



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Curso de Activación Glial y Muerte
de las Células Ganglionares de la Retina
en Dos Modelos de Degeneración

Doña María Josefa González Riquelme

2022



Universidad de Murcia

Laboratorio de Oftalmología Experimental
Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología
y Anatomía Patológica.

Facultad de Medicina

Programa de doctorado en “Ciencias de la Visión”

**“CURSO DE ACTIVACIÓN GLIAL Y MUERTE DE LAS CÉLULAS
GANGLIONARES DE LA RETINA EN DOS MODELOS DE
DEGENERACIÓN”**

Presentada por:

María Josefa González Riquelme

Para obtener el grado de Doctor por la Universidad de Murcia
con mención Internacional

Dirigida por:

**Dra. Marta Agudo Barriuso
Dra. Caridad Galindo Romero**

2022



Universidad de Murcia

Laboratory of Experimental Ophthalmology
Department of Ophthalmology, Optometry, Otolaryngology
and Pathology.

Faculty of Medicine

Postgraduate program in "Visual Science"

"COURSE OF GLIAL ACTIVATION AND RETINAL GANGLION CELL DEATH IN TWO MODELS OF DEGENERATION"

Dissertation submitted by:

María Josefa González Riquelme

To obtain the PhD degree from the University of Murcia
with the International Doctor mention

Supervised by:

Dra. Marta Agudo Barriuso
Dra. Caridad Galindo Romero

2022

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perservar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste los que cueste.

-Marie Curie-

*A mis padres, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.
A mi familia, a los que están y a los que por desgracia ya no están.*

AGRADECIMIENTOS	VII
ANEXOS ADMINISTRATIVOS	XI
RESUMEN	XXI
SUMMARY	XXV
LISTAS DE ABREVIATURAS	XXX
LISTA DE ILUSTRACIONES. FIGURAS Y TABLAS	XXXIII
ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS	XLIX
HALLAZGOS ORIGINALES	LI
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	LII
I. INTRODUCCIÓN.....	2
I.1. EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	2
I.2. SISTEMA VISUAL	4
I.2.1. ANATOMÍA DEL OJO.....	5
I.3. LA RETINA DE MAMÍFEROS	6
I.4. CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA (CGRs).....	9
I.4.1. PROYECCIONES DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN ROEDORES	10
I.4.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA	11
I.4.3. MARCAJE RETRÓGRADO CON TRAZADORES NEURONALES	12
I.5. MARCADORES FENOTÍPICOS.....	12
I.5.1. DENSIDAD DE CGR EN RETINAS INTACTAS	13
I.6. CÉLULAS DE LA GLÍA EN LA RETINA.....	13
I.1.6.1. DESCUBRIMIENTO DE LA MICROGLÍA.....	14
I.1.6.2. IDENTIFICACIÓN Y MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA	16
I.1.6.3. MICROGLIA EN LA RETINA	20
I.1.6.4. IDENTIFICACIÓN DE MICROGLIA	21
I.1.7. CÉLULAS DE MACROGLIA	22
I.1.7.1. CÉLULAS DE MÜLLER.....	22

I.1.7.2. ASTROCITOS	23
I.1.7.3. IDENTIFICACIÓN DE MACROGLÍA DE LA RETINA.....	23
I.1.8. DEGENERACIÓN DEL SISTEMA VISUAL	24
I.1.8.1. VENTAJAS DE TRABAJAR EN EL SISTEMA VISUAL COMO MODELO DE DEGENERACIÓN DEL SISTEMA VISUAL	24
I.1.8.2. MODELOS DE DEGENERACIÓN NEURONAL EN LA RETINA.....	25
I.1.8.2.1. Isquemia retiniana	25
I.1.8.2.2. Excitotoxicidad	25
I.1.8.2.3. Hipertensión ocular	26
I.1.8.2.4. Modelos de axotomía del nervio óptico.....	26
I.1.9. EFECTO CONTRALATERAL: SIGNIFICADO Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS.....	27
I.1.10. EFECTO CONTRALATERAL DESPUÉS DE AXOTOMIA DEL NO.....	28
I.1.11. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE RETINA	29
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
II.2. HIPÓTESIS	32
II.2.1. OBJETIVOS GENERALES	32
II.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA.....	36
III.2. APLASTAMIENTO DEL NERVIÓ ÓPTICO.....	38
III.3. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA	38
III.4. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA	39
III.5. PROCESADO HISTOLÓGICO	41
III.5.1. SACRIFICIO, PERFUSIÓN Y FIJACIÓN DEL ANIMAL	41
III.5.2. ENUCLEACIÓN DEL GLOBO OCULAR.....	41
III.5.3. RETINAS A PLANO	42
III.5.4. PROCESADO HISTOLÓGICO DE LA RETINA PARA SECCIONES TRANSVERSALES.....	42
III.5.5. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE RETINA.....	43

III.6. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA.....	43
III.7. ANTICUERPOS PRIMARIOS.....	46
III.7.1. ANTICUERPOS SECUNDARIOS	47
III.8.2. FOTOMONTAJES	48
III.8.3. MAGNIFICACIONES EN DETALLE.....	48
III.9. CUANTIFICACIÓN	50
III.9.1. CUANTIFICACIÓN MANUAL EN RETINAS A PLANO.....	50
A) Iba1 ⁺ y CD68 ⁺	50
B) CMs CD206 ⁺	51
C) CGRs y Microglía	51
III.9.2. MANUAL EN SECCIONES TRASVERSALES DE RETINA.....	53
A) CMs Iba1 ⁺ , CD68 ⁺ y CD206 ⁺	53
III.9.3. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL. MAPAS TOPOGRÁFICOS.....	53
III.9.3.1 MAPAS DE VECINOS.....	54
III.9.4. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES MEDIANTE IMAGE J.....	55
IMAGE J.....	55
Cuantificación de las CMs-Iba1 ⁺ y CMs-CD68 ⁺ en secciones trasversales de retina	56
Cuantificación de las CMs-CD206 ⁺ en secciones trasversales de retina	57
III.9.5. ANALISIS MORFOMÉTRICO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES MEDIANTE IMAGE J FIJI	59
IMAGE J FIJI.....	59
RECONSTRUCCIÓN DE LAS CMs	59
III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
IV. RESULTADOS	67
IV.1. CURSO DE LA ACTIVACIÓN GLIAL A LARGO PLAZO EN RETINAS LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN TRAS UNA AXOTOMÍA UNILATERAL	67
IV.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	67
IV.1.2. ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN RETINAS INTACTAS, LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN.....	67

IV.1.2.1. ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN RETINAS INTACTAS.....	67
IV.1.2.2. ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN RETINAS LESIONADAS	69
IV.1.2.3. ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN RETINAS CONTRALATERALES A LA LESIÓN	78
IV.1.3. ACTIVACIÓN MACROGLIAL EN RETINAS LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN	86
IV.1.3.1. ACTIVACIÓN MACROGLIAL EN RETINAS LESIONADAS.....	86
IV.1.3.2. ACTIVACIÓN MACROGLIAL EN RETINAS CONTRALATERALES	87
IV.1.4. RESUMEN.....	88
IV.1.5. SUMMARY	89
IV.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE CURSO DE MUERTE DE CGRs Y ACTIVACIÓN MICROGLIAL ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS.....	90
IV.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	90
IV.2.2. CURSO TEMPORAL DE MUERTE DE LAS CGRs: CORs vs. ApNO	90
IV.2.3. ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN LOS CORs vs ApNO	97
IV.2.4. ACTIVACIÓN MACROGLIAL	102
IV.2.5. RESUMEN.....	104
IV.2.6. SUMMARY	105
IV.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DE MICROGLIA ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS.....	106
IV.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	106
IV.3.2. NÚMERO DE PROCESOS.....	110
IV.3.2.1 NÚMERO DE PROCESOS DE RAMAS BASALES Y APICALES.....	115
IV.3.3. TAMAÑO DEL SOMA	124
IV.3.4. LONGITUD TOTAL DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES.....	127
IV.3.4.1 LONGITUD TOTAL DE LAS RAMAS BASALES Y APICALES	132
IV.3.5. VOLUMEN TOTAL DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES	140
IV.3.6. ÁREA Y PERÍMETRO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES.....	142
IV.3.7. CIRCULARIDAD DEL SOMA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES	149
IV.3.8. SHOLL DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES	153

IV.3.9. RESUMEN.....	156
IV.3.10. SUMMARY	157
IV.4. RESUMEN GRÁFICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	158
V. DISCUSIÓN	163
V.1 CURSO DE ACTIVACIÓN GIAL EN RETINAS LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN TRAS UNA AXOTOMIA UNILATERAL	163
V.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE MUERTE DE CGR Y ACTIVACIÓN MICROGLIAL ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS	166
V.3 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MORFOLOGIA DE LA MICROGLIA ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS	168
VI. CONCLUSIONES	172
VII.BIBLIOGRAFÍA	175
ANEXO I.....	196
ANEXO II.....	217

AGRADECIMIENTOS

¡Quién diría que ya han pasado cuatro años desde que comencé la realización de esta tesis doctoral!, y ahora que estoy escribiendo estas líneas, me embarga la nostalgia y me llegan numerosos recuerdos de estos últimos años (incluidos los de la pandemia del 2020). Cuesta decir adiós, y no sé cómo demostrarlo en tan solo unas líneas, pero espero que sean suficientes. Perdonadme si me pongo sentimental, pero es complicado no hacerlo al llegar a este punto. Quién me diría que hacer la tesis doctoral sería posible gracias a la realización del TFG, hace ya seis años, el cual sería el principio de una etapa importante de mi vida que ahora está a punto de terminar. Aún recuerdo el “tour” por el laboratorio, acompañada por el Doctor Marcelino Avilés, y de los nervios que tenía por estar allí. Nunca olvidaré aquel primer momento, pues fue el instante que marcó mi futuro. Desde entonces, he experimentado muchas emociones, tanto buenas como malas, y todas me han permitido avanzar a nivel emocional y personal.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a la **Doctora Marta Agudo Barriuso**, co-directora de esta tesis, quien con su apoyo y sus conocimientos me ha guiado año tras año para poder terminar una etapa muy importante de mi vida. No sabría cómo agradecerle la confianza que depositaste en mí desde el primer momento, cuando me aceptaste para realizar el TFG. Han pasado bastantes años desde entonces, y creo –y espero– no haberte defraudado. Me has enseñado que la vida es, a veces, injusta, pero que de una forma u otra hay que seguir adelante. Me has hecho ver que con constancia, esfuerzo y trabajo todo sale (incluso los explantes). Gracias por ayudarme a ejercitar la paciencia y a controlar mis nervios. Gracias por permitirme poner mis toques de “historia” en los trabajos que he desarrollado durante estos años. Simplemente, gracias.

A la **Doctora Caridad Galindo Romero**, co-directora de esta tesis. Quién me iba a decir que mi profesora de carrera (a quien confundía con una estudiante de grado) sería parte fundamental de mi tesis doctoral. Gracias por ayudarme y guiarme en estos años tan intensos. Aunque siempre te he visto como profesora, he de decir que estos últimos años hemos ganado en confianza, por lo que me alegro de que seas también parte notoria de esta etapa.

Al profesor **Manuel Vidal Sanz**: gracias por permitirme ser una más en su grupo de investigación, y por enseñarme a trabajar con constancia y rigor, y por creer en mí.

A la profesora **María Paz Villegas Pérez**: gracias por enseñarme que todo esfuerzo y trabajo tienen su recompensa.

Al Doctor **Marcelino Avilés Trigueros**: muchísimas gracias por toda la ayuda que he recibido de tu parte. Desde que comencé en el laboratorio con el Trabajo Fin de Grado estuviste allí, dándome consejos, enseñándome cómo funcionaban las cosas y, todavía hoy (terminado la tesis doctoral), sigues ayudándome, por muy ocupado que estés. De verdad, no sé cómo agradecerle tu inmensa paciencia y la confianza que depositaste en mí desde el primer momento que me diste clase en primero de carrera.

Al doctor **Fernando Lucas Ruiz**: gracias por la ayuda recibida en estos años. A pesar de que hemos tenido algún que otro disgusto, creo que hemos formado un buen equipo.

Al doctor **Johnny di Pierdomenico**: gracias por alegrarme el día a día y por brindarme tu ayuda siempre que lo necesitaba.

Al Doctor **Diego García Ayuso**, al Doctor **Javier Valiente Soriano** y al Doctor **Manuel Salinas Navarro**: gracias por ser auténticos referentes de profesionalidad, entereza y sacrificio.

Al Doctor **Juan Antonio Miralles de Imperial Ollero**, a la Doctora **María Norte Muñoz** y a **Alejandro Gallego Ortega**, gracias por hacerme desconectar y por regalarme grandes momentos en el laboratorio.

Ana Martínez Vacas, que puedo decir de ti que ya no sepas y que refleje todo lo que significas para mí en tan solo unas líneas. Eres una pieza fundamental en mi vida: una hermana, una amiga, una confidente... Nada hubiera sido lo mismo si no te hubiera conocido. Alguien con quien puedo contar siempre, es decir, en las buenas, en las malas y en las muy malas. Alguien a quien puedo confiar cualquier cosa y quien da muy buenos consejos (tipo bruja). A alguno tendría que haber escuchado con más atención, aunque suena a tópico, pero tenías razón. Me llevo todos los buenos momentos que hemos pasado juntas mientras desarrollaba esta tesis; me quedo con las risas, las prisas..., incluso con los nervios. Muchas gracias por estar en mi vida.

Kristy Rodríguez Ramírez: muchas gracias por ser parte importante en la realización de esta tesis. Gracias por estar allí, escuchar, reír, y, sobre todo, mandar stickers chistosos para ayudarme a desconectar. Lo de hacerme fotos y videos a traición, mejor lo dejamos.

Gracias a **José Manuel Bernal**, por ser una gran persona que siempre ha estado ahí cuando lo necesitaba. Cómo no, gracias por aguantarme, ya que, a veces, soy intensa.

A **María Dolores Soria**: gracias por estar siempre y por resolver todos los problemas que surgen (que no son pocos).

También me gustaría agradecer a **Juana** y a **Pepe** (técnicos de la planta 0 del LAIB) su apoyo en la realización de esta tesis. Por ayudarme siempre que lo necesitaba y por estar pendientes de mí, aunque ya hubiera terminado el trabajo en su planta.

A **Loli**, la reina a la sombra del lab: gracias por las risas, por los momentos de "no me pises lo fregao", por tus consejos... Por estar ahí.

I would like to thank **Dra. Ana Raquel Santiago** for allowing me to stay abroad for three months under her supervision and for all her help. I would also like to thank **Dra. Raquel Boia** for her help during those months and the whole retinal dysfunction and neuroinflammation group.

No puedo obviar escribir unas líneas a dos personas que me hicieron la vida más fácil en Coímbra durante los 3 meses que estuve allí: la **Doctora Xandra Pereiro** y **Carolina Santos**. Xandra, muchas gracias por todo: por estar pendiente de mí, por enseñarme el lab, por presentarme a tus amigos, por tus consejos y por toda tu ayuda. Como prometido, vou escrever em português à minha menina portuguesa favorita. Carolina, muito obrigada por tudo, pela tu ajuda, pelas risadas, pelas nossas conversas em "Portoñol", pelas nossas fotografías... Gracias chicas por todos esos buenos momentos que vivimos juntas y siempre agradeceré a Coímbra, a cidade dos estudantes, el haber juntado a una portuguesa, a una vasca y a una murciana. Espero que sigamos manteniendo el contacto como hasta ahora.

