procedentes de cerebro en desarrollo, expresan los distintos receptores para las NTs, por lo que pueden responder a las mismas, y además, su activación modifica selectivamente la expresión de los distintos receptores de NTs y, por lo tanto, la respuesta de las células de microglía a las mismas.

En algunos tipos de lesión, las NTs que actúan sobre las células de microglía son producidas por las neuronas lesionadas. Así, cuando se lesiona el tálamo con kainato, se expresa el NGF en las neuronas lesionadas, mientras que una subpoblación de células de microglía ve incrementada su expresión del receptor de baja afinidad p75 (Junier y cols., 1994), lo que sugiere que esta NT puede mediar en la supervivencia de las neuronas dañadas por favorecer las relaciones entre éstas y las células de microglía.

En cuanto a los efectos de las NTs sobre las células de microglía, mediados por los receptores de alta y baja afinidad, se han documentado diferencias según la NT, la lesión inducida, etc. En algunos casos, las NTs modifican la producción de sustancias por parte de las células de microglía. En otros casos, inducen proliferación o desplazamientos de las células de microglía. A este respecto, se ha documentado que las células de microglía en cultivo son capaces de producir proteasas como la elastasa y el activador del plasminógeno (rev. Kohsaka y cols., 1996) y que la adición de las NTs BDNF, NT3 y NGF a cultivos de células de microglía de cerebro de rata neonatal aumentan la producción microglial de plasminógeno y activador de uroquinasa tipo plasminógeno, así como su actividad específica de la fosfatasa ácida, y disminuyen la producción microglial de óxido nítrico, tanto basal como la inducida por la activación de las células de microglía con lipolisacárido (Nakajima y cols., 1998), siendo el BDNF la NT que muestra mayor efecto inhibitor de la producción de óxido nítrico. Estos hechos han llevado a estos autores a postular que dichas NTs intervendrían en la citoarquitectura del SNC durante el desarrollo, al menos en parte, a través de sus interacciones con las células de microglía (Nakajima y cols., 1998).

Por otra parte, cuando se añaden al medio de cultivo de hipocampo de rata

neonatal las neurotrofinas NT3 y NGF se produce disminución de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH-II) por parte de las células de microglía (Newmann y cols., 1998), estando mediado este efecto por la unión de las citadas NTs al receptor de baja afinidad p75 existente en dichas células. Esto indicaría que ambas NTs regulan la actividad presentadora de antígenos que exhiben las células de microglía tras diferentes procesos lesivos o degenerativos del SNC (Newmann y cols., 1998), por lo que de alguna forma, mediarían en las relaciones entre SNC y sistema inmunitario.

Además de los efectos anteriormente citados, se ha documentado que la NT3 induce la proliferación *in vitro* de las células de microglía de cerebro de rata postnatal, incrementando además la actividad fagocítica de las mismas (Elkabes y cols., 1996).

Por último, se ha documentado la capacidad de la neurotrofina NGF para inducir desplazamientos de las células de microglía en cultivo hacia las fuentes de producción de la misma, tras lo cual internalizan la NT (Gilad y Gilad, 1995). Se postula que este efecto determina que las células de microglía medien en la disponibilidad del NGF por parte de las neuronas lesionadas.

A pesar de todos los efectos descritos de las NTs sobre las células de microglía, en la actualidad no se conoce el papel que estas interacciones juegan en el efecto neuroprotector de las NTs.

1.3.2 OTROS FACTORES TRÓFICOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS

Los **factores tróficos o de crecimiento**, entre los cuales se encuentran las Neurotrofinas –ver apartado 1.3.1 de esta Introducción), son proteínas que juegan un papel importante en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Algunos de los factores de crecimiento se ha demostrado que pueden intervenir también en el crecimiento y diferenciación neuronal, y dentro de éstos nos vamos a interesar por la pro-insulina humana (PIH) y el factor de crecimiento similar a Insulina-I (Insuline-like growth factor-I; IGF-I), ya que los hemos utilizado en nuestro estudio.

1.3.2.1 PROINSULINA HUMANA

La pro-insulina humana (PIH), es una pro-hormona producida por el páncreas de estructura semejante a la insulina (Xie y Tsou, 1993). Sus efectos biológicos se producen por la unión de la misma al receptor de la insulina, unión para

la que la PIH muestra menor afinidad que la insulina (rev. Hadjidakis y Raptis, 1992), lo que determina que los efectos de la PIH sobre los niveles de glucosa en sangre sean muy inferiores a los de la insulina (Podlecki y cols., 1982; rev. Hadjidakis y Raptis, 1992)

La PIH, además de tener leves efectos sobre la glucemia, es un factor neurotrófico, ya que se ha documentado que promueve la diferenciación y proliferación de células neuroepiteliales de embrión de pollo (de la Rosa y cols., 1994b; Hernández-Sánchez y cols., 1995) y que incrementa la proliferación y diferenciación de las CGR de embrión de pollo en cultivo (Hernández-Sánchez y cols., 1995). Además, regula el proceso de muerte neuronal fisiológica de las CGR de pollo durante el desarrollo (Díaz y cols., 2000), e impide la muerte de células de embrión de pollo en suspensión a través del mantenimiento de los niveles de la proteína de trauma por calor 70 (del inglés heat-shock 70; Hsc70s), que normalmente desciende en las células que sufren apoptosis (de la Rosa y cols., 1998b).

1.3.2.2 FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA-I

El Factor de crecimiento similar a la insulina-1 (Insulin-like growth factor-I ó IGF-I), también denominado *somatomedina C*, es un péptido producido en el hígado y purificado a partir de suero humano, cuya estructura es similar a las de la PIH y la insulina humana (Rinderknecht y Humbel, 1978), y muestra grandes similitudes en cuanto a sus efectos metabólicos con la insulina (rev., Stewart y Rotwein, 1996).

Los efectos del IGF-I son consecuencia de la unión del péptido a su receptor específico IGF-IR, el cual contiene un dominio tirosina-quinasa responsable de la fosforilación de proteínas inductoras de señales de transducción intracelulares (Ullrich y cols., 1986; De Pablo y cols., 1990; Singleton y cols., 1996a y b; rev. Czech y cols., 1989), aunque también se une a receptores de membrana tirosina-quinasa para insulina (De Pablo y cols., 1990; Sara y Hall, 1990). Además, la unión del IGF-I a su receptor es modulada por proteínas de unión de alta afinidad, (IGF binding-proteins; IGFBPs; Clemmons, 1990; Jones y Clemmons, 1995; rev. Clemmons y cols., 1995; rev. Cohen y Rosenfeld, 1994).

Se ha documentado que el IGF-I es un importante factor neurotrófico para el SNC en desarrollo, ya que promueve la neurogénesis, diferenciación y supervivencia de neuronas de SNC de rata (Beck y cols., 1988; Rotwein y cols., 1988; rev. Beck y cols., 1994; rev. Stewart y Rotwein, 1996) y de células neuroepiteliales de embrión de pollo (de la Rosa y cols., 1994b; Hernández-Sánchez y cols., 1995; Frade y cols.,

1996), así como la diferenciación, supervivencia y proliferación de neuronas dopaminérgicas y colinérgicas procedentes de cerebro de embrión de rata (Knusel y cols., 1990; Bozyczko-Coyne y cols., 1993; rev. Beck, 1994). El IGF-I también promueve el crecimiento de células de neuroblastoma humano (Sumantran y Feldman, 1993; rev. Feldman y cols., 1997), el crecimiento neurítico de neuronas humanas (Kim y Feldman, 1997) así como la movilidad de su cono de crecimiento y la extensión axonal (Kim y cols., 1997a). Además, se ha documentado *in vitro* que aumenta la supervivencia y la síntesis mielínica de los oligodendrocitos (Mozell y McMorris, 1988; Barres y cols., 1992).

Estos efectos documentados para el IGF-I sobre neuronas en desarrollo están en concordancia con los niveles de expresión de esta proteína en cerebro de rata, donde se expresa abundantemente en estadios tempranos del desarrollo para disminuir gradualmente su expresión a medida que avanza el mismo hasta los bajos niveles observados en el adulto (Rotwein y cols., 1988). Además, el hecho de que se produzca expresión transitoria del IGF-I en neuronas de proyección durante la sinaptogénesis hace postular a algunos autores que el IGF-I interviene en la formación y estabilización de las conexiones sinápticas (Bondy, 1991).

Además de los efectos sobre neuronas durante el desarrollo, el IGF-I también ejerce efectos neurotróficos sobre algunas poblaciones neuronales lesionadas, y así, se ha documentado que disminuye la apoptosis en neuronas de hipocampo de rata tras isquemia y reperfusión (Tagami y cols., 1997b), aumenta la supervivencia de neuronas hipotalámicas y de neuronas primarias cerebelares de rata tras inducción de estrés oxidativo (Heck y cols., 1999), y promueve la regeneración de motoneuronas de nervio ciático de rata adulta tras crio-lesión (Sjöberg y Kanje, 1989).

Se ha documentado la expresión de IGF-I en retina de rata adulta y en desarrollo, así como en retina de embrión de pollo (Danas y Stylianopoulou, 1990; Burren y cols. 1996; Calvaruso y cols., 1996). Concretamente, se ha documentado expresión del mRNA para el IGF-I en CGR de la retina de rata adulta (Burren y cols., 1996), mientras que se ha documentado expresión del mRNA para su receptor IGF-IR en la CCG y otras capas retinianas (Burren y cols., 1996). Además, se ha documentado la expresión de proteínas de unión a IGF-I de alta afinidad (IGFBPs), que modulan la unión del IGF-I a su receptor, en retina de pollo en desarrollo (De la Rosa y cols., 1994b) y en CCG de la retina de rata adulta (Burren y cols., 1996).

El IGF-I ejerce efectos tróficos y neuroprotectores sobre las CGR. Así, se ha

documentado que aumenta la supervivencia de CGR de rata neonatal en cultivo (Meyer-Franke y cols., 1995), estimula la proliferación y la diferenciación de CGR de embrión de pollo en cultivo (Hernández-Sánchez y cols., 1995), y aumenta la supervivencia de las CGR de rata adulta cuando se administra intravítreamente en dosis repetidas tras seccionar el NO (Kermer y cols., 2000).

En cuanto a las vías a través de las cuales puede actuar el IGF-I, existen diversas hipótesis:

1.- Disminuyendo el incremento del enzima óxido-nítrico sintetasa que se produce en ciertas lesiones, como en la lesión de médula espinal en ratas (Sharma y cols., 1998). El tratamiento previo con IGF-I en este tipo de lesión previene a través de esta vía la formación de óxido nítrico.

2.- Actuando sobre la actina y ciertas proteínas de adhesión y lípidos fundamentales para el crecimiento neurítico. Esta vía sería la responsable de los efectos tróficos y de neuritogénesis inducidos por la administración de IGF-I en cultivos de neuronas (rev., Feldman y cols., 1997), así como de los efectos regeneradores del IGF-I sobre motoneuronas de nervio ciático criolesionado (Sjöberg y Kanje, 1989).

3.- Aumentando la transcripción del ADN. Se postula que el aumento de supervivencia inducido por la administración del IGF-I en ciertas poblaciones neuronales puede estar mediado por el aumento de la transcripción del ADN inducido por el IGF-I a través de sus efectos sobre el factor nuclear NF-Kappa-B (Heck y cols., 1999), factor de transcripción del que se ha documentado que previene la apoptosis de neuronas (Mattson y cols., 1997).

4.- Inhibiendo la apoptosis. Se postula que la estimulación de receptores IGF-I durante un breve periodo de tiempo inhibe el proceso de muerte celular programada en células de neuroblastoma humano manteniendo los niveles de transcripción del gen bcl-2 e impidiendo la activación de la caspasa 3, mientras que la estimulación crónica de estos receptores inhibe el proceso de apoptosis en las mismas células a través del aumento de las concentraciones celulares de Bcl-xL (Singleton y cols., 1996a). Por tanto, se postula que el IGF-I puede regular el proceso de apoptosis a través de sus interacciones con genes y proteínas que intervienen en el mismo (rev. Feldman y cols., 1997).

1.4 LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA

1.4.1 INTRODUCCIÓN

Las células de microglía fueron descritas por del Río Hortega como un tipo de glía del sistema nervioso central (SNC) diferente a los astrocitos y oligodendrocitos (del Río-Hortega, 1932). Este autor no solamente describió las células de microglía sino que además definió la que entonces se creía función principal de las mismas, que consiste en la fagocitosis de desechos y restos celulares en el SNC. En la actualidad se sabe que las células de microglía constituyen aproximadamente el 20% del total de la población de células gliales del SNC de los mamíferos (del Río-Hortega, 1932; Cammermeyer, 1970a; Perry y Gordon, 1988; Lawson y cols., 1990c; Banati y Graeber, 1994; rev. Barron, 1995; rev. Kreutzberg, 1995) y que en el cerebro se encuentran tanto en materia gris como en materia blanca, aunque son más abundantes en la primera (del Río-Hortega, 1920, 1921a y 1932; Innocenti y cols., 1983; Perry y cols., 1985; rev. Perry y Lawson, 1992; rev. Perry, 1993; rev. Kreutzberg, 1995). Por su morfología, el periodo de desarrollo en que aparecen y su función, se distinguen tres tipos de células de microglía: ameboide, ramificada y reactiva.

La **microglía ameboide** se asemeja en su morfología a los macrófagos periféricos, ya que posee un cuerpo celular grande, del que pueden partir un pequeño número de procesos, aunque también puede carecer de éstos. Como los macrófagos, la microglía ameboide posee capacidad migratoria (Rieske y cols., 1989) y de adhesión a superficies (Frei y cols., 1988; Giulian y Baker, 1986; Suzumura y cols., 1987). Ultraestructuralmente, la microglía ameboide se diferencia de la microglía ramificada, que veremos a continuación, no solamente por su morfología sino también por contener en su citoplasma numerosas vacuolas y lisosomas densos (del Río-Hortega, 1932; Vaughn y Peters, 1968; Stensaas y Reichert, 1971; Ling, 1976a; Imamoto y Leblond, 1978; Murabe y Sano, 1982b; Fujimoto y cols., 1987; Ashwell, 1990, 1991; Wu y cols., 1994; Dalmau y cols., 1997). Este tipo de célula microglial es muy abundante en cerebro en etapas tempranas de desarrollo, y sobre todo, durante el proceso de muerte neuronal fisiológica. Se postula que el elevado número de células ameboides que se observan durante esta etapa del desarrollo, se debe a la capacidad de proliferación de las mismas (rev. Castellano y González, 1996).

El papel fundamental que desempeñan las células de microglía ameboide en

el periodo de muerte neuronal fisiológica es el de limpieza del tejido nervioso, eliminando los desechos de las neuronas que degeneran (Ling, 1976; Murabe y Sano, 1982b; Hume y cols., 1983; Innocenti y cols., 1983; Perry y cols., 1985; Fujimoto y cols., 1987; Ashwell, 1989, 1990, 1991; Ashwell y cols., 1989; Cuadros y cols., 1993); sin embargo, también se ha postulado que en este periodo pueden intervenir en sinaptogénesis y gliogénesis por secretar NTs y factores de crecimiento (rev. Nakajima y Kohsaka, 1993).

Con la progresión del desarrollo del SNC, la microglía ameboide desaparece (rev. Barron, 1995; rev. Ling y Wong, 1993), y es sustituida por la **microglía ramificada**. Ésta se caracteriza por presentar cuerpo celular pequeño y numerosos procesos, que suelen estar profusamente ramificados. Ultraestructuralmente, a diferencia de la microglía ameboide, la microglía ramificada carece de vacuolas, cuerpos densos y fagosomas (Peter y cols., 1976; Fujimoto y cols., 1987). Aunque no se ha podido demostrar para la totalidad de la microglía ramificada, se postula que al menos una parte de ella deriva de la microglía ameboide, y de hecho, coincide la desaparición de esta última con la aparición y aumento en densidad de las células de microglía ramificada (Ling y Tan, 1974; Torvick, 1975; Ling, 1976; Imamoto y Leblond, 1978; Ling y cols., 1980; Murabe y Sano, 1982b; Perry y cols., 1985; Giulian y Baker, 1986; Fujimoto y cols., 1987; Jordan y Thomas, 1988; Kaur y Ling, 1991; Ling y Wong, 1993; Cuadros y cols., 1994; Wu y cols., 1994; Dalmau y cols., 1997; rev. Barron, 1995; rev. Castellano y González, 1996). Además, estudios recientes *in vitro* han podido secuenciar la transformación de microglía ameboide en microglía ramificada (cultivos de hipocampo de rata en desarrollo; rev. Castellano y González, 1996), comprobando que el proceso se completa en un periodo de tiempo comprendido entre los 7 y 14 días. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios realizados *in vivo*, en cerebro de rata en desarrollo, en los que se observa que al principio de la tercera semana del periodo post-natal comienzan a desaparecer las células de microglía ameboide y aparecen células de microglía ramificadas (Ling y Tan, 1974; rev. Ling y Wong, 1993).

Hace solamente unos años se postulaba que la microglía ramificada se encontraba en parénquima nervioso como microglía inactiva, al menos en lo referente a sus funciones de migración, proliferación y fagocitosis (Peters y cols., 1976; rev. Perry y Lawson, 1992; rev. Thomas, 1990), por lo que estas células se denominaron células de microglía quiescente o residente. Sin embargo, recientemente se ha documentado *in vitro* que este tipo de célula microglial posee cierta capacidad de endocitosis y pinocitosis (Glenn y cols., 1991; Ward y cols., 1991), por lo que se le

atribuye la función de limpieza de sustancias del espacio extracelular (Fabian y Aronson, 1978; Pow y cols., 1989). También se ha documentado la capacidad de este tipo de célula microglial para realizar cortos desplazamientos, mediante acortamiento y alargamiento de sus procesos (Ward y cols., 1991; rev. Thomas, 1990). Además, ante determinados estímulos medioambientales lesivos o en enfermedades degenerativas, las células de microglía ramificada sufren cambios morfológicos, concretamente la retracción de sus procesos, transformándose así en células con perfil redondeado o de bastón (Murabe y cols., 1981), semejantes a los macrófagos. Además, también se producen en ellas cambios moleculares, comenzando a expresar diversas moléculas características de macrófagos (rev. Thomas, 1992; rev. Ling y Wong, 1993; rev. García-Segura y cols., 1996), como los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (Matsumoto y cols., 1986; Kiefer y Kreutzberg, 1991) o la vimentina (Graeber y cols., 1988b). Estas células también producen citocinas, igual que lo hacen los macrófagos de línea monocítica, como las interleucinas (Dickson y cols., 1993; Banati y Graeber, 1994), el factor de necrosis tumoral (Sawada y cols., 1989; Dickson y cols., 1993; Kiefer y cols., 1993), el factor estimulante de la colonización de macrófagos (Raivich y cols., 1996; Liu y cols., 1994) y el factor de transformación del crecimiento (rev. Kiefer y cols., 1995). Además, estas células pueden adquirir capacidad fagocítica y de secreción de sustancias citotóxicas, como los intermediarios de oxígeno reactivo, aminoácidos excitatorios y el ácido quinoleico (Colton y Gilbert, 1987; Giulian y cols., 1993; rev. Kreutzberg, 1996; rev. Streit, 1996).

Todos los cambios que acabamos de describir, y que ocurren en las células de microglía ramificada ante estímulos lesivos o en enfermedades degenerativas, determinan que la célula ramificada se convierta en el tercer tipo de célula microglial, denominada **microglía reactiva** (Del Río-Hortega, 1932; Torvick, 1975; Graeber y cols., 1988b; Jordan y Thomas, 1988; Schnitzer y Scherer, 1990; Gehrman y Kreutzberg, 1991; Nakagawa y cols., 1996; rev. Streit y cols., 1988). Estas células de microglía reactiva son un tipo celular transitorio, que se observa en tejido nervioso adulto dañado. Estas células son capaces de fagocitar a las neuronas degeneradas, y ultraestructuralmente se asemejan a las células de microglía ameboide (Murabe y cols., 1981; rev. Jordan y Thomas, 1988), si bien pueden exhibir morfología ramificada, similar a la descrita en las células de microglía residente (rev. Barron, 1995). Se ha identificado este tipo de célula microglial en lesiones naturales y experimentales, así como en diversas enfermedades degenerativas del SNC (Fujita y Kitamura, 1976; Murabe y Sano, 1982a; Matsumoto y cols., 1986; Jordan y Thomas, 1988; Gras y cols., 1990; Weinstein y cols., 1990; Dickson y cols., 1991; Gehrman y

cols., 1992; Thomas, 1992; McGeer y cols., 1993; Banati y cols., 1995; rev. Barron, 1995; rev. Kreutzberg, 1995; rev. Moore y Thanos, 1996).

Algunos autores distinguen también un cuarto tipo de célula microglial: la **microglía perivascular** (Graeber y Streit 1990; Streit y Graeber, 1993; rev. Moore y Thanos, 1996). Este tipo celular se ha localizado, o por fuera de la membrana basal de los vasos sanguíneos, o englobado dentro de ésta, extendiendo desde ahí sus procesos hacia el parénquima nervioso.

Se postula que las células de microglía ramificada pueden transformarse en microglía reactiva, y viceversa, en presencia de adecuados estímulos medioambientales (rev. Jordan y Thomas, 1988; rev. Streit y cols., 1988). De hecho, se ha documentado *in vitro* una gran capacidad de las células de microglía para modificar su morfología (Giulian y Baker, 1986; Suzumura y cols., 1990 y 1991). En cualquier caso, los tres primeros tipos morfológicos descritos tienen funciones distintas en SNC.

En el cerebro adulto no lesionado se ha documentado la existencia de dos de los cuatro tipos microgliales: las células de microglía ramificada y las células perivasculares. Las células de microglía ramificada de cerebro adulto pueden tener morfología diferente dependiendo del tejido en el que se encuentran y por ello se postula que su fenotipo depende de las características histológicas del tejido que las circunda (Lawson, 1990; Vela y cols., 1995; rev. Perry y Gordon, 1991). En la sustancia gris del SNC maduro, las células de microglía ramificada tienen morfología estrellada y adquieren una disposición característica, formando un mosaico regular en el que los procesos de cada célula no se solapan con los de células vecinas (Innocenti y cols., 1983; Lawson y cols., 1990c; Castellano y cols., 1991b y c; Perry y Lawson, 1992; Cuadros y cols., 1994; Vela y cols., 1995b). El espacio que ocupa cada célula se ha denominado *territorio de proyección*, siendo el área del mismo y la distancia entre células vecinas factores constantes en cada tejido (Innocenti y cols., 1983; Cuadros y cols., 1994). Se ha postulado que los territorios de proyección tienen su origen en un mecanismo de inhibición por contacto, regulado a su vez por enzimas proteolíticos producidos por estas células (Giulian y cols., 1986). La densidad de las células microgliales varía mucho de un tejido a otro, y en la actualidad no se conoce con certeza las causas que justifican su patrón de distribución; sin embargo, se han propuesto diferentes hipótesis, como su relación con el desarrollo de la vascularización (Hume y cols., 1983 –retina–; Perry y cols., 1985; Fujimoto y cols., 1987), con la presencia de determinados neurotransmisores (Castellano y cols., 1990, 1991c; rev. Castellano y González, 1996) o con la maduración de la barrera

hemato-encefálica (Boya y cols., 1987; Perry y Gordon, 1988; Lawson, 1990c; Cuadros y cols., 1993, 1994 y 1997; Navascués y cols., 1994 y 1995; Perry, 1997; Dalmau y cols., 1997). También se postula que existe un paralelismo en los patrones de distribución de las células de microglía y de los astrocitos (rev. Castellano y González, 1996).

1.4.2 ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA

Existen algunas discrepancias entre diferentes autores en cuanto al origen de las células de microglía y los precursores de los que derivan. Actualmente existen dos teorías: una que apoya el origen mesodérmico de estas células, y otra que propone para las mismas un origen neuroectodérmico.

La **teoría mesodérmica** postula que las células de microglía pueden derivar de las meninges (Boya y cols., 1979; Matthews, 1974), del plexo coroideo (Sturrock, 1978; Murabe y Sano, 1982b; Matsumoto e Ikuta, 1985), de monocitos sanguíneos (Ling y cols., 1980; Hume y cols., 1983 –retina–; Perry y cols., 1985; Matsumoto y Fujiwara, 1987; rev. Castellano y González, 1996) o de pericitos (Barón y Gallego, 1972; Stensaas, 1975; Gallego, 1976). Según esta teoría, precursores mesodérmicos penetrarían en el parénquima cerebral en los primeros estadios del desarrollo embrionario y se diferenciarían en microglía ameboide. Posteriormente, al finalizar el desarrollo del SNC, la microglía ameboide se transformaría en microglía ramificada que se integraría en el tejido nervioso. Concuerda con esta hipótesis el hecho de que las células de microglía exhiban antígenos de superficie comunes a macrófagos periféricos (rev. Nakajima y Kohsaka, 1996), que tengan capacidad fagocítica y que puedan secretar citocinas y citotoxinas (Giulian y cols., 1986, 1993; Bock y cols., 1996; Kozak y cols., 1997; rev. Barron, 1995; rev. Benveniste, 1995b; rev. Lipton y cols., 1998).

La **teoría neuroectodérmica** postula que, tanto las células de microglía, como los oligodendrocitos y astrocitos derivan de unas células madre comunes, los glioblastos, de origen neuroectodérmico. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que las células de microglía y los astrocitos son reconocidos por algunos anticuerpos monoclonales comunes, como el LN-1 (Dickson y Mattiace, 1989; rev. Nakajima y Kohsaka, 1996).

1.4.3 FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA EN EL TEJIDO NERVIOSO

Durante mucho tiempo se pensó que el único papel que las células de

microglía tenían en SNC era el de fagocitar los residuos de las neuronas muertas (del Río-Hortega, 1932). En la actualidad se sabe que las células de microglía desempeñan otras muchas funciones, algunas de las cuales iremos desarrollando a continuación.

1.4.3.1 Papel de las células de microglía en el desarrollo y homeostasis del SNC

En el proceso de muerte neuronal fisiológica que tiene lugar durante el desarrollo del SNC (Oppenheim, 1991a), se ha postulado que al menos una parte de las neuronas mueren por apoptosis. Durante este proceso, las células de microglía ameboides se encargan de fagocitar los desechos celulares derivados de la degeneración neuronal o de la remodelación de fibras (Hume y cols., 1983; Perry y cols., 1985; Ashwell, 1989; Ashwell y cols., 1989; rev. Jordan y Thomas, 1988; rev. Ling y Wong, 1993; rev. Moore y Thanos, 1996) y de eliminar selectivamente cierto número de conexiones sinápticas (Ferrer y cols., 1990). Además, se postula que las células de microglía pueden intervenir en la muerte de las neuronas en este periodo de muerte neuronal fisiológica, ya que se ha documentado *in vitro* la capacidad de las células de microglía ameboides para inducir muerte neuronal en cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro de embrión de rata, mediante la producción de intermediarios de oxígeno reactivo (Théry y cols., 1991). También se ha documentado que, durante el desarrollo, las células de microglía producen NGF, que induce la muerte de las neuronas en el periodo de muerte neuronal fisiológica mediante la activación del receptor p75 (Frade y Barde, 1998).

Además de eliminar los desechos de las neuronas degeneradas en el proceso de muerte neuronal fisiológica, y de los posibles efectos citotóxicos sobre las neuronas durante el mismo, se postula que durante el desarrollo las células de microglía actúan como línea de defensa mientras se completa la maduración de la barrera hemato-encefálica (Xu y Ling, 1994; Xu y cols., 1993). Así, se ha documentado en cerebro en desarrollo que las células de microglía ameboides fagocitan sustancias extrañas que, administradas por vía endovenosa o intraperitoneal, llegan hasta algunos lugares del cerebro atravesando la barrera hemato-encefálica inmadura (Xu y Ling, 1994; Xu y cols., 1993). Posiblemente, la maduración de esta barrera sería una de las señales para la transformación de la microglía ameboides en microglía ramificada (Xu y cols., 1993; Wu y cols., 1993). Se postula que, tras el cierre de la barrera hemato-encefálica, las células de microglía que han actuado como macrófagos eliminando sustancias extrañas o desechos de neuronas muertas durante el periodo de muerte neuronal fisiológica, quedarían

atrapadas en el parénquima cerebral, y se transformarían entonces en células de microglía ramificada (rev. Moore y Thanos, 1996).

Pero además de tomar parte en la muerte neuronal o de actuar de defensa durante el desarrollo, las células de microglía también pueden jugar otros papeles a lo largo del mismo, secretando, por ejemplo: una citocina, la interleucina-1 (Giulian y cols., 1986; Giulian y cols., 1988a y b) y factores promotores de glía (Giulian y Young, 1986) que estimulan la formación de astrocitos; NGF, que promueve el crecimiento neuronal (Mallat y cols., 1989); bFGF (Shimojo y cols., 1991) y que actúa como factor neurotrófico para numerosas neuronas del SNC; elastasa y activador del plasminógeno (Nakajima y cols., 1992; rev. Nakajima y Kohsaka, 1996), que pueden romper moléculas de la matriz extracelular del SNC y contribuir por tanto a la neuritogénesis y extensión de neuritas (Nagata y cols., 1993; Nakajima y Kohsaka, 1993; rev. Nakajima y Kohsaka, 1996), postulándose por ello que las células de microglía juegan un papel en la estructuración e histogénesis del SNC.

También se ha postulado que las células de microglía intervienen de alguna forma en la transmisión sináptica (Kreutzberg y cols., 1978; rev. Castellano y González, 1996), y en la formación y mantenimiento de sinapsis axo-dendríticas (Murabe y Sano, 1982b) y por tanto, en el desarrollo y plasticidad del SNC (rev. Castellano y González, 1996). A este respecto, se ha documentado la presencia en la membrana de estas células de los enzimas: 5' nucleotidasa (Sjöstrand, 1966; Kreutzberg y Barron, 1978; Kreutzberg y cols., 1978), adenosina 5' trifosfatasa (ATPasa) (Ibrahim y cols., 1974) y purino-nucleósido fosforilasa (PNPasa) (Castellano y cols., 1990), los cuales intervienen como neurotransmisores o neuromoduladores en el cerebro (Kreutzberg y cols. 1978; Castellano y cols., 1991b).

1.4.3.2 Papel de las células de microglía en las lesiones y enfermedades del tejido nervioso.

En diversos tipos de lesión de tejido nervioso: en procesos degenerativos, inflamatorios y de respuesta del sistema inmunitario, las células de microglía ramificada del cerebro adulto se activan transformándose en fagocitos, que se encargan de eliminar los desechos celulares de las neuronas que han muerto (del Río-Hortega, 1932; Thanos, 1991a y b; Thanos y cols., 1992; Thanos y cols., 1994; Kacza y Seeger, 1997). Se postula que la función fagocítica de las células de microglía tiene como fin impedir que residuos tóxicos provenientes de células muertas dañen a las neuronas sanas circundantes a las mismas (Giulian y cols., 1993). Además, se ha postulado que, al igual que en el proceso de muerte neuronal

fisiológica, la fagocitosis no es la única función que las células de microglía pueden llevar a cabo en casos de lesión del SNC, y que posiblemente intervengan activamente en la muerte o supervivencia de las neuronas afectadas, bien mediante la secreción de sustancias citotóxicas (Boje y Arora, 1992; Giulian, 1993; Giulian y cols., 1993; Li y cols., 1996) o mediante la producción de factores neurotróficos (Mallat y cols., 1989; Shimojo y cols., 1991; Elkabes y cols., 1996; Heese y cols., 1997; Miwa y cols., 1997; Heese y cols., 1998a y b).

Para estudiar el tipo de respuesta y las posibles funciones de las células de microglía en la **lesión del tejido nervioso** se han empleado numerosos modelos experimentales. De todos ellos, revisamos aquellos que parecen tener mayor relevancia para nuestro estudio, como son la sección del nervio facial, la sección del nervio óptico y la isquemia cerebral.

1.4.3.2.1 Activación microglial en la sección del nervio facial

En la sección del nervio facial se produce una activación microglial en el núcleo del citado nervio, que determina cambios en el fenotipo de las células de microglía y en la densidad de las mismas. Así, a las 24 horas de la lesión, las células de microglía aumentan la síntesis del factor estimulante de la colonización de macrófagos (M-CSF), lo que induce un incremento en la densidad microglial a las 48 horas de la lesión, que se cree debido a mitosis o proliferación de las células de microglía (Raivich y cols., 1991). También se observa a las 24 horas de la lesión que las células de microglía presentan una sobre-regulación del receptor del complemento tipo 3 (RC3) (Graeber y cols., 1988a y b; Morioka y Streit, 1991; Gehrman y cols., 1992; Streit y Graeber, 1993; Gehrman y Banati, 1995; rev. Streit, 1996), de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH-I) y del receptor de la región Fc de la inmunoglobulina (RFc) (Streit y cols., 1989b; Streit y Graeber, 1993; rev. Streit y cols., 1988). Transcurridos siete días de la lesión, se produce expresión prolongada de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH-II), aunque esta respuesta se circunscribe a una pequeña parte de la población microglial afectada (Streit y cols., 1989b; Streit y Graeber, 1993). La expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad por parte de las células de microglía, permite que las mismas actúen como presentadoras de antígenos a los linfocitos T (Hickey y Kimura, 1988; Streit y cols., 1989b). Además, las células de microglía activadas por esta lesión expresan también la vimentina -proteína fibrosa del citoplasma- (Graeber y cols., 1988b) y diversas citocinas (Frei y cols., 1988), y aumenta en ellas la expresión de

los antígenos reconocidos por los anticuerpos MUC 101 y MUC 102, que también son expresados por macrófagos de línea monocítica (Gehrmann y Kreutzberg, 1991).

La sección del nervio facial no induce la degeneración retrógrada y muerte de las neuronas del núcleo de este nervio, por lo que la característica fundamental de la respuesta de las células de microglía en esta lesión es que los cambios que se producen en el fenotipo de estas células no determinan que las mismas se transformen en células fagocíticas. No se conoce con exactitud el papel de la activación microglial en este tipo de lesión. Sin embargo, se ha documentado que, cuando se complementa la sección del nervio facial con una inyección de toxina de *Ricinus communis* (Streit y cols., 1989b), que induce la muerte de las neuronas del núcleo del facial, las células de microglía sí se transforman en fagocíticas, eliminando los desechos de las neuronas muertas. De los resultados obtenidos en este modelo experimental, se ha postulado la existencia de una respuesta diferente o escalonada de las células de microglía a los distintos tipos de lesión (Perry y Gordon, 1988; rev. Jordan y Thomas, 1988; rev. Kreutzberg, 1996; rev. Streit y cols., 1988), de manera que la transformación de la microglía ramificada en microglía fagocítica dependería de la gravedad de la lesión producida. Si la lesión es leve, las células de microglía sufrirían las modificaciones fenotípicas descritas en la lesión del nervio facial, no llegando a transformarse en células fagocíticas. Si la profundidad de la lesión diera lugar a la degeneración de las neuronas y las sinapsis, entonces las células de microglía adquirirían capacidad para fagocitar los residuos y transformarse en células potencialmente citotóxicas (Streit, y cols., 1988; rev. Kreutzberg, 1996; rev. Perry y Gordon, 1991; rev. Streit, 1996). Algunos autores han denominado “plasticidad funcional” a esta capacidad de las células de microglía para transformarse o no en células fagocíticas según las necesidades del tejido (rev. Streit y cols., 1988).

1.4.3.2.2 Activación microglial en la isquemia cerebral

En situaciones de isquemia transitoria del SNC, las células de microglía sufren cambios fenotípicos en cuestión de minutos tras la isquemia (Brierley y Brown, 1982; Morioka y cols., 1991) comenzando a expresar complejo mayor de histocompatibilidad II y el receptor del complemento tipo 3. Además, una subpoblación de las mismas expresa también antígeno común leucocitario (Finsen y cols., 1993; rev. Moore y Thanos, 1996). La rapidez de la respuesta de las células de microglía en este tipo de lesión ha llevado a algunos autores a postular que las células de microglía son la primera línea de defensa ante el daño isquémico (rev.

Barron, 1995; rev. Gehrman y cols., 1995). Se ha documentado que, al menos en algunos modelos de isquemia cerebral experimental (Brierly y Brown, 1982; Morioka y cols., 1991; rev. Moore y Thanos, 1996), las células de microglía tienen una capacidad limitada de fagocitosis de las neuronas lesionadas, contrariamente a lo que ocurre en otros tipos de lesión, por ejemplo, en la lesión del nervio facial seguida de inyección de toxina de *Ricinus communis* (Streit y Kreutzberg, 1988; Morioka y Streit, 1991) o tras la sección del NO (ver más adelante). Se postula que las diferencias en los cambios fenotípicos sufridos por las células de microglía tras distintos tipos de lesión podrían estar relacionadas con la existencia de distintas vías de muerte neuronal (rev. Moore y Thanos, 1996), y la participación de las células de microglía tan solo en algunas de ellas. Por otra parte, el hecho de que las células de microglía puedan producir, por una parte, sustancias citotóxicas, como el glutamato, el ON o los radicales libres (Colton y Gilbert, 1987; Piani y cols., 1991; Boje y Arora, 1992) y por otra, sustancias que protegen del daño isquémico, como interleucina-1 y el factor de transformación del crecimiento-beta (Lees, 1993), hace postular que las células de microglía pueden desempeñar un papel de modulación en los procesos de isquemia y edema cerebral (Banati y Graeber, 1994), más que de eliminación de los desechos de las neuronas muertas.

1.4.3.2.3 Activación microglial en otros tipos de lesión

Se ha documentado la participación de las células de microglía en otras lesiones del SNC, como la respuesta inmune, donde las células de microglía expresan diversos antígenos de superficie que intervienen en el reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T (Suzumura y cols., 1987; Perry y Gordon, 1988; rev. Benveniste, 1992; rev. Gehrman y cols., 1995; rev. Moore y Thanos, 1996), en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA; Dickson y cols., 1993; Dickson y cols., 1991), en las enfermedades de Parkinson (McGeer y cols., 1988) y de Alzheimer (McGeer y cols., 1987; McGeer y cols., 1993; Perlmutter y cols., 1990 y 1992; Dickson y cols., 1993; Li y cols., 1996) y en la esclerosis múltiple (Woodroffe y cols., 1986).

1.4.3.3 Células de microglía y citotoxicidad

Se postula que el papel de las células de microglía en la lesión del SNC no se limita al de fagocitar las neuronas degeneradas, sino que podrían actuar como agentes neurotóxicos, a través de la secreción de sustancias citotóxicas. A este respecto, se ha documentado la capacidad de las células de microglía para producir

in vitro sustancias que inducen la muerte neuronal, como glutamato (Piani y cols., 1991), óxido nítrico (Chao y cols., 1992) y peróxido de hidrógeno (Giulian y Baker, 1986). También producen estas sustancias *in vivo*, y así, en lesiones isquémicas cerebrales experimentales llevadas a cabo en animales de experimentación, se ha demostrado que las células de microglía producen estas mismas sustancias neurotóxicas (Colton y Gilbert, 1987; Boje y Arora, 1992; rev. Wozniak, 1998), por lo que podrían contribuir al daño neuronal inducido por la isquemia (Morioka y cols., 1993; Gherman y cols., 1995). También se ha observado la producción de óxido nítrico por parte de las células de microglía en modelos experimentales *in vivo* en los que se ha producido activación de las mismas con citocinas como el interferon gamma o el factor de necrosis tumoral-alfa (rev. Banati y cols., 1993) o endotoxinas como el lipopolisacárido (endotoxina contenida en las paredes celulares de bacterias Gram-negativas, capaz de inducir uveítis), aunque en este caso lo hacen a través de la génesis de intermediarios de óxido nítrico (rev. Nomura y Kitamura, 1993). En procesos degenerativos como el Parkinson o el Alzheimer las células de microglía producen también óxido nítrico (li y cols., 1996; rev. Meldrum y Garthwaite, 1990) y glutamato (rev. Meldrum y Garthwaite, 1990), que pueden mediar en el daño neuronal.

Las células de microglía pueden intervenir también en otras enfermedades humanas como en el daño neuronal en pacientes afectados de SIDA, mediante la producción de neurotoxinas (Giulian y cols., 1990), la activación de receptores N-metil-D-aspartato (rev. Lipton, 1992) o la producción de factor de necrosis tumoral-alfa e interleucina-1-beta (Tyor y cols., 1993; Dickson y cols., 1993), si bien otros autores postulan que intervienen en dicha lesión neuronal a través de la modificación de las relaciones microglía-astrocitos, que induce una alteración en la homeostasia del SNC (Dickson y cols., 1991).

Se ha documentado también que las células de microglía activada secretan factor de necrosis tumoral-alfa *in vitro* (Sawada y cols., 1989), y se postula que esta citocina puede mediar en los efectos de las células de microglía en algunos tipos de lesión, ya que se ha documentado que tiene efectos citotóxicos sobre las células productoras de mielina (Selmaj y Raine, 1988). De hecho, se postula que esta citocina media en la lisis de oligodendrocitos inducida por las células de microglia *in vitro* (Merril y cols., 1993) y en la muerte de las CGR tras la sección del NO, ya que el factor inhibidor de macrófagos (MIF; Auriault y cols., 1983; Plata-Salamán, 1991; Thanos y cols., 1993) que disminuye *in vitro* la expresión del factor de necrosis tumoral-alfa por parte de las células de microglía activada (Rogove y Tsirka, 1997),

aumenta la supervivencia de las CGR tras la citada lesión (Thanos y cols., 1993).

Por último se ha visto que las células de microglía activada producen la catepsina B/L (rev. Banati y cols., 1993), enzima lisosomal que degrada tanto la mielina como las proteínas de la matriz extracelular (rev. Banati y cols., 1993); además, las células de microglía activadas producen *in vitro* el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (Nakajima y cols., 1992; Rogove y Tsirka, 1997; rev. Banati y cols., 1993), que también degrada la mielina e interviene en neurodegeneración (Rogove y Tsirka, 1997). Por todo ello, se postula que las células de microglía podrían intervenir en procesos desmielinizantes y de remodelación del SNC (Rogove y Tsirka, 1997; rev. Banati y cols., 1993).

Además de producir diversas sustancias citotóxicas, las células de microglía activada pueden inducir muerte neuronal en distintos tipos de lesión a través de otras vías, como interviniendo en alguno de los pasos del proceso de apoptosis. Se ha demostrado que cuando se induce experimentalmente isquemia cerebral en hipocampo (*en gerbo*), se produce activación y aumento de la inmuno-reactividad del enzima convertidor de interleucina-1-beta (ver más adelante, en sección de Apoptosis) en las células de microglía (Bhät y cols., 1996). El enzima convertidor de interleucina-1-beta promueve la transformación de la pro-interleucina-1-beta en interleucina-1-beta (Cerretti y cols., 1992; Thornberry y cols., 1992), que interviene en procesos inflamatorios, por lo que este enzima mediaría en la toxicidad celular mostrada por las células de microglía en este tipo de lesión (Bhät y cols., 1996).

1.4.3.4 Células de microglía y neuroprotección

Además de la capacidad fagocítica y posiblemente citotóxica de las células de microglía, se postula que estas células pueden ejercer efectos neurotróficos, pues se ha documentado que las células de microglía pueden secretar *in vitro* ciertos factores neurotróficos, como por ejemplo, NGF, BDNF, NT3, NT4/5, bFGF, y factor de transformación del crecimiento (Shimojo y cols., 1991; Elkabes y cols., 1996; Heese y cols., 1998a; rev. Streit, 1996), así como expresar receptores para los mismos. La producción de estos factores neurotróficos por parte de las células de microglía está sujeta a variaciones temporales y, en algunos casos, a la existencia o no de lesión. A este respecto, se ha documentado que algunas poblaciones de células de microglía de cerebro de rata neonatal expresan NGF y NT3 y, en cantidades muy pequeñas, BDNF (Elkabes y cols., 1996; Miwa y cols., 1997). Además, tras ser activadas con aminoácidos excitatorios como el ácido kaínico o con lipopolisacárido, algunas poblaciones de células de microglía de cerebro de rata embrionaria y neonatal

expresan NGF, p75, TrKA, TrKB y TrKC (Mallat y cols., 1989; Elkabes y cols., 1998; Heese y cols., 1998b), o sufren un incremento en la expresión de BDNF (Miwa y cols., 1997), NT3 y TrKC (Elkabes y cols., 1998) mientras que sufren una disminución en la expresión de TrKA (Elkabes y cols., 1998).

El hecho de que las células de microglía tengan capacidad para producir algunas NTs y que expresen receptores para las mismas, indica que puede existir una regulación autocrina de las funciones de las células de microglía por medio de estas NTs. Pero también es posible que las NTs producidas por las células de microglía actúen sobre neuronas próximas con capacidad para responder a dichas NTs, ejerciendo de esta forma un papel neuroprotector. Existen discrepancias en cuanto a si las células de microglía de cerebro de rata neonatal expresan NT3 ya que algunos autores no encuentran producción de la citada NT en cultivos de células de microglía procedentes de cerebro de rata neonatal (Miwa y cols., 1997), mientras que otros autores sí han documentado expresión de la NT3 en las mismas condiciones (Elkabes y cols., 1996), por lo que se postula la existencia de diferentes subpoblaciones de células de microglía capaces de expresar distintas NTs y por tanto, de asumir diferentes funciones. Además, estos últimos autores han documentado *in vivo* que la NT3 se expresa tan solo en células de microglía de cerebro de rata neo-natal (Elkabes y cols., 1996), lo que sugeriría que, al menos en una subpoblación de células de microglía, se produce una disminución en la expresión de la NT3 con la maduración, es decir, cuando aparecen las células de microglía ramificada. Este hecho indicaría que las células de microglía podrían intervenir en la citoarquitectura del SNC así como en procesos de regeneración tras diversos tipos de lesión, por medio de la producción de la NT3, puesto que se ha documentado expresión de esta NT en células de microglía neonatal y en células de microglía activada tras la lesión (Elkabes y cols., 1996).

En cerebro de pacientes con SIDA, las células de microglía activadas y las células gigantes multinucleadas (algunos autores postulan que estas últimas pueden ser agrupaciones de células de microglía; Dickson y cols., 1991) producen BDNF, mientras que los astrocitos y cuerpos celulares de neuronas localizadas en los tejidos cerebrales dañados expresan TrKB, por lo que se postula que de alguna manera las células de microglía activada pueden intervenir en la supervivencia neuronal y la respuesta astrogliar en la citada enfermedad por medio de la producción de dicha NT (Soontornnijkij y cols., 1998).

Se ha documentado *in vitro* que las citocinas interleucina-1-beta y el factor de necrosis tumoral-alfa, y el receptor del complemento tipo 3, todos ellos

mediadores de procesos inflamatorios en SNC, pueden aumentar la producción del NGF en las células de microglía humana activadas (Heese y cols., 1998a), lo que puede indicar que las células de microglía intervienen en la degeneración y regeneración del SNC tras la lesión mediante la producción de NGF. Así, se ha documentado *in vivo* que la lesión de médula espinal en ratas aumenta la expresión del NGF por parte de numerosas células de microglía activada (Krenz y Weaver, 2000).

También se postula que las células de microglía activadas tras la lesión del núcleo estriado pueden intervenir en el crecimiento axonal de las neuronas dopaminérgicas produciendo BDNF, que es un potente factor trófico dopaminérgico (Batchelor y cols., 1999).

Las células de microglía presentan receptores A2, a través de los cuales la adenosina es capaz de producir activación microglial (Fiebich y cols., 1996; Gebicke-Haerter y cols., 1996). Las células de microglía activadas por la unión de la adenosina a los receptores A2 de las mismas producen NGF (Heese y cols., 1997). Además, la adenosina es producida en grandes cantidades por las neuronas en condiciones patológicas, lo que a su vez induciría la producción de NGF por parte de las células de microglía, explicándose de esta forma los efectos neuroprotectores de la adenosina (rev. Rudolphi y cols., 1992a y b). Sin embargo, actualmente se postula que los nucleótidos y nucleósidos secretados en gran cantidad por las neuronas dañadas podrían tener efectos perjudiciales para las células nerviosas, y que las células de microglía actuarían como “neutralizadoras” de los mismos. De hecho se ha postulado que el mantenimiento de unos niveles aceptables de estos metabolitos por medio de la activación microglial podría marcar la diferencia entre regeneración y degeneración (rev. Castellano y González, 1996).

Aunque la producción de NTs por parte de las células de microglía puede estar asociada en su mayor parte con la supervivencia de las neuronas, se ha documentado que en retina de ratón en desarrollo, durante el proceso de muerte neuronal fisiológica, las células de microglía producen NGF (Frade y Barde, 1998) que al unirse a receptores p75 existentes en las CGR inducen muerte por apoptosis de las mismas (Frade y Barde, 1999).

Además de los efectos que las células de microglía pueden tener a través de la producción de distintas NTs, en algunas lesiones del sistema nervioso como la isquemia, el efecto neuroprotector de las células de microglía podría estar mediado por la producción, por parte de las mismas, de la interleucina-1 y factor de

transformación del crecimiento-beta-1, que protegen del daño originado por la citada lesión (Lees, 1993) y favorecen el crecimiento axonal. Sin embargo, en otros tipos de lesión, los efectos neuroprotectores de las células de microglía podrían estar relacionados con su capacidad para sobre-expresar genes directamente relacionados con la apoptosis, como es el caso del proto-oncogen bcl-2, (Urabe y cols., 1998), cuya expresión inhibe la apoptosis, evitando también el daño isquémico.

Por último, se postula que las células de microglía residente pueden actuar como detoxificantes del SNC (Castellano y cols., 1990 y 1991c; Thomas, 1990; Glenn y cols., 1991; Ward y cols., 1991; Navascués y cols., 1994; Vela y cols., 1995), ya que muestran cierta capacidad de endocitosis y pinocitosis en el SNC adulto en condiciones normales (Fabian y Aronson, 1978; Pow y cols., 1989; Ward y cols., 1991). Por ejemplo, se ha documentado la existencia de ferritina y hierro en las células de microglía de cerebro de rata (Benkovic y Connor, 1993) y el aumento de la densidad de células de microglía ricas en ferritina y hierro con la edad. Como el hierro es un oligoelemento tóxico para tejidos ricos en lípidos, como el cerebro (rev., Barron, 1995), se puede interpretar que la capacidad de las células de microglía para almacenar hierro a lo largo del tiempo es un mecanismo de protección contra los efectos tóxicos del exceso de hierro en el cerebro.

1.4.4 LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA DE LA RETINA

1.4.4.1 Células de microglía de la retina adulta

López-Enríquez (1926), fue el primer autor que documentó la presencia de células de microglía en retina y vías ópticas de mamíferos adultos (hombre, mono conejo y cerdo). En la retina, este autor localizó las células de microglía en CFN, CCG y CPI fundamentalmente, aunque sugirió que también podrían localizarse en capa nuclear interna. López-Enríquez (1926) observó que en estas capas las células de microglía adquirirían una distribución regular y que tras una lesión, tanto en retina como en vías ópticas lesionadas, las células de microglía ramificada se transformaban en células de bastón y en corpúsculos gránulo-adiposos, por lo que postuló que las células de microglía del sistema visual también poseían capacidad fagocítica. Estudios posteriores han corroborado la presencia de células de microglía en CFN, CCG y CPI en la retina de rata (Terubayashi y cols., 1984; Sanyal y de Ruiter, 1985), conejo (Vrabec, 1970; Schnitzer, 1989), mono (Vrabec, 1970; Gallego, 1976; Boycott y Hopkins, 1981) y gato (Gallego, 1976; Boycott y Hopkins, 1981). Además, algunos autores han identificado células de microglía en CPE de retinas de

rata, gato y mono (Vrabec, 1980; Boycott y Hopkins, 1981).

Las células de microglia de la CFN poseen morfología bipolar y se sitúan paralelas a los axones de las células ganglionares, como se ha documentado en retina de conejo adulto, (Schnitzer, 1989; Schnitzer y Scherer, 1990), disminuyendo su densidad desde la zona central hacia la periferia. En este animal, estos autores documentaron la presencia de escasos procesos en las células de esta capa, que penetran hacia capas más profundas. Sin embargo, en la CFN de la retina de gato y mono, Gallego (1976) postuló que las células de microglía se disponían anárquicamente.

En el resto de las capas de la retina de animal adulto las células de microglía tienen morfología ramificada y se disponen de forma regular. Gallego (1976) documentó dicha regularidad en la distribución de las células de microglía en la CPI de la retina de gato y mono, pero no en la distribución de las células situadas en la CCG, para las cuales documentó una disposición anárquica. Sin embargo, posteriormente otros autores documentaron que las células de microglía que se encuentran en la CCG de la retina de mamífero adulto en CCG siguen también una distribución regular, y que las células de microglía situadas en la CCG y CPI presentan la morfología típica de células de microglía residente de SNC adulto, es decir, poseen numerosos procesos estratificados, como se ha documentado en retina de rata y conejo (Terubayashi y cols., 1984; Schnitzer, 1989 –CPI-), y se distribuyen de forma característica y diferente a las que se localizan en la CFN. Dicha distribución característica, documentada en las CCG y CPI de la retina de la rata adulta y en desarrollo (Terubayashi y cols., 1984; Ashwell y cols., 1989; Thanos y cols., 1992) y de la retina humana adulta (Penfold y cols., 1991), y en la CPI de la retina de conejo adulto (Schnitzer, 1989; Schnitzer y Scherer, 1990), consiste en que las células de microglía se reparten a lo largo de dichas capas regularmente, formando un mosaico en el que cada célula ocupa un territorio delimitado, respetando el territorio de sus vecinas, no observándose solapamientos ni entre los procesos de las células de microglía que ocupan la misma capa (Schnitzer, 1989; Schnitzer y Scherer, 1990), ni entre los procesos de células que se encuentran en distintas capas (Thanos y cols., 1992). La única excepción a este patrón ha sido descrita en retina de codorniz, en la cual los procesos de las células de microglía vecinas se solapan entre sí (Navascués y cols., 1994). En la CPI de retina de conejo adulto se ha documentado que la densidad de células de microglía varía entre los distintos animales, aunque pertenezcan a la misma raza (Schnitzer y Scherer, 1990).

Respecto a la CPE, algunos autores no pudieron documentar la presencia de células de microglía en la retina de conejo adulto (Schnitzer, 1989) mientras que otros autores han documentado una densidad muy escasa de células de microglía NDPasa+ (Schnitzer y Scherer, 1990) en esta capa. Para marcar las células de microglía de la retina, estos autores han utilizado la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa, y la variabilidad de los resultados les ha hecho postular que las células de microglía de la CPE de la retina de conejo tienen una baja actividad NDPasa, lo que no permite la visualización de las células. Estos resultados han sido confirmados también por otros autores en retina de conejo adulto (Humphrey y Moore, 1995). Humphrey y Moore (1995) empleando la misma técnica de marcaje para las células de microglía en distintas razas de conejo adulto, encontraron diferencias en la intensidad del marcaje y en la densidad de células NDPasa+ en la CPE entre las distintas razas, y postularon que las diferencias en la actividad NDPasa así como en la densidad de las células en esta capa podrían estar relacionadas con la existencia de diferentes funciones para las células de microglía de esta capa de la retina en las distintas razas de conejos.

1.4.4.2 Respuesta de las células de microglía de la retina adulta a la lesión

Para el estudio de la respuesta a la lesión de las células de microglía de la retina en mamíferos, se han empleado diferentes modelos experimentales de daño retiniano, de los cuales vamos a revisar solamente la **lesión del nervio óptico**, por ser el modelo experimental que vamos a utilizar en este estudio. La lesión del NO a su salida del globo ocular, bien por sección del mismo, bien por aplastamiento, llevada a cabo en diferentes animales de experimentación, provoca siempre una activación de las células de microglía de la retina, que se manifiesta por una parte, por un aumento de la actividad NDPasa en la membrana de estas células, como se ha documentado en retina de conejo adulto (Schnitzer y Scherer, 1990), tras dos o cuatro días de la lesión, dependiendo de la capa retiniana considerada, y por otra, por la aparición de células de microglía fagocitando las neuronas degeneradas, como se ha documentado en retina de rata adulta empleando trazadores neuronales (Barron y cols., 1986; Thanos, 1991a; Kacza y Seeger, 1997), entre los días séptimo y octavo tras la lesión.

Se han observado diferencias en los cambios sufridos por las células de microglía tras la lesión según la capa de la retina donde se sitúan estas células, tanto en el tiempo transcurrido desde la lesión hasta que se producen los primeros cambios en las células de microglía, como en las alteraciones morfológicas sufridas por dichas

células como consecuencia de la lesión. Así, por ejemplo, con respecto al tiempo de respuesta, en retina de rata y conejo se ha documentado que tras la lesión del NO se produce un incremento transitorio de la densidad celular y el marcaje NDPasa de las células de microglía de la CFN entre las dos horas y los dos días, según el tipo de lesión (Barron 1986; Schnitzer y Scherer, 1990), mientras que el incremento en la densidad y el marcaje NDPasa de las células de microglía en CPI se produce a partir de los cuatro días de la lesión (Schnitzer y Scherer, 1990). Todos los cambios que se producen en las dos capas citadas de la retina de conejo tras la sección del NO se incrementan entre los 7 y 14 días de la lesión (Schnitzer y Scherer, 1990).

Con respecto a los cambios morfológicos y de distribución de las células de microglía de la retina tras la lesión, se ha documentado que las células de microglía de la retina de rata que se localizan en la CFN modifican su morfología, perdiendo las pocas ramificaciones que presentaban sus procesos y transformándose en células claramente bipolares (rev. Moore y Thanos, 1996), que siguen situándose paralelamente a los axones de las CGR. Sin embargo, en retina de conejo se ha documentado un aumento en el número de procesos de las células de microglía en esta capa (Schnitzer y Scherer, 1990). Contrariamente a lo que ocurre en la CFN, los cambios en la morfología de las células de microglía de la CCG y de la CPI no resultan tan evidentes, al menos en los distintos tipos de lesión estudiados. Así, se ha documentado que las células de microglía de la retina mantienen su forma ramificada y el patrón de distribución regular que presentaban antes de la lesión tras la sección del NO de rata y conejo adultos, tras el aplastamiento del NO de la rata adulta (Schnitzer y Scherer, 1990; Thanos, 1991a; Thanos y cols., 1994; rev. Moore y Thanos, 1996) y tras la fotocoagulación de la retina de conejo adulto con láser (Humphrey y Moore, 1996b). Sin embargo, tras la lesión del NO se ha documentado que se produce una retracción de los procesos de las células de microglía NDPasa+ de la CPI (Schnitzer y Scherer, 1990), motivada posiblemente por el incremento en la densidad de las mismas y la necesidad del mantenimiento de los territorios de proyección.

El empleo de trazadores neuronales fluorescentes como marcadores de las CGR ha permitido documentar que en la retina de rata las células de microglía se encargan de fagocitar las CGR muertas, y que las primeras células de microglía que aparecen fagocitando neuronas tras la lesión del NO son las situadas en la CFN y CCG, a los ocho días de la lesión (Thanos y cols., 1992). A partir de la segunda semana, aparecen células de microglía fagocitando restos de CGR degeneradas en CPI, produciéndose un aumento progresivo en la densidad de células de microglía en

esta última capa a medida que disminuye paulatinamente la densidad de células de microglía marcadas en la CCG (Thanos y cols., 1992). Se postula que estas variaciones en la densidad de células microgliales fagocíticas tras la lesión del NO en las distintas capas podrían ser debidas a mitosis o a migraciones de las células de microglía entre distintas capas de la retina. A este respecto se ha documentado la existencia de mitosis y migraciones de las células de microglía activada en la retina de rata (Barron y cols., 1986) y de conejo (Schnitzer y Scherer, 1990) tras seccionar el NO, así como migraciones entre distintas capas en la retina de conejo tras fotocoagulación con láser (Humphrey y Moore, 1996). En la actualidad no se conoce si el incremento de densidad de las células de microglía que se observa es producido, al menos en parte, por migraciones, por mitosis de las células de microglía o por llegada de macrófagos desde el torrente circulatorio, que se diferenciarían posteriormente en células de microglía.

Tras la sección del NO algunos autores han documentado un aumento en la densidad de las células de microglía en la CPE de la retina de conejo adulto (Schnitzer y Scherer, 1990). Además, estos autores han documentado que tras la sección del NO se pueden observar células de microglía marcadas con la técnica de la NDPasa en toda la extensión de la CPE (Schnitzer y Scherer, 1990), contrariamente a lo que ocurría en las retinas intactas (Schnitzer, 1989; Schnitzer y Scherer, 1990) en las cuales se observaban zonas de retina sin células marcadas en esta capa. Estos resultados han sido confirmados también por otros autores tras fotocoagular la retina de conejo adulto con láser (Humphrey y Moore, 1996). Además, Humphrey y Moore (1996) encontraron diferentes incrementos de intensidad de marcaje y de densidad de células de microglía NDPasa+ en la CPE tras fotocoagular la retina con láser, entre distintas razas de conejos adultos.

Se postula que todos los cambios que sufren las células de microglía tras la lesión de la retina, al igual que ocurre en el SNC, no tienen tan solo como fin la transformación de estas células en fagocíticas, que se encargarían de eliminar los desechos de las CGR que degeneran tras la lesión, sino que pueden relacionarse con la transformación de las células de microglía en células neurotóxicas, que intervendrían activamente en la muerte de las CGR. Esta hipótesis se ve apoyada por estudios realizados en ratas, los cuales documentan que la administración intravítrea de un factor inhibidor de macrófagos (Thanos y cols., 1993; rev. Thanos y cols., 1994) o de un factor inhibidor de proteasas (Thanos, 1991b) aumenta la supervivencia de las CGR tras la sección del NO y facilita su regeneración.

1.4.4.3 Implicación de las células de microglía en enfermedades degenerativas de la retina

Las células de microglía retiniana se activan también en diferentes enfermedades de la retina, como por ejemplo, en la distrofia hereditaria de fotorreceptores que se manifiesta en ratas RCS. En esta distrofia se ha observado cómo las células de microglía fagocitan a las CGR y a los fotorreceptores, desplazándose para ello desde las CCG y CPI, hasta la capa de fotorreceptores (Thanos y Richter, 1993; rev. Moore y Thanos, 1995). La llegada de las células de microglía a la capa de fotorreceptores se produce al final de la segunda semana de vida del animal, lo que indica que la activación de las células de microglía se produce antes de que comiencen a morir los fotorreceptores (Hollyfield, 1976), por lo que se postula que las células de microglía pueden intervenir de forma activa, mediante la secreción de sustancias citotóxicas, en la muerte de los fotorreceptores (Roque y cols., 1996; rev. Thanos y cols., 1995), como se ha demostrado *in vitro* (Roque y cols., 1999). De hecho, si se inhibe la migración de las células de microglía en ratas RCS por medio de la administración del factor inhibidor de macrófagos (MIF), la degeneración de los fotorreceptores se produce más lentamente (rev. Thanos y cols., 1995).

1.5 EL FACTOR INHIBIDOR DE MACRÓFAGOS

El Factor Inhibidor de Macrófagos (Macrophage Inhibiting Factor; MIF), también denominado "*fragmento 1-3 de Tuftsina*", es un tripéptido aislado de la cadena Fc de la inmunoglobulina G humana (Auriault y cols., 1983; Thanos y cols., 1993; rev. Plata-Salaman, 1991; rev. Thanos y cols., 1995), con capacidad para unirse a los receptores de Tuftsina existentes en células de origen monocítico (Auriault y cols., 1983; Thanos y cols., 1993; rev. Plata-Salaman, 1991; rev. Thanos y cols., 1995). La unión de este tripéptido a las células de microglía induce modificaciones morfológicas y de sus capacidades fagocítica y de migración. Se postula que estos cambios inducidos en las células de microglía pueden incidir en la supervivencia neuronal tras algunos tipos de lesión, y así, se ha documentado que la inyección intravítrea de este factor aumenta la supervivencia y capacidad de regeneración de las CGR de rata adulta tras la sección del NO y tras el trasplante de un injerto de nervio periférico al NO, respectivamente (Thanos y cols., 1993; Thanos y Mey, 1995; rev. Thanos y cols., 1994), e induce un enlentecimiento en la degeneración de los fotorreceptores de la retina de ratas RCS (rev. Thanos y cols., 1995).

1.6 APOPTOSIS

1.6.1 INTRODUCCIÓN

Se ha postulado que, aunque existen muchas causas de muerte celular, todas ellas conducen finalmente a dos formas morfológicas de muerte de la célula: la necrosis y la apoptosis.

La **necrosis** es un proceso que ocurre en aquellas células cuyas condiciones fisiológicas se han visto seriamente alteradas, como puede ocurrir en caso de: hipoxia, inhibición de enzimas que intervienen en ciclo de Krebs, glicolisis, fosforilación oxidativa, hipertermia y exposición a diversas toxinas (rev. Wyllie, 1981).

En la necrosis, los cambios morfológicos que ocurren son los siguientes: Inicialmente se produce agrupamiento marginal de la cromatina nuclear, la cual pierde su aspecto normal, se dilata el retículo endoplásmico y se observa una leve dispersión de los ribosomas. Estos cambios iniciales pueden ser reversibles. Sin embargo, el proceso de necrosis se hace irreversible cuando se produce una dilatación apreciable de la matriz mitocondrial. A esta afectación mitocondrial le sucede la dilatación del núcleo y la leve dispersión de las masas de cromatina agrupadas, las cuales acaban por desaparecer en un breve periodo de tiempo. El proceso continúa con la rotura de las membranas de los orgánulos y del núcleo, así como de la membrana citoplasmática, con la aparición de condensaciones vellosas o granulosas en la matriz mitocondrial, y con la disolución de los ribosomas y lisosomas. La rotura de la membrana citoplasmática hace que el contenido celular se libere al medio extracelular, produciéndose un proceso inflamatorio exudativo en el tejido circundante, que afecta a las células próximas por la liberación de enzimas lisosomales procedentes de la célula que ha sufrido necrosis. Los desechos celulares son normalmente eliminados por células fagocíticas especializadas del tejido (rev. Wyllie, 1981; rev. Wyllie y cols., 1981a).

La **apoptosis** es un proceso activo, regulado intrínsecamente (Kerr, 1971; rev. Kerr y cols., 1972; rev. Macaya, 1996; rev. Wyllie y cols., 1981a y b; rev. Wyllie, 1981), en el que, a diferencia de la necrosis, se mantiene en todo momento la integridad de los orgánulos y de la membrana citoplasmática, por lo que no se produce lisis celular. Esto hace que no se produzca en el tejido reacción inflamatoria. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que puede suceder tanto en condiciones fisiológicas, como ocurre durante el desarrollo (Wyllie y cols., 1981a; rev. Ellis, 1991; rev. Kerr y cols., 1972), como en diversos estados patológicos (Berkelaar

y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994; Rabacchi y cols., 1994; Quigley y cols., 1995; rev. Muñoz-Negrete, 1999). Se postula que la apoptosis es un proceso que modela el organismo en desarrollo (Saunders, 1966; rev. Adams y Cory, 1998; rev. Steller, 1995), controla el número de células que permanecen en tejido adulto (rev. Raff, 1992; rev. Steller, 1995) y elimina células indeseables para el organismo (rev. Adams y Cory, 1998; rev. Steller, 1995), células infectadas por virus o células potencialmente tumorales.

Para que se produzca la apoptosis se requiere energía, y se ha documentado que las células apoptóticas muestran niveles normales de ATP y son metabólicamente activas (Liu y cols., 1996; rev. Wyllie, 1981); de hecho, el proceso puede ser estimulado por el AMPc. Además, requiere síntesis de macromoléculas de novo y nueva expresión de genes, por lo que son necesarios el RNA y la síntesis proteica para que se produzca apoptosis, aunque se ha documentado que células sin núcleo también pueden sufrir apoptosis (rev. Steller, 1995).

1.6.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE APOPTOSIS

El proceso de apoptosis se produce a través de diversos estadios (rev. Kerr y cols., 1972; rev. Wyllie y cols., 1981a). En un principio se produce el aislamiento de la célula afectada de las células que la circundan, por eliminación de las uniones con las mismas. A continuación la cromatina nuclear se condensa formando masas densas bajo la membrana nuclear, en la que aparecen indentaciones. Posteriormente comienza a condensarse el citoplasma, y la superficie celular pierde las microvellosidades si las tenía. Sustituyendo a éstas se forman en la misma protuberancias, que llegan a ser en algunos casos bastante pronunciadas. Los orgánulos se agrupan, por los cambios que sufre la membrana, sin llegar a perder su integridad (Mullinger y Johnson, 1976). Finalmente, las protuberancias de la superficie celular se desprenden, llevándose en su interior una parte del contenido citoplasmático, por lo que la célula queda dividida en varios fragmentos rodeados de membrana celular, que son los *cuerpos apoptóticos* (rev. Kerr y cols., 1972), que se caracterizan por tener contornos esféricos u ovoides y superficie lisa. Dependiendo del contenido celular en la zona próxima a la protuberancia que los ha originado y del tamaño de la célula de la que derivan, la composición y dimensiones de los mismos varían. Así, algunos contienen cromatina nuclear, mientras que otros presentan orgánulos citoplasmáticos intactos (rev. Kerr y cols., 1972). Los corpúsculos apoptóticos son englobados a continuación por células fagocíticas de línea monocítica, por células epiteliales vecinas, o por endotelio vascular. Una vez

englobados dentro de estas células, sufren auto lisis en los fago somas (Kerr, 1971, 1972; Wyllie y cols., 1972a; rev. Kerr y cols., 1972; rev. Wyllie, 1981). Por tanto, no existe lisis al final del proceso de apoptosis, por lo que las sustancias tóxicas contenidas en los cuerpos apoptóticos no se liberan al medio extracelular que rodea a la citada célula, manteniéndose intactas las células circundantes a la célula que ha sufrido el proceso de apoptosis. Por ello se postula que la apoptosis es un mecanismo de defensa celular desarrollado a lo largo de la evolución (rev. Ellis y cols., 1991).