Gracias a **Saray**, con la que siempre puedo contar. Ni la distancia ha podido con esta amistad sincera que comenzó hace ya varios años. Gracias por estar siempre conmigo, escucharme y apoyarme. Gracias por hacer que me olvidara por unos momentos de la tesis y mil gracias por todos esos buenos momentos que hemos vivido juntas.

Gracias también a **Marta**, que siempre me anima y me dice “puedes con todo”. Gracias por esos audios super largos poniéndonos al día, por hacerme desconectar y por hacerme reír. Esos momentos son, sin duda, lo mejor.

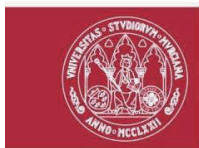
Por último, y no menos importante, agradecer a mi **familia**, por apoyarme aun cuando mis ánimos decaían. Gracias a mis padres, **Mariano** y **Juana**, que siempre están para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías. Gracias por la inmensa ayuda, por guiarme y darme apoyo para realizar esta tesis doctoral. Gracias por ayudarme económicamente (ha sido difícil, pero siempre miráis por mi porvenir). Esto que habéis hecho por mí nunca lo olvidaré. Gracias a mi hermano **Diego** y a mi primo **José Juan**, a quien considero otro hermano por aguantarme y soportarme estos años, por escucharme y ayudarme cada vez que lo necesitaba (los desayunos en “Argos” siempre ayudan a desconectar).

A mis abuelos, **Juan**, **María**, **Diego** y **Josefa** por creer en mí y permanecer siempre conmigo. Cada día he podido contar con vosotros, y eso es algo que llevo en el corazón. Por eso, lamento que no estéis todos para ver que, al fin, conseguí mi sueño.

ANEXOS ADMINISTRATIVOS

ANEXOS ADMINISTRATIVOS

Autorización de los directores de la Tesis para su presentación: **Dra. Marta Agudo Barriuso** y **Dra. Caridad Galindo Romero**.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a Marta Agudo Barriuso, profesora asociada del Área de Oftalmología en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia, e investigadora principal en el grupo de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia e Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria.

D^a Caridad Galindo Romero, Profesora Contratada Doctora de Universidad del Área de Optometría en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia.

AUTORIZAN

La presentación de la tesis doctoral titulada: **“Curso de Activación Glial y Muerte de las Células Ganglionares de la Retina en dos Modelos de Degeneración”** realizada por **D^a María Josefa González Riquelme** bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctora por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 12 de septiembre de 2022

Fdo. Marta Agudo Barriuso

Fdo. Caridad Galindo Romero

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina

Edificio Departamental/LAIB 5^º planta, Ctra. Buenavista s/n, 30120 El Palmar, Murcia T. 868 887574 -7575

Certificado estancia internacional

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

CERTIFICADO DE ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN FUERA DE
ESPAÑA PARA OPTAR A MENCIÓN DE
«DOCTORADO INTERNACIONAL»
INTERNATIONAL Ph.D. VISITING RESEARCH CERTIFICATE

1. DATOS DEL DOCTORANDO QUE HA REALIZADO LA ESTANCIA / Ph.D. STUDENT'S PERSONAL DATA

Nombre y apellidos del doctorando/a / Ph.D. student name and surname: María Josefa González Riquelme
Centro de origen / Institution of origin: Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia
Programa de Doctorado / Doctoral Programme: Vision sciences
Título de la tesis / Thesis title: "Glial activation course after optic nerve crush in injured and contralateral retinas to the injury".

2. DATOS DEL CENTRO EN EL QUE SE HA REALIZADO LA ESTANCIA / HOST INSTITUTION

Nombre del Centro de Educación Superior o Instituto de Investigación / Name of the host institution: Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBR) of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra.
Departamento/Centro / Department/Centre: Retinal Dysfunction and Neuroinflammation Lab
Dirección del Centro / Address: Polo III - Campus de Ciências de la Salud Azinhaga Santa Comba, Celas 3000-548 Coimbra PORTUGAL
Localidad y país / City and country: Coimbra, Portugal.



COMISIÓN GENERAL DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA (España)

Página 1 de 2




UNIVERSIDAD DE
MURCIA

3. DATOS DEL TUTOR/INVESTIGADOR RESPONSABLE DE LA ESTANCIA / RESEARCH SUPERVISOR AT HOST INSTITUTION

Nombre y apellidos del tutor/investigador / Research supervisor name and surname: Ana Raquel Sarabando Santiago
DNI/Pasaporte nº. / I.D. / Passport nº.: 11514635
E-mail: asantiago@fmed.uc.pt
Departamento/Centro al que pertenece / Department/Centre: Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBR) of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra.

4. CERTIFICADO DE LA ESTANCIA / VISITING RESEARCH CERTIFICATE ⁽¹⁾:

(1) A cumplimentar por el tutor investigador responsable de la estancia / To complete by the research supervisor.

<p>El abajo firmante certifica que el doctorando/a arriba mencionado/a ha realizado una estancia en este Centro bajo mi supervisión en las siguientes fechas: desde el 13 de 09 de 2021 hasta el 13 de 12 de 2021, realizando un análisis de la población de células microgliales en diferentes modelos de degeneración neuronal. Evaluando las similitudes y diferencias entre ellos y relacionando estos cambios con la muerte neuronal.</p> <p><i>(indicar la investigación realizada en relación con su tesis doctoral)</i></p> <p>The person signing this document certifies that the above mentioned PhD student has visited this institution under my supervision on the following dates: from 13 September 2021 to 13 December 2021 and, carrying out an analysis of the microglial cell population in different models of neuronal degeneration. Evaluating the similarities and differences between them and relating these changes to neuronal death.</p> <p><i>(research carried out related to the thesis)</i></p>
 Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research <small>Faculty of Medicine - University of Coimbra</small>

En/In Coimbra 13 of December 2021

Firmado y sellado / Signed and stamped*. Dr/a D^o./D^a.: Ana Raquel Santiago

(* Debe firmar y sellar todas las hojas del informe / You must sign and seal all the pages of the report

COMISIÓN GENERAL DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA (España)

Página 2 de 2

Informe Doctor 1

Informe doctor 2

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La retina es parte del sistema nervioso central (**SNC**) y es un modelo ampliamente utilizado para estudiar la respuesta a la lesión de las neuronas y las células gliales, así como para ensayar la eficacia de posibles terapias neuroprotectoras. El aplastamiento del nervio óptico (**ApNO**), es un modelo de degeneración de las células ganglionares de la retina (**CGRs**) muy bien caracterizado en roedores que produce una primera fase de muerte rápida en la que un 85% de la población celular total se pierde en los primeros 14 días, y una segunda fase de muerte más lenta pero constante donde a los 90 días queda aproximadamente el 2% del número inicial. Como consecuencia de la muerte de las CGRs, las células microgliales (**CMs**) se activan, cambian su morfología, migran y fagocitan las CGRs muertas. Las macroglía, astrocitos y células de Müller, también responden, con cambios morfológicos. Los astrocitos y las células de Müller aumentan la expresión de GFAP como signo de reactividad, se vuelven hipertróficas y forman una cicatriz para sellar el tejido dañado. Sin embargo, la respuesta al ApNO no se limitan a la retina lesionada. Recientemente, se ha descrito que, el llamado efecto contralateral. La retina contralateral a una lesión unitateral responde como la retina lesionada, pero de una manera moderada y más tardía. Así, tras el ApNO unilateral en la retina contralateral, se observa activación de CMs, aparición de microglía fagocítica, activación de astrocitos y células de Müller y pérdida de CGRs.

Los cultivos organotípicos de retina (**CORs**) se están utilizando desde principios de los años 30 como un sustituto *in vivo* para estudiar la pérdida de CGRs y la neuroprotección. Además de cumplir mejor con las 3Rs que los modelos *in vivo*, los CORs tienen otras ventajas como un entorno controlado para el ensayo de fármacos o la posibilidad de utilizar retinas humanas procedentes de donaciones post-mortem.

OBJETIVOS

Los objetivos generales de este estudio son:

- 1) Estudiar la respuesta glial en retinas axotomizadas y contralaterales a la lesión.
- 2) Estudiar y comparar el curso de muerte de CGRs y la repuesta glial en CORs y en retinas axotomizadas.
- 3) Analizar y comparar cuantitativamente la morfología de las CMs en retinas intactas, axotomizadas, contralaterales a la lesión y en CORs.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sé utilizaron ratones hembra y machos adultos pigmentados C57Bl / 6, de la colonia reproductora de la Universidad de Murcia. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las directrices de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales con fines científicos y las directrices de la Declaración de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (**ARVO**) para el uso de animales en tratamientos oftálmicos e Investigación de la visión.

Todos los animales fueron manipulados siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Murcia y con la certificación de manejo de animales función C para la manipulación y planificación de experimentos con animales.

Se realizó el modelo de daño axonal de las CGRs mediante ApNO. Se requiere la exposición del nervio óptico (**NO**) tras la apertura de la cuenca ocular. El ApNO se realizó a 0,5 mm y los tiempos de análisis tras la axotomía fueron de 1 días a 45 días y de 1 día a 7 días. Para el estudio *in vivo* los animales se sacrificaron con inyección intraperitoneal de barbitúricos y para el estudio *in vitro* en cámara de dióxido de carbono (**CO₂**).

Se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en retinas a corte, a plano y en explantes de retina con diferentes marcadores para el estudio de diferentes poblaciones celulares como las células de microglía (Iba1, CD206, CD68), astrocitos y células de Müller (Vimentina y GFAP), y CGRs (Brn3a, RBPMS, BIII Tubulina y y sinucleína). La cuantificación de CGRs se realizó de manera automática y la cuantificación de microglía se realizó de forma manual y se estudió su distribución mediante mapas de vecinos. Mediante el programa Image J e Image J Fiji se analizó la morfología de las CMs y la intensidad de fluorescencia del GFAP y Vimentina.

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico y de representación gráfica Graph Pad® Prism v6 (Graph Pad, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Para la comparación de más de dos grupos se realiza un análisis de comparación múltiple por parejas, el *test ANOVA* con post-análisis: *Tukey Dunn* tras cumplir la condición de que la *F global* del *test ANOVA* sea estadísticamente significativa. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Para la comparación de los grupos se utilizó "t-test" prueba no paramétrica y posteriormente un post-análisis; Kruskal-Wallis. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

En el estudio de curso de activación glial en retinas lesionadas y contralaterales a la lesión tras una axotomía unilateral se caracterizó los dos estados de las CMs en fotomontajes a plano y en secciones trasversales. En fotomontajes a plano de retinas intactas se encontraron CMs-Iba1⁺ en la Capa de Fibras de las CGRs (**CFN**), capa de células ganglionares (**CCG**), y en las capasplexiforme interna y externa con una morfología ramificada indicativo de un estado de reposo. En la CCG las CMs-Iba1⁺ se distribuyeron uniformemente. La expresión de CD206 y CD68, marcadores de activación de las CMs M2 y M1 respectivamente, se observó en muy pocas CMs y se localizaron alrededor del NO y Cuerpo Ciliar (**CC**).

En retinas lesionadas, la densidad de CMs-Iba1⁺ en la CCG aumento significativamente a 5, 9 y 21 días volviendo a la normalidad a los 45 días. La densidad de las CMs-CD68⁺ aumento significativamente a 3 días y permaneció más alta que el intacto hasta 45 días. En las retinas contralaterales a la lesión, la densidad de las CMs-Iba1⁺ aumento significativamente a 5 días mientras que las CMs-CD68⁺ fue significativamente mayor de 1 a 45 días después de la lesión. Los CMs-CD206⁺ tenían una morfología alargada y se encontraban principalmente en el CC y alrededor de la cabeza del NO. Así su número aumentó en las retinas lesionadas, y disminuyó en las contralaterales a la lesión.

En secciones trasversales de retina, la densidad de CMs aumentó significativamente de 5 a 21 días en las capas internas de las retinas lesionadas, permaneciendo dentro de los valores intactos en las retinas contralaterales a la lesión. Los astrocitos y las células de Müller se hipertrofiaron transitoriamente en las retinas lesionadas y en menor medida en las contralaterales.

En el estudio del análisis comparativo del curso de muerte de CGRs y activación microglial entre CORs y retinas axotomizadas se observó que la pérdida de CGRs-Brn3a⁺ fue similar en ambos modelos durante los 5 primeros días. *In vivo* la expresión de Brn3a y RBPMS fue paralela, sin embargo, a partir de 5 días *in vitro* la señal de RBPMS se mantiene. También se observó la menor población de células microgliales *in vitro*. Al probar otros marcadores de CGRs, como B III Tubulina o γ sinucleína se observó que el número de CGRs inmunodetectadas con estos marcadores era el mismo que al usar RBPMS, lo que nos indica que son marcadores estructurales, pero no los de viabilidad los que siguen presentes en los CORs.

In vitro, las CMs tienen una activación morfológica distinta a *in vivo*. La cuantificación de las CMs en los CORs mostró que en estos su densidad es menor que tras ApNO, explicando porqué los marcadores estructurales están presentes, ya que no hay bastantes CMs en los CORs para fagocitar todas las CGRs que han muerto. La activación macroglial en CORs ocurre antes que *in vivo*, y abarca toda la retina, mientras que tras ApNO se circunscribe al complejo de CGRs.

En el estudio del análisis comparativo de la morfología de la microglía entre CORs y retinas axotomizadas se observaron cambios cualitativos en la morfología de las CMs-Iba1⁺ y por ello, se decidió realizar un análisis cuantitativo, donde se procedió a realizar un análisis del número de procesos, tamaño del soma, longitud total, volumen, área y perímetro, circularidad y análisis sholl. Se analizó la microglía de 3 zonas de la retina: zona central, zona medial y zona periférica y aunque se encontraron diferencias significativas en las 3 zonas de la retina a diferentes tiempos, para facilitar la lectura se decidió realizar un análisis total. En los tres grupos experimentales, (retinas lesionadas, contralaterales a la lesión y CORs), en todos los parámetros analizados las CMs difieren de las CMs en reposo (retinas intactas). En cada grupo experimental la activación de las CMs siguió una cinética específica, y como norma, los cambios morfológicos en las retinas contralaterales a la lesión fueron más tenues que en la retina axotomizada y en estas que en los CORs.

CONCLUSIONES

El ApNO desencadena una activación bilateral y persistente de las CMs-Iba1⁺ y una respuesta opuesta de las CMs M2 entre ambas retinas. La hipertrofia macroglial es transitoria y limitada a la CCG en ambas retinas.

La muerte de las CGR en CORs e *in vivo* es similar hasta 5 días, lo que significa que durante esta ventana terapéutica los CORs pueden ser útiles para estudiar nuevos fármacos protectores de las CGRs. Sin embargo, a partir de este momento el número de CMs en los CORs no es suficiente para fagocitar las CGRs muertas.

Así, los CORs no son un modelo muy preciso para probar terapias neuroprotectoras específicas para las CGRs, porque en los CORs hay otros factores que pueden alterar los resultados, principalmente la muerte concomitante de otras neuronas, y la diferente activación glial que ocurre cuando los fotorreceptores y las CGRs están afectados. Pero sin son un buen modelo para estudiar la interacción entre la muerte de CGRs y la muerte de fotorreceptores. En CORs, retinas axotomizadas y contralaterales, las CMs sufren cambios en el tamaño, forma, volumen, número y longitud de sus prolongaciones. Estas alteraciones morfológicas son más marcadas en CORs seguido de retinas axotomizadas y finalmente de los encontrados en las retinas contralaterales a la lesión.