Sin embargo, en algunos casos una pequeña proporción de cuerpos apoptóticos alcanzan el fluido extracelular (rev. Kerr y cols., 1972; rev. Wyllie y cols., 1981a) sin llegar a ser fagocitados por macrófagos. Estos cuerpos apoptóticos sufren un proceso espontáneo de rotura de la membrana que por asemejarse a la necrosis se ha denominado “necrosis secundaria” y que se distingue de la verdadera necrosis por el pequeño tamaño de los fragmentos celulares que se originan, que poseen formas redondeadas u ovoides, y por la presencia de fragmentos nucleares de morfología típica en algunos de ellos (rev. Wyllie y cols., 1981a).

Algunos autores resumen el proceso de apoptosis en cuatro fases diferenciadas (rev. Muñoz-Negrete y cols., 1999): una primera de precondensación, en la que se producen transcripción y traslación de enzimas; una fase de condensación, en la que se reduce el volumen del núcleo y el citoplasma, y se condensa la cromatina en el margen nuclear, formando masas granulosas adosadas al núcleo; una fase de fragmentación, en la que se solubilizan las proteínas de la matriz celular, el ADN se hace susceptible a la degradación por endonucleasas, se forman cuerpos apoptóticos y los corpúsculos aumentan hasta que el núcleo se transforma en picnótico; y una última fase en la que los cuerpos apoptóticos son degradados por enzimas lisosomales de células vecinas. Parece ser que las células apoptóticas envían señales a las células vecinas para ser fagocitadas (Savill y cols., 1990).

Los pasos moleculares de la apoptosis se repiten en todos aquellos organismos en los que se produce, aunque sean especies diferentes. De hecho, la apoptosis es un proceso altamente conservado a lo largo de la evolución. Así, aunque se pueden encontrar diferencias inter-especies, existen efectores comunes a las distintas especies (rev. Thompson, 1995). Esto ha permitido extrapolar los resultados de estudios de apoptosis llevados a cabo en invertebrados, como el nematodo *Caenorabditis elegans* (rev. Ellis y cols., 1991), a los vertebrados superiores.

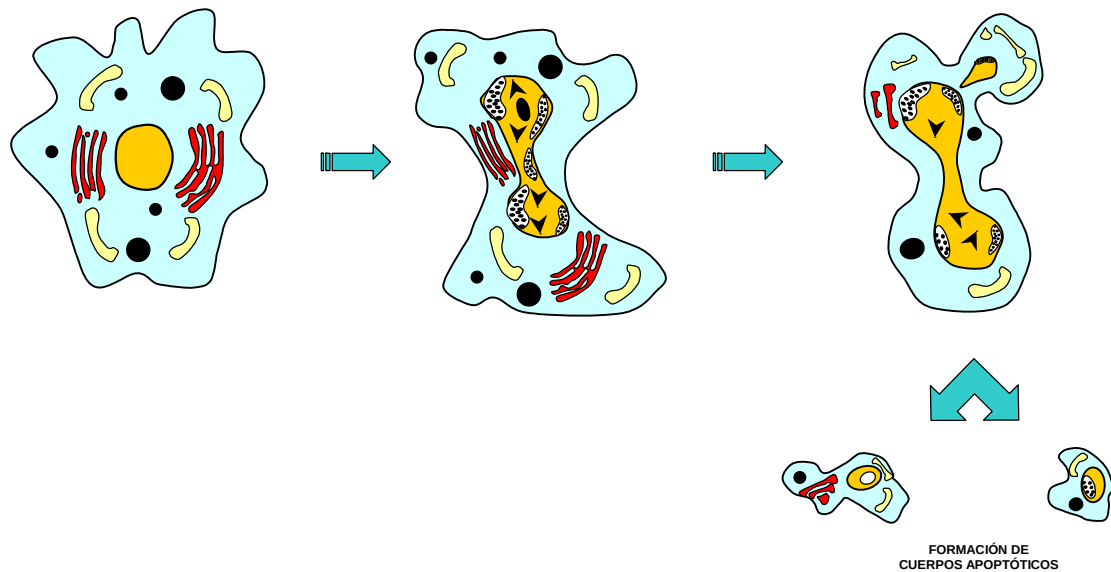


Imagen 3: representación esquemática del proceso de apoptosis, en la cual se muestran la fragmentación del DNA nuclear y la formación final de los cuerpos apoptóticos, de contenido variable.

1.6.2.1 Mecanismos extrínsecos que desencadenan el proceso

Aunque parece ser que los genes necesarios para que el proceso se desencadene existen en el interior de las células sanas, hay factores externos que pueden determinar que se desencadene o no el proceso de apoptosis en la célula, como por ejemplo:

1.- Algunas células son capaces de inducir la apoptosis de otras células. Así, en el sistema inmunitario los linfocitos T y las llamadas “células asesinas naturales” inducen la muerte por apoptosis de células infectadas por virus, o de células tumorales (rev. Cohen y cols., 1992). Se postula que su capacidad para inducir apoptosis estaría relacionada con la presencia en su membrana del receptor Fas (ver más adelante), cuya estimulación induce apoptosis (rev. Nagata y Golstein, 1995).

2.- Determinadas citocinas, como el ligando de Fas (FasL), el factor de necrosis tumoral-alfa ($\text{TNF}\alpha$) y el interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) pueden desencadenar el proceso de apoptosis, como se ha documentado en algunas poblaciones celulares del sistema inmunitario (rev. Nagata y Goldstein, 1995). Todas ellas se unen a receptores pertenecientes a la familia de receptores del

factor de necrosis tumoral. La unión de FasL a Fas determina que la célula sobre la que se ha producido la unión sufra fragmentación del ADN y, por tanto, muerte por apoptosis (rev. Nagata y Golstein, 1995). El receptor del $\text{TNF}\alpha$ (TNFR) modula la apoptosis de forma diferente a Fas (rev. Nagata y Golstein, 1995). Se postula que la estimulación de TNFR inducida por su unión al $\text{TNF}\alpha$ provoca el aumento rápido de las especies reactivas de oxígeno (ver más adelante) (rev. Buttke y Sandstrom, 1994), lo que induce apoptosis. También se ha documentado que $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ pueden actuar directamente sobre genes relacionados con la apoptosis, y así, ambas citocinas disminuyen la expresión de los genes antiapoptóticos bcl-2 y bcl-xL (ver más adelante), respectivamente (Spanaus y cols., 1998).

3.- Las células circundantes a cualquier célula favorecen su supervivencia, mediante estímulos provenientes de dichas células vecinas que impiden que la apoptosis se active (Raff, 1992). De hecho, muchas neuronas durante el desarrollo dependen para su supervivencia de factores neurotróficos generados por células de su entorno y células de sus territorios diana (Purves, 1988; Barde, 1989; Oppenheim, 1991a). La pérdida de aporte trófico, provocada en caso de lesión axonal por la interrupción del flujo de NTs desde los territorios diana neuronales hasta el soma celular hace que en algunas neuronas se produzca apoptosis. No se conoce si la interrupción del aporte trófico juega un papel activo o pasivo en la apoptosis (rev. Johnson y Deckwerth, 1993), aunque algunos autores postulan su intervención en el proceso.

4.- La exposición a agentes que dañan el ADN (Martin y cols. 1990; Park y cols., 1998), como por ejemplo las radiaciones γ y ultravioleta, induce apoptosis.

5.- El incremento de especies reactivas de oxígeno, inducido directamente por algunas drogas como la doxorrubicina y el cisplatino, o indirectamente por otras, como la butionina sulfoxamina, la cual produce una disminución en las reservas intracelulares de glutatión (que se encarga de eliminar dichas especies reactivas de oxígeno), provoca la apoptosis de las células (rev. Buttke y Sandstrom, 1994). También se produce incremento en las especies reactivas de oxígeno como consecuencia del estrés oxidativo, que induce la disminución en la regulación de la enzima superóxido dismutasa (Zhong y cols., 1993). Los mecanismos a través de los cuales estas

especies reactivas de oxígeno inducen apoptosis pueden ser variados: provocando alteración en la membrana mitocondrial, que permite la salida de Ca^{2+} y entrada del mismo al núcleo celular (rev. Chakraborti y cols., 1999; rev. Motyl, 1999); causando daño sobre el ADN, a través de la activación del enzima poli-ADP-ribosa transferasa (rev. Buttke y Sandstrom, 1994) que a su vez polimeriza la ADP-ribosa, lo que lleva a la muerte celular (rev. Buttke y Sandstrom, 1994); reaccionando con los ácidos grasos poli-insaturados y el colesterol de la membrana celular, produciendo lípidos oxidados, que inducen apoptosis (rev. Buttke y Sandstrom, 1994); por último, se postula que pueden interaccionar con diferentes genes que a su vez intervendrían en el control de la apoptosis (Hockenbery, 1993; rev. Steller, 1995), concretamente, se postula que activan algunos genes promotores de apoptosis (rev. Buttke y Sandstrom, 1994).

6.- El incremento de aminoácidos excitotóxicos, como el glutamato y el aspartato en el medio ambiente celular. En concentraciones fisiológicas ambos actúan como aminoácidos excitatorios en el proceso de transmisión sináptica, ejerciendo su acción sobre receptores de membrana N-metil D-aspartato. La estimulación de este receptor de membrana por parte del glutamato abre los canales del Ca^{2+} , lo que produce un aumento en la concentración intracelular de este ión. Esto provoca la estimulación del enzima óxido nítrico sintetasa y, como consecuencia, la producción del radical libre óxido nítrico. A su vez, el óxido nítrico frente a una elevada concentración de glutamato se combina con especies reactivas de oxígeno generando peroxinitrilos, que producen a su vez fragmentación del ADN (rev. Muñoz-Negrete y cols., 1999). Por ello, altas concentraciones de glutamato provocan muerte celular. Se producen elevadas concentraciones de glutamato en la isquemia (Quigley y cols., 1995) y en ciertas degeneraciones del SNC.

1.6.3 MECANISMOS CELULARES DEL PROCESO

Existen evidencias de que la apoptosis se desencadena desde el interior de la célula, ante determinados estímulos externos, que son capaces de iniciar el proceso activando diversos mecanismos intracelulares, y que el mismo agente externo puede inducir apoptosis por distintas vías sobre diferentes tipos celulares.

Los mecanismos intrínsecos responsables del proceso de apoptosis en la célula no son conocidos en su totalidad actualmente, pero se postula que ninguno de ellos es imprescindible para que se active la apoptosis; de hecho, se ha documentado

que algunos inhibidores de apoptosis actúan bloqueando distintas vías intracelulares (Troy y cols., 1997; rev. Davies, 1995). Dentro de los mecanismos intrínsecos que participan en la apoptosis podemos incluir:

1.- La fragmentación del ADN (rev. Steller, 1995) para la cual es necesaria la presencia de una endonucleasa endógena calcio-magnesio dependiente (rev. Wyllie, 1981; rev. Bursch y cols. 1990). Este mecanismo no es absolutamente necesario ya que también pueden sufrir apoptosis células sin núcleo (rev. Steller, 1995). De hecho, inicialmente se pensaba que la fragmentación del ADN era la causa desencadenante de la apoptosis, mientras que en la actualidad se postula que son las alteraciones mitocondriales las que intervienen de forma temprana desencadenando el proceso (rev. Macaya, 1996).

2.- La expresión de genes relacionados con la apoptosis: en la célula existe toda la maquinaria genética necesaria para modular el proceso de apoptosis. Algunos de estos genes intervienen en el proceso de apoptosis estimulándolo, como los genes bcl-xS, bax, bad, bag, bik y p53, mientras que otros lo inhiben, como bcl-2 o bcl-xL (ver más adelante). Aunque los mecanismos a través de los cuales actúan los genes citados anteriormente pueden ser complejos, se postula que una de las vías principales de su intervención en el proceso de apoptosis es la formación de poros en la membrana mitocondrial y la activación de la cascada de las caspasas (ver más adelante).

3.- La activación de las caspasas, proteínas implicadas en el proceso de apoptosis. La familia de las caspasas está formada por enzimas proteolíticos que, una vez activados, hidrolizan importantes moléculas celulares, transformándolas en formas activas que intervienen en el proceso de muerte celular. Aunque la cascada de las caspasas puede ser desencadenada por diversos estímulos externos, y aunque existen proteínas no identificadas que inician el proceso, se sabe que una de las vías a través de las cuales se activan las caspasas es la aparición de zonas de rotura del potencial de membrana mitocondrial, que se han denominado poros, a través de los cuales se libera de la mitocondria al citoplasma citocromo c, que induce la activación de la cascada de las caspasas, por ruptura de pro-caspasa 3 que se transforma en caspasa 3, estimulándose el proceso de apoptosis (ver más adelante) (Reed, 1997; rev. Tatton, 1999).

Dada la importancia de la regulación genética de la apoptosis y de la cascada de las caspasas en el proceso de apoptosis, a continuación realizaremos a realizar una revisión de ambos procesos.

1.6.3.1 Mecanismos genéticos de regulación de la apoptosis

El estudio de la apoptosis en el nematodo *Caenorabditis elegans* (rev. Adams y Cory, 1998; rev. Ellis y cols., 1991; rev. Steller, 1995), así como en virus, ha permitido conocer la existencia de un conjunto de genes que regulan positiva o negativamente la apoptosis. En nematodo se han descrito 14 genes diferentes que intervienen en el proceso, entre los cuales se encuentran ced-3 y ced-4, que activan la muerte celular en todos los casos, y ced-9, que protege de la apoptosis a las células (Hengartner y cols., 1992). Basándose en estos hallazgos, y en el alto grado de conservación del proceso en las diferentes especies, muchos autores han intentado encontrar los caminos de regulación genética de la apoptosis en vertebrados superiores que, lógicamente, deben ser más complejos.

1.6.3.1.1 Familia de genes bcl-2

Estudios realizados en mamíferos y virus han llevado a identificar al menos 15 genes relacionados con la apoptosis y que se asemejan a aquellos implicados en la apoptosis en *Caenorabditis elegans*. Estos genes se han englobado bajo el nombre de “familia de genes bcl-2”, ya que fue éste el primer gen identificado. Dentro de esta familia se distinguen a su vez dos subfamilias: una subfamilia de genes inhibidores de apoptosis y otra subfamilia de genes promotores de apoptosis.

En **mamíferos**, se han identificado varios miembros pertenecientes a la subfamilia de genes anti-apoptóticos, como son: bcl-2, las isoformas bcl-xL y bcl-x β del gen bcl-x, bcl-W, mcl-1 y A1 (rev. Adams y Cory, 1998), de los que revisaremos más extensamente los genes bcl-2 y bcl-xL, por ser relevantes para nuestro estudio.

En **mamíferos** se han identificado algunos genes promotores de apoptosis, entre los cuales algunos guardan gran similitud con bcl-2, como los genes bax, bak y bok, mientras que otros, los genes bik, blk, hrk, BNIP3, bim_L, bad y bld, denominados “genes asesinos”, son menos similares al gen bcl-2 (rev. Adams y Cory, 1998). Estos últimos genes difieren mucho entre sí, guardando tan solo alguna semejanza bik y blk. También se incluye dentro de la familia de genes pro-apoptóticos la isoforma bcl-xS del gen bcl-x. De todos ellos revisaremos más extensamente los genes bax y bcl-xS, por ser relevantes para nuestro estudio.

Los genes de la familia bcl-2 regulan el proceso de apoptosis por medio de la interacción entre los péptidos producto de su expresión. En estos péptidos existen secuencias de aminoácidos homólogas, llamadas *dominios homólogos*, a través de las cuales interaccionan entre ellos (Yin y cols., 1994; Zha y cols., 1996; Huang y cols., 1998; rev. Kelekar y Thompson, 1998). Se postula que la homodimerización y heterodimerización entre los diversos miembros de las dos subfamilias a través de sus dominios homólogos modula la activación de la cascada de las caspasas, moléculas ejecutoras del programa de muerte celular (ver más adelante) (Yang y cols., 1995; Reed, 1997; rev. Korsmeyer, 1995). A este respecto existen opiniones encontradas, y en la actualidad se postula que para la actividad de los genes inhibidores de apoptosis no debe ser imprescindible la heterodimerización (Cheng y cols., 1996; rev. Adams y Cory, 1998), mientras que sí lo debe ser para los péptidos derivados de la subfamilia de genes promotores de apoptosis (Chittenden y cols., 1995a; Boyd y cols., 1995; Zha y cols., 1996; Hunter y Parslow, 1996; rev. Adams y Cory, 1998; rev. Kelekar y Thompson, 1998).

A pesar de la importancia de las heterodimerizaciones en la actividad de estos genes, existen otras vías a través de las cuales los péptidos derivados de estos genes inhibidores y promotores de apoptosis llevan a cabo su función, como se ha documentado para Bcl-2 y Bcl-xL (Levin y cols., 1997) y para Bax y Bak (ver más adelante) (rev. Adams y Cory, 1998).

1.6.3.1.1.1 El gen bcl-2

El proto-oncogen bcl-2 fue el primer miembro de la familia de genes bcl-2 que se identificó como mediador de la apoptosis en mamíferos. Se aisló a partir del punto de translocación cromosómico t (14,18) (q32; q21) encontrado en células de linfoma folicular humano (Bakhshi y cols., 1985; Cleary y Sklar, 1985; Tsujimoto y cols., 1985; rev. Korsmeyer, 1992; rev. Reed, 1994; rev. Adams y Cory, 1998), se asemeja al gen antiapoptótico ced-9 aislado del nematodo *Caenorabditis elegans* y, al igual que este último gen, actúa inhibiendo la apoptosis en diferentes circunstancias. El agente responsable de las acciones del gen bcl-2 es el producto consecuencia de la expresión de este proto-oncogen, el péptido Bcl-2. El gen da lugar a dos transcripciones, a través de dos vías alternativas de comienzo de la misma. Como resultado da lugar a dos mRNA: bcl-2 α y bcl-2 β (Tsujimoto y Croce, 1986; rev. Merry y Korsmeyer, 1997). No se ha podido localizar en tejido alguno la proteína codificada por el mRNA bcl-2 β , por lo que al hablar del péptido Bcl-2 nos referiremos siempre al Bcl-2 α . Éste es una proteína intracelular asociada a

membrana, que se localiza en célula en distintos lugares: en la cara citoplasmática de la membrana externa mitocondrial, en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear (Chen-Levy y cols., 1989; Hockenbery y cols., 1990b; Monaghan y cols., 1992; rev. Reed, 1994). En la membrana mitocondrial se ha visto que existe una parte de la molécula que se sitúa externamente a la misma, y otra que permanece unida a la membrana mitocondrial. Ambas fracciones se han denominado "libre" y "citósólica" y, al parecer, la verdaderamente activa es la primera (Hockenbery y cols., 1993). Este péptido se ha encontrado en neuronas y en linfocitos (García y cols., 1992) y se postula que su localización subcelular puede estar relacionada con su actividad en la célula (Davies, 1995), como también lo estarían las variaciones temporales que sufre la expresión del gen.

1.6.3.1.1.1 Expresión del gen bcl-2 en distintas poblaciones celulares

En el **cerebro**, la expresión del gen bcl-2 en las neuronas varía a lo largo del desarrollo: es elevada en neuronas en desarrollo, descendiendo en el adulto, en el que solo se mantienen niveles altos en unas pocas poblaciones neuronales (Merry y cols., 1994). Las áreas del cerebro en donde se mantienen los niveles de expresión del gen con la madurez, son aquellas en las que la capacidad de neurogénesis se prolonga toda la vida, como el giro dentado, el bulbo olfatorio, la zona subventricular y el septum glial (Castrén y cols., 1994; Merry y cols., 1994; Bernier y Parent, 1998). Además, las neuronas en las que se mantiene la expresión del gen bcl-2 en la edad adulta, presentan morfología de células inmaduras (Bernier y Parent, 1998), por lo que el gen bcl-2 podría servir como marcador de diferenciación y proliferación.

Se ha documentado que la lesión del tejido nervioso induce un aumento en la expresión de este gen. Así, tras lesión del tejido nervioso por isquemia o epilepsia, la expresión del gen bcl-2 aumenta en neuronas (Clark y cols., 1997), concretamente en aquellas que sobreviven a la lesión (Chen y cols., 1995). También se ha documentado expresión de este gen en células gliales tras la lesión, fundamentalmente en células de microglía (Chen y cols., 1995). Este último hecho ha sido interpretado por algunos autores como un mecanismo de protección de las neuronas cerebrales contra la isquemia, pues postulan que el aumento de la expresión del gen bcl-2 en las células de microglía desencadenaría una vía antioxidante que evitaría los efectos lesivos de la isquemia cerebral en las neuronas (Urabe y cols., 1998).

En **retina**, el gen bcl-2 se expresa en las CGR en el periodo de muerte neuronal fisiológica que tiene lugar durante el desarrollo. Se postula que la falta de

aporte trófico de aquellas CGR que no contactan con sus territorios diana produce una disminución en la expresión de este gen que conduce a la muerte de las mismas (Merry y cols., 1994). De hecho, se ha documentado en ratas que a partir de la segunda semana del nacimiento, coincidiendo con la finalización del periodo de muerte neuronal fisiológica en las capas internas de la retina (Beazley y cols., 1987), se produce disminución en la expresión del gen bcl-2 en las CGR (Chen y cols., 1994). Al igual que en cerebro adulto, en retina adulta los niveles de expresión de este gen son muy bajos, tanto en neuronas como en células gliales (Chen y cols., 1994).

En motoneuronas y en neuronas del **SNP**, contrariamente a lo que ocurre en la mayor parte de las neuronas intrínsecas del SNC, la expresión del gen se mantiene en la edad adulta en los mismos niveles que durante el desarrollo (Hockenbery y cols., 1991; Merry y cols., 1994). Se postula que este hecho podría estar relacionado con la elevada capacidad de regeneración de las neuronas en el SNP (Merry y cols., 1994).

1.6.3.1.1.2 Efectos inducidos por la expresión del gen bcl-2

Una parte de los estudios sobre los efectos del péptido Bcl-2 se han llevado a cabo empleando ratones transgénicos que sobre-expresan el gen bcl-2. Dichos experimentos han documentado que la principal consecuencia de la sobre-expresión del gen bcl-2 es la inhibición de la apoptosis. Así, los ratones transgénicos que sobre-expresan el gen poseen una población de CGR y de neuronas del núcleo facial doble a la de ratones normales (Martinou y cols., 1994; Bonfanti y cols. 1996; Burne y cols, 1996) lo que indica que la sobre-expresión del gen protege a las CGR y a las neuronas del núcleo facial de la muerte por apoptosis que tienen lugar durante el proceso de muerte neuronal fisiológica.

Este gen también protege a las neuronas de la apoptosis inducida por lesión del tejido nervioso, ya sea mecánica, química o por radiación, y así, se ha documentado que ratones transgénicos que sobre-expresan el gen presentan una mayor supervivencia de las CGR tras la sección del NO (Bonfanti y cols., 1996; Cenni y cols., 1996; Porciatti y cols., 1996), presentando las CGR que sobreviven a la lesión respuestas visuales normales (Bonfanti y cols., 1996; Cenni y cols., 1996; Porciatti y cols., 1996; Chierzi y cols., 1998). Este gen también promueve *in vitro* e *in vivo* el crecimiento axonal de las CGR (Chen y cols., 1997), y se ha observado que protege a fotorreceptores de la degeneración en enfermedades heredo-degenerativas de la retina (Chen y cols., 1996). También se ha documentado que este gen protege a las

neuronas sensoriales de bulbo olfatorio tras ablación del mismo (Jourdan y cols., 1998), aumenta de la supervivencia de neuronas de cortex e hipocampo tras la isquemia (Martinou y cols., 1994; Shimazaki y cols., 1994; Chen y cols., 1995; Linnik y cols., 1993; Cenni y cols., 1996) y aumenta la supervivencia de las motoneuronas tras la sección del nervio facial y del nervio ciático (Dubois-Duphin, 1994; Farlie y cols., 1995). Por último, este gen protege de la muerte por estrés oxidativo inducido por diferentes vías a las neuronas hipotalámicas y dopaminérgicas, a células pro-linfoides de la línea FL5.12, a precursores de linfocitos B y a células T de hibridoma (Hockenbery y cols., 1993; Kane y cols., 1993; Yang y cols., 1998).

Se postula que la expresión del gen bcl-2 puede impedir los efectos de la privación de factores tróficos sobre diversos tipos celulares. Así, se ha documentado que protege a las células linfoides que dependen de IL-3 para su supervivencia, de la muerte por privación de la citocina (Hockenbery y cols., 1990b; Mah y cols., 1993), y a las células PC12 de feocromocitoma y a neuronas sensoriales de pollo de la privación de NGF, BDNF o NT-3 (García y cols., 1992; Allsopp y cols., 1993; Batistatou y cols., 1993; Farlie y cols., 1995; rev. Merry y Korsmeyer, 1997), neurotrofinas de las que estas neuronas dependen para su supervivencia.

Vías a través de las cuales el péptido Bcl-2 inhibe la apoptosis: Se sabe que el péptido Bcl-2 puede tener diferentes efectos sobre distintos tipos celulares en los que se ha producido el mismo tipo de lesión. Además, es capaz de rescatar de diferentes vías de apoptosis a poblaciones celulares sometidas a distintos tipos de lesión. Por tanto, las vías por las cuales el péptido Bcl-2 protege a las células de la apoptosis, pueden ser variadas, y depender de las células sobre las que actúe. Los linfocitos, por ejemplo, mueren por aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (rev. Ellis y cols., 1991), mientras que las neuronas pueden hacerlo por esta causa o por falta de aporte trófico. El péptido Bcl-2 previene la apoptosis en ambos tipos celulares y posiblemente lo haga a través de mecanismos diferentes.

Una de las posibles vías por las que este gen actuaría en neuronas, sería la mediación o simulación de los efectos de las NTs (Mah y cols., 1993; Bonfanti y cols., 1996; rev. Davies, 1995). Por ejemplo, transfectando el gen bcl-2 a un cultivo de neuronas simpáticas privadas de NGF, que en su ausencia morirían porque dependen de esta neurotrofina para su supervivencia, se observa que la sobre-expresión del gen impide que se produzca muerte celular. Sin embargo, el crecimiento neurítico es menor que cuando se añade al medio la citada neurotrofina, por lo que posiblemente, aunque el NGF y el péptido Bcl-2 promuevan la

supervivencia neuronal, el mecanismo de acción no sea exactamente el mismo (García y cols., 1992; Farlie y cols., 1995). En cualquier caso, existen evidencias de las interacciones entre las NTs y los efectos del péptido Bcl-2. Por ejemplo, la aplicación de anticuerpos contra el péptido Bcl-2 inhibe *in vitro* los efectos neuroprotectores del BDNF sobre neuronas que dependen del mismo para su supervivencia, como son las neuronas sensoriales y parasimpáticas (Allsopp y cols., 1995).

A este respecto algunos autores postulan que el hecho de que sobrevivan en la retina durante el periodo de muerte neuronal fisiológica aquellas CGR que tienen niveles más altos de expresión del gen bcl-2 está relacionado con la uniformidad de las CGR en su dependencia de determinadas NTs, por lo que podría ser que la sobre-expresión de bcl-2 y, por tanto, la sobre-producción del péptido Bcl-2, supliera al aporte trófico necesario para las CGR que normalmente mueren durante el desarrollo por la carencia del mismo (Bonfanti y cols., 1996). Otros autores postulan que la sobre-expresión del gen bcl-2 en ratones transgénicos está relacionada con la formación de territorios diana de las CGR más extensos, ya que el tectum en dichos ratones es más grande (Bonfanti y cols., 1996), lo que podría proporcionar un mayor aporte trófico y haría que sobrevivieran más CGR en el periodo de muerte neuronal fisiológica.

También se postula que los efectos de la expresión del gen bcl-2 y, por lo tanto, del péptido Bcl-2, pueden estar relacionados con su localización subcelular; así, por ejemplo, se postula que evita la alteración mitocondrial que tiene lugar en la apoptosis (Hockenbery y cols. 1993; rev. Davies, 1995; rev. Nickels, 1999), por impedir la formación de poros en la membrana mitocondrial (Yang y cols., 1997; Marzo y cols., 1998b; Zamzami y cols., 1998; rev. Adams y Cory, 1998). A este respecto se ha documentado que cuando se induce sobre-expresión del gen bcl-2 en cultivos de células de leucemia humana, dichas células no sufren apoptosis tras ser tratadas con medicamentos anticancerosos, comprobándose que en estas células permanece el citocromo c en la membrana mitocondrial, contrariamente a lo que ocurre en las células que no sobre-expresan el gen (Yang y cols., 1997). Del mismo modo, se postula que mantiene los niveles de Ca^{2+} dentro de la mitocondria y del retículo endoplásmico, que se ven alterados en algunos tipos de lesión neuronal, como la isquemia y la excitotoxicidad, lo que impide la muerte neuronal por entrada del Ca^{2+} citosólico al interior del núcleo (Kruman y Mattson, 1999; Murphy y cols., 1996; Foyouzi-Youssefi y cols., 2000; rev. Chakraborti y cols., 1999; rev. Motyl, 1999; rev. Murphy, 1999).

Se ha postulado también que el gen bcl-2 podría actuar impidiendo la formación de radicales libres (Dubois-Dauphin y cols., 1994) o de especies reactivas de oxígeno (Hockenbery y cols., 1993; Kane y cols., 1993; rev. Buttke y Sandstrom, 1994). Además, se postulan otras tres vías de aumento de la supervivencia en neuronas hipotalámicas expuestas al estrés oxidativo por parte del Bcl-2: que el Bcl-2 actúe como carroñero de los mismos; que impida la transferencia de electrones; que actúe como proteína ligando de metales (Kane y cols., 1993). Sin embargo, otros autores postulan que la inhibición de la apoptosis inducida por la expresión del gen bcl-2 es independiente de sus efectos sobre las especies reactivas de oxígeno (Jacobson y Raff, 1995; Shimizu y cols., 1995).

También se ha documentado que la expresión del gen bcl-2 impide la activación de la caspasa 3 ó CPP32, por lo que bloquearía directamente la vía de las caspasas (Armstrong y cols., 1996; Boulakia y cols., 1996).

Sea cual fuera el mecanismo a través del cual la expresión del gen bcl-2 bloquea la apoptosis, parece que es importante para los efectos antiapoptóticos del mismo la previa heterodimerización del péptido originado como consecuencia de su expresión con péptidos derivados de la expresión de genes pro-apoptóticos (ver más adelante). Así, el péptido Bcl-2 es capaz de formar heterodímeros con otros péptidos pro-apoptóticos, a través de sus dominios homólogos (Williams y Smith, 1993; Yin y cols., 1994; Boyd y cols., 1995; Chittenden y cols., 1995a; Hanada y cols., 1995; rev. Rubin cols., 1994). Por ejemplo, el péptido Bcl-2 podría impedir los efectos pro-apoptóticos inducidos por la expresión de los genes bax y bak ligándose a los péptidos originados por dicha expresión, Bax y Bak, a través de los citados dominios (Chittenden y cols., 1995b). La heterodimerización de Bcl-2 con Bax impediría la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Shimizu y cols., 1996; Antonsson y cols., 1997; Aritomi y cols., 1997) y por lo tanto, la salida del citocromo c al citoplasma y la consiguiente activación de la cascada de las caspasas. Por ello se postula que el equilibrio de concentraciones de los péptidos Bax/Bcl-2 es importante para la supervivencia de la célula. En cuanto a la heterodimerización entre los péptidos Bcl-2 y Bak, se postula que la unión de Bcl-2 con Bak es más débil que la descrita con Bax (rev. Merry y Korsmeyer, 1997).

1.6.3.1.1.2 El gen bcl-x

El gen bcl-x es otro de los miembros de la familia de genes bcl-2 inhibidores de apoptosis (Boise y cols., 1993; Levin y cols., 1997) que presenta un porcentaje de homología con el gen bcl-2 del 56%. La transcripción de este gen puede ocurrir por

tres vías alternativas, cada una de las cuales da lugar a la aparición de una isoforma de mRNA que a su vez dan lugar a la síntesis de tres péptidos: Bcl-xL, Bcl-xS y Bcl-x β (Boise y cols., 1993; González-García y cols., 1994; Shiraiwa y cols., 1996).

1.6.3.1.1.2.1 Expresión del gen bcl-x en distintas poblaciones celulares

Se ha documentado expresión de las isoformas mRNA bcl-xL y mRNA bcl-x β , así como de los péptidos codificados por ambos mRNAs en cerebro de ratón en desarrollo y adulto, observándose siempre mayor expresión de Bcl-xL que del resto de las isoformas (González-García y cols., 1995). Se ha localizado también expresión del gen bcl-x en neuronas de la porción ventral de cerebro de ratón en desarrollo, y en neuronas de cortex cerebral, hipocampo y cerebelo de ratón adulto (González-García y cols., 1995). Por tanto, el gen bcl-x se expresa en cerebro en desarrollo en menor número de tejidos que el gen bcl-2 manteniéndose la expresión en cerebro adulto (Boise y cols., 1993; González-García y cols., 1995; Parsadanian y cols., 1998).

En cuanto a la isoforma bcl-xS, se ha documentado expresión del mRNA para bcl-xS en linfocitos T y timocitos en desarrollo y activados, no encontrándose expresión en tejido cerebral humano (Boise y cols., 1993).

En retina de rata adulta, como se ha demostrado también en otros tejidos nerviosos centrales adultos, se ha encontrado que la expresión del gen bcl-x es muy elevada, aproximadamente 16 veces mayor que la del gen bcl-2 (Levin y cols., 1997), siendo la isoforma bcl-xL la más abundante en la retina de rata (Nickells, 1996; Isenmann y cols., 1997). Además, algunos autores postulan que este gen interviene en la supervivencia o muerte de las CGR tras la lesión, y así, Levin y cols. (1997) han documentado que se produce una disminución en la expresión del gen bcl-xL tras la sección del NO en retina de rata adulta, por lo que postulan que las variaciones en la expresión de este gen podrían jugar algún papel en la muerte de las CGR tras la sección del NO. Sin embargo, el aplastamiento del NO en rata no produce modificación de la expresión del bcl-xL (Isenmann y cols., 1997).

1.6.3.1.1.2.2 Estructura de los péptidos Bcl-x

Como hemos visto antes, las tres opciones de transcripción del gen bcl-x dan lugar a tres péptidos similares: Bcl-xL, Bcl-xS y Bcl-x β (Boise y cols., 1993; Shiraiwa y cols., 1996). Bcl-xL es la forma más larga, y la más similar en su secuencia al péptido Bcl-2. Bcl-xS es un péptido más corto, concretamente posee en

su secuencia 63 aa menos, lo cual hace que carezca de dos dominios que sí existen en Bcl-xL. Parece ser que la carencia de estos dominios es la que determina las diferentes funciones de ambos péptidos, y que la secuencia de 63 aa ausente en Bcl-xS es la que permite a Bcl-xL unirse a moléculas que median en la inhibición del proceso de apoptosis (Boise y cols., 1993). Bcl-x β es más similar en su estructura a Bcl-xL, es decir, es más largo que Bcl-xS y tan solo carece del dominio C-terminal hidrofóbico que sí posee Bcl-xL (González-García y cols., 1994; rev. Davies, 1995). Puesto que Bcl-xL es el péptido más similar a Bcl-2, es lógico que, al igual que el Bcl-2, tenga una función de inhibición de la apoptosis (Boise y cols., 1993). Sin embargo, Bcl-xS estimula la apoptosis (Boise y cols., 1993; Minn y cols., 1997). Respecto a Bcl-x β , algunos autores afirman que la estimula, (Shiraiwa y cols., 1996) mientras que otros han documentado que tiene un efecto anti-apoptótico (González-García y cols., 1995).

Se ha localizado el péptido Bcl-xL en la célula fundamentalmente en la membrana mitocondrial, y en menor proporción en membrana nuclear (González-García y cols., 1994; rev. Merry y Kosmeyer, 1997).

1.6.3.1.1.2.3 Efectos del gen bcl-x

Se postula que el gen bcl-x, al igual que el bcl-2, tiene una función importante durante el desarrollo. Sin embargo, el papel que juega durante el mismo, fundamentalmente la isoforma bcl-xL, puede ser más crucial que el del bcl-2, puesto que se ha documentado que ratones transgénicos con la isoforma bcl-xL truncada sufren muerte neuronal a partir del día 13 del desarrollo embrionario, mientras que aquellos que poseen genes bcl-2 truncados presentan un sistema nervioso aparentemente normal (Motoyama y cols., 1995; rev. Davies, 1995), por lo que se postula que la isoforma bcl-xL del gen bcl-x es un importante factor de diferenciación y supervivencia neuronal.

Estudios *in vitro* han demostrado que la sobre-expresión de la isoforma bcl-xL protege a las neuronas simpáticas de la muerte por privación de NGF (González-García y cols., 1995; Frankowski y cols., 1995), al igual que lo hace bcl-x β . La sobre-expresión de bcl-xL rescata también a las neuronas sensoriales dependientes de NGF o de BDNF para su supervivencia, de la privación de dichos factores (rev. Davies, 1995). Por otra parte, se ha documentado que bcl-xL y bcl-x β tienen efectos aditivos en cuanto a la inhibición de apoptosis en neuronas primarias de ratón, que dependen del NGF para su supervivencia, tras la privación de NGF

(González-García y cols., 1995), lo que hace que estos autores postulen que tienen distinta localización subcelular o que actúan en distintas vías de apoptosis (González-García y cols., 1995).

Se ha documentado que la sobre-expresión de la isoforma bcl-xL del gen bcl-x humano en ratones transgénicos protege a diversos tipos neuronales de distintas lesiones inducidas en periodo post-natal (Parsadanian y cols., 1998). Así, se ha documentado que protege a neuronas corticales, hipocampales y estriadas de la hipoxia-isquemia experimental, y a las motoneuronas faciales de la muerte inducida por axotomía (Parsadanian y cols., 1998), por lo que se postula que es un potente inhibidor de apoptosis en periodo postnatal.

Vías a través de las cuáles el péptido Bcl-xL ejerce su efecto antiapoptótico: Los mecanismos por los cuales el péptido Bcl-xL impide la apoptosis no se conocen con exactitud. Se postula que, al igual que el péptido Bcl-2, podría actuar heterodimerizándose con péptidos inductores de muerte, como Bax, Bad y Bak, a través de sus dominios homólogos (Yin y cols., 1994; Chittenden y cols., 1995b; Sattler y cols., 1997). A este respecto se postula que la ratio de expresiones bax/bcl-xL modularía la apoptosis en neuronas post-natales, regulando la susceptibilidad de las mismas a este proceso (Parsadanian y cols., 1998), ya que las expresiones de ambos genes se mantienen en niveles altos en el adulto (Krajewsky y cols., 1994b). Cuando se sobre-expresara bcl-xL, la susceptibilidad celular sería menor, mientras que la sobre-expresión de bax aumentaría la susceptibilidad celular a la apoptosis (Parsadanian y cols., 1998). Bcl-xL interacciona con Bax heterodimerizándose con él, e impidiendo que Bax origine poros en la membrana mitocondrial (Reed y cols., 1998; Shimizu y cols., 2000), evitando de esta forma la salida de citocromo c y por tanto, la activación del proceso de apoptosis.

Además, se ha documentado que el péptido Bcl-xL se puede unir también al producto de la expresión del gen bak, el péptido Bak, a través de una secuencia de 16 aa perteneciente a uno de sus dominios homólogos (Sattler y cols., 1997). Esta heterodimerización impide los efectos pro-apoptóticos del gen bak. De hecho, estudios actuales indican que para que el péptido Bcl-xL ejerza sus efectos anti-apoptóticos es necesario que se heterodimerice con el péptido Bak, y no con el péptido Bax, (Farrow y cols., 1995; Sattler y cols., 1997); por ello sería la ratio de expresiones bcl-xL/bak la responsable del control de la apoptosis.

Además de sus efectos anti-apoptóticos, mediados por interacciones con los péptidos derivados de la familia de genes pro-apoptóticos, la expresión de bcl-xL

también podría impedir el proceso de apoptosis actuando de forma independiente (Cheng y cols., 1996), por ejemplo, por bloqueo de la formación de radicales libres (Fang y cols., 1995), o por otros mecanismos (Shimizu y cols., 1995; rev. Levin y cols., 1997). De hecho, se ha documentado que puede actuar directamente bloqueando la vía de las caspasas; concretamente, se ha documentado que el péptido Bcl-xL puede unirse al factor de activación de la proteasa apoptótica-1 (Apaf-1; Hu y cols., 1998), molécula implicada en la apoptosis (-ver más adelante- Zou y cols., 1997), a través del dominio homólogo similar a ced-4 existente en Apaf-1; la citada unión impediría que Apaf-1 se uniese a Apaf-3, también denominada pro-caspasa 9, unión que la transformaría en su forma activa, la caspasa 9, impidiendo de esta forma que se desencadene la cascada de las caspasas (Hu y cols., 1998; rev. Adams y Cory, 1998; rev. Nickells, 1999).

1.6.3.1.1.3 Gen bax

Es uno de los genes de la familia de genes bcl-2 promotores de apoptosis (Oltvai y cols., 1993). El gen bax transcribe dos mRNA: $bax\alpha$ y $bax\beta$. $Bax\alpha$ codifica una proteína que interacciona con el péptido Bcl-2 heterodimerizándose, impidiendo de esta forma los efectos anti-apoptóticos derivados de la expresión del gen bcl-2. Por ello, su sobre-expresión neutraliza los efectos de la expresión del gen bcl-2 (Oltvai y cols., 1993). Del mismo modo, los péptidos Bcl-2 y Bcl-xL, heterodimerizándose con Bax, inhiben el efecto inductor de apoptosis que posee este último (Yin y cols., 1994); por tanto, la ratio de expresiones de los genes $bax/bcl-2$ y $bax/bcl-xL$ es importante para la formación de heterodímeros y, como consecuencia, para la regulación de la apoptosis (Oltvai y Korsmeyer, 1994).

Se ha postulado que la vía a través de la cual los péptidos Bax, Bcl-2 y Bcl-xL intervienen en la regulación de la apoptosis es la modulación de la rotura del potencial de membrana mitocondrial; la unión de Bax a cualquiera de los dos péptidos anteriores determina la formación de poros en la membrana, que en el caso de Bax son anión-selectivos y facilitan la salida de diversas moléculas (Marzo y cols., 1998b). A través de los poros se libera hacia citoplasma celular el citocromo c procedente de la cara citoplasmática de la membrana externa mitocondrial; este citocromo c, en presencia de ATP, promueve la rotura proteolítica que Apaf-1 (ver más adelante) induce sobre la pro-caspasa 9 transformándola en su forma activa, que a su vez rompe la procaspasa 3 transformándola en caspasa 3, desencadenando de esta forma la cascada de las caspasas y por tanto, el proceso de apoptosis (Zou y cols., 1997; rev. Adams y Cory, 1998; rev. Green y Kroemer, 1998; rev. Green y

Reed, 1998; rev. Kroemer, 1998). Sin embargo, a pesar de que los efectos de la expresión del gen bax sean debidos en parte a la activación de la vía de las caspasas, se ha documentado que la inhibición de la ruta de las caspasas, una vez iniciado el mecanismo de muerte mediado por el aumento de expresión del gen bax, no inhibe la muerte celular, produciéndose ésta de forma más lenta y similar a la necrosis (Xiang y cols., 1996). Se postula que este hecho es debido a que la formación de poros en la membrana mitocondrial inducida por Bax daña irreversiblemente a la células e inicia una serie de procesos que no se detienen con la inhibición de la ruta de las caspasas, y que conducen finalmente a la producción de especies de oxígeno reactivo y al déficit de ATP, que conducen a la necrosis (rev. Nickells, 1999).

Por otra parte, estudios realizados en ratones transgénicos que carecen de la expresión de bax han documentado que las neuronas que dependen de NGF para su supervivencia son más resistentes a la privación de esta NT en ausencia de expresión de bax, lo que se interpreta como una intervención de este gen pro-apoptótico en el mecanismo de muerte por privación de NGF en estas neuronas (Knudson y cols., 1995; Deckwerth y cols., 1996). Además, cuando se priva de interleucina-3 a células progenitoras linfoides de la línea FL5.12 de ratón, las cuales dependen de la citada citocina para su supervivencia, la expresión del gen bax no varía, mientras que su sobre-expresión acelera el proceso de muerte por privación (Oltvai y cols., 1993). Por ello, se postula que la expresión del gen bax existe en las células en condiciones normales y no induce por sí misma la apoptosis de estas células, pero que, en presencia de estímulos desencadenantes de muerte, la sobre-expresión de bax puede desplazar el equilibrio hacia la apoptosis, por favorecer el proceso (Oltvai y cols., 1993).

Isenmann y cols. (1997) han documentado que el aplastamiento del NO en ratas adultas induce un incremento en la expresión del gen bax en CGR, junto con una disminución en la expresión del gen bcl-2 en las mismas células. Además se ha documentado la sobre-expresión de bax a los treinta minutos del aplastamiento, por lo que dichos autores postulan que la sobre-expresión del gen bax sería la desencadenante de la apoptosis de las CGR (Isenmann y cols., 1997). De hecho, se ha documentado que la inhibición de la proteína Bax aumenta la supervivencia de las CGR de rata adulta tras la lesión del NO (Isenman y cols., 1999). Por otra parte, se ha documentado un incremento en la expresión del gen bax conjuntamente con una disminución en la expresión del gen bcl-2 en CGR de rata en cultivo sometidas a diversas agresiones que inducen la apoptosis en las mismas, como la isquemia o la

excitotoxicidad (Tezel y Wax, 1999), lo que lleva a postular la importancia del mantenimiento del equilibrio bax/bcl-2 para la supervivencia de las CGR tras diversos tipos de lesión.

Se postula que la apoptosis de las CGR inducida por la sobre-expresión del gen bax se caracteriza por la rotura de la membrana mitocondrial, y los efectos de esta alteración mitocondrial sobre la célula son tan agresivos que pueden determinar que el empleo de inhibidores de caspasas tenga una eficacia limitada en el aumento de supervivencia de las CGR tras la lesión (rev. Nickells, 1999).

1.6.3.1.1.4 Gen bak

También es un gen promotor de apoptosis (Kiefer y cols., 1995; Chittenden y cols., 1995 b; Farrow y cols., 1995), aunque en determinadas circunstancias puede actuar inhibiendo la apoptosis (Kiefer y cols., 1995). Su mRNA se expresa en cerebro adulto (Kiefer y cols., 1995), mientras que en la actualidad tan solo se ha descrito expresión del péptido Bak en neuronas sensoriales y simpáticas (Krajewski y cols., 1996; rev. Merry y Korsmeyer, 1997). Este péptido posee dominios homólogos con los cuáles interacciona con péptidos derivados de la expresión de genes anti-apoptóticos (Chittenden y cols., 1995 b), teniendo mayor afinidad por el péptido Bcl-xL (Sattler y cols., 1997). De hecho, algunos autores afirman que tan solo se une al péptido Bcl-xL (Farrow y cols., 1995). Sin embargo, se ha documentado que contrarresta los efectos antiapoptóticos de la expresión del gen bcl-2 en la línea de células pro-linfoides F5.12 (rev. Merry y Korsmeyer, 1997).

1.6.3.1.1.5 Gen bik

Es otro de los miembros de la subfamilia de genes promotores de apoptosis (Boyd y cols., 1995). El péptido codificado por este gen, Bik, posee tan solo un dominio homólogo común con los péptidos anti-apoptóticos, mediante el cual interacciona con los péptidos Bcl-2 y Bcl-xL, aunque también podría hacerlo con otros miembros de la misma familia (Boyd y cols., 1995). A pesar de estar muy repartido en diferentes tejidos, su distribución en tejido nervioso no se conoce con exactitud, aunque se ha documentado que en la célula se localiza en las membranas nuclear y citoplasmática (Boyd y cols., 1995; rev. Merry y Korsmeyer, 1997). Respecto a los mecanismos a través de los cuales ejerce sus efectos pro-apoptóticos, se postula que el gen bik actúa por una vía independiente de bax (ver más adelante) (Han y cols., 1996), y algunos autores postulan que sus efectos pro-apoptóticos son debidos a la alteración en los niveles del Ca^{2+} inducida por la expresión del gen (Zhu y cols.,

1999).

1.6.3.1.1.6 Gen bad

Es otro de los genes promotores de apoptosis. El producto de su expresión, el péptido Bad, es una proteína de 22 KDa capaz de unirse al péptido Bcl-xL con alta afinidad, separándolo de su unión con el péptido Bax (Yang y cols., 1995; Kelekar y cols., 1997), por lo que induce apoptosis. Sin embargo se postula que la expresión del gen bad por sí misma no induce apoptosis (Yang y cols., 1995). Se ha postulado que este gen interviene en la actividad antiapoptótica de las NTs, ya que la unión de estas últimas a sus receptores TrK induce la fosforilación del péptido Bad, que una vez fosforilado no puede romper el heterodímero Bax/Bcl-xL, lo que impide los efectos pro-apoptóticos de Bax y por lo tanto, inhibe la apoptosis (Datta y cols., 1997; rev. Nickels, 1999).

1.6.3.2 Familia de cisteína-proteasas (caspasas)

Uno de los genes promotores de apoptosis descubiertos en el nematodo *Caenorabditis elegans*, el ced-3, interviene en la muerte por apoptosis que tiene lugar durante el proceso de muerte celular programada en el citado nematodo (Ellis y Horvitz, 1986). Se observó que este gen (Yuan y cols., 1993) codificaba una proteína similar a las cisteína-proteasas convertidoras de interleukina-1 β de mamíferos (ICE; Cerretti y cols., 1992; Thornberry y cols., 1992). Estas proteasas similares a ICE, son promotoras de apoptosis, y se han denominado **caspasas** (cisteína-aspartasas). Se han identificado al menos 13 miembros de esta familia (rev. Nickells, 1999), una parte de los cuales se han agrupado en dos subfamilias filogenéticas: caspasas similares a caspasa-1 y caspasas similares a caspasa-3. Dentro de la subfamilia de caspasas similares a caspasa-1 se encuentran la caspasa 1, también denominada ICE-1 (Cerretti y cols., 1992; Thornberry y cols., 1992; Yuan y cols., 1993), la caspasa 4 (Faucheu y cols., 1996; Munday y cols., 1995) y la caspasa 5 (Munday y cols., 1995; Faucheu y cols., 1996). Dentro de las caspasas similares a caspasa 3 se incluyen la caspasa 2 (Nedd-2/ICH-1; Wang y cols., 1994), la caspasa 3 (CPP32/YAMA; Fernandes-Alnemri y cols., 1994; Liu y cols., 1996; Tewari y cols., 1995) y las caspasas 6 a 10 (Fernandes-Alnemri y cols., 1995a y b, 1996; Duan y cols., 1996).

La caspasa 3 juega un importante papel en la muerte neuronal fisiológica en SNC, por hidrolizar la poli-ADP-ribosa polimerasa (Tewari y cols., 1995; Nicholson y cols., 1995; Kuida y cols., 1996) y la proteína-quinasa ADN dependiente (Casciola-Rosen y cols., 1996), ambas implicadas en procesos de reparación y protección del

ADN fragmentado (Satoh y Lindahl, 1992; Morozov y cols., 1994), por lo que su hidrólisis desencadenaría la apoptosis irreversible por fragmentación del ADN. Además, se postula que la caspasa 3 puede intervenir en la muerte de las CGR tras diversos tipos de lesión, ya que se ha documentado que se activa en retina tras inducir apoptosis por medio de distintas lesiones (Tezel y Wax, 1999). Por ejemplo, tras la sección del NO se produce incremento de la expresión de la caspasa 3 en las CGR a partir de los 4 días de inducida la lesión (Kermer y cols., 1998, 1999a y b).

La sobre-expresión de cualquiera de las caspasas induce apoptosis en el SNC de vertebrados superiores (Wang y cols., 1994; rev. Miura y Yuan, 1996), como lo hace la sobre-expresión de ced-3 en nematodo. En la célula, estas proteasas se encuentran como pro enzimas inactivos o zimógenos, que han de sufrir rotura proteolítica para transformarse en formas activas. Esta rotura es desencadenada por diferentes lesiones inductoras de muerte por apoptosis. Por ello se postula que el proceso consiste en una cascada de activaciones de pro-enzimas (Tewari y cols., 1995; Salvesen y Dixit, 1997).

Una de las vías a través de las cuales se estimula la cascada de las caspasas es la formación de un complejo de 4 efectores: citocromo c, también denominado “factor activador de proteasa apoptótica 2” (Apaf-2), ATP y los factores activadores de proteasa apoptótica 1 y 3 (Apaf-1 y Apaf-3; Li y cols., 1997; Zou y cols., 1997). Apaf-1 muestra grandes analogías con los péptidos codificados por los genes ced-3 y ced-4 del nematodo *Caenorabditis elegans*. Es una proteína de 130 KDa, que se expresa profusamente en diversos tejidos fetales y adultos humanos, aunque se encuentra en mayor proporción en bazo y leucocitos adultos, y en riñón, cerebro y pulmón fetales (Zou y cols., 1997). Apaf-1 no presenta la estructura característica de las caspasas y es capaz de unirse por uno de sus dominios con el ATP (dominio común con Ced-4), por otro al citocromo c, que ha llegado al citoplasma celular procedente de la mitocondria a través de los poros que se producen en ésta (dominio WD; Zou y cols., 1997; rev. Nickels, 1999) y por otro dominio a proteínas implicadas en la apoptosis (dominio CARD). Apaf-3 es una proteína identificada como uno de los miembros de la familia de las caspasas, la pro-caspasa 9. Al parecer, la formación del complejo Apaf-1/citocromo c en presencia de ATP permite la unión de Apaf-1 a Apaf-3, a través de su dominio CARD. Esta última unión provoca la rotura y por tanto, la activación de la pro-caspasa 9, que se transformaría en caspasa 9 (Li y cols., 1997; Zou y cols., 1997; rev. Nickells, 1999), que a su vez rompería la pro-caspasa 3 transformándola en su forma activa, la caspasa 3 ó CPP32/YAMA (Tewari y cols., 1995; rev. Nickells, 1999). Esta caspasa 3

es capaz de inducir la fragmentación del ADN (Liu y cols., 1997), iniciándose de esta forma el proceso de apoptosis. El hecho de que la caspasa 3 induzca la fragmentación del ADN así como de algunas proteínas importantes para el mantenimiento de la homeostasis del tejido, lleva a postular que su activación es fundamental en los primeros estadios del proceso para hacerlo irreversible (Casciola-Rosen y cols., 1996).

En otros tipos de lesión, la cascada de las caspasas no es inducida por la formación de poros en la membrana mitocondrial y salida del citocromo c al citoplasma celular, sino que se produce a través de otras vías. Así, se ha documentado que en la apoptosis mediada por Fas, la unión de esta citocina a su ligando FasL, identificado como caspasa 8, induce la activación de este último, desencadenándose la cascada de las caspasas (Enari y cols., 1996; Fernandes-Alnemri y cols., 1996; Srinivasula y cols., 1996; Yakovlev y cols., 1997). A este respecto, se ha documentado que en cultivos de células retinianas de rata en los que se produce lesión por adición al medio de anticuerpos contra la proteína heat-shock 27, la vía de activación de la cascada de las caspasas es mediada por Fas (Tezel y Wax, 1999) (ver más adelante).

Determinadas sustancias inhiben, al menos parcialmente, la activación de las caspasas, y su empleo ha permitido conocer algunas de las vías a través de las cuales actúan estas enzimas, y también aumentar la supervivencia de neuronas tras diversos tipos de lesión. Algunos de los inhibidores de caspasas producen disminución en los niveles de interleucina-1-beta, mediadora de inflamación, lo que llevó a postular que uno de los posibles desencadenantes de la apoptosis por parte de las caspasas sería precisamente la transformación de la pro-interleucina-1-beta en su forma activa (Thornberry y cols., 1992).

Aunque los inhibidores de caspasas pueden bloquear ciertas vías de apoptosis, se ha comprobado que no tienen un efecto absoluto en la supervivencia celular, bien porque en algunos casos la apoptosis se produce por una vía diferente a la cascada de las caspasas, bien porque estos inhibidores actúen específicamente sobre determinados tipos de caspasas (Park y cols., 1998), por lo que solo inhibirían la muerte inducida por diferentes estímulos y que fuera mediada por una determinada caspasa.

Así, por ejemplo, los inhibidores de caspasas no evitarían finalmente la muerte cuando esta es producida por un mecanismo dependiente del gen bax (Xiang y cols., 1996), ya que la formación de poros mitocondriales que induce la expresión

de este gen, provoca daños celulares profundos que puede dar lugar finalmente a la formación de especies de oxígeno reactivo, capaces por sí mismas de inducir apoptosis. Sin embargo, se postula que en la muerte inducida por unión específica de Fas (ver más atrás) a su receptor FasL, que ocurre por activación directa de la cascada de las caspasas, sí se podría evitar totalmente la muerte por apoptosis con el empleo de inhibidores de caspasas (rev. Nickells, 1999).

Además, se ha documentado que distintos tipos de lesión pueden inducir apoptosis por diferentes vías en las mismas neuronas. Así, la privación de factores tróficos induce la apoptosis en neuronas simpáticas por activación de la caspasa 2 (Nedd-2), mientras que el estrés oxidativo induce la apoptosis en las mismas neuronas por activación de la caspasa 1 (Troy y cols., 1997; Park y cols., 1998). Sin embargo, no se conoce la caspasa o caspasas que intervienen en la apoptosis inducida por daño en el ADN en las citadas neuronas (Park y cols., 1998). Por tanto, el tipo de inhibidor de caspasas empleado para evitar la apoptosis en un determinado tipo neuronal dependerá de la lesión sufrida por las mismas.

1.6.4 LA APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

Al igual que en otros tejidos, en la retina la apoptosis se produce tanto en procesos fisiológicos como patológicos.

Entre los procesos fisiológicos en los que se produce apoptosis en la retina se encuentra la muerte celular programada que se produce en condiciones normales durante el desarrollo, y que se ha denominado *muerte neuronal fisiológica*. Se ha documentado que en retina la muerte neuronal fisiológica se produce por apoptosis e interviene en el mantenimiento de la homeostasis del tejido, en la creación de las conexiones sinápticas durante el desarrollo y en la elaboración de la estructura histológica del sistema visual (Penfold y Provis, 1986; Provis, 1987; Provis y Penfold, 1988). Así, se postula que las CGR que no llegan a conectar con sus territorios diana durante el desarrollo, no recibirían el necesario aporte trófico y morirían por apoptosis (Insausti y cols., 1984), como lo harían las CGR que realizaran conexiones inadecuadas, por no conseguir tampoco el aporte trófico preciso (Cowan y cols., 1984; O'Leary y cols., 1986). Se postula que este proceso de muerte neuronal fisiológica que tiene lugar en la retina durante el desarrollo regula la citoarquitectura de la misma, ya que el resultado final es una distribución irregular de las CGR, existiendo una mayor densidad de éstas en la zona central de la retina, que es fundamental para la visión, y una menor densidad en la periferia retiniana. De hecho, en hamster (Sengelaub y cols., 1986) y en humano (Provis, 1987) se ha

documentado que se produce mayor muerte de CGR en la periferia de la retina durante el desarrollo.

Pero también sufren apoptosis las CGR en distintos procesos patológicos, y así, se ha documentado que al menos una parte de las CGR que mueren a causa de neuropatía óptica isquémica (Levin y Louhab, 1996), glaucoma (Quigley y cols., 1995; rev. Nickells, 1996), isquemia (Lam y cols., 1999), o tras la sección del NO (Berkelaar y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994; Rabacchi y cols., 1994; Quigley y cols., 1995; Porciatti y cols., 1996), lo hacen por apoptosis, encontrándose en el caso de la sección del NO la densidad máxima de células apoptóticas a los 7 días de la lesión (Isenmann y cols., 1997).

1.6.4.1 Implicación de las caspasas en la muerte por apoptosis de las CGR

En retina se ha documentado el aumento en la expresión de la caspasa 3 en las CGR tras diversos tipos de lesión (Tezel y Wax, 1999; Liu y cols., 1999). Por ello se postula que esta caspasa puede jugar un papel importante en la muerte por apoptosis de las CGR inducida por algunos tipos de lesión, como se ha documentado en la sección del NO de rata empleando el inhibidor irreversible de la caspasa 3 (Kermer y cols., 1999b). Sin embargo, Tezel y Wax (1999) han documentado que la apoptosis inducida en cultivos de CGR por inhibición de la proteína heat-shock 27 es mediada por la activación de la caspasa 8 (FasL) (Tezel y Wax, 1999). Por tanto, también en retina diferentes tipos de lesión inducen diferentes vías de muerte por apoptosis de las CGR.

El hecho de que la muerte por apoptosis de las CGR pueda ser mediada por diferentes caspasas, y que se produzca sobre-expresión de bax tras algunas lesiones retinianas, lo que induce la formación de poros en la mitocondria que pueden producir una alteración celular profunda que provocaría la muerte de las CGR por una vía más lenta, y similar a la necrosis (Xiang y cols., 1996), puede determinar que el empleo de inhibidores de una caspasa específica tenga una eficacia limitada sobre la supervivencia de las CGR.

2. OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

En mamíferos, la sección del NO induce la degeneración anterógrada de los axones lesionados y la degeneración retrógrada de los axones y del soma de las CGR. Las neuronas degeneradas son fagocitadas por poblaciones de células de microglía activada de la retina. Se postula que el papel de las células de microglía en la muerte de las CGR tras la sección del NO no se limita tan solo a fagocitar los desechos de las neuronas muertas, sino que pueden intervenir de forma activa en dicha muerte neuronal. Además, se ha documentado que las CGR sobreviven tras la administración de algunas neurotrofinas, como NGF, BDNF y NT4, y que las células de microglía son capaces de expresar factores tróficos (NGF, BDNF, NT3, NT4, etc.), por lo que podrían mediar en los efectos neuroprotectores de diversos factores tróficos sobre las CGR en algunos tipos de lesión.

Por otra parte, se ha documentado que en la muerte de las CGR tras la sección del NO y otros tipos de lesión están implicados genes relacionados con la apoptosis (bcl-2, bcl-xL y bax) así como algunas de las proteínas que forman parte de la cascada de las caspasas. ¿Intervienen de alguna manera las células de microglía en esta vía de muerte de las CGR?

Este trabajo experimental se puso en marcha para investigar el papel de las células de microglía en la muerte o supervivencia de las CGR tras la sección del NO, y para ello nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1) Determinar el número y la localización de las células de microglía residente de la retina de rata adulta.**
- 2) Determinar la respuesta de las células de microglia de la retina de rata a la sección del NO.**
 - 2.1) Estudiar si la administración intravítrea de tres neurotrofinas: el NGF, la NT3 y el BDNF, es capaz de modificar dicha respuesta.**
 - 2.2) Estudiar si la administración intravetrea de una sustancia inhibidora de macrófagos, es capaz de modificar esta respuesta.**

3) Estudiar la degeneración retrógrada de las CGR de rata tras la sección del NO.

- 3.1) Determinar qué proporción de células de microglía de la retina activada intervienen en la fagocitosis de las CGR degeneradas.**
- 3.2) Determinar si la administración intravítrea de las neurotrofinas NGF o BDNF modifica la degeneración retrógrada de las CGR y la respuesta microglial.**
- 3.3) Determinar si la administración intravítrea de otros factores neurotróficos, como el factor de crecimiento similar a la insulina-I o la pro-insulina humana, o la administración subcutánea de la pro-insulina humana modifican la degeneración retrógrada de las CGR tras la sección del NO y la respuesta microglial.**
- 3.4) Determinar si la administración de péptidos implicados en la muerte celular por apoptosis, como el Bcl-2, los Bcl-xL y Bcl-xS, o el inhibidor irreversible de la caspasa 3 (Z-DEVD-cmk) modifican la degeneración retrógrada de las CGR y la respuesta microglial.**
- 3.5) Determinar si la administración intravítrea del factor inhibidor de macrófagos (MIF) modifica la degeneración retrógrada de las CGR y la respuesta microglial.**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos del presente trabajo era investigar la respuesta de las células de microglía residentes en la retina de la rata adulta tras la sección del NO, así como el papel que juegan dichas células en el proceso de degeneración que sufren las CGR tras la citada lesión (Liebermann, 1971; Thanos, 1988). Para ello, en un primer grupo de animales, se seccionó el NO izquierdo y se analizaron los cambios cualitativos y cuantitativos que se producían en las células de microglía residente, tanto en el ojo izquierdo o experimental como en el derecho o control, empleando la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa, que permite el marcaje de las células de microglía. Como se ha documentado que la lesión del NO de la rata induce cambios en la población de células de microglía residente en la retina contralateral, se analizó también un grupo de animales controles en el que no se había realizado ninguna manipulación experimental para estudiar las células de microglía de la retina en condiciones normales.

Para saber si la respuesta de las células de microglía de la retina tras la sección del NO se modificaba con la administración de sustancias exógenas, en otros grupos de animales con sección del NO del ojo izquierdo se administró intravíteamente en el ojo izquierdo una de las siguientes sustancias: el Factor Inhibidor de Macrófagos (MIF), el Factor de Crecimiento Nervioso fracción 2,5S (NGF 2,5S), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) o la Neurotrofina 3 (NT3). Para comprobar que los resultados obtenidos en los animales a los que se había administrado algún factor eran independientes de los efectos de la inyección por sí misma o del vehículo empleado, en dos grupos de animales con sección del NO izquierdo se realizó un pinchazo simple del globo ocular o inyección intravítrea del vehículo empleado para las sustancias anteriores.

Para estudiar la supervivencia de las CGR de la retina tras la sección del NO, y la influencia que las células de microglía activada pueden tener en la misma, en otro grupo de animales se marcaron las CGR aplicando en colículo superior el trazador fluorescente fluorogold (FG). Esto permite el marcaje retrógrado del cuerpo celular de las CGR. A los siete días del marcaje se seccionó el NO del ojo izquierdo a su salida del globo ocular, y posteriormente se estudió la supervivencia de las CGR y el número de células de microglía que se marcaban con el trazador fluorescente.

Para investigar si la actividad fagocítica de las células de microglía se modificaba con la inyección de factores exógenos, en otro grupo de animales, en el momento de la sección del NO, se administró intravítreamente alguna de las siguientes sustancias: las neurotrofinas NGF, BDNF y NT3; el péptido inhibidor de macrófagos (MIF); el factor trófico Factor de Crecimiento similar a Insulina-I (IGF-I) o la Pro-insulina Humana (PIH), solos o asociados a la neurotrofina NT3; los péptidos implicados en la apoptosis Bcl-2, Bcl-xS, Bcl-xL o el inhibidor irreversible de la caspasa 3, ZDEVD-cmk. En otro grupo de animales no se realizó inyección intravítrea sino que se administró la PIH por vía subcutánea. Para comprobar que los resultados obtenidos en este segundo grupo experimental eran independientes de la punción ocular o de los vehículos empleados en esta parte del estudio, en varios animales en los que se habían marcado las CGR con fluorogold y se había seccionado el NO izquierdo se llevó a cabo punción simple del globo ocular o inyección subcutánea o intravítrea de los vehículos utilizados para administrar las diferentes sustancias.

3.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA

Hemos empleado un total de 304 ratas hembras adultas Sprague-Dawley con un peso medio entre 180 y 225 gramos, criadas en el animalario de la Universidad de Murcia. En este animalario los animales eran alimentados "ad libitum" y eran mantenidos en cajas, en habitaciones a temperatura controlada y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. La habitación se mantuvo iluminada de las 8:00 a las 20:00 horas, y la intensidad de luz variaba dentro de las cajas de los animales entre 8 a 24 luxes, según la altura a la que se hubiesen situado las cajas del suelo.

Todos los animales empleados en nuestros experimentos han sido tratados de acuerdo con las normas éticas internacionales dictadas por la Unión Europea en noviembre de 1986 (86/609/EV), con la legislación española para el uso de animales de laboratorio (BOE 67/8509-8512,1988) y con las Normas de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO).

Para todas las manipulaciones experimentales los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 7% en suero salino. La dosis empleada fue de 0,42 mg/g de peso corporal. Para sacrificar a los animales se les administró intraperitonealmente una dosis letal del mismo anestésico (1,26 mg/g).

3.3 GRUPOS EXPERIMENTALES

Los animales fueron divididos en dos grupos: En un primer grupo se realizaba la sección del NO del ojo izquierdo y la tinción de las células de microglía mediante la técnica de la NDPasa. En un segundo grupo se realizaba marcaje de las CGR con FG y se seccionaba el NO del ojo izquierdo.

3.3.1 GRUPO I: Sección del nervio óptico y técnica de la NDPasa

En este primer grupo se emplearon 119 animales. En 4 animales de este grupo no se llevó a cabo técnica quirúrgica alguna. En el resto de los animales se seccionó el NO del ojo izquierdo, y en algunos de estos animales se administraron diversas sustancias neurotróficas o el factor inhibidor de macrófagos.

Los animales de este grupo fueron divididos, según las manipulaciones quirúrgicas empleadas, en tres subgrupos:

3.3.1.1 Subgrupo I.1: Grupo control

Se emplearon en este grupo 4 animales que no sufrieron manipulación experimental alguna.

3.3.1.2 Subgrupo I.2: Sección del nervio óptico

Se emplearon en este grupo 33 animales en los que solo se realizó sección del NO izquierdo y que fueron procesados a los 7 (n=6), 10 (n=5), 14 (n=4), 22 (n=5), 30 días (n=5) ó 40 (n=4) días después de ésta.

3.3.1.3 Subgrupo I.3: Sección del nervio óptico e inyección intravítrea de diversos factores

Se emplearon en este grupo un total de 86 animales. En todos ellos se seccionó el NO izquierdo e inmediatamente después, se inyectó en el vítreo uno de los siguientes factores:

3.3.1.3.1 Factor inhibidor de macrófagos (MIF)

Este grupo experimental constaba 33 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de MIF (Tuftsin Fragment 1-3, Sigma Chemical, Co., St. Louis, USA) en tampón fosfato salino (PBS), a una concentración de 2,5

µg/ml, y se procesaron 7 (n=5), 10 (n=5), 14 (n=6), 22 (n=6), 30 (n=5) ó 40 (n=6) días después de la sección del NO.

3.3.1.3.2 Factor de crecimiento nervioso (NGF)

En este grupo experimental se emplearon 12 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de NGF en PBS, a una concentración de 1 µg/µl, y que fueron procesados 7 (n=6) ó 14 (n=6) días después de la sección del NO.

3.3.1.3.3 Factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF)

Este grupo experimental se componía de 18 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de BDNF (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.; Tarrytown, New York, EEUU) en PBS, a una concentración de 1 µg/µl, y que fueron procesados 7 (n=6), 14 (n=6) ó 30 (n=6) días después de la sección del NO.

3.3.1.3.4 Neurotrofina 3 (NT3)

Este grupo constaba de 17 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de NT3 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.; Tarrytown, New York, EEUU) en PBS, a una concentración de 1 µg/µl, y que se procesaron 7 (n=5), 14 (n=6) ó 30 (n=6) días después de la sección del NO.

3.3.1.3.5 Tampón fosfato salino (PBS)

Este grupo experimental se componía de 3 animales, que se procesaron 7 días después de la sección del NO.

3.3.1.3.6 Punción simple

Este grupo se componía de 3 animales en los que, inmediatamente después de seccionar el NO, se puncionó el globo ocular como si se fuera a realizar una inyección intravítrea pero no se administró sustancia alguna. Los animales se procesaron 7 días después de la sección del NO.

Todos los animales de este grupo fueron procesados y las retinas se reaccionaron con la técnica de la NDPasa para la demostración de la microglía. Se

estudió en este grupo la morfología y la densidad de células de microglía NDPasa positivas en la capa de células ganglionares (CCG) y la capa plexiforme interna (CPI), tanto en la retina izquierda como en la retina derecha o contralateral a la sección del NO. También se realizó un estudio cualitativo de la microglía retiniana en las cuatro capas en las que se observaban células de microglía NDPasa+: CFN, CCG, CPI y CPE.

	PERIODO DE SUPERVIVENCIA						
	0 DÍAS	7 DÍAS	10 DÍAS	14 DÍAS	22 DÍAS	30 DÍAS	40 DÍAS
CONTROL	n=4						
SIN INYECCIÓN		n=6	n=5	n=4	n=5	n=5	n=4
MIF		n=5	n=5	n=6	n=6	n=5	n=6
NGF		n=6		n=6			
BDNF		n=6		n=6		n=6	
NT3		n=5		n=6		n=6	
VEHÍCULO		n=3					
PINCHAZO		n=3					

TABLA I

Descripción de los subgrupos de animales que componían el grupo I, la sustancia que les fue administrada en su caso y su periodo de supervivencia. A todos los animales se les realizó sección del NO izquierdo menos al los del grupo control.

3.3.2 GRUPO II: Marcaje de CGR con fluorogold y sección del nervio óptico

Este grupo constaba de 185 animales en los que se marcaron las CGR aplicando en colículo superior el trazador neuronal fluorescente FG. Siete días más tarde se seccionó el NO y en algunos animales, inmediatamente después de la lesión, se administraron intravítrea o subcutáneamente diversas sustancias, como neurotrofinas, o el factor inhibidor de macrófagos, o péptidos que intervienen en la muerte por apoptosis. Los animales se procesaron 7 ó 14 días después de la sección del NO.

Este grupo experimental se dividió en 14 subgrupos:

3.3.2.1 Subgrupo II.1: Sección del nervio óptico

Se emplearon en este grupo 14 animales en los que tan solo se seccionó el

NO y que fueron procesados 7 (n=7) ó 14 (n=7) días después de la sección del NO.

3.3.2.2 Subgrupo II.2: Sección del nervio óptico e inyección de factores

3.3.2.2.1 Inyección de MIF

Se emplearon en este grupo 16 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de MIF (Tuftsin Fragment 1-3. Sigma Chemical, Co. St. Louis, USA) en PBS, a una concentración de 2,5 µg/ml. Se procesaron los animales 7 (n=8) ó 14 (n=8) días después de la sección del NO.

3.3.2.2.2 Inyección de NGF

En este grupo se emplearon 15 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de NGF en PBS, a una concentración de 1 µg/µl, y se procesaron los animales 7 (n=7) ó 14 (n=8) días después de la sección del NO.

3.3.2.2.3 Inyección de BDNF

Este grupo se componía de 15 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de BDNF (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.; Tarrytown, New York, EEUU) en PBS, a una concentración de 1 µg/µl, y se procesaron los animales 7 (n=8) ó 14 (n=7) días después de la sección del NO.

3.3.2.2.4 Inyección de Proinsulina Humana (PIH)

En este grupo se emplearon 20 animales. En 8 animales se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de PIH (Gro-Pep, Ltd.; Adelaide, Australia) en PBS, a una concentración de 1 µg/µl y fueron procesados tras 7 días de la sección del NO. En otros 12 animales, se administraron subcutáneamente 300 µl de una solución que contenía 10 µg de PIH en PBS, inmediatamente después de la sección del NO y cada 24 horas, hasta el día de su procesado. Los animales se procesaron 7 (n=13) ó 14 (n=7) días después de la sección del NO.

3.3.2.2.5 Inyección de Factor de Crecimiento similar a Insulina-I (IGF-I)

En este grupo se emplearon 8 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de IGF-I (Gro-Pep, Ltd.; Adelaide, Australia) en

PBS, a una concentración de 1 µg/µl, y los animales se procesaron 7 días después de la sección del NO.

3.3.2.2.6 Inyección de NT-3 más IGF-I

Con el fin de estudiar si el IGF-I potencia el efecto de la NT3, a 6 animales se les administraron en vítreo 5 µl de una solución que contenía IGF-I (1 µg/µl) y NT3 (1 µg/µl) en PBS, y los animales fueron procesados 7 días después de la sección del NO.

3.3.2.2.7 Inyección de NT-3 más PIH

Para estudiar si la PIH potencia el efecto de la NT3, en 9 animales se administraron en el vítreo 5 µl de una solución que contenía PIH (1 µg/µl) y NT3 (1 µg/µl) en PBS y fueron procesados 7 días después de la sección del NO.

3.3.2.2.8 Inyección del péptido Bcl-2

Se emplearon en este grupo 13 animales a los que se administraron intravítreamente 5 µl de una solución de Bcl-2 (Calbiochem; La Jolla, California, EEUU) en PBS a una concentración de 1 µg/µl. En 7 animales el Bcl-2 se administró tan solo inmediatamente después de la sección del NO, mientras que otros 6 animales recibieron una segunda inyección el cuarto día tras la sección del NO. Todos los animales se procesaron 7 días después de la sección del NO.

3.3.2.2.9 Inyección de inhibidor irreversible de la caspasa 3 ZVED-cmk

En este grupo se emplearon 15 animales a los que se administraron inyecciones repetidas intravítreas que contenían 2 µl de una solución del inhibidor irreversible de la caspasa 3 (Z-DEVD-cmk; Bachem; Bubendorf, Suiza) en PBS con un 2% de dimetil sulfóxido (DMSO), a una concentración de 2 µg/µl. Las inyecciones se llevaron a cabo en el momento de la sección del NO y 4 días después en aquellos animales que sobrevivieron 7 días (n=8), y en el momento de la sección del NO y 4 y 7 días después en los animales que sobrevivieron 14 días (n=7) tras la sección del NO.

3.3.2.2.10 Inyección de péptido Bcl-xS

En este grupo se emplearon 6 animales a los que se inyectaron

intravítreamente 5 μ l de una solución de Bcl-xS (Calbiochem; La Jolla, California, EEUU) en PBS, a una concentración de 1 μ g/ μ l. Estos animales recibieron dos inyecciones intravítreas, una inmediatamente después de la sección del NO y otra, 4 días después. Los animales se procesaron a los 7 días de la lesión.

3.3.2.2.11 Inyección de péptido Bcl-xL

En este grupo se emplearon 7 animales a los que se administraron intravítreamente 5 μ l de una solución de Bcl-xL (Calbiochem; La Jolla, California, EEUU) en PBS, a una concentración de 1 μ g/ μ l, inyectando el producto los días 0 y 4 tras la sección del NO. Los animales se procesaron a los 7 días de la lesión.

3.3.2.2.12 Inyección de vehículo

En 29 animales se administraron intravítrea o subcutáneamente, inmediatamente después de la sección del NO, las soluciones utilizadas como vehículo para nuestro estudio. Así, 11 animales recibieron una inyección intravítrea de 5 μ l de tampón fosfato salino (PBS) 0,1M a pH 7,4 y fueron procesados 7 (n=6) ó 14 (n=5) días después de la sección del NO. Otros 12 animales recibieron inyecciones subcutáneas de 300 μ l de tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 desde día 0 hasta día 6, cuando el periodo de supervivencia era de 7 días (n=6), o hasta día 13, cuando el periodo de supervivencia era de 14 días (n=6). Por último, 6 animales recibieron una inyección intravítrea de 5 μ l de PBS 0,1M pH 7,4 con un 2% de Dimetil Sulfóxido (DMSO; Sigma Chemical, Co. St.Louis, EEUU), y fueron procesados a los 7 (n=6) días de la sección del NO.

3.3.2.2.13 Pinchazo simple

En 12 animales, inmediatamente después de seccionar el NO, se realizó una punción simple del ojo izquierdo sin inyectar sustancia alguna. Los animales se procesaron 7 (n=6) ó 14 (n=6) días después de la sección del NO.

		PERIODO DE SUPERVIVENCIA	
		7 DÍAS	14 DÍAS
SIN INYECCIÓN		n=7	n=7
C O N I N Y E C C I Ó N	MIF	n=8	n=8
	NGF	n=7	n=8
	BDNF	n=8	n=7
	PIH	n=13	n=7
	IGF-I	n=8	
	NT3 + IGF-I	n=6	
	NT3+PIH	n=9	
	Bcl-2	n=13	
	ZDEVd-cmk	n=8	n=7
	Bcl-xS	n=6	
	Bcl-xL	n=7	
	VEHÍCULO	n=18	n=12
	PINCHAZO	n=6	n=6

TABLA II

Descripción de los subgrupos de animales que componían el grupo II, el tipo de sustancia administrada y su periodo de supervivencia. En todos los animales se habían marcado las CGR mediante la aplicación de fluorogold en el CS y se había seccionado el NO izquierdo 7 días más tarde. Después de la sección del NO, los animales fueron tratados con las sustancias que aparecen en la tabla, y fueron procesados 7 ó 14 días después.

Para conseguir los objetivos de esta parte del estudio, se calcularon las densidades de CGR marcadas con FG en CCG, tanto en retina control como experimental, en los dos subgrupos que componían este grupo experimental. De esta forma, se obtuvieron las densidades medias de las mismas. Así mismo, se contaron todas las células de microglía marcadas con FG en las retinas experimentales, obteniéndose igualmente las densidades medias.

3.4 TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

3.4.1 MARCAJE DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA CON EL TRAZADOR NEURONAL FLUORESCENTE FLUOROGOLD

Se afeitaba el pelo de la parte dorsal de la cabeza y cuello del animal y con el bisturí se realizaba una incisión sagital en el cuero cabelludo, exponiendo el cráneo del animal. Se hacía una craneotomía parietal bilateral con fresadora (Dremel, Free-Wheeler, Cordless Moto-tool, Model 850), resecando con ayuda de micropipeta conectada a sistema de aspiración (Ordisi, S.A., L'Hospitalet. Barcelona, España), la cantidad necesaria de hipocampo y corteza cerebral para dejar expuestos ambos colículos superiores. A continuación, se resecaba la piamadre que recubre al CS y se

procedía a aplicar en la superficie de ambos CS una pequeña porción de esponja de fibrina (Spongostan Film, Ferrosan, Dinamarca), previamente empapada en una solución de FG al 3% (FG; Fluorochrome, Inc., Engelwood, Colorado, EEUU) en suero salino conteniendo un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Chemical, Co. St.Louis, EEUU). Finalmente, se procedía a suturar la piel del animal con seda trenzada de 5/0.

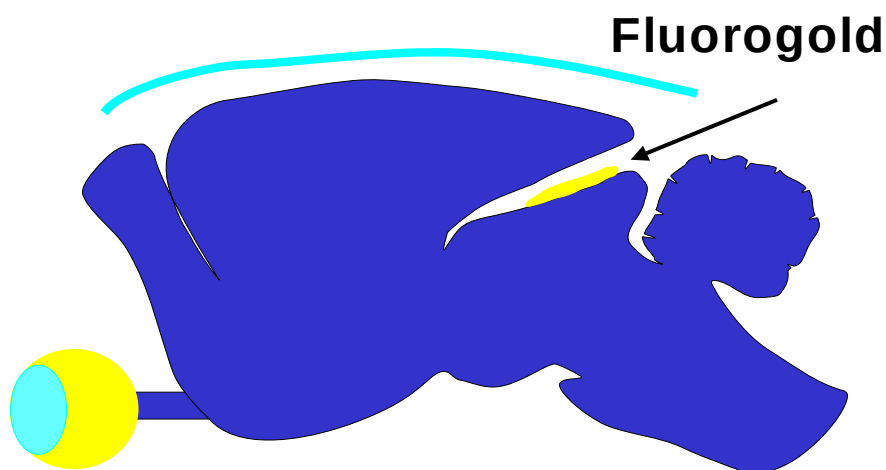


Imagen : marcaje de las células ganglionares de la retina por medio de la aplicación del trazador neuronal fluorescente fluorogold en ambos colículos superiores.

3.4.2 SECCIÓN DEL NERVIO ÓPTICO

Se afeitaba la parte dorsal de la cabeza y cuello del animal, y se realizaba una incisión sagital en cuero cabelludo con bisturí, situada medialmente al reborde orbitario superior del ojo izquierdo. Se disecaba la piel hacia el reborde orbitario izquierdo y se realizaba una incisión sobre este reborde orbitario, se disecaban el tejido adiposo y glandular que rodea el ojo y se disecaban y seccionaban los músculos recto superior, oblicuo superior y retractor bulbi, a fin de acceder a la parte posterior del globo ocular y al NO, en su porción más proximal al globo ocular. Antes de proceder a la sección del NO y puesto que la cubierta dural de éste contiene, en su zona nasal inferior, a la arteria oftálmica y al sistema venoso ocular en su trayecto intraorbitario (Janes y Bounds, 1955; Forrester y Peters, 1967), realizábamos una incisión longitudinal de la cubierta meníngea del NO, en una longitud suficiente como para poder aislarlo de sus cubiertas meníngeas. Una vez aislado el NO, procedíamos a seccionarlo 0,5 milímetros por detrás de su salida del globo ocular (Villegas-Pérez y cols., 1993). Inmediatamente después, comprobábamos la integridad de la circulación

retiniana mediante la visualización del fondo de ojo del animal, a través del microscopio operatorio. Para ello, antes de la intervención, se había instilado en el ojo izquierdo una gota de colirio de Tropicamida (Laboratorios Cusí, El Masnou, Barcelona), para dilatar la pupila. Para observar el fondo de ojo, aplicábamos una gota de Gonioftal (Metilcelulosa al 10%, Laboratorios Cusí, El Masnou, Barcelona) sobre la córnea del ojo izquierdo, y por encima un cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro.

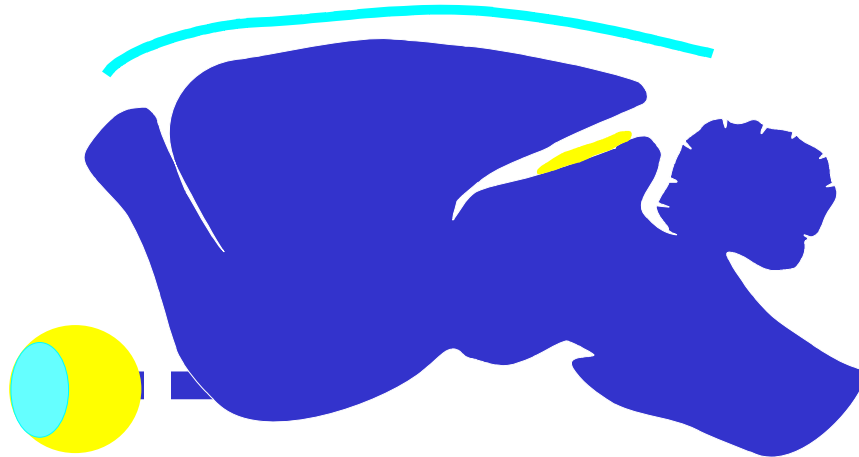


Imagen 4: sección del nervio óptico del ojo izquierdo a los 7 días del marcaje de las células ganglionares de la retina mediante la aplicación en colículo superior del trazador neuronal fluorescente fluorogold.

3.4.3 INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE FACTORES

Las diluciones de las sustancias se prepararon inmediatamente antes de su uso, y se mantuvieron en refrigerador entre 2 y 8°C hasta el momento de su administración. Se realizaba una esclerotomía en la zona supratemporal de ojo izquierdo a nivel de ora serrata, con una aguja estéril de 30 G (Microlance 3; Becton Dickinson, S.A., Fraga, Huesca, España). Posteriormente se introducía por esta esclerotomía una aguja de 33G conectada a una jeringa Hamilton de 5 µl (Hamilton Company, Reno, Nevada, EEUU) mediante la cual se inyectaba el factor lentamente cuando se observaba a través de la córnea que la punta de la aguja se encontraba en la cavidad vítrea. En ningún animal lesionamos el cristalino cuando realizamos esta inyección (Leon y cols., 2000). En los animales en los que se realizó punción simple del globo ocular, no se inyectó sustancia alguna. Una vez realizada la inyección, se

extraía la aguja lentamente, para evitar el reflujo, y se observaba nuevamente el fondo de ojo para comprobar que no se habían lesionado la retina ni el cristalino.

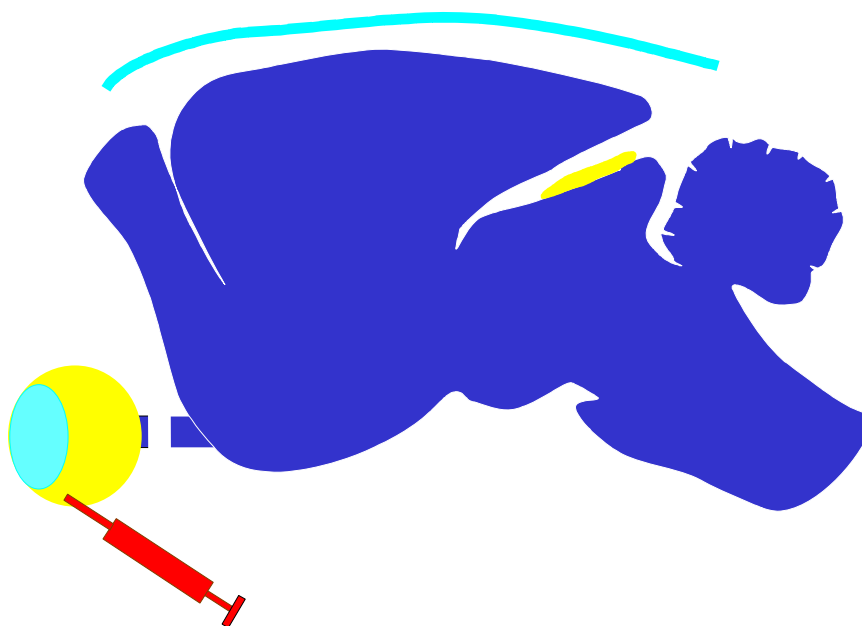


Imagen 5: inyección de diferentes sustancias en cámara vítrea del ojo izquierdo, inmediatamente después de la sección del nervio óptico.

3.4.4 INYECCIÓN SUBCUTÁNEA DE FACTORES

A 12 animales se les administró PIH subcutáneamente, empleando para ello una jeringa de insulina estéril de 1 ml con aguja de 25 G (Terumo, Leuve, Bélgica). La inyección se llevó a cabo inmediatamente después de la sección del NO y en los 5 días sucesivos, o en los 12 días sucesivos, según el periodo de supervivencia, y siempre en el mismo momento del día. El producto se preparó el día en que se realizó la primera inyección, y se mantuvo refrigerado a 4°C hasta el momento en que se inyectaba. La dosis inyectada cada vez fue de 10 µg. Al día siguiente de la intervención se midió la glucemia de los animales a las dos horas de la administración de la PIH, con el medidor de glucemia Accutrend alpha (Boehringer Mannheim, S.A., Barcelona) previamente calibrado, para comprobar que el producto inyectado no tenía efectos negativos sobre la concentración de glucosa en sangre (no se muestran datos).

3.5 PROCESADO DE LOS ANIMALES

Los animales se perfundieron a través de la aorta ascendente con suero salino durante dos o tres minutos, e inmediatamente después con 250 ml de una solución fijadora que contenía paraformaldehído (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) al 4% en tampón cacodilato 0,1 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) a pH 7,4, si se trataba de los animales del grupo I, o con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M a pH 7,2, en los animales del grupo II.

Tras la perfusión, se enucleaban ambos ojos, marcando la parte superior del globo ocular con una sutura, y se disecaban las retinas, a las que se les practicaban cuatro cortes radiales, desde la periferia hacia la cercanía del disco óptico, para facilitar su posterior montaje global. Los cortes se realizaban de forma que el correspondiente a la zona superior del globo ocular era más profundo, lo que permitía conocer en todo momento la orientación de la retina.

En el grupo I, las retinas se postfijaban durante 4 días en la misma solución fijadora empleada en la perfusión. En el grupo II, las retinas se postfijaban durante 1 hora en la solución de fijación. Tras el periodo de postfijación se procedía en ambos grupos a la limpieza profunda y cuidadosa del vítreo. Esta operación se realizaba manteniendo las retinas constantemente sumergidas en la solución fijadora.

A continuación, las retinas de los animales del grupo experimental I se procesaban siguiendo la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa, realizando posteriormente montaje global de las mismas en portas gelatinizados, con la superficie vítrea hacia arriba, empleando como solución de montaje glicerol al 50% en tampón carbonato sódico 0,1 M a pH 9,0 conteniendo un 0,04% de p-fenilendiamina (Dodd y cols., 1.984).

Las retinas del grupo experimental II no eran reaccionadas, sino que inmediatamente se montaban en portas gelatinizados, con la superficie vítrea hacia arriba, empleando la misma solución de montaje utilizada en el grupo I. Todos los cubreobjetos se sellaban al portaobjetos con laca de uñas.

3.5.1 REACCIÓN ENZIMO-HISTOQUÍMICA DE LA NDPASA

Para esta reacción hemos utilizado el protocolo de Novikoff y Goldfischer (1961) modificado por Murabe y Sano (1982a). Las retinas del grupo I, después de ser postfijadas, se lavaban durante 30 minutos en solución de tampón cacodilato 0,1 M, a pH 7,4 (Sigma Chemical, CO, St. Louis, EEUU) y a temperatura de 4°C.

Posteriormente, las retinas se volvían a lavar durante 5 minutos con tampón trizma-maleato 0,2M a pH 7,4 a temperatura ambiente. Inmediatamente, las retinas eran incubadas en estufa durante un periodo de 30 minutos, a temperatura de 38°C, en un medio de incubación previamente filtrado que contenía: agua destilada (7 ml), sal sódica del substrato citidina-5'-difosfato (Sigma C-9755, USA) 10 mM (25 mg), tampón trizma-maleato 0,2M, pH 7,4 (10 ml), cloruro de manganeso (II) (MnCl_2) al 0,5% (5 ml) (Merck 805930, Alemania) y nitrato de plomo (II) ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) al 1% (3 ml) (Merck 7398.0100, Alemania).

Posteriormente, las retinas se lavaban tres veces consecutivas, 10 minutos cada vez, en tampón cacodilato 0,1M a pH 7,4 y a temperatura de 4°C, procediendo seguidamente al revelado de la reacción. Para ello, las retinas se reaccionaban con una solución al 2% de sulfuro de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{S}$) (Prolabo 12135-76-1, Francia) en agua destilada, durante dos minutos. Una vez finalizado el revelado, las retinas se lavaban con tampón cacodilato, tres veces, 5 minutos cada vez (Novikoff y Goldfischer, 1961; Murabe y Sano, 1982a; Schnitzer, 1989).

3.6 DETERMINACIÓN DE DENSIDADES CELULARES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el grupo I se analizaron las densidades de células de microglía NDPasa positivas, tanto en retina control o derecha como experimental o izquierda. En el grupo II se analizaron las densidades de CGR, tanto en las retinas controles como en las experimentales, y las densidades de células de microglía marcadas con FG en las retinas experimentales.

3.6.1 GRUPO I: RETINAS PROCESADAS POR LA TÉCNICA ENZIMO-HISTOQUÍMICA DE LA NDPASA

En este grupo se estimaron las densidades de células de microglía NDPasa positivas en las retinas controles o derechas y experimentales o izquierdas solamente en dos capas retinianas: la CCG y la CPI, ya que no se pudieron estimar en la CFN ni en la CPE, debido a la dificultad para la visualización de las células en la CFN y a la irregularidad del marcaje celular en la CPE. Para estimar las densidades de células de microglía en la CCG y en la CPI se contaron todas las células NDPasa+ encontradas en las dos capas, en 16 áreas estándar de la retina, enfocando alternativamente ambas capas con el microscopio óptico (Axiophot, Zeiss, Alemania) a 100 aumentos (100X). Todas las áreas analizadas tenían una superficie de 0,0864 mm² (0,36 mm x 0,24 mm) cada una y se situaban a 0,72, 1,44, 2,16 y 2,88 mm del disco óptico en cada cuadrante retiniano. El número total de células contadas en

cada retina se dividía entre 16, que era el número de áreas analizadas por retina, obteniendo así el valor medio de células por retina. Este valor medio se dividía nuevamente entre 0,0864, que era el área de cada una de las 16 regiones donde se realizaban los contajes en cada retina. De esta forma se obtenían las densidades medias de células de microglía NDPasa+ por mm^2 en las CCG y CPI de cada retina.

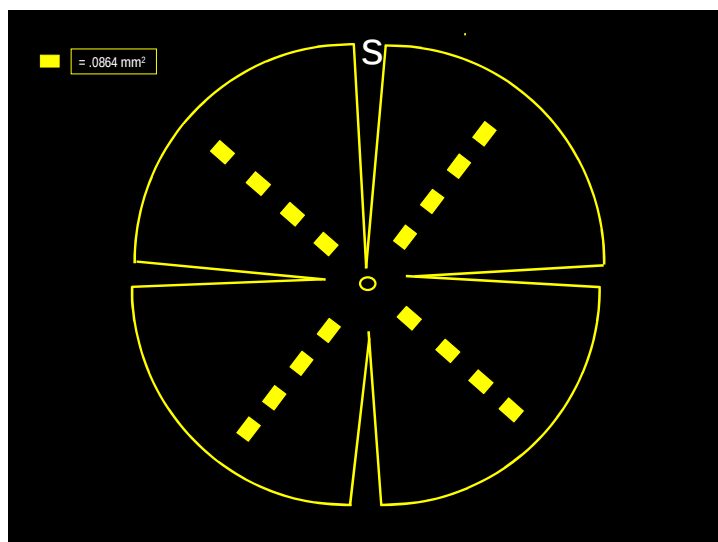


Imagen 7: en las retinas procesadas mediante la técnica enzimohistoquímica de la NDPasa se analizaron 4 áreas estándar en cada uno de los cuatro cuadrantes en que se dividieron las retinas.

3.6.2 GRUPO II: RETINAS MARCADAS CON FLUOROGOLD

En este grupo se realizaron fotografías enfocadas en la capa de las CGR y la CFN en 12 áreas estándar de cada retina. Las áreas fotografiadas tenían una superficie de $0,0864 \text{ mm}^2$ ($0,36 \text{ mm} \times 0,24 \text{ mm}$), y se encontraban situadas en cada uno de los cuatro cuadrantes a 0,875, 1,925 y 2,975 mm del disco óptico respectivamente. Cada área fue fotografiada en el microscopio de fluorescencia (Axiophot Zeiss, Alemania), utilizando un filtro ultravioleta que permite la observación de la fluorescencia emitida por el FG (excitación BP 365/11, supresión LP 397), a 100X, y una película para fotografía en blanco y negro T-MAX 400 (Kodak, Rochester, Reino Unido). Los negativos se revelaban, y posteriormente se positivaban empleando una video impresora Sony UP890CE (Sony, Japón) y papel térmico Sony UPP110 HD tipo II (Sony, Japón).

En las doce fotografías realizadas en cada retina se contaron todas las células con morfología de CGR que aparecían marcadas con FG. El número total de

células obtenido por retina se dividía entre 12, para hallar así el valor medio de células en la retina, y éste valor se dividía entre 0,0864, que era la superficie de cada área estándar analizada. De esta forma obtuvimos las densidades medias de CGR marcadas con fluorogold por mm^2 en retinas controles y experimentales. Los valores obtenidos para retinas izquierdas en los distintos grupos fueron comparados con los obtenidos en las retinas derechas o controles, considerando que los valores de estas últimas representaban el 100% de la población de CGR.

Así mismo, en las mismas fotografías se contaron todas las células con morfología de células de microglía que se encontraban marcadas con FG en las retinas experimentales o izquierdas, ya que en las retinas controles o derechas no se observaban células de microglía marcadas con FG. Las densidades de células de microglía marcadas con FG por mm^2 en cada retina se obtuvieron de la misma forma que hemos detallado para obtener las densidades de CGR.

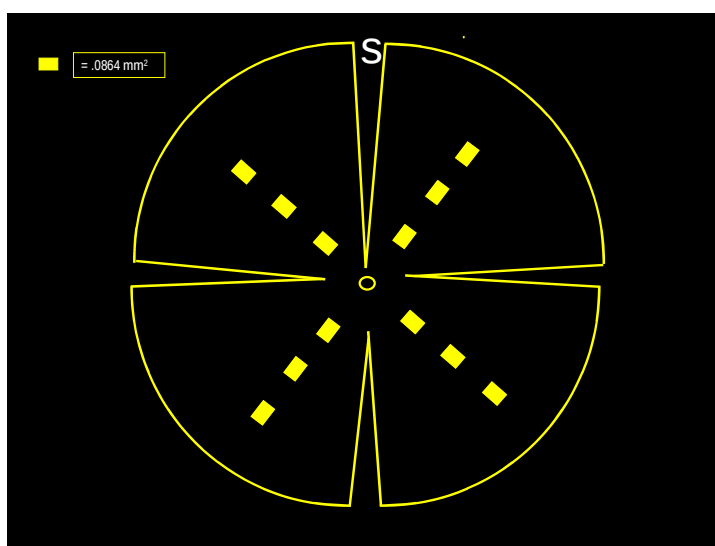


Imagen 8: En las retinas en las cuales se marcaron las CGR mediante aplicación del trazador neuronal fluorescente fluorogold en colículo superior, se analizaron tres áreas estándar en cada uno de los cuatro cuadrantes en que se dividieron las retinas.

3.6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico empleamos el programa Statistix® V 1.0 para Windows (Analitical Software, USA), obteniéndose con el mismo las medias aritméticas de las densidades para las CGR y de las células de microglía retiniana en los distintos grupos, así como los correspondientes errores estándar. Para comparar

las densidades celulares obtenidas en las retinas izquierdas o experimentales y derechas o controles de un mismo grupo experimental, o de dos grupos experimentales diferentes se empleó el test de Mann-Whitney. Cuando comparamos las densidades celulares entre grupos experimentales con gran número de observaciones ($n > 54$) empleamos el test de la t de Student. Las comparaciones de densidades celulares entre más de dos grupos experimentales se llevaron a cabo por medio del test no paramétrico ANOVA de una vía, Kruskal Wallis. Para analizar la correlación entre densidades celulares dentro de un mismo grupo experimental se construyeron líneas de regresión, empleando para ello el programa Sigma Plot versión 4.0 (Jandel Scientific, CA 94925, USA).

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS CUANTITATIVOS

4.1.1 RESULTADOS GRUPO I: Retinas procesadas por la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa

En este grupo se analizaron las densidades de células de microglía NDPasa+ que aparecían en la CCG y la CPI de las retinas controles o derechas y experimentales o izquierdas, en los tres subgrupos que componían este grupo experimental, es decir, en el subgrupo I.1 compuesto por animales en los que no se había realizado técnica quirúrgica alguna, en el subgrupo experimental I.2 en el que tan solo se había llevado a cabo sección del NO del ojo izquierdo, y en el subgrupo I.3 en el que, inmediatamente después de la sección del NO, se había administrado intravítreamente alguna sustancia. Los resultados en los distintos subgrupos que componen este grupo experimental fueron los siguientes:

4.1.1.1 Subgrupo I.1: Grupo control

La densidad media de células de microglía NDPasa+ en las **retinas derechas** de los animales de este grupo (Tabla IV) fue de 258 ± 6 células/mm² (n=4), con un rango entre 247 células/mm² y 270 células/mm².

La densidad media de células de microglía NDPasa+ en las **retinas izquierdas** de los animales de este grupo (Tabla IV) fue de 262 ± 4 células/mm² (n=4), con un rango entre 252 células/mm² y 268 células/mm².

Observamos que, en todos los animales, las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en los ojos derechos eran muy similares a las obtenidas en los ojos izquierdos (Tabla IV). Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en los ojos derechos de estos animales con las obtenidas en sus correspondientes ojos izquierdos por medio del test de Mann-Whitney, las diferencias de densidad no fueron estadísticamente significativas (p=0,6036).

		SUBGRUPO I.2 (SECCIÓN SIMPLE DEL NERVO ÓPTICO) PERIODO DE SUPERVIVENCIA TRAS LA LESIÓN											
SUBGRUPO I.1 (CONTROL)	Izquierda Derecha	7 días		10 días		14 días		22 días		30 días		40 días	
		Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control
Células/mm ²	252	262	224	284	220	347	276	331	246	317	253	322	239
	260	375	304	323	229	391	298	331	247	424	337	331	256
	266	336	268	331	251	343	258	353	268	302	245	297	221
	268	327	248	341	240	342	253	323	244	421	336	318	252
Media±ESM % aumento		308	265	323	244			402	329	347	255		
		308	234										
	262±4	319±15*	257±12	320±10*	237±6	356±12*	271±10	348±14*	267±16	362±26	285±21	317±7*	242±7
		24%		35%		31%		30%		27%		31%	

TABLA III

Densidades medias de células de microglía NDPasa positivas expresadas en células/mm² y valores medios±ESM, en las retinas de los animales de los subgrupos I.1 y I.2 tras los distintos tiempos de supervivencia. Se señala también el aumento de la densidad de células de microglía en las retinas izquierdas o experimentales expresado como porcentaje del valor obtenido en las retinas derechas en el subgrupo I.2. El asterisco(*) indica los tiempos de supervivencia en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de células de microglía en las retinas controles y experimentales (Mann-Whitney; $p < 0,05$).

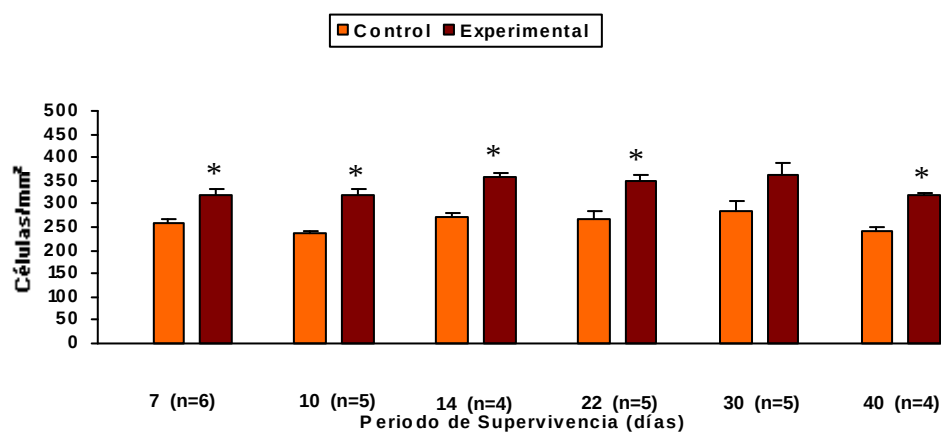


Figura 1: densidades medias de células de microglía NDPase+/mm² en las retinas de los animales con axotomía simple, procesados tras distintos tiempos de supervivencia. Los asteriscos (*) indican los periodos de supervivencia tras los cuales las densidades de células de microglía NDPase+ fueron significativamente mayores en las retinas izquierdas o experimentales que en las retinas derechas o controles.

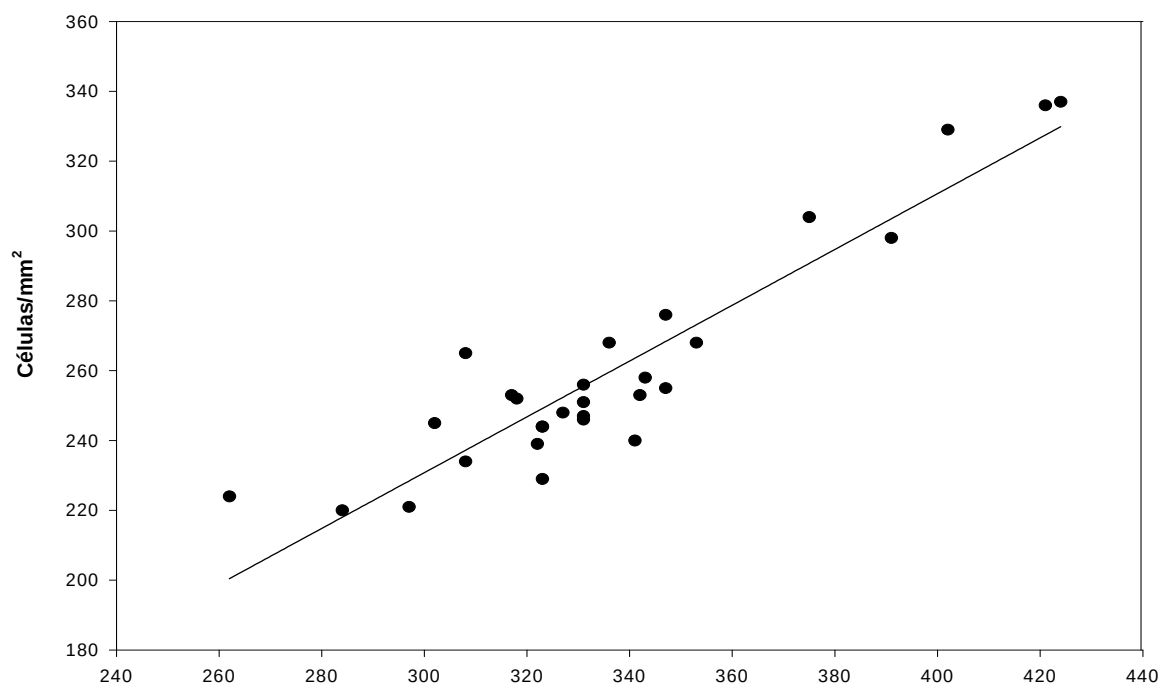


Figura 2: línea de regresión realizada con las densidades de células de microglía NDPase+ en las retinas controles y experimentales de los animales con sección simple del NO.

4.1.1.2 Subgrupo I.2: Sección del nervio óptico

Las densidades medias de células de microglía NDPasa+ en las **retinas derechas o controles** de los animales de este subgrupo (Tabla IV) variaron entre 237 ± 6 células/mm² en el grupo de animales analizado 10 días (n=5) después de la sección del NO y 285 ± 21 células/mm² en el grupo analizado 30 días (n=5) después de la sección del NO (Tabla IV; Figura 1). Las densidades medias de células NDPasa+ en las retinas derechas o controles variaban significativamente (Kruskal Wallis; $p=0,0052$) entre los subgrupos experimentales que habían sido analizados tras distintos periodos de supervivencia. Sin embargo, estas densidades no dependían del periodo de tiempo tras el cual se habían analizado los animales, ya que la mayor densidad media fue la del grupo de animales analizado 30 días después de la sección del NO (285 ± 21 células/mm²; n=5), seguida de las de los grupos analizados a los 14 (271 ± 10 células/mm²; n=4), 22 (267 ± 16 células/mm²; n=5), 7 (257 ± 12 células/mm²; n=6), 40 (242 ± 8 células/mm²; n=4) y 10 días (237 ± 6 células/mm²; n=5) después de la sección del NO (Tabla IV; Figura 1).

Observamos, además, que las densidades de células de microglía NDPasa+ en las retinas derechas o controles de este subgrupo experimental eran similares a las obtenidas en las retinas derechas e izquierdas de los animales que componían el grupo control (subgrupo I.1), en el cual se había mantenido la integridad de los NOs en ambos ojos. Cuando comparamos todas las densidades obtenidas en las retinas derechas o controles de este subgrupo I.2 con las obtenidas en los todos ojos derechos e izquierdos del subgrupo I.1, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,2907$).

Además, cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ de las retinas controles o derechas en cada periodo de supervivencia con las densidades obtenidas en las retinas izquierdas y derechas de los animales del subgrupo I.1, encontramos que las diferencias no fueron estadísticamente significativas en los animales analizados 7 ($p=0,8336$), 14 ($p=0,5459$), 22 ($p=0,7499$), 30 ($p=0,8505$) y 40 ($p=0,1681$) días después de la sección del NO, mientras que las densidades resultaron ser significativamente mayores en los animales analizados 10 días ($p=0,0098$) después de la sección del NO.

Las densidades medias de células de microglía NDPasa+ en las **retinas izquierdas o experimentales** de este grupo I.2 (Tabla IV; Figura 1) variaron entre 317 ± 7 células/mm² en el grupo analizado 40 días (n=4) después de la sección del NO y 362 ± 26 células/mm² en el grupo de animales analizado 30 días (n=5) después de la

sección del NO. Las densidades medias de células NDPasa+ en las retinas experimentales también variaban entre los subgrupos de animales que se habían analizado tras diferentes periodos de supervivencia, aunque tales variaciones no resultaron ser estadísticamente significativas ($p=0,1146$). Las densidades medias de células de microglía en estas retinas tampoco parecían depender del tiempo de supervivencia tras el cual había sido analizado el animal, ya que la densidad media mayor se obtuvo en el grupo de animales analizado 30 días después de la sección del NO (362 ± 26 células/mm²; $n=5$), seguida de las de los grupos analizados a los 14 (356 ± 12 células/mm²; $n=4$), 22 (348 ± 14 células/mm²; $n=5$), 10 (320 ± 10 células/mm²; $n=5$), 7 (319 ± 15 células/mm²; $n=6$) y 40 días (317 ± 7 células/mm²; $n=4$) después de la sección del NO (Tabla IV; Figura 1).

En todos los animales que componían este subgrupo experimental observamos que la densidad media de células NDPasa+ era siempre mayor en las retinas izquierdas o experimentales que en las retinas derechas o controles, en cualquiera de los periodos de supervivencia estudiados (Figura 1). Cuando comparamos las densidades medias de células NDPasa+ obtenidas en las retinas derechas ($n=29$) de todos los animales que componían el subgrupo 1.2 con las densidades medias de células NDPasa+ obtenidas en sus correspondientes retinas izquierdas ($n=29$), las densidades eran significativamente mayores en las retinas izquierdas ($p<0,0001$). Cuando comparamos las densidades medias de células NDPasa+ obtenidas en las retinas controles de los animales analizados tras un determinado periodo de supervivencia después de la sección del NO, con las de sus correspondientes retinas experimentales, observamos que las densidades de células NDPasa+ en las retinas experimentales eran significativamente mayores en los subgrupos de animales analizados a los 7 ($p=0,0076$; $n=6$), 10 ($p=0,0010$; $n=5$), 14 ($p=0,0047$; $n=4$), 22 ($p=0,0051$; $n=5$) y 40 ($p=0,0047$; $n=4$) días después de la sección del NO, mientras que las diferencias entre las retinas controles y experimentales no fueron estadísticamente significativas en los grupos de animales analizados 30 días después de la sección del NO, aunque en este grupo la diferencia se aproximaba al nivel de significación estadística ($p=0,0715$; $n=5$). Estos resultados documentan que la sección del NO produce un aumento en la densidad de células de microglía NDPasa+ de la retina ipsilateral durante el periodo de tiempo estudiado.

Observamos, además, que las densidades de células NDPasa+ en las retinas derechas o controles y en las izquierdas o experimentales de todos los animales de este grupo diferían de unos animales a otros en todos los periodos de supervivencia estudiados, y que parecía existir una relación entre las densidades

obtenidas en las retinas derechas y las obtenidas en las retinas izquierdas, ya que cuando un animal presentaba una densidad de células NDPasa+ alta en la retina derecha, tenía también una densidad alta en la retina izquierda y viceversa (Tabla IV), independientemente del incremento de densidad que se producía en las retinas experimentales después de la sección del NO. Esto indicaba que la densidad media de células de microglía NDPasa+ podía ser un rasgo fenotípico de cada animal. Para comprobar si existía una relación entre las densidades de células de microglía de las retinas derechas y de las retinas izquierdas en este grupo experimental, realizamos una línea de regresión con las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas derechas de todos los animales que componían este subgrupo experimental y las de sus correspondientes retinas izquierdas (Figura 2). El coeficiente de correlación para esta línea (r^2) fue de 0,8567, lo que indicaba que existía una correlación estadísticamente significativa entre las densidades medias de células NDPasa+ de las retinas derechas e izquierdas.

4.1.1.3 Subgrupo I.3: Sección del nervio óptico e inyección de diversos factores

En este grupo experimental se estimaron las densidades de células de microglía NDPasa+ en CCG y CPI de la retina en animales que, inmediatamente después de la sección del NO, habían recibido intravítreamente alguna de las siguientes sustancias: MIF, BDNF, NGF y NT3, y que habían sido analizados tras distintos periodos de supervivencia.

Las densidades medias de células NDPasa+ en las **retinas controles o derechas** (Tabla V) en este grupo experimental variaron entre 285 ± 4 células/mm² en el grupo de animales en el que se había administrado intravítreamente MIF y se había analizado a los 10 días (n=5) de la sección del NO y 371 ± 8 células/mm² en el grupo de animales que recibió una inyección intravítrea de MIF y que se había analizado 22 días (n=6) después de la sección del NO. Se observó que las densidades de células NDPasa+ variaban entre los animales que componían los distintos subgrupos de este grupo experimental, y que estas variaciones no estaban relacionadas con la sustancia inyectada o con el tiempo transcurrido desde la lesión (Tabla V). Así, las densidades medias obtenidas en los distintos grupos de animales fueron de 371 ± 8 (MIF, 22 días; n=6), 356 ± 14 (NGF, 7 días; n=6), 351 ± 17 (MIF, 40 días; n=6), 344 ± 4 (BDNF, 7 días; n=6), 335 ± 21 (MIF, 7 días; n=5), 330 ± 7 (BDNF, 14 días; n=6), 328 ± 12 (NGF, 14 días; n=6), 316 ± 16 (PBS 7 días; n=3), 315 ± 6 (BDNF, 30 días; n=6), 311 ± 15 (MIF, 30 días; n=5), 310 ± 14 (Pinchazo 7 días; n=3), 309 ± 6 (NT3, 30 días; n=6), 304 ± 12 (NT3, 14 días; n=6), 297 ± 8 (MIF, 14 días; n=6), 287 ± 17 (NT3,

Tiempo Supervivencia	MIF		NGF		BDNF		NT3		Pinchazo		PBS	
	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control
	(0'0125µg)		(5µg)		(5µg)		(5µg)				(5µL)	
7 Días	318	253	418	378	368	345	411	323	420	330	409	327
	420	373	412	393	377	337	394	305	375	284	399	285
	417	352	425	349	373	348	399	310	415	317	423	335
	409	346	360	367	365	332	360	258				
	408	352	462	360	395	342	328	237				
			469	291	422	359						
Media ± ESM	394±19*	335±21	424±16*	356±14	383±9*	344±4	378±15*	287±17	403±14*	310±14	410±7*	316±16
%Aumento	18%		19%		11%		32%		30%		30%	
10 Días	339	299										
	294	281										
	339	287										
	354	278										
	370	282										
Media ± ESM	339±13*	285±4										
%Aumento	19%											
14 Días	357	313	373	332	369	329	355	265				
	328	259	354	303	407	344	446	320				
	370	297	483	350	391	350	446	323				
	366	307	483	328	400	298	378	276				
	356	294	292	289	366	329	405	303				
	355	309	383	367	412	332	452	339				
Media ± ESM	355±6*	297±8	395±31*	328±12	391±8*	330±7	414±17*	304±12				
%Aumento	20%		20%		18%		36%					

Tabla IV (a)

Densidades de células de microglía NDPasa positivas/mm², en la CCG y la CPI, y valores medios±ESM, del subgrupo I.3, para los diferentes periodos de supervivencia. Se señala también el aumento de densidad de células de microglía en las retinas izquierdas o experimentales expresado como porcentaje respecto al valor obtenido en las retinas derechas. El asterisco (*) indica los tiempos de supervivencia en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de células de microglía en las retinas controles y experimentales (Mann-Whitney, p<0,05)

Tiempo Supervivencia	MIF		NGF		BDNF		NT3	
	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control
	(0'0125µg)		(5µg)		(5µg)		(5µg)	
22 Días	426	373						
	474	401						
	399	348						
	416	358						
	428	359						
	443	386						
Media ± ESM	431±10*	371±8						
%Aumento	16%							
30Días	353	286			438	339	413	305
	340	281			429	313	436	336
	350	297			436	317	405	301
	404	328			440	319	418	305
	425	363			422	305	412	310
					408	299	412	298
Media ± ESM	374±17*	311±15			429±5*	315±6	416±4*	309±6
%Aumento	20%				36%		35%	
40 Días	427	362						
	416	349						
	453	394						
	356	302						
	354	302						
	463	394						
Media ± ESM	412±19*	351±17						
%Aumento	17%							

Tabla IV (b)

Densidades de células de microglía NDPasa positivas/mm², en la CCG y la CPI, y valores medios±ESM, del subgrupo I.3, para los diferentes periodos de supervivencia. Se señala también el aumento de densidad de células de microglía en las retinas izquierdas o experimentales expresado como porcentaje respecto al valor obtenido en las retinas derechas. El asterisco (*) indica los tiempos de supervivencia en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de células de microglía en las retinas controles y experimentales (Mann-Whitney, p<0,05)

7 días; n=5) y 285 ± 4 (MIF, 10 días; n=5) células/mm².

Las densidades medias de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas derechas o controles en este subgrupo I.3 fueron generalmente superiores a las obtenidas en las retinas controles de los subgrupos I.1 y I.2. Así, cuando se compararon las densidades de células de microglía NDPasa+ de todas las retinas izquierdas y derechas del subgrupo I.1 y las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en todas las retinas controles del subgrupo I.2 con las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas controles del subgrupo I.3, las densidades obtenidas en este último grupo eran significativamente mayores ($p < 0,0001$) que las obtenidas en los otros dos grupos.

Cuando se compararon las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas controles de cada uno de los grupos de animales que habían recibido intravítreamente algún factor inmediatamente después de la sección del NO (subgrupo I.3) y que se habían procesado tras distintos periodos de supervivencia, con las obtenidas en las retinas controles de los animales con sección simple del NO (subgrupo I.2) y que se habían analizado tras los mismos periodos de supervivencia, por medio del test de Mann-Whitney, se observó que las densidades eran mayores y las diferencias estadísticamente significativas en los animales en los que se había administrado: PBS y se habían analizado 7 días ($p=0,0255$) después de la sección del NO; MIF y se habían analizado 7 ($p=0,0177$), 10 ($p=0,0011$), 14 ($p=0,0023$) y 22 ($p=0,0011$) días después de la sección del NO; BDNF y se habían analizado 7 ($p=0,0006$) y 14 ($p=0,0057$) días después de la sección del NO; NGF y se habían analizado 7 ($p=0,0006$) y 14 ($p=0,0133$) días después de la sección del NO, y en aquellos que habían recibido punción simple y se habían analizado a los 7 días ($p=0,0255$) de la sección del NO. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en los animales en los que se había administrado: MIF, y se habían analizado 30 días ($p=0,4974$) después de la sección del NO; BDNF y se habían analizado 30 días ($p=0,3780$) después de la sección del NO; NT3 y se habían analizado 7 ($p=0,1527$), 14 ($p=0,1127$) y 30 ($p=0,5600$) días después de la sección del NO.

Las densidades medias de células NDPasa+ de las **retinas izquierdas o experimentales** en este grupo (Tabla V) variaron entre 339 ± 13 células/mm² en el grupo de animales en los que se administró MIF y se había analizado a los 10 días (n=5) de la sección del NO y 431 ± 10 células/mm² en el grupo de animales a los que se administró MIF y se había analizado a los 22 días (n=6) de la sección del NO.

Nuevamente, estas variaciones parecían ser independientes de la sustancia administrada y del periodo de supervivencia estudiado.

La densidad media de células NDPasa+ en las retinas izquierdas de los animales a los que se les había realizado una **punción simple** del globo ocular (Figura 3) y que habían sido procesados 7 días después de la sección del NO fue de 403 ± 14 células/mm². Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas izquierdas con las obtenidas en sus correspondientes retinas derechas en este subgrupo experimental, observamos que las densidades de las retinas izquierdas eran siempre superiores a las de las retinas derechas, y que las diferencias eran estadísticamente significativas (Mann-Whitney; $p=0,0213$; $n=3$).

La densidad media de células NDPasa+ en las retinas izquierdas de los animales a los que se administró intravítreamente el **Vehículo** (PBS) (Tabla V y Figura 3) y que habían sido procesados a los 7 días de la sección del NO fue de 410 ± 7 células/mm². Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas izquierdas con las obtenidas en sus correspondientes retinas derechas en este subgrupo experimental, observamos que las densidades de las retinas izquierdas eran siempre mayores, y las diferencias eran estadísticamente significativas (Mann-Whitney; $p=0,0213$; $n=3$).

Las densidades medias de células NDPasa+ en las retinas izquierdas de los animales a los que se inyectó intravítreamente **MIF** (Tabla V y Figura 4) y se analizaron tras diversos periodos de supervivencia fueron de 394 ± 19 células/mm² a los 7 días ($n=5$), 339 ± 13 células/mm² a los 10 días ($n=5$), 355 ± 6 células/mm² a los 14 días ($n=6$), 431 ± 10 células/mm² a los 22 días ($n=6$), 374 ± 17 células/mm² a los 30 días ($n=5$) y 412 ± 19 células/mm² a los 40 días ($n=6$). Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas izquierdas con las de sus correspondientes retinas derechas en cada periodo de supervivencia, observamos que las densidades eran siempre mayores en las retinas izquierdas, y que las diferencias eran estadísticamente significativas en los animales analizados a los 10 ($p=0,0051$; $n=5$), 14 ($p=0,0002$; $n=6$), 22 ($p=0,0011$; $n=6$), 30 ($p=0,0372$; $n=5$) y 40 ($p=0,0474$; $n=6$) días después de la sección de NO, mientras que no eran significativamente diferentes en los animales analizados 7 días ($p=0,0704$; $n=5$) después de la sección del NO.

Las densidades medias de células NDPasa+ en las retinas izquierdas de los animales en los que se inyectó intravítreamente **NGF** (Tabla V y Figura 5) fueron de

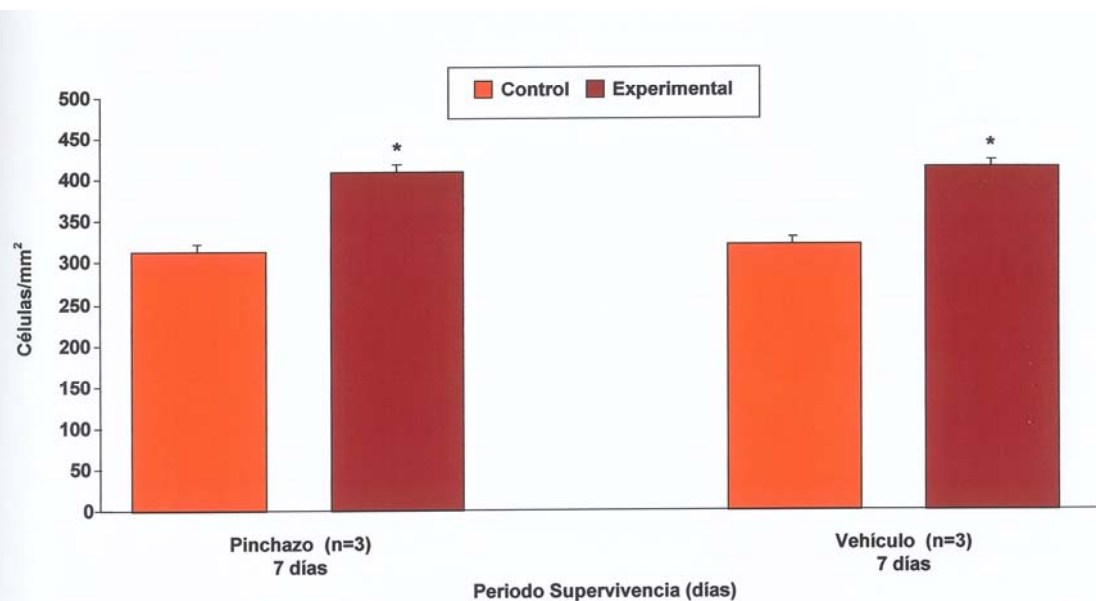


Figura 3

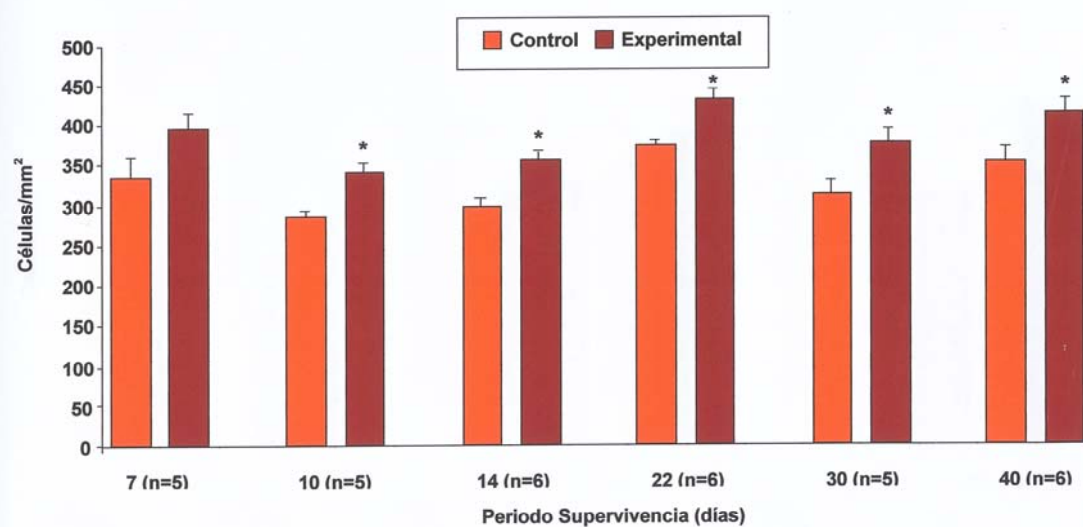


Figura 4

Figuras 3 y 4: Densidades medias de células de microglía NDPase+/mm²±ESM en las retinas controles y experimentales de los animales marcados con la técnica de la NDPase, tratados con pinchazo simple o vehículo (PBS) (Fig. 3), y MIF (Fig. 4). Los asteriscos (*) indican los periodos de supervivencia tras los cuales las densidades de células de microglía NDPase+ fueron significativamente superiores en las retinas experimentales que en sus correspondientes controles.

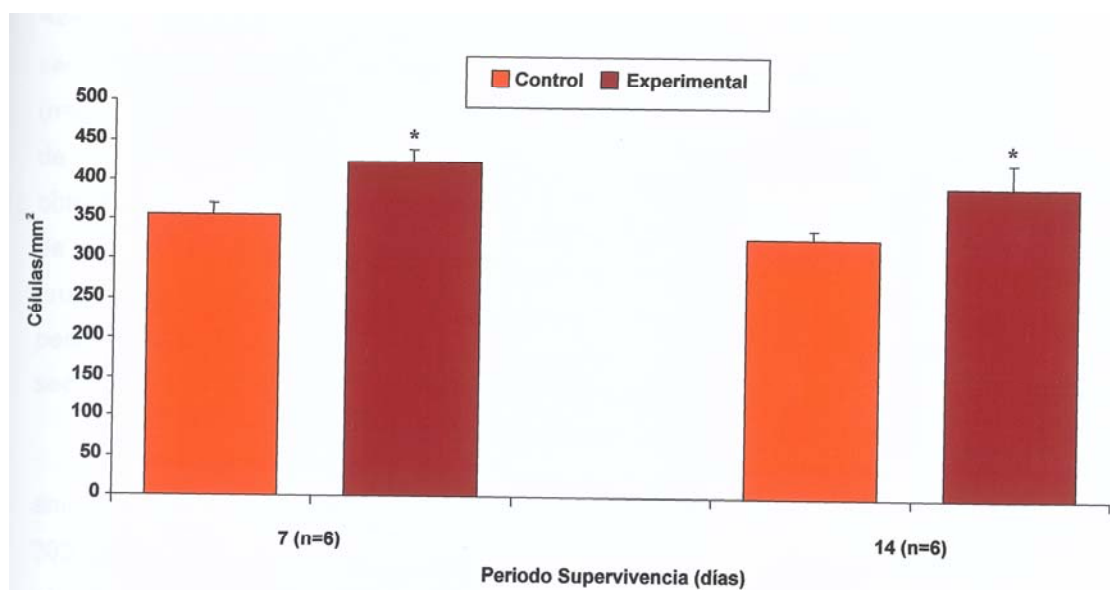


Figura 5

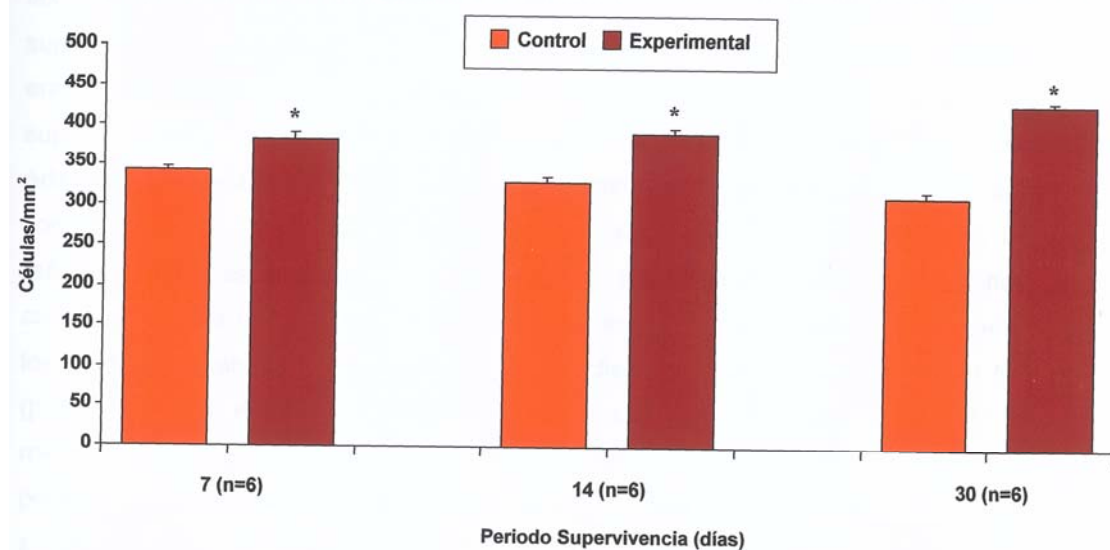


Figura 6

Figuras 5 y 6: Densidades de células de microglía NDPasa+/mm²±ESM en las retinas controles y experimentales de los animales marcados con la técnica de la NDPasa, tratados con NGF (Fig. 5) y BDNF (Fig. 6) después de la sección del NO, y analizados tras distintos periodos de supervivencia. Los asteriscos (*) indican los periodos de supervivencia tras los cuales las densidades de células de microglía NDPasa+ de las retinas experimentales fueron significativamente superiores a las obtenidas en sus correspondientes retinas controles.

424±16 células/mm² en el grupo de animales analizado a los 7 días (n=6) de la sección del NO, y de 395±31 células/mm² en el grupo de animales analizado 14 días (n=6) después de la sección del NO. Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas izquierdas o experimentales con las obtenidas en sus correspondientes retinas derechas o controles en los dos periodos de supervivencia, observamos que las densidades de las retinas izquierdas en este grupo eran significativamente superiores a las de las retinas derechas, en todos los periodos analizados: a los 7 (p=0,0110; n=6) y 14 (p=0,0479; n=6) días después de la sección de NO.

Las densidades medias de células NDPasa+ en las retinas izquierdas de los animales en los que se inyectó intravítreamente **BDNF** (Tabla V y Figura 6) fueron de 383±9 células/mm² en el grupo de animales analizados a los 7 días (n=6), 391±8 células/mm² en el grupo de animales analizados a los 14 días (n=6) y 429±5 células/mm² en el grupo de animales analizados a los 30 días (n=6) de la sección del NO. Por tanto, la densidad de células de microglía NDPasa+ aumentaba en este grupo según se incrementaba el intervalo de supervivencia. Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas izquierdas con las obtenidas en sus correspondientes retinas derechas en los tres periodos de supervivencia, observamos que las densidades de células de microglía NDPasa+ eran significativamente mayores en las retinas izquierdas en todos los intervalos de supervivencia: 7 (p=0,0002 n=6), 14 (p=0,0002; n=6) y 30 (p=0,0002; n=6) días. Además, en estos animales tratados intravítreamente con BDNF, cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas izquierdas de animales analizados tras periodos de supervivencia consecutivos, las diferencias de densidad eran estadísticamente significativas entre los animales analizados a los 14 y a los 30 días después de la sección del NO (p=0,0011). Sin embargo, cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas derechas de animales analizados tras periodos de supervivencia consecutivos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (7 y 14 días, p=0,1321; 14 y 30 días, p=0,1573).