SUMMARY

INTRODUCTION

The retina is part of the central nervous system (**CNS**) and is a widely used model to study the response to neuronal and glial cell injury, as well as to test the efficacy of potential neuroprotective therapies. Optic nerve crush (**ONC**), a well-characterised rodent model of retinal ganglion cells (**RGCs**) degeneration, produces a first phase of rapid death in which 85% of the total cell population is lost in the first 14 days, and a second phase of slower but steady death in which at 90 days approximately 2% of the initial number remains. As a consequence of RGCs death, microglial cells (**MCs**) become activated, change their morphology, migrate and phagocytose the dead RGCs. Macrogia, astrocytes and Müller cells also respond, with morphological changes. Astrocytes and Müller cells increase GFAP expression as a sign of reactivity, become hypertrophic and form a scar to seal the damaged tissue. However, the response to ONC is not limited to the injured retina. Recently, the so-called contralateral effect has been described. The retina contralateral to a unilateral lesion responds like the injured retina, but in a moderate and delayed manner. Thus, after unilateral ONC in the contralateral retina, activation of MCs, appearance of phagocytic microglia, activation of astrocytes and Müller cells and loss of RGCs are observed.

Organotypic retinal cultures (**ROCs**) have been used since the early 1930s as an *in vivo* surrogate to study RGCs loss and neuroprotection. In addition to better complying with the 3Rs than *in vivo* models, ROCs have other advantages such as a controlled environment for drug testing or the possibility of using human retinas from post-mortem donations.

OBJECTIVES

The general objectives of this study are:

- 1) To study the glial response in axotomized retinas and retinas contralateral to the lesion.
- 2) To study and compare the course of RGCs death and glial response in ROCs and axotomized retinas.
- 3) To analyse and quantitatively compare the morphology of MCs in intact, axotomized, contralateral to the lesion and in ROCs.

MATERIAL AND METHODS

Adult female and male C57Bl/6 pigmented mice from the breeding colony of the University of Murcia were used. All animals were treated in accordance with the European Union guidelines for the care and use of animals for scientific purposes and the Association for Research in Vision and Ophthalmology (**ARVO**) guidelines for the use of animals in ophthalmic treatments and vision research.

All animals were handled according to protocols approved by the Ethical Committee of the University of Murcia and with function C animal handling certification for the handling and planning of animal experiments.

Axonal damage model of RGCs was performed using ONC. Optic nerve (**ON**) exposure is required after eye socket opening. ONC was performed at 0.5 mm and analysis times after axotomy were 1 day to 45 days and 1 day to 7 days. For the *in vivo* study, animals were sacrificed with intraperitoneal injection of barbiturates and for the *in vitro* study in a carbon dioxide (**CO₂**) chamber.

Immunofluorescence experiments were performed on cut retinas, flat retinas and retinal explants with different markers for the study of different cell populations such as microglial cells (Iba1, CD206, CD68), astrocytes and Müller cells (Vimentin and GFAP), and RGCs (Brn3a, RBPMS, BIII Tubulin and γ synuclein). Quantification of RGCs was performed automatically and of microglia manually and their distribution was studied using neighbourhood maps. The morphology of MCs and the fluorescence intensity of GFAP and Vimentin were analysed using Image J and Image J Fiji.

Statistical analysis was performed with Graph Pad® Prism v6 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Data are presented as mean \pm standard deviation. For the comparison of more than two groups a pairwise multiple comparison analysis, ANOVA test with post-analysis: Tukey Dunn is performed after fulfilling the condition that the overall F of the ANOVA test is statistically significant. Differences were considered significant when $p < 0.05$. A non-parametric t-test was used to compare the groups, followed by a Kruskal-Wallis post-analysis. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

In the study of the course of glial activation in lesioned retinas contralateral to the lesion after unilateral axotomy, the two states of the MCs were characterised in plan photomontages and in cross-sections. In plan photomontages of intact retinas, Iba1⁺-MCs were found in the RGCs fibre layer (**NFL**), ganglion cell layer (**GCL**), and in the inner and outerplexiform layers with a branched morphology indicative of a resting state. In the GCL, the Iba1⁺-MCs were evenly distributed. Expression of CD206 and CD68, markers of activation of M2 and M1 MCs respectively, was observed in very few MCs and was localised around the ON and Ciliary Body (**CB**).

In injured retinas, the density of Iba1⁺-MSCs in the GCL increased significantly at 5, 9 and 21 days and returned to normal at 45 days. The density of CMs-CD68⁺ increased significantly at 3 days and remained higher than intact up to 45 days. In retinas contralateral to the lesion, the density of MCs- Iba1⁺ increased significantly at 5 days while the density of MCs-CD68⁺ was significantly higher from 1 to 45 days post-injury. The MCs-CD206⁺ had an elongated morphology and were mainly located in the CB and around the NO head. Thus, their number increased in lesioned retinas, and decreased in retinas contralateral to the lesion.

In retinal cross-sections, the density of MCs increased significantly from 5 to 21 days in the inner layers of the injured retinas, while remaining within the intact values in the retinas contralateral to the injury. Astrocytes and Müller cells were transiently hypertrophied in the lesioned retinas and to a lesser extent in the contralateral retinas.

Comparative analysis of the course of RGCs death and microglial activation between ROCs and axotomized retinas showed that the loss of RGCs-Brn3a⁺ was similar in both models during the first 5 days. *In vivo* the expression of Brn3a and RBPMS was parallel, however, after 5 days *in vitro* the RBPMS signal is maintained. The lower microglial cell population *in vitro* was also observed. When testing other RGCs markers, such as B III Tubulin or γ -synnuclein, it was observed that the number of RGCs immunodetected with these markers was the same as when using RBPMS, indicating that structural markers, but not viability markers, are still present in the ROCs.

In vitro, MCs have a different morphological activation than *in vivo*. Quantification of MCs in RGCs showed that their density is lower in RGCs than after ONC, explaining why structural markers are present, as there are not enough MCs in RGCs to phagocytose all the RGCs that have died. Macroglial activation in ROCs occurs earlier than *in vivo*, and encompasses the entire retina, whereas after ONC it is confined to the RGCs complex.

In the comparative analysis of microglial morphology between ROCs and axotomized retinas, qualitative changes in the morphology of MCs-Iba1⁺ were observed and therefore, it was decided to perform a quantitative analysis, where an analysis of the number of processes, soma size, total length, volume, area and perimeter, circularity and sholl analysis was performed. Microglia from 3 retinal areas were analysed: central, medial and peripheral and although significant differences were found in the 3 retinal areas at different times, for ease of reading it was decided to perform a total analysis. In the three experimental groups (lesioned retinas, contralateral to the lesion and ROCs), in all the parameters analysed the MCs differed from the resting MCs (intact retinas).

In each experimental group, the activation of the MCs followed specific kinetics, and as a rule, the morphological changes in the retinas contralateral to the lesion were fainter than in the axotomized retina and in the axotomized retina than in the ROCs.

CONCLUSIONS

ONC triggers a bilateral and persistent activation of MCs-Iba1⁺ and an opposing response of M2 MCs between both retinas. Macroglial hypertrophy is transient and limited to the GCL in both retinas.

RGCs death in ROCs and *in vivo* is similar for up to 5 days, which means that during this therapeutic window ROCs may be useful for studying new RGCs-protective drugs. However, after this time the number of MCs in ROCs is not sufficient to phagocytose dead RGCs.

Thus, ROCs are not a very accurate model for testing specific neuroprotective therapies for RGCs, because in ROCs there are other factors that can alter the results, mainly the concomitant death of other neurons, and the different glial activation that occurs when photoreceptors and RGCs are affected. But they are not a good model to study the interaction between RGCs death and photoreceptor death. In ROCs, axotomized and contralateral retinas, MCs undergo changes in the size, shape, volume, number and length of their prolongations. These morphological alterations are most marked in ROCs followed by axotomized retinas and finally by those found in the retinas contralateral to the lesion.

LISTAS DE ABREVIATURAS

ARVO	Asociación para la investigación en visión y oftalmología. Del inglés: "Association for Research in Vision and Ophthalmology"
ApNO	Aplastamiento del nervio óptico
Brn3a	Homeobox específico de proteína 3a con dominio POU. Del inglés: "Brain-specific homeobox/POU domain protein 3a"
BHR	Barrera hematorretiniana
CC	Cuerpo ciliar
CCG	Capa de células ganglionares de la retina
CI	Colículo inferior
CGRip	Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles. Del inglés: "intrinsically photosensitive"
CFNR	Capa de fibras nerviosas de la retina
CGRs	Células ganglionares de la retina
CMs	Células de la microglía
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CO₂	Dióxido de carbono
CORs	Cultivos organotípico de retina
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
CS	Colículo Superior
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DE	Desviación Estándar
DLGN	Núcleo geniculado dorsolateral (del inglés: "dorso lateral geniculate nucleus")
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
d	Día/días
EPR	Epitelio pigmentario de la retina

FG	Fluorogold
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial. Del inglés: “Glial fibrillary acidic protein”
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks sin glucosa. Del inglés: “Hanks’ balanced salt solution without glucosa”.
Iba1	Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1. Del inglés: “Ionized calcium binding adaptor molecule 1”
IL.	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
MNO	Muñón del nervio óptico
NDS	Suero normal de burro. Del inglés: “Normal donkey serum”
NGS	Suero normal de cabra. Del inglés: “Normal goat serum”
NO	Nervio óptico
OCT	Tomografía de coherencia óptica. Del inglés “Optical coherence tomography”.
OD	Ojo derecho
OI	Ojo izquierdo
OHSt	Metanosulfonato de hidroxistilbamidina. Del inglés: “Hydroxystilbamidine methanesulfonate”
PBS	Tampon fosfato salino. Del inglés “Phosphate buffered saline”
PFA	Paraformaldehído
RBPMS	Proteína de unión al ARN. Del inglés: “RNA binding protein”.
SBF	Suero bovino fetal
SEF	Segmentos externos de los fotorreceptores
SI	Segmentos internos de los fotorreceptores
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central

SNO	Sección del nervio óptico
SNT	Rastreador de neuritas simple. Del inglés: "Simple Neurite Tracer"
SV	Sistema visual

LISTA DE ILUSTRACIONES. FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1	Esquema de las principales partes de una neurona. La neurona presenta polaridad funcional donde las dendritas y el soma son elementos receptores de estímulos y el axón actúa como elemento conductor y transmisor de impulsos nerviosos a otras neuronas u otro tipo de células. ilustración tomada de: https://www.istockphoto.com/es/fotos/neurona .	Página 2
Figura 2	Esquema de las principales células de la glía. Las células gliales mantienen la homeostasis en el SNC. A) Oligodendrocitos: forman la vaina de mielina en el SNC. B) Células Ependimiales: células especializadas que recubren los ventrículos cerebrales y el canal central de la médula espinal. C) Células de Schwann: se sitúan entre las neuronas como los astrocitos, fagocitan los restos celulares como la microglía y forman la mielina en el SNP. D) Microglía: Las células de microglía son los macrófagos residentes del SNC. E) Astrocitos: Son las células gliales más abundantes y se denominan de esta manera por su forma estrellada. Esquema realizado en: www.biorender.es .	Página 3
Figura 3	Sistema visual en humanos. Se observan las principales vías del SV en el cerebro humano. Ilustración tomada de: https://www.lucescei.com/estudios-y-eficiencia/extractos-libro-blanco-deiluminacion/el-sistema-visual-humano .	Página 4
Figura 4	Esquema general del globo ocular. Sección sagital del ojo humano. Se muestran las posiciones relativas de las 3 capas nucleares de la retina. La luz tiene que pasar a través de la retina CCG antes de alcanzar los bastones y los conos. Ilustración tomada de: "Ojo, cerebro y visión", D. Hubel, 1999.	Página 5
Figura 5	Esquema de la retina realizado por Santiago Ramón y Cajal. En esta imagen se muestran todas las capas de la retina de mamífero. Se puede observar que, en la parte inferior, correspondiente a la zona más interna, se encuentran los axones de las CGRs que migran fuera de la retina, para formar el NO. Ilustración tomada de: "Ojo, cerebro y visión", D. Hubel, 1999.	Página 7
Figura 6	Dibujo esquemático de las células de la retina de los mamíferos. Vasos sanguíneos (BV), células amacrinas (A), astrocitos (AS), células bipolares (B), conos (C), células ganglionares (G), células horizontales (H), células de Müller (M), microglía (Mi), bastones (R), nervio óptico (ON). Capas de la retina (de la más interna a la más externa), capa de fibras nerviosas (NFL), capa de células ganglionares (GCL), capa plexiforme interna (IPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear externa (ONL), capa de los segmentos externos (OS), epitelio pigmentario (PE) y coroides (Ch). Acrónimos en inglés. Esquema tomado de: <i>Vecino y cols., 2016</i> .	Página 9

<p>Figura 7</p>	<p>Localización de los colículos superiores en el cerebro del ratón. Esquema de una sección sagital del cerebro de ratón donde se muestra el CS como una protuberancia situada en la parte dorsal del mesencéfalo, rostral al CI. Esquema modificado de: <i>"The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates"</i>, Paxinos y Franklin, 2001).</p>	<p>Página 10</p>
<p>Figura 8</p>	<p>Principales proyecciones neuronales de las CGR melanopsínicas de ratón. Los axones de las CGRs melanopsínicas (azul oscuro) proyectan principalmente al núcleo supraquiasmático, encargado de la regulación de los ritmos circadianos, y una minoría a la lámina intergeniculada lateral y núcleo de la oliva pretectal, encargado del reflejo pupilar. Además, existen circuitos sinápticos (naranja) que se originan en el núcleo supraquiasmático hacia el núcleo paraventricular, el núcleo intermediolateral y el ganglio cervical superior. A su vez, el núcleo de la oliva pretectal establece conexiones con el núcleo de Edinger-Westphal que a su vez conecta con el ganglio ciliar y éste inerva el músculo del iris (azul claro). Ilustración modificada de: <i>Berson y cols., 2003</i>.</p>	<p>Página 11</p>
<p>Figura 9</p>	<p>Las cuatro especies de corpúsculos intersticiales ("células gliales ") en el tejido nervioso humano: A) célula neuroglial (astrocito) de tipo protoplásmico, en la sustancia gris cerebral; B) célula neuroglial (astrocito), de tipo fibroso típica en la sustancia blanca cerebral; C) microglía; D) glía interfascicular (oligodendrocitos) de la sustancia blanca del encéfalo. Imágen tomada de: <i>Tremblay y cols., 2015</i>.</p>	<p>Página 14</p>
<p>Figura 10</p>	<p>Investigadores principales en el descubrimiento de las CMs.</p> <p>(A) Don Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) médico especializado en histología y anatomía patológica. Compartió el premio Nobel de medicina con Don Camilo Golgi en 1906. (B) Don Nicolás Achúcarro y Lund (1880-1918) médico neurocientífico especializado en enfermedades mentales. (C) Don Pío del Río Horteiga (1882-1945) médico especialista en histología y neuroanatomía. Imágenes tomadas de: www.google.es.</p>	<p>Página 15</p>
<p>Figura 11</p>	<p>Dibujos esquemáticos de los métodos histológicos que permitieron identificar las CMs.</p> <p>(A) el método de taninos y nitrato de plata amoniacal desarrollado por achúcarro permitió observar la capacidad fagocítica de la microglía (a las que denominó células granuloadiposas) en el cerebro de un conejo con rabia. (B) Ramón y Cajal introdujo su método de cloruro de oro sublimado, que permitió diferenciar los astrocitos de otras células débilmente marcadas, a las cuales denominó "el tercer elemento". Río-Horteiga completó el trabajo de ambos, por medio del método de carbonato de plata diferenció la microglía (C) de los oligodendrocitos (D), éstos últimos identificados con el método Golgi-Horteiga. Dibujo modificado de: <i>Tremblay y cols., 2015</i>.</p>	<p>Página 15</p>

Figura 12	Ilustraciones de microglía realizadas por Pío del Río-Hortega. (A) Principales formas de microglía observadas en un cerebro humano sano. (B) Morfología de la microglía de un paciente con meningitis aguda. (C) Microglía del cortex cerebral de un conejo en una zona cercana a una herida tras 48 h de evolución. Imagen tomada de: <i>Sierra y cols., 2016</i> .	Página 16
Figura 13	Ilustración de Del Río-Hortega (1919) de microglía ramificada. Se observa una ilustración de microglía ramificada realizada por: <i>Pío De Río-Hortega en 1919</i> .	Página 17
Figura 14	Representación esquemática de los diferentes fenotipos de la microglía. Representación realizada en: www.biorender.com .	Página 19
Figura 15	Figura 15: Esquema de los diferentes estados de la microglía. A) El dibujo son trazados de la microglía activada en reposo que comienza en la etapa de reposo 1A, continúa hasta la etapa 6A activada, se transforma en la etapa 6R y luego vuelve a la etapa de reposo 1R. Las flechas azules indican el aumento de activación y la flecha verde indica la transición de activado a retorno. Imagen tomada de: <i>Jonas RA y cols., 2012</i> . B) Esquema con los diferentes tipos de microglía. Imagen modificada de: <i>Holloway y cols., 2019</i> .	Página 20
Figura 16	Imagen de una sección transversal de retina intacta. Se observan CMs teñidas con Iba1 (verde), CD206 (rojo), CD68 (rosa) y DAPI (azul) en diferentes capas de la retina. <i>Imagen tomada durante el desarrollo de esta tesis doctoral.</i>	Página 21
Figura 17	Imagen de una retina a plano de ratón que muestra los astrocitos. Se muestran los astrocitos inmunomarcados con la proteína GFAP . Los astrocitos se sitúan en CFNR y forman una red densa que se asemeja a un panal de abejas. <i>Imagen tomada durante el desarrollo de esta tesis doctoral.</i>	Página 23
Figura 18	Fases de pérdida temporal de CGR-Brn3a⁺ tras corte o aplastamiento del NO en ratón albino. Gráfico que representa el número total + desviación estándar (SD) de CGR-Brn3a ⁺ que sobrevive a tiempos crecientes tras la sección (ONT) o aplastamiento (ONC) del NO, donde puede apreciarse el transcurso de la muerte en dos fases, una rápida y otra lenta, independientemente de la lesión producida. Datos tomados de: <i>Sánchez-Migallón et al., 2016</i> I: Intactas: retinas control a las que no se le realizó ninguna lesión.	Página 27

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 19	Ratón adulto de 2 meses de edad, de la cepa C57BL/6. Ilustración tomada de: https://www.criver.com/ .	Página 36
Figura 20	Esquema representativo del aplastamiento del NO. El aplastamiento se hizo a 0,5 mm desde la cabeza del NO durante 5 segundos. Ilustración realizada en: www.biorender.com .	Página 38
Figura 21	Esquema del trazado retrógrado de las CGR aplicando el trazador en el CS. El trazador con OHSt se aplicó en ambos CS para marcar todas las CGRs que proyectan a éstos.	Página 39
Figura 22	Fotomontaje de una sección transversal de retina de ratón teñida con DAPI. A: fotomontaje. a´: magnificación de la sección transversal del fotomontaje. a´´: magnificación de la cabeza del NO. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 45
Figura 23	Magnificaciones de las CMs en CORs a 3 días mediante microscopia confocal. En esta figura se pueden observar CM- lba1+ con el filtro verde (A) y (B). (A). Magnificación a 20X. (B). Magnificación a 63X. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 48
Figura 24	Reconstrucción fotográfica o fotomontaje de una retina de ratón intacta a partir de campos microscópicos individuales. A: Fotomontaje de retina montada a plano en la que se observan las CMs- lba1+ . El cuadro representa 1 campo microscópico (a). <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 49
Figura 25	Representación esquemática del método de conteo manual del número de CMs en cada una de las tres regiones (centro, media y periferia). En este dibujo se ilustra las muestras seleccionadas manualmente en cada fotomontaje la cuantificación manual. Se tienen 4 fotografías por área {central (C), media (M) y periférica (P)}. En cada cuadrante se analizaron 3 fotografías equidistantes, tomando como referencia el NO. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior.	Página 50
Figura 26	Representación de microfotografías de fotomontajes globales con el marcador lba1 y el marcador CD68. Se puede observar un campo microscópico individual adquirido con el filtro verde (A) para detectar las CMs- lba1+ , con el filtro rojo lejano (B), se detectan las CMs que expresan CD68+ y finalmente una combinación de ambos (C). Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. Barra en A, B y C= 20 µm. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 50
Figura 27	Representación de fotomontajes globales de retina (A), CC (B) y NO (C) con el marcador CD206. Se observan diferentes imágenes usando el marcador CD206 . Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 51

Figura 28	Representación de microfotografías a detalle del trazador OHSt en retinas montadas a plano. Se puede observar el trazador OHSt en A y el marcador lba1 en B . La superposición de ambos marcadores en C . Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. Barra en A, B, C = 50 µm. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 51
Figura 29	Representación del marcaje de Brn3a y RBPMS secciones transversales al ApNO. Se puede observar Brn3a en A y RBPMS en B . Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 52
Figura 30	Representación del marcaje de lba1 en secciones transversales al ApNO. Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 53
Figura 31	Visualización de la distribución de las células de microglía M2 en retinas de ratón usando mapas de vecinos. En esta imagen se muestran dos retinas de ratón representativas, correspondientes a una retina control derecha (A) y una retina experimental izquierda (B). La escala de colores de cada célula nos muestra el número de células vecinas que tiene en un radio determinado. Las células lilas poseen un rango de entre 0-2 células vecinas, y aumenta el número hasta las células granates que tienen entre 19-21 células vecinas o más en un radio de 0,20 mm. En la parte inferior izquierda se muestra el número total de CMs de cada retina. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 54
Figura 32	Representación esquemática del método de conteo manual del número de CMs-lba1⁺ y CMs-CD68⁺ en la retina intacta. A, A') Imagen de una sección trasversal de retina inmunoteñida con lba1 y CD68 . B, B') Retina total. C, C') Retina Interna. D, D') Retina Externa. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 56
Figura 33	Representación esquemática del método de conteo manual del número total de CMs-CD206⁺ en la retina intacta. A, A') Imagen de una sección trasversal de retina inmunoteñida con CD206⁺ y CD68 . B, B') Retina total. C, C') Retina Interna. D, D') Retina Externa. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 57
Figura 34	Reconstrucción del proceso de cuantificación del tamaño, circularidad y soma de las CMs. A) Programa Image J. B) Carga de la imagen para cuantificar. C) Selección del área a medir. D) Con el programa Image J se procede a analizar y medir el área. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i>	Página 58

Figura 35	<p>Reconstrucción del número de procesos y de la longitud total (basal y apical) de las CMs utilizando SNT. A y B) Carga de imágenes confocales en el software Fiji para la reconstrucción microglial; C) menú de Simple Neurite Tracer (SNT); D) ejemplo de reconstrucción de las CMs con todos los procesos trazados discriminados en la ventana "All paths" (panel central). E, F, G) Paso a paso de cómo se reconstruye una CMs. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i></p>	Página 60
Figura 36	<p>Reconstrucción de la morfología 3D de las células de microglia utilizando SNT. A y B) Carga de imágenes confocales en el software Fiji para la reconstrucción microglial; C) menú de Simple Neurite Tracer (SNT); D) ejemplo de reconstrucción 3D con todos los procesos trazados discriminados en la ventana "All paths" (panel central). <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i></p>	Página 61
Figura 37	<p>Reconstrucción del proceso de cuantificación del volumen, área y perímetro de las CMs. A) Programa Image J. B) Carga de la imagen para cuantificar. C) Selección del volumen a medir. D) Medición del volumen. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i></p>	Página 62
Figura 38	<p>Reconstrucción del proceso de cuantificación del sholl de las CMs. A) Programa Image J. B) Carga de la imagen para cuantificar. C) Selección "path 0" para comenzar a medir. D) Análisis del radio máximo y el número de intersecciones. <i>Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.</i></p>	Página 63

RESULTADOS

Figura 39	<p>Diseño experimental del estudio de activación glial en retinas intactas y tras ApNO unilateral.</p>	Página 67
Figura 40	<p>CMs en retinas intactas (A – F). Fotomontajes de una sección trasversal de retina (A, C, E) y montaje plano (B, D, F) donde se han inmunodetectado Iba1, CD68 y CD206 para identificar todas las CMs (Iba1+) y sus estados de activación (CD68+ y CD206+). Las ampliaciones en (a' – f') son de las áreas enmarcadas en (A – F). GCL: capa de células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; OPL: capa plexiforme externa.</p>	Página 68
Figura 41	<p>Activación microglial en secciones trasversales de retinas axotomizadas. Magnificaciones de secciones trasversales de retinas intactas y lesionadas analizadas a tiempos crecientes después de lesión e inmunoteñidas con Iba1, CD68 y CD206. CCG: capa de células ganglionares de la retina; CPI: capa plexiforme interna; CPE: capa plexiforme externa.</p>	Página 70

Figura 42	Densidad media (CMs/mm²) ± DE de CMs-<i>Iba</i>⁺ y <i>CD68</i>⁺. En la retina interna (A), externa (B) y total (C) en retinas axotomizadas. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con las retinas intactas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.	Página 71
Figura 43	Número total ± DE de CMs-<i>CD206</i>⁺ en secciones trasversales de retinas axotomizadas. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.	Página 72
Figura 44	CMs en la CCG de retinas axotomizadas. Ampliaciones de retinas montadas a plano intactas y lesionadas enfocadas en el CCG y que muestran inmunotinción de <i>Iba1</i> ⁺ , <i>CD68</i> ⁺ y <i>CD206</i> ⁺ .	Página 73
Figura 45	Densidad media (CMs/mm²) ± DE de CMs-<i>Iba</i>⁺ y <i>CD68</i>⁺ en la CCG. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.	Página 74
Figura 46	Mapas de vecinos de CMs-<i>CD206</i>⁺ tras ApNO en retinas axotomizadas a diferentes tiempos tras la lesión. Los colores fríos (gama de azules) corresponden a un menor número de vecinos y tienen un rango de tamaño de 0-2 células vecinas y los colores más cálidos (gama de rojos) a un mayor número de vecinos con un rango de tamaño de 19-21 células vecinas o más. Vemos como en estos mapas de vecinos, a 1 día hay un menor número de vecinos (colores azules y violetas) y como a 5 y 9 días (colores rojos, naranjas) este número aumenta considerablemente con respecto a intacto. A 45 días el número de vecinos es parecido a una retina intacta.	Página 75
Figura 47	Número total ± DE de CMs-<i>CD206</i>⁺ en la capa de CCG, en la cabeza del NO y en el CC en las retinas intactas y axotomizadas. Observamos como a 1 día hay un menor número de CMs- <i>CD206</i> ⁺ en el CC que va aumentando hasta 5 días y como a partir de ahí vemos como ese número de CMs- <i>CD206</i> ⁺ va disminuyendo. En cuanto al NO vemos como a 1 día hay un número menor de CMs- <i>CD206</i> ⁺ y como a partir de ahí va incrementando hasta 5 días y 9 días el número de CMs- <i>CD206</i> ⁺ hasta que vuelve a bajar a 45 días. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0,01$, ** $p < 0,01$.	Página 76
Figura 48	CMs-<i>CD206</i>⁺ en la cabeza NO y en el CC en retinas intactas y axotomizadas a diferentes tiempos tras la lesión. (A): Izquierda: fotomontaje de una retina intacta montada en plano que muestra inmunodetección de <i>CD206</i> . Medio, magnificación del CC y a la derecha, magnificación de la cabeza del NO. Estos aumentos son de las áreas enmarcadas que se muestran en el fotomontaje. (B): Magnificaciones de la cabeza del NO y del CC en retinas axotomizadas a diferentes tiempos tras lesión.	Página 77
Figura 49	CMs en secciones trasversales de retinas contralaterales al ApNO unilateral. Ampliaciones de retinas trasversales intactas y contralaterales ilesas analizadas tras ApNO e inmunoteñidas contra <i>Iba1</i> , <i>CD68</i> y <i>CD206</i> .	Página 78

Figura 50	<p>Densidad media (CMs/mm²) ± DE de CMs-Iba⁺ y CD68⁺ en la retina interna (A), externa (B) y total (C) en retinas contralaterales tras ApNO unilateral. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con las retinas intactas, * p < 0,05, ** p < 0,01.</p>	Página 79
Figura 51	<p>Número total ± DE de CMs-CD206⁺ en CCG, NO y en CC en las retinas intactas y contralaterales al ApNO unilateral. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * p < 0,05, ** p < 0,01, ***p<0,001.</p>	Página 80
Figura 52	<p>Densidad y activación de CMs en CCG de retinas contralaterales al ApNO unilateral. Ampliaciones de retinas montadas planas intactas contralaterales ilesas enfocadas en la CCG y que muestran inmunotinción de Iba1, CD68 y CD206.</p>	Página 81
Figura 53	<p>Densidad media (CMs/mm²) ± DE de CMs-Iba⁺ y CD68⁺ en la CCG de las retinas contralaterales tras ApNO unilateral. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * p < 0,05, ** p < 0,01.</p>	Página 82
Figura 54	<p>Mapas de vecinos de CMs-CD206⁺ en retinas contralaterales al ApNO unilateral. Los colores fríos (gammas de azules) corresponden a un menor número de vecinos y tienen un rango de tamaño de 0-2 células vecinas y los colores más cálidos (gama de rojos) a un mayor número de vecinos con un rango de tamaño de 19-21 células vecinas o más. Vemos como en estos mapas de vecinos, tanto a 1 día como a 5 y 9 días hay un número de vecinos similar al grupo intacto (colores azules y violetas) y como a 45 días el número de vecinos es ligeramente menor al grupo intacto.</p>	Página 83
Figura 55	<p>Número total ± DE de CMs-CD206⁺ en la CCG (A), en la cabeza del NO (B) y en el CC (C), en retinas intactas y contralaterales al ApNO unilateral Observamos como a 1 día hay un elevado número de CMs-CD206⁺ en el CC que va aumentando hasta 5 días y como a partir de ahí vemos ese número de CMs- CD206⁺ va disminuyendo. En cuanto al NO vemos a 1 día hay un número menor de CMs- CD206⁺ y a partir de 5 días y 9 días incrementa el número de CMs- CD206⁺. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * p < 0,05, ** p < 0,01.</p>	Página 84
Figura 56	<p>CMs-CD206⁺ en la cabeza del NO y en el CC en retinas intactas y contralaterales tras ApNO unilateral a diferentes días. A): Izquierda: fotomontaje de una retina intacta montada en plano que muestra inmunodetección de CD206. Medio, magnificación del CC y a la derecha, magnificación de la cabeza del NO. Estos aumentos son de las áreas enmarcadas que se muestran en el fotomontaje. (B): Magnificaciones de la cabeza del NO y del CC en retinas contralaterales a la lesión a diferentes tiempos.</p>	Página 86
Figura 57	<p>Activación de astrocitos y células de Müller en retinas axotomizadas. Aumentos de retinas en sección transversal intactas y lesionadas inmunoteñidas contra GFAP y vimentina, y contrateñidas con DAPI. CCG: capa de células ganglionares; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna.</p>	Página 86
Figura 58	<p>Activación de astrocitos y células de Müller en retinas contralaterales al ApNO unilateral. Aumentos de retinas en sección transversal intactas y lesionadas inmunoteñidas contra GFAP y vimentina, y contrateñidas con DAPI. CCG: capa de células ganglionares; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna.</p>	Página 87