Las densidades medias de células NDPasa+ en las retinas izquierdas de los animales en los que se inyectó intravítreamente **NT3** (Tabla V y Figura 7) fueron de 378±15 células/mm² en el grupo de animales analizados a los 7 días (n=5), 414±17 células/mm² en el grupo de animales analizados a los 14 días (n=6) y 416±4 células/mm² en el grupo de animales analizados a los 30 días (n=6) de la sección del NO. Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+

obtenidas en las retinas izquierdas con las obtenidas en sus correspondientes retinas derechas en los tres periodos de supervivencia, las densidades de células NDPasa+ fueron significativamente mayores en las retinas izquierdas en todos los intervalos de supervivencia: 7 ($p=0,0011$; $n=5$), 14 ($p=0,0002$; $n=6$) y 30 ($p=0,0002$; $n=6$) días después de la sección del NO. Observamos que la densidad de células de microglía en estas retinas aumentaba cuando se incrementaba el intervalo de supervivencia. Sin embargo, cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas izquierdas de todos los animales tratados intravítreamente con NT3 y analizados tras los diferentes periodos de supervivencia, las diferencias de densidad no fueron estadísticamente significativas ($p=0,0709$). Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas izquierdas de los animales analizados tras periodos de supervivencia consecutivos, las densidades no fueron significativamente diferentes (7 y 14 $p=0,3765$; 14 y 30 $p=0,6994$). Además, observamos que en estos animales tratados intravítreamente con NT3, la densidad de células de microglía NDPasa+ aumentaba en las retinas controles cuando se incrementaba el intervalo de supervivencia. Sin embargo, cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas derechas o controles de los animales analizados tras periodos de supervivencia consecutivos y extremos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (7 y 14 días, $p=0,7003$; 14 y 30 días, $p=0,4961$; 7 y 30 días, $p=0,5563$).

En todos los animales de este grupo experimental las densidades medias de células NDPasa+ de las retinas izquierdas o experimentales (398 ± 4 ; $n=86$) eran superiores a las obtenidas en retinas derechas o controles (323 ± 4 ; $n=86$). Cuando comparamos las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas controles con las obtenidas en las retinas experimentales para todos los animales de este grupo experimental por medio de un test t de Student, las densidades de las retinas experimentales fueron significativamente superiores a las de las retinas controles ($p<0,0001$). Además se observó que las densidades variaban entre los distintos animales de este grupo, y que cuando un animal tenía una densidad alta en la retina control, también la tenía en la retina experimental, igual que pasaba en los animales del subgrupo experimental I.2. Para comprobar si existía una relación entre las densidades de células de microglía NDPasa+ encontradas en las retinas izquierdas ($n=86$) y en las retinas derechas ($n=86$) de los animales que componían este subgrupo I.3, realizamos una línea de regresión (Figura 8) con las densidades obtenidas en las retinas experimentales y en sus correspondientes retinas controles de todos los animales analizados en este subgrupo experimental. El coeficiente de correlación para esta línea (r^2) fue de 0,3787, lo que indicaba que la

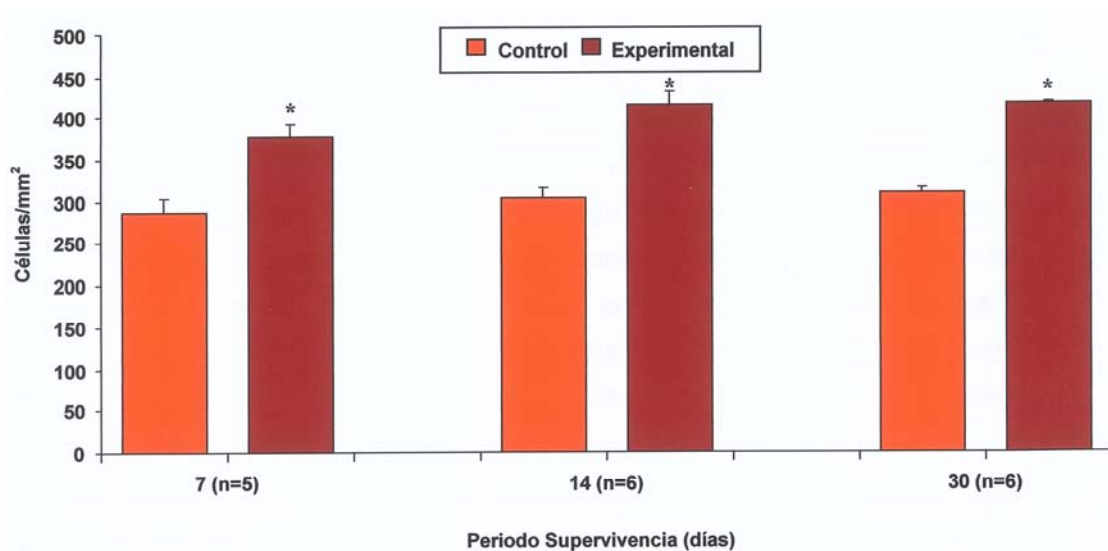


Figura 7

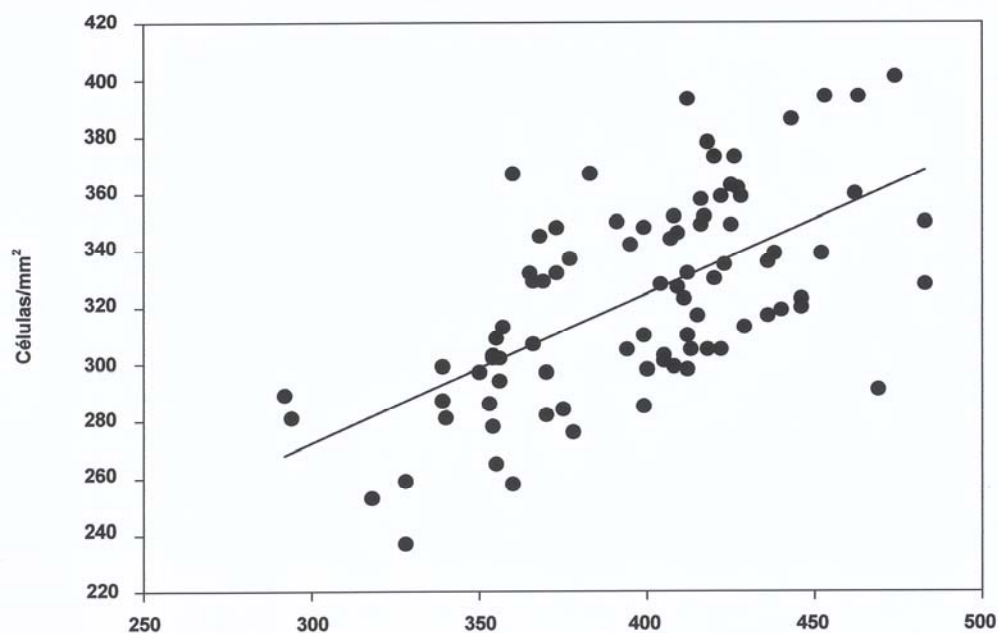


Figura 8

Figura 7: Densidades medias de células de microglía NDPasa+/mm²±ESM en las retinas de los animales tratados con NT3 tras la sección del NO (Fig. 7) analizados a los 7, 14 y 30 días de la lesión. Los asteriscos (*) indican los periodos de supervivencia tras los cuales las densidades de células de microglía NDPasa+ fueron significativamente mayores en las retinas experimentales que en sus correspondientes retinas controles.

Figura 8: Línea de regresión realizada con las densidades de células de microglía NDPasa+ en las retinas controles y en las retinas experimentales de los animales tratados con distintas sustancias tras la sección del NO.

correlación entre las densidades de células de microglía NDPasa+ de las retinas derechas e izquierdas era muy baja. Esto sugiere que la administración de diferentes sustancias modifica la correlación existente entre las densidades de células de microglía en las retinas izquierdas y derechas después de la sección del NO.

Además, se observó que las densidades de células de microglía en las retinas izquierdas o experimentales de este subgrupo experimental eran mayores que las observadas en las retinas izquierdas de los animales del subgrupo I.2. Cuando se compararon las densidades de células de microglía NDPasa+ obtenidas en las retinas experimentales de los animales tratados intravítreamente con alguna sustancia tras la sección del NO y analizados tras distintos periodos de supervivencia (subgrupo I.3), con las obtenidas en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO y analizados tras los mismos periodos de supervivencia (subgrupo I.2), por medio del test de Mann-Whitney, se observó que las densidades de células de microglía en las retinas experimentales eran mayores y las diferencias estadísticamente significativas en los animales en los que se había administrado: PBS y se habían analizado tras 7 días ($p=0,0062$); MIF y se habían analizado tras 7 ($p=0,0177$), 14 ($p=0,0386$), 22 ($p=0,0051$) y 40 ($p=0,0025$) días; BDNF y se habían analizado tras 7 ($p=0,0177$) y 30 ($p=0,0054$) días; NGF y se habían analizado tras 7 ($p=0,0025$) días; NT3 y se habían analizado a los 7 ($p=0,0177$) y 14 ($p=0,0374$) días de la sección del NO, y en los animales que habían recibido punción simple y se habían analizado a los 7 ($p=0,0127$) días de la sección del NO. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas en los animales en los que se había administrado: MIF, y se habían analizado a los 10 ($p=0,1860$) y 30 ($p=0,4974$) días; BDNF y se habían analizado a los 14 ($p=0,0569$) días; NGF y se habían analizado a los 14 ($p=0,3590$) días; NT3 y se habían analizado a los 30 ($p=0,3780$) días tras la sección del NO.

4.1.2 RESULTADOS GRUPO II: Retinas marcadas con fluorogold

En este grupo se analizaron las densidades de CGR y de células de microglía de la retina, que aparecían marcadas con FG, en las retinas de los animales con sección simple del NO y en aquellos tratados con diversas sustancias después de la citada lesión. Pasamos a exponer en primer lugar, los resultados obtenidos para las CGR, y en segundo lugar, los obtenidos para las células de microglía, en los dos subgrupos que componen este grupo experimental.

4.1.2.1 Células ganglionares de la retina marcadas con fluorogold

4.1.2.1.1 Grupo II.1 Sección del nervio óptico

En este grupo estudiamos las densidades de CGR marcadas con FG que aparecían en la CCG en las retinas controles y experimentales, en animales que fueron procesados 7 y 14 días después de la sección del NO (Tabla VI). La densidad media de CGR marcadas con FG en las **retinas derechas o controles** en el grupo de animales analizado a los **siete días** de la sección del NO fue de 2366 ± 40 células/mm² (n=7), variando en los animales que componían el grupo entre 2146 células/mm² y 2445 células/mm², mientras que en los animales analizados a los **catorce días** de la sección del NO la densidad media de CGR en las retinas derechas o controles fue de 2325 ± 36 células/mm² (n=7), variando en los animales que componían el grupo entre 2176 células/mm² y 2442 células/mm² (Figuras 9 y 10).

Cuando comparamos las densidades de CGR obtenidas en las retinas controles de los animales analizados a los 7 días con las obtenidas en las retinas controles de los animales analizados a los 14 días, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,3584$). Esto nos indica que las densidades de CGR obtenidas en todas las retinas controles de este subgrupo experimental eran similares e independientes del intervalo de supervivencia.

En las **retinas izquierdas o experimentales** la densidad media de CGR marcadas con FG en el grupo de animales analizado a los **siete días** (Tabla VI) de la sección del NO fue de 1410 ± 53 células/mm² (n=7), variando las densidades en los animales que componían este grupo entre 1270 células/mm² y 1586 células/mm², mientras que en los animales analizados a los **catorce días** (Tabla VI) de la sección del NO la densidad media de CGR fue de 300 ± 25 células/mm² (Tabla VI), variando en los animales que componían el grupo entre 231 células/mm² y 377 células/mm² (Figuras 11 y 12).

Observamos que, tanto en los animales analizados a los 7 días como en aquellos analizados a los 14 días, las densidades de CGR obtenidas en las retinas experimentales eran inferiores a las obtenidas en las retinas controles (Figuras 13 y 14). Cuando comparamos las densidades de CGR obtenidas en las retinas experimentales tras la sección del NO con las obtenidas en las retinas controles en cada uno de los dos intervalos de supervivencia: 7 y 14 días, por medio de un test de Mann-Whitney, encontramos que las densidades de CGR eran significativamente

Tiempo Supervivencia	Sección NO		BDNF (5µg)		NGF (5µg)		MIF (0,0125µg)		PIH (5µg)	
	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control
7 Días	1270	2417	2276	2349	1435	2512	1316	2374	2052	2427
	1479	2390	2285	2245	1172	2414	1418	2305	2207	2293
	1586	2450	2387	2211	1024	2544	1252	2390	1684	2482
	1581	2373	2412	2382	1484	2120	1101	2231	1809	2357
	1279	2340	2271	2276	1209	2287	1608	2319	1677	2475
	1392	2146	2300	2388	1225	2505	1251	2283	1905	2415
	1285	2445	2384	2230	1022	2212	1806	2384	1144	2284
			2131	2134			1215	2342	1788	2061
Media ± ESM	1410±53*	2366±40	2306±32	2277±32	1224±68*	2371±63	1371±82*	2329±20	1783±112*	2349±49
%Supervivencia	60%		100%		52%		59%		76%	
14 Días	362	2387	900	2295	313	2323	485	2336		
	196	2375	986	2388	269	2230	415	2304		
	287	2251	802	2405	447	2366	449	2170		
	231	2260	1450	2240	342	2394	1069	2134		
	250	2442	890	2307	505	2444	336	2326		
	377	2176	863	2144	497	2417	351	2380		
	294	2385	960	2379	738	2553	429	2237		
					511	2502	452	2216		
Media ± ESM	285±25*	2325±36	979±82*	2308±35	453±53*	2404±36	498±83*	2263±3		
%Supervivencia	12%		42%		19%		22%			
Tiempo Supervivencia	IGF-I (5µg)		IGF-I+NT3 (5µg)		PIH+NT3 (5µg)		PIH subc. (10µg/día)		Bcl-xS (5µg)	
	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control
7 Días	1044	2237	1696	2240	477	2310	2232	2336	1255	2031
	1278	2334	2285	2342	857	2100	2323	2347	1076	2173
	2422	2405	1619	2072	700	2396	2293	2387	1412	2273
	1143	2116	2013	2455	602	2402	2141	2382	1339	2206
	1136	2323	1148	2418	532	2568	2104	2424	1203	2153
	2236	2451	2178	2205	456	2272			1249	2434
	1258	2488			857	2382				
	1306	2415			640	2366				
Media ± ESM	1478±189*	2346±43	1823±172*	2289±59	690±70*	2363±43	2219±42*	2375±16	1256±47*	2212±55
%Supervivencia	63%		80%		29%		93%		57%	
14 Días							430	2212		
							410	2325		
							323	2041		
							398	2300		
							413	2086		
							453	2290		
Media ± ESM							413±18*	2235±49		
%Supervivencia							18%			

TABLA V (a)

Densidades de CGR/mm² y densidades medias±ESM en las retinas controles y experimentales en los diferentes subgrupos, que fueron analizadas a los siete y catorce días de la sección del NO. Se detalla también la supervivencia de CGR en las retinas izquierdas o experimentales de cada subgrupo, expresado como porcentaje de la densidad media obtenida en las retinas derechas o controles de cada subgrupo. El asterisco(*) indica los tiempos de supervivencia en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de CGR en las retinas controles y experimentales (Mann-Whitney; p<0,05).

Tiempo Supervivencia	Bcl-2/0 (5µg)		Bcl-2/0-4 (5µg)		Bcl-xL (5µg)		Z-DEVD-cmk (4µg)	
	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control
7 Días	1042	2343	1214	2226	1503	2347	1853	2260
	1233	2319	1170	2271	1722	2321	1824	2118
	1277	2385	1400	2215	1515	2203	2295	2405
	1495	2430	1025	2188	1945	2355	1588	2195
	1418	2315	1264	2103	1545	2240	1846	2148
	1755	2241	1303	2365	1530	2351	1862	2347
	1501	2300			1761	2472	1540	2374
							1951	2060
Media ± ESM	1389±87*	2333±23	1229±52*	2228±36	1646±64*	2327±33	1845±82*	2238±45
%Supervivencia	60%		55%		71%		82%	
14 Días							782	2290
							853	2451
							1016	2222
							1332	2396
							995	2463
							739	2434
							1073	2390
Media ± ESM							970±77*	2378±34
%Supervivencia							41%	
Tiempo Supervivencia	PBS (5µl)		PBS+DMSO (5µl)		PBS subc. (300µl)		Pinchazo	
	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control	Experim.	Control
7 Días	1309	2254	1413	2303	1451	2430	1397	2359
	1292	2211	1546	2705	1429	2395	1424	2417
	1664	2464	1551	2407	1310	2369	1515	2445
	1273	2355	1647	2253	1511	2501	1323	2297
	1399	2292	1352	2373	1259	2238	1402	2233
	1178	2137	1951	2323	1378	2405	1259	2190
Media ± ESM	1353±69*	2286±40	1577±86*	2394±66	1390±38*	2390±35	1387±36*	2324±41
%Supervivencia	59%		66%		59%		60%	
14 Días	301	2236			277	2557	251	2043
	236	2337			305	2159	295	2322
	286	2318			313	2235	313	2554
	278	2406			238	2318	266	2216
	304	2557			238	2406	275	2367
					281	2301	280	2299
Media ± ESM	281±12*	2371±54			275±13*	2329±57	280±9*	2300±69
%Supervivencia	12%				12%		12%	

TABLA V (b)

Densidades de CGR/mm² y densidades medias±ESM en las retinas controles y experimentales en los diferentes subgrupos, que fueron analizadas a los siete y catorce días de la sección del NO. Se detalla también la supervivencia de CGR en las retinas izquierdas o experimentales de cada subgrupo, expresado como porcentaje de la densidad media obtenida en las retinas derechas o controles de cada subgrupo. El asterisco(*) indica los tiempos de supervivencia en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de CGR en las retinas controles y experimentales (Mann-Whitney; p<0,05).

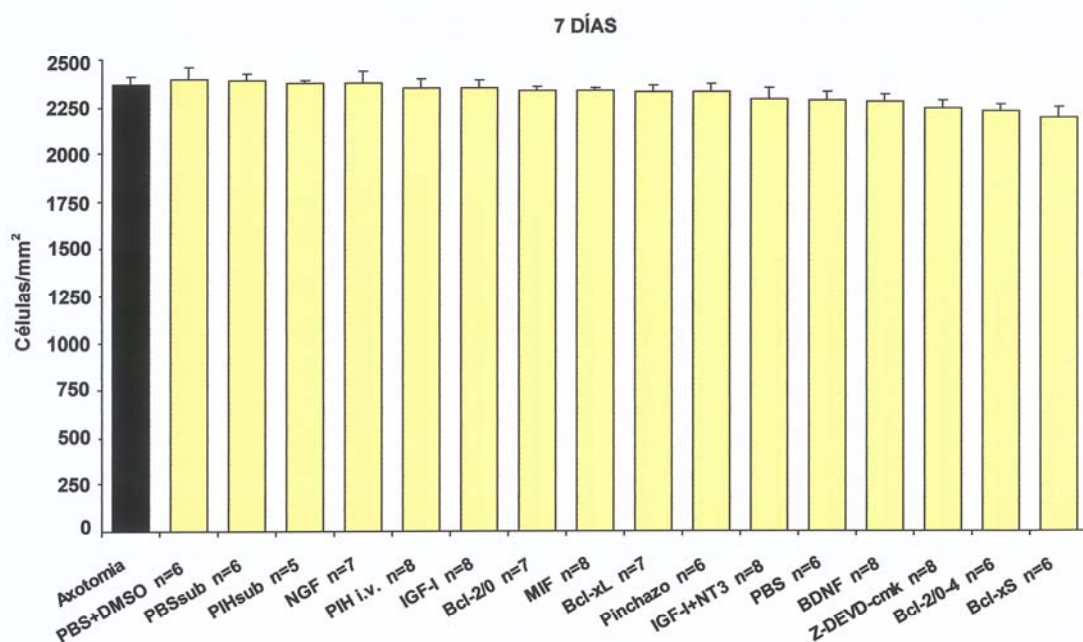


Figura 9

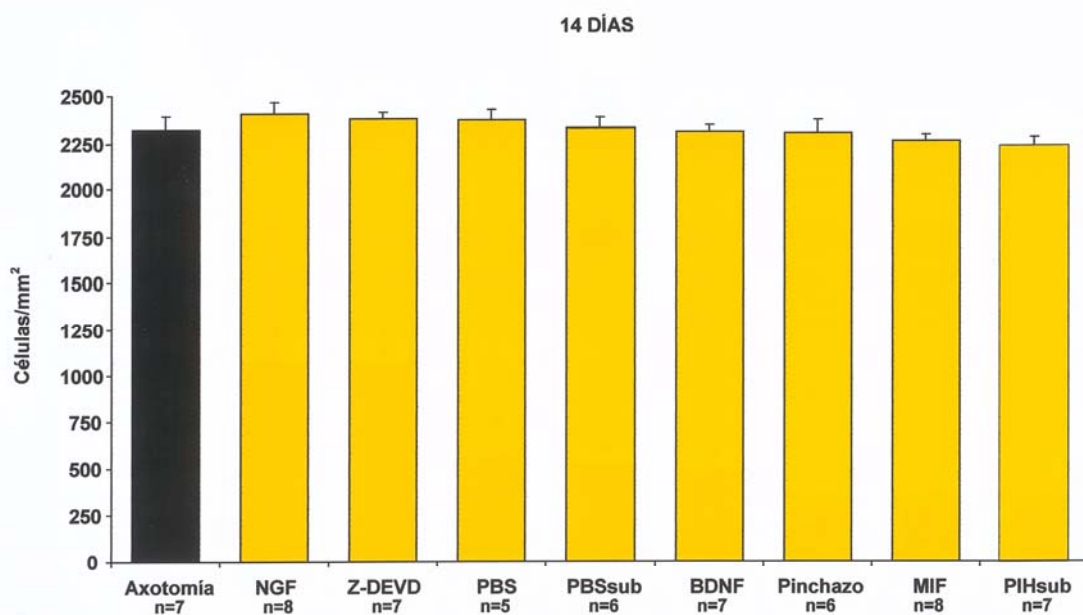


Figura 10

Figuras 9 y 10: Densidades medias de CGR/mm²±ESM en las retinas derechas o controles de los animales marcados con FG, con sección simple del NO (axotomía) y tratados con alguna sustancia tras la lesión, y analizados a los 7 (Fig. 9) y 14 (Fig. 10) días de la sección del NO. Obsérvese que las densidades de CGR fueron muy similares en todos los subgrupos analizados.

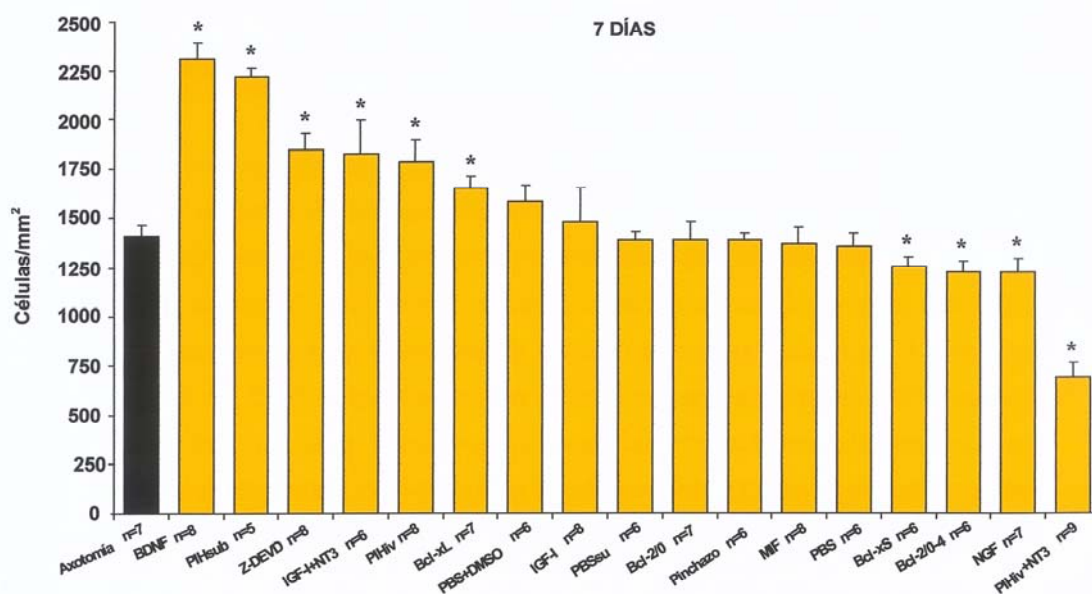


Figura 11

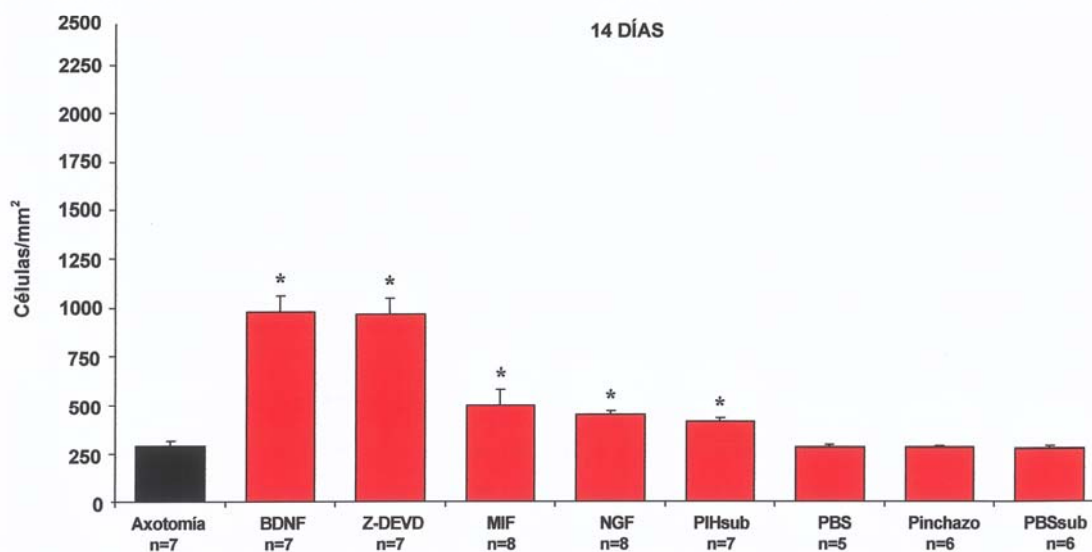


Figura 12

Figuras 11 y 12: Densidades medias de CGR/mm² ± ESM en las retinas experimentales o izquierdas de los animales marcados con FG, con sección simple del NO (axotomía) o tratados con alguna sustancia tras la lesión, y analizados a los 7 (Fig. 11) ó 14 (Fig. 12) días de la sección del NO. Obsérvese que las densidades varían con respecto a las obtenidas en las retinas con sección simple del NO tras la administración de algunas sustancias, en los dos periodos de supervivencia. Los asteriscos (*) indican los subgrupos experimentales que arrojaron densidades de CGR significativamente diferentes a las obtenidas en el grupo de animales con sección simple del NO.

menores en las retinas experimentales a los 7 ($p=0,0001$; $n=7$) y 14 días ($p=0,0001$; $n=7$) de la sección del NO. Este hecho documenta que en las retinas experimentales se producía muerte de las CGR tras la sección del NO.

Observamos, además, que las densidades de CGR obtenidas en las retinas experimentales de los animales analizados a los 14 días de la sección del NO eran inferiores a las obtenidas en las retinas experimentales de los animales analizados a los 7 días de la sección del NO. Cuando comparamos las densidades de CGR obtenidas en las retinas experimentales de los animales analizados a los 7 días con las densidades de CGR obtenidas en las retinas experimentales de los animales analizados a los 14 días, observamos que las densidades de las retinas experimentales analizadas a los 14 días de la sección del NO eran significativamente menores (Mann-Whitney; $p=0,0001$). Este resultado, unido al hecho de que las retinas controles de los animales analizados a los 7 días no mostraban densidades de CGR significativamente diferentes a las retinas controles de los animales analizados a los 14 días de la sección del NO, indicaba que la disminución de la densidad de CGR de la retina que se producía entre 7 y 14 después de la sección del NO se debía a muerte de CGR.

4.1.2.1.2 Grupo II.2 Sección del nervio óptico e inyección de factores

En este grupo analizamos las densidades de CGR marcadas con FG, tanto en retinas controles como experimentales, a los 7 y 14 días de la sección del NO, cuando inmediatamente después de ésta se inyectaban, intravítrea o subcutáneamente, diversos factores.

La densidad media de CGR marcadas con fluorogold en las **retinas derechas o controles** de estos animales (Tabla V), varió entre 2212 ± 55 células/mm² ($n=6$) en el grupo de animales en el que se había administrado intravítreamente Bcl-xS y se habían analizado a los 7 días de la sección del NO y 2404 ± 36 células/mm² ($n=8$) en el grupo de animales en el que se había administrado intravítreamente NGF y se habían analizado a los 14 días de la sección del NO (Figuras 9 y 10; Tabla VI).

Las densidades de CGR marcadas con FG obtenidas en las retinas controles de los animales que componían este grupo experimental variaban de un animal a otro, aunque perteneciesen al mismo subgrupo experimental y se hubieran analizado tras el mismo intervalo de supervivencia. Comparamos por medio del test t de Student las densidades de CGR de todas las retinas controles de los animales a los que tan solo se les había seccionado el NO y que habían sido analizados 7 y 14

días después de la lesión (subgrupo II.1; n=14), con las densidades de CGR de las retinas controles de todos los animales que, inmediatamente después de la sección del NO, habían sido tratados con alguna sustancia y se habían analizado a los 7 y 14 días de la lesión (subgrupo II.2; n=166) (Figuras 9 y 10); las diferencias de densidades no fueron estadísticamente significativas ($p=0,17322$). Así mismo, comparamos por medio del test t de Student las densidades de CGR obtenidas en las retinas controles del grupo de animales a los cuales se les había administrado alguna sustancia y que se habían analizado a los 7 días (n=112), con las densidades de CGR obtenidas en las retinas controles del grupo de animales a los cuales se les había administrado alguna sustancia y que se habían analizado a los 14 días de la sección del NO (n=54), encontrando que las diferencias de densidades no fueron estadísticamente significativas ($p=0,204006$). Estos resultados indican que las densidades de CGR obtenidas en las retinas controles de los animales tratados con alguna sustancia tras la sección del NO (subgrupo II.2) eran similares a las densidades de CGR obtenidas en las retinas controles de los animales con sección simple del NO (subgrupo II.1) e independientes del periodo de supervivencia tras el cual se analizaron las retinas.

Las densidades medias de CGR marcadas con FG en las **retinas experimentales o izquierdas** (Tabla VI) de este grupo variaron entre 275 ± 13 células/mm² (n=6) en el grupo de animales en el que se había administrado PBS subcutáneo y se había analizado 14 días después de la sección del NO y 2306 ± 32 células/mm² (n=8) en el grupo de animales a los que se había administrado BDNF y se había analizado a los 7 días de la sección del NO (Figuras 11 y 12). El análisis de los resultados de este grupo mostró diferencias apreciables entre las densidades de los distintos subgrupos en los cuales se había administrado intravítrea o subcutáneamente alguna sustancia inmediatamente después de la sección del NO, tanto a los 7 días como a los 14 días de la sección del NO.

Observamos que en los subgrupos de animales en los que se había llevado a cabo punción simple o administración subcutánea o intravítrea de PBS, las densidades de CGR en las retinas experimentales eran similares a las obtenidas en las retinas experimentales de los animales en los que tan solo se había seccionado el NO (Tabla VI). Cuando comparamos las densidades de CGR obtenidas en las retinas experimentales o izquierdas de los animales tratados con punción simple con las obtenidas en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO, las diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas ni a los 7 días (n=6; $p=0,8936$) ni a los 14 días (n=6; $p=0,8936$) de la sección del NO. Cuando

comparamos las densidades de CGR en las retinas experimentales de los animales tratados intravítreamente con PBS con las obtenidas en las retinas de los animales con sección simple del NO, las densidades tampoco fueron significativamente diferentes ni a los 7 días ($n=6$; $p=0,6872$) ni a los 14 días ($n=5$; $p=0,9398$) de la sección del NO. Cuando comparamos las densidades de CGR en las retinas experimentales de los animales tratados subcutáneamente con PBS con las obtenidas en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO, las densidades tampoco fueron significativamente diferentes ni a los 7 días ($n=6$; $p=0,7888$) ni a los 14 días ($n=6$; $p=0,8934$) de la sección del NO. Por último, cuando comparamos las densidades de CGR obtenidas en las retinas experimentales de los animales tratados intravítreamente con PBS+DMSO con las obtenidas en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO, las diferencias de densidad tampoco fueron estadísticamente significativas a los 7 días ($n=6$; $p=0,1614$) de la sección del NO.

Observamos cierta heterogeneidad en las densidades de CGR de las retinas experimentales entre los distintos subgrupos de animales que se habían tratado con alguna sustancia; así en algunos de ellos las diferencias entre las densidades de CGR obtenidas en retinas controles y experimentales eran evidentes, mientras que en otros, tales diferencias eran muy pequeñas (Figuras 13 y 14). Cuando comparamos las densidades de CGR obtenidas en las retinas controles con las densidades de CGR en sus correspondientes retinas experimentales en cada uno de los subgrupos que habían sido tratados con alguna sustancia tras la sección del NO y que habían sido analizados **siete días** después de la sección del NO, por medio del test de Mann-Whitney, encontramos que las densidades de CGR en las retinas experimentales eran menores y las diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos en los que se había administrado: PIH subcutánea ($p=0,0011$; $n=5$), Z-DEVD-cmk ($p=0,0000$; $n=8$), IGF-I+NT3 ($p=0,0158$; $n=6$), PIH intravítrea ($p=0,0000$; $n=8$), Bcl-xL ($p=0,0001$; $n=7$), PBS+2%DMSO ($p=0,0002$; $n=6$), IGF-I ($p=0,0039$; $n=8$), PBS subcutáneo ($p=0,0002$; $n=6$), Bcl-2 a día 0 ($p=0,0000$; $n=7$), MIF ($p=0,0000$; $n=8$), PBS ($p=0,0002$; $n=6$), Bcl-xS ($p=0,0002$; $n=6$), Bcl-2 a días 0 y 4 ($p=0,0002$; $n=6$), NGF ($p=0,0001$; $n=7$), PIH+NT3 ($p<0,0001$; $n=9$) y en el que se había llevado a cabo punción simple ($p=0,0002$; $n=6$), mientras que las diferencias entre densidades no fueron estadísticamente significativas en el subgrupo de animales en el que se había administrado intravítreamente BDNF ($p=0,3901$; $n=8$). Estos resultados documentan que 7 días después de la sección del NO se había producido muerte de CGR en todos los subgrupos experimentales a excepción de aquel en el que se había administrado intravítreamente BDNF tras la lesión.

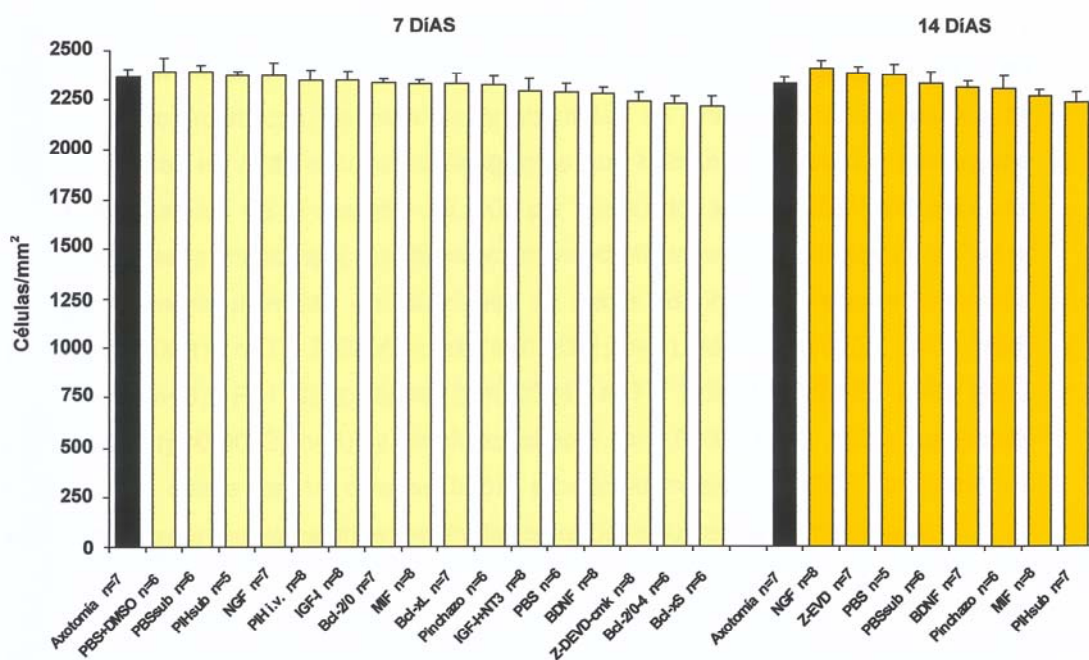


Figura 13

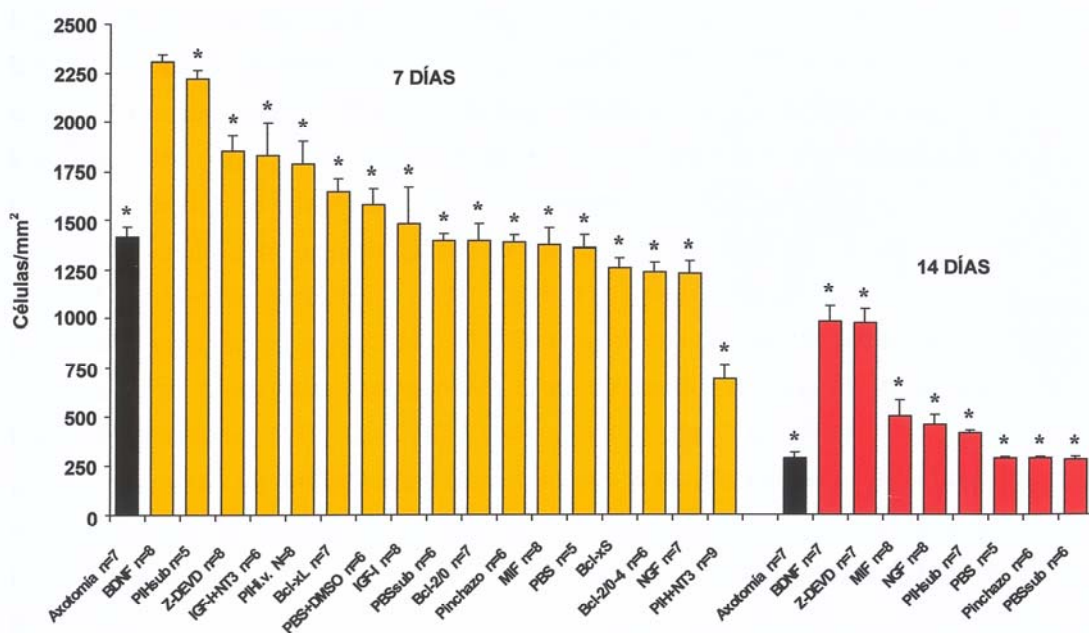


Figura 14

Figuras 13 y 14: Densidades medias de CGR/mm² ± ESM en las retinas controles (Fig. 13) y experimentales (Fig. 14) de los animales marcados con FG, con sección simple del NO (axotomía) y con administración de distintas sustancias tras la lesión, analizados a los 7 y 14 días de la sección del NO. Los asteriscos (*) indican los subgrupos que tuvieron densidades significativamente diferentes de CGR en las retinas experimentales que en sus correspondientes retinas controles.

En los animales procesados **catorce días** después de la sección del NO y administración de alguna sustancia, cuando comparamos las densidades de CGR en las retinas controles con las densidades obtenidas en sus correspondientes retinas experimentales en cada uno de los subgrupos que habían sido tratados con alguna sustancia después de la sección del NO, por medio del test de Mann-Whitney, las densidades eran menores y las diferencias estadísticamente significativas en todos los subgrupos de animales en los cuales se había administrado alguna sustancia: BDNF ($p=0,0001$; $n=7$), Z-DEVD-cmk ($p=0,0001$; $n=7$), MIF ($p=0,0000$; $n=8$), NGF ($p=0,0000$; $n=8$), PIH subcutánea ($p=0,0001$; $n=7$), PBS ($p=0,0002$; $n=6$), PBS subcutáneo ($p=0,0002$; $n=6$), y pinchazo simple ($p=0,0002$; $n=6$). Estos resultados documentan que a los 14 días se había producido muerte de CGR en todos los subgrupos experimentales, independientemente de la sustancia administrada.

Para investigar si la administración de diferentes sustancias modificaba de alguna manera la supervivencia de las CGR tras la sección del NO, comparamos las densidades de CGR obtenidas en las retinas experimentales de cada subgrupo en el que se había administrado alguna sustancia, con las densidades de CGR de las retinas experimentales de los animales en los que tan solo se había seccionado el NO. Puesto que las densidades dependían del tiempo transcurrido tras la lesión, las comparaciones se llevaron a cabo entre animales analizados tras el mismo periodo de supervivencia, empleando el test de Mann-Whitney. En los animales analizados a los **siete días** (Figura 11), las densidades de CGR en las retinas experimentales fueron mayores y las diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos en los que se había administrado: BDNF ($p=0,0000$; $n=8$), PIH subcutánea ($p=0,0004$; $n=5$), Z-DEVD-cmk ($p=0,0003$; $n=8$), IGF-I+NT3 ($p=0,0388$; $n=6$), PIH intravítrea ($p=0,0088$; $n=8$), Bcl-xL ($p=0,0281$; $n=7$). En este mismo periodo de supervivencia las densidades no fueron significativamente diferentes en los subgrupos en los que se había administrado: IGF-I ($p=0,262$; $n=8$), Bcl-2 a día 0 ($p=0,7633$; $n=7$) y MIF ($p=0,9033$; $n=8$). Las densidades fueron menores y las diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos en los que se había administrado: Bcl-xS ($p=0,0388$; $n=6$), Bcl-2 a días 0 y 4 ($p=0,0388$; $n=6$), NGF ($p=0,0429$; $n=7$) y PIHi.v.+NT3 ($p<0,0001$; $n=9$).

En los animales analizados a los **catorce días** después de la sección del NO (Figura 12), las densidades de CGR en las retinas experimentales resultaron ser mayores y las diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos en los que se había administrado BDNF ($p=0,0001$; $n=7$), Z-DEVD-cmk ($p=0,0001$; $n=7$), MIF ($p=0,0015$; $n=8$), NGF ($p=0,0140$; $n=8$) y PIH subcutánea ($p=0,0006$; $n=7$).

Además, comparamos las densidades de CGR de las retinas experimentales de cada subgrupo en el que se había administrado alguna sustancia tras la sección del NO, con las densidades de CGR de las retinas experimentales de los animales tratados con sus correspondientes vehículos. Puesto que las densidades dependían del tiempo transcurrido desde la lesión, las comparaciones se llevaron a cabo entre animales analizados tras el mismo periodo de supervivencia, empleando el test de Mann-Whitney. En los animales analizados a los **siete días** de la sección del NO, las densidades de CGR en las retinas experimentales fueron mayores que en las retinas tratadas con el vehículo, y las diferencias estadísticamente significativas, en los subgrupos en los que se había administrado: BDNF ($p=0,0001$; $n=8$), PIH subcutánea ($p=0,0004$; $n=5$), PIH intravítrea ($p=0,0128$; $n=8$) y Bcl-xL ($p=0,0076$; $n=7$). Las densidades no fueron significativamente diferentes a las obtenidas en sus correspondientes vehículos en los subgrupos en los que se había administrado: Z-DEVD-cmk ($p=0,0796$; $n=8$), IGF-I+NT3 ($p=0,0756$; $n=6$), IGF-I ($p=0,262$; $n=8$), MIF ($p=0,9033$; $n=8$), Bcl-xS ($p=0,3611$; $n=6$), Bcl-2 a día 0 ($p=0,6872$; $n=7$), NGF ($p=0,2118$; $n=7$) y Bcl-2 a días 0 y 4 ($p=0,2149$; $n=6$). Las densidades fueron menores y las diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos en los que se había administrado PIH+NT3 ($p<0,0001$; $n=9$).

En los animales analizados a los **catorce días**, las densidades de CGR en las retinas experimentales resultaron ser mayores que en los animales tratados con el vehículo y las diferencias fueron estadísticamente significativas en los subgrupos en los que se había administrado BDNF ($p=0,0004$; $n=7$), Z-DEVD-cmk ($p=0,0004$; $n=7$), MIF ($p=0,0003$; $n=8$), NGF ($p=0,0112$; $n=8$) y PIH subcutánea ($p=0,0001$; $n=7$).

Estos resultados documentan que la sección del NO inducía una disminución en la densidad de CGR que era mayor según aumentaba el intervalo de supervivencia, y que la supervivencia de las CGR podía ser modificada por medio de la administración de algunas sustancias, siendo los efectos sobre la supervivencia de las CGR diferentes según la sustancia administrada.

4.1.2.2 Células de microglía marcadas con fluorogold

En esta parte del estudio, se analizaron las densidades de células de microglía que aparecían marcadas con FG en las retinas de los animales de los subgrupos II.1 y II.2 y que se encontraban marcadas porque habían fagocitado los desechos de las CGR que degeneraban tras la sección del NO. Dado que las células de microglía solo se marcan con FG cuando hay muerte de CGR, en esta parte del estudio se analizaron tan solo las retinas experimentales, ya que las retinas controles

presentaban solamente algunas células de microglía aisladas marcadas con FG.

4.1.2.2.1 Grupo II.1 Sección del nervio óptico

Las densidades medias de células de microglía marcadas con fluorogold en las **retinas experimentales** de los animales de este grupo (Tabla VII) fueron de 358 ± 26 células/mm² en el grupo de animales analizados a los 7 días de la lesión, y de 566 ± 30 células/mm² en el grupo de animales que se habían analizado a los 14 días de la sección del NO (Figuras 15 y 16).

Cuando comparamos las densidades de células de microglía marcadas con FG en las retinas de los animales analizados a los 7 días con las obtenidas en los animales analizados a los 14 días de la sección del NO, por medio del test de Mann-Whitney, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,0002$). Estos resultados documentan que las densidades de células de microglía fagocítica aumentan en las retinas experimentales entre los 7 y los 14 días después de la sección del NO.

Parecía existir una relación entre las densidades de CGR muertas en las retinas experimentales como consecuencia de la sección del NO y las densidades de células de microglía fagocítica en las mismas retinas, en cada uno de los dos intervalos de supervivencia estudiados. Así, en las retinas experimentales en las que la supervivencia de las CGR era menor, la densidad de células de microglía fagocítica era mayor, y en las retinas experimentales en las que sobrevivían más CGR después de la sección del NO, la densidad de células de microglía fagocítica era menor (Figuras 17 y 18), tanto a los 7 como a los 14 días de la lesión. Para comprobar si 7 días después de la sección del NO existía una relación entre las densidades de células de microglía fagocítica y los porcentajes de CGR que habían muerto en las retinas experimentales, realizamos una línea de regresión con los porcentajes de CGR muertas en cada retina experimental analizada a los **siete días** y las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas en las mismas retinas. El coeficiente de correlación de esta línea (r^2) fue de 0,7645 (Fig. 19), lo que indicaba que existía una correlación estadísticamente significativa entre los porcentajes de muerte de las CGR y las densidades de células de microglía fagocítica en las retinas analizadas a los 7 días de la sección del NO.

Tiempo Supervivencia	Sección NO	BDNF (5µg)	NGF (5µg)	MIF (0'0125µg)	PIH i.v. (5µg)	IGF-I (5µg)	IGF-I+NT3 (5µg)	PIH+NT3 (5µg)	PIH subc. (10µg/día)
7 Días	451	0	363	343	121	307	335	636	110
	368	0	477	343	102	366	31	405	76
	344	0	413	403	242	0	237	639	94
	236	0	470	430	248	486	177	602	120
	374	0	388	390	298	451	308	595	92
	317	0	430	412	209	9	50	654	
	415	0	626	302	381	444		671	
		0		492	160	456		677	
								664	
Media± ESM	358±26	0	452±33*	389±21	220±33*	315±71	190±52*	616±28*	98±8*
14 Días	566	501	723	618					553
	646	357	720	548					499
	664	481	752	676					455
	570	360	843	532					590
	571	273	824	568					513
	428	504	786	521					502
	518	549	624	627					578
			757	694					
Media± ESM	566±30	432±36*	754±24*	598±23					527±18
Tiempo Supervivencia	Bcl-xS (5µg)	Bcl-2/0 (5µg)	Bcl-2/0-4 (5µg)	Bcl-xL (5µg)	Z-DEVD (5µg)	PBS (5µl)	PBS+DMSO (5µl)	PBS subc. (5µl)	Pinchazo
7 Días	261	383	401	340	141	423	297	403	344
	264	252	440	327	209	421	336	329	386
	384	340	343	355	95	387	185	421	310
	315	226	397	181	178	362	139	383	381
	350	300	297	267	161	363	227	371	368
	353	125	367	247	150	332	104	397	378
		352		280	197				
					112				
Media± ESM	321±21	283±34	374±20	285±23	155±14*	381±15	215±37*	384±13	361±12
14 Días					345	468		635	482
					408	525		504	469
					246	559		435	548
					343	602		510	477
					190	535		560	515
					391			548	564
					172				
Media± ESM					299±36*	538±22		532±27	509±8

TABLA VI

Densidades de células de microglía marcadas con fluorogold/mm² en las retinas experimentales de los animales de los subgrupos II.1 y II.2, en los dos periodos de supervivencia estudiados, siete y catorce días. El asterisco (*) indica los subgrupos de animales en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de células de microglía fagocítica tras la administración de alguna sustancia y las densidades obtenidas en los animales con sección simple del NO, comparando siempre retinas analizadas tras el mismo periodo de supervivencia (p<0,05).

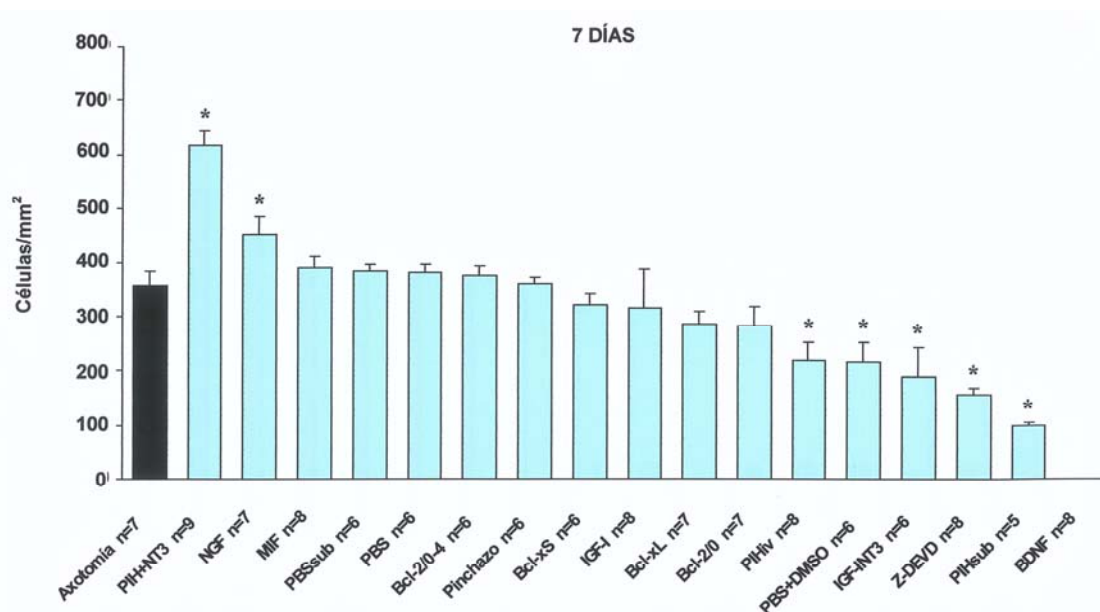


Figura 15

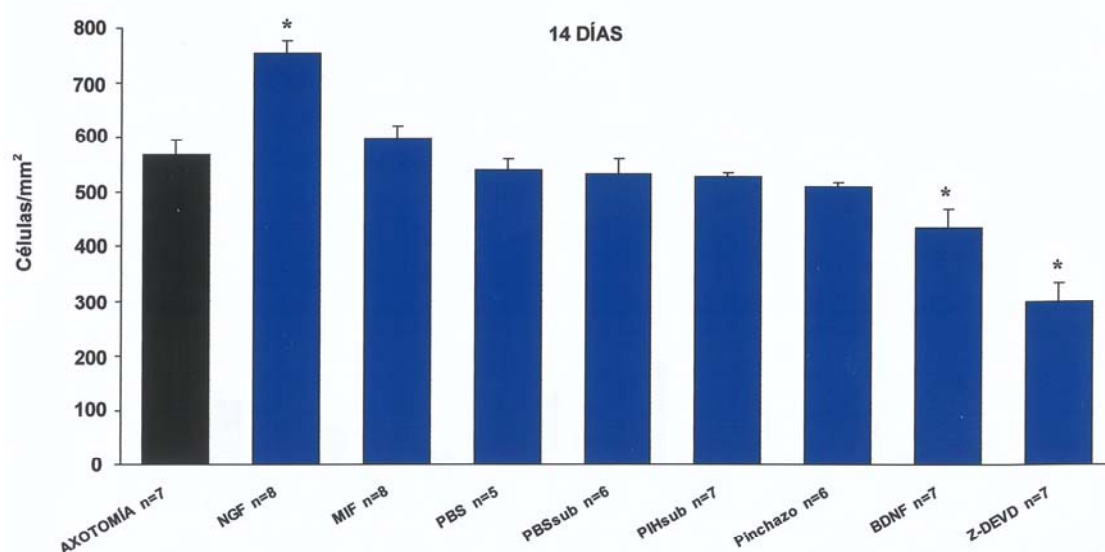


Figura 16

Figuras 15 y 16: Densidades medias de células de microglía fagocítica/mm²±ESM en las retinas izquierdas o experimentales de los grupos de animales marcados con FG, con sección simple del NO (axotomía) y administración de alguna sustancia, y analizados a los 7 (Fig.15) y 14 días (Fig.16) de la sección del NO. Obsérvese que en todos los subgrupos analizados las densidades de células de microglía fagocítica fueron mayores a los 14 días de la lesión. Los asteriscos indican los subgrupos experimentales en los que las densidades de células de microglía fueron significativamente diferentes a las obtenidas en las retinas de los animales con sección simple del NO.

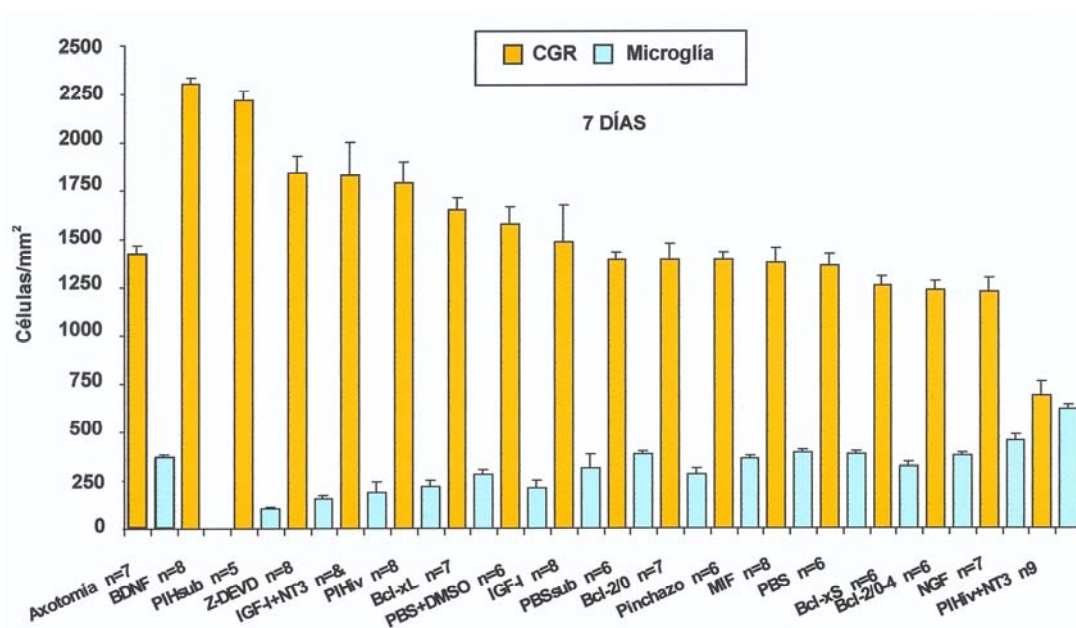


Figura 17

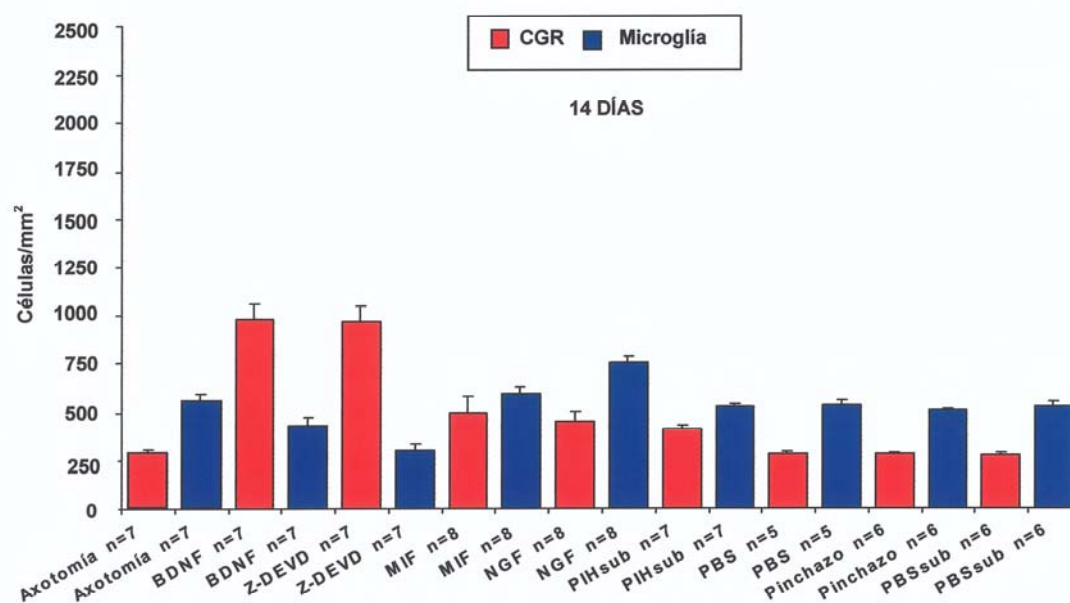


Figura 18

Figuras 17 y 18: Densidades medias de CGR/mm²±ESM y densidades medias de células de microglía fagocítica/mm²±ESM en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO (axotomía) o tratados con alguna sustancia, y analizados a los 7 (Fig. 17) y 14 (Fig. 18) días de la sección del NO. Obsérvese que las densidades de células de microglía fagocítica están en relación inversa a las densidades de CGR en todos los subgrupos experimentales, independientemente de la sustancia administrada.

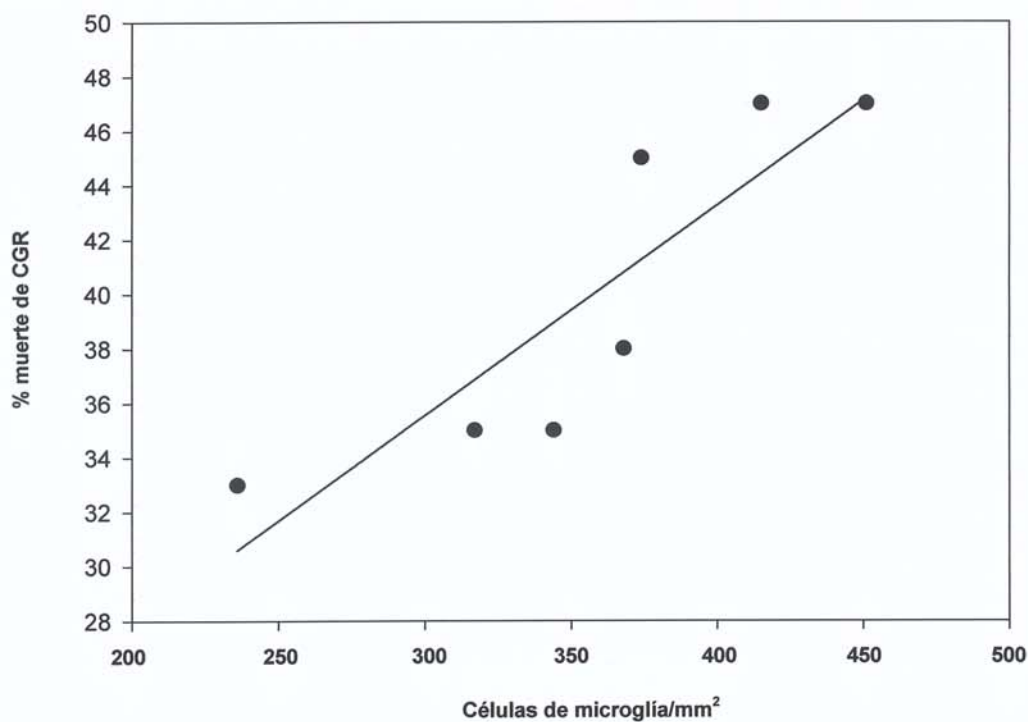


Figura 19

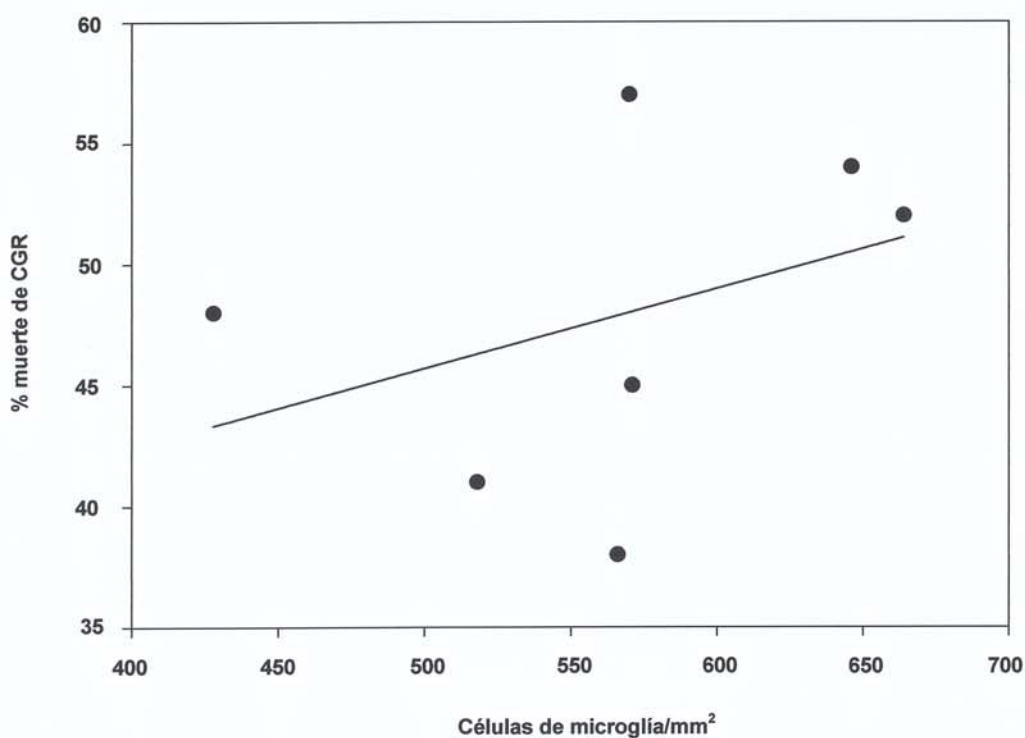


Figura 20

Figuras 19 y 20: Líneas de regresión realizadas con las densidades medias de células de microglía fagocítica a los 7 días y los porcentajes de muerte de CGR entre los 0 y los 7 días de la sección del NO (Fig. 19) y con las densidades medias de células de microglía fagocítica a los 14 días y los porcentajes de muerte de CGR entre los 7 y los 14 días (Fig. 20) en las retinas de los animales marcados con FG y con sección simple del NO.

Para analizar si existía una relación entre el porcentaje de CGR muertas y las densidades de células de microglía fagocítica a los 14 días de la sección del NO, hicimos una línea de regresión con los porcentajes de CGR muertas en las retinas experimentales analizadas a los 14 días de la sección del NO y las densidades de células de microglía fagocítica en las mismas retinas. El coeficiente de correlación de esta línea (r^2) fue de 0,3932 (no se muestra figura), lo que indica que en las retinas experimentales no existía una correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de CGR muertas y las densidades de células de microglía fagocítica a los 14 días de la sección del NO.

Además, en los grupos experimentales analizados a los 7 y 14 días después de la sección del NO, realizamos una línea de regresión con las diferencias de porcentajes de CGR muertas en las retinas experimentales entre los siete y los catorce días tras la sección del NO, y las densidades de células de microglía marcadas con FG obtenidas en las retinas experimentales analizadas a los 14 días de la sección del NO. El coeficiente de correlación de esta línea (r^2) fue de 0,1389 (Fig. 20), lo que indicaba que no existía una correlación estadísticamente significativa entre los porcentajes de CGR que mueren en las retinas experimentales entre 7 y 14 días y la densidad de células de microglía fagocítica catorce días después de la sección del NO. Estos resultados sugerían que las densidades de células de microglía fagocítica marcadas con FG a los 7 días de la sección del NO estaban relacionadas con el porcentaje de CGR muertas tras este periodo de supervivencia, y que esta relación no existía catorce días después de la sección del NO.

4.1.2.2.2 Grupo II.2 Sección del nervio óptico e inyección de factores

En este grupo se analizaron las densidades de células de microglía fagocítica marcadas con FG en las retinas experimentales de los animales que habían recibido tratamiento con alguna sustancia después de la sección del NO.

Las densidades medias de células de microglía marcadas con FG en las retinas experimentales de los distintos subgrupos de animales en los cuales se había administrado alguna sustancia (Tabla VII) variaron entre 0 células/mm² (n=7) en el grupo de animales en el que se había administrado intravítreamente BDNF y que había sido analizado a los 7 días de la sección del NO, y 754±24 células/mm² (n=8) en el grupo de animales en los que se había administrado intravítreamente NGF y que había sido analizado 14 días después de la sección del NO (Figuras 15 y 16).

En los subgrupos de animales en los que se había llevado a cabo punción

simple o administración subcutánea o intravítrea de vehículo (PBS), las densidades de células de microglía marcadas con FG en las retinas experimentales fueron similares a las obtenidas en las retinas experimentales de los animales en los que tan solo se había seccionado el NO (Tabla VII). Cuando comparamos las densidades obtenidas en las retinas experimentales de los subgrupos de pinchazo simple con las obtenidas en los animales con sección simple del NO, las diferencias no fueron estadísticamente significativas a los 7 ($p=0,8933$; $n=6$) y 14 días ($p=0,0589$; $n=6$) después de la lesión. Cuando comparamos las densidades de células de microglía marcadas con FG en las retinas tratadas intravítreamente con PBS con las obtenidas en las retinas con sección simple del NO, las densidades tampoco fueron significativamente diferentes a los 7 ($p=0,5902$; $n=6$) y 14 días ($p=0,3973$; $n=5$) después de la lesión. Por último, cuando comparamos las densidades de células de microglía marcadas con FG en las retinas de los animales tratados subcutáneamente con PBS con las obtenidas en los animales con sección simple del NO, las densidades tampoco fueron significativamente diferentes a los 7 ($p=0,4914$; $n=6$) y 14 días ($p=0,2118$; $n=6$) después de la lesión. Sin embargo, los animales que recibieron una inyección intravítrea del otro vehículo (PBS+DMSO) presentaron unas densidades de células de microglía significativamente menores que los animales con sección simple del NO 7 días después de la lesión ($p=0,0037$; $n=6$), que fue el único intervalo de supervivencia analizado para este vehículo.

Observamos que las densidades de células de microglía fagocítica variaban entre los distintos subgrupos de animales en los que se había administrado alguna sustancia y que habían sido analizados **siete días** después de la sección del NO (Tabla VII y Figura 15). También observamos diferencias entre las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas en los distintos subgrupos en los que se había administrado alguna sustancia y que habían sido analizados **catorce días** después de la sección del NO (Tabla VII y Figura 16).

Cuando consideramos los resultados en conjunto, observamos que las densidades de células de microglía fagocítica de las retinas experimentales (Tabla VII) variaban entre los distintos subgrupos y parecían depender de la sustancia administrada y del tiempo de supervivencia transcurrido (Figuras 15, 16 y 21). Además se observó que las retinas experimentales que presentaban más muerte de CGR tras la sección del NO (en relación a su correspondiente retina control) tenían una densidad de células de microglía fagocítica mayor, mientras que aquellas que arrojaban porcentajes menores de muerte de CGR tras la sección del NO tenían también densidades menores de células de microglía fagocítica (Figuras 17 y 18).