Figura 59	Diseño experimental	Página 90
Figura 60	CGRs en retinas intactas. Ampliaciones representativas de retinas intactas que muestran las CGRs-Brn3a ⁺ (rojo) y RBPMS ⁺ (verde).	Página 91
Figura 61	Densidad media (cels/mm²) ± DE de CGRs-Brn3a⁺ (A) y CGRs-RBPMS⁺ (B) en retinas intactas.	Página 91
Figura 62	CGRs en retinas intactas y tras CORs y ApNO unilateral. Ampliaciones representativas de retinas intactas y de retinas analizadas de 1 a 9 días después de CORs y de ApNO que muestran las CGRs-Brn3a ⁺ (rojo) y RBPMS ⁺ (verde).	Página 94
Figura 63	Gráficos X, Y (tiempo frente a células) que muestran la densidad media ± DE (células/mm²) de CGRs-brn3a⁺ (a) y CGRs-RBPMS⁺ (b) en ambos grupos. El tiempo 0 son datos de retinas intactas. La regresión lineal se calculó en dos fases (x ₀ en el día 5). La pendiente 1 no difiere entre modelos o marcadores. La pendiente 2 es significativamente más pronunciada en los cors que después de ApNO para Brn3a, y después de ApNO que en los CORs para RBPMS (p<0,0001). * intacto frente a experimental (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, prueba de kruskal-wallis, prueba de comparaciones múltiples de dunn); # ApNO frente a CORs (#p<0,001, prueba de mann-whitney). n=4-6 retinas/grupo/punto temporal.	Página 95
Figura 64	CGRs a 7 días en CORs inmunodetectadas con diferentes marcadores. Ampliaciones representativas de retinas intactas y CORs a los 7 días que muestran la inmunodetección de γ -sinucleína, β III tubulina, Brn3a y RBPMS.	Página 96
Figura 65	Densidad media (cels/mm²) ± DE de CGRs inmunodetectadas con cada marcador en retinas intactas y 7 días después de CORs. * Diferencia significativa entre las retinas intactas y las de 7 días (***p<0,001, prueba de Mann-Whitney); # No hay diferencia significativa entre los marcadores a los 7 días (###p<0,001, prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, Dunn). n=4-6 retinas/grupo.	Página 97
Figura 66	Pérdida de CMs en CCG de los CORs y tras ApNO unilateral. Ampliaciones representativas de retinas intactas y retinas analizadas de 1 a 9 días después de CORs y ApNO que muestran CMs-Iba1 ⁺ .	Página 99
Figura 67	Gráficos X, Y (tiempo frente a células) que muestran la densidad media ± DE (células/mm²) de células Iba1⁺ en ambos grupos. El tiempo 0 son datos de retinas intactas. Tras una disminución significativa de las células Iba1 ⁺ entre el día 0 y el 1 en los CORs, los datos se ajustan a una regresión lineal a partir del día 1. La pendiente entre ambos modelos es significativamente más pronunciada después de ApNO que en los CORs (p=0,048). *Experimental frente a intacto (**p<0,01, ***p<0,001, prueba de Kruskal-Wallis, prueba de comparaciones múltiples de Dunn); # ApNO frente a CORs (#p<0,001, prueba de Mann-Whitney). n=4-6 retinas/grupo/punto temporal.	Página 100

Figura 68	<p>Los CORs tienen una menor densidad de CMs fagocíticas en la CCG que las retinas axotomizadas.</p> <p>Ampliaciones representativas de retinas trazadas 7 días después de ApNO y CORs que muestran las células trazadas (OHSt, rojo) y las CMs-Iba1⁺ (verde). Las células Iba1⁺OHSt⁺ son CMs fagocíticas. Los asteriscos en los paneles de Iba1 marcan la zona de la que se tomaron los aumentos de la derecha.</p>	Página 101
Figura 69	<p>Densidad media \pm DE (células/mm²) de las CMs fagocíticas en CORs y después de ApNO. * ApNO frente a CORs (**p<0,001, test de Mann-Whitney). n=4-6 retinas/grupo.</p>	Página 102
Figura 70	<p>Inducción temprana de macrogliosis en los CORs. Microfotografías confocales representativas enfocadas en la de los CORs inmunodetectadas contra GFAP (púrpura) y Vimentina (verde). Debajo de cada imagen se muestran las representaciones en 3D del espesor total de cada CORs. Las flechas señalan las células de Müller activadas. n=4-6 retinas/grupo/tiempo. Barra: 100μm.</p>	Página 103
Figura 71	<p>Diseño experimental</p>	Página 106
Figura 72	<p>Dibujos (amarillo) y representación 3D (gris) de las CMs tras ApNO y en CORs a tiempos crecientes tras la lesión o <i>in vitro</i>. Estos dibujos y esquemas se utilizaron para obtener los parámetros cuantitativos de la morfología que se describen en las siguientes imágenes.</p>	Página 107
Figura 73	<p>Dibujos (amarillo) y representación 3D (gris) de las CMs representativas tras ApNO y en CORs a tiempos crecientes. Estos dibujos y esquemas se utilizaron para obtener los parámetros cuantitativos de la morfología que se describen en las siguientes imágenes.</p>	Página 109
Figura 74	<p>Dibujo representativo de una CMs axotomizada a 21 días tras ApNO. En ella se puede ver el número de procesos que se cuentan.</p>	Página 110
Figura 75	<p>Número de procesos \pm DE de las CMs en diferentes zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica(rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 112
Figura 76	<p>Número total de procesos \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales al ApNO en comparación con las retinas intactas. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 113

Figura 77	Gráficos comparativos que muestran el número de procesos \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ A Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).	Página 114
Figura 78	Ilustración donde se muestra cómo se calculó el número de procesos de las ramas basales y apicales en las CMs en la retina. A y B: Ramas basales en color verde y ramas apicales en color gris. A y B) Microglía de una retina axotomizadas a 21 días.	Página 115
Figura 79	Número de procesos de ramas basales \pm de las CMs en diferentes zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ anova comparación. Multiple. Prueba de mann-whitney).	Página 118
Figura 80	Número de procesos de ramas apicales \pm de de las CMs en diferentes zonas de la retina. A: cors. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ anova comparación. Multiple. Prueba de mann-whitney).	Página 119
Figura 81	Número total de procesos de las ramas basales \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).	Página 120
Figura 82	Número total de procesos de las ramas apicales \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).	Página 121

Figura 83	<p>Gráficos comparativos que muestran el número de procesos de las ramas basales \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ A Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 122
Figura 84	<p>Gráficos comparativos que muestran el número de procesos de ramas apicales \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral). (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ A Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 123
Figura 85	<p>Ilustración donde se muestra cómo se calculó el tamaño del soma en las CMs en la retina. A) Microglía de una retina axotomizadas a 21 días. B) Microglía de un CORs a 3 días. Soma en color negro.</p>	Página 124
Figura 86	<p>Media del tamaño del soma de la microglía (μm^2) \pm DE. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacta. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 125
Figura 87	<p>Gráficos agrupados que muestran el % de las CMs dentro de cada grupo y día con un rango de tamaño (100% todas las CMs dentro de cada grupo). A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO).</p>	Página 126
Figura 88	<p>Dibujo representativo de una CMs axotomizada a 21 días tras ApNO. En ella se puede ver el número como que es y cómo se calcula la longitud total.</p>	Página 127
Figura 89	<p>Longitud total \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 129
Figura 90	<p>Longitud total \pm DE de las CMs en la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intactas), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 130

Figura 91	<p>Gráficos comparativos que muestran la longitud total \pm DE de las CMs en CORs y retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 131
Figura 92	<p>Ilustración donde se muestra cómo se calculó el número de procesos de las ramas basales y apicales en las CMs en la retina. A y B: Ramas basales en color verde y ramas apicales en color gris. A y B) Microglía de una retina axotomizadas a 21 días.</p>	Página 132
Figura 93	<p>Longitud total de las ramas basales \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 134
Figura 94	<p>Longitud total de las ramas apicales \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 135
Figura 95	<p>Longitud total de las ramas basales \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intactas), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 136
Figura 96	<p>Longitud total de las ramas apicales \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intactas), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 137
Figura 97	<p>Gráficos comparativos que muestran la longitud total del número de ramas basales \pm DE de las CMs en CORs y retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 138

Figura 98	<p>Gráficos comparativos que muestran la longitud total del número de ramas apicales ± DE de las CMs en CORs y retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: COR y retinas contralaterales (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 139
Figura 99	<p>Volumen ± DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 140
Figura 100	<p>Gráficos comparativos que muestran el volumen ± DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 141
Figura 101	<p>Área ± DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 143
Figura 102	<p>Perímetro ± DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 144
Figura 103	<p>Área total ± DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).</p>	Página 145

Figura 104	Gráficos comparativos del área \pm DE de las CMs en la retina. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).	Página 146
Figura 105	Perímetro total \pm DE de las CMs en la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).	Página 147
Figura 106	Gráficos comparativos del perímetro \pm DE de las CMs en la retina. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO), Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).	Página 148
Figura 107	Circularidad \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).	Página 150
Figura 108	Circularidad \pm DE de las CMs en CORs, Retina lesionada (ApNO) y Retina contralateral a la lesión (ApNO). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión).	Página 151
Figura 109	Gráficos comparativos de la circularidad \pm DE de las CMs en la retina. Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).	Página 152
Figura 110	Radio máximo en el que interseccionan las CMs tomando como centro su soma. A: CORs. B: Retina lesionadas. C: Retina Contralateral a la lesión. Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral).	Página 153
Figura 111	Número de intersecciones a cada radio a tiempos cortos tras ApNO y en CORs. Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión).	Página 154

Figura 112	Número de intersecciones a cada radio a tiempos largos en retinas lesionadas (A) y contralaterales a la lesión (B). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión).	Página 155
-------------------	---	-------------------

Figura 113	Esquema gráfico	Página 158
-------------------	-----------------	-------------------

TABLAS

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1	Anestesia y analgesia.	Página 37
----------------	------------------------	------------------

Tabla 2	Composición del medio de cultivo básico de los CORs.	Página 40
----------------	--	------------------

Tabla 3	Composición del medio de cultivo completo de los CORs.	Página 41
----------------	--	------------------

Tabla 4	Relación de los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo.	Página 46
----------------	---	------------------

Tabla 5	Relación de los anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.	Página 47
----------------	---	------------------

ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

Esta tesis está dividida en ocho partes: **introducción, objetivos e hipótesis, material y métodos, resultados (con sus respectivos diseños experimentales), discusión, conclusiones y bibliografía**. Por último, se incluyen en forma de **anexos** las publicaciones de parte de estos resultados.

La **introducción** consta de una serie de apartados. En el primero se repasan los conceptos básicos anatómicos y fisiológicos de SNC, en especial del sistema visual (**SV**) del roedor. Dentro de este apartado se describe en profundidad la retina y las poblaciones celulares de las que se compone, en concreto, de las CGRs. En el siguiente apartado se describe en profundidad las células de la glía. Centrándose tanto en las CMs como macrogliales. El último apartado se centra en la degeneración neuronal, poniendo hincapié en los modelos de estudio en ratón.

En el segundo capítulo se plantea la **hipótesis** de este trabajo. En ella se describe una estimación de los posibles hallazgos a descubrir.

En el tercer capítulo se plantean los **objetivos** de esta tesis, primero de forma general y posteriormente se desglosan más concretamente unos objetivos específicos derivados de cada apartado de los que consta esta tesis.

El cuarto capítulo corresponde a la descripción de **material y métodos** utilizados para la realización de la tesis. En este apartado se exponen las metodologías para la identificación de las CGRs y de las CMs y macrogliales. También la realización de la axotomía del NO, el CORs, uso del Image J e Imaje J Fiji, y los métodos de análisis de imagen empleados.

En el cuarto capítulo se exponen los **resultados**. Este capítulo está dividido en tres apartados correspondientes a cada uno de los objetivos generales. Para hacer más fácil la comprensión, al principio de cada apartado de los resultados, se muestra el diseño experimental llevado a cabo para la consecución de los objetivos.

Así, en el primer apartado se analiza el comportamiento de la curva de muerte de las CMs tras una lesión a una distancia de 0,5mm del NO, tanto en el ojo lesionado como en el ojo contralateral a la lesión a diferentes tiempos. Dentro de este apartado, también se estudia y analiza los dos fenotipos de la microglía en la retina de ratón y la población de células macrogliales.

En el segundo apartado, se estudia y se compara el curso de muerte de las CGRs *in vivo* e *in vitro*. También se muestran los resultados de la caracterización de los CORs como modelo de estudio de la población de las CGRs tras axotomía del NO. En este apartado, además se estudia la población de CMs y se comparan dichos datos con el modelo de ApNO.

Por último, se estudia la morfología, la longitud total, el número de procesos, el área ocupada de las CMs, el área y el perímetro, la circularidad del soma de las CMs y el radio máximo en CORs y en ApNO. Para una mayor comprensión de la tesis, al final de cada apartado de los resultados, se han incluido unas conclusiones específicas derivadas de cada apartado, que serán resumidas en el capítulo de conclusiones generales.

El quinto capítulo corresponde a la **discusión**, en la que se analizan de forma crítica los resultados obtenidos y se comparan con los resultados obtenidos por otros autores en estudios previos.

En el sexto capítulo se enumeran las principales **conclusiones** del trabajo y los hallazgos originales más relevantes.

En la séptima y última parte, la **bibliografía**, se incluyen las referencias de los trabajos científicos consultados para esta tesis.

Por último, se han incluido como **anexos**, las principales publicaciones que recogen una gran parte de los trabajos experimentales presentados en esta tesis doctoral.

HALLAZGOS ORIGINALES

La realización de esta tesis nos ha permitido documentar los siguientes hallazgos originales:

La realización de esta tesis nos ha permitido documentar los siguientes hallazgos originales:

1. En referencia al curso de activación glial en retinas lesionadas y contralaterales a la lesión tras una axotomía unilateral:

I) En este estudio se caracteriza los dos estados de las CMs en retinas intactas y tras ApNO unilateral en retinas montadas a plano y en secciones trasversales de retina.

II) Se evalúa el curso de activación glial en retinas intactas y tras ApNO unilateral en retinas montadas a plano y en secciones trasversales de retina.

III) Se describe numérica y topográficamente la población total de las CMs M2 en retinas lesionadas y contralaterales a la lesión tras ApNO.

IV) Se evalúa el curso de activación macroglial en retinas intactas y tras ApNO unilateral en retinas montada a plano y en secciones trasversales de retina.

2. En referencia al análisis comparativo de curso de muerte de CGRs y activación microglial entre cultivos organotípicos de retina y retinas axotomizadas:

I) Se compara el curso temporal de degeneración de las CGRs entre CORs y ApNO usando marcadores de viabilidad neuronal y estructurales

II) Se cuantifica la población de CMs a lo largo del tiempo en CORs y en retinas axotomizadas

III) Se estudia la actividad macroglial en CORs.

3. En referencia al análisis comparativo de la morfología de la microglía entre cultivos organotípicos de retina y retinas axotomizadas y contralaterales a la lesión

I) Se realiza una comparación morfológica cuantitativa del tamaño, forma, volumen, número y longitud de las prolongaciones de las CMs-Iba1⁺ en CORs, en retinas axotomizadas, contralaterales a la lesión e intactas.

II) Se muestra que estas alteraciones morfológicas son más marcadas en CORs seguido de retinas axotomizadas y finalmente de los encontrados en las retinas contralaterales.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Durante la realización de la tesis en el Laboratorio de Oftalmología experimental de la Universidad de Murcia/IMIB-Arixaca he participado en diversos proyectos de investigación, cuyos resultados se han divulgado en publicaciones científicas y comunicaciones a congresos internacionales. A continuación, se detallan dichos trabajos y se mencionan con asteriscos aquellos que constituyen la base experimental de esta tesis doctoral.

ARTÍCULOS

Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Salinas-Navarro M, **González-Riquelme MJ**, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Systemic and Intravitreal Antagonism of the TNFR1 Signaling Pathway Delays Axotomy-Induced Retinal Ganglion Cell Loss. *Front Neurosci.* 2019 Oct 15; 13: 1096. doi: 10.3389/fnins.2019.01096. eCollection 2019. PubMed PMID: 31680831; PubMed Central PMCID: PMC6803525.

*****González-Riquelme MJ**, Galindo-Romero C, Lucas-Ruiz F, Martínez-Carmona M, Rodríguez-Ramírez KT, Cabrera-Maqueda JM, Norte-Muñoz M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Axonal Injuries Cast Long Shadows: Long Term Glial Activation in Injured and Contralateral Retinas after Unilateral Axotomy. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 7;22(16):8517. doi: 10.3390/ijms22168517. PMID: 34445225; PMCID: PMC8395228.

Martínez-Carmona, M., Lucas-Ruiz, F., Gallego-Ortega, A., Galindo-Romero, C., Norte-Muñoz, M., **González-Riquelme, M. J.**, Valiente-Soriano, F. J., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2021). Ly6c as a New Marker of Mouse Blood Vessels: Qualitative and Quantitative Analyses on Intact and Ischemic Retinas. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 19. <https://doi.org/10.3390/ijms23010019>. PMCID: PMC8744623.

Norte-Muñoz M, Gallego-Ortega A, Lucas-Ruiz F, **González-Riquelme MJ**, Changa-Espinoza Y.I, Galindo-Romero C, Ponsaerts P, Vidal-Sanz M, García-Bernal D*, Agudo-Barriuso M*. (2022). Immune recognition of syngeneic, allogeneic and xenogeneic stromal cell grafts in healthy retinas. *Stem Cell Research and Therapy*.

Galindo-Romero C, Norte-Muñoz M, Gallego-Ortega A, Lucas-Ruiz F, Rodríguez-Ramírez KT, **González-Riquelme MJ**, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. (2022). "The retina of the lab rat". *Frontiers in Neuroanatomy*.

*****González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Boia R, Ambrósio A.F, Vidal-Sanz M, Santiago A.R, Agudo-Barriuso M. (2022). Comparative analysis of retinal organotypic cultures and in vivo axotomized retinas. *Altex (Alternatives to animal experimentation)*. (En revisión).

COMUNICACIONES A CONGRESOS

*****González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2018). Course of retinal ganglion cell death in organotypic mouse retinal explants. Comunicación oral/Ponencia. **VI Congreso Internacional de Investigación en Retina y Visión 2018**. Madrid, Spain.

Galindo-Romero C, Lucas-Ruiz F, Albaladejo-García V, Ros-Alcobas L, Norte-Muñoz M, **González-Riquelme MJ**, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2018). Degeneration of retinal ganglion cells in the contralateral retina following unilateral optic nerve axotomy. Comunicación tipo póster. **11th FENS Forum of Neuroscience**. Berlin, Germany.

Galindo-Romero C, Lucas-Ruiz F, Albaladejo-García V, Ros-Alcobas L, Norte-Muñoz M, **González-Riquelme MJ**, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2018). Degeneration of retinal ganglion cells following unilateral optic nerve axotomy performed at different distances from the optic disk. Comunicación en póster. Comunicación tipo póster para “**European Association for Vision and Eye Research (EVER) Congress 2018**”. Nice, France.

Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Albaladejo-García V, Ros-Alcobas L, Norte-Muñoz M, **González-Riquelme MJ**, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2018). Efecto de la distancia a la que se inflige una lesión axonal en el curso de muerte las células ganglionares de la retina de ratón. Póster multimedia. **III Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca**. Murcia, Spain.

*****González-Riquelme MJ**, Galindo-Romero C, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2019). Course of microglial activation after optic nerve crush in the injured and contralateral un-injured retinas. Comunicación tipo póster. **V Jornadas Doctorales 2019**. Murcia, Spain.

Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Salinas-Navarro M, **González-Riquelme MJ**, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2019). TNFR1 antagonism delays axotomy-induced retinal ganglion cell death. Comunicación oral/Ponencia. **XX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular VI Congreso Iberoamericano de Histología VIII International Congress of Histology and Tissue Engineering**. Murcia, Spain.

*****González-Riquelme MJ**, Galindo-Romero C, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2019). Course of microglial activation after optic nerve crush in the injured and contralateral un-injured retinas. Comunicación oral/Ponencia. **XX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular VI Congreso Iberoamericano de Histología VIII International Congress of Histology and Tissue Engineering**. Murcia, Spain.

*****González-Riquelme MJ**, Galindo-Romero C, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2021). Activación microglial en la retina del roedor tras una lesión axonal. Comunicación tipo póster. **26º Congreso de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid, España**.

*****González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Boia R, Santiago A.R., Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Agudo-Barriuso M (2021). Morphological Changes of Microglial Cells: Comparison Between Retinal Organotypic Cultures and *In Vivo* Axotomized Retinas. Comunicación oral/Ponencia. **VII Congreso Internacional de Investigación en Retina y Visión 2021**. Murcia, Spain.

*****González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Boia R, Santiago A.R., Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Agudo-Barriuso M (2021). Morphological Changes of Microglial Cells: Comparison Between Retinal Organotypic Cultures and *In Vivo* Axotomized Retinas. Comunicación oral/Ponencia. **VI Jornadas Doctorales 2021**. Murcia, Spain.

*****González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Boia R, Santiago A.R., Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Agudo-Barriuso M (2021). Course of retinal ganglion cell loss and microglial activation in two models of neuronal degeneration. Comunicación tipo póster. Comunicación tipo póster para **“European Association for Vision and Eye Research (EVER) Congress 2021”**. Nice, France.

*** **González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Boia R, Santiago A.R., Ambrósio A.F., Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Agudo-Barriuso M (2021). Comparison of the microglial cell population between retinal organotypic cultures and axotomized retinas *in vivo*. Comunicación tipo póster. **V Symposium of the Portuguese Glial Network 2021**. Coímbra, Portugal.

*** **González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Boia R, Santiago A.R., Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Agudo-Barriuso M (2021). Comparison of retinal ganglion cell loss and microglial activation *in vitro* and *in vivo*. Comunicación tipo póster. **XVII Meeting of the Portuguese Society for Neuroscience – SPN2021**. Coímbra, Portugal.

*** **González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Agudo-Barriuso M (2022). Análisis temporal de los cambios morfológicos de la microglía en retinas axotomizadas. Comunicación Oral. **I Jornadas de Jóvenes Investigadores SIREV 2022**. Valladolid, España.

*****González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Boia R, Santiago A.R., Abroósio A.F, Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Agudo-Barriuso M (2022). **Análisis temporal de los cambios morfológicos de la microglía en retinas contralaterales tras aplastamiento unilateral del nervio óptico**. Comunicación oral/Ponencia. **VII Jornadas Doctorales 2022**. Murcia, España.

*****González-Riquelme MJ**, Lucas-Ruiz F, Boia R, Santiago A.R., Abroósio A.F, Vidal-Sanz M, Galindo-Romero C, Agudo-Barriuso M (2022). **Análisis temporal de los cambios morfológicos de la microglía en retinas contralaterales tras aplastamiento unilateral del nervio óptico**. Comunicación tipo póster. Comunicación tipo póster para “European Association for Vision and Eye Research (EVER) Congress 2022”, en Valencia, España.

I.INTRODUCCIÓN

I.INTRODUCCIÓN

I.1. EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

I.6. CÉLULAS DE LA GLÍA

I.7. CÉLULAS DE MACROGLIA

I.8. DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

I.9. EFECTO CONTRALATERAL DESPUÉS DE AXOTOMIA DEL NERVIO ÓPTICO

I.10.CULTIVO ORGANOTÍPICO DE RETINA

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El SNC es el encargado de procesar la información exterior, así como generar, enviar y conducir los impulsos nerviosos necesarios a músculos y nervios de nuestro cuerpo. Está compuesto por el cerebro, la retina, la médula espinal y los nervios centrales. En el SNC existen dos tipos especializados de células que lo constituyen: las células nerviosas (neuronas) y las células de la glía.

Las neuronas son células bien diferenciadas cuya morfología está muy bien definida con pequeñas diferencias entre los tipos de neuronas (**Figura 1**). El cuerpo o soma celular acoge el núcleo, mitocondrias y otras organelas. Las dendritas son ramificaciones que emanan del soma celular y, que, junto a este, reciben neurotransmisores de otras neuronas en un proceso llamado sinapsis. El axón es una fibra nerviosa polarizada de mayor longitud que transmite la información o impulsos nerviosos en forma de potencial de acción hacia otra célula, ya sea otra neurona diana o con otro tipo celular como célula muscular o glandular. El axón puede encontrarse revestido y protegido por vainas de mielina, que aumentan la velocidad de transmisión del impulso eléctrico (*Hubel, 1999*).

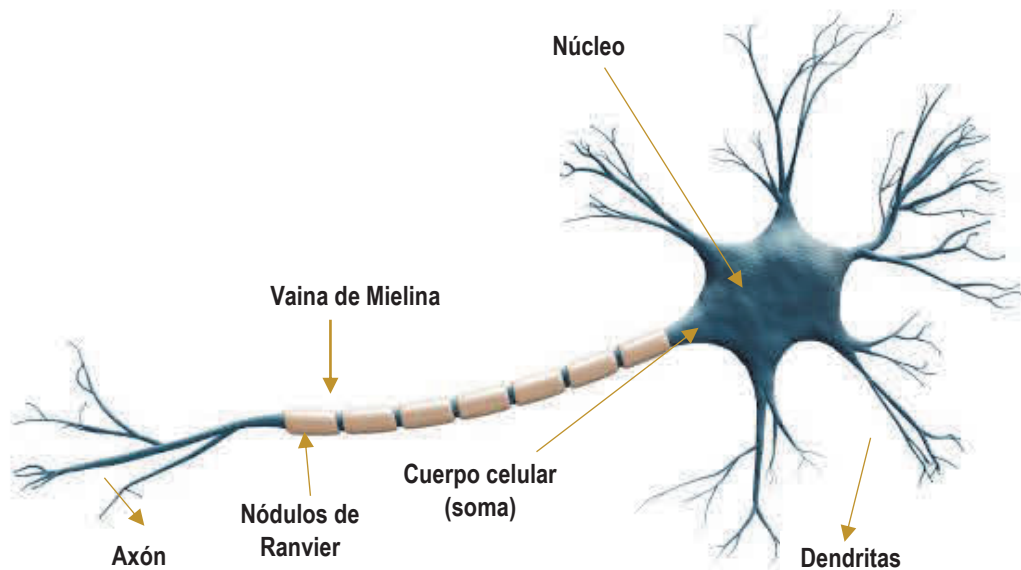


Figura 1. Esquema de las principales partes de una neurona.

La neurona presenta polaridad funcional donde las dendritas y el soma son elementos receptores de estímulos y el axón actúa como elemento conductor y transmisor de impulsos nerviosos a otras neuronas u otro tipo de células. Ilustración tomada de: <https://www.istockphoto.com/es/fotos/neurona>.

Las células gliales son más numerosas que las neuronas y desempeñan funciones auxiliares complementando a éstas. Entre las funciones más destacadas cabe mencionar que son las responsables del sostén y la nutrición de las neuronas, forman la vaina de mielina, mantienen la homeostasis o desempeñan un papel inmunitario. Las principales células gliales son los oligodendrocitos, astrocitos, microglía y células ependimarias (Figura 2). En la retina, modelo utilizado en esta tesis, no hay células ependimarias, pero hay un tipo de célula de la glía radial característico: la célula de Müller.

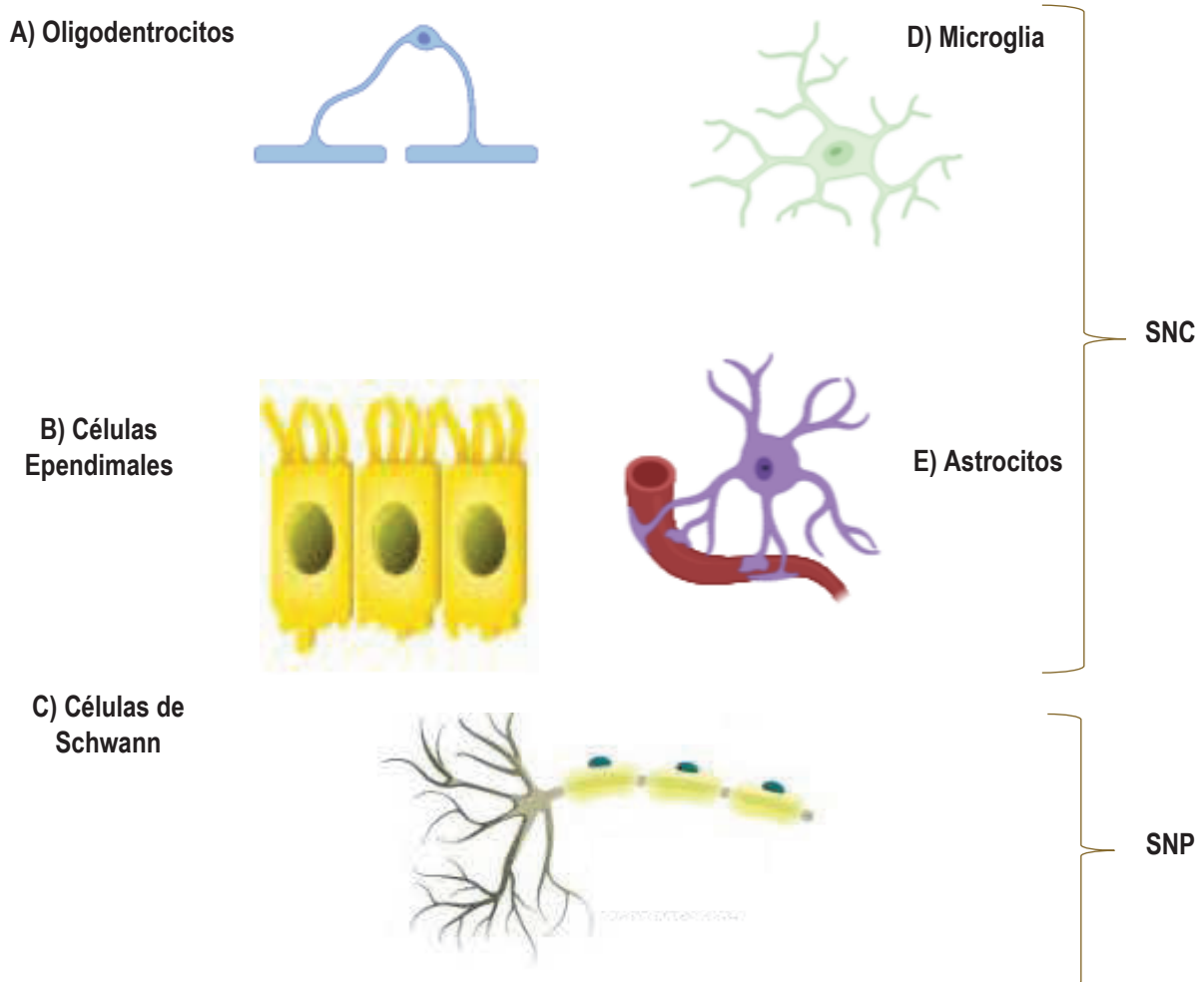


Figura 2. Esquema de las principales células de la glía.