Para comprobar si en las retinas experimentales de los animales que habían sido tratados con alguna sustancia tras la sección del NO existía una relación entre el número de CGR que morían como consecuencia de la lesión y el número de células de microglía que fagocitaban los desechos de las CGR muertas, hicimos una **línea de regresión** con los porcentajes de CGR desaparecidas o muertas en las retinas tratadas con alguna sustancia y analizadas a los siete días de la sección del NO y las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas en las mismas retinas. El coeficiente de correlación de esta línea (r^2) fue de 0,7906 (Fig. 22), lo que indicaba que en las retinas tratadas con alguna sustancia y analizadas 7 días después de la sección del NO existía una correlación estadísticamente significativa entre la muerte de las CGR y la densidad de células de microglía fagocítica, al igual que hemos visto antes que ocurría en las retinas con sección simple del NO analizadas tras el mismo periodo de supervivencia.

Para investigar si 14 días después de la sección del NO y administración de alguna sustancia seguía existiendo esta relación, realizamos una línea de regresión con los porcentajes de CGR desaparecidas o muertas en las retinas tratadas con alguna sustancia y analizadas a los 14 días de la sección del NO y las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas en las mismas retinas. El coeficiente de correlación de esta línea (r^2) fue de 0,2984695 (no se muestra la figura), lo que indicaba que no existía una correlación entre ambos parámetros, al igual que hemos visto antes que ocurría en las retinas con sección simple del NO y analizadas tras el mismo periodo de supervivencia.

Además, en los grupos experimentales en los cuales las retinas se analizaron a los 7 y 14 días de la sección del NO, quisimos saber si existía una relación entre el porcentaje de CGR muertas entre 7 y 14 días y las densidades de células de microglía fagocítica encontradas a los 14 días, para lo que realizamos una línea de regresión con los porcentajes de CGR muertas entre 7 y 14 días después de la sección del NO y las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas en las retinas experimentales analizadas 14 días después de la sección del NO y administración de alguna sustancia. El coeficiente de correlación de esta línea (r^2) fue de 0,015028 (Fig. 23), lo que indicaba que en las retinas tratadas con alguna sustancia después de la sección del NO tampoco existía una correlación estadísticamente significativa entre los porcentajes de CGR muertas entre 7 y 14 días y las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas a los 14 días de la lesión. Este resultado fue similar al obtenido en los animales con sección simple del NO que hemos visto anteriormente y documentan que la administración de diferentes

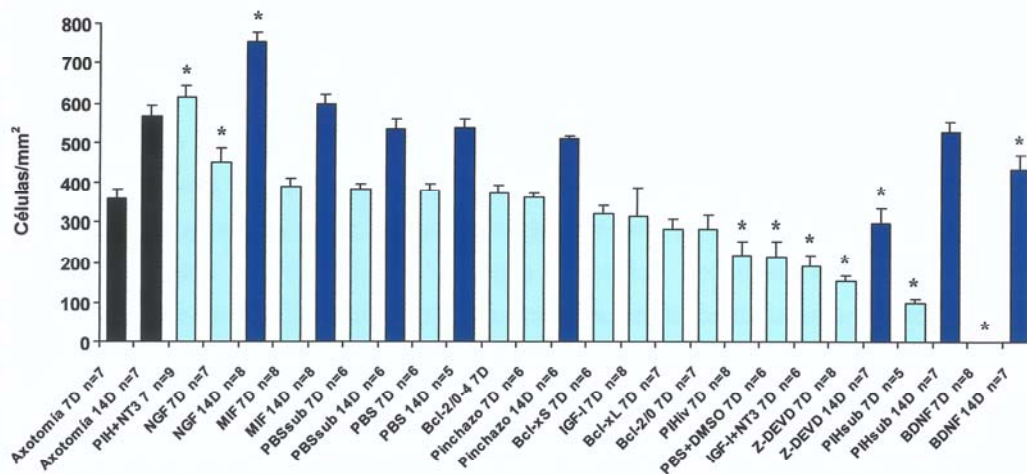


Figura 21

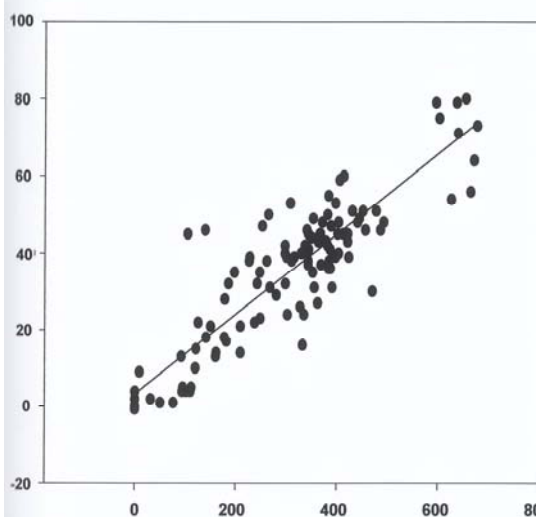


Figura 22

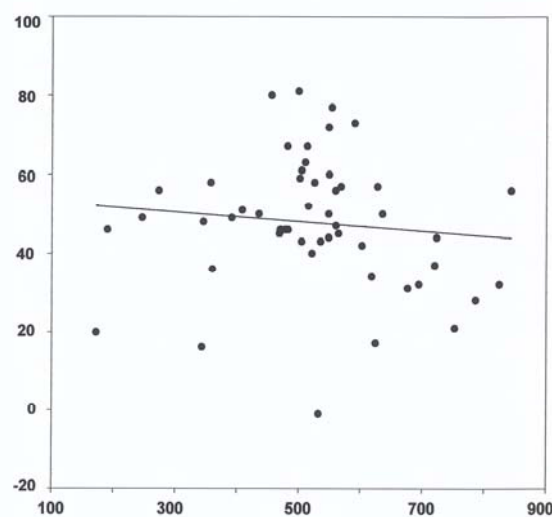


Figura 23

Figura 21: Densidades de células de microglía marcadas con FG/mm²±ESM en las retinas de los animales con sección simple del NO (axotomía), y en los que habían recibido tratamiento con alguna sustancia, a los 7 y 14 días de la sección del NO. Los asteriscos (*) indican los subgrupos experimentales que arrojaron densidades de células de microglía significativamente diferentes a las obtenidas en el grupo con sección simple del NO (axotomía), comparando periodos de supervivencia iguales.

Figuras 22 y 23: Líneas de regresión realizadas con las densidades de células de microglía marcadas con FG y los porcentajes de muerte de CGR entre 0 y 7 días (Fig. 22) y entre 7 y 14 días (Fig. 23) después de la sección del NO.

sustancias después de la sección del NO no altera la relación existente en las retinas experimentales entre los porcentajes de muerte de las CGR y las densidades de células de microglía fagocítica marcadas con FG, al menos a los 7 días de la sección del NO.

Para comprobar si la administración intravítrea o subcutánea de distintas sustancias tenía algún efecto sobre la población de células de microglía marcadas con FG que aparecían como consecuencia de la muerte de las CGR, se compararon las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas en las retinas experimentales tras la sección del NO y administración de los distintos productos con las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas en las retinas experimentales de los animales a los que tan solo se les había seccionado el NO. Las comparaciones se realizaron entre animales analizados tras el mismo periodo de supervivencia. Así, cuando comparamos las densidades de células de microglía marcadas con FG en los distintos subgrupos de animales en los que se había administrado alguna sustancia y que habían sido analizados a los **siete días**, con aquellos en los que tan solo se había seccionado el NO y habían sido analizados tras el mismo periodo de supervivencia (Figura 15), empleando el test de Mann-Whitney, observamos que las densidades de células de microglía fagocítica eran significativamente mayores tras la administración de PIH+NT3 ($p=0,0002$; $n=9$) y de NGF ($p=0,0419$; $n=7$), que no fueron significativamente diferentes en los subgrupos en los que se había administrado MIF ($p=0,8566$; $n=7$), Bcl-2 a días 0 y 4 ($p=0,8936$; $n=6$), Bcl-xS ($p=0,3388$; $n=6$), IGF-I ($p=0,7840$; $n=8$), Bcl-xL ($p=0,0602$; $n=7$) y Bcl-2 a día 0 ($p=0,1127$; $n=7$), y que fueron significativamente menores en los subgrupos de administración de PIH intravítrea ($p=0,0140$; $n=8$), IGF-I+NT3 ($p=0,0076$; $n=6$), Z-DEVD-cmk ($p<0,0001$; $n=8$), PIH subcutánea ($p=0,0004$; $n=5$) y BDNF ($p<0,0001$; $n=7$). Estos resultados sugieren que la administración intravítrea de NGF y de PIH+NT3 producen un significativo aumento de las densidades de células de microglía fagocítica de las retinas experimentales a los siete días de la sección del NO, lo que concuerda con el significativo descenso en la densidad de CGR observado en las retinas experimentales tratadas con estas dos sustancias tras dicho periodo de supervivencia.

Cuando comparamos las densidades de células de microglía marcadas con FG en los distintos subgrupos de animales a los que se había administrado alguna sustancia y que se habían analizado a los **catorce días**, con aquellos en los que tan solo se había seccionado el NO y habían sido analizados tras el mismo periodo de supervivencia (Figura 16), observamos que las densidades eran significativamente

mayores tras la administración de NGF ($p=0,0003$; $n=8$), que no eran significativamente diferentes en los subgrupos en los que se había administrado MIF ($p=0,5821$; $n=8$) y PIH subcutánea ($p=0,2953$; $n=7$) y que eran significativamente menores tras la administración de BDNF ($p=0,0088$; $n=8$) y Z-DEVD-cmk ($p=0,0001$; $n=7$). Estos resultados sugieren que la administración intravítrea de NGF produce un incremento significativo de la densidad de células de microglía fagocítica en las retinas experimentales analizadas a los catorce días de la sección del NO, a pesar de que la administración intravítrea de NGF no modifica significativamente la supervivencia de las CGR tras dicho periodo de supervivencia.

Analizamos a continuación si las densidades de células de microglía marcadas con FG en las retinas experimentales de los animales tratados con las distintas sustancias después de la sección del NO eran diferentes de las obtenidas en las retinas experimentales de los animales tratados con sus correspondientes vehículos. Cuando comparamos las densidades de células de microglía marcadas con FG en los distintos subgrupos de animales en los que se había administrado alguna sustancia y que se habían analizado a los **siete días**, con aquellos que habían recibido inyecciones intravítreas o subcutáneas de sus correspondientes vehículos y que se habían analizado tras el mismo periodo de supervivencia, empleando el test de Mann-Whitney, observamos que las densidades de células de microglía fagocítica eran significativamente mayores tras la administración de PIH+NT3 ($p=0,0005$; $n=9$) y de NGF ($p=0,0478$; $n=7$), que no fueron significativamente diferentes en los subgrupos en los que se había administrado MIF ($p=0,8076$; $n=7$), Bcl-2 a días 0 y 4 ($p=0,8936$; $n=6$) e IGF-I ($p=0,7147$; $n=8$) y que fueron significativamente menores en los subgrupos de administración de: Bcl-xS ($p=0,0289$; $n=6$), Bcl-xL ($p=0,0015$; $n=7$), Bcl-2 a día 0 ($p=0,0141$; $n=7$), PIH intravítrea ($p=0,0019$; $n=8$), IGF-I+NT3 ($p=0,0011$; $n=6$), Z-DEVD-cmk ($p<0,0001$; $n=8$), PIH subcutánea ($p=0,0004$; $n=5$) y BDNF ($p<0,0001$; $n=7$). Estos resultados sugieren que el significativo aumento en la densidad de células de microglía fagocítica observado en las retinas tratadas con PIH+NT3 y con NGF y analizadas a los siete días de la sección del NO era debido a la administración de estos dos productos, y no estaba relacionado con el vehículo empleado para la inyección.

Cuando comparamos las densidades de células de microglía marcadas con FG en los distintos subgrupos de animales a los que se había administrado alguna sustancia y que habían sido analizados a los **catorce días**, con aquellos en los que se habían administrado intravítrea o subcutáneamente sus correspondientes vehículos, y habían sido analizados tras el mismo periodo de supervivencia,

observamos que las densidades eran significativamente mayores tras la administración de NGF ($p=0,0003$; $n=8$), que no eran significativamente diferentes en los subgrupos en los que se había administrado BDNF ($p=0,0769$; $n=8$), MIF ($p=0,1503$; $n=8$) y PIH subcutánea ($p=0,2953$; $n=7$) y que eran significativamente menores tras la administración de Z-DEVD-cmk (-comparado con administración intravítrea de PBS- $p=0,0004$; $n=7$). Estos resultados sugieren que el significativo incremento en la densidad de células de microglía fagocítica observado en las retinas tratadas intravítreamente con NGF y analizadas a los 14 días de la sección del NO era debido a la administración del factor y no estaba relacionado con el vehículo empleado en la inyección.

Además, cuando comparamos las densidades de células de microglía marcadas con FG en las retinas de los animales tratados con alguna sustancia y que habían sido analizados a los **siete días**, con las obtenidas en las retinas de los animales que habían sido tratados con la misma sustancia y que se habían analizado a los **catorce días** de la sección del NO (Figura 21) por medio del test de Mann-Whitney, encontramos que las densidades de células de microglía eran significativamente mayores a los 14 días de la sección del NO tras la administración de: NGF ($p=0,0001$), MIF ($p=0,0000$), PBS ($p=0,0006$), PBS subcutáneo ($p=0,0002$), PIH subcutánea ($p=0,0004$), BDNF ($p=0,0000$) y Z-DEVD-cmk ($p=0,0029$) y en el grupo en el que se había llevado a cabo pinchazo simple ($p=0,0002$). Por tanto, la administración de diferentes sustancias o la punción simple tras la sección del NO no impiden el aumento en la densidad de células de microglía fagocítica marcadas con FG observado en las retinas experimentales entre los 7 y los 14 días de la lesión, como tampoco impedían el descenso en la densidad de CGR observado entre ambos periodos de supervivencia.

4.2 RESULTADOS CUALITATIVOS

4.2.1 OBSERVACIONES CUALITATIVAS EN EL GRUPO I: Retinas procesadas por la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa

El análisis cualitativo de las retinas procesadas mediante la técnica enzimo-histoquímica de la NDPasa por medio del microscopio óptico mostró marcaje en todas las retinas, tanto controles como experimentales, en los tres subgrupos que componían este grupo experimental. Dicho marcaje podía observarse en las paredes de los vasos sanguíneos, por lo que éstos se veían en todas las capas en las que aparecen: CFN, CPI y a ambos lados de la CNI. Además se observaban también

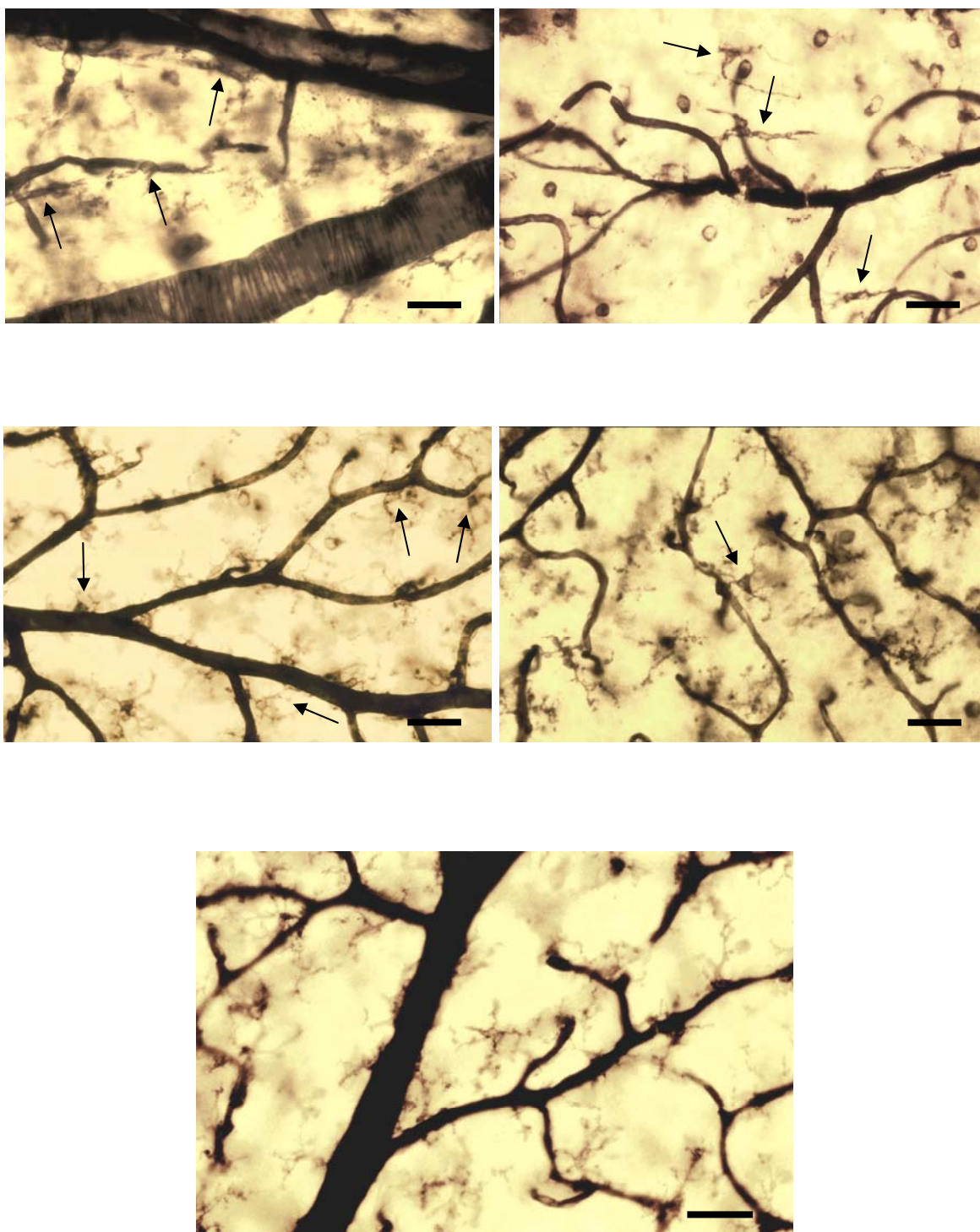
células NDPasa+ que se distribuían en distintas capas de la retina, y que en algunas de estas capas tenían distinta morfología. Estas células presentaban las características morfológicas típicas de las células de microglía descritas por otros autores en retina de mamífero adulto. Las capas en las que se distribuían estas células NDPasa+ fueron: CFN, CCG, CPI y CPE, tanto en las retinas controles como en las retinas experimentales. A continuación pasaremos a describir las características de las células NDPasa+ encontradas en los tres subgrupos que componen este grupo experimental.

4.2.1.1 Observaciones cualitativas realizadas en el subgrupo I.1

En las retinas de este subgrupo experimental, que se correspondían en su totalidad a retinas controles, es decir, a animales sin manipulaciones experimentales, observamos que la intensidad del marcaje no era uniforme ni dentro de la misma capa de una retina, ni entre las distintas capas en las que aparecían células NDPasa+, ni entre las retinas controles que componían este subgrupo experimental. Además, la morfología, densidad y/o distribución de las células variaba en las distintas capas.

En la **CFN** se observaban células NDPasa+ con morfología bipolar, que se disponían radialmente, siguiendo la trayectoria de los axones de las CGR (Fig 24). La densidad de estas células era mayor en las cercanías del disco óptico, mientras que a medida que nos alejábamos hacia la periferia de la retina dicha densidad disminuía, por lo que era difícil encontrar alguna célula bipolar (Fig 25). El número de células NDPasa+ en la CFN de estas retinas controles era muy escaso.

En la **CCG** se observaron células NDPasa+ de morfología estrellada, distribuidas uniformemente a lo largo de la retina. En las cercanías del disco óptico las células de microglía NDPasa+ de esta capa no podían observarse bien, no sabemos si por hallarse los vasos sanguíneos intensamente marcados y muy próximos, o porque en esta zona existe una menor densidad de células de microglía en esta capa. La morfología estrellada de las células NDPasa+ de esta capa era la típica de las células de microglía (Fig. 26), con un cuerpo celular pequeño, en relación al tamaño total de la célula, de forma redondeada u ovoide (aunque algunos casos aislados el soma tenía forma triangular; Fig. 27), del cual partían entre tres y cuatro procesos principales que se ramificaban profusamente, en la mayoría de los casos inmediatamente después de abandonar el soma, estratificándose dichas ramificaciones o procesos secundarios en varios planos. Esta disposición estratificada de los procesos con respecto al cuerpo celular daba lugar a que la célula



Figuras 24, 25, 26, 27 y 28: retinas de los animales del subgrupo I.1 (control), marcadas mediante la técnica de la NDPasa. Las flechas señalan algunas células de microglía NDPasa+ bipolares de la CFN en las cercanías del disco óptico (Fig. 24) y en la zona media de la retina (Fig. 25), así como células ramificadas de la CCG (Figs. 26 y 27) en estas retinas. La figura 28 ilustra el aspecto típico del mosaico de células de microglía NDPasa+ de la CCG en estas retinas. Obsérvese la ausencia de solapamientos entre los procesos de células vecinas Barra = 40 μ m.

ocupase un territorio tridimensional, ovoide o redondeado. Además, el territorio ocupado por cada una de estas células no era invadido por los procesos de las células vecinas, es decir, no existían solapamientos entre los procesos de las células de microglía NDPasa+ en esta capa (Fig. 28).

La morfología y la individualidad de las células NDPasa+ de esta capa se mantenían a lo largo de toda la retina, lo que le confería la apariencia de mosaico de células dispuestas regularmente (Fig. 28). Sin embargo, en la periferia extrema de la retina, los procesos de estas células no cubrían un territorio redondeado sino claramente oval, con el eje mayor paralelo a la periferia retiniana (Fig.29). Las células de microglía ramificadas NDPasa+ de esta capa guardaban una estrecha relación con los vasos sanguíneos, de forma que muchas de ellas establecían contacto con los mismos, a través de su soma o de sus procesos (Fig. 30).

En la **CPI** se observaron células NDPasa+ distribuidas regularmente por toda la retina y, al igual que ocurría en CCG, en la zona más próxima al disco óptico las células de microglía se veían con más dificultad, bien por el entramado de vasos sanguíneos que aparecían marcados, o bien porque existiera una menor densidad celular en esta zona. Las células de microglía NDPasa+ de la CPI tenían la morfología estrellada característica de las células de microglía, con un cuerpo celular pequeño, generalmente redondo u oval, del cual partían tres procesos principales que se ramificaban en numerosos procesos secundarios, a veces inmediatamente después de abandonar el soma celular, estratificándose dichos procesos secundarios en diferentes planos (Fig. 31). En esta capa las células de microglía NDPasa+ ocupaban, igual que en CCG, un territorio o dominio ovoide o redondeado, que no se solapaba con los dominios de las células vecinas. Esta ausencia de solapamiento no solo se producía entre las células de microglía NDPasa+ que se localizaban en la CPI sino también con las que se encontraban en CCG, de forma que las células que observadas en CPI parecían ocupar los huecos existentes en la trama formada por las células de microglía NDPasa+ situadas en la CCG.

En la **CPE** se observaron células NDPasa+ que no se distribuían uniformemente en toda la retina, de forma que en algunas retinas se podían observar en toda su extensión y en otras tan solo en algunas zonas de la misma (Fig. 32). Las células NDPasa+ observadas en esta capa mostraban un soma oval y el aspecto ramificado característico de las células de microglía. Sin embargo, el soma celular y los procesos se encontraban en el mismo plano, situándose horizontales y paralelos al eje de esta capa. A simple vista daba la impresión de que algunas células en esta capa ocupaban un territorio más extenso que las células de microglía NDPasa+ en

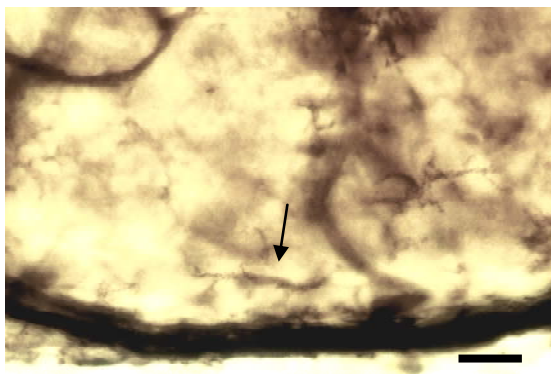


Figura 29

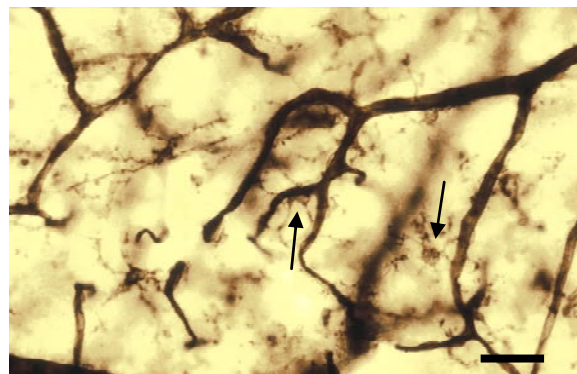


Figura 30

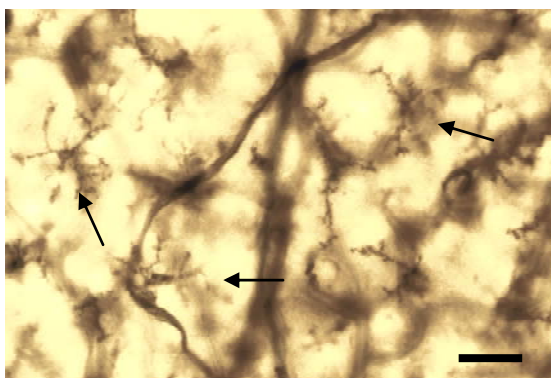


Figura 31

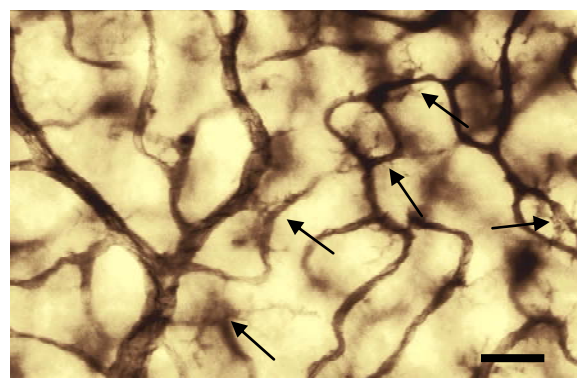


Figura 32



Figura 33

Figuras 29, 30, 31, 32 Y 33: Retinas del subgrupo I.1 (control), marcadas mediante la técnica de la NDPasa. Las flechas señalan células de microglía NDPasa+ de la periferia de la retina (Fig. 29), células de microglía NDPasa+ de la CCG contactando con los vasos (Fig. 30), células de microglía NDPasa+ ramificadas de la CPI (Fig. 31) y células de microglía NDPasa+ de la CPE (Figs. 32 y 33), algunas de las cuales entran en contacto con los vasos. Barra = 40µm.

CCG y CPI. La ausencia de homogeneidad de la distribución celular en esta capa podría deberse al deficiente marcaje de las células causado por la dificultad de penetración de los reactivos, más que a la ausencia de células en algunas zonas de la retina. Realizamos varios intentos de potenciar la penetración del marcaje (que no se mencionan en esta tesis) prolongando el tiempo de incubación y aumentando la concentración del sustrato del enzima (citidina 5' difosfato), pero no conseguimos nuestro objetivo, ya que los vasos se marcaban tan intensamente que no permitían identificar las células de microglía NDPasa+ situadas en las otras capas. A pesar de la heterogeneidad del marcaje, observamos que la densidad de células era menor en esta capa que en CCG y CPI, aunque no analizamos la densidad de células en esta capa por la dificultad de su marcaje.

Las células de microglía NDPasa+ de esta capa también se relacionaban estrechamente con los vasos sanguíneos, de forma que algunas de ellas entraban en contacto con los vasos existentes en esta capa a través de sus somas o de sus procesos, llegando algunas células a contactar con varios vasos por los extremos de sus procesos (Fig. 33).

4.2.1.2 Observaciones cualitativas realizadas en el subgrupo I.2

En las **retinas controles o derechas** de este subgrupo experimental observamos nuevamente una falta de uniformidad en el marcaje, tanto dentro de la misma retina como entre distintas retinas controles de este mismo subgrupo, igual que ocurría con las retinas controles del subgrupo I.1. Además, la mayoría de las observaciones realizadas en estas retinas en cuanto a morfología, características y distribución de las células coincidían con las descritas en las retinas controles y experimentales del subgrupo I.1. Por ello, tan solo mencionaremos las diferencias observadas en estas retinas con respecto a las retinas controles del citado grupo I.1. Estas diferencias observadas son válidas para todos los periodos de supervivencia tras los cuales fueron analizadas las retinas de este subgrupo experimental.

En la **CFN** de las retinas controles de este subgrupo experimental la densidad de células bipolares parecía ser levemente mayor a la observada en el subgrupo I.1, aunque seguía siendo baja.

En la **CCG** se observaban células de microglía ramificadas NDPasa+ similares a las células de microglía de esta capa descritas en el subgrupo I.1, aunque sus somas parecían tener un tamaño menor.

En la **CPI** el aspecto de las células era similar al descrito para el subgrupo I.1, aunque aparentemente el marcaje de las células NDPasa+ en esta capa era más intenso que el observado en la CPI de las retinas del subgrupo I.1, y similar al observado en las células NDPasa+ de la CCG.

En la **CPE** nuevamente aparecían zonas de la retina donde no se observaban células NDPasa+, posiblemente por dificultades de penetración de los reactivos.

En las **retinas experimentales o izquierdas** de este subgrupo tampoco se observó un marcaje uniforme en todas las retinas. En éstas se observaron células NDPasa+ localizadas en las mismas capas descritas en las retinas controles, si bien en algunas capas existían diferencias en cuanto a densidad y/o morfología. Todas las observaciones cualitativas que a continuación se describen correspondientes a CCG, CPI y CPE son comunes a todos los tiempos de supervivencia tras los cuales fueron analizadas las retinas en esta parte del estudio. Sin embargo, se observaron diferencias entre algunos periodos de supervivencia en las células de microglía NDPasa+ de la CFN de las retinas experimentales, como describiremos a continuación.

En la **CFN**, cuando las retinas se veían al microscopio óptico con bajo número de aumentos, se observaban cordones radiales con marcaje NDPasa+ muy intenso, que seguían la trayectoria de los axones de las CGR (Figs. 34a y 34b). Interpretamos que dichos cordones estaban formados por células de microglía NDPasa+ de morfología bipolar, que se encontraban en las retinas experimentales en un número superior al observado en las retinas controles. Así, en estos cordones las células se encontraban tan próximas que a veces no se podían individualizar al microscopio óptico, sobre todo en las zonas más próximas al disco óptico. A medida que nos alejábamos del mismo y fundamentalmente desde la zona media de la retina hasta la periferia, la densidad de células descendía sensiblemente de forma que se podían observar estas células bipolares aisladas (Fig. 35). Algunas de estas células bipolares presentaban algunos procesos escasamente ramificados que partían de los polos del soma celular (Fig. 35). Las células de esta capa cubrían la extensión total de la retina, si bien en la periferia eran muy escasas.

Los cordones radiales formados por células de microglía NDPasa+ bipolares intensamente marcados podían verse en la CFN de las retinas experimentales 7, 10 y 14 días después de la sección del NO. En las retinas analizadas 22 días después de la lesión, las células presentaban un marcaje más tenue (Fig. 36), por lo que no se

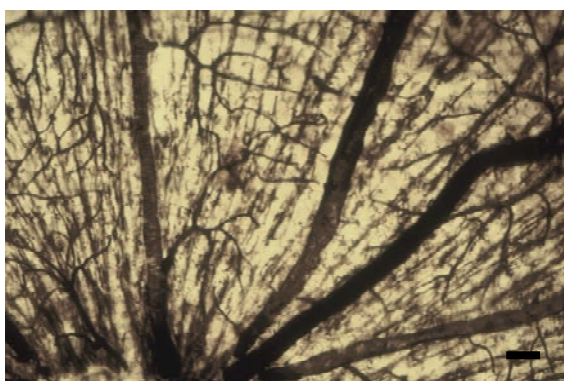


Figura 34a

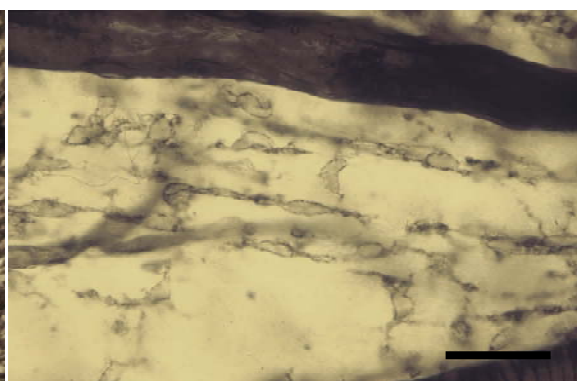


Figura 34b

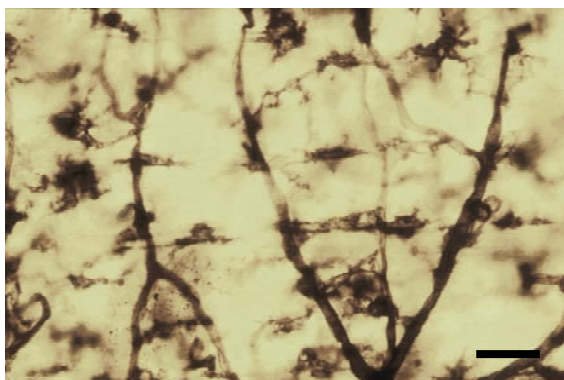


Figura 35

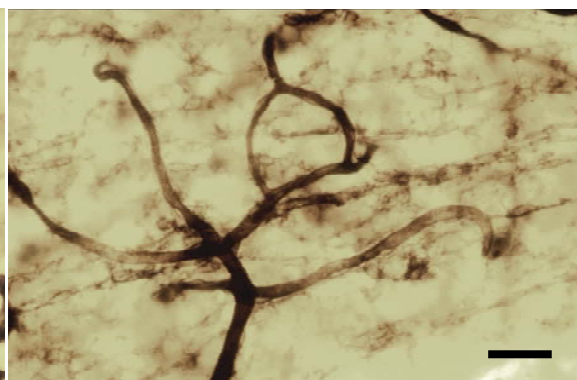


Figura 36

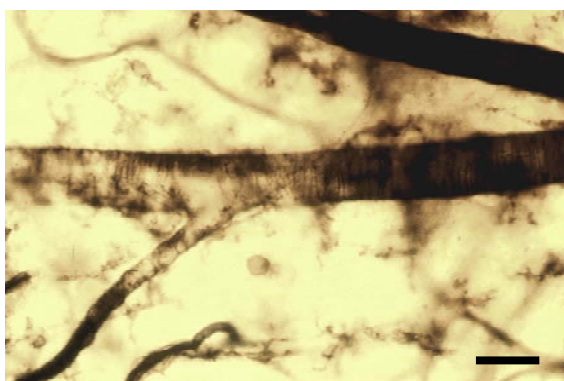


Figura 37

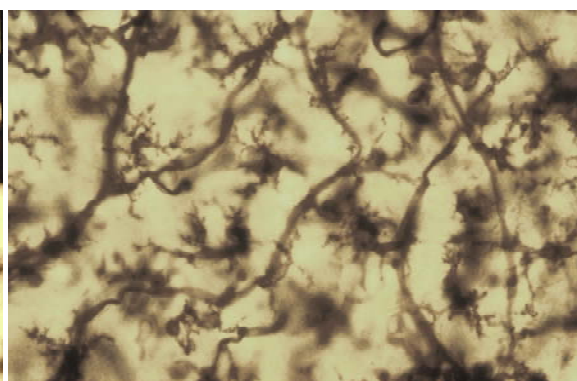


Figura 38

Figuras 34a, 34b, 35, 36, 37 y 38: retinas del subgrupo I.2, marcadas mediante la técnica de la NDPasa. Aspecto de la CFN de una retina experimental analizada a los 7 días de la sección del NO (Fig. 34a) y detalle de la citada capa en las cercanías del disco óptico en la misma retina (Fig. 34b). Aspecto de la CFN en la zona media de la retina (Fig. 35), de la CFN en una retina experimental a los 22 (Fig. 36) y 40 (Fig. 37) días de la sección del NO, y aspecto del mosaico de células de microglía NDPasa+ ramificadas de la CCG de una retina experimental del subgrupo I.2 (Fig. 38). Barra = 40 μ m.

podían observar claramente los cordones de células bipolares NDPasa+, y en las retinas experimentales analizadas a los 30 y 40 días de la sección del NO (Fig. 37) el marcaje de la CFN era similar al existente en la CFN de sus correspondientes retinas controles.

En la **CCG** de las retinas experimentales, las células de microglía NDPasa+ tenían el aspecto típico ramificado y con sus procesos estratificados, y se distribuían uniformemente a lo largo de toda la retina formando, al igual que en las retinas controles, un mosaico regular (Fig. 38). En este caso tampoco podían observarse adecuadamente las células en la zona más próxima al disco óptico, pues al problema del marcaje de los vasos se sumaba en las retinas de este grupo de animales el incremento en el marcaje que en esta zona presentaban las células de microglía de la CFN.

Los dominios redondeados u ovoides ocupados por las células de microglía NDPasa+ en esta capa tampoco se solapaban, como ya se ha descrito en las retinas controles. Sin embargo, se observaba que las células de microglía en la CCG de las retinas experimentales sufrían una leve retracción en sus procesos, de forma que el espacio o dominio ocupado por cada célula era aparentemente menor que el ocupado por las mismas células en las retinas controles. En esta capa, el marcaje de las células de microglía NDPasa+ era más intenso que el observado en sus correspondientes retinas controles.

En la **CPI** se observaron células de microglía NDPasa+ ramificadas y con sus procesos estratificados distribuidas por toda la retina, si bien se veían peor en la región cercana al disco óptico, por el mismo motivo expuesto para las células de microglía situadas en la CCG. Las células de microglía NDPasa+ en esta capa ocupaban un territorio bien delimitado, como lo hacían las células de microglía descritas en las retinas controles, que no se solapaba con el de las células vecinas situadas en la misma capa ni con el de las células de microglía NDPasa+ situadas en CCG (Fig. 39). En esta capa observamos que las células de microglía NDPasa+ sufrían también una retracción en sus procesos, igual que la descrita en la CCG de las retinas experimentales, abarcando un territorio menor que el ocupado por las células de microglía de las retinas controles. Además, en esta capa parecía apreciarse un leve incremento en la intensidad del marcaje de las células de microglía NDPasa+ respecto al observado en las retinas controles (Fig. 39).

En la **CPE** de las retinas experimentales se observaron células de microglía NDPasa+ extensas, de morfología ramificada y con procesos situados en el mismo

plano que el soma celular, como hemos descrito en las retinas controles. Nuevamente estas células se relacionaban estrechamente con los vasos sanguíneos, a través del soma o de los procesos (Fig. 40), contactando algunas de ellas con varios vasos a la vez, como hemos descrito en las retinas controles. No podemos afirmar que existieran diferencias en la intensidad del marcaje de las células de esta capa respecto a las observadas en retinas controles, ya que el marcaje de las células de esta capa tampoco era uniforme, existiendo zonas en las que no se observaban células o su marcaje era muy tenue. Pensamos que esta circunstancia seguía siendo consecuencia de la dificultad en la penetración de los reactivos y no de la inexistencia de células en algunas zonas.

4.2.1.3 Observaciones cualitativas realizadas en el subgrupo I.3

Las observaciones en cuanto a la morfología y disposición de las células de microglía NDPasa+ encontradas en estas retinas coincidían en su mayor parte con las descripciones hechas en las retinas controles y experimentales del subgrupo I.2, y eran comunes a todos los periodos de supervivencia tras los cuales fueron analizadas las retinas en esta parte del estudio. Por ello, vamos a exponer en este apartado del estudio cualitativo de este grupo experimental tan solo aquellas diferencias evidentes observadas en CFN, CCG y CPI entre las retinas experimentales y controles de este subgrupo I.3 y las retinas experimentales y controles del subgrupo I.2, así como las diferencias encontradas entre retinas experimentales de los animales a los que se les había administrado distintos factores.

Las retinas controles y experimentales de los animales que se habían tratado con PBS o que habían recibido punción simple eran más similares en cuanto a la apariencia de sus células de microglía NDPasa+ a las retinas experimentales y controles de los animales que habían sido tratados con las diferentes sustancias empleadas en esta parte del estudio, que a las de los animales con sección simple del NO (subgrupo I.2).

En las **retinas experimentales** de los animales a los que se había administrado **BDNF**, a los 7 días de la sección del NO, en la **CFN** aparecían cordones de células marcados menos intensamente (Fig. 41) que los observados tras el mismo periodo de supervivencia en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO o en aquellos tratados con punción simple o vehículo, y que adquirirían una intensidad de marcaje similar a las retinas citadas anteriormente 14 días después de la sección del NO (Fig. 42). Algo similar ocurría en la intensidad del marcaje de las células de microglía NDPasa+ de la **CCG** y la **CPI** en las retinas tratadas con BDNF,

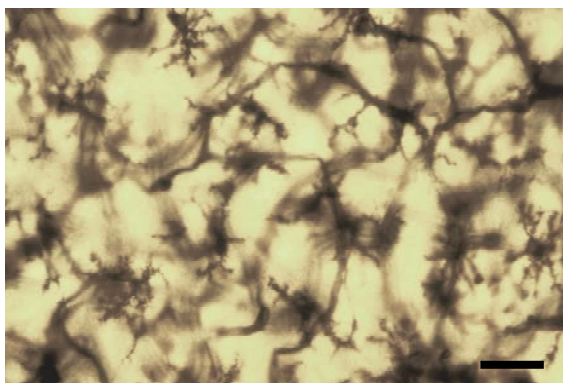


Figura 39

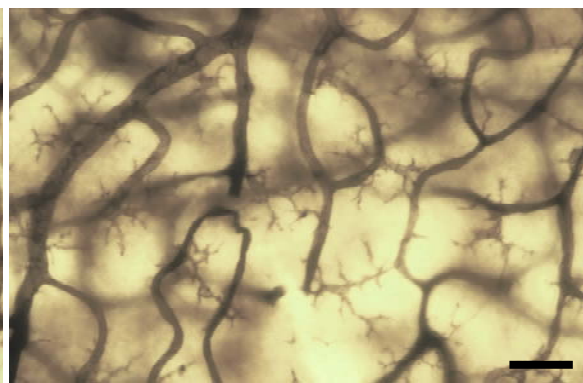


Figura 40

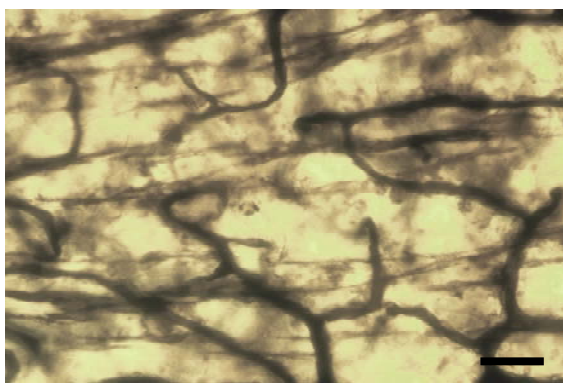


Figura 41

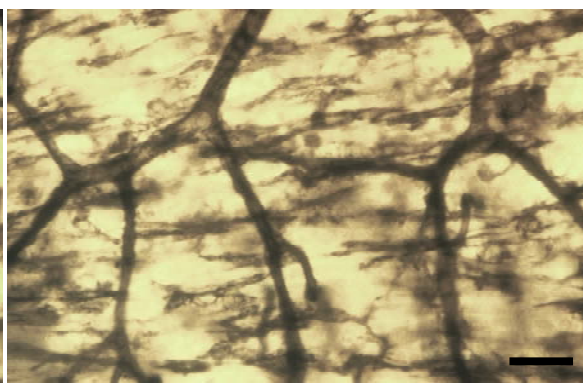


Figura 42

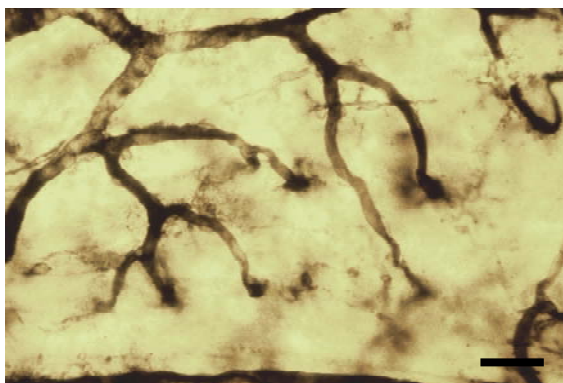


Figura 43



Figura 44

Figuras 39, 40, 41, 42, 43 y 44: aspecto de la CPI y de la CPE de las retinas experimentales del subgrupo I.2. Obsérvese el estrecho contacto entre las células de microglía NDPase+ y los vasos sanguíneos en ambas capas. Las figuras 41 y 42 corresponden a la CFN de retinas experimentales tratadas con BDNF, y analizadas a los 7 (Fig. 41) y 14 (Fig. 42) días de la sección del NO. Obsérvese que el marcaje NDPase de esta capa es menor a los 7 días que a los 14 días de la lesión. Las figuras 43 y 44 corresponden a la CFN de retinas experimentales tratadas con NT3, y analizadas a los 7 (Fig. 43) y 14 (Fig. 44) días de la sección del NO. Obsérvese que el marcaje NDPase en estas retinas tratadas con NT3 es más tenue que el observado en las retinas con sección simple del NO. Barra = 40 μ m.

ya que a los 7 días de la sección del NO la intensidad del marcaje de las células de microglía NDPasa+ de estas capas era mayor en las retinas experimentales que en las retinas controles, pero dicho marcaje se incrementaba en las retinas experimentales tratadas con BDNF a los 14 días de la lesión.

En las retinas **experimentales** de los animales en los que se había administrado intravítreamente **NT3** tras la sección del NO, y que se habían analizado a los 7 días de la lesión, se observaron diferencias en la **CFN** en cuanto a la densidad y aspecto de las células de microglía NDPasa+ bipolares con respecto a las retinas controles y experimentales de los animales de los subgrupos I.2 y I.3. Así, los cordones de células bipolares de la CFN en las retinas experimentales tenían un marcaje menos intenso que el observado en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO (subgrupo I.2) y en las de aquellos que tras la sección del NO habían recibido punción simple o una inyección intravítrea de PBS (pertenecientes al subgrupo I.3) (Fig. 43), pudiendo observarse las células individualmente, aunque unidas por los polos de sus somas a células bipolares vecinas. A los 14 días de la sección del NO (Fig. 44), la CFN de las retinas tratadas con NT3 adquiría un marcaje más intenso, aunque menor que el observado en la CFN de las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO o de los que habían recibido punción simple o inyección de vehículo.

4.2.2 OBSERVACIONES CUALITATIVAS EN EL GRUPO II: Retinas marcadas con fluorogold

En el grupo de animales a los cuales se les realizó marcaje de las CGR con FG, las células microgliales se observaban cuando habían fagocitado los desechos de las neuronas muertas, es decir, cuando se había llevado a cabo la sección del NO, que inducía la degeneración y muerte de las CGR. Por esta razón, las descripciones cualitativas de las células de microglía marcadas con FG que se exponen en este estudio se corresponden a las realizadas en las retinas experimentales de los distintos subgrupos.

4.2.2.1 Observaciones cualitativas realizadas en el subgrupo II.1

4.2.2.1.1 Células ganglionares de la retina marcadas con fluorogold

En las **retinas controles o derechas** se observaron células marcadas con FG, con la morfología típica de las CGR, distribuidas a lo largo de toda la retina. Esta distribución no era uniforme, sino que variaba en función de la distancia al disco

óptico. Así, desde el disco óptico hasta la zona media de la retina, las células se agrupaban entre sí, dejando espacios vacíos entre ellas que correspondían al lugar ocupado por los vasos sanguíneos o los axones (Fig. 45). Sin embargo, a medida que nos alejábamos hacia la periferia, las células se distanciaban más entre sí, coincidiendo con un paulatino descenso de la población (Fig. 46).

En las **retinas experimentales o izquierdas** se observaron también las CGR marcadas con FG (Fig. 47). Las CGR observadas en la zona central-media de las retinas experimentales no se encontraban agrupadas entre sí como en las retinas controles, sino que entre ellas se podían observar numerosos espacios, que no correspondían solo a los ocupados por los vasos sanguíneos y por los axones de las CGR, sino que también se debían a la muerte de algunas CGR. Estos espacios eran más frecuentes a medida que aumentaba el tiempo de supervivencia, por lo que la separación entre las CGR era mayor 14 días después de la sección del NO, mostrando las retinas experimentales tras este periodo de supervivencia una densidad muy escasa de CGR (Fig. 48).

4.2.2.1.2 Células de microglía marcadas con fluorogold

En las **retinas controles** o derechas de los animales en los que se había seccionado el NO izquierdo, se observaba en raras ocasiones un segundo tipo celular marcado con FG, cuya morfología se correspondía con la de las células de microglía. Este segundo tipo celular era mucho más numeroso en las **retinas experimentales**. Estas células se caracterizaban por tener un cuerpo celular pequeño generalmente alargado, del cual partían algunos procesos bipolares o radiales (Figs. 49 y 50), aunque se observaron a lo largo de la retina diferencias morfológicas y de densidad en estas células de microglía, que describiremos a continuación.

En las cercanías del disco óptico existían numerosas células con morfología bipolar dispuestas radialmente, que en ocasiones presentaban dos procesos cortos que partían de los extremos opuestos de sus somas (Fig. 50). Estas células se localizaban en la **CFN** y su disposición radial se correspondía con la trayectoria de los axones de las CGR. Estas células eran muy numerosas en la zona más próxima al disco óptico, donde se alineaban de forma que una célula contactaba por los extremos de sus somas con otras células, aunque también en ocasiones se observaban células aisladas. A medida que nos alejábamos de la zona más próxima al disco óptico era más frecuente la observación de células bipolares aisladas, dado que su densidad disminuía. Este primer tipo de células de microglía fagocítica se extendía desde el disco óptico hasta la periferia retiniana. Además, desde las

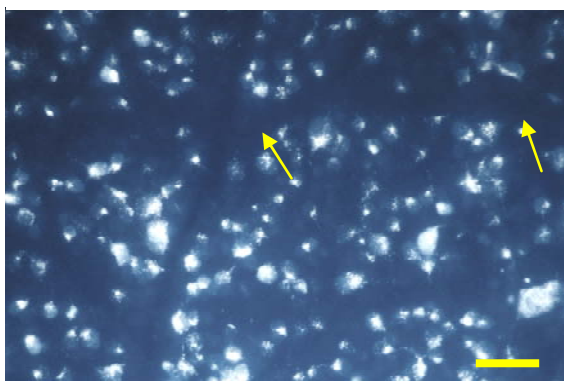


Figura 45

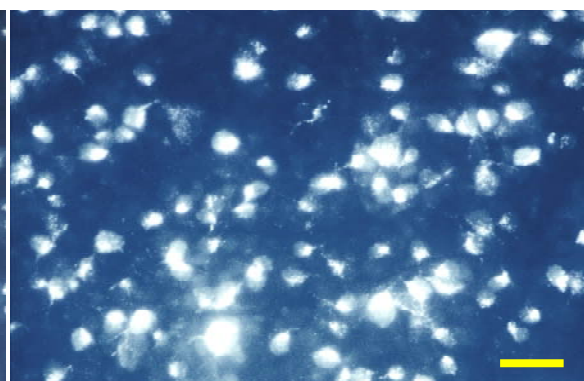


Figura 46

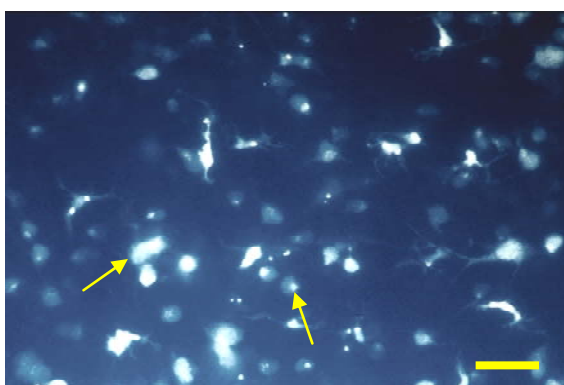


Figura 47

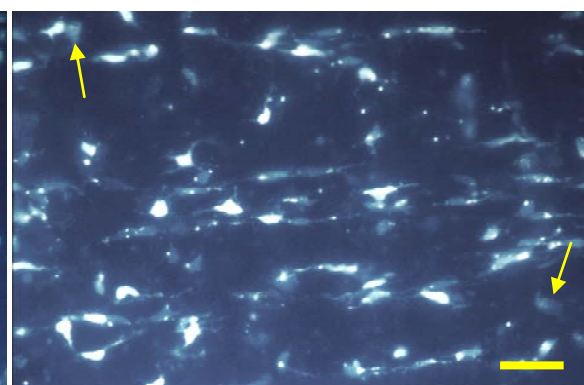


Figura 48

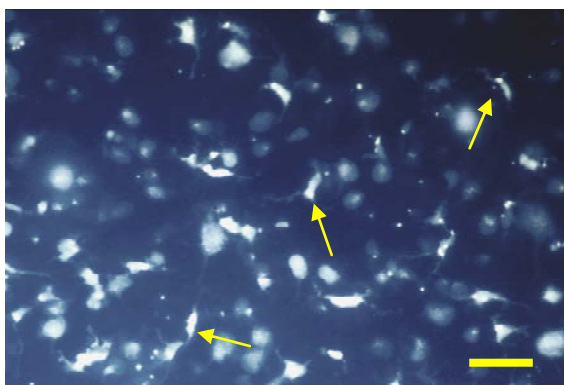


Figura 49

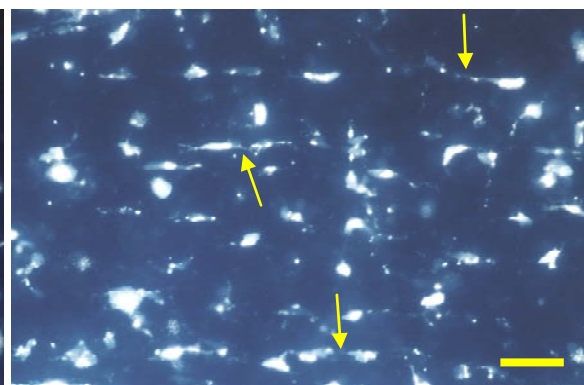


Figura 50

Figuras 45, 46, 47, 48, 49 y 50: retinas marcadas con Fluorogold. Aspecto de la CCG de las retinas derechas o controles (Fig. 45 y 46). Obsérvese que los espacios entre CGR se corresponden con la trayectoria de los vasos sanguíneos (señalados con flechas). Aspecto de las retinas experimentales a los 7 (Fig. 47) y 14 días (Fig. 48) después de la sección del NO. Las flechas señalan algunas CGR en estas retinas. Obsérvese que existen más espacios entre las CGR en estas retinas experimentales que en las retinas controles, y que las retinas analizadas a los 14 días de la sección del NO presentaban una escasa densidad de CGR. Aspecto de las retinas experimentales marcadas con FG a los 7 (Fig. 49) y 14 días (Fig. 50) de la sección del NO. Las flechas señalan células de microglía bipolar marcadas con FG que siguen la trayectoria de los axones de las CGR, algunas de las cuales se unen entre sí por los extremos de sus polos (Fig. 50), mientras que otras se encuentran aisladas y no siguen una disposición radial (Fig. 49). Barra = 40 μ m.

cercanías del disco óptico y aumentando a medida que avanzábamos hacia la zona media y periférica de la retina existían en la CFN células bipolares que no seguían una distribución radial y que se encontraban aisladas (Fig. 49), así como células de microglía fagocítica cuyo soma presentaba morfología variada, y del cual partían escaso número de procesos (Fig. 51). Estas últimas células se localizaban en la **CCG**. En escasas ocasiones se podían observar una ó más células de esta capa rodeando a alguna CGR a la que presumiblemente podían estar fagocitando o esperando la muerte de ésta (Fig. 52).

Observamos también células de microglía fagocítica marcadas con FG en la **CPI**, cuyos cuerpos celulares seguían siendo en la mayor parte de los casos ovales, aunque existía bastante heterogeneidad. En esta capa las células de microglía eran muy escasas, sobre todo en las retinas analizadas a los 7 días de la lesión, y a diferencia de lo que ocurría con los dos tipos celulares anteriores, algunas de ellas poseían un cuerpo celular voluminoso y numerosos procesos ramificados (Figs. 53 y 54).

La cantidad de células de microglía marcadas con FG que aparecían en las retinas experimentales en la CFN y CCG dependía también del periodo de supervivencia estudiado, y así, 14 días después de la sección del NO (Fig. 50), en todas las retinas experimentales de este subgrupo se observaba un mayor número de células marcadas con FG que a los 7 días de la sección del NO (Fig. 49). Por tanto, parecía existir una relación inversa entre la densidad de células de microglía marcadas con FG y la de CGR. Estas diferencias en la densidad de células de microglía marcadas con FG entre los dos periodos de supervivencia mencionados se observaron también en las células localizadas en la CPI.

4.2.2.2 Observaciones cualitativas realizadas en el subgrupo II.2

4.2.2.2.1 Células ganglionares de la retina marcadas con fluorogold

En este subgrupo, las observaciones realizadas en las **retinas controles** coincidieron en su totalidad con las llevadas a cabo en las retinas controles del subgrupo II.1, por lo que nos remitimos a las mismas (ver apartado 4.2.2.1).

En cuanto a las **retinas experimentales**, aunque la mayor parte de las observaciones cualitativas realizadas en los subgrupos que forman este grupo experimental coincidían con las llevadas a cabo en las retinas experimentales del

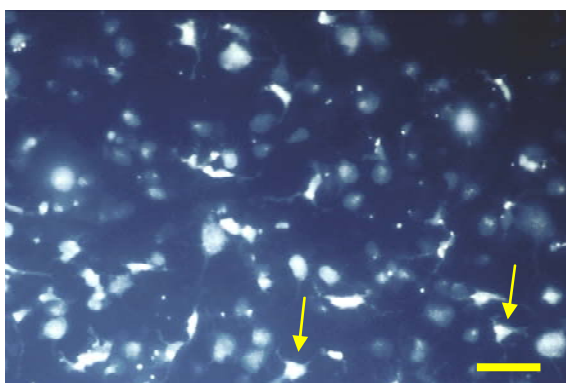


Figura 51

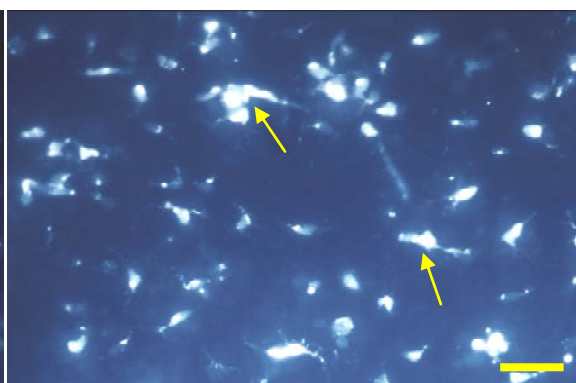


Figura 52

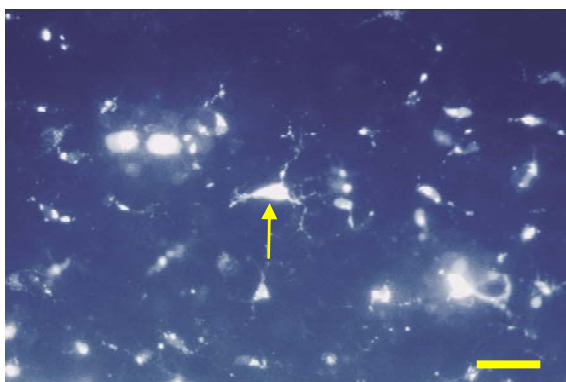


Figura 53

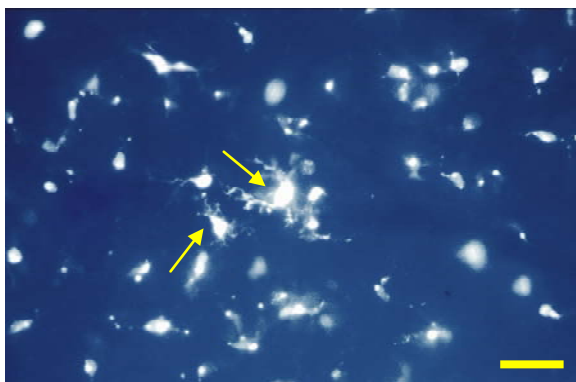


Figura 54

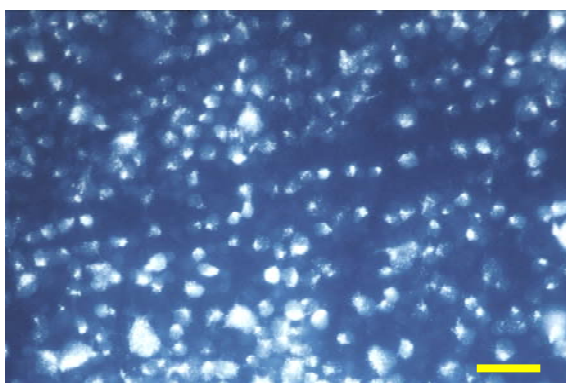


Figura 55

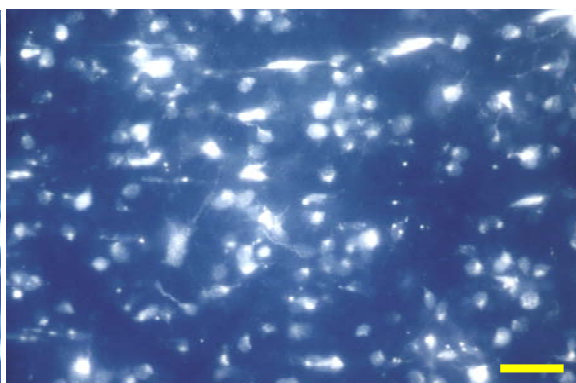


Figura 56

Figuras 51, 52, 53, 54, 55 y 56: retinas marcadas con Fluorogold. Células de microglía fagocítica con morfología no bipolar (Fig. 51) y células de microglía asociadas a alguna CGR (Fig. 52). Aspecto de la CPI de las retinas experimentales (Figs. 53 y 54). Las flechas señalan células de microglía fagocítica en esta capa con procesos radiales, y algunas de ellas presentan un cuerpo celular voluminoso. Aspecto de las retinas experimentales tratadas con BDNF a los 7 (Fig. 55) y 14 días (Fig. 56) después de la sección del NO. Obsérvese que a los 7 días de la lesión las retinas presentan una densidad de CGR similar a observada en las retinas controles, mientras que a los 14 días de la sección del NO ha disminuido sensiblemente la densidad de CGR. Barra = 40 μ m.

subgrupo II.1, algunos subgrupos en los que se había administrado alguna sustancia mostraban diferencias cualitativas apreciables en sus retinas experimentales respecto a las del subgrupo II.1, que pasaremos a exponer a continuación.

Así, las retinas experimentales de los animales tratados intravítreamente con **BDNF** y que se analizaron a los 7 días de la sección del NO no se diferenciaban de sus correspondientes retinas controles en cuanto a la población de CGR (Fig. 55). Además, las retinas experimentales de los animales tratados con BDNF y que se habían analizado a los 14 días de la sección del NO (Fig. 56) se asemejaban en la apariencia de las CGR a las retinas experimentales de los animales en los que tan solo se había seccionado el NO y que habían sido analizados a los 7 días de la lesión, más que a las de los animales con sección simple del NO o a aquellos tratados intravítreamente con el vehículo, y que habían sido analizados 14 días después de la lesión.

Las retinas experimentales de los animales en los que se administró subcutáneamente **PIH** y que se analizaron a los 7 días de la sección del NO, tenían una apariencia muy similar a sus correspondientes retinas controles en cuanto a la población de CGR (Fig. 57). Además, las densidades de CGR en estas retinas tratadas subcutáneamente con PIH eran mayores que en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO o de aquellos tratados subcutáneamente con PBS, y que se habían analizado a los 7 días de la sección del NO. A los 14 días de la lesión, las retinas experimentales de los animales a los que se les había administrado subcutáneamente PIH (Fig. 58) presentaban una apariencia muy similar en cuanto a las CGR a las retinas de los animales con sección simple del NO o a las de los animales tratados subcutáneamente con PBS, y que se habían analizado tras el mismo periodo de supervivencia.

Las retinas experimentales de los animales que habían recibido dosis repetidas del inhibidor irreversible de la caspasa 3, el **Z-DEVD-cmk**, y que se habían analizado a los 7 días de la sección del NO, se encontraban más pobladas de CGR que las retinas experimentales de los animales a los que tan solo se les había seccionado el NO y que habían sido analizados tras el mismo periodo de supervivencia (Fig. 59). Además, las retinas experimentales de los animales tratados con Z-DEVD-cmk y analizadas 14 días después de la sección del NO (Fig. 60) se asemejaban más, en cuanto a la densidad de CGR, a las retinas experimentales de los animales tratados con una dosis intravítrea de BDNF y analizados tras el mismo periodo de supervivencia, que a las retinas de los animales con sección simple del

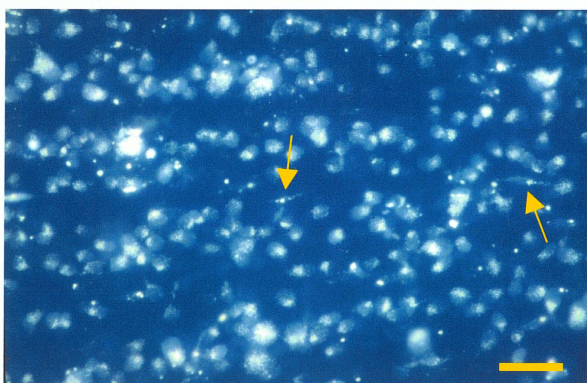


Figura 57

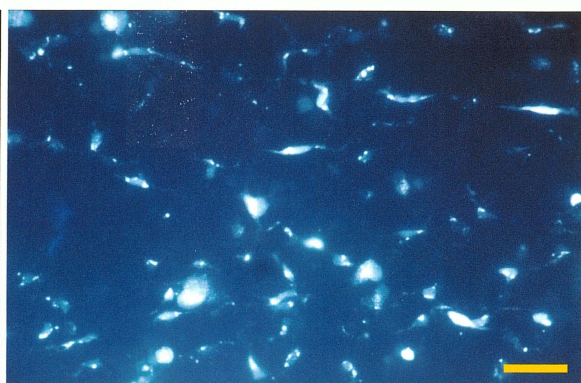


Figura 58

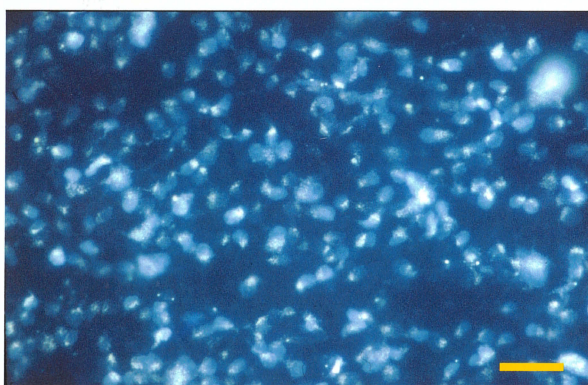


Figura 59

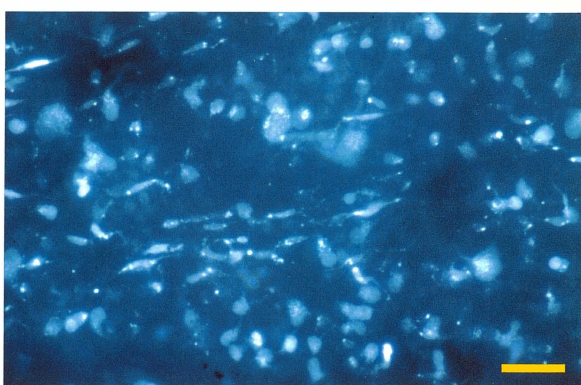


Figura 60

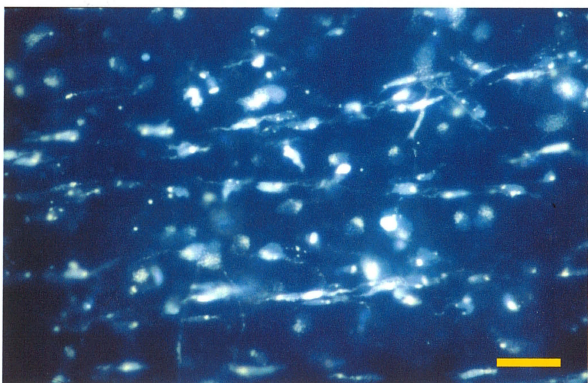


Figura 61

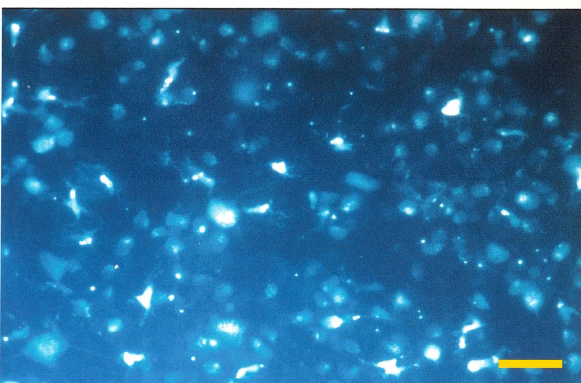


Figura 62

Figuras 57, 58, 59, 60, 61 y 62: Retinas marcadas con fluorogold. Aspecto de las retinas experimentales tratadas subcutáneamente con PIH, y analizadas a los 7 (Fig. 57) y 14 (Fig. 58) días de la sección del NO. Las flechas (Fig. 57) señalan algunas células de microglía en las retinas experimentales tratadas subcutáneamente con PIH y analizadas a los 7 días de la lesión. Las figuras 59 y 60 muestran el aspecto de las retinas experimentales tratadas con Z-DEVD-cmk, y analizadas a los 7 (Fig. 59) y 14 (Fig. 60) días de la sección del NO. La figura 61 muestra el aspecto de las retinas experimentales tratadas con PIH+NT3 y analizadas a los 7 días de la lesión. Obsérvese que estas retinas estaban menos pobladas de CGR que las retinas experimentales con sección simple del NO analizadas tras el mismo periodo de supervivencia (Fig. 62). Barra = 40 μ m.