Las células gliales mantienen la homeostasis en el SNC. **A) Oligodendrocitos:** forman la vaina de mielina en el SNC. **B) Células Ependimales:** células especializadas que recubren los ventrículos cerebrales y el canal central de la médula espinal. **C) Células de Schwann:** se sitúan entre las neuronas como los astrocitos, fagocitan los restos celulares como la microglía y forman la mielina en el SNP. **D) Microglía:** Las células de microglía son los macrófagos residentes del SNC. **E) Astrocitos:** Son las células gliales más abundantes y se denominan de esta manera por su forma estrellada. Esquema realizado en: www.biorender.es.

I.2. SISTEMA VISUAL

El sistema visual (SV) se encarga de recibir, procesar e interpretar la información luminosa, para alcanzar una percepción muy precisa del mundo físico que nos rodea. Se trata de un sistema binocular, por lo que la información que recibe cada ojo es diferente y a sí, se forma una imagen en la corteza visual que permite evaluar la distancia entre objetos, así como los movimientos, los colores y las formas de dichos objetos. El SV está formado por el ojo, la retina, el nervio óptico (NO), el quiasma óptico, el tracto óptico y las diferentes áreas de proyección visual. Los ojos funcionan como unas sencillas cámaras fotográficas: la córnea y la lente del cristalino forman en la retina una imagen invertida de los objetos que enfocan; el iris hace de diafragma pues regula la cantidad de luz que pasa a través de la pupila y la retina se correspondería con la película fotográfica sensible a la luz. La principal función de la retina consiste en captar la energía de la luz para transformarla en energía eléctrica. La información visual recogida en la retina se manda al cerebro a través de los axones de las células ganglionares de la retina (CGRs), que en conjunto forman el NO.

Las proyecciones de los NO de ambos ojos se juntan en el quiasma óptico, y en humanos la información procedente de éstos se divide antes de llegar al núcleo geniculado dorsolateral (**DLGN**) de manera que la mitad de los axones decusan al otro hemisferio. Una vez en el DLGN, mediante las radiaciones ópticas, la información es enviada a la corteza visual para su procesamiento (*Dowling, 1987*) (**Figura 3**).

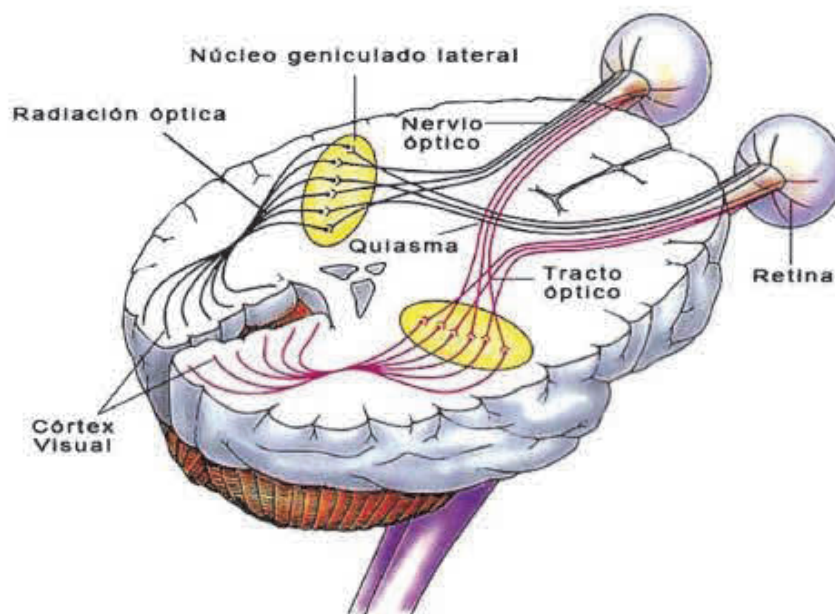


Figura 3. Sistema visual en humanos.

Ilustración tomada de: <https://www.lucescei.com/estudios-y-eficiencia/extractos-libro-blanco-deiluminacion/el-sistema-visual-humano>.

I.2.1. ANATOMÍA DEL OJO

El globo ocular es un órgano situado en la órbita, de estructura esférica y que tiene movimiento gracias a la acción de músculos extraoculares, cuatro rectos y dos oblicuos. En su zona posterior se encuentra el NO envuelto en una vaina de mielina. El globo ocular está formado por tres capas concéntricas: la túnica externa, la capa intermedia o úvea y la capa más interna, la retina (**Figura 4**).

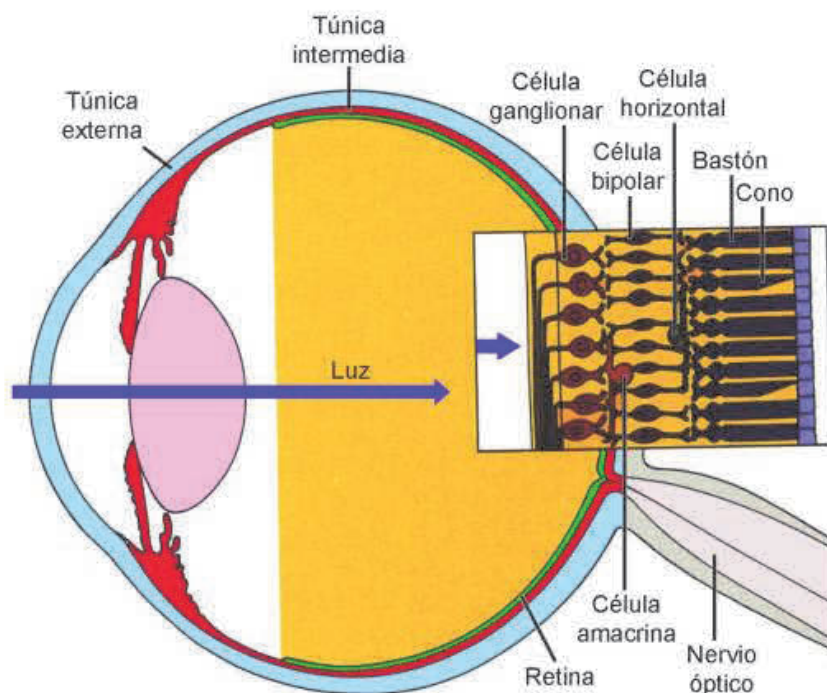


Figura 4. Esquema general del globo ocular.

Sección sagital del ojo humano. Se muestran las posiciones relativas de las 3 capas nucleares de la retina. La luz tiene que pasar a través de la retina antes de alcanzar los bastones y los conos. Ilustración tomada de: "Ojo, cerebro y visión", D. Hubel, 1999.

La túnica externa es la capa más superficial, está formada en la zona anterior por la córnea, un tejido formado por colágeno cuya función principal es la de permitir el paso de la luz a través de su tejido avascular y transparente y del enfoque de ésta en la retina gracias a su poder dióptrico. Periféricamente a la córnea, la túnica externa continúa con la esclerótica, una capa blanca constituida por tejido conjuntivo (*Del Monte y Kim 2011; Lammert 2014*), cuya función principal es la de protección de las estructuras más internas del globo ocular.

La túnica intermedia contiene una capa muy vascularizada llamada úvea. Situada en el polo anterior de esta capa se encuentra el cuerpo ciliar (CC), cuya superficie presenta numerosos pliegues llamados procesos ciliares dedicados a la formación del humor acuoso. En el interior del CC se encuentra el músculo ciliar cuya contracción permite el abombamiento del cristalino y el enfoque de estímulos visuales a corta distancia. Estos movimientos permiten el enfoque de la imagen en la retina. Este fenómeno se conoce como acomodación.

Para finalizar, el iris se sitúa anterior al CC. El iris es una estructura formada por dos grupos de músculos: músculo circular o esfínter del iris y los músculos radiales. La contracción y relajación de estos músculos permiten aumentar o disminuir el tamaño pupilar y, por tanto, la cantidad de luz que entra en el globo ocular. Seguidamente, la úvea forma la coroides, cuya estructura, muy vascularizada, permite la nutrición de la retina externa.

La capa más interna es la retina y, como mencionamos anteriormente, es un tejido neuronal parte del SNC. Está formada por diversas capas que permiten la captación de información luminosa, la transformación a un impulso eléctrico y la transmisión de este al cerebro a través del NO, donde se procesará para generar imágenes o para funciones no formadoras de imágenes reguladas por la luz.

I.3. LA RETINA DE MAMÍFEROS

El fácil acceso a la retina, unido a la posibilidad de estudiar el procesamiento de la información en una porción del SNC convierte a esta estructura en un modelo de gran utilidad para estudios fisiológicos y morfológicos del SNC en general (*Dowling & Ripps, 1976; Dowling, 1987*). La retina fue descrita por Don Santiago Ramón y Cajal como “...una extensión periférica del Sistema Nervioso Central, cuya delicadeza, transparencia y otras características estructurales la hacen especialmente apta para el análisis histológico...” (*Ramón y Cajal, 1892*). La retina se encuentra alojada dentro del globo ocular. Los fotorreceptores constituyen las primeras células de la vía visual cuya función es detectar y transformar el estímulo luminoso en una señal eléctrica que es procesada por las neuronas intermedias de la retina (bipolares, amacrinas, horizontales e interplexiformes) hasta llegar a las CGRs. Éstas, a través de sus axones que forman el NO, envían la información luminosa a diversas regiones retino-recipientes del cerebro que procesan la información procedente de diversos tipos de CGRs para dar lugar a la formación de la imagen (visión) y a las respuestas no visuales que desencadena la luz, como la sincronización de los ritmos circadianos o el reflejo pupilar (**Figura 5**).

El SV de roedor constituye un buen modelo de experimentación en estudios de neurodegeneración y neuroprotección. Una de las ventajas de utilizar roedores es el fácil manejo para generar una gran cantidad de prole a corto plazo, así como la posibilidad de generar ratones transgénicos. El principal motivo de utilizar en esta tesis el ratón C57BL/6 como modelo experimental es que la población de CGRs ha sido bien caracterizada funcional y morfológicamente (*Salinas-Navarro y cols., 2009a; Alarcon-Martínez y cols., 2009, 2010; Sánchez-Migallón y cols., 2011; Galindo-Romero y cols., 2013b*). En los ratones, la retina está organizada en capas de manera idéntica a la de los otros mamíferos; sin embargo, no posee fovea como los humanos y los primates, aunque sí posee una estría visual, una región de alta densidad de CGRs y conos L/M (*Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Ortín-Martínez y cols., 2010*).

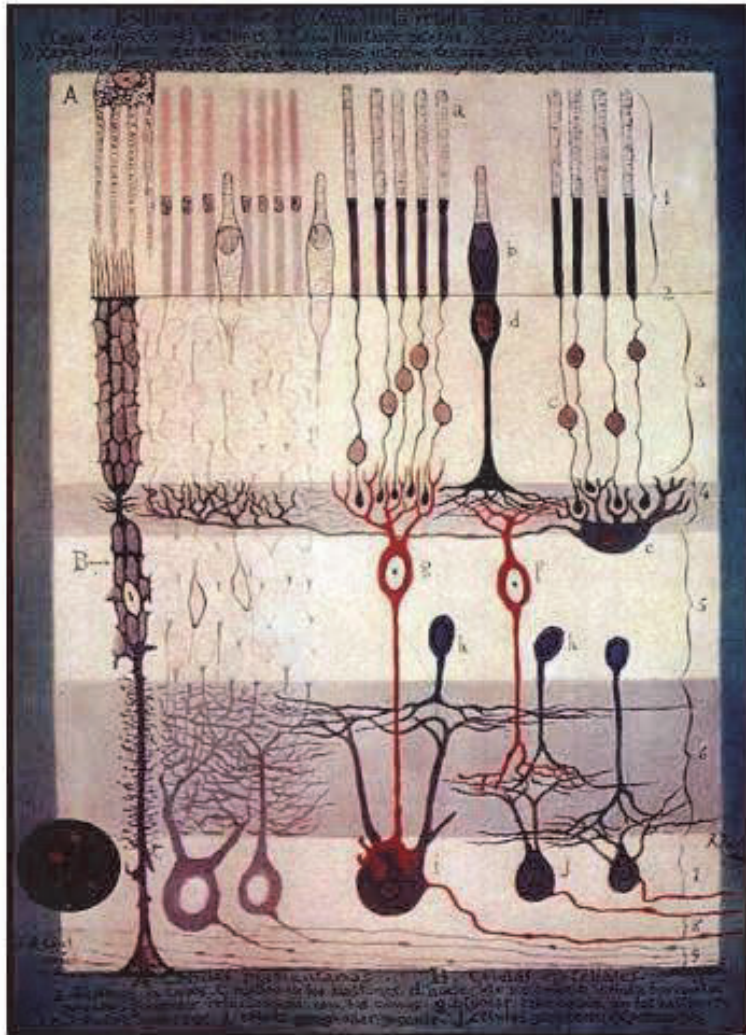


Figura 5. Esquema de la retina realizado por Santiago Ramón y Cajal.

En esta imagen se muestran todas las capas de la retina de mamífero. Se puede observar que, en la parte inferior, correspondiente a la zona más interna, se encuentran los axones de las CGRs que migran fuera de la retina, para formar el NO. Ilustración tomada de: *"Ojo, cerebro y visión"*, D. Hubel, 1999.

La retina de todos los animales vertebrados adultos está formada por capas perfectamente organizadas. Aunque cada especie de vertebrado tiene algún tipo de especialización topográfica en la retina que la hace única, la laminación básica es constante en todos ellos (**Figuras 5 y 6**). Del interior al exterior se organizan de la siguiente manera:

- I) **Membrana limitante interna (MLI)**, es una lámina basal de glicoproteínas adheridas a las células de Müller. Separa la retina del humor vítreo.
- II) **Capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR)**, está formada por los axones de CGRs que se dirigen fuera de la retina para formar el NO.
- III) **Capa de las células ganglionares (CCG)**, en esta capa se encuentran los somas de las CGRs y de las células amacrinas desplazadas (*Jeon y cols., 1998; Nadal-Nicolas y cols., 2015a*).
- IV) **Capa plexiforme interna (CPI)**, se produce la sinapsis entre células amacrinas, bipolares, interplexiformes y las CGRs.
- V) **Capa nuclear interna (CNI)**, está formada por los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas, interplexiformes, células de Müller y las CGRs desplazadas.
- VI) **Capa plexiforme externa (CPE)**, es donde se producen las conexiones sinápticas de los fotorreceptores y las células bipolares, horizontales e interplexiformes.
- VII) **Capa nuclear externa (CNE)**, se encuentran los somas de los fotorreceptores, conos y bastones. Los fotorreceptores más abundantes en roedores son los bastones, y a diferencia con humanos, solamente tienen dos tipos de conos, los que detectan la luz azul o conos S y los que detectan la luz roja/verde o conos L/M (*Szel y cols., 1993; revisado en Bowmaker y cols., 2006; Ortín-Martínez y cols., 2010, 2014*).
- VIII) **Capa de segmentos externos (SEF) e internos (SIF) de los fotorreceptores**, encargada de sentir la información luminosa.
- IX) **Membrana limitante externa (MLE)**, formada por complejos de unión, entre la región más externa de las células de Müller y entre éstas y los fotorreceptores.
- X) **Epitelio pigmentario de la retina (EPR)**, formado por una monocapa de células epiteliales que externamente limita con la capa más interna de la coroides, altamente vascularizada. Contiene gránulos de pigmento, melanina, que es la responsable de la absorción y reflexión de la luz. También tiene un importante papel como soporte de los fotorreceptores.