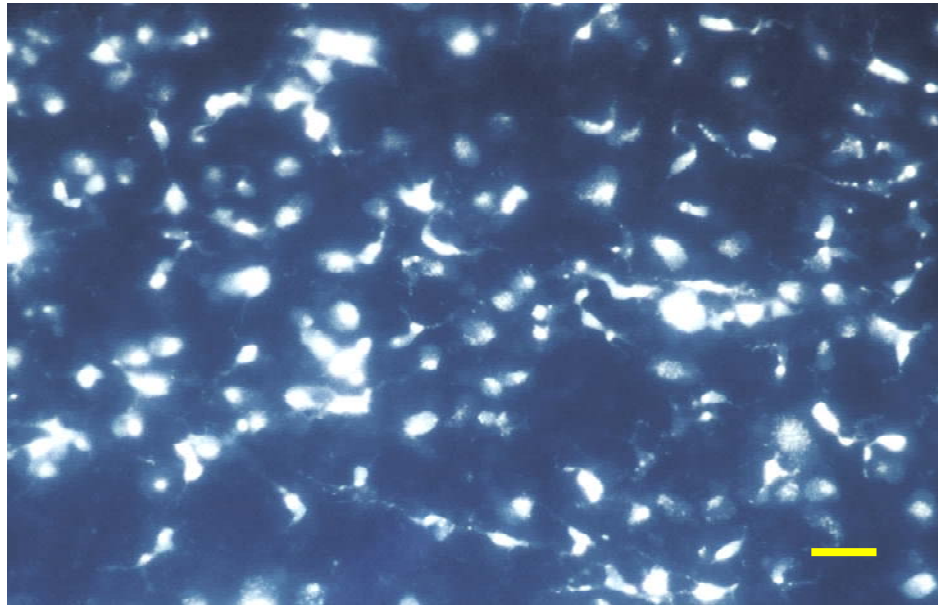


Figura 63

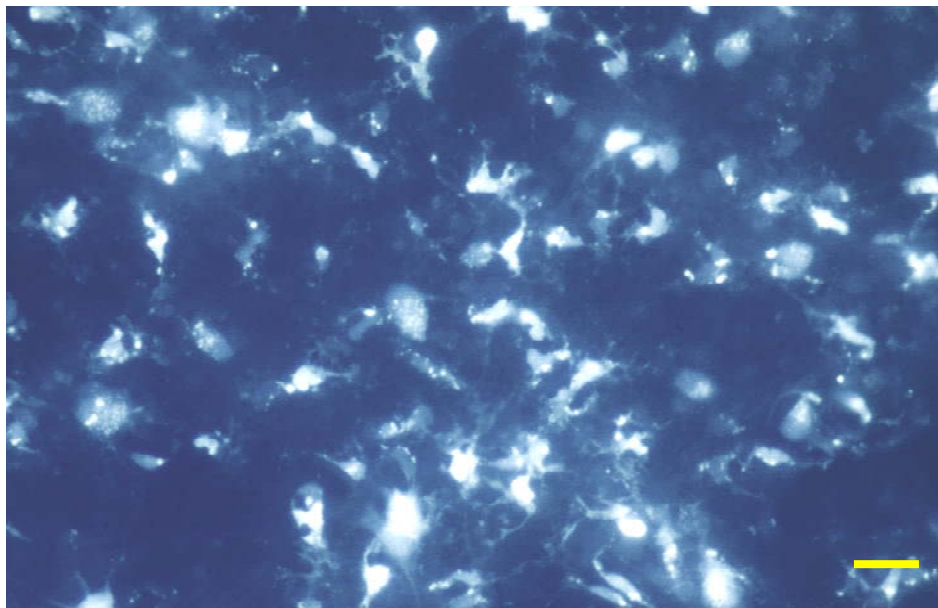


Figura 64

Figuras 63 y 64: retinas marcadas con Fluorogold. Aspecto de las retinas tratadas con NGF tras la sección del NO, y analizadas a los 7 (Fig. 63) y 14 (Fig. 64) días de la lesión. Obsérvese que en estas retinas existen numerosas células de microglía en los dos periodos de supervivencia estudiados. Barra = 25 μ m.

NO o de aquellos tratados intravítreamente con PBS y que se habían analizado tras el mismo periodo de supervivencia.

En las retinas experimentales de los animales tratados con **PIH+NT3** y que se analizaron a los 7 días de la sección del NO observamos una población menor de CGR (Fig. 61) que las retinas con sección simple del NO analizadas tras el mismo periodo de supervivencia (Fig. 62).

4.2.2.2.1 Células de microglía marcadas con fluorogold

Las retinas controles y experimentales de los animales tratados con **BDNF** y analizados a los 7 días de la sección del NO (Fig. 55) eran muy similares en cuanto a la escasez de células de microglía marcadas con FG observada en las mismas a las retinas controles del grupo II.1. Además, las retinas de los animales tratados con BDNF y analizados a los 14 días de la sección del NO (Fig. 56) presentaban un aspecto muy similar al de las retinas de los animales con sección simple del NO y analizados a los 7 días de la lesión, en cuanto a densidad y apariencia de las células de microglía marcadas con FG.

En las retinas experimentales de los animales en los que se administró subcutáneamente **PIH** y que se analizaron a los 7 días de la sección del NO (Fig. 57) se observaron más células de microglía marcadas con FG que en las retinas controles y que en las tratadas con BDNF y analizadas tras el mismo periodo de supervivencia. A los 14 días de la lesión, las retinas experimentales de los animales a los que se les había administrado subcutáneamente PIH (Fig. 58) presentaban un aspecto muy similar en cuanto a apariencia y densidad de células de microglía marcadas con FG a las retinas de los animales con sección simple del NO o a las de los animales tratados subcutáneamente con PBS, y que se habían analizado tras el mismo periodo de supervivencia.

Las retinas experimentales de los animales que habían recibido dosis repetidas del inhibidor irreversible de la caspasa 3, el **Z-DEVD-cmk**, y que se habían analizado a los 7 días de la sección del NO (Fig. 59), se encontraban menos pobladas de células de microglía fagocítica marcadas con FG que las retinas experimentales de los animales a los que tan solo se les había seccionado el NO o de aquellos que habían recibido intravítreamente PBS+DMSO, y que habían sido analizados tras el mismo periodo de supervivencia. Además, las retinas experimentales de los animales tratados con Z-DEVD-cmk y analizadas 14 días después de la sección del NO (Fig. 60) presentaban una densidad menor de células

de microglía marcadas con FG que las retinas de los animales con sección simple del NO o de aquellos tratados intravítreamente con PBS, y que se habían analizado tras el mismo periodo supervivencia.

En los animales a los que se había administrado intravítreamente **NGF** y que se analizaron a los 7 y 14 días de la sección del NO (Figs. 63 y 64) se observó que las retinas experimentales estaban sensiblemente más pobladas de células de microglía marcadas con FG que en cualquiera de los otros grupos.

En las retinas experimentales de los animales tratados con **PIH+NT3** y que se analizaron a los 7 días de la sección del NO observamos una población más numerosa de células de microglía marcadas con FG (Fig. 61) que las retinas con sección simple del NO analizadas tras el mismo periodo de supervivencia (Fig. 62).

5. DISCUSIÓN

Las células de microglía son un tipo de células gliales del SNC que intervienen en numerosos procesos lesivos e inflamatorios, desempeñando en los mismos diversas funciones. Se ha documentado que las células de microglía del SNC fagocitan los desechos de las neuronas muertas a consecuencia de la lesión (del Río-Hortega, 1932; Thanos, 1991; Thanos y cols., 1992; Kacza y Seeger, 1997; rev. Thanos y cols., 1994). Esta función de las células de microglía es la primera que se describió para estas células (del Río-Hortega, 1932), pero se postula que no es la única. Así, Thanos y cols. (1993; rev. 1995) postulan que las células de microglía intervienen más activamente en la muerte de las neuronas tras la lesión y han documentado que, si tras la sección del NO de la rata, se administran inhibidores de proteasas (enzimas producidos por las células de microglía y que estos autores postulan que intervienen en la degradación de las CGR tras la sección del NO) o se impide la activación de las células de microglía inyectando intravítreamente el péptido inhibidor de macrófagos MIF, se produce un aumento en la supervivencia de las CGR. Además, cuando se administra intravítreamente el Factor Estimulante de Macrófagos (Macrophage Stimulating Factor, MSF) se produce una disminución en la supervivencia de las CGR de la rata tras la sección del NO (Thanos y cols., 1993). Otro hecho que apoya también la intervención activa de las células de microglía en la muerte de las neuronas lesionadas es su capacidad para producir sustancias citotóxicas, que podrían tener efectos negativos para la supervivencia neuronal (Giulian y Baker, 1986; Colton y Gilbert, 1987; Sawada y cols., 1989; Giulian y cols., 1990; Boje y Arora, 1992; Chao y cols., 1992; Lipton, 1992; Epstein y Gendelman, 1993; Morioka y cols., 1993; Nomura y Kitamura, 1993; Gherman y cols., 1995; Li y cols., 1996; rev. Meldrum y Garthwaite, 1990).

En este trabajo hemos investigado la respuesta de las células de microglía de la retina de la rata adulta después de la sección del NO. Hemos elegido la retina de la rata porque:

- 1) Pueden realizarse montajes globales de la retina que permiten su análisis al microscopio.
- 2) El NO de la rata en su porción intraorbitaria es de fácil acceso y no contiene la arteria central de la retina, por lo que podemos seccionarlo sin interrumpir la circulación retiniana (Richardson y cols., 1992; Barron y cols., 1986; Thanos, 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988; Villegas-

Pérez y cols., 1993).

- 3) Las CGR, que son las células que van a degenerar tras la sección del NO, pueden marcarse mediante la aplicación de FG (Schmued y Fallon, 1986; del Cerro y cols., 1990) en ambos colículos superiores, territorios de proyección de las mismas (Linden y Perry, 1983). Esta técnica de marcaje permite la cuantificación de la totalidad de las CGR (Schmued y Fallon, 1986; del Cerro y cols., 1990; Peinado-Ramón y cols., 1996).
- 4) Las células de la retina y en especial las CGR, que son las que se sitúan más internamente en la retina, pueden tratarse mediante la aplicación de sustancias en el vítreo.

5.1 CÉLULAS DE MICROGLÍA MARCADAS CON NDPASA

En la retina de mamífero adulto no lesionada, las células de microglía se encuentran en un estado de aparente inactividad recibiendo el nombre de microglía ramificada o residente (López-Enríquez, 1926; Terubayashi y cols., 1984; Vrabec, 1970; Gallego, 1976; Boycott y Hopkins, 1981; Schnitzer, 1989). Para el marcaje de la población de células de microglía residente en la retina de la rata hemos empleado la técnica enzimohistoquímica de la NDPasa (Novikoff y Goldfischer, 1961; Murabe y Sano, 1982a), que reconoce dicho enzima en la membrana de las células de microglía y que, por ello, es específica para estas células, aunque también marca en la retina las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Este tipo de marcaje nos permite: identificar las células de microglía, estudiar su distribución en la retina e investigar los cambios que se producen en esta población de células de microglía residente en respuesta a la lesión, como han documentado otros autores en diversos mamíferos (Barron y cols., 1986; Schnitzer, 1989; Schnitzer y Scherer, 1990; Humphrey y Moore, 1996b). En nuestro estudio hemos empleado como sustrato del enzima la citidina 5' difosfato, coincidiendo con los autores anteriormente citados. Otros autores (Sanyal y de Ruiter, 1985) empleando como sustrato del enzima la inosina difosfato, obtuvieron un marcaje similar. Se postula que la actividad NDPasa exhibida por las células de microglía es un reflejo de la capacidad fagocítica de las mismas (Schnitzer y Scherer, 1990), y que las células de microglía son capaces de regular la actividad de este enzima al variar su estado de activación tras la lesión. Por ello, se ha sugerido que un incremento en la intensidad del marcaje NDPasa en las células de microglía puede ser reflejo de un incremento en su actividad fagocítica.

5.1.1 CÉLULAS DE MICROGLÍA MARCADAS CON NDPASA EN LA RETINA DE LOS ANIMALES CONTROLES

En nuestro estudio, observamos que en las retinas izquierdas y derechas del grupo en el que no se había realizado técnica quirúrgica alguna, así como en las retinas controles o derechas del grupo en el que se había llevado a cabo sección simple del NO izquierdo, existían células de microglía residente NDPasa+ distribuidas en CFN, CCG, CPI y CPE, con diferentes morfologías.

Las células de microglía NDPasa+ observadas en **CFN** presentaban morfología claramente bipolar, y se distribuían paralelamente a la trayectoria de los axones de las CGR; además, su densidad disminuía paulatinamente desde la zona central próxima a papila hasta la periferia. Estos resultados concuerdan con los descritos por Schnitzer (1989), Schnitzer y Scherer, (1990) y Humphrey y Moore, (1995) en la retina de conejo, empleando la misma técnica de marcaje. Además, Sanyal y de Ruiter (1985) y Terubayashi y cols (1984), empleando también técnicas enzimohistoquímicas (ID Pasa y TPPasa respectivamente), documentaron la presencia de células de microglía NDPasa+ en la CFN de secciones de retina de rata adulta

En la **CCG** y **CPI** encontramos células NDPasa+ de morfología ramificada, distribuidas en las dos capas formando un mosaico regular, en el que cada célula ocupaba un dominio delimitado en el cual no penetraban los procesos de las células circundantes. La existencia de células de microglía NDPasa+ en estas dos capas había sido documentada ya por otros autores en secciones de retina de rata adulta (Sanyal y de Ruiter, 1985). Además, la delimitación del territorio celular había sido descrita anteriormente por otros autores en retina de rata adulta (Terubayashi y cols., 1984; Ashwell y cols., 1989; Thanos y cols., 1992), en retina de conejo (Schnitzer y Scherer, 1990) y en retina de hombre (Penfold y cols., 1991).

La densidad de células de microglía NDPasa+ en CCG y CPI de las retinas izquierdas y derechas del subgrupo I.1 (grupo control), al igual que ocurría en las retinas controles del subgrupo I.2 (ver apartado 5.1.2), variaba de un animal a otro. Schnitzer y Scherer (1990) habían documentado cierta heterogeneidad en las densidades de células de microglía NDPasa+ de la CPI entre distintos animales cuando estudiaban la retina de conejo adulto, lo que ha hecho postular que la densidad de células de microglía ramificada de la retina puede ser un rasgo fenotípico de cada animal.

Las células de microglía NDPasa+ de la **CPE** tenían morfología estrellada, con procesos ramificados que se situaban en el mismo plano del cuerpo celular, y que se relacionaban estrechamente con los vasos sanguíneos. Hemos observado la presencia de estas células en la mayor parte de las retinas analizadas en todos los animales estudiados, si bien algunas zonas de las retinas analizadas parecían carecer de células en esta capa. Schnitzer (1989) no pudo documentar la existencia de células de microglía NDPasa+ en la CPE de la retina de conejo adulto. Sin embargo, otros autores (Sanyal y de Ruiter, 1985; Schnitzer y Scherer, 1990; Humphrey y Moore, 1996) han documentado la existencia de células marcadas con esta técnica en la retina de rata y conejo adultos, si bien la densidad de células encontradas por estos últimos autores en esta capa era escasa. Schnitzer y Scherer (1990) explican la variabilidad en el marcaje de esta capa postulando que la causa puede ser la baja actividad NDPasa de estas células en la CPE de la retina intacta. El hecho de que en nuestro estudio, tanto en las retinas controles como en las experimentales, las zonas de retina donde no pudimos encontrar células NDPasa+ en esta capa coincidieran habitualmente con aquellas que tenían un marcaje más tenue de las células de microglía NDPasa+ situadas en CCG y CPI que el observado en el resto de la retina, nos llevan a postular que la ausencia de marcaje no obedece realmente a una ausencia de células, ni, al menos en su totalidad, a una menor actividad NDPasa de las células de microglía localizadas en esta capa, sino más bien a una dificultad de penetración del marcaje en algunas zonas de la retina. Intentamos potenciar la penetración de los reactivos en la CPE aumentando el tiempo de incubación o incrementando la concentración del sustrato, pero en ambos casos se producía un incremento en el marcaje de los vasos sanguíneos y de las células situadas en otras capas, que impedía la visualización de la CPE.

Además de la heterogeneidad en el marcaje de la CPE en una misma retina, observamos que también existían diferencias en la densidad de células de microglía entre las retinas controles de los animales de un mismo grupo, aunque no realizamos análisis cuantitativo de esta capa. Esta heterogeneidad en las densidades de células de microglía NDPasa+ de la CPE entre animales había sido descrita por otros autores (Humphrey y Moore, 1995) entre retinas de conejos de distintas razas.

5.1.2 CÉLULAS DE MICROGLÍA MARCADAS CON NDPASA DESPUÉS DE LA SECCIÓN DEL NO

Tras la sección del NO, en las retinas experimentales o izquierdas se

producía un incremento tanto en la densidad de células NDPasa+ como en la intensidad del marcaje, al menos en las siguientes capas: CFN, CCG y CPI.

Así, en la **CFN** de las retinas experimentales analizadas siete días después de la sección del NO aparecían unos cordones radiales intensamente marcados. Pensamos que estos cordones eran consecuencia del incremento en el marcaje y en la densidad de las células de microglía NDPasa+ bipolares, y que estaban formados por un elevado número de estas células, que se situaban a lo largo de la trayectoria de los axones de las CGR, y que se unían estrechamente entre sí por los polos de sus somas. Otros autores han descrito un incremento en la intensidad del marcaje y en la densidad de las células de microglía en la retina de conejo (Schnitzer y Scherer, 1990), dos días después de la sección del NO. En nuestro estudio hemos observado que esto sucede a partir del día séptimo de la lesión, en concordancia con los resultados obtenidos por Humphrey y Moore (1996) quienes provocaban una lesión localizada de la retina de conejo fotocoagulando la misma con láser (en este caso la reacción microglial se circunscribe a la zona próxima a la lesión). Sin embargo, como no hemos analizado animales antes de los siete días, no sabemos si el incremento en la densidad y el marcaje de las células de microglía NDPasa+ en esta capa se produce en la rata antes de los siete días o desde el séptimo día tras la sección del NO.

Tanto el incremento en el marcaje, debido al aumento en la actividad NDPasa de la membrana celular, como en la densidad de las células de microglía de esta capa, son reflejo de una activación microglial que podría estar relacionada con la transformación de estas células en fagocíticas, como han postulado otros autores (Schnitzer y Scherer, 1990). Así, algunos autores han documentado que las células de microglía comienzan a fagocitar a las neuronas degeneradas tras la sección del NO a los siete u ocho días de la lesión (Barron y cols., 1986; Thanos, 1991a; Kacza y Seeger, 1997), por lo que el incremento en el marcaje NDPasa en la CFN documentado en este estudio en el día séptimo de la lesión podría relacionarse con la transformación de las células de microglía en células fagocíticas.

Tras la sección del NO, en la **CCG** y **CPI** se produjo un aumento en el marcaje y un incremento en la densidad de células de microglía NDPasa+, siendo este último significativo en todos los periodos de tiempo en que se analizaron las retinas después de la sección del NO. Además, se observó un sensible acortamiento de los procesos de las células NDPasa+ ramificadas residentes en estas dos capas, lo que debe contribuir al mantenimiento del mosaico regular, de forma que las células cercanas siguen sin sufrir solapamientos entre sus procesos. Estos hallazgos

concuerdan con los realizados por otros autores en la CPI de retina de conejo tras la sección del NO (Schnitzer y Scherer, 1990) y tras fotocoagulación con láser (Humphrey y Moore, 1996) y en la CCG y CPI de la retina de rata tras aplastamiento del NO (Thanos, 1991a; rev. Thanos y cols., 1994). Schnitzer y Scherer (1990) observaron que la intensidad del marcaje y la densidad de células de microglía se incrementaban en CPI de retina de conejo a partir del cuarto día tras la sección del NO. Sin embargo, Humphrey y Moore (1996), tras provocar una fotocoagulación focal en retina de conejo adulto, documentaron cambios en la intensidad del marcaje y la densidad de las células de microglía de la CPI a partir de las dos horas de producida la lesión, circunscribiéndose dicha respuesta a las zonas próximas a la lesión. En nuestro estudio no hemos analizado retinas antes de los siete días de la sección del NO por lo que no podemos saber cuándo comienzan a producirse los incrementos en el marcaje y en la densidad celular en la CCG y CPI, así como el acortamiento de los procesos de las células de microglía NDPasa+.

Además de que la densidad de células de microglía NDPasa+ en la CCG y CPI era mayor en las retinas izquierdas o experimentales después de la sección del NO que en las retinas contralaterales o controles, observamos que parecía existir una relación entre la densidad de células NDPasa+ de esta capa en las retinas controles o derechas y las densidades de estas células en las retinas experimentales o izquierdas, de forma que a mayor densidad en retina derecha, mayor densidad se observaba en retina izquierda. Esto nos hace postular que la densidad de células de microglía residentes en retina de rata así como los cambios que sufren las mismas tras la sección del NO pueden ser rasgos característicos de cada animal. De la misma manera, hemos observado diferencias en la intensidad del marcaje tras la sección del NO entre retinas de animales diferentes, aunque hubieran sido analizados tras el mismo periodo de supervivencia. Esta heterogeneidad en el marcaje y densidad de las células de microglía NDPasa+ entre distintos animales después de la lesión había sido observada por otros autores, y así, Humphrey y Moore (1996) fotocoagulando con láser las retinas de conejos de distintas razas, encontraron diferencias en la densidad e intensidad de marcaje de las células de microglía NDPasa+ entre las distintas razas, postulando estos autores que dichas diferencias podrían relacionarse con la individualidad de cada animal en cuanto al número de células de microglía NDPasa+ residente y a los cambios que las mismas sufren en el marcaje y la densidad tras la lesión.

El hecho de que, tras la sección del NO se mantenga la distribución de las células formando un mosaico regular sin solapamientos entre los procesos, se ha

postulado que es debido a fenómenos de inhibición por contacto, en los cuales pueden intervenir enzimas proteolíticos producidos por las células de microglía antes y después de ser activadas por las CGR que degeneran tras la lesión, y que permiten la delimitación del territorio ocupado por cada célula de microglía (Giulian y cols., 1986; Giulian, 1990; Thanos, 1991a). No sabemos por qué es necesario el mantenimiento de los territorios de proyección entre estas dos capas y dentro de la misma capa, y por qué no ocurre así en la CFN, pero podría estar relacionado con la fagocitosis de cuerpos celulares en la CCG, frente a la de los axones en la CFN, o a la posibilidad de que las células de la CCG y la CPI tengan otras funciones diferentes a las células que se localizan en la CFN.

Debido a la variabilidad en la intensidad del marcaje de las células de microglía NDPasa+ en la **CPE**, no nos atrevemos a afirmar que existiera un incremento en la actividad NDPasa de las células de microglía en esta capa tras la sección del NO, como ha sido descrito por otros autores en retina de conejo tras la misma lesión o tras fotocoagular la retina con láser (Schnitzer y Scherer, 1990; Humphrey y Moore, 1996).

5.1.3 CÉLULAS DE MICROGLÍA MARCADAS CON NDPASA DESPUÉS DE LA SECCIÓN DEL NO E INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE DIFERENTES SUSTANCIAS

5.1.3.1 Células de microglía NDPasa+ en las retinas derechas o controles

En los animales a los que se les había realizado una punción del globo ocular izquierdo, con o sin inyección de BDNF, MIF, NGF, NT3 o el vehículo tras la sección del NO, observamos que la densidad de células de microglía NDPasa+ en la **CCG** y **CPI** de las retinas controles o derechas era significativamente mayor que las obtenidas en las retinas derechas o controles de los animales en los que se había llevado a cabo sección simple del NO izquierdo. Estos resultados nos hacen postular que existe una cierta comunicación entre las células de microglía NDPasa+ de las retinas lesionadas y las de sus correspondientes retinas contralaterales o controles, que hace que aumente la densidad de células de microglía NDPasa+ en las retinas contralaterales tras la punción.

5.1.3.2 Células de microglía NDPasa+ en las retinas experimentales de los animales con sección del NO e inyecciones intravítreas

El análisis de las retinas experimentales de este grupo, mostró diferencias en los cambios en intensidad de marcaje y densidad de las células de microglía

NDPasa+ residentes en las distintas capas de la retina de la rata adulta tras la sección del NO en aquellos grupos de animales en los cuales se administró en vítreo BDNF, NT3 o MIF, mientras que en los grupos de animales en los que se llevó a cabo punción simple, o en aquellos tratados con vehículo o NGF, los cambios observados en las retinas experimentales tras la lesión fueron similares al grupo en el que se llevó a cabo sección simple del NO.

5.1.3.2.1 Células de microglía NDPasa+ en las retinas de los animales tratados con BDNF

En los animales tratados con BDNF, si bien a los siete días de la sección del NO se observó un incremento de la densidad de las células de microglía NDPasa+ de morfología bipolar en la **CFN**, los cordones de células bipolares intensamente marcados no se veían hasta catorce días después de la sección del NO, mientras que en los animales con sección simple del NO y en aquellos que habían recibido punción simple o tratamiento con el vehículo, dichos cordones aparecían a los siete días de la lesión. La menor activación de las células de microglía NDPasa+ de la CFN observada a los siete días de la lesión en las retinas tratadas con BDNF, podría estar relacionada con el efecto neuroprotector transitorio del BDNF sobre las CGR de rata tras la sección del NO documentado por otros autores (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; DiPolo y cols., 1998) y confirmado en este estudio (ver apartado 4.1.2.1.2 de Resultados).

Algo similar se observó en los incrementos de densidad de las células de microglía NDPasa+ de la **CCG** y **CPI** en los animales tratados con BDNF. Así, en estas dos capas el incremento de la densidad las células de microglía siete días después de sección del NO era menor que el observado tras el mismo periodo de supervivencia en las retinas con sección simple del NO, o en aquellas tratadas con el vehículo o con punción simple, y aumentaba a los catorce y a los treinta días de la lesión, llegando tras este último intervalo a un incremento del 36% en la densidad de células de microglía NDPasa+, similar al obtenido en las retinas analizadas siete días después de la sección del NO y punción simple o administración de vehículo (30%) y diez días después de la sección simple del NO (35%). Así mismo, las retinas de los animales tratados con BDNF y analizados siete días después de la sección del NO presentaban un marcaje de las células de microglía en la CCG y CPI más tenue que las retinas de los animales analizados catorce o treinta días después de la lesión. Estas diferencias observadas en la intensidad del marcaje y en la densidad de células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI de las retinas de los animales tratados con BDNF podrían estar relacionadas nuevamente con el efecto neuroprotector transitorio

del BDNF sobre las CGR tras la sección del NO.

Como a los siete días de la sección del NO no se produce muerte de CGR en la retina de los animales tratados con BDNF (Peinado-Ramón y cols., 1996; apartado 4.1.2.1.2 de los Resultados), el hecho de que en las retinas experimentales marcadas con la NDPasa y tratadas con BDNF se produzca a los siete días de la sección del NO un pequeño incremento en la densidad de células de microglía bipolar NDPasa+ de la CFN y un aumento significativo en la densidad de células de microglía NDPasa+ de las CCG y CPI a los siete días de la sección del NO, nos indica que las células de microglía NDPasa+ de CFN, CCG y CPI se activan antes de que ocurra muerte de CGR. Estos resultados documentan que puede existir una activación inicial débil de las células de microglía NDPasa+ de la retina de rata como consecuencia de la sección del NO y/o la administración intravítrea de BDNF, independiente de la muerte o supervivencia de las CGR, y que la muerte de las CGR que se produce después de la primera semana tras seccionar el NO en las retinas experimentales tratadas con BDNF daría lugar a una activación más intensa de las células de microglía NDPasa+ que se traduciría en un mayor incremento en el marcaje y en la densidad de las citadas células, al menos a partir de las dos semanas de la lesión.

5.1.3.2.2 Células de microglía NDPasa+ en las retinas de los animales tratados con NT3

En la **CFN** de los animales que recibieron inyecciones intravítreas de la NT3 observamos que el incremento en la intensidad del marcaje de las células microgliales NDPasa+ siete días después de la sección del NO era menor que el observado en los animales con sección simple del NO, o en aquellos que habían recibido punción simple o tratamiento con el vehículo, y posiblemente –pues no realizamos el análisis cuantitativo- menor incremento de la densidad de las células en esta capa. En estas retinas, este menor incremento en el marcaje y la densidad de las células de microglía NDPasa+ de la CFN no puede relacionarse con un aumento en la supervivencia de las CGR tras la administración de la NT3, como hemos indicado con el BDNF, ya que se ha documentado que esta NT no modifica significativamente la supervivencia de las CGR tras la sección del NO (Peinado-Ramón y cols., 1996). Por tanto, el menor incremento en la densidad y en el marcaje de las células de microglía NDPasa+ de la CFN de la retina de la rata adulta a los siete días de la sección del NO tras la administración de la NT3 documentado en nuestro estudio puede ser debido a un discreto efecto inhibitor de dicha NT sobre la

activación de las células microgliales.

Diversos autores han documentado *in vitro* la expresión de la NT3 y su receptor específico TrKC en las células de microglía de cerebro de rata post-natal (Elkabes y cols., 1996; Nakajima y cols., 1998). Por otra parte, cuando se produce lesión inflamatoria con lipopolisacárido en cultivos de células de microglía de cerebro de rata post-natal, se produce un aumento de la expresión del receptor TrKC en dichas células (Elkabes y cols., 1998). Además, la mayor parte de los efectos de la NT3 documentados sobre las células de microglía son efectos activadores, y siempre sobre poblaciones de células de cerebro en desarrollo (Elkabes y cols., 1996). También se ha documentado que la NT3, junto con otras NTs, induce *in vitro* cambios bioquímicos en las células de microglía del hipocampo de rata neo-natal, y que estos efectos pueden ser mediados por el receptor p75 o por el TrKC, ya que ambos se expresan en dichas células (Newmann y cols., 1998).

En contra de los documentados efectos activadores de la NT3 sobre las células de microglía de cerebro de rata en desarrollo, los resultados de nuestro estudio documentan que la NT3 induce una disminución tanto en la intensidad del marcaje como en el incremento de la densidad de células de microglía NDPasa+ de la CFN de la retina de la rata adulta a los siete días de la sección del NO. Este efecto podría indicar una inactivación parcial de la respuesta de dichas células de microglía a la lesión, aunque podría tratarse tan solo de una ralentización en los cambios de densidad y de intensidad del marcaje observados en las células de microglía NDPasa+ tras la sección del NO, inducida por la administración intravítrea de la NT3.

Las densidades de células de microglía NDPasa+ en **CCG y CPI** de los animales tratados con la NT3 fueron siempre significativamente mayores en las retinas izquierdas o experimentales que en las derechas o controles, siendo los porcentajes de aumento de la densidad muy similares a los encontrados en el grupo de animales tratados con vehículo o con punción simple. Así, el incremento en la densidad de células de microglía NDPasa+ en estas dos capas era mayor a los siete días de la lesión tras la administración de NT3 (32%) que tras la sección simple del NO (24%), la administración de BDNF (11%), la administración de MIF (18%) y la administración de NGF (19%), y similar a la observada en el grupo tratado con vehículo o con punción simple (30%). Además observamos que, contrariamente a lo que ocurría en el subgrupo tratado con BDNF, las densidades de células de microglía en estas capas tras siete, catorce y treinta días de supervivencia, cuando eran comparadas consecutivamente, no eran significativamente diferentes, lo que nos indica que la activación microglial en este grupo se debe producir durante la primera

semana después de la lesión y que posteriormente los efectos del incremento en la muerte de CGR induciría cambios poco significativos en los incrementos de densidad y marcaje de las células de microglía NDPasa+ de la CCG y la CPI tras la lesión. Estos resultados podrían estar relacionados con la ausencia de capacidad neuroprotectora de la NT3 sobre las CGR (Peinado-Ramón y cols., 1996) frente a los documentados efectos neuroprotectores del BDNF sobre las mismas células.

Puesto que en los animales tratados con la NT3 la densidad de células de microglía NDPasa+ de la CFN aumenta más lentamente que en otros grupos, mientras que la densidad de células de microglía en CCG y CPI lo hace más rápidamente que en otros grupos, podría ocurrir que las células de microglía de estas tres capas respondieran de forma diferente a la NT3. Aunque se ha documentado que las células de microglía expresan receptores p75 y TrKC, no sabemos si existe cierta heterogeneidad en dicha expresión, al igual que existe en la expresión de la NT3 por parte de las células de microglía, como han documentado Miwa y cols. (1997).

5.1.3.2.3 Células de microglía marcadas con NDPasa en las retinas de los animales tratados con MIF

En el grupo de animales tratados con MIF los cambios observados en las células de microglía NDPasa+ de la **CFN** tras la lesión fueron similares a los observados en el grupo de animales con sección simple del NO, es decir, se observaban cordones de células bipolares intensamente marcados a partir de siete días de la sección del NO.

Sin embargo, en las retinas experimentales de los animales tratados con MIF la densidad de células de microglía NDPasa+ en la **CCG** y **CPI** aumentó significativamente respecto a la de sus correspondientes retinas derechas o controles tan solo a partir de los catorce días de la sección del NO, siendo, además, este incremento de densidad inferior al observado en el grupo de animales con sección simple del NO, en todos los intervalos de supervivencia analizados, o en aquellos animales que habían recibido pinchazo simple o tratamiento con el vehículo y que se habían analizado siete días después de la sección del NO.

5.2 RETINAS DE LOS ANIMALES MARCADOS CON FLUOROGOLD

5.2.1 RETINAS CONTROLES

En nuestro estudio, en las retinas derechas o controles del grupo II.1 observamos células con el aspecto típico de CGR marcadas con FG (Schmued y Fallon, 1986; Del Cerro y cols., 1990; Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés y cols., 1996), cuya densidad disminuía desde el disco óptico hasta la periferia.

En estas retinas derechas o controles, en algunas ocasiones observamos alguna célula marcada con FG con la morfología típica de célula de microglía, fundamentalmente en las retinas analizadas tras catorce días de la sección del NO. Estas células marcadas nos indican que se ha producido muerte de alguna CGR marcada con FG. Ya que en estos animales se había seccionado el NO izquierdo, no esperábamos encontrar muerte en las retinas derechas. Sin embargo, se ha documentado que, en la rata, el 1% de las CGR proyectan su axón en la retina contralateral a través del quiasma óptico (Müller y Hollander, 1988) y por lo tanto, su axón sería lesionado por la sección del NO contralateral y podría degenerar y morir. Sin embargo, para que esta muerte produjera el marcaje de las células de microglía encargadas de fagocitar los desechos de las CGR muertas sería necesario que las neuronas que proyectan en la retina contralateral proyectaran también en CS, de forma que se marcaran con FG. Müller y Hollander (1988) investigaron si estas CGR de la rata adulta que envían sus axones a la retina contralateral proyectaban colateralmente en CS pero no pudieron documentarlo. Sin embargo, el hecho de que en nuestro estudio observemos células de microglía marcadas con FG en la retina contralateral a la sección del NO sugiere que las CGR que proyectan en la retina contralateral envían proyecciones colaterales al CS, aunque también es posible que sea la aplicación de FG en CS lo que produce muerte de algunas CGR.

5.2.2 RETINAS DE LOS ANIMALES CON SECCIÓN DEL NO IZQUIERDO

Tras la sección del NO, en las retinas izquierdas o experimentales del subgrupo II.1 se observaron dos tipos celulares diferentes marcados con FG: un tipo celular con la morfología típica de CGR, y otro con morfología diferente y que identificamos como células microgliales que se habían marcado tras fagocitar los desechos de las CGR muertas. Estas células microgliales ya habían sido descritas por otros autores tras seccionar el NO de la retina de rata adulta (Thanos 1991a y b; Thanos y cols., 1992, 1993), empleando otros trazadores neuronales. Dichos autores identificaron como células de microglía a las células que habían fagocitado los

desechos neuronales empleando técnicas específicas para el marcaje de las mismas (Thanos, 1991a; Thanos y cols., 1992).

5.2.2.1 Células ganglionares en las retinas de los animales con sección del NO

Tras la sección del NO, en las retinas izquierdas o experimentales observamos una disminución de la densidad de CGR marcadas con FG, tanto en las retinas analizadas a los siete días, como en las analizadas catorce días después de la sección del NO. Además, observamos que la densidad de CGR marcadas con FG en las retinas experimentales de los animales de este grupo II.1 descendía a medida que aumentaba el periodo de supervivencia. Así, en los animales analizados siete días después de la sección del NO la densidad de CGR descendió hasta un 60% del valor control, mientras que en los analizados tras catorce días, la densidad de CGR supervivientes se redujo hasta un 12% del valor control. Estas observaciones concuerdan con las expuestas por otros autores empleando este mismo marcador (Peinado-Ramón y cols., 1996), u otro trazador neuronal fluorescente (Villegas-Pérez y cols., 1988; 1993), e indican que se produce muerte de CGR entre estos dos periodos de supervivencia.

5.2.2.2 Células de microglía fagocítica en las retinas de los animales con sección del NO

En las retinas izquierdas de los animales marcados con FG y a los cuales se les había seccionado el NO del ojo izquierdo, la densidad de células de microglía marcadas con FG en la CCG a los siete días era de 358 ± 26 células/mm². Esta densidad aumentaba hasta 566 ± 30 células/mm² catorce días después de la sección del NO. Por tanto, la población de células de microglía fagocítica marcadas con FG aumentaba entre los siete y los catorce días después de la lesión. Esta observación concuerda también con las realizadas por Thanos (1991b) y Thanos y cols. (1992), quienes documentaron que la densidad de células microgliales marcadas con el trazador neuronal fluorescente 4Di-10ASP aumentaba tras la sección del NO a medida que lo hacía el intervalo de supervivencia. Sin embargo, las densidades medias encontradas a las dos semanas de la lesión eran mayores en nuestro estudio (566 ± 30 células/mm²) que en el de Thanos (1992) (490 ± 45 células/mm²). Las discrepancias entre las densidades de células microgliales obtenidas en los dos estudios podrían ser consecuencia del diferente trazador neuronal utilizado o de las diferentes áreas de retina analizadas.

Por otra parte, en las retinas izquierdas o experimentales observamos células

de microglía fagocítica marcadas con FG en la CPI desde el séptimo día tras la sección del NO, y la densidad de células de microglía en esta capa aumentaba a los catorce días de la sección del NO. Sin embargo, Thanos y cols. (1992) documentaron la aparición de células de microglía fagocítica en CPI a partir del decimocuarto día. No sabemos si esta discrepancia en los resultados es fruto nuevamente del diferente trazador neuronal empleado por dichos autores.

En las retinas izquierdas o experimentales parecía existir una relación directa entre las densidades de CGR supervivientes y las densidades de células de microglía marcadas con FG, ya que la densidad de células de microglía aumentaba a medida que disminuía la densidad de CGR. El estudio de esta relación mediante líneas de regresión nos indicaba que existía una relación directa entre las densidades de CGR supervivientes y las densidades de células de microglía marcadas con FG en las retinas analizadas a los siete días de la sección del NO, pero no en las retinas analizadas catorce días después de la lesión. Estos resultados podrían estar relacionados con los hallazgos de una densidad máxima de cuerpos apoptóticos a los siete días de la sección del NO (Isenmann y cols., 1997) y con una degradación variable de los desechos fagocitados por las células de microglía entre los siete y los catorce días de la sección del NO, que no permitiría ver a los catorce días de la sección del NO la totalidad de las células de microglía que han fagocitado CGR y tampoco el número de células de microglía que hubiesen fagocitado CGR 7 y 14 días después de la sección del NO porque una proporción de éstas hubiese eliminado ya los cuerpos fagocíticos que contenían el FG .

Las células de microglía fagocítica en las retinas experimentales tras seccionar el NO se distribuían por toda la retina, variando su morfología según la zona de la retina estudiada. Así, en las proximidades del disco óptico se observaban células de microglía fagocítica de morfología claramente bipolar localizadas en la CFN, que se disponían radialmente, siguiendo la trayectoria de los axones de las CGR. Estas células de microglía bipolar posiblemente se marquen al fagocitar los axones de las CGR. Estas observaciones concuerdan con las realizadas por Thanos (1991b, 1992) que refirió la presencia de células de microglía fagocítica aisladas en CFN, empleando también trazadores neuronales fluorescentes, postulando que estas células fagocitaban los axones de las neuronas degeneradas.

Además, también a partir del disco óptico encontramos células de microglía marcadas con FG aparentemente bipolares, pero no dispuestas radialmente, así como células con morfologías de soma variadas, aunque escasamente ramificadas, que eran más visibles a partir de zonas intermedias de la retina, donde en algunas

ocasiones adquirirían morfología más ramificada. Estas células se localizaban en la CCG y, dado que en la retina de rata la CFN y la CCG están muy juntas, las células de microglía marcadas con FG que se localizan en ambas capas pueden ser observadas simultáneamente al microscopio de fluorescencia sin variar el enfoque. Las células de microglía fagocítica de la CCG que se disponían aparentemente de forma aleatoria eran menos abundantes que en la CFN, y sus cuerpos celulares se localizaban en muchos casos adyacentes a los somas de las CGR, por lo que interpretamos que se encargaban de fagocitar los cuerpos celulares de las neuronas degeneradas. Además, se podían observar en ocasiones una o varias células de microglía marcadas con FG alrededor de una o varias CGR. Estas observaciones se oponen a las referidas por Thanos (1991a), quien documentó que tras la sección del NO las células de microglía fagocítica de la CCG no sufrían solapamientos entre sí, y se distribuían siguiendo un mosaico regular, en el que cada célula respetaba el territorio de las células vecinas. Nuestros resultados sugieren que algunas células de microglía migran para fagocitar a algunas CGR, volviendo posteriormente a ocupar su lugar en el mosaico de las células de microglía. Sin embargo, en las retinas del grupo anterior, grupo I, en el que habíamos marcado las retinas mediante la técnica de la NDPasa, ni hemos observado espacios libres en el mosaico de células ramificadas de la CCG, ni hemos visto agrupaciones de células de microglía NDPasa+ ramificadas. Por tanto, estos resultados sugieren que la técnica de la NDPasa no marca a todas las células de microglía de la retina y en particular puede no marcar a las células de microglía cuando están fagocitando a las CGR.

También observamos células marcadas con FG con aspecto típico de células de microglía en la CPI de las retinas experimentales tras la sección del NO. En esta capa, las células de microglía marcadas con FG eran escasas y aparentemente tenían un tamaño mayor y presentaban más ramificaciones que las células de microglía de la CCG. Pensamos que esta última observación puede ser consecuencia del escaso número de células de microglía fagocítica en esta capa, que permitiría una mejor observación de los procesos y del cuerpo celular de las células de microglía marcadas con FG en la misma. Además, hemos observado que las células de microglía fagocítica marcadas con FG de la CPI no solapaban sus procesos con los de las células de microglía de la CCG después de la sección del NO, hecho que también ha sido documentado por Thanos (1991a).

Los resultados expuestos anteriormente documentan que la sección del NO induce la muerte de las CGR y, a consecuencia de ello, la transformación de al menos una parte de la población de células de microglía de la retina de la rata adulta

en células de microglía fagocítica que se encargan de eliminar los desechos de las CGR degeneradas. Las células de microglía situadas en la CFN se encargarían de fagocitar los axones de las CGR, mientras que las localizadas en CCG y CPI fagocitarían los somas de dichas células. Sin embargo, como el número de células de microglía marcadas con FG después de la sección del NO es mucho mayor en la CFN que en la CCG, es posible que las células de microglía de la CFN contribuyan también a la fagocitosis de las CGR.

5.2.3 RETINAS DE LOS ANIMALES CON SECCIÓN DEL NO IZQUIERDO E INYECCIONES INTRAVÍTREAS O SUBCUTÁNEAS

En el subgrupo II.2, en el que se realizó sección del NO izquierdo y administración intravítrea de diversos factores en el ojo izquierdo, o administración subcutánea, observamos diferencias en las densidades de CGR y de las células de microglía marcadas con FG dependiendo de la sustancia inyectada.

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales de este grupo observamos que, independientemente del producto administrado, existía una relación entre las densidades de células de microglía fagocítica y los porcentajes de CGR muertas como consecuencia de la lesión. Esta relación fue significativa a los siete días de la sección del NO, mientras que no lo fue catorce días después de la lesión, al igual que ocurría en el subgrupo experimental II.1 (ver apartado 5.2.2.2 de esta Discusión).

A continuación pasamos a discutir los resultados de las CGR y las células de microglía de las retinas experimentales tras la sección del NO y administración de distintos factores.

5.2.3.1 Retinas de los animales tratados con BDNF

5.2.3.1.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con BDNF

La apariencia de las retinas experimentales de los animales tratados con BDNF y analizadas siete días después de la sección del NO era idéntica a la de los ojos controles, tanto en la morfología y la densidad de las CGR como en la escasez de células de microglía fagocítica. Así, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de CGR de estas retinas y las de sus

correspondientes controles, lo que indica que no se produce muerte significativa de CGR siete días después de la sección del NO en las retinas tratadas con BDNF, aunque no podemos descartar que alguna CGR haya muerto como consecuencia de la lesión, ya que se observaban escasas células de microglía marcadas con FG en estas retinas. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores en la retina de rata adulta tras seccionar el NO y administrar BDNF (Mey y Thanos, 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; Di Polo y cols., 1998; Isenmann y cols., 1998), y también con los efectos neuroprotectores documentados para el BDNF en cultivos de CGR o de explantes de retina adulta (Johnson y cols., 1986; Thanos y cols., 1989; Mittal y cols., 1994) en los cuales la administración de BDNF aumenta la supervivencia de dichas células.

Los efectos neuroprotectores del BDNF sobre las CGR de rata adulta pueden estar mediados por la unión de esta NT a su receptor de alta afinidad, ya que se ha documentado la expresión del receptor TrKB en la CCG y en las CGR de rata adulta (Caminos, 1998; Jelsma y cols., 1993; Pérez y Caminos y cols., 1995; Vecino y cols., 1998a). Sin embargo, no se conocen en la actualidad las vías a través de las cuales el BDNF aumenta la supervivencia de las CGR, aunque podría deberse, como se ha documentado en otros tipos de lesión, al bloqueo de la cascada de las caspasas (Kurokawa y cols., 1999), o a las interacciones con la expresión de genes que intervienen en el proceso de apoptosis (rev. Nickels, 1999). En efecto, algunos estudios han documentado que tras la axotomía, al menos una parte de las CGR mueren por apoptosis (Berkelaar y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994; Rabacchi y cols., 1994; Quigley y cols., 1995; Isenman y cols., 1997), y que en la muerte de las CGR tras la sección del NO interviene la activación de la caspasa 3 (Chaudhary y cols., 1999; Kermer y cols., 1998; 1999a y b). También se ha documentado que el BDNF puede impedir la producción de óxido nítrico por parte de las células de microglía activada con lipopolisacárido (Nakajima y cols., 1998), por lo que su efecto neuroprotector en este tipo de lesión podría estar mediado con su efecto sobre las células de microglía.

A los catorce días de la sección del NO, en las retinas experimentales de los animales tratados con BDNF las densidades de CGR eran significativamente menores que las densidades obtenidas en sus correspondientes retinas controles, pero eran significativamente mayores que las obtenidas en las retinas experimentales de los animales en los que se había realizado sección simple del NO y que habían sido analizados tras el mismo periodo de supervivencia. Estos resultados nos indican que el efecto neuroprotector de una inyección única de BDNF sobre las CGR

después de la sección del NO es transitorio, como había sido documentado ya por otros autores (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; DiPolo y cols., 1998). En la actualidad no se conoce si el efecto neuroprotector del BDNF es transitorio como consecuencia de la aparición de radicales libres (Klöcker y cols., 1998) o de la disminución en la expresión de los receptores TrKB por parte de las CGR, al igual que ocurre en neuronas del hipocampo (Frank y cols., 1996), aunque se ha documentado también que incluso la administración continuada de BDNF tiene un efecto neuroprotector transitorio sobre la supervivencia de las CGR después de la sección del NO (Di Polo y cols., 1998; Isenmann y cols., 1998).

5.2.3.1.2 Células de microglía fagocítica en las retinas de los animales tratados con BDNF

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados con una dosis intravítrea de BDNF y que fueron analizados siete días después de la sección del NO, aparecen células de microglía fagocítica en un número muy escaso, similar al observado en sus correspondientes retinas derechas o controles. Este resultado concordaría con los efectos neuroprotectores del BDNF sobre las CGR de la rata adulta a los siete días de la sección del NO (Mey y Thanos, 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; Di Polo y cols., 1998; Isenman y cols., 1998) y con el papel desempeñado por las células de microglía en la eliminación de los desechos de las CGR muertas (Thanos, 1991a y b; Thanos y cols., 1992). Además, en las retinas de los animales tratados con BDNF y que se analizaron catorce días después de la sección del NO, las densidades de células de microglía fagocítica fueron significativamente menores que las obtenidas en las retinas de los animales con sección simple del NO y que se analizaron tras el mismo periodo de supervivencia. Sin embargo, las densidades no fueron significativamente diferentes a las de los animales que habían recibido tratamiento con el vehículo, y que se habían analizado tras el mismo periodo de supervivencia, si bien el valor de *p* estaba próximo a los niveles de significación estadística (ver apartado 4.1.2.2 de los Resultados). Estos resultados concuerdan con la proporción de muerte de CGR observada en las retinas tratadas con BDNF y analizadas a los catorce días de la sección del NO.

Hemos visto anteriormente en los animales marcados con la NDPasa que las retinas de los animales tratados con BDNF y analizados a los siete días de la sección del NO presentaban una activación microglial muy escasa en CFN y algo mayor en CCG y CPI. El hecho de que, siete días después de la sección del NO, en las retinas

tratadas con BDNF no exista muerte de CGR ni se puedan observar células de microglía marcadas con FG, nos indica que la escasa activación de las células de microglía NDPasa+ que se produce en las retinas tratadas con BDNF tras este periodo de supervivencia no está relacionada con la muerte de las CGR ni con la transformación de las células de microglía residentes en la retina de rata adulta en células de microglía fagocíticas.

5.2.3.2 Retinas de los animales tratados con NGF

5.2.3.2.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con NGF

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales a los cuales se les había administrado intravítreamente NGF y que habían sido analizados siete días después de la sección del NO, las densidades de CGR marcadas con FG (52% de supervivencia) eran significativamente inferiores a las densidades obtenidas en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO (60% de supervivencia), y a las obtenidas en las retinas de los animales tratados con el vehículo (59% de supervivencia). Sin embargo, las retinas de los animales tratados con NGF y analizadas catorce días después de la sección del NO presentaban densidades de CGR (18% de supervivencia) significativamente superiores a las obtenidas tras el mismo periodo de supervivencia en el grupo de animales con sección simple del NO (12% de supervivencia) y en aquellos que habían recibido tratamiento con el vehículo (12% de supervivencia).

La ausencia de efecto neuroprotector del NGF observada en nuestro estudio en periodos de supervivencia tempranos, y la presencia de un discreto efecto neuroprotector en periodos de supervivencia más tardíos puede relacionarse con las discrepancias en la capacidad neurotrófica del NGF sobre las CGR expuestas por diversos autores. Así, Thanos y cols. (1989) documentaron que el NGF no incrementaba la supervivencia ni el crecimiento axonal de las CGR en explantes retinianos de rata adulta, mientras que Carmignoto y cols. (1989) y Siliprandi y cols. (1993) documentaron que la administración intraocular de dosis repetidas de NGF aumentaba la supervivencia de las CGR de rata adulta a las 5 y 7 semanas de la sección intracraneal del NO (Carmignoto y cols., 1989) y de las CGR de gato adulto a

los 30 días de la inducción de isquemia retiniana experimental (Siliprandi y cols., 1993).

El efecto neuroprotector del NGF sobre las CGR puede deberse a su unión con los receptores p75 o TrKA. Se ha documentado la ausencia de expresión del receptor p75 en las CGR de rata adulta (Hu y cols., 1998; Vecino y cols., 1998a) mientras que el receptor de alta afinidad TrKA se expresa en la CCG de retina de rata en desarrollo y adulta (Caminos, 1998; Jelsma, 1993; Pérez y Caminos, 1995; Ugolini, 1995; Vecino y cols., 1998a).

El hecho de que el NGF no muestre en nuestro estudio un significativo efecto neuroprotector sobre las CGR de rata en la primera semana tras la lesión pero sí en la segunda semana de la lesión y que Carmignoto y cols. (1989) hayan documentado un aumento de supervivencia de las CGR de la retina de la rata adulta a las 5 y 7 semanas de la sección del NO con la administración de dosis repetidas intravítreas de NGF, sugiere que el efecto neuroprotector del NGF sobre las CGR axotomizadas es un efecto tardío. Es posible que este hecho esté relacionado con una variación en la expresión de receptores TrKA por las CGR tras la sección del NO, aunque este hecho no ha sido investigado, o también que el efecto neuroprotector del NGF se produzca actuando sobre vías de muerte celular que se activan tardíamente tras la lesión.

5.2.3.2.2 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con NGF

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados con NGF observamos que, siete días después de la sección del NO, las densidades de células de microglía fagocítica eran significativamente superiores a las obtenidas en las retinas de los animales en los que tan solo se había seccionado el NO o a las obtenidas en los animales tratados intravítreamente con el vehículo, lo cual estaría en concordancia con la menor densidad de CGR supervivientes encontradas siete días después de la sección del NO en los animales que habían sido tratados con NGF. Además, catorce días después de la sección del NO, las densidades de células de microglía fagocítica en las retinas tratadas con NGF eran significativamente mayores que las encontradas en las retinas de los animales en los que tan solo se había seccionado el NO o en aquellos que habían sido tratados intravítreamente con el vehículo. Sin embargo, a los catorce días de la sección del NO había mayor supervivencia de CGR en las retinas de los animales tratados con NGF (18%) que en las retinas de los animales con sección simple del NO o de los tratados con PBS (12%).

Los resultados obtenidos sugieren que el NGF incrementa el número de células de microglía fagocítica de la retina en los siete primeros días de la sección del NO, ya que en este periodo de tiempo aumenta la densidad de células de microglía marcadas con FG y disminuye la supervivencia de las CGR. Además, nuestros resultados sugieren que a los catorce días de la sección del NO, el NGF sigue incrementando el número de células de microglía fagocítica, ya que las retinas analizadas tras este periodo de supervivencia tenían una mayor densidad de estas células, a pesar de que en este periodo de estudio el NGF tenía un discreto efecto neuroprotector sobre las CGR. Estos resultados sugieren que el NGF aumenta el número de células de microglía fagocítica después de la sección del NO y, a pesar de ello, también tiene un efecto neuroprotector tardío sobre las CGR, por lo que es posible que el aumento de la actividad fagocítica que se observa tras la administración del NGF no sea capaz de incrementar la muerte de las CGR porque el NGF esté impidiendo la muerte de éstas por otras vías

Se ha documentado que las células de microglía de cerebro de rata embrionaria y post-natal expresan los receptores p75 (Nakajima y cols., 1998; Newmann y cols., 1998) y TrKA (Elkabes y cols., 1998; Heese y cols., 1998a) y que tras activar con lipopolisacárido cultivos de células de microglía procedentes de cerebro de rata en desarrollo, se produce en dichas células una disminución en la expresión del receptor TrKA. No sabemos si las células de microglía de la retina de rata adulta expresan alguno de los dos receptores sobre los que puede actuar el NGF después de la sección del NO, y si varía su expresión según el periodo de tiempo transcurrido desde la sección del NO, pero esta podría ser una de las explicaciones al efecto del NGF sobre las células de microglía.

5.2.3.3 Retinas de los animales tratados con MIF

5.2.3.3.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con MIF

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados con el MIF y analizados a los siete días de la sección del NO se observaron densidades de CGR supervivientes similares a las observadas en los animales con sección simple del NO o en los tratados intravítreamente con el vehículo, y analizados tras el mismo periodo de supervivencia. Sin embargo, las densidades de CGR observadas en los animales tratados con MIF y analizados catorce días después de la sección del NO fueron significativamente mayores que las obtenidas en los animales con sección simple del NO o en los animales tratados con vehículo y que fueron analizados tras el mismo

periodo de supervivencia.

Estos resultados concuerdan en parte con los expuestos por otros autores (Thanos y cols., 1993; Thanos y Mey, 1995; rev. Thanos y cols., 1994). Así, Thanos y cols. (1993) no observaron aumento de la supervivencia de las CGR a los siete días de la sección del NO tras la administración de una dosis del MIF, ni tampoco cuando administraban dosis repetidas del mismo producto, mientras que a los catorce días de la sección del NO documentaron que la administración intravítrea de MIF triplicaba los valores de supervivencia de las CGR con respecto a los obtenidos tras la sección simple del NO, siendo mayor la supervivencia tras la administración de dosis repetidas de MIF que cuando se administraba una dosis única.

En nuestro estudio, el efecto neuroprotector del MIF sobre las CGR a los catorce días de la sección del NO, aunque significativo, fue menor que el obtenido por Thanos. Esta discordancia puede ser consecuencia de las diferencias en la administración del producto. En nuestro estudio administramos el MIF inmediatamente después de la sección del NO, empleando una dosis única que era inferior a la utilizada por Thanos y cols. (1993). Estos autores inyectaron 10 μ l de solución 500 μ M de MIF = 0,172 μ g/ μ l, y emplearon como vehículo TP, mientras que nosotros inyectamos 5 μ l de una solución que contenía 0,0025 μ g/ μ l, y empleamos como vehículo PBS). Además, entre nuestro estudio y el de Thanos pueden existir otras diferencias metodológicas, ya que en nuestro estudio realizamos la sección del NO 0,5 mm a su salida del globo ocular, mientras que en el estudio de Thanos y cols. -1993- no indican la distancia, aunque dicen que la sección es intraorbitaria.

En nuestro estudio, en los animales marcados con la NDPasa observamos que la administración del MIF no modificaba la activación de las células de microglía residentes en CFN tras la sección del NO, mientras que atenuaba el incremento de densidad observado en las células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI a los siete días de la sección del NO. El hecho de que en las retinas tratadas con una dosis del MIF se atenúe el incremento de densidad de las células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI tras la sección del NO, y que, sin embargo, no exista un aumento de la supervivencia de las CGR a los siete días de la lesión en las mismas retinas, podría indicar que las células de microglía NDPasa+ de estas capas intervengan en menor grado en la fagocitosis y muerte de las CGR de rata tras la sección del NO.

5.2.3.2.1 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con MIF

Las densidades de células de microglía fagocítica marcadas con FG en las

retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados con MIF no fueron significativamente diferentes a las obtenidas en las retinas de los animales con sección simple del NO o a las de los animales tratados con el vehículo, tanto siete como catorce días después de la sección del NO. Estos resultados se oponen a los expuestos por Thanos y cols. (1993) que documentaron un descenso en la densidad de células de microglía fagocítica a los catorce días de la sección del NO en las retinas tratadas con una o más dosis de MIF, respecto a las retinas con sección simple del NO. Además, Thanos y cols. (1993) no observaban células de microglía marcadas con diASP a los siete días de la sección del NO, con dosis única o repetidas del MIF, mientras que en nuestro estudio la densidad media de células de microglía fagocítica marcadas con FG a los siete días de la sección del NO en los animales tratados con el MIF fue de 389 ± 21 células/mm². Esta discrepancia entre nuestros resultados y los de Thanos y cols. (1993) puede ser debida a diferencias metodológicas, ya que nosotros hemos seccionado el NO a su salida del globo ocular y Thanos y cols. (1993) lo seccionan en la órbita. Aunque estos autores no han especificado la distancia a la que seccionaron el NO, el que en sus experimentos no se observen células de microglía fagocítica siete días después de la sección del NO indica que estos autores seccionaron el NO lejos del ojo, ya que se ha documentado que la distancia a la que se realiza la sección del NO determina el tiempo de inicio de la muerte de las CGR (Berkelaar, 1992).

En nuestro estudio no hemos podido documentar que la administración de MIF induzca cambios morfológicos en las células de microglía fagocítica marcadas con FG. Sin embargo, Thanos y cols. (1993) documentaron que la administración intravítrea de MIF modificaba la morfología de las células de microglía que se marcaban con 4Di-10Asp tras fagocitar los desechos de las CGR degeneradas como consecuencia de la sección del NO. Así, el tratamiento con MIF inducía, según Thanos y cols. (1993), una retracción en los procesos de las células de microglía fagocítica que aparecían marcadas con el trazador fluorescente tras la sección del NO, tanto a los siete como a los catorce días de la lesión. Thanos y cols. (1993) postularon que esta alteración morfológica podía implicar cambios metabólicos y funcionales de las células de microglía activada, que a su vez serían responsables del aumento de la supervivencia de las CGR de la rata tras la sección del NO inducido por la administración del MIF. No sabemos si la ausencia de alteraciones morfológicas de las células de microglía fagocítica en nuestro estudio es consecuencia de las diferencias en las dosis administradas o en las manipulaciones quirúrgicas entre nuestros métodos y los de Thanos y cols. (1993).

Por otra parte, a los catorce días de la sección del NO las densidades de células de microglía fagocítica obtenidas en nuestro estudio en los animales inyectados con MIF eran muy altas (598 ± 23) y no se correspondían con el leve pero significativo aumento de la supervivencia de las CGR observado en este periodo. Es posible que este hecho sea debido a que el aumento de la supervivencia de las CGR, aunque significativo, sea pequeño, y por ello no se altere el incremento de densidad de las células de microglía fagocítica. Por otra parte podría ser debido a que, al no exhibir el MIF efecto neuroprotector significativo a los siete días de la sección del NO, la muerte de las CGR ocurrida durante la primera semana después de la lesión induzca una activación microglial que no pueda ser impedida por el discreto efecto neuroprotector de este factor en un periodo posterior.

Hemos visto antes en los animales marcados con NDPasa que la administración de MIF no disminuía los incrementos en la densidad y en la intensidad de marcaje de las células de microglía residentes en CFN inducidos por la sección del NO, mientras que disminuía significativamente el incremento de la densidad de células de microglía NDPasa+ en la CCG y CPI a los siete días de la sección del NO. El hecho de que esta inhibición transitoria y parcial de las células de microglía NDPasa+ de la CCG y CPI inducida por la administración de MIF no se refleje en un descenso en la población de células de microglía fagocítica marcadas con FG, nos hace pensar en la existencia de distintas poblaciones de células microgliales con diferente capacidad de respuesta al MIF y, posiblemente, con diferentes funciones tras la lesión.

5.2.3.4 Retinas de los animales tratados con pro-Insulina humana

5.2.3.4.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con pro-Insulina humana

En nuestro estudio documentamos que tanto la administración intravítrea como subcutánea de PIH aumentaban significativamente la supervivencia de las CGR a los siete días de la sección del NO. Así, las densidades de CGR fueron significativamente mayores en las retinas experimentales tratadas intravítrea o subcutáneamente con PIH que en las retinas experimentales tratadas intravítrea o subcutáneamente con el vehículo (PBS). Los porcentajes de supervivencia en estos grupos fueron: 93% tras la administración subcutánea de PIH, 76% tras la administración intravítrea de PIH, 60% tras la administración subcutánea de PBS y 59% tras la administración intravítrea de PBS. Algunos autores han documentado que

la PIH actúa como factor de proliferación y diferenciación de las células neuroepiteliales y ganglionares del pollo (De la Rosa y cols., 1994b; Hernández-Sánchez y cols., 1995) y que regula el proceso de muerte neuronal fisiológica de las CGR (Díaz y cols., 2000). Nuestros resultados indican que la PIH puede tener *in vivo* un efecto neuroprotector sobre las CGR de la rata después de la sección del NO, y este es el primer estudio que lo documenta.

Se postula que los efectos antiapoptóticos de la PIH se relacionan con su capacidad para mantener los niveles celulares de la proteína heat-shock 70, los cuales descienden en las células que sufren apoptosis (De la Rosa y cols., 1998b). Además, se postula que el descenso en los niveles de este tipo de proteínas se relaciona con la activación de la cascada de las caspasas y, de hecho, se ha documentado que la inhibición de otra proteína similar a la anterior, concretamente la proteína heat-shock 27 en células retinianas en cultivo, induce la activación de la caspasa 8 (FasL) (Tezel y Wax, 1999), lo que lleva a la muerte de las CGR. Por tanto, es posible que los efectos neuroprotectores de la PIH sobre las CGR estén mediados por la inhibición de la cascada de las caspasas.

En cuanto a las diferencias que hemos obtenido en los porcentajes de supervivencia de las CGR entre los subgrupos de administración intravítrea y subcutánea, éstas pueden ser consecuencia de las diferencias en las dosis administradas, ya que en el primer caso se administró una dosis única intravítrea inmediatamente después de la sección del NO, mientras que para la administración subcutánea se repitieron las dosis cada 24 horas hasta el momento de procesar los animales. Aunque actualmente no conocemos si la PIH atraviesa la barrera hemato-retiniana, es posible que sí lo haga, a la vista de los resultados obtenidos.

Las retinas experimentales de los animales tratados con dosis subcutáneas repetidas de PIH y que se analizaron catorce días después de la sección del NO, mostraron densidades de CGR significativamente superiores a las obtenidas en los animales tratados con PBS subcutáneo, aunque los porcentajes de supervivencia no fueron muy diferentes (12% para el PBS subcutáneo; 18% para la PIH subcutánea) lo que indica que aunque la PIH muestra a los siete días de la sección del NO un efecto neuroprotector sobre las CGR de la rata similar al observado para el BDNF o para el Z-DEVD-cmk (ver apartado 4.1.2.1.2 de Resultados), este efecto es transitorio y se mantiene durante menos tiempo en las retinas tratadas con PIH que en las tratadas con BDNF o Z-DEVD-cmk, ya que los porcentajes de supervivencia de las CGR a los catorce días de la sección del NO eran menores en las retinas tratadas con PIH que en las tratadas con el BDNF (41% de supervivencia tras una única dosis de BDNF), o

con el Z-DEVD-cmk (41% de supervivencia tras tres dosis de Z-DEVD-cmk).

5.2.3.4.2 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con pro-Insulina humana

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados con PIH, tanto intravítrea como subcutáneamente y que se analizaron a los siete días de la sección del NO, las densidades de células de microglía fagocítica marcadas con FG eran significativamente menores a las obtenidas en las retinas experimentales de los animales tratados intravítrea o subcutáneamente con PBS. Estos resultados estaban en concordancia con los porcentajes de supervivencia de CGR obtenidos en estas retinas, y así, la menor densidad de células de microglía fagocítica marcadas con FG se obtuvo en el subgrupo en el que se administró subcutáneamente la PIH y se analizó siete días después de la sección del NO (98 células/mm²), que a su vez se correspondía con el subgrupo que arrojó mayores valores de CGR supervivientes (93%).

En las retinas experimentales de los animales a los que se administró subcutáneamente PIH y que se analizaron catorce días después de la sección del NO, las densidades de células de microglía marcadas con FG no fueron significativamente diferentes a las obtenidas en los animales con sección simple del NO o en los tratados con su vehículo. Estos resultados concuerdan con las densidades de CGR obtenidas en las mismas retinas catorce días después de la sección del NO, ya que, a pesar de que las densidades de CGR eran significativamente mayores, se acercaban mucho a los valores de supervivencia de las retinas con sección simple del NO o de las tratadas con el vehículo.

5.2.3.5 Retinas de los animales tratados con factor de crecimiento similar a Insulina-I

5.2.3.5.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con factor de crecimiento similar a Insulina-I

Las densidades medias de CGR obtenidas en las retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados intravítreamente con IGF-I y analizados siete días después de la sección del NO no fueron significativamente diferentes a las obtenidas en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO o en los animales tratados intravítreamente con el vehículo, y que fueron analizados tras el mismo periodo de supervivencia. Estos resultados se oponen a los estudios

que documentan la importancia del IGF-I para la neurogénesis y diferenciación de la retina de pollo (de la Rosa y cols., 1994b; Hernández-Sánchez y cols., 1995), a la existencia del receptor específico del IGF-I en la CCG de la retina de rata adulta (Burren y cols., 1996), y la capacidad del IGF-I para aumentar la supervivencia de las CGR de rata adulta catorce días después de la sección del NO (Kermer y cols., 2000).

Pensamos que las diferencias encontradas entre nuestros resultados y los de Kermer y cols. (2000) pueden ser debidas a las distintas formas de administración del producto. Así, en nuestro estudio se inyectó una dosis única intravítrea y se analizaron los animales siete días después de la sección del NO, mientras que en el estudio de Kermer y cols. (2000) se realizaron inyecciones intravítreas repetidas del producto y se analizaron los animales a los catorce días de la sección del NO.

Por otra parte hemos observado que las densidades de CGR marcadas con FG en las retinas experimentales de este grupo, al igual que en el subgrupo en el que se administraron conjuntamente IGF-I y NT3, y a diferencia del resto de los grupos analizados, eran heterogéneas, es decir, que variaban mucho de un animal a otro dentro del mismo grupo. Concretamente, en uno de los animales tratados con IGF-I la densidad de CGR en la retina experimental fue prácticamente igual a la obtenida en su correspondiente control, y en otro animal ambos valores estuvieron muy cercanos (Tabla IIIa). Dado que las manipulaciones experimentales fueron iguales en todos los animales del mismo grupo, podría ocurrir que realmente el IGF-I tenga efectos neuroprotectores sobre las CGR lesionadas tras la sección del NO en algunos animales y que existan características fenotípicas en cada animal que determinen la respuesta de las CGR a este péptido. Si esto fuera así, el efecto neuroprotector del IGF-I sobre las CGR podría estar mediado por la inhibición de la activación de la caspasa 3, como han documentado algunos autores (Kermer y cols., 2000), ya que esta caspasa interviene en la muerte por apoptosis de las CGR tras la sección del NO (Kermer y cols., 1998, 1999a y b).

5.2.3.5.2 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con factor de crecimiento similar a Insulina-I

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados con IGF-I, la densidad media de células de microglía fagocítica marcadas con FG no fue significativamente diferente a la obtenida en los animales con sección simple del NO o en los tratados intravítreamente con vehículo, lo que concuerda con la ausencia de diferencias significativas entre las densidades de CGR de las retinas izquierdas o

experimentales de estos tres grupos, a los siete días de la sección del NO.

Sin embargo, también observamos en este grupo de animales cierta heterogeneidad en las densidades de células de microglía fagocítica entre los distintos animales que componían este grupo, al igual que ocurría con las densidades de CGR en las mismas retinas. Así, en los animales que presentaban una densidad de CGR muy similar en ambos ojos (control y experimental), prácticamente no existían células de microglía en las retinas experimentales, mientras que en los animales en los que existía una densidad de CGR más baja en las retinas experimentales, las densidades de células de microglía fagocítica eran mayores. Estos resultados sugieren que las diferencias observadas en las densidades de células de microglía marcadas con FG entre los distintos animales tratados intravítreamente con IGF-I son consecuencia de las modificaciones en la supervivencia de las CGR de rata adulta tras la sección del NO, inducidas en algunos animales por este péptido.

5.2.3.6 Retinas de los animales tratados con IGF-I+NT3 y PIH+NT3

5.2.3.6.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con IGF-I+NT3

Las densidades de CGR en las retinas izquierdas o experimentales de los animales que habían recibido una dosis intravítrea de IGF-I+NT3 fueron significativamente mayores que las de los animales con sección simple del NO, mientras que no fueron significativamente diferentes a las de los tratados intravítreamente con PBS.

En las retinas experimentales de este grupo, de forma similar a lo observado en el subgrupo tratado con una dosis intravítrea de IGF-I, observamos cierta heterogeneidad de las densidades de CGR supervivientes entre los animales que componían el grupo. De hecho, algunos animales poseían densidades muy similares entre retina control y experimental mientras que uno de los animales arrojó valores inferiores de supervivencia en la retina experimental a los obtenidos tras la administración intravítrea de PBS. Se ha documentado que la NT3 no modifica la supervivencia de las CGR después de la sección del NO (Peinado y cols., 1996). Por ello, es posible que estas diferencias entre animales del mismo subgrupo sean debidas a diferencias fenotípicas que determinen la distinta respuesta de las CGR a la administración del IGF-I, como ya discutíamos en el apartado anterior. Por otra parte, ya que las densidades de CGR observadas en las retinas tratadas con IGF-

I+NT3 no fueron significativamente superiores a las obtenidas en el subgrupo de animales tratados con una inyección intravítrea de IGF-I, este estudio documenta que la NT3 no aumenta la supervivencia de las CGR después de la sección del NO.

5.2.3.6.2 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con IGF-I+NT3

En las retinas experimentales de los animales tratados conjuntamente con IGF-I y NT3, aunque existía una gran heterogeneidad en las densidades de células de microglía entre los animales que componían este grupo, la densidad media de células de microglía fagocítica obtenida a los siete días de la sección del NO fue significativamente menor a la obtenida en las retinas de los animales con sección simple del NO y en los tratados intravítreamente con PBS y analizados tras el mismo periodo de supervivencia.

El hecho de que la administración conjunta de IGF+NT3 produzca un descenso significativo de la población de células de microglía fagocítica que no tiene reflejo en un aumento significativo de la densidad de CGR tras la sección del NO, puede indicar que la administración conjunta de IGF-I y NT3 disminuye la población de células de microglía fagocítica.

En esta tesis no hemos analizado los efectos del IGF-I sobre las células de microglía NDPasa+, ni los efectos de la NT3 administrada en solitario sobre las células de microglía marcadas con FG. Sin embargo, en las retinas marcadas con la NDPasa hemos visto que la administración intravítrea de la NT3 disminuía el número de células de microglía NDPasa+ de la CFN en las retinas experimentales a los siete días de la sección del NO. Es posible que esta disminución transitoria del número de células de microglía en la CFN se refleje en un descenso en la densidad de células de microglía fagocítica en la CFN, ya que en los contajes de las células de microglía fagocítica de las retinas marcadas con FG hemos incluido también las células de microglía fagocítica de la CFN.

5.2.3.6.3 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con PIH+NT3

En las retinas experimentales de los animales en los que se administró una dosis intravítrea de PIH y NT3, las densidades de CGR fueron significativamente inferiores a las obtenidas en el grupo de animales con sección simple del NO y en los animales tratados intravítreamente con el PBS. De hecho, a pesar de existir cierta

heterogeneidad en las densidades de CGR entre las retinas de los distintos animales, todos ellos presentaron unos porcentajes de supervivencia menores que los animales con sección simple del NO o los tratados con el vehículo. No sabemos a qué se debe el aumento de muerte de las CGR en estas retinas, pero la administración conjunta de ambos péptidos no solo anula el posible efecto neuroprotector de la PIH (ver apartado 5.2.3.4.1 de esta Discusión) sino que también induce muerte de las CGR.

5.2.3.6.4 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con PIH+NT3

En las retinas experimentales de los animales en los que se administró una dosis intravítrea de PIH y NT3 observamos que las densidades de células de microglía fagocítica eran significativamente mayores a las obtenidas en el subgrupo de animales con sección simple del NO y en los que se había administrado intravítreamente el vehículo. Este significativo incremento de las densidades de células de microglía fagocítica observado en las retinas tratadas con PIH+NT3 concuerda con la disminución significativa de la supervivencia de las CGR observada en las retinas de los animales tratados con PIH+NT3 y analizados siete días después de la sección del NO. Por tanto, nuestros resultados sugieren que las variaciones de las densidades de células de microglía observadas a los siete días de la sección del NO en las retinas tratadas con PIH y NT3 pueden ser consecuencia del aumento de la muerte de las CGR en dichas retinas.

5.2.3.7 Retinas de los animales tratados con los péptidos Bcl-x

5.2.3.7.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con Bcl-xL

Las densidades de CGR en las retinas experimentales de los animales tratados con Bcl-xL y analizados siete días después de la sección del NO eran significativamente superiores a las obtenidas en los animales con sección simple del NO y en los tratados intravítreamente con el vehículo. Estos resultados concuerdan con los estudios que documentan que el gen bcl-xL es el gen antiapoptótico que se expresa mayoritariamente en retina adulta (Isenman y cols., 1997; Levin y cols., 1997; rev. Nickells, 1996) y que interviene en la muerte de las CGR de rata adulta tras la sección del NO (Isenman y cols., 1997; Chaudhary y cols., 1999; Isenman y cols., 1999).

Respecto al mecanismo a través del cual el péptido producto de la expresión

de la isoforma bcl-xL del gen bcl-x inhibe la apoptosis, la hipótesis más apoyada en la actualidad es la interacción del mismo con los productos de expresión de genes pro-apoptóticos como Bax, Bad y Bak, a través de sus dominios homólogos (Chitenden y cols., 1995a y b; Sattler y cols., 1997). Concretamente, parece que la alteración de la ratio de expresiones bcl-xL/bax puede ser responsable en la retina del desplazamiento del equilibrio hacia la apoptosis (Parsadanian y cols., 1998). La unión de Bcl-xL a Bax impide la formación de poros mitocondriales y la liberación del citocromo c al citoplasma celular (Shimizu y cols., 1995; Reed, 1997), bloqueándose la cascada de las caspasas.

En cualquier caso, el aumento de supervivencia de las CGR inducido por la administración del Bcl-xL tras la sección del NO aunque significativo, fue bajo, lo cual puede indicar que existen otras vías que inducen la apoptosis de las CGR tras la sección del NO. También es posible que la formación de poros mitocondriales inducida por Bax provoque una alteración celular profunda que no sea totalmente impedida por su heterodimerización con Bcl-xL. Además, se postula que el efecto antiapoptótico del péptido Bcl-xL mediado por su heterodimerización con Bax se produce durante la fase de muerte rápida de las CGR tras la sección del NO (Chaudhary y cols., 1999), por lo que es probable que dicho efecto no se mantenga en el tiempo. En nuestro estudio solo hemos investigado la supervivencia a los siete días de la sección del NO, por lo que no sabemos si el aumento de supervivencia que observamos se mantiene más allá de la primera semana de la lesión.

5.2.3.7.2 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con Bcl-xL

No observamos diferencias significativas entre las densidades de células de microglía de las retinas experimentales de los animales tratados con Bcl-xL y analizados a los siete días de la sección del NO y las obtenidas en los animales con sección simple del NO. Sin embargo, las densidades de células de microglía en las retinas experimentales de los animales tratados con Bcl-xL fueron significativamente menores que las obtenidas en los animales tratados intravítreamente con el vehículo.

El hecho de que las densidades de células de microglía fagocítica en las retinas tratadas con Bcl-xL no fueran significativamente diferentes a las obtenidas en las retinas con sección simple del NO, mientras que las densidades de CGR eran significativamente mayores tras la administración de Bcl-xL, puede ser debido a que el incremento en la supervivencia de las CGR inducido por la administración del Bcl-xL era muy pequeño (ver apartado 4.1.2.2.1 de los Resultados), lo que determinaría que el efecto sobre la población de células de microglía no fuera significativo.

5.2.3.7.3 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con Bcl-xS

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales a los cuales se les administró intravítreamente el péptido Bcl-xS, las densidades de CGR supervivientes a los siete días de la sección del NO eran significativamente más bajas que en los animales con sección simple del NO mientras que no fueron significativamente diferentes a las obtenidas en los animales tratados intravítreamente con el vehículo. Sin embargo, el porcentaje de supervivencia de CGR era similar en los tres grupos, lo cual era debido a la existencia de una menor densidad de CGR en las retinas controles de los animales tratados con Bcl-xS, por lo que pensamos que la inyección de Bcl-xS no tiene efecto sobre la supervivencia de las CGR después de la sección del NO. No sabemos por qué las retinas controles de este grupo de animales tenían menores densidades de CGR marcadas con FG, pero podría deberse a alguna característica específica de este grupo de animales o a problemas en el marcaje de las CGR.

El péptido Bcl-xS no manifiesta pues, en nuestro estudio, efectos pro-apoptóticos, como han sido descritos como consecuencia de la sobre-expresión del gen por otros autores (Boise y cols., 1993), y este hecho puede deberse a que la secuencia de aa del péptido utilizada en nuestro estudio no fuera estrictamente la del Bcl-xS, sino que aunque conteniéndolo, era mayor. Boise y cols. (1993) han postulado que la falta de 63 aa pertenecientes a dos dominios homólogos en la estructura del Bcl-xS (el péptido más corto) que sí aparecen en la estructura del Bcl-xL es la responsable de que Bcl-xS tenga efectos pro-apoptóticos, contrariamente a lo que ocurre con el péptido Bcl-xL. Posiblemente el hecho de que el péptido empleado, a pesar de contener la secuencia del Bcl-xS, fuera de mayor tamaño, provoque un cambio en los efectos biológicos del mismo, llegando a impedir sus efectos pro-apoptóticos. También es posible que esta isoforma del gen bcl-x no se exprese en retina de rata adulta, como ocurre en tejido cerebral humano (Boise y cols., 1993) y por ello no existan en dicha retina mecanismos de respuesta al péptido Bcl-xS.

5.2.3.7.4 Células microglía en las retinas de los animales tratados con Bcl-xS

Las densidades de células de microglía fagocítica en las retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados con el péptido Bcl-xS siete días después de la sección del NO no fueron significativamente diferentes a las obtenidas en los animales con sección simple del NO, mientras que fueron significativamente menores

que las obtenidas en los animales tratados con el vehículo. Sin embargo, las diferencias de densidad de células de microglía entre las retinas tratadas con Bcl-xS y las retinas tratadas con el vehículo se acercaban al límite de significancia estadística (ver apartado 4.1.2.2.2 de los Resultados). Este hecho unido a la semejanza entre los porcentajes de supervivencia de las CGR obtenidos en los tres grupos puede indicar que la administración de Bcl-xS en nuestro estudio no tiene efecto alguno sobre la población de células de microglía fagocítica de la retina de la rata adulta a los siete días de la sección del NO.

5.2.3.8 Retinas de los animales tratados con el péptido Bcl-2

5.2.3.8.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con Bcl-2

En las retinas izquierdas o experimentales de los animales que habían recibido una dosis única del péptido Bcl-2, las densidades de CGR supervivientes siete días después de la sección del NO no fueron significativamente diferentes a las densidades obtenidas en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO ni a las obtenidas en los animales tratados intravítreamente con el vehículo.

Sin embargo, en las retinas experimentales de los animales que habían recibido dos dosis del producto, y que fueron analizadas siete días después de la sección del NO, las densidades de CGR supervivientes fueron significativamente menores a las obtenidas en los animales con sección simple del NO, mientras que no fueron significativamente diferentes a las obtenidas en los animales tratados con el vehículo. A pesar de ello, los porcentajes de supervivencia eran tan solo levemente inferiores a las de estos dos grupos (60% en el grupo de sección simple del NO; 59% en el grupo de administración intravítrea de PBS; 55% en el grupo de administración de Bcl-2 a días 0 y 4) debido a que las densidades de CGR en las retinas controles de los animales que habían recibido dos dosis de Bcl-2 eran también inferiores a las de las retinas controles de los animales tratados intravítreamente con vehículo. No sabemos por qué las retinas controles de este grupo de animales tenían menores densidades de CGR marcadas con FG pero podía deberse a alguna característica específica de este subgrupo de animales o a problemas en el marcaje.

Nuestros resultados sugieren que la administración intravítrea del péptido Bcl-2 no tiene efectos neuroprotectores en las CGR de la rata adulta después de la sección del NO. Estos resultados difieren de los expuestos por algunos autores que han documentado que la sobre-expresión del gen *bcl-2* aumenta la supervivencia de

las CGR de ratones adultos transgénicos después de la sección del NO (Cenni y cols., 1996; Porciatti y cols., 1996; Chierzi y cols., 1998), y que la ratio de expresiones bcl-2-bcl-xL/bax en retina de rata adulta varía durante el proceso de apoptosis de las CGR inducido por el aplastamiento (Isenman y cols., 1997) o la sección del NO (Chaudhary y cols., 1999). Además, algunos autores han documentado un descenso en la expresión del gen bcl-2 en cultivos de células retinianas lesionadas mediante isquemia o excitotoxicidad (Tezel y Wax, 1999). No podemos saber si estas discrepancias son debidas a que nosotros no hemos estimulado la producción endógena del péptido, sino que lo hemos administrado exógenamente. Es posible que la expresión del gen bcl-2 varíe tras la lesión retiniana en las CGR, pero que, a pesar de ello, sea la expresión del gen bcl-xL la que tenga efectos neuroprotectores sobre las CGR de la rata adulta. A este respecto, en nuestro estudio, la administración del péptido Bcl-xL aumentaba leve, aunque significativamente, la supervivencia de las CGR después de la sección del NO (ver apartado 4.1.2.2.1 de Resultados), lo que sugiere que las diferencias existentes en las secuencias de aminoácidos de las cadenas peptídicas del Bcl-2 y el Bcl-xL pueden determinar que el péptido Bcl-2 no manifieste efectos neuroprotectores sobre las CGR de la rata adulta cuando es administrado intravítreamente después de la lesión.

5.2.3.8.2 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con Bcl-2

No observamos diferencias significativas entre las densidades de células de microglía obtenidas en las retinas izquierdas o experimentales de los animales tratados con una o dos dosis de Bcl-2, y analizados siete días después de la sección del NO, y las obtenidas en los animales con sección simple del NO, como tampoco eran significativas las diferencias de densidad de células de microglía entre los animales tratados con dos dosis de Bcl-2 y los tratados intravítreamente con el vehículo. Sin embargo, las densidades de células de microglía fagocítica fueron significativamente menores en las retinas tratadas con una dosis de Bcl-2 que en las retinas tratadas con el vehículo, aunque el valor de p era próximo al límite de significación estadística ($p=0,0141$).

No sabemos cuál es la causa de la existencia de una menor densidad de células de microglía en los animales tratados con una dosis de Bcl-2, pero el hecho de que el valor de p se aproxime al límite de significación estadística y que los porcentajes de supervivencia en los grupos tratados con una o dos dosis de Bcl-2 y con el vehículo sean muy similares sugieren que el tratamiento con el péptido Bcl-2 no modifica la población de células de microglía fagocítica de la retina de la rata

adulto siete días después de la sección del NO.

5.2.3.9 Retinas de los animales tratados con el inhibidor irreversible de la caspasa 3 (Z-DEVD-cmk)

5.2.3.9.1 Células ganglionares en las retinas de los animales tratados con el Z-DEVD-cmk

Las densidades de CGR que obtuvimos en las retinas experimentales de los animales tratados con dosis repetidas de Z-DEVD-cmk fueron significativamente superiores a las obtenidas en las retinas experimentales de los animales con sección simple del NO, tanto a los siete como a los catorce días de la sección del NO, y a las obtenidas en las retinas tratadas intravítreamente con PBS y analizadas a los catorce días de la sección del NO, mientras que no fueron significativamente diferentes a las de los animales tratados intravítreamente con PBS+DMSO (que era el vehículo utilizado para la administración del Z-DEVD-cmk) y analizados a los siete días de la sección del NO.

Diversos estudios han documentado que al menos una parte de las CGR que mueren tras la sección del NO lo hacen por apoptosis (Berkelaar y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994; Rabacchi y cols., 1994; Quigley y cols., 1995; Isenman y cols., 1997), y que la caspasa 3 interviene en la muerte de las CGR tras la citada lesión (Chaudhary y cols., 1999; Kermer y cols., 1998, 1999a y b). Además, se ha documentado que el Z-DEVD-cmk aumenta la supervivencia de las CGR tras la lesión (Kermer y cols., 1998).

Sin embargo, el hecho de que en nuestro estudio las retinas tratadas con dosis repetidas de Z-DEVD-cmk no tengan a los siete días densidades de CGR significativamente diferentes a las retinas tratadas con su correspondiente vehículo y estas densidades sean superiores a las obtenidas en los animales tratados con PBS, indica que el DMSO puede inducir algunos cambios en las CGR que favorezcan su supervivencia, y que el Z-DEVD-cmk no tenga en sí efecto neuroprotector.

El efecto neuroprotector observado a los siete días de la sección del NO en las retinas tratadas con Z-DEVD-cmk se mantenía en el tiempo aunque era menor a los catorce días y así, las densidades de CGR supervivientes en este grupo a los catorce días eran superiores a las obtenidas en las retinas con sección simple del NO y en las tratadas intravítreamente con PBS.

El que el efecto neuroprotector de la administración del Z-DEVD-cmk fuera menor a los catorce que a los siete días coincide con los resultados obtenidos por otros autores como Kermer y cols. (1999b) y podría deberse, entre otros factores, a la intervención de caspasas diferentes a la caspasa 3 en la muerte por apoptosis de las CGR tras la sección del NO (Park y cols., 1998). También podría ocurrir que la lesión desencadenara cambios a nivel mitocondrial que no fueran reversibles y que acabaran por destruir a la célula por una vía independiente de la cascada de las caspasas (Xiang y cols., 1996; rev. Nickels, 1999). Esta última hipótesis estaría en concordancia con los estudios que demuestran que la lesión del NO induce la sobre-expresión del gen bax (Isenman y cols., 1997), que a su vez provoca profundas alteraciones en la membrana mitocondrial, que probablemente no permitan que los efectos del bloqueo de la vía de las caspasas se mantengan en el tiempo. Posiblemente, la combinación de sustancias que actúen a distintos niveles sería un método más eficaz para mantener la supervivencia de las CGR tras la sección del NO.

5.2.3.9.2 Células de microglía en las retinas de los animales tratados con el Z-DEVD-cmk

Las retinas experimentales de los animales tratados con Z-DEVD-cmk y analizados a los siete días de la sección del NO presentaban unas densidades de células de microglía fagocítica significativamente menores a las obtenidas en los animales con sección simple del NO y a las obtenidas en los animales tratados con PBS+DMSO y analizados tras el mismo periodo de supervivencia. Como las densidades de CGR supervivientes 7 días después de la sección del NO eran mayores en los grupos tratados con Z-DEVD-cmk y con PBS+DMSO que en el grupo con sección simple del NO, parece que las densidades de células de microglía observadas en estos tres grupos no estaban relacionadas con la supervivencia de las CGR, y que la menor densidad de células de microglía fagocítica obtenida en las retinas tratadas con Z-DEVD-cmk era consecuencia de que este péptido induce una disminución en la cantidad de células de microglía fagocítica a los siete días de la sección del NO.

Catorce días después de la sección del NO, en las retinas experimentales de los animales tratados con inyecciones repetidas de Z-DEVD-cmk las densidades de células de microglía fagocítica eran menores que en los animales con sección simple del NO y en los tratados intravítreamente con PBS. Como las densidades de CGR supervivientes encontradas en las retinas tratadas con el Z-DEVD-cmk eran mayores

que en los otros dos grupos citados catorce días después de la sección del NO, es posible que, tras este periodo de supervivencia, exista una relación entre las densidades de células de microglía fagocítica y la supervivencia de las CGR en estos tres grupos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.M. and S. Cory (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**: 1322-1326.
- Alderson R.F., Alterman A.L., Barde Y.A. and R.M.Lindsay (1990) Brain- derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron*. Vol. **5**: 297-306.
- Allendoerfer K.L., Cabelli R.J., Escandon E., Kaplan D.R., Nikolics K., and C.J. Shatz (1994) Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system. *J. Neurosci*. Vol. **14**(3): 1795-1811.
- Allsopp T.E., Kiselev S., Wyatt S. and A.M. Davies (1995) Role of Bcl-2 in the brain-derived neurotrophic factor survival response. *Eur. J. Neurosci*. Vol. **7**(6): 1266-72.
- Allsopp T.E., Wyatt S. Patterson H.F. and A.M. Davies (1993) The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell*. Vol. **73**: 295-307.
- Angeletti R.H. and R.A. Bradshaw (1971) Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: Amino acid sequence. *Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. USA*. Vol. **68**(10): 2417-2420.
- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J.J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R. and J.C. Martinou (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*. Vol. **277**: 370-372.
- Aritomi M., Kunishima N., Inohara N., Isihibashi Y., Otha S. and K. Morikawa (1997) Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *J.Biol.Chem*. Vol. **272**(44): 27886-27892.
- Armson P.F., Bennett M.R. and T.R. Raju (1987) Retinal ganglion cell survival and neurite regeneration requirements: the changes from the Müller cell dependence to superior colliculi dependence during development. *Dev. Brain Res*. Vol. **32**: 207-216.
- Armstrong R.C., Aja T., Xiang J., Gaur S., Krebs J.F., Hoang K., Bai X., Korsmeyer S.J., Karanewsky D.S., Fritz L.C. and K.J. Tomaselli (1996). Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by Bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J. Biol. Chem*. Vol. **271**(28): 16850-16855.
- Ary-Pires R., Nakatani M., Rehen S.K. and R. Linden (1997) Developmentally regulated release of intraretinal neurotrophic factors in vitro. *Int. J. Devl. Neurosci*. Vol. **15**(2): 239-255.

- Ashwell K. (1989) Development of microglia in the albino rabbit retina. *J. Comp. Neur.* Vol. **287**: 286-301.
- Ashwell K. (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Dev. Brain Res.* Vol. **55**: 219-230.
- Ashwell K. (1991) The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev. Brain Res.* Vol. **58**: 1-12.
- Ashwell K.W.S., Hollander H., Streit W. and J. Stone.(1989). The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Visual Neurosci.* Vol. **2**: 437-448.
- Atkinson J., Panni M.K. and R.D. Lund (1999) Effects of neurotrophins on embryonic retinal outgrowth. *Dev. Brain Res.* Vol. **112**: 173-180.
- Auriault C., M. Joseph., Tartar A and A. Capron (1983) Characterization and synthesis of a macrophage inhibitory peptide from the second constant domain of human immunoglobulin G. *FEBS Lett.* Vol. **153**: 11-15.
- Bakhshi A., Jensen J.P., Goldman P., Wright J.J., McBride O.W., Epstein A.L. and S.J. Korsmeyer (1985) Cloning the cromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell.* Vol. **41**(3): 889-906.
- Banati R.B. and M.B. Graeber (1994) Surveillance, intervention and cytotoxicity: Is there a protective role of microglia?. *Dev. Neurosci.* Vol. **16**: 114-127.
- Banati R.B., Gehrmann J., Schubert P. and G.W. Kreutzberg (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia.* Vol. **7**: 111-118.
- Banati R.B., Gehrmann J., Wiebner C., Hosmann K.A. and G.W. Kreutzberg (1995) Glial expression of the β -amyloid precursor protein (APP) in global ischemia. *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* Vol. **15**: 647-654.
- Barbacid M. (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* Vol. **7**: 148-155.
- Barbacid M., Lamballe F., Pulido D. And R. Klein (1991) The trk family of tyrosine kinase receptors. *Biochem. Biophys. Acta.* Vol. **1072**: 115-127.
- Barde Y.A. (1989) Trophic factor and neuronal survival. *Neuron.* Vol. **2**: 1525-1534.
- Barde Y.A., Edgar D. and H. Thoenen (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal.* Vol. **1**(5): 549-553.
- Barker P.A. and R.A. Murphy (1992) The nerve growth factor receptor: a multicomponent system that mediates the actions of neurotrophin family of protein. *Molecular and Cellular Biochemistry.* Vol. **110**: 1-15.
- Barón M. and A. Gallego (1972) The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex. *Z. Zellforsch.* Vol. **128**: 42-57.

- Barres B.A., Hart I.K., Coles H.S.R., Burne J.F., Voyvodic J.T., Richardson W.D. and M.C. Raff (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. Vol. **70**: 31-46.
- Barron K.D. (1983a) Comparative observations on the cytologic reactions of central and peripheral nerve cells to axotomy. En *"Spinal Cord Reconstruction"* (Ed. Kao C.C., Bunge R.P. and Reier P.J.). New York, Raven Press: 7-40.
- Barron K.D. (1983b) Axon reaction and central nervous system regeneration. En *"Nerve, Organ and Tissue Regeneration: Research Perspectives"*. (Ed. Seil F.J.). New York. Academic Press: 3-36.
- Barron K.D. (1989) Neuronal responses to axotomy: consequences and possibilities for rescue from permanent atrophy or cell death. En *"Neural Regeneration and Transplantation"*. (Ed. Liss A.R.) Cap. **6**: 79-99.
- Barron K.D.(1995) The microglial cell. A historical review. *J. Neurological Sciences*. Vol. **134**: 57-68.
- Barron K.D., Dentinger G., Krohel G., Easton S.K. and R. Mankes (1986) Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer in rat after intraorbital optic nerve crush. *J. Neurocytol.* Vol. **15**: 345-362.
- Batchelor P.E., Liberatore G.T., Wong J.Y., Porritt M.J., Frerichs F., Donnan G.A. and D.W. Howells (1999). Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* Vol. **19**(5): 1708-1716.
- Batistatou A., Merry D.E., Korsmeyer S.J. and L.A. Greene (1993) Bcl-2 affects survival but not neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Neurosci.* Vol. **13**: 4422-4428.
- Beazley L.D., Perry V.H., Baker B. and E.J. Darby (1987) An investigation into the role of ganglion cells in the regulation of division and death of other retinal cells. *Dev. Brain Res.* Vol. **36**: 169-184.
- Beck F., Samani N.J., Byrne S., Morgan K., Gebhard R. and W.J. Brammar (1988). Histochemical localization of IGF-1 and IGF-II mRNA in the rat between birth and adulthood. *Dev.* Vol. **104**:29-39.
- Beck K.D. (1994) Functions of brain-derived neurotrophic factor, insulin-like growth factor-1 and basic fibroblast growth factor in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Progress in Neurobiology.* Vol. **44**: 497-516.
- Beck K.D., Knusel B. and F. Hefti (1993a) The nature of the trophic action of BDNF, des(1-3)IGF-I, and bFGF on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neurosci.* Vol. **52**: 855-866.

- Beck K.D., Knusel B., Winslow J.W., Rosenthal A., Burton L.E., Nikolics K. and F. Hefti (1992) Pretreatment of dopaminergic neurons in culture with brain-derived neurotrophic factor attenuates toxicity of 1-methyl-4-pyridinium. *Neurodegeneration*. Vol. **1**: 27-36.
- Benkovic S.A. and J.R. Connor (1993) Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* Vol. **338**(1): 97-113.
- Benveniste E.N. (1992) Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* Vol. **263**(1 Pt 1): C1-16
- Benveniste E.N., Huneycutt B.S., Shrikant P. and M.E. Ballestas (1995) Second messenger system in the regulation of cytokines and adhesion molecules in the central nervous system. *Brain Behav. Immun.* Vol. **9**(4): 304-314.
- Berkelaar M. (1992) Retinal ganglion cell loss after different types of axotomy in the optic nerve. M.Sc. Thesis. McGill University. Montreal. Canadá
- Berkelaar M., Bray G.M. and A.J. Aguayo (1991) Retrograde effects of axotomy by cut or crush of the adult rat optic nerve. *Soc. Neurosci. Abstr.* Vol. **17**: 555.
- Berkelaar M., Clarke D.B., Wang Y.C., Bray G.M. and A.J. Aguayo (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* Vol. **14**: 4368-4374.
- Berkemeier L.R., Winslow J.W., Kaplan D.R., Nikolics K., Goeddel D.V. and Rosenthal A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*. Vol. **7**: 857-866.
- Bernier P.J. and A. Parent (1998) Bcl-2 Protein as a marker of neuronal immaturity in postnatal primate brain. *J. Neurosci.* Vol. **18**(7): 2486-2497.
- Bhät R.V., DiRocco R., Marcy V.R., Flood D.G., Zhu Y., Dobrazanski P., Siman R., Scott R., Contreras P.C. and M. Miller (1996). Increased expression of IL-1B converting enzyme in hippocampus after ischemia: selective localization in microglia. *J. Neurosci.* Vol. **16**: 4146-4154.
- Bock F., Dornand J. and G. Rondouin (1996) Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *NeuroReport*. Vol. **7**(6): 1125-1129.
- Bodeutsch N., Siebert H., Dermon C. and S. Thanos (1999) Unilateral injury of the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. *J. Neurobiol.* Vol. **38**(1): 116-128.
- Boise L.H, González-García M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka, L.A., Mao X., Nuñez G. and C.B Thompson (1993) Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. Vol. **74**(4): 597-

608.

- Boje K.M. and P.K. Arora (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* Vol. **587**(2): 250-256.
- Bondy C.A. (1991) Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally-related central projection neurons. *J. Neurosci.* Vol. **11**: 3442-3455.
- Bonfanti L., Strettoi E., Chierzi S., Cenni M.C., Liu X.H., Martinou J.C., Maffei L. and S.A. Rabacchi (1996) Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-induced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing bcl-2. *J. Neurosci.* Vol. **16**: 4186-4194.
- Bosco A. and R. Linden (1999) BDNF and NT-4 differentially modulate neurite outgrowth in developing retinal ganglion cells. *J. Neurosci. Res.* Vol. **57**: 759-769.
- Boulakia C.A., Chen G., Ng F.W., Teodoro J.G., Branton P.E., Nicholson D.W., Poirier G.G. and G.C. Shore (1996) Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDa protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. *Oncogene.* Vol. **12**(3): 529-535.
- Bovolenta P., Frade J.M., Martí E., Rodríguez-Peña M.A., Barde Y.A. and A. Rodríguez-Tébar (1996) Neurotrophin-3 antibodies disrupt the normal development of the chick retina. *J. Neurosci.* Vol. **16**: 4402-4410.
- Boya J., Calvo J. and A. Prado (1979) The origin of microglial cells. *J. Anat.* Vol. **129**: 177-186.
- Boya J., Calvo J. and A.L. Carbonell (1987) Appearance of microglial cells in the postnatal rat retina. *Arch. Histol. Jap.* Vol. **50**(2): 223-228.
- Boycott B.B. and J.M. Hopkins (1981) Microglia in the retina of monkey and other mammals; its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neurosci.* Vol. **6**(4): 679-688.
- Boyd J.M., Gallo G.J., Elangovan B., Houghton A.B., Malstrom S., Aver R.G., Subramanian T., Chittenden T., Lutz R.J., et al. (1995) Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene.* Vol. **11**(9): 1921-1928.
- Bozyczko-coyne D., Glicksman M.A., Prantner J.E., McKenna B., Connors T., Friedman C., Dasgupta M. and N.T. Neff (1993) IGF-I supports the survival and/or differentiation of multiple types of central nervous system neurons. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Vol. **692**: 311-313.
- Bray G.M., Villegas-Pérez M.P., Vidal-Sanz M. and A.J. Aguayo (1992) Death and survival of axotomized retinal ganglion cells. En *"Regeneration and plasticity in*

- the mammalian visual system".* (Ed. D. Man-Kit Lam and G.M. Bray) MIT press: 29-45.
- Brierley J.B. and A.W. Brown (1982) The origin of lipid phagocytes in the central nervous system. I. The intrinsic microglia. *J. Comp. Neurol.* Vol. **211**(4): 397-406.
- Buck C.R., Martínez H.J., Black I.B. and M.V. Chao (1987) Developmentally regulated expression of the nerve growth factor receptor gene in the periphery and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **84**(9): 3060-3063.
- Burne J.F., Staple J.K. and Raff M.C. (1996) Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *J Neurosci.* Vol. **16**(6): 2064-2073.
- Burren C.P., Berka J.L., Edmondson S.R., Werther G.A. and J.A. Batch (1996) Localization of mRNAs for insulin-like growth factor-1(IGF-1), IGF-1 receptor, and IGF binding proteins in rat eye. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* Vol. **37**(7): 1459-1468.
- Bursch W., Kleine L. And M. Tenniswood (1990) The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* Vol. **68**: 1071-1074.
- Buttke T.M. and P.A. Sandstrom (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today.* Vol. **15**(1): 7-10.
- Cabelli R.J., Hohn A. and C.J. Shatz (1995) Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science.* Vol. **267**: 1662-1666.
- Calvaruso G., Vento R., Giuliano M., Lauricella M., Gerbino E. and Tesoreiro (1996) Insulin-like growth factors in chick embryo retina during development. *Regul. Pept.* Vol. **61**(1): 19-25.
- Caminos Benito, M.E. (1998) Localización de las Neurotrofinas y sus receptores en el sistema visual: efecto de la regeneración del nervio óptico de la tenca. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Cammermeyer J. (1970a) The life history of the microglia cell: a light microscopic study. En *"Neuroscience Research"*. (Ed. S. Ehrenpreis and O.C. Solnitzky). Academic Press., New York. Vol. **3**: 44-129.
- Carmignoto G., Comelli M-C., Candeo P., Cavicchioli L., Yan Q., Merighi A. and L. Maffei (1991) Expression of NGF receptor and NGF mRNA in the developing and adult rat retina. *Exp. Neurol.* Vol. **111**: 302-311.
- Carmignoto G., Maffei L., Candeo P., Canella R., and C. Comeli (1989) Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J. Neurosci.* Vol. **9**(4): 1263-1272.
- Casciola-Rosen L., Nicholson D.W., Chong T., Rowan K.R., Thornberry N.A., Miller

- D.K. and A. Rosen (1996) Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J.Exp. Med.* Vol. **183**: 1957-1964.
- Castellano B. and B. González (1996) Las células de microglía: origen, diferenciación y función en el cerebro normal. *Boletín SENC.* Vol.**5**(1): 2-6.
- Castellano B., Gonzalez B., Dalmau I. and JM. Vela (1991c) Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of the lizard: a histochemical study. *J. Comp. Neur.* Vol. **311**: 434-444.
- Castellano B., González B., Finsen B.R. and J. Zimmer (1990) Histochemical demonstration of purine nucleoside phosphorylase (PNPase) in microglial and astroglial cells of adult rat brain. *J. Histochem. Cytochem.* Vol. **38**(11): 1535-1539.
- Castellano B., González B., Jensen M.B., Pedersen E.B., Finsen B.R. and J. Zimmer (1991b) A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. *J. Histochem. Cytochem.* Vol. **39**(5): 561-568.
- Castellano O., Martínez-Martí L. and L. Gómez-Fernández (1998) *Rev. Neurol.* Vol. **26**(154): 1032-1039.
- Castillo B., del Cerro M., Breakefield X.O., Frim D.M., Barnstable C.J., Dean D.O. and Bohn M.C. (1994) Retinal ganglion cell survival is promoted by genetically modified astrocytes designed to secrete brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Brain Res.* Vol. **647**(1): 30-36.
- Castrén E., Ohga Y., Berzaghi M.P., Tzimagiorgis G., Thoenen H. and D. Lindholm (1994) Bcl-2 messenger mRNA is localized in neurons of the developing and adult rat brain. *Neuroscience.* Vol. **61**(1): 165-177.
- Castrén E., Zafra F., Thoenen H. and D. Lindholm (1992) Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **89**: 9444-9448.
- Cellerino A. and K. Kohler (1997) Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is located on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in vertebrate retina. *J. Comp. Neurol.* Vol **386**: 149-160.
- Cellerino A. and L. Maffei (1996) The action of neurotrophins in the development and plasticity of the visual cortex. *Progr. Neurobiol.* Vol. **49**: 53-71.
- Cenni M.C., Bonfati L., Martinou J.C., Ratto G.M., Strettoi E. and L. Maffei (1996) Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult bcl-2 transgenic mice. *J Neurosci.* Vol. **8**: 1735-1745.
- Cerretti D.P., Kozlosky C.J., Mosley B., Nelson V., Van Ness K., Greenstreet T.A.,

- March C.J., Kronheim S.R., Druck T., Cannizzaro L.A. et al (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. Vol. **256**(5053): 97-100.
- Chakrabarti S., Sima A.A.F., Lee J., Brachet P. and E. Dicou (1990) Nerve growth factor (NGF) proNGF and NGF receptor-like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res*. Vol. **523**: 11-15.
- Chakraborti D., Das S., Mondal M. Roychoudhury S. and S. Chakraborti (1999) Oxidant, mitochondria and calcium. *Cell Signal*. Vol. **11**(2): 77-85.
- Chang G.Q., Hao Y. and F. Wong (1993) Apoptosis: final common pathways in photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron*. Vol. **11**: 595-605.
- Chao C.C., Hu S., Molitor T.W., Shaskan E.G. and P.K. Peterson (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol*. Vol. **149**(8): 2736-2741.
- Chao M.V. (1992) Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron*. Vol. **9**: 583-593.
- Chao M.V., Bothwell M.A., Ross A.H., Koprowski H., Lanahan A.A., Buck C.R. and A. Sehgal (1986) Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science*. Vol. **232**: 518-521.
- Chaudhary P., Ahmed F., Quebada P and S.C. Sharma (1999) Caspase inhibitors blocks the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Brain Res. Mol. Brain Res*. Vol. **67**(1): 36-45.
- Chen D.F., Jhaveri S. and G.E. Schneider (1995) Intrinsic changes in developing retinal neurons result in regenerative failure of their axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **92**: 7287-7291.
- Chen D.F., Schneider G.E., Martinou J.C. and Tonegawa S. (1997) Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature*. Vol. **385**: 434-439.
- Chen J., Flannery J.G., La Vail M.M., Steinberg R.H., Xu J. and M.I. Simon (1996) Bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **93**(14): 7042-7047.
- Chen J., Graham S.H., Chan P.H., Lan J., Zhou R.L. and R.P. Simon (1995) Bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in transgenic mice. *Neuroreport*. Vol. **6**(2): 394-398.
- Chen S.T., Garey L.J. and L.S. Jen (1994) Bcl-2 proto-oncogene protein immunoreactivity in normally developing and axotomised rat retinas. *Neurosci. Letters* Vol. **172**(1-2): 11-14.
- Cheng B. and M.P. Mattson (1991) NGF and bFGF protect rat hippocampal and

- human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron*. Vol. **7**: 1031-1041.
- Cheng E.H.Y., Levine B., Boise L.H., Thompson C.G. and J.M. Hardwick (1996) Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-xL. *Nature*. Vol. **379**: 554-556.
- Chen-Levy Z., Nourse J. and M.L. Cleary (1989) The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Mol. Cell Biol*. Vol. **9**: 701-710.
- Chierzi S., Cenni M.C., Maffei L., Pizzorusso T., Porciatti V., Ratto G.M. and E. Strettoi (1998). Protection of retinal ganglion cells and preservation of function after optic nerve lesion in bcl-2 transgenic mice. *Vision Res*. Vol. **38**(10): 1537-43.
- Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B., Ebb R.G., Gallo G.J., Elangovan B., Chinnadauri G. and R.J. Lutz (1995a) A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J*. Vol. **14**: 5589-5596.
- Chittenden T., Harrington E.A., O'Connor R., Flemington C., Lutz R.J., Evan G.I. and B.C. Guild (1995b) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*. Vol. **374**: 733-736.
- Clark R.S., Chen J., Watkins S.C., Kochanek P.M., Chen M., Stetler R.A., Loeffert J.E. and S.H. Graham (1997) Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. Vol. **17**(23): 9172-9182.
- Cleary M.L. and J. Sklar (1985) Nucleotide sequence of t(14; 18) of chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus of chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **82**: 7439-7443.
- Cleland B.G. and W.R. Levick (1974) Properties of rarely encountered types of ganglion cells in the cat's retina and an overall classification. *J. Physiol*. Vol. **240**(2): 457-492.
- Clemmons D.R. (1990) Insuline-like growth factor binding protein. *Trends Endocrinol. Metab*. Vol. **1**: 412-417.
- Clemmons D.R., Busby W.H., Arai T., Nam T.J., Clarke J.B., Jones J.I. and D.K. Ankrapp (1995) Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Prog. Growth Factor Res*. Vol. **6**(2-4): 357-366.
- Cohen J.J., Duke R.C., Fadok V.A. and K.S. Sellins (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol*. Vol. **10**: 267-293.
- Cohen P. and R.G. Rosenfeld (1994) Physiologic and clinical relevance of the insulin-like growth factor binding proteins. *Curr. Opin. Pediatr*. Vol. **6**(4): 462-467.

- Cohen S. (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Biochemistry*. Vol. **46**: 302-311.
- Cohen-Cory S. (1999) BDNF modulates, but does not mediate, activity-dependent branching and remodeling of optic axon arbors in vivo. *J. Neurosci*. Vol. **19**(22): 9996-10003.
- Collazo D., Takahashi H. and R.D.G. McKay (1992) Cellular targets and trophic functions of neurotrophin-3 in the developing rat hippocampus. *Neuron*. Vol. **9**: 643-656.
- Colton C.A. and D.L. Gilbert (1987) Production of superoxide anion by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett*. Vol. **223**(2): 284-288.
- Cordon-Cardo C., Tapley P., Jing S., Nanduri V., O'Rourke E., Lamballe F. Kovary K., Klein R., Jones K.R., Reichardt L.F. and M. Barbacid (1991) The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell*. Vol. **66**: 173-183.
- Cowan W.M., Fawcett J.W., O'Leary D.D.M. and B.B. Stanfield (1984) Regressive events in neurogenesis. *Science*. Vol. **225**: 1258-1265.
- Cregan S.P., MacLaurin J., Craig C.G., Robertson G.S., Nicholson D.W., Park D.S. and R.S. Slack (1999) Bax dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci*. Vol. **19**(18): 7860-7869.
- Crowley C., Spencer S.D., Nishimura M.C., Chen K.S., Pitts-Meek S., Armanini M.P., Ling L.H., McMahon S.B., Shelton D.L., Levinson A.D. and H.S. Philips (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*. Vol. **76**: 1001-1011.
- Cuadros M.A., Martin C., Coltey P., Almendros A. and J. Navascués (1993) First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J. Comp. Neurol*. Vol. **330**: 113-129.
- Cuadros M.A., Rodríguez-Ruiz J., Calvente R., Almendros A., Marín-Teva J.L. and J. Navascués (1997) Microglial Development in the Quail Cerebellum. *J. Comp. Neurol*. Vol. **389**: 390-401.
- Cuadros M.A., Moujahid A., Quesada A., and J. Navascués (1994). Development of microglia in the quail optic tectum. *J. Comp. Neur*. Vol. **348**: 207-224.
- Cusick C.G. and R.D. Lund (1982) Modification of visual callosal projections in rats. *J. Comp. Neurol*. Vol. **212**: 385-398.
- Czech M.P., Lewis R.E. and S. Corvera (1989) Multifunctional glycoprotein receptors

- for insulin and the insulin-like growth factors. *Ciba Found Symp.* Vol. **145**: 27-41: discussion 42-44.
- Dalmau I., Finsen B., Tonder N., Zimmer J., González B. and B. Castellano (1997) Development of microglia in the prenatal Rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* Vol. **377**: 70-84.
- Danias J. and F. Stylianopoulou (1990) Expression of IGF-I and IGF-II genes in the rat adult eye. *Curr. Eye Res.* Vol. **9**(4): 379-386.
- Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. and M.E. Greenberg (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* Vol. **91**: 231-241.
- Davies A.M. (1995) The Bcl-2 family of proteins, and the regulation of neuronal survival. *TINS.* Vol. **18**(8): 355-358.
- Davies A.M., Lee K.F. and R. Jaenisch (1993) p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not of other neurotrophins. *Neuron.* Vol. **11**: 565-574.
- Davies A.M., Thoenen H. and Y.A. Barde (1986) Different factors from the central nervous system and periphery regulate the survival of sensory neurons. *Natur.* Vol. **319**: 497-502.
- De la Rosa E. J., Bondy C.A. , Hernández-Sánchez, C., Wu X., Zhou J., López-Carranza A., Scavo L.M. and F. De Pablo (1994b) Insulin and insulin-like growth factor system componentes gene expression in the chicken retina from early neurogenesis until late development and their effect on neuroepithelial cells. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **6**: 1801-1810.
- De la Rosa E.J., Arribas A., Frade J.M. and A. Rodríguez-Tébar (1994a) Role of neurotrophins in the control of neural development: neurotrophin-3 promotes both neuron differentiation and survival of cultured chick retinal cells. *Neurosci.* Vol. **58**(2): 347-352.
- De la Rosa E.J., Vega-Núñez E., Morales A.V., Serna J., Rubio E. and F. De Pablo (1998) Modulation of the chaperone heat-shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **95**: 9950-9955.
- De Pablo F., Scott L.A. and J. Roth (1990) Insulin and insulin like growth factors in early development: peptides, receptors and biological events. *Endocrine Rev.* Vol. **11**: 558-577.
- Deckwerth T.L., Elliot J.L., Knudson C.M., Johnson E.M: Jr., Snider W.B. and S.J: Korsmeyer (1996) Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron.* Vol. **17**: 401-411.

- Del Cerro M., Jiang L.Q., Wiegand S.J. and E. Lazar (1990) In vivo staining of the mammalian retina by means of a simple fluorescent method. *J. Neurosci. methods*. Vol. **32**:81-86.
- Del Río Hortega (1932) Microglía. En *"Cytology and cellular pathology of the nervous system"*. (Ed. W. Penfield. Paul B.) Hoebner Inc., New York. Vol. **2**: 482-534.
- Del Río Hortega P. (1920) Estudios sobre la neuroglía. La microglía y su transformación en células de bastoncitos y cuerpos gránulo-adiposos. *Trab. Lab. Inves. Biol. Madrid*. Vol. **18**: 37-82.
- Del Río Hortega P. (1921a) El tercer elemento de los centros nerviosos. Histogénesis y evolución normal; éxodo y distribución normal de la microglía. *Memorias de la R. Soc. Esp. His. Nat.* Vol. **11**: 213-268.
- Di Polo A., Aigner L.J., Dunn R.J. Bray G.M. and A.J. Aguayo (1998) Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **95**: 3978-3983.
- Díaz B., Serna J., de Pablo, F. and E.J. de la Rosa (2000) In vivo regulation of cell death by embrionic (pro)insulin and insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Dev.* Vol. **127**(8): 1641-1649.
- Dickson D.W. and L.A. Mattiace (1989) Astrocytes and microglia in human brain share an epitope recognized by a B-lymphocyte-specific monoclonal antibody (LN-1). *Am. J. Pathol.* Vol. **135**: 135-147.
- Dickson D.W., Lee S.C., Mattiace L.A. Yen S.H.C. and C. Brosnan (1993) Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia*. Vol. **7**: 75-83.
- Dickson D.W., Mattiace L.A., Kure K., Hutchins K., Lyman W.D. and C.F. Brosnan (1991) Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immune deficiency syndrome. *Lab. Invest.* Vol. **64**(2): 135-156.
- Domenici L., Berardi N., Carmignoto G., Vantini G. and L. Maffei (1991a) Nerve growth factor prevents the amblyopic effects of monocular deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **88**: 8811-8815.
- Domenici L., Gravina A., Berardi N. and L. Maffei (1991b). Different effects of intracranial and intraorbital section of the optic nerve on the functional responses of rat retinal ganglion cells. *Exp. Brain Res.* Vol. **86**: 579-584.
- Dräger U.C., Edwards D.L. and C.J. Barnstable (1984) Antibodies against filamentous components in discrete cell types of the mouse retina. *J. Neurosci.* Vol. **4**: 2025-2042.
- Dreher B., Potts R.A., Ni S.Y.K. and M.R. Bennet (1984) The development of heterogeneities in distribution and soma sizes of rat retinal ganglion cells. En

- "Development of visual pathways in mammals" (Ed. Alan R. Liss) New York: 39-57.
- Dreher B., Sefton A.J., Ni S.Y.K. and G. Nisbett (1985) The morphology, number and distribution of class I cells in the retina of the albino and hooded rat. *Brain Behav. Evol.* Vol. **26**: 10-48.
- Dreher, 1981
- Duan H., Orth K., Chinnaiyan A.M., Poirier G.G., Froelich C.J., He W.W. and D.M. Dixit (1996) ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J. Cell Biol.* Vol. **271**(28): 16720-16724.
- Dubois-Dauphin M., Frankowski H., Tsujimoto Y. and J. Huarte (1994) Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **91**: 3309-3313.
- Ebadi M., Bashir R.M., Heidrick M.L., Hamada F.M., El Rafey H., Hamed A., Helal G., Baxi D., Cerutis D.R. and N.K. Lassi (1997) Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Int.* Vol. **30**(4-5): 347-374.
- Elkabes S. DiCicco-Bloom E.M. and I.B. Black (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J. Neurosci.* Vol. **16**(8): 2508-2521.
- Elkabes S., Peng L. and I.B. Black (1998) Lypopolisaccharide differentially regulates microglial Trk receptors and neurotrophins expression. *J. Neurosci. Res.* Vol. **54**: 117-122.
- Ellis H.M. and H.R. Horvitz (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell.* Vol. **44**: 817-829.
- Ellis R.E., Yuan J. and H.R. Horvitz (1991) Mechanism and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* Vol. **7**: 663-698.
- Enari M., Talanian R.V., Wong W.W. and S. Nagata (1996) Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature.* Vol. **380**(6576): 723-726.
- Ernfors P., Ibáñez C.F., Ebendal T., Olson L. and H. Persson (1990a) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: Developmental and topographical expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **87**: 5454-5458.
- Ernfors P., Lee K.F., Kucera J. and R. Jaenisch. (1994b) Lack of neurotrophin-3 lead to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell.* Vol. **77**: 503-512.

- Ernfors P., Merlio J.P. and H. Persson (1992) Cells expressing mRNA for neurotrophins and their receptors during embryonic rat development. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **4**: 1140-1158.
- Ernfors P., Wetmore C., Olson L. and H. Persson (1990b) Identification of cells in the rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.* Vol. **5**: 511-526.
- Fabian I. and M. Aronson (1978) Monoamine oxidase activity of macrophages at rest and during phagocytosis. *Biochem. Pharmacol.* Vol. **27**: 1909-1911.
- Fang W., Rivard J.J., Ganser J.A. LeBien T.W., Nath K.A., Mueller D.L. and T.W. Behrens (1995) Bcl-xL rescues WEHI 231 B lymphocytes from oxidant-mediated death following diverse apoptotic stimuli. *J. Immunol.* Vol. **155**: 66-75.
- Fariñas I., Jones K.R., Backus C., Wang X.Y. and L.F. Reichardt (1994) Severe sensory and sympathetic deficits in mice lacking NT-3. *Nature.* Vol. **369**: 658-661.
- Farlie P.G., Dringer R., Rees S.M., Kannaourakis G. and O. Bernard (1995) Bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **92**: 4397-4401.
- Farrow S.N., White J.H.M., Martinou I., Raven T., Pun K.T. Grinham C.J., Martinou J.C. and R. Brown (1995) Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature.* Vol. **374**: 731-733.
- Faucheux C., Blanchet A.M., Collard-Dutilleul V., Lalanne J.L. and Diu-Hercend A. (1996) Identification of a cysteine protease closely related to interleukin-1 beta-converting enzyme. *Eur. J. Biochem.* Vol. **236**(1): 207-213.
- Feldman E.L., Sullivan K.A., Kim B. and J.W. Russell (1997) Insulin-like growth factors regulate neuronal differentiation and survival. *Neurobiology of Disease.* Vol. **4**: 201-214.
- Fernandes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M. Wang L., Bullrich F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G. and E.S. Alnemri (1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **93**(15): 7464-7469.
- Fernandes-Alnemri T., Litwack G. and E.S. Alnemri (1994) CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian Interleukin-1 β -converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. **269**(49): 30761-30764.
- Fernandes-Alnemri T., Litwack G. and E.S. Alnemri (1995a) Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Res.* Vol.

55(13): 2737-2742.

- Fernandes-Alnemri T., Takahashi A., Armstrong R., Krebs J., Fritz L., Tomaselli K.J., Wang L., Yu Z., Croce C.M., Salveson G. et al (1995) Mhc3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* Vol. **55**(24): 6045-6052.
- Ferrer I., Bernet E., Soriano E., del Río T. and M. Fonseca (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neurosci.* Vol. **39**(2): 451-458.
- Fiebich B.L., Biber K., Lieb K., van Calker D., Berger M., Bauer J. and P.J. Gebicke-Haerter (1996) Cyclooxygenase-2 expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. *Glia.* Vol. **18**(2): 152-160.
- Finsen B.R., Jorgensen M.B., Diemer N.H. and J. Zimmer (1993) Microglial MHC antigen expression after ischemic and kainic acid lesions of the adult rat hippocampus. *Glia.* Vol. **7**(1): 41-49.
- Fournier A.E. and L. McKerracher (1997) Expression of specific tubulin isotypes increases during regeneration of injured CNS neurons, but not after the application of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *J. Neurosci.* Vol. **17**(12): 4623-4632.
- Fournier A.E., Beer J., Arregui C.O., Essagian C., Aguillo A.J. and L McKerracher (1997) Brain-derived neurotrophic factor modulates GAP-43 but not T-alpha1 expression in injured retinal ganglion cells of adult rats. *J. Neurosci. Res.* Vol. **47**(6): 561-572.
- Foyouzi-Youssefi R., Arnaudeau S., Borner C., Kelley W.L., Tschopp J.L., Demareux N. and K.H. Krause (2000) Bcl-2 decreases the free Ca^{2+} concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **97**(11): 5723-5728.
- Frade J.M. and Y.A. Barde (1999) Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Dev.* Vol. **126**: 683-690.
- Frade J.M. and Y.V. Barde (1998) Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron.* Vol. **20**: 35-41.
- Frade J.M., Marti E., Bovolenta P., Rodríguez-Pena M.A. Pérez García, Rohrer H. Edgar D. and A. Rodríguez-Tébar (1996) Insuline-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick by regulating expression of the alpha 6 integrin subunit. *Dev.* Vol. **122**(8): 2497-2506.
- Frank L., Ventimiglia R., Anderson K., Lindsay R.M. and J.S. Rudge (1996) BDNF down-regulates neurotrophin responsiveness, TrkB protein and TrkB mRNA levels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **8**(6): 1220-

1230.

- Frankowski H., Misotten M., Fernández P.A., Martinou I., Michel P., Sadoul R. and J.C. Martinou (1995) Function and expression of the bcl-x gen in the developing and adult nervous system. *Neuroreport*. Vol. **6**: 1917-1921.
- Frei K., Leist T.P., Meager A., Gallo P., Leppert D., Zinkernagel R.M. and A. Fontana (1988) Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon γ in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis. *J. Exp. Med.* Vol. **168**: 449-453.
- Friedman B., Kleinfeld D., Ip N.Y., Verge V.M., Moulton R. and P. Boland (1995) BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. *J. Neurosci.* Vol. **15**(2): 1044-1056.
- Frisén, J. Verge V.M.K., Fried K., Risling M., Persson H., Trotter J., Hökfelt T. and D. Lindholm (1993) Characterization of glial trkB receptors: Differential response to injury in the central and peripheral nervous system. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **90**: 4971-4975.
- Fujimoto E., Miki A. and H. Mizogutti (1987) Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks. *Histochem.* Vol. **87**: 209-216.
- Fujita S. and T. Kitamura (1976) Origin of brain macrophages and the nature of the microglia. En *"Progress in Neuropathology"*. (Ed. Zimmerman H.M.) Grune and Stratton, New York. Vol. **3**: 1-50.
- Fukuda Y. (1977) A three group classification of rat retinal ganglion cells: histological and fisiological studies. *Brain Res.* Vol. **119**: 327-334.
- Fukuda Y., Sugimoto T. and T. Shirokawa (1982) Strain differences in quantitative analysis of the rat optic nerve. *Exp. Neurol.* Vol. **75**: 525-532.
- Funakoshi H., Frisén J., Barbany G., Timmusk T., Zachrisson O., Verge V.M.K. and H. Persson (1993) Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J. Cell Biol.* Vol. **123**: 455-465.
- Gallego Fernández A. (1976) La microglía de la retina. *Anales de la Real Acad. Nac. de Med.* Vol. **13**(3):394-407.
- Ganter S., Northoff H., Mannel D. and P.J. Gebicke-Harter (1992) Growth control of cultured microglia. *J. Neurosci. Res.* Vol. **33**(2): 218-230.
- Gao H., Qiao X., Hefti F., Hollyfield J.G. and B. Knusel (1997) Elevated mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in retinal ganglion cell layer after optic nerve injury. *Inves. Ophthal. Vis. Sci.* Vol. **38**(9): 1840-1847.
- García I., Martinou I., Tsujimoto Y. and J.C. Martinou (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogen. *Science*. Vol.

258: 302-304.

- García-Segura L.M., Chowen J.A. and F. Naftolin (1996) Endocrine cells: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. *Frontiers in neuroendocrinology*. Vol. **17**: 180-211.
- García-Valenzuela E., Gorzyca W., Darzynkiewicz Z. and S.C. Sharma (1994) Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J. Neurobiol.* Vol. **25**(4): 431-438.
- Gebicke-Haerter P.J., Christoffel F., Timmer J., Northoff H., Berger M. and D. Vancalker (1996) Both adenosine A1 and A2 receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochem. Int.* Vol. **1**: 37-42.
- Gehrmann J. and G.W. Kreutzberg (1991) Characterisation of two new monoclonal antibodies directed against rat microglia. *J. Comp. Neurol.* Vol. **313**: 409-430.
- Gehrmann J. and R.B. Banati (1995) Microglial Turnover in the Injured CNS: Activated microglia undergo delayed DNA fragmentation following peripheral nerve injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* Vol. **54**(5): 680-688.
- Gehrmann J., Banati R.B., Wiessner C., Hossmann K.A. and G.W. Kreutzberg (1995) Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage?. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* Vol. **21**(4): 277-289.
- Gehrmann J., Gold R., Linington C., Lannes-Vieira J., Wekerle H. and G.W. Kreutzberg (1992) Spinal cord microglia in experimental allergic neuritis: Evidence for fast and remote activation. *Lab. Invest.* Vol. **67**(1): 100-113.
- Giestal de Araujo E. and R. Linden (1993) Trophic factors produced by retinal cells increase the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **5**: 1181-1188.
- Gilad G.M. and V.H. Gilad (1995) Chemotaxis and accumulation of nerve growth factor by microglia and macrophages. *J. Neurosci. Res.* Vol. **41**(5): 594-602.
- Giulian D. (1990) Microglia, cytokines and cytotoxins: modulator of cellular responses after injury to the central nervous system. *J. Immunol. Immunopharmacol.* Vol. **10**: 15-21.
- Giulian D. (1993) Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia.* Vol. **7**(1): 102-110.
- Giulian D. and D.G. Young (1986) Brain peptides and glial growth. II. Identification of cells that secrete glia-promoting factors. *J. Cell Biol.* Vol. **102**: 812-820.
- Giulian D. and T.J. Baker (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.* Vol. **6**(8): 2163-2178.
- Giulian D., Baker T.J., Shin L.N. and L.B. Lachman (1986) Interleukin-1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J. Exp. Med.* Vol. **164**: 594-

604.

- Giulian D., Johnson B., Krebs J.F., George J.K. and M. Tapscott (1991) Microglial mitogens are produced in the developing and injured mammalian brain. *J. Cell Biol.* Vol. **112**(2): 323-333.
- Giulian D., Vaca K. and C.A. Noonan (1990) Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science.* Vol. **250**: 1593-1596.
- Giulian D., Vaca K. and M. Corpuz (1993) Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J. Neurosci.* Vol. **13**(1): 29-37.
- Giulian D., Woodward J., Krebs J. and L.B. Lachman (1988b) Intracerebral injection of interleukin-1 stimulation of astrogliosis and neovascularization. *J. Neurosci.* Vol. **8**: 709-714.
- Giulian D., Young D.G., Woodward J., Brown D.C. and L.B. Lachman (1988a) Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *The J. Neurosci.* Vol. **8**(2): 709-714.
- Glass D.J. and G.D. Yancopoulos (1993) The neurotrophins and their receptors. *Trends in Cell Biology.* Vol. **3**: 262-268.
- Glenn J.A., Booth P.L. and W.E. Thomas (1991) Pinocytotic activity in ramified microglia. *Neurosci. Letters* Vol. **123**: 27-31.
- González-García M., García I., Ding L., O'shea S., Boise L.H., Thompson G.B. and G. Núñez (1995) Bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **92**(10): 4304-4308.
- González-García M., Pérez-Ballester F., Ding L., Duang L., Boise L.H., Thompson C.B. and G. Nuñez (1994) Bcl-xL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development.* Vol. **120**: 3033-3042.
- Götz R., Köster R. and C. Winkler (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* Vol. **372**: 266-269.
- Götz R., Raulf F. and M. Schart (1992) Brain derived neurotrophic factor is more highly conserved structure and function than nerve growth factor during vertebrate evolution. *J. Neurochem.* Vol. **59**(2): 432-442.
- Graeber M.B. and W.J. Streit (1990) Perivascular microglia defined. *Tins.* Vol. **13**(9): 336.
- Graeber M.B., Streit W.J. and G.W. Kreutzberg (1988b) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.* Vol. **21**: 18-24.
- Graeber M.B., Tetzlaff W., Streit W.J. and G. Kreutzberg (1988a) Microglial cells but

- not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy. *Neurosci. Letters*. Vol. **85**: 317-321.
- Gras P., Kawai P., Siedlak S., Muihivill P., Gamnetti P., Loweri D., Dewhitt-Gonzalez P., Greenberg B. and G. Perry (1990) Neuronal and microglial involvement of beta-amyloid deposition in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* Vol. **137**: 141-146.
- Green D. and G. Kroemer (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?. *Trends Cell Biol.* Vol. **8**(7): 267-271.
- Green D.R. and J.C. Reed (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*. Vol. **281**(5381): 1309-1312.
- Gu Q. (1995) Involvement of nerve growth factor in visual cortex plasticity. *Rev. Neurosci.* Vol. **6**: 329-351.
- Hadjidakis D.J. and S.A. Raptis (1992) Proinsulin as a possible therapeutic agent. *Horm. Metab. Res. Suppl.* Vol. **26**: 131-137.
- Hallböök F., Bäckström A., Kullander K., Ebendal T. and N.G. Carri (1996a) Expression of neurotrophins and TrK receptors in the avian retina. *J. Comp. Neurol.* Vol. **364**: 664-676.
- Hallböök F., Ebendal T. and N.G. Carri (1996b) Neurotrophins in the developing avian visual system. : 141-151.
- Hallböök F., Ibáñez C.F. and H. Persson (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*. Vol. **6**: 845-858.
- Han J., Sabbatini P. and E. White (1996) Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol. Cell Biol.* Vol. **16**(10): 5857-5864.
- Hanada M., Aime-Sempe C., Sato T. and J.C. Reed (1995) Structure-function analysis of Bcl-2 protein: Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem.* Vol. **270**(29): 11962-11969.
- Heck S., Lezoualc'h F., Engert S. and C. Behl (1999) Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor KappaB. *J. Biol. Chem.* Vol. **274**(14): 9828-9835.
- Heese K., Fiebich B.L., Bauer J. and U. Otten (1997) Nerve Growth Factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A_{2a}-receptors. *Neurosci. Letters*. Vol. **231**: 83-86.
- Heese K., Fiebich B.L., Bauer J. and U. Otten (1998b) NF-Kb modulates lipopolysaccharide-induced microglial nerve growth factor expression. *Glia*.

Vol. **22**: 401-407.

- Heese K., Hock C. and U. Otten (1998a) Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J. Neurochem.* Vol. **70**(2): 699-707.
- Hefti F. (1986) Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J. Neurosci.* Vol. **6**: 2155-2162.
- Hefti F., Hartikka J. and B. Knusel (1989) Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging.* Vol. **10**: 515-553.
- Hempstead B.L., Martín-Zanca D., Kaplan D.R., Parada L.F. and M.V. Chao (1991) High affinity NGF binding requires co-expression of trk proto-oncogene product and the low affinity NGF receptor. *Nature.* Vol. **350**: 678-683.
- Hempstead B.L., Patil N., Thiel B. and M.V. Chao (1990) Deletion of cytoplasmic sequences of the nerve growth factor receptor leads to loss of high affinity binding. *J. Biol. Chem.* Vol. **265**(17): 9595-9598.
- Hendry I.A. (1975a) The effects of axotomy on the development of the rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* Vol. **90**(2): 235-244.
- Hendry I.A. (1975b) The response of adrenergic neurones to axotomy and nerve growth factor. *Brain Res.* Vol. **94**(1): 87-97.
- Hengartner M.O., Ellis R.E. and H.R. Horvitz (1992) *Caenorhabditis elegans* gen ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature.* Vol. **356**: 494-499.
- Hernández-Sánchez C., López-Carranza A., Alarcón A., de la Rosa E.J. and F. De Pablo (1995) Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **92**: 9834-9838.
- Herzog K.H. and C.S. von Bartheld (1997) Contributions of the optic tectum and the retina as sources of BDNF for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J. Neurosci.* Vol. **18**(8): 2891-2906.
- Hickey W.F. and H. Kimura (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science.* Vol. **239**: 290-292.
- Hockenbery D., Núñez G., Millman C., Schreiber R.D. and S.J. Korsmeyer (1990b) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* Vol. **348**(6299): 334-336.
- Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Millman C.L. and S.J. Korsmeyer (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* Vol. **75**: 241-251.
- Hockenbery D.M., Zutter M., Hickey W., Nahm M., and S.J. Korsmeyer (1991) Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell

- death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. **88**: 6961-6965.
- Hofer M.M. and Y.A. Barde (1988) Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death *in vivo*. Nature. Vol. **331**(21): 261-262.
- Hofer M.M., Pagliusi S.R., Hohn A., Leibrock J. and Y.A. Barde (1990) Regional distribution of brain derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. EMBO J. Vol. **9**: 2459-2464.
- Hohn A., Leibrock J., Bailey K. and Y.A. Barde (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. Nature. Vol. **344**: 339-341.
- Hu B., Yip H.K. and K.F. So (1998) Localization of p75 neurotrophin receptor in the retina of the adult SD rat: An immunocytochemical study at light and electron microscopic levels. Glia. Vol. **24**: 187-197.
- Hu Y., Benedict M.A., Wu D., Inohara N. and G. Núñez (1998) Bcl-xL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. **95**(8): 4386-4391.
- Huang D.C.S., Adams J.M. and S. Cory (1998) The conserved n-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. The EMBO Journal. Vol. **17**(4): 1029-1039.
- Hume D.A., Perry H.V. and S. Gordon (1983) Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. J. Cell Biol. Vol. **97**: 253-257.
- Humphrey M.F. and S.R. Moore (1995) Strain differences in the distribution of NDPase labelled microglia in the normal rabbit retina. Glia. Vol. **15**: 367-376.
- Humphrey M.F. and S.R. Moore (1996b) Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. Glia. Vol. **16**(4): 325-341.
- Hunter J.J. and T.G. Parslow (1996) A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into activator of apoptosis. J. Biol. Chem. Vol. **271**(15): 8521-8524.
- Hyman C., Hofer M., Barde Y.A., Juhasz M., Yancopoulos G.D., Squinto S.P. and R.M. Lindsay (1991) BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. Nature. Vol. **350**: 230-232.
- Ibrahim M.Z.H., Khreis Y. and D.S. Koshayan (1974) The histochemical identification of microglia. J. Neurol. Sci. Vol. **22**: 211-233.
- Ii M., Sunamoto M., Ohnishi K. and Y. Ichimori (1996) β -Amyloid protein-dependent nitric oxide production from microglial cells and neurotoxicity. Brain Res. Vol. **720**: 93-100.

- Imamoto K. and C.P. Leblond (1978) Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. *J. Comp. Neur.* Vol. **180**: 139-164.
- Innocenti G.M., Clarke S. and H. Koppel (1983) Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. II. Development and relations with axonal pathways. *Dev. Brain Res.* Vol. **11**: 55-66.
- Insausti R., Blakemore C. and W.M. Cowan (1984) Ganglion cell death during development of ipsilateral retinocollicular projection in golden hamster. *Nature*. Vol. **398**(5957): 362-365.
- Ip N.Y., Ibáñez C.F., Nye S.H., McClain J., Jones P.F., Gies D.R., Belluscio L., Le Bau M.M., Espinosa R., Squinto S.P., Persson H. and G.D. Yancopoulos (1992) Mammalian neurotrophin-4 structure, chromosomal localization, tissue distribution and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **89**: 3060-3064.
- Ip N.Y., Stitt T.N., Tapley P., Klein R., Glass D.J., Fandl J., Green L.L.A., Barbacid M. and G.D. Yancopoulos (1993) Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron*. Vol. **10**: 137-149.
- Isenmann S. and M. Bähr (1997) Expression of c-jun protein in degenerating retinal ganglion cells after optic nerve lesion in the rat. *Exp. Neurol.* Vol. **147**(1): 28-36.
- Isenmann S., Cellerino A., Gravel C. and M. Bähr (1999) Excess target-derived Brain Derived Neurotrophic factor preserves the transient uncrossed retinal projection to the superior colliculus. *Molecular and Cellular Neuroscience*. Vol. **14**: 52-65.
- Isenmann S., Klöcker N., Gravel C. and M. Bähr (1998) Protection of axotomized retinal ganglion cells by adenovirally delivered BDNF *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **10**: 2751-2756.
- Isenmann S., Wahl C., Krajewski S., Reed J.C. and M. Bähr (1997) Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **9**: 1763-1772.
- Jacobson M.D. and M.C. Raff (1995) Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*. Vol. **374**: 814-816.
- Janes R.G. and Bounds G.W. (1955) The Blood Vessels of the Rat's Eye. *Am. J. Anat.* Vol. **96**: 357-373.
- Jeffery G., Cowey A., and H.G.J.M. Kuypers (1981) Bifurcating retinal ganglion cell axons in the rat, demonstrated by retrograde double labelling. *Exp. Brain Res.* Vol. **44**: 34-40.

- Jelsma T.N. and A.J. Aguayo (1994) Trophic factors. *Current Opinion in Neurobiology*. Vol. **4**: 717-725.
- Jelsma T.N., Friedman H.H. Berkelaar M., Bray G.M. and A.J. Aguayo (1993) Different forms of the neurotrophin receptor *trkB* mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J. Neurobiol.* Vol. **24**(9): 1207-1214.
- Johnson E.M. and T.L. Deckwerth (1993) Molecular mechanism of developmental neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* Vol. **16**: 31-46.
- Johnson E.M., Gorin P.D., Brandeis L.D. and J. Pearson (1980) Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. *Science*. Vol. **210**: 916-918.
- Johnson J.E., Barde Y.A., Schwab M and H. Thoenen (1986) Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultures rat retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* Vol. **6**(10): 3031-3038.
- Jones K.R. and L.F. Reichardt (1990) Molecular cloning of human gene that is member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **87**(20): 8060-8064.
- Jordan F.L. and W.E. Thomas (1988) Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res. Rev.* Vol. **13**: 165-178.
- Jourdan F., Moyse E., De Bilbao F. And M. Dubois-Dauphin (1998) Olfactory neurons are protected from apoptosis in adult transgenic mice over-expressing the bcl-2 gene. *Neuroreport*. Vol. **9**(5): 921-926.
- Junier M.P., Suzuki F., Onteniente B. and M. Perchanski (1994) Target-deprived CNS neurons express the NGF gen while reactive glia around their axonal terminals contain low and high affinity NGF receptors. *Mol. Brain Res.* Vol. **24**: 247-260.
- Kacza J. and J. Seeger (1997) Transcellular labelling of activated retinal microglia following transection of the optic nerve. *Inflamm. Res.* Vol. **46**(10): 430-433.
- Kaisho Y., Yoshiura K. and K. Nakahama (1990) Cloning and expresssion of cDNA encoding a novel human neurotrophic factor. *FEBS Lett.* Vol. **266**: 187-191.
- Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R., Hahn H., Gralla E.B., Valentine J.S., Örd T. and D.E. Bredesen (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*. Vol. **262**: 1274-1277.
- Kaplan D.R., Hempstead B.L., Martín-Zanca D., Chao M.V. and L.F. Parada (1991a) The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for Nerve Growth Factor. *Science*. Vol **252**: 554-555.
- Kaplan D.R., Martín-Zanca D. and L.F. Parada (1991b). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the *trk* proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*. Vol. **350**: 158-160.

- Kaur C. and E.A. Ling (1991) Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labelled with the isolectin *Girffonia simplicifolia* in postnatal rats. *Acta Anat.* Vol. **142**: 118-125.
- Kelekar A. and C.B. Thompson (1998) Bcl-2 family of proteins: the role of BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* Vol. **8**: 324-330.
- Kelekar A., Chang B.S., Harlan J.E., Fesik S.W. and C.B. Thompson (1997) Bad is a BH3 domain-containing protein taht forms an inactivating dimer with Bcl-xL. *Mol. Cell. Biol.* Vol. **17**(12): 7040-7046.
- Kermer P., Klöcker N. and M. Bahr (1999b). Long-term effect of inhibition of ced 3-like caspases on the survival of axotomized retinal ganglion cells *in vivo*. *Exp. Neurol.* Vol. **158**(1): 202-205.
- Kermer P., Klöcker N., Labes M. and M. Bahr (1998) Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death in vivo. *J. Neurosci.* Vol. **18**(12): 4656-4662.
- Kermer P., Klöcker N., Labes M. and M. Bähr (2000) Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 *in vivo*. *J. Neurosci.* Vol. **20**(2): 722-728.
- Kermer P., Klöcker N., Labes M., Thomsen S., Srinivasan A. and M. Bahr (1999a) Activation of caspase 3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *FEBS Lett.* Vol. **453**(3): 361-364.
- Kerr J.F.R. (1971) Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death". *J. Pathol.* Vol. **105**: 13-20.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H. and A.R. Currie (1972) Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer.* Vol. **26**: 239-257.
- Kiefer M.C., Brauer M.J., Powers V.C., Wu J.J., Umansky S.R., Tomei L.D. and P.J. Barr (1995) Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature.* Vol. **374**(6524): 736-739.
- Kiefer R. and G.W. Kreutzberg (1991) Effects of dexamethasone on microglial activation in vivo: selective downregulation of major histocompatibility complex class II expression in regenerating facial nucleus. *J. Neuroimmunol.* Vol. **34**: 99-108.
- Kiefer R., Lindholm D. and G.W. Kreutzberg (1993) Interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 mRNAs are induced in rat facial nucleus following motoneuron axotomy. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **5**: 775-781.
- Kiefer R., Streit W.J., Toyka K.V., Kreutzberg G.W. and H.P. Hartung (1995)

- Transforming growth factor- β 1: a lesion-associated cytokine of the nervous system. *Int. J. Devl. Neurosci.* Vol. **13**(3-4): 331-339.
- Kim B. and E.L. Feldman (1997) Insulin-like growth factor-I signaling mediates membrane ruffling and neurite outgrowth *in vitro* requires mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* Vol. **272**(34): 21268-21273.
- Kim B., Leventhal P.S. and Feldman E.L. (1997^a) IGF-I mediates growth cone motility and axonal extension. *Neurology (Suppl.)*. Vol. **48**: Abstract 44.
- Klein R., Nanduri V., Jing S. Lamballe F., Tapley P., Bryant S. Cordón-Cardo C. Jones K.R. Reichardt L.F. and M. Barbacid (1991b) The *trkB* tyrosine protein is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*. Vol. **66**: 395-403.
- Klöcker N., Cellerino A. and M. Bähr (1998) Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells *in vivo*. *J. Neurosci.* Vol. **18**(3): 1038-1046.
- Knudson C.M., Tung K.S.K., Tourtellotte W.G., Brown G.A.J. and S.J. Korsmeyer (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*. Vol. **270**: 96-99.
- Knüsel B., Michel P.P., Schwaber J.S. and F. Hefti (1990) Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insuline-like growth factor I and II. *J. Neurosci.* Vol. **10**(2): 558-570.
- Knüsel B., Winslow J.W., Rosenthal A., Burton L.E., Seid D.P., Nikolics K. and F. Hefti (1991) Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **28**: 961-965.
- Kohsaka S., Hamanoue M. and K. Nakajima (1996) Functional implication of secretory proteases derived from microglia in the central nervous system. *Koio J. Medicine*. Vol. **45**(3): 263-269.
- Korsmeyer S.J. (1992) Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*. Vol. **80**(4): 879-886.
- Korsmeyer S.J. (1995) Regulators of cell death. *Trends Genet.* Vol. **11**: 101-105.
- Kozak Y., Cotinet A., Goureau O., Hicks D. and B. Thillaye-Goldenberg (1997) Tumor necrosis factor and nitric oxide production by resident retinal glial cells from rats presenting hereditary retinal degeneration. *Ocul. Immunol. Inflamm.* Vol. **5**(2): 85-94.

- Krajewski S., Krajewska M. and J.C. Reed (1996) Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res.* Vol. **56**(12): 2849-2855.
- Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Wang H.G., Irie S., Fong L. And J.C. Reed (1994b) Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bcl-x expression. *Cancer Res.* Vol. **54**: 5501-5507.
- Krenz N.R. and L.C. Weaver (2000) Nerve growth factor in glia and inflammatory cells of the injured rat spinal cord. *J. Neurochem.* Vol. **74**(2): 730-739.
- Kreutzberg G.W. (1995) Microglia: the first line of defence in brain pathologies. *Drug Research.* Vol. **45**(I-3a): 357-360.
- Kreutzberg G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neuroscience.* Vol. **19**(8): 312-318.
- Kreutzberg G.W. and K.D. Barron (1978) 5'nucleotidase of microglial cells in the facial nucleus during axonal reaction. *J. Neurocytol.* Vol. **7**: 601-610.
- Kreutzberg G.W., Barron K.D. and P. Schubert (1978) Cytochemical localization of 5'nucleotidase in glial plasma membranes. *Brain Res.* Vol. **158**: 247-257.
- Kroemer G. (1998) The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.* Vol. **5**(6): 547.
- Kruman I.I. and M.P. Matson (1999) Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cells apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* Vol. **72**(2): 529-540.
- Kuida K., Zheng T.S., Na S., Kuan C., Yang D., Karasuyama H., Rakic P. and R.A. Flavell (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP-32-deficient mice. *Nature.* Vol. **384**: 368-372.
- Kumar S., Peña L.A. and J. de Vellis (1993) CNS glial cells express neurotrophin receptors whose levels are regulated by NGF. *Mol. Brain Res.* Vol. **7**: 163-168.
- Kurokawa T., Katai N., Shibuki H., Kuroiwa S., Kurimoto Y. Nakayama and N. Yoshimura (1999) BDNF diminishes caspase-2 but not c-jun immunoreactivity of neurons in retinal ganglion cell layer after transient ischemia. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* Vol. **40**(12): 3006-3011.
- La Vail M.M., Unoki K., Yasamura D., Matthes M.T., Yancopoulos G.D. and R.H. Steinberg (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **99**: 11249-11253.
- Lam K., Sefton A. and M.R. Bennet (1982) Loss of axons from the optic nerve of the rat during early postnatal development. *Dev. Brain Res.* Vol. **3**: 487-491.
- Lam T.T., Abler A.S. and M.O.M. Tso (1999) Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* Vol. **40**(5): 967-975.

- Lamballe F., Klein R. and M. Barbacid (1991) *TrkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*. Vol. **66**: 967-979.
- Lambiase A. and L. Aloe (1996) Nerve growth factor delays retinal degeneration in C3H mice. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Vol. **234**(Suppl.1): S96-S100.
- Lambiase A., Centofanti M., Micera A., Manni G.L., Mattei E., de Gregorio A., de Feo G., Bucci M-G. and L. Aloe (1997) Nerve growth factor (NGF) reduces and NGF antibody exacerbates retinal damage induced in rabbit by experimental ocular hypertension. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Vol. **230**: 780-785.
- Lawson L.J., Perry V.H., Dri P. and S. Gordon (1990c) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neurosci.* Vol. **39**(1): 151-170.
- Lee K.F., Bachman K., Landis S. and R. Jaenisch (1994) Dependence on p75 for innervation of some sympathetic targets. *Science*. Vol. **263**: 1447-1449.
- Lee K.F., EnLi L., Huber J., Landis S.C. Sharpe A., Chao M. and R. Jaenisch (1992) Targeted mutation the gene encoding the low affinity NGF receptor leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*. Vol. **69**: 737-749.
- Lees G.J. (1993) The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J. Neurol. Sci.* Vol. **114**(2): 119-122.
- Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H. and Y.A. Barde (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. Vol. **341**: 149-152.
- Leon S., Yin Y., Nguyen J., Irwin N. and L.I. Benowitz (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J. Neurosci.* Vol. **20**(12): 4615-4626.
- Levi-Montalcini R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science*. Vol. **237**: 1154-1162.
- Levi-Montalcini R. and P.U. Angeletti (1968) Nerve growth factor. *Physiological Reviews*. Vol. **48**(3): 534-568.
- Levi-Montalcini R. and V. Hamburger (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma of the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* Vol. **116**: 321-362.
- Levin L.A. (1999) Intrinsic survival mechanism for retinal ganglion cells. *Eur. J. Ophthalmol.* Vol. **9**(1): S12-S16.
- Levin L.A. and A. Louhab (1996) Apoptosis of retinal ganglion cells in anterior ischemic optic neuropathy. *Arch. Ophthalmol.* Vol. **114**(4): 488-491.
- Levin L.A. and K.M. Geszvain (1998) Expression of celastrol in the retina:

- Induction after retinal ganglion cell axotomy. *Inves. Ophthal. Vis. Sci.* Vol. **39**: 157-163.
- Levin L.A., Schlamp C.L., Spiedoch R.L., Geszvain K.M. and R.W. Nickells (1997) Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina. *Inves. Ophthal. Vis. Sci.* Vol. **38**(12): 2545-2553.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivansula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. and X. Wang (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* Vol. **91**(4): 479-489.
- Lieberman A.R. (1971) The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* Vol. **14**: 49-124.
- Linden R. and V.H. Perry (1983) Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.* Vol. **272**: 145-149.
- Lindsay R.M., Thoenen H. and Y.A. Barde (1985) Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to brain-derived neurotrophic factor. *Dev. Biol.* Vol. **112**: 319-328.
- Ling E.A. (1976) Some aspects of amoeboid microglia in the corpus callosum and neighbouring regions of neonatal rats. *J. Anat.* **121**: 29-45.
- Ling E.A. and C.K. Tan (1974) Amoeboid microglia cells in the corpus callosum of neonatal rats. *Arch. Histol. Jpn.* Vol. **36**: 265-280.
- Ling E.A. and W.C. Wong (1993) The origin and nature of ramified and ameboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia.* Vol. **7**: 9-18.
- Ling E.A. Penney D. and C.P. Leblond (1980) Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the "ameboid cells" present in the corpus callosum of postnatal rats. *J. Comp. Neur.* Vol. **193**: 631-657.
- Linnik M.D., Zobrist R.H. and M.D. Hatfield (1993) Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* Vol. **24**: 2002-2009.
- Lipton J.M., Catania A. and R. Delgado (1998) Peptide modulation of inflammatory processes within the brain. *Neuroimmunomodulation.* Vol. **5**(3-4): 178-183.
- Lipton S.A. (1992) Models of neuronal injury in AIDS: another role for the NMDA receptor?. *Trends Neurosci.* Vol. **15**(3): 75-79.
- Liu C., Li Y., Peng M., Laties A.M. and R. Weng (1999) Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation S334ter during photoreceptor degeneration. *J. Neurosci.* Vol. **19**(12): 4778-4785.
- Liu W., Brosnan C.F., Dickson D.W. and S.C. Lee (1994) Macrophage colony-stimulating factor mediates factor-induced microglial ramification in human fetal

- central nervous system culture. *Am. J. Pathol.* Vol. **145**: 48-53.
- Liu X., Kim C.N., Pohl J. and X. Wang (1996) Purification and characterization of an interleukin-1 beta-converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32). *J. Biol. Chem.* Vol. **271**(23): 13371-13376.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. and X. Wang (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* Vol. **86**(1): 147-157.
- Liu X., Zou H., Slaughter C. and X. Wang (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* Vol. **89**(2): 175-184.
- Llamosas M.M., Cernuda-Cernuda R. and J.J. Huerta (1997) Neurotrophins receptors expression in the developing mouse retina: an immunohistochemicla study. *Anat. Embryol.* Vol. **197**: 337-344.
- López-Enríquez M. (1926) Existencia de células de Hortega "microglia" en la retina y vías ópticas. *Bo. Real Soc. Esp. His. Nat.* Vol. **25**: 294-307.
- Lund R.D. (1965) Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science.* Vol. **149**: 1506-1507.
- Macaya A. (1996) Apoptosis en el sistema nervioso. *Rev. Neurol.* Vol. **24**(135): 1356-1360.
- Madison R., Moore M.R. and R.L. Sidman (1984) Retinal ganglion cells and axons survive after optic nerve transection. *Int. J. Neurosci.* Vol. **23**: 15-32.
- Maffei L., Berardi N., Carmignoto G., Cellerino A., Domenici L., Fiorentini A. and T. Pizzorusso (1992) Nerve growth factor (NGF) prevents the shifts in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monocularly deprived rats. *J. Neurosci.* Vol. **12**(12): 4651-4662.
- Mah S.P., Zohng L.T., Liu Y., Roghani A., Edwards R.H. and D.E. Bredesen (1993) The protooncogene bcl-2 inhibits apoptosis in PC12 cells. *J. Neurochem.* Vol. **60**(3): 1183-1186.
- Maisonpierre P.C., Belluscio L., Friedman B., Alderson R.F., Wiegand S.J., Furth M.E., Lindsay R.M. and G.D. Yancopoulos (1990b) NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.* Vol. **5**: 501-509.
- Maisonpierre P.C., Belluscio L., Squinto S., Ip N.Y., Furth M.E., Lindsay R.M. and G.D. Yancopoulos (1990a) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science.* Vol. **247**: 1446-1451.
- Mallat M., Houlgatte R., Brachet P and A. Prochiantz (1989) Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF *in vitro*. *Dev. Biol.* Vol. **133**:

309-311.

- Mamounas L.A., Altar C.A., Blue M.E., Kaplan D.R., Tessarollo L. and W.E. Lyons (2000) BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *J. Neurosci.* Vol. **20**(2): 771-782.
- Mamounas L.A., Blue M.E., Siuciak J.A. and C.A. Altar (1995) Brain derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in the brain. *J. Neurosci.* Vol. **15**: 7929-7939.
- Mansour-Robaey S., Clarke D.B., Wang Y.C., Bray G.M. and A.J. Aguayo (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **91**: 1632-1636.
- Martin D.P., Wallace T.L. and E.M. Johnson (1990) Cytosine arabinoside kills postmitotic neurons in a fashion resembling trophic factor deprivation: evidence that a deoxycytidine-dependent process may be required for nerve growth factor signal transduction. *J. Neurosci.* Vol. **10**: 184-193.
- Martin P.R. (1986) The projection of different retinal ganglion cells classes to the dorsal geniculate nucleus in the hooded rat. *Exp. Brain Res.* **62**: 77-88.
- Martinou JC, Dubois-Dauphin M., Staple J.K., Rodriguez I., Frankowski H., Missotten M., Albertini P., Talabot D., Catsicas S., Pietra C. et al (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron.* Vol. **13**(4): 1017-30.
- Martin-Zanca D., Oskam R., Mitra G., Copeland T. and M. Barbacid (1989) Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogen. *Mol. Cell. Biol.* Vol. **9**: 24-33.
- Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Susin S.A., Beutner G., Brdiczka D., Remy R., Xie Z.H., Reed J.C. and G. Kroemer (1998b) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* Vol. **187**(8): 1261-1271.
- Matsumoto Y. and F. Ikuta (1985) Appearance and distribution of fetal brain macrophages in mice. Immunohistochemical study with a monoclonal study. *Cell Tissue Res.* Vol. **239**: 271-278.
- Matsumoto Y. and M. Fujiwara (1987) Absence of donor-type major histocompatibility complex class I antigen-bearing microglia in the rat central nervous system of radiation bone marrow chimeras. *J. Neuroimmunol.* Vol. **17**: 71-82.
- Matsumoto Y., Hara N., Tanaka R. and M. Fujiwara (1986) Immunohistochemical analysis of the rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis, with special reference to I_a-positive cells with dendritic

- morphology. *J. Immunol.* Vol. **136**(10): 3668-3675.
- Matthews M.A. (1974) Microglia and reactive "M" cells of degenerating central nervous system: does similar morphology and function imply a common origin?. *Cell Tissue Res.* Vol. **148**(4): 477-491.
- Mattson M.P., Goodman Y., Luo H., Fu W. and K. Furukawa (1997) Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J. Neurosci. Res.* Vol. **49**(6): 681-697.
- McAllister A.K., Katz L.C. and D.C. Lo (1997) Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron.* Vol. **18**: 767-778.
- McDonald N.Q. and M.V. Chao (1995) Structural determinants of neurotrophin action. *J. Biol. Chem.* Vol. **270**(34): 19669-19672.
- McGeer P.L., Itagaki S., Boyes B.E. and E.G. McGeer (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* Vol. **38**(8): 1285-1291.
- McGeer P.L., Itagaki S., Tago H. and E.G. McGeer (1987) Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci. Lett.* Vol. **79**(1-2): 195-200.
- McGeer P.L., Kawamata D.G., Wilker H., Akiyama H., Tooyama H. and E.G. McGeer (1993) Microglia in degenerative neurological disease. *Glia.* Vol. **7**: 84-92.
- Meakin S.O. and E.M. Shooter (1992) The nerve growth factor family of receptors. *Trends in Neuroscience.* Vol. **15**(9): 323-331.
- Meldrum B. and J. Garthwaite (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* Vol. **11**(9): 379-387.
- Merril J.E., Ignarro L.J., Sherman M.P., Melinek J. and T.E. Lane (1993) Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J. Immunol.* Vol. **151**: 2132-2141.
- Merry D.E. and S.J. Korsmeyer (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* Vol. **20**: 245-267.
- Merry D.E., Veis D.J., Hickey W.F. and S.J. Korsmeyer (1994) Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Dev.* Vol. **120**: 301-311.
- Mey J. and S. Thanos (1993) Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo. *Brain Res.* Vol. **602**: 304-317.
- Meyer M., Matsuoka I., Wetmore C., Olsson L. And H. Thoenen (1992) Enhanced

- synthesis of brain derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J. Cell Biol.* Vol. **119**: 45-54.
- Meyer-Franke A., Kaplan M.R., Pfrieder F.W. and B.A. Barres (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron*. Vol. **15**(4): 805-819.
- Minn A.J., Vélez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M. and C.B. Thompson (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*. Vol. **385**: 353-357.
- Mittal S., Cohen A. and D. Maysinger (1994) In vitro effects of brain derived neurotrophic factor released from microspheres. *NeuroReport*. Vol. **5**: 2577-2582.
- Miura M. and J. Yuan (1996) Regulation of programmed cell death by interleukin-1 beta-converting enzyme family of proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* Vol. **389**: 165-172.
- Miwa T., Furukawa S., Nakajima K., Furukawa Y. and S. Kohsaka (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J. Neurosci. Res.* Vol. **50**: 1023-1029.
- Monaghan P., Robertson D., Amos T.A.S., Dyer M.J.S., Mason D.Y. and M.S. Greaves (1992) Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* Vol. **40**: 1819-1825.
- Moore S. and S. Thanos (1996) The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Progress in Neurobiology*. Vol. **48**: 441-460.
- Morioka T. and W.J. Streit (1991) Expression of immunomolecule on microglial cells following neonatal sciatic nerve axotomy. *J. Neuroimmunol.* Vol. **35**(1-3): 21-30.
- Morioka T., Kalkbrenner A.N. and W.J. Streit (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* Vol. **11**(6): 966-973.
- Morioka T., Kalkbrenner A.N. and W.J. Streit (1993) Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J. Comp. Neur.* Vol. **327**: 123-132.
- Moriya T. and Yamadori T. (1993) Correlative Study of the Morphology and Central Connections of Ipsilaterally Projecting Retinal Ganglion Cells in the Albino Rat. *Exp. Eye. Res.* Vol. **56**: 79-83.
- Morozov V.E., Falzon M., Anderson C.W. and E.L. Kuff (1994) DNA-dependent protein kinase is activated by nicks and larger single-stranded gaps. *J. Biol. Chem.*

- Vol. **269**(24): 16684-16688.
- Motoyama N., Wang F., Roth K.A. Sawa H., Nakayama K., Nakayama K., Negishi I., Sanju S., Zhang Q., Fujii S. et al (1995) Masive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*. Vol. **267**: 1506-1510.
- Motyl T (1999) Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins. *Reprod. Nutr. Dev.* Vol. **39**: 49-59.
- Mozell R.L. and F.A. McMorris (1988) Insuline-like growth factor-I stimulates regeneration of oligodendrocytes *in vitro*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Vol. **540**: 430-432.
- Müller M., and H. Holländer (1988) A small Population of retinal ganglion cells projecting to the retina of the other eye. *Exp. Brain Res.* Vol. **71**: 611-617.
- Munday N.A., Vaillancourt J.P., Ali A., Casano F.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Yamin T.T., Yu V.L: and D.W. Nicholson (1995) Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICErelIII and ICErelIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J. Biol. Chem.* Vol. **270**(26): 15870-15.876.
- Muñoz Negrete F.J., Rebolleda Fernández G. and C. Gutiérrez Ortiz (1999) Apoptosis y neuroprotección. *St. Ophtal.* Vol. **18**(1): 9-15.
- Murabe Y. and Y. Sano (1981)Thiaminepyrophosphatase activity in the plasma membrane of microglia. *Histochem.* Vol. **71**: 45-52.
- Murabe Y. and Y. Sano (1982a) Morphological studies in neuroglia. V. Microglial cells in the cerebral cortex of the rat, with special references to their possible involvement in synaptic function. *Cell Tissue Res.* Vol. **223**: 498-506.
- Murabe Y. and Y. Sano (1982b) Morphological studies on neuroglia. VI. Postnatal development of microglial cells. *Cell and Tissue Research.* Vol. **225**: 469-485.
- Murabe Y., Ibata Y. and Y. Sano (1981) Morphological studies on neuroglia. III.Macrophage respnse and “microgliocytosis” in kainic acid-induced lesions. *8Cell Tissue Res.* Vol. **218**(1): 75-86.
- Murphy A.N. (1999). Ca⁽²⁺⁾-mediated mitochondrial dysfunction and the protector effects of Bcl-2. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. **893**:19-32.
- Murphy A.N., Bredesen D.E., Cortopassi G., Wang E. and G. Fiskum (1996) Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **93**(18): 9893-9898.
- Nagata K., Nakajima K., Takemoto N., Saito H. and S. Kohsaka (1993) Microglia-derived plasminogen enhances neurite outgrowth from explant cultures of Rat brain. *Int. J. Devl. Neurosci.* Vol. **11**(2): 227-237.
- Nagata S. and P. Golstein (1995) The Fas death factor. *Science.* Vol. **267**(5203):

- 1449-1456.
- Nakagawa M., Bellinzona M., Seilhan T.M., Gobbel G.T., Lamborn K.R. and J.R. Fike (1996) Microglial responses after focal radiation-induced injury are affected by α -difluoromethylornithine. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* Vol. **36**(1): 113-123.
- Nakajima K., Kikuchi Y., Ikoma E., Honda S., Ishikawa M. Liu Y. and S. Kohsaka (1998) Neurotrophins regulate the function of cultured microglia. *Glia*. Vol. **24**: 272-288.
- Nakajima K. and Kohsaka S. (1998) Functional roles of microglia in the central nervous system. *Hum. Cell*. Vol. **11**(3): 141-155.
- Nakajima K. and S. Kohsaka (1993) Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci. Res.* Vol. **17**: 187-203.
- Nakajima K. and S. Kohsaka (1996) Functional Implications of Microglia-derived secretory proteases. In *"Topical Issues in Microglia Research"* (Ed. Ling E.A., Tan C.K. and C.B.C. Tan) Singapore Neuroscience Association: 203-218.
- Nakajima K., Tsuzaki N., Shimojo M., Hamanoue M. and S.H. Kohsaka (1992) Microglia isolated from rat brain secrete an urokinase-type plasminogen activator. *Brain Res.* Vol. **577**: 285-292.
- Navascués J., Moujahid A., Almendros A., Marín-Teva J.L. and M.A. Cuadros (1995) Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J. Comp. Neurol.* Vol. **354**: 209-228.
- Navascués J., Moujahid A., Quesada A. and M.A. Cuadros (1994) Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J. Comp. Neurol.* Vol. **350**: 171-186.
- Newman H., Misgeld T., Mastsumuro K. and H. Wekerle (1998) Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **95**(10): 5779-84.
- Ni S.Y.K. and B. Dreher (1981) Morphology of rat retinal ganglion cells projecting to the thalamus and midbrain. *Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc.* Vol. **12**: 97 p.
- Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., Munday N.A., Raju S.M., Smulson M.E., Yamin T., Yu V.L. and D.K. Miller (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. Vol. **376**: 37-43.
- Nickells R.W. (1996) Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. *J. Glaucoma*. Vol. **5**: 345-356.

- Nickells RW. (1999). Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Survey of Ophthalmology*. Vol. **43**(1): S151-S161.
- Nilsson A.S., Fainzilber M., Falck P. and C.F. Ibáñez (1998) Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* Vol. **424**: 285-290.
- Nomura Y. and Y. Kitamura (1993) Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neurosci. Res.* Vol. **18**(2): 103-107.
- Novikoff A.B. and S. Goldfischer (1961) Nucleoside-diphosphatase activity in the golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **47**: 802-810.
- O'Leary D.D., Fawcett J.W. and W.M. Cowan (1986) Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cell death. *J. Neurosci.* Vol. **6**(12): 3692-3705.
- Okazawa H., Kamei M., Imafuku I. and I. Kanazawa (1994) Gene regulation of *trkB* and *trkC* in the chick retina by light/darkness exposure. *Oncogene*. Vol. **9**: 1813-1818.
- Oltvai Z.N., Millman C.L. and S.J. Korsmeyer (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. Vol. **74**: 609-619.
- Oltvai Z.N. and S.J. Korsmeyer (1994) Checkpoints of duelling dimers foil death wishes. *Cell*. Vol. **79**: 189-192.
- Oppenheim R.W. (1991a) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* Vol. **14**: 453-501.
- Oppenheim R.W., Qin-Wei Y., Prevet D. and Q. Yan (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature*. Vol. **360**: 755-757.
- Otto D., Unsicker K. and C. Grothe (1987) Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron death in adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci. Letters*. Vol. **83**: 156-160.
- Park D.S., Morris E.J., Stefanis L., Troy C.M., Shelanski M.L., Geller H.M. and L.A. Greene (1998) Multiple pathways of neuronal death induced by DNA-damaging agents, NGF deprivation, and oxidative stress. *J. Neurosci.* Vol. **18**(3): 830-840.
- Parsadanian A.S., Cheng Y., Keller-Peck C.R., Holtzman D.M. and W.D. Snider (1998) Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J. Neurosci.* Vol. **18**(3): 1009-1019.

- Patil N., Lacy E. and M.V. Chao (1990) Specific neuronal expression of human NGF receptors in the basal forebrain and cerebellum of transgenic mice. *Neuron*. Vol. **4**: 437-447.
- Peinado-Ramón P., Salvador M., Villegas-Pérez M.P. and M. Vidal-Sanz (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and Brain-Derived Neurotrophic Factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Vol. **37**(4): 489-500.
- Penfold P.L., Madigan M.C. and J.M. Provis (1991) Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Visual Neurosci.* Vol. **7**: 383-388.
- Penfold P.L. and J.M. Provis (1986) Cell death in the development of human retina phagocytosis of pycnotic and apoptotic bodies by retinal cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Vol. **224**: 549-553.
- Pérez M.T.R. and Caminos E. (1995) Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci. Letters*. Vol. **183**: 96-99.
- Perlmutter L.S., Barron E. and H.C. Chui (1990) Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters* Vol. **119**: 32-36.
- Perlmutter L.S., Scott S.A. and H.C. Chui (1992) MHC class II-Positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *J. Neurosci. Res.* Vol. **33**: 549-558.
- Perry V.H. (1979) The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc. R. Soc. Lond. B.* Vol. **204**: 363-375.
- Perry V.H. (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neurosci.* Vol. **6**(5): 931-944.
- Perry V.H. (1997) Macrophages, microglia and cell death in the developing mouse brain. *Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia*. Vol. **59**(219): 281-295.
- Perry V.H. and L.J. Lawson (1992) Macrophages in the central nervous system. In *"The macrophage"* (ED. Lewis, C.E. and McGee, J.O'D) IRL Press, Oxford: 389-413.
- Perry V.H. and R. Linden (1982) Evidence for dendritic competition in the developing retina. *Nature*. Vol. **297**: 683-685.
- Perry V.H. and S. Gordon (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *TINS*. Vol. **11**(6): 273-277.
- Perry V.H. and S. Gordon (1991) Macrophages and the nervous system. *International Rev. Cytol.* Vol. **125**: 203-244.

- Perry V.H., Henderson Z. and R. Linden (1983) Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J. Comp. Neur.* Vol. **219**: 356-368.
- Perry V.H., Hume D.A. and S. Gordon (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neurosci.* Vol. **15**: 313-326.
- Perry, V.H. (1993) Macrophages and inflammation in the central nervous system. *TINS.* Vol. **16**(7): 268-273.
- Peters A., Palay S.L. y H. de F. Webster (1976) The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. (Ed. Suanders W.B.) Philadelphia.
- Phillips H.S., Hains J.M., Laramie G.R., Rosenthal A. and J.W. Winslow (1990) Widespread expression of BDNF but not NT-3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science.* Vol. **250**: 290-294.
- Piani D., Frei K., Do K.Q., Cuenod M. and A. Fontana (1991) Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vivo by secreting glutamate. *Neurosci. Lett.* Vol. **133**(2): 159-162.
- Plata-Salamán C.R. (1991) Immunoregulators in the nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* Vol. **15**: 185-215.
- Podlecki D., Green A. and J.M. Olefsky (1982) Binding and biological activity of biosynthetic human proinsulin. *Diabetes (Suppl).* Vol. **31**(2): 126.
- Porciatti V., Pizzorusso T., Cenni M.C. and L. Maffei (1996) The visual response of retinal ganglion cells is not altered by optic nerve transection in transgenic mice overexpressing bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **93**: 14955-14959.
- Potts R.A., Dreher B. And M.R. Bennet (1982) The loss of ganglion cells in the developing retina of the rat. *Dev. Brain Res.* Vol. **3**: 481-486.
- Pow D.V., Perry V.H., Morris J.F. and S. Gordon (1989) Microglia in the neurohypophysis associate with an endocytose terminal portions of neurosecretory neurons. *Neurosci.* Vol. **33**(3): 567-578.
- Provis J.M. (1987) Patterns of cell death in the ganglion cell layer of the human fetal retina. *J. Comp. Neurol.* Vol. **259**: 237-246.
- Provis J.M. and P.L. Penfold (1988) Cell death and the elimination of retinal axons during development. *Progress in Neurobiology.* Vol. **31**: 331-347.
- Purves D. (1988) *Body and Brain. A trophic theory of neural connections.* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London, England.
- Purves D.A. and A. Nja (1976) Effect of nerve growth factor on synaptic depression after axotomy. *Nature.* Vol. **260**(5551): 535-536.
- Quigley H.A., Nickels R.W., Kerrigan L.A., Pease M.E., Thibault D.J. and D.J. Zack

- (1995) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Vol. **36**: 774-786.
- Rabacchi S.A., Bonfati L., Liu X.H. and L. Maffei (1994) Apoptotic cell death induced by optic nerve lesion in the neonatal rat. *J. Neurosci.* Vol. **14**(9): 5292-5301.
- Rabizadeh S., Oh J., Zhong L., Yang J., Bitler C.M., Butcher L.L. and D.E. Bredesen (1993) Induction of Apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science.* Vol. **261**: 345-348.
- Radeke M.J., Misko T.P., Hsu C., Herzenberg L.A. and E.M. Shooter (1987) Gene transfer and molecular cloning of the rat growth factor receptor. *Nature.* Vol. **325**: 593-597.
- Raff M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* Vol. **356**: 397-400.
- Ragsdale C. and J. Woodgett (1991) Neurobiology. Trk neurotrophic receptors. *Nature.* Vol. **350**(6320): 660-661.
- Raivich G., Bluethmann H and G.W. Kreutzberg (1996) Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio J. Med.* Vol. **45**(3): 239-247.
- Raivich G., Gehrmann J. and G.W. Kreutzberg (1991) Increase of macrophage colony-stimulating factor receptors in the regenerating rat facial nucleus. *J. Neurosci. Res.* Vol. **30**(4): 682-686.
- Reed J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of cell death. *J. Cell Biol.* Vol. **124**(1-2): 1-6
- Reed J.C. (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature.* Vol. **387**(6635): 773-776.
- Reed J.C., Jurgensmeier J.M. and S. Matsuyama (1998) Bcl-2 family protein and mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta.* Vol. **1366**(1-2): 127-137.
- Richardson P.M., Issa V.M.K. and S. Shemie (1982) Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve. *J. Neurocytol.* Vol. **11**: 949-966.
- Rickman D.W. and N.C. Brecha (1995) Expression of the proto-oncogene trk receptors in the developing rat retina. *Vis. Neurosci.* Vol. **12**(2): 215-222.
- Rieske E., Graeber M.B., Tetzlaff W., Czlonskowska A., Streit W.J. and G.W. Kreutzberg (1989) Microglia and microglia-derived brain macrophages in culture: generation from axotomized rat facial nuclei, identification and characterization *in vitro*. *Brain Res.* Vol. **492**(1-2): 1-14.
- Rinderknecht E. and R.E. Humbel (1978) The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* Vol. **253**: 2769-2776.
- Rodríguez-Tébar A., Dechant G. and Y.A. Barde (1990) Binding of brain-derived

- neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron*. Vol. **4**: 487-492.
- Rodríguez-Tébar A., Dechant G., Götz R. and Y.A. Barde (1992) Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *The EMBO Journal*. Vol. **11**(3): 917-922.
- Rodríguez-Tébar A., Jeffrey P.L., Thoenen H. and Y.A. Barde (1989) The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain-derived neurotrophic factor depends on their embryonic age. *Dev. Biol.* Vol. **136**: 296-303.
- Rogove A.D. and S.E. Tsirka (1997) Neurotoxic responses by microglia elicited by excitotoxic injury in the mouse hippocampus. *Current Biology*. Vol. **8**: 19-25.
- Roque R.S., Imperial C.J. and R.B. Caldwell (1996) Microglial cells invade the O outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Inves. Ophthalm. Vis. Sci.* Vol. **37**(1): 196-203.
- Roque R.S., Rosales A.A., Jingjing L., Agarwal N. and M.R. Al-Ubaidi (1999) Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Res.* Vol. **836**(1-2): 110-119.
- Rosenthal A., Goeddel D.V., Nguyen T., Lewis M., Shih A., Laramée G.R., Nikolics K. and J.W. Winslow (1990) Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron*. Vol. **4**: 767-773.
- Rosenthal A., Goeddel D.V., Nguyen T., Lewis M., Shih A., Laramée G.R., Wurm F., Mason A., Nikolics K. and J.W. Winslow (1991) Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology*. Vol. **129**(3): 1289-1294.
- Rothman S.M. and J.W. Oltney (1987) Excitotoxicity and the NMDA receptor. *TINNS*. Vol. **7**: 299-302.
- Rotwein P., Burgess S.K., Milbrandt J.D. and J.E. Krause. (1988) Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **85**: 265-269.
- Rubin L.L., Christine L., Gatchalian C.L., Rimon G. and S.F. Brooks (1994) The molecular mechanisms of neuronal apoptosis. *Current Opinion in Neurobiol.* Vol. **4**: 696-702.
- Rudolphi K.A., Schubert P., Parkinson F.E. and B.B. Fredholm (1992) Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol. Sci.* Vol. **13**(12): 439-445.
- Rudolphi K.A., Schubert P., Parkinson F.E. and B.B. Fredholm (1992b) Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* Vol. **4**(4): 346-369.

- Russelakis-Carneiro M., Silveira L.C. and V.H. Perry (1996) Factors affecting the survival of cat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *J. Neurocytol.* Vol. **25**(6): 393-402.
- Salvesen G.S. and V.M. Dixit (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* Vol. **91**: 443-446.
- Sanyal S. and A. DeRuiter (1985) Inosine diphosphatase as histochemical marker of retinal microvasculature, with special reference to transformation of microglia. *Cell Tissue Res.* Vol. **241**: 291-297.
- Sara V.R. and K. Hall (1990) Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev.* Vol. **70**: 591-614.
- Sato M.S. and T. Lindahl (1992) Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature.* Vol. **356**(6367): 356-358.
- Sattler M., Liang H., Nettesheim D., Meadows R.P., Harlan J.E., Eberstadt M., Yoon H.S., Shuker S.B., Chang B.S., Minn A.J., Thompson C.B. and S.W. Fesik (1997) Structure of Bcl-x_L-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science.* Vol. **275**(5302): 983-986.
- Saunders J.W. (1966) Death in embryonic system. *Science.* Vol. **154**: 604-612.
- Savill J., Dransfield I., Hogg N. and C. Haslett (1990) Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* Vol. **343**(6254): 170-173.
- Sawada M., Kondo N., Suzumura A. and T. Marunouchi (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* Vol. **491**: 394-397.
- Sawai H., Clarke D.B., Kittlerova P., Bray G.M. and A.J. Aguayo (1996) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulated growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* Vol. **16**: 3887-3894.
- Schecterson L.C. and M. Bothwell (1992) Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron.* Vol. **9**: 449-463.
- Schlessinger J. and A. Ullrich (1992) Growth Factor Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Neuron.* Vol. **9**: 383-391.
- Schmued L.C. and Fallon J.H. (1986) Fluoro-gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* Vol. **377**: 147-154.
- Schnitzer J. (1989) Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J. Comp. Neur.* Vol. **282**: 249-263.
- Schnitzer J. and J. Scherer (1990) Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *J. Comp. Neur.* Vol. **302**: 779-791.
- Sefton A.J. and B. Dreher (1985) Visual System. En *"The rat nervous system"* Ed. G.

- paxinos. Academic press, Sydney: 169-221.
- Sefton A.J. and K. Lam (1984) Quantitative and morphological studies on the developing optic nerve in normal and enucleated rats. *Exp. Brain Res.* Vol. **57**: 107-117.
- Segal R.A. and M.E. Greenberg (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* Vol. **19**: 463-489.
- Sellés I., Villegas M.P., Salvador M., Ruiz-Gómez J.M. and M. Vidal-Sanz (1996) Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals: A quantitative *in vivo* study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Vol. **37**(10): 2002-2024.
- Sellés-Navarro I., Avilés-Trigueros M., García-Avilés A., Villegas-Pérez M.P. and M. Vidal-Sanz (2000). Efectos de diferentes modelos de producción de isquemia sobre las células ganglionares de la retina (CGR) y respuesta al tratamiento con BDNF. *Rev. Neurol.* Vol. **30**(3): 288.
- Selmaj K.W. and C.S. Raine (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann. Neurol.* Vol. **23**(4): 339-346.
- Sendtner M., Holtmann B., Kolbeck R., Thoenen H. and Y.A. Barde (1992) Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature.* Vol. **360** :757-759.
- Sengelaub D.R. and B.L. Finlay (1986) Cell death in the mammalian visual system during development: I. Retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* Vol. **204**(4): 311-317.
- Sharma H.S., Nyberg F., Westman J., Alm P., Gordh T. and D. Lindholm (1998) Brain derived neurotrophic factor and insulin like growth factor-1 attenuate upregulation of nitric oxide synthase and cell injury following trauma to the spinal cord. An immunohistochemical study in the rat. *Amino Acids.* Vol. **14**: 121-129.
- Shigeno T., Mima T., Takakura K., Graham D.I., Kato G., Hashimoto Y. and S. Furukawa (1991) Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J. Neurosci.* Vol. **11**(9): 2914-2919.
- Shimazaki K., Ishida A. and N. Kawai (1994) Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci. Res.* Vol. **20**(1): 95-99.
- Shimizu S., Eguchi Y., Kosaka H., Kamiike W., Matsuda H. and Tsujimoto Y. (1995) Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature.* Vol. **374**: 811-813.
- Shimizu S., Shinohara Y. and Y. Tsujimoto (2000) Bax and Bcl-xL independently

- regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene*. Vol. **19**(38): 4309-4318.
- Shimojo M., Nakajima K., Takei N., Hamanoue M. and S. Kohsaka (1991) Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci. Letters*. Vol. **123**: 229-231.
- Shiraiwa N., Inohara N., Okada S., Yuzaki M., Shoji S. and S. Ohta (1996) An additional form of rat Bcl-x, Bcl-xbeta, generated by an unspliced RNA, promotes apoptosis in promyeloid cells. *J. Biol. Chem*. Vol. **271**(22): 13258-13265.
- Sieber-Blum, M. (1991) Role of the neurotrophic factors BDNF and NGF in the commitment of pluripotent neural crest cells. *Neuron*. Vol. **6**: 949-955.
- Siliprandi R., Canella R. and G. Carmignoto (1993) Nerve growth factor promotes functional recovery of retinal ganglion cells after ischemia. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci*. Vol. **34**(12): 3232-3245.
- Singleton J.R., Dixit V.M. and E.L. Feldman (1996a) Type-I insuline-like growth factor receptor activation regulate apoptotic proteins. *J. Biol. Chem*. Vol. **271**: 31791-31794.
- Sjöberg J. and M. Kanje (1989) Insulin-like growth factor (IGF-1) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res*. Vol. **485**:102-108.
- Sjöstrand J. (1996) Changes of nucleoside phosphatase activity in the hypoglossal nucleus during nerve regeneration. *Acta Physiol. Scand*. Vol. **67**: 219-228.
- So K.F. and H.K. Yip (1998) Regenerative capacity of retinal ganglion cells in mammals. *Vision Res*. Vol. **38**: 1525-1535.
- Soontornniyomkij V., Wang G., Pittman C.A., Wiley C.A. and C.L. Achim (1998) Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in activated microglia of human immunodeficiency virus type 1 encephalitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. Vol. **24**(6): 453-60.
- Soppet D., Escandon E., Maragos J., Middlemas D.S., Reid S.W., Blair J., Burton L.E., Stanton B.R., Kaplan D.R., Hunter T., Nikolics K and L.F.Parada (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell*. Vol. **65**: 895-903.
- Spanaus K.S., Schlapbach R. and A. Fontana (1998) TNF- α and IFN- γ render microglia sensitive to Fas ligand-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL. *Eur. J. Immunol*. Vol. **28**: 4398-4408.
- Squinto S.P., Stitt T.N., Aldrich T.H., Davis S., Bianco S.M., Radziejewski C., Glass

- D.J., Masiakowski P., Furth M.E., Valenzuela D.M., DiStefano P.S. and G.D. Yancopoulos (1991) trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*. Vol. **65**: 885-893.
- Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Litwack G. and E.S. Alnemri (1996) Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **93**(25): 14486-14491.
- Steller H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. Vol. **267**: 1445-1456.
- Stensaas L.J. (1975) Pericytes and perivascular microglial cells in the basal forebrain of the neonatal rabbit. *Cell Tiss. Res*. Vol. **158**: 517-541.
- Stensaas L.J. and Reichert W.H. (1971) Round and amoeboid microglial cells in the neonatal rabbit brain. *Z. Zellforsch*. Vol. **119**: 147-163.
- Stewart C.E.H. and P. Rotwein (1996) Growth, differentiation and survival: Multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev*. Vol. **76**: 1005-1026.
- Strautman A.F., Cork R.J. and K.R. Robinson (1990) The distribution of free calcium in transected spinal axons and its modulation by applied electrical fields. *J. Neurosci*. Vol. **10**: 3564-3575.
- Streit W.J. (1996) The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicol*. Vol. **17**(3-4): 671-678.
- Streit W.J. and G.W. Kreutzberg (1988) Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J. Comp. Neurol*. Vol. **268**(2): 248-263.
- Streit W.J. and M. B. Graeber (1993) Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: Insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia*. Vol. **7**: 68-74.
- Streit W.J., Graeber M.B. and G.W. Kreutzberg (1988) Functional plasticity of microglia: A review. *Glia*. Vol. **1**: 301-307.
- Streit W.J., Graeber M.B. and G.W. Kreutzberg (1989b) Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Exp. Neurol*. Vol. **105**(2): 115-126.
- Sturrock R.R. (1978) A developmental study of ependymal cells and supraependymal cells and their possible relationship to microglia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. Vol. **4**(5): 307-322.

- Sumantran V.N. and E.L. Feldman (1993) Insulin-like growth factor I regulates c-myc and GAP-43 messenger ribonucleic acid 3 expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Endocrinology*. Vol. **132**: 2017-2023.
- Suzumura A., Marunouchi T. and H. Yamamoto (1991) Morphological transformation of microglia in vitro. *Brain Res.* Vol. **545**(1-2): 301-306.
- Suzumura A., Mezitis S.G.E., Gonatas N.K. and D.H. Silberbeg (1987) MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain: induction of Ia antigen expression by γ -interferon. *J. Neuroimmunol.* Vol. **15**: 263-278.
- Suzumura A., Sawada M., Yamamoto H. and T Marunouchi (1990) Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J. Neuroimmunol.* Vol. **30**(2-3): 111-120.
- Tagami M., Ikeda K., Nara Y., Fujino H., Kubota A., Numano F. and Y. Yamori (1997b) Insulin-like growth factor-1 attenuates apoptosis in hippocampal neurons caused by cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lab. Invest.* Vol. **76**(5): 613-617.
- Taniuchi M., Clark H.B., Schweitzer J.B. and E.M. Johnson Jr. (1988) Expression of NGF receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact and binding properties. *J. Neurosci.* Vol. **8**: 664-681.
- Tatton W.G. (1999) Apoptotic mechanism in neurodegeneration: Possible relevance to glaucoma. *Eur. J. Ophthalmol.* Vol. **9**(Suppl. 1): S22-S29.
- Terubayashi H., Murabe Y., Fujisawa H., Itoi M. and Y. Iwata (1984) Enzymehistochemical identification of microglial cells in the rat retina: Light and electron microscopic studies. *Exp. Eye Res.* Vol. **39**: 595-603.
- Tewari M., Quan L.T., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S. and V.M. Dixit (1995) Yama/CPP32 β , a mammalian homologue of *ced-3*, is a a crm-A-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly-(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* Vol. **81**: 801-809.
- Tezel G. and M.B. Wax (1999) Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, Vol. **40**(11): 2660-2667.
- Thanos S. (1988) Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites a the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments. *Cell Tiss. Res.* Vol. **254**: 599-609.
- Thanos S. (1991a) Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neurosci. Letters.* Vol. **127**: 108-

112.

- Thanos S. (1991b) The relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **3**: 1189-1207.
- Thanos S. and J. Mey (1995) Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats. *J. Neurosci.* Vol. **15**(2): 1057-1079.
- Thanos S. and W. Richter (1993) Migration of microglia: The migratory potential of vitally labelled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy. *Int. J. Devl. Neuroscience.* Vol. **11**(5): 671-680.
- Thanos S., Bähr M., Barde Y.A. and J. Vanselow (1989) Survival and axonal elongation of adult rat retinal ganglion cells. *In vitro* effects of lesioned sciatic nerve and brain derived neurotrophic factor. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **1**(1): 19-26.
- Thanos S., Kacza J., Seeger J. and J. Mey (1994) Old dyes for new scopes: the phagocytosis-dependent long-term fluorescence labelling of microglial cells *in vivo*. *TINS.* Vol. **17**(5): 177-182.
- Thanos S., Mey J. and M. Wild (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurosci.* Vol. **13**(2): 455-466.
- Thanos S., Pavlidis C., Mey J. and H.J. Thiel (1992) Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.* Vol. **55**: 101-117.
- Thanos S., Richter W. and H.J. Thiel (1995) Cell and tissue protection in Ophthalmology (Ed. Pleyer U., Schmidt K.H. and H. Thiel) Hippokrates. Stuttgart: 195-205.
- Théry C., Chamak B. and M. Mallat (1991) Cytotoxic effect of brain macrophages on developing neurons. *Eur. J. Neurosci.* Vol. **3**: 1155-1164.
- Thoenen H. (1991) The changing scene of neurotrophic factors. *TINS.* Vol. **14**(5): 165-170.
- Thoenen H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science.* Vol. **270**: 593-598.
- Thoenen H. and Y.A. Barde (1980) Physiology of nerve growth factor. *Physiological Reviews.* Vol. **6**(4): 1284-1335.
- Thoenen H., Barde Y.A., Davies A.M. and J.E. Johnson (1987) Neurotrophic factors and neuronal cell death. *Ciba Found Symp.* Vol. **126**: 82-95.
- Thomas W.E. (1990) Characterization of the dynamic nature of microglial cells. *Brain Research Bulletin.* Vol. **25**: 351-354.

- Thomas W.E. (1992) Brain macrophages: Evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. Rev.* Vol. **17**:61-74.
- Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* Vol. **267**: 1456-1462.
- Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J. et al (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing monocytes. *Nature.* Vol. **356**(6372): 768-774.
- Tomita H., Ishiguro S.I., Abe, T. and M. Tamai (1999) Administration of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-II protects phosphate-activated glutaminase in the ischemic and reperfused rat retinas. *Tohoku J. Exp. Med.* Vol. **187**: 227-236.
- Torvick A. (1975) The relation between microglia and brain macrophages. Experimental investigations. *Acta Neuropathol.* Vol. **VI**: 297-300.
- Troy C.M., Stefanis L., Greene L.A. and M.L. Shelanski (1997) Nedd2 is required for apoptosis after trophic factor withdrawal, but not superoxide dismutase (SOD1) downregulation, in sympathetic neurons and PC12 cells. *J. Neurosci.* Vol. **17**(6): 1911-1918.
- Tsoufas P., Soppet D. Escandón E. Tesrollo L., Mendoza-Ramírez J.L., Rosenthal A., Nikolics K. and L. Parada (1993). The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to NT-3 in PC12 cells. *Neuron.* Vol. **10**: 975-990.
- Tsujimoto Y. and C.M. Croce (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **83**: 5214-5218.
- Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E. and C.M. Croce (1985) The t(14; 18) chromosome translocation involved in B-Cell neoplasm result from mistakes in VDJ joining. *Science.* Vol. **229**: 1390-1393.
- Tyor W.R., Glass J.D., Baumrid N., McArthur J.C., Griffin J.W., Becker P.S. and D.E. Griffin (1993) Cytokine expression of macrophages in HIV-1 associated vacuolar myelopathy. *Neurology.* Vol. **43**(5): 1002-1009.
- Ugolini G., Cremisi F. and L. Maffei (1995) TrkA, TrkB and p75 mRNA expression is developmentally regulated in the rat retina. *Brain Res.* Vol. **704**: 121-124.
- Ullrich A., Gray A., Tam A.W., Yang-Fen T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Le Bon T., Kathuria S., Chen E. et al (1986) Insulin-like growth factor receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggest structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* Vol. **5**(10): 2503-2512.

- Unoki K. and M.M. La Vail (1994) Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Inves. Ophthal. Vis. Sci.* Vol. **35**(3): 907-915.
- Urabe T., Hattori N., Yoshikawa M., Yoshino H., Uchida K. and Y. Mizuno (1998) Colocalization of Bcl-2 and 4-hydroxynonenal modified proteins in microglial cells and neurons of rat brain following transient focal ischemia. *Neurosci. Letters.* Vol. **247**: 159-162.
- Varon S. and R. Adler (1981) Trophic and spicifying factors directed to neuronal cells. *Adv. Cell Neurobiol.* Vol. **2**: 115-163.
- Vaughn J.E. and A. Peters (1968) A Third Neuroglial Cell Type. *J. Comp. Neur.* Vol. **133**: 269-288.
- Vázquez M.E. and T.Ebendal (1991) Messenger RNAs for *trk* and the low-affinity NGF receptor in rat basal forebrain. *NeuroReport.* Vol. **2**(10): 593-596.
- Vecino E., Caminos E., Ugarte M., Martin-Zanca D. and N.N. Osborne (1998a) Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptors in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion. *Gen.Pharmac.* Vol. **30**(3): 305-314.
- Vecino E., Ugarte M., Nash M.S. and N.N. Osborne (1999) NMDA induces BDNF expression in the albino rat retina *in vivo*. *NeuroReport.* Vol. **10**: 1103-1106.
- Vela J.M., Dalmau I., González B. and B.Castellano (1995b) Morphology and Distribution of Microglial Cells in the Young and Adult Mouse Cerebellum. *J. Comp. Neurol.* Vol. **361**: 602-616.
- Verdi J.M., Birren S.J., Ibáñez C.F., Persson H. Kaplan D.R., Benedetti M., Caho M.V. and D.J. Anderson (1994) p75^{LNGFR} regulates trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron.* Vol. **12**: 733-745.
- Vidal-Sanz M. (1990) Regeneración del sistema visual en la rata adulta. *Anales de la real Academia de Medicina*, tomo **CVII**, cuaderno 1º: 17-49.
- Vidal-Sanz M., Villegas-Pérez M.P., Bray G.M. y A.J. Aguayo (1988) Persistent retrograde retinal labelling of adult rat retinal ganglion cells with carbocyanine dye dil. *Exp. Neurol.* Vol. **102**: 92-101.
- Villegas-Pérez M.P., Vidal-Sanz M., Bray G.M and A.J. Aguayo (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* Vol. **8**(1): 265-280.
- Villegas-Pérez M.P., Vidal-Sanz M., Rasminsky M., Bray G.M. and A.J. Aguayo (1993) Rapid and protacted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* Vol. **24**(1): 23-36.
- Von Bartheld C.S. (1998) Neurotrophins in the developing and regenerating visual

- system. *Histol. Histopathol.* Vol. **13**: 437-459.
- Von Bartheld C.S., Williams R., Lefcort F., Clary D.O., Reichardt L.F. and M. Bothwell (1996) Retrograde transport of neurotrophins from the eye to the brain in chick embryos: Roles of the p75^{NTR} and TrkB receptors. *J. Neurosci.* Vol. **16**(9): 2295-3008.
- Vrabec M.D. (1970) Microglia in the monkey and rabbit retina. *Neuropathol. Exp. Neurol.* Vol. **29**: 217-224.
- Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H. and J. Yuan (1994) *Ich-1*, an *Ice/ced-3* related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell.* Vol. **78**: 739-750.
- Wang T., Xie X. and B. Lu (1995) Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J. Neurosci.* Vol. **15**: 4796-4805.
- Ward S.A., Ransom P.A., Booth P.L. and W.E. Thomas (1991) Characterization of ramified microglia in tissue culture: pinocytosis and motility. *J. Neurosci. Res.* Vol. **29**: 13-28.
- Watanabe H., Ishiguro S. and M. Tamai (1995) Retinal degeneration and regeneration. En *"Degradation of membrane-bound glutaminase in the rat retina following ischemia"* (Ed. Kato S., Osborne N. and M. Tagami). Kugler Publications, Amsterdam, New York.
- Watson F.L., Herssen H.M., Moheban D.B., Lin M.Z., Sauvageot C.M., Bhattacharyya A., Pomeroy S.L. and R.A. Segal (1999) Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J. Neurosci.* Vol. **19**(18): 7889-7900.
- Weinstein D.L., Walker D.G., Akiyama H. and P.L. McGeer (1990) Herpes simplex virus type I infection of the CNS induces major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia. *J. Neurosci. Res.* Vol. **26**: 55-65.
- Wetmore C., Ernfors P., Persson H. and L. Olson (1990) Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in-situ hybridization. *Exp. Neurol.* Vol. **109**: 141-152.
- Whittemore S.R. and A. Seiger (1987) The expression, localization and functional significance of beta-nerve growth factor in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* Vol. **12**: 439-464.
- Whittemore S.R., Ebendal T., Lärkfors L., Olson L., Seiger A., Strömberg and H. Persson (1986) Developmental and regional expression of β nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* Vol. **83**: 817-821.
- Williams G.T. and C.A. Smith (1993) Molecular regulation of apoptosis: genetic

- controls on cell death. *Cell*. Vol. **74**: 777-779.
- Williams L.R., Varon S., Peterson G.M., Wictorin K., Fischer W., Bjorklund A. and F.H.Gage (1986) Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria fornix transection. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA. USA*. Vol. **83**: 9231-9235.
- Woodroffe M.N., Bellamy A.S., Feldmann M., Davison A.N. and M.L. Cuzner (1986) Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. Possible role for microglia in lesion growth. *J. Neurol. Sci*. Vol. **74**(2-3): 135-152.
- Wozniak W. (1998) Origin and functional role of microglia. *Folia Morphol*. Vol. **57**(4): 277-285.
- Wu C.H., Wen C.Y., Shieh J.Y. and E.A. Ling (1993) A quantitative study of the differentiation of microglial cells in the developing cerebral cortex in rats. *J. Anat*. Vol. **182**: 403-413.
- Wu C.H., Wen C.Y., Shieh J.Y. and E.A. Ling (1994) Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J. Neurocytol*. Vol. **23**: 258-269.
- Wyllie A.H. (1981) Cell death:a new classification separating apoptosis from necrosis. En *"Cell Death in Biology and Pathology"* (Ed. Bowen y Lockshin, Chapman and Hall). Londres: 9-34.
- Wyllie A.H., Kerr J.F.R. and A.R. Currie (1972a) Cellular events in the adrenal cortex following ACTH deprivation. *J. Pathol*. Vol. **106**(1).
- Wyllie A.H., Kerr J.F.R. and A.R. Currie (1981a) Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol*. Vol. **68**: 251-306.
- Wyllie, A.H., Beattie G.J. and A.D. Hargreaves (1981b) Chromatin changes in apoptosis. *Histochem. J*. Vol. **13**: 681-692.
- Xiang J., Chao D.T. and S.J. Korsmeyer (1996) BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **93**: 14559-14563.
- Xie L. And C.L. Tsou (1993) Comparison of secondary structures of insulin and proinsulin by FTIR. *J. Protein Chemistry*. Vol. **12**(4): 483-487.
- Xu J. And E.A. Ling (1994) Studies of the distribution and functional roles of transitory amoeboid microglial cells in developing rat brain using exogenous horseradish peroxidase as a marker. *J. Hirnsforsch*. Vol. **35**(1): 103-111.
- Xu J., Kaur C. and E.A. Ling (1993) Variation with age in the labelling of amoeboid microglial cells in rats following intraperitoneal or intravenous injection of a fluorescent dye. *J. Anat*. Vol. **182**(Pt1): 55-63.

- Yakovlev A.G., Knobloch S.M., Fan L., Fox G.B., Goodnight R. and A.I. Faden (1997) Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* Vol. **17**(19): 7415-7424.
- Yamadori T. (1981) An experimental anatomical study on the topographic termination of the optic nerve fibers in the rat. *J. Hirnforsch.* Vol. **22**: 313-326.
- Yan Q., Elliot J. and W.D.O. Snider (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature.* Vol. **360**: 753-755.
- Yan Q. And E.M. Johnson (1988) An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J. Neurosci.* Vol. **8**: 3481-3498.
- Yang D., Liu Y., Bhalla K., Naekyung K., Ibrado A.M., Cai J., Peng T., Jones D.P. and X. Wang (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* Vol. **275**: 1129-1132.
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B. and S.J. Korsmeyer (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* Vol. **80**, 285-291.
- Yang L., Matthews R.T., Schulz J.B., Klockgether T., Liao A.W., Martinou J.C., Penney J.B., Hyman B.T. and M. F. Beal (1998) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J. Neurosci.* Vol. **18**(20): 8145-8152.
- Yeo T.T., Chua-Couzens J., Butcher L.L., Bredesen D.E. Cooper J.D., Valletta J.S., Mobley W.C. and F.M. Longo (1997) Absence of p75NTR causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation. *J. Neurosci.* Vol. **17**(20): 7594-7605.
- Yin X.M., Oltvai Z.N. and S.J. Korsmeyer (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature.* Vol. **369**: 321-323.
- Yip H.K. and E.M. Johnson, Jr. (1984) Developing dorsal root ganglion neurons require trophic support from their central processes: Evidence for a role of retrogradely transported nerve growth factor from the central nervous system to the periphery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. **81**: 6245-6249.
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M. and H.R. Horvitz (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell.* Vol. **75**: 641-652.
- Zamzami N., Brenner C., Marzo I., Susin S.A. and G. Kroemer (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene.* Vol.

16(17): 2265-2282.

Zanellato A., Comelli M.C., Dal Toso R. and G.Carmignoto (1993) Developing rat retinal ganglion cells express the functional NGF receptor p140trKA. Dev. Biol. Vol. **159**: 105-113.

Zha H., Aimé Sempé C., Sato T. and J.C. Reed (1996) Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. J. Biol. Chem. Vol. **271**: 7440-7444.

Zhong L.T., Sarafian T., Kane D.J. , Charles A.C., Mah S.P., Edwards R.P. and D.E Bredesen (1993) Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. **90**(10): 4533-4537.

Zhu L., Ling S., Yu X.D., Venkatesh L.K., Subramanian T. and G.T.H. Chinnadurai (1999). Modulation of mitochondrial Ca(2+) homeostasis by Bcl-2. J. Biol. Chem. Vol. **274**(47): 33267-33273.

Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A. and X. Wang (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell. Vol. **90**: 405-413.