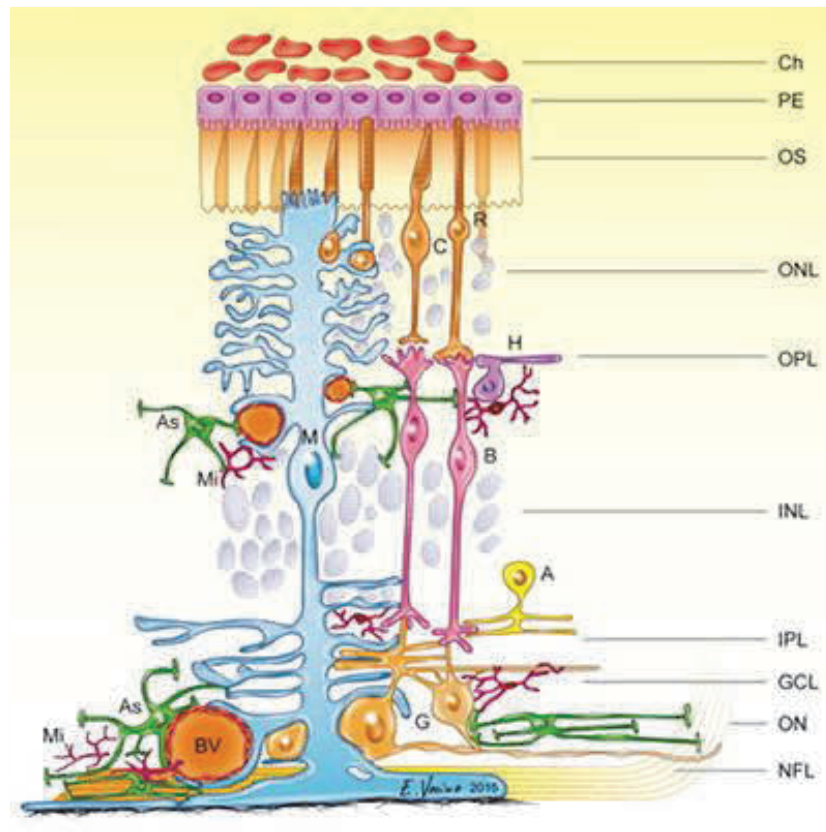


Figura 6: Dibujo esquemático de las células de la retina de los mamíferos.

Vasos sanguíneos (BV), células amacrinas (A), astrocitos (AS), células bipolares (B), conos (C), células ganglionares (G), células horizontales (H), células de Müller (M), microglía (Mi), bastones (R), nervio óptico (ON). Capas de la retina (de la más interna a la más externa), capa de fibras nerviosas (NFL), capa de células ganglionares (GCL), capa plexiforme interna (IPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear externa (ONL), capa de los segmentos externos (OS), epitelio pigmentario (PE) y coroides (Ch). Acrónimos en inglés. Esquema tomado de: *Vecino y cols., 2016*.

En la retina hay 2 tipos de células gliales: macroglía (células de Müller y astrocitos) y microglía (CMs).

I.4. CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA (CGRs)

Como hemos dicho, las CGRs son las únicas neuronas aferentes de la retina. La mayoría de las CGRs se encuentran en la CCG, aunque una minoría, conocida como células ganglionares desplazadas, se localizan en la CNI (*Perry, 1979; Nadal-Nicolás y cols., 2012*). Se han descrito más de 40 subtipos de CGRs dependiendo de sus características morfológicas. Las CGRs se dividen en varios subtipos en función de los perfiles morfológicos [~35, (*Bae y cols., 2018*)], fisiológicos [~30; (*Baden y cols., 2016*)] o de expresión génica [~46, (*Tran y cols., 2019; Rheaume y cols., 2018*)].

Pueden agruparse de forma bastante más exhaustiva en sus dos tipos funcionales: CGRs formadoras de visión y no formadoras de visión. Existe un subtipo de CGRs que no está implicado en la función visual.

Estas se conocen como CGRs intrínsecamente fotosensibles (**CGRip**), y expresan el fotopigmento melanopsina que les permite recibir estímulos luminosos. Las **CGRip** permiten regular el sueño, la temperatura corporal, los niveles hormonales y otras variables fisiológicas (Provencio y cols., 2000; Schmidt y cols., 2011). En rata y ratón las CGRip son aproximadamente un 2,4% y un 7,5% de las CGRs totales, respectivamente (Galindo-Romero y cols., 2013b; Valiente-Soriano y cols., 2014; Chen y cols., 2021).

I.4.1. PROYECCIONES DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN ROEDORES

La información visual procesada en la retina de mamíferos es conducida por los axones de las CGRs a los núcleos retinorreceptores del cerebro. A la salida del globo ocular, los axones convergen para formar el NO, por donde llegan al quiasma óptico. En roedores, más del 95% de los axones de las CGRs se decusan a nivel del quiasma (Lund, 1965; Perry, 1979; Drager y Olsen, 1981; Linden y Perry, 1983, Nadal-Nicolás y cols., 2012), a diferencia de los humanos, en los que sólo decusan el 50% de los axones. Las CGRs del roedor proyectan a las siguientes regiones del cerebro: núcleo supraquiasmático, núcleo óptico accesorio, núcleo pretectal, núcleo geniculado ventrolateral, el DLGN y el colículo superior (**CS**) (Rodiek, 1979). La proyección de los axones en las distintas regiones del cerebro se realiza de una manera topográfica muy precisa (Linden y Perry, 1983; Sauv e y cols., 2001; 2002).

En roedores, las principales regiones retinorreceptores son los CS, donde proyectan la mayor parte de CGRs (Lund, 1965, 1969; Linden y Perry, 1983; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b), y est n situados en la parte dorsal del mesencéfalo, rostrales al colículo inferior (**CI**) (Figura 7). Están compuestos por varias capas, que del estrato más superficial al más profundo son: stratum zonale, stratum griseum superficiale, stratum opticum, stratum griseum Intermediale, stratum album intermediale, stratum griseum profundum, y stratum album profundum. Las tres primeras capas, denominadas capas superficiales o visuales, reciben aferencias retinianas y se encargan de procesar estímulos visuales (Hofbauer y Dr ger, 1985; Sefton y Dreher, 1985; Sefton y cols., 2004), mientras que las cuatro restantes procesan información auditiva y somatosensorial (Stein, 1984).

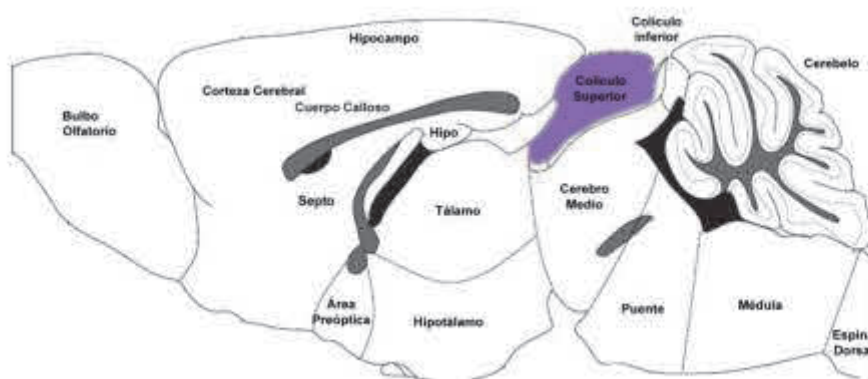


Figura 7: Localización de los colículos superiores en el cerebro del ratón.

Esquema de una sección sagital del cerebro de ratón donde se muestra el CS como una protuberancia situada en la parte dorsal del mesencéfalo, rostral al CI. Esquema modificado de: "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates", Paxinos y Franklin, 2001.

Las CGRip proyectan sus axones a diferentes núcleos cerebrales de los que proyectan el resto de las CGRs. El principal centro de proyección es el núcleo supraquiasmático, a través del tracto retinohipotalámico (vía por la que también discurre el sistema formador de imágenes). El núcleo supraquiasmático es el encargado de la sincronización y regulación de los ritmos circadianos mediante la estimulación de la secreción de melatonina por la glándula pineal (Gooley y cols., 2001; Hannibal y cols., 2002). Cuya actividad está regulada por irradiancia luminica. Además, algunas proyecciones de las CGRip llegan a la lámina intergeniculada y al núcleo de la oliva pretectal, responsable del reflejo pupilar. También se ha descrito la proyección de CGRip a regiones como el área preóptica ventrolateral (que regula el sueño), la zona subparaventricular, el núcleo geniculado ventro-lateral y el colículo superior (Hattar y cols., 2006) (Figura 8).

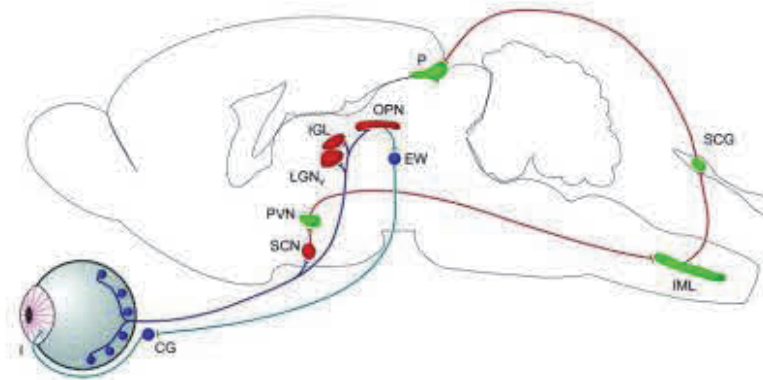


Figura 8: Principales proyecciones neuronales de las CGRs melanopsínicas de ratón.

Los axones de las CGRs melanopsínicas (azul oscuro) proyectan principalmente al núcleo supraquiasmático, encargado de la regulación de los ritmos circadianos, y una minoría a la lámina intergeniculada lateral y núcleo de la oliva pretectal, encargado del reflejo pupilar. Además, existen circuitos sinápticos (naranja) que se originan en el núcleo supraquiasmático hacia el núcleo paraventricular, el núcleo intermediolateral y el ganglio cervical superior. A su vez, el núcleo de la oliva pretectal establece conexiones con el núcleo de Edinger-Westphal que a su vez conecta con el ganglio ciliar y éste inerva el músculo del iris (azul claro). Ilustración modificada de: Berson y cols., 2003.

I.4.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

Las CGRs se utilizan como modelo para estudiar los cambios degenerativos asociadas a la lesión axonal del SNC y las propiedades neuroprotectoras de diferentes sustancias. Para poder conocer con exactitud tanto la proporción de CGRs que mueren tras un insulto como la que sobrevive tras un tratamiento, es muy importante su identificación para diferenciar estas células de las células amacrinias desplazadas, ya que ambos tipos celulares se encuentran en la CCG (Nadal-Nicolas y cols., 2015b). Existen diferentes procedimientos y técnicas que permiten identificar las CGRs, siendo el trazado retrógrado desde las regiones retinorecipientes (Salinas-Navarro y cols., 2009b) o la inmunodetección de proteínas que sólo se expresan en esta población neuronal, los dos métodos más utilizados. A continuación, se detallan algunas técnicas para identificar este tipo celular.

I.4.3. MARCAJE RETRÓGRADO CON TRAZADORES NEURONALES

Hasta el descubrimiento de marcadores específicos de CGRs, una de las técnicas más utilizadas para identificar las CGRs era el marcaje retrógrado con trazadores neuronales aplicados en el NO o en los territorios de proyección de las CGRs en el cerebro. Los axones de las CGRs captan el trazador y lo transportan retrógradamente hasta el soma celular, donde se acumulan.

Existen dos métodos para trazar retrógradamente las CGRs. El primero de ellos consiste en aplicar el trazador en el muñón del NO (**MNO**) tres días antes del procesado del animal. De esta forma, se trazan la totalidad de las CGRs. El segundo método consiste en aplicar el trazador en ambos CS, principales territorios de proyección de las CGRs en roedores (*Perry, 1981; Nadal-Nicolás y cols., 2015c*). Estudios anteriores han descrito que la aplicación del trazador en los CS de la rata y del ratón se trazan aproximadamente un 98,4% y un 96,5% del total de las CGRs, respectivamente (*Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2014*).

El fluorogold (**FG**) y su análogo, el hydroxystilbamidine methanesulfonate (**OHSt**), son los trazadores que se transportan activa y retrógradamente. El número y la distribución espacial de las CGRs en rata y ratón son trazadas desde los CS o desde el MNO, ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo (*Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2013; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b*). A partir de ahora, nos referiremos a las CGRs trazadas con OHSt como CGRs-OHSt*.

I.5. MARCADORES FENOTÍPICOS

Los marcadores fenotípicos son proteínas que, en la retina, se expresan en CGRs y permiten su identificación por técnicas de inmunodetección. Los marcadores más utilizados son, el Brn3a y las RBPMS.

El **Brn3a** es un factor de transcripción con dominio POU clase IV (Pou4f) que se expresa en el 91% de la población total de CGRs en ratón (*Galindo-Romero y cols., 2011*) y en el 97% en rata (*Nadal-Nicolás y cols., 2009*). La expresión de Brn3a permanece en las CGRs mientras éstas estén vivas (*Nadal-Nicolás y cols., 2009; Sánchez-Migallón y cols., 2011*) y su patrón de expresión no cambia tras una lesión.

Por lo tanto, es un buen marcador de CGRs para el estudio del curso temporal de muerte neuronal en distintos modelos de lesión experimental, como la sección o aplastamiento del NO (*Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013a*), hipertensión ocular (*Salinas-Navarro y cols., 2010*), o las degeneraciones retinianas (*García-Ayuso y cols., 2010, 2011*) y en el estudio de su supervivencia tras la administración de un tratamiento neuroprotector (*Sánchez-Migallón y cols., 2011; Galindo-Romero y cols., 2013a; Norte-Muñoz y cols., 2021, 2022*).

El Brn3a se expresa en las CGRs implicadas en visión, pero no se expresa en las CGRip (2,4% de las CGRs totales en rata. 7,5% en ratón). Así, inmunodetectando Brn3a se identifica la población de CGRs implicadas en la formación de imágenes (*Galindo-Romero y cols., 2013a; Valiente-Soriano y cols., 2015*).

RBPMS: (RNA-binding protein with multiple splicing sites), es una proteína de la familia de proteínas de unión a RNA con múltiples sitios de unión que ha sido utilizada como marcador de CGR en modelos de excitotoxicidad, aplastamiento del NO e hipertensión ocular (*Kwong y cols., 2011, 2013*). Se expresa en un 99,5 % de las CGR trazadas desde los colículos superiores, incluidas las CGRip (*Rodriguez y cols., 2014*).

También se utilizan otros marcadores para detectar las CGRs como son: **NeuN, β III-tubulina y γ -sinucleína**. La cuantificación de las CGRs con estos marcadores puede ser problemática debido a varios factores como, en el caso de NeuN, que también se expresa en parte de la población de células amacrinas (*Mullen y cols., 1992; Buckingham y cols., 2008*). La β III-tubulina y γ -sinucleína son proteínas citoplasmáticas y axonales, por lo que la gran densidad de axones en el centro de la retina dificulta la cuantificación de las CGRs.

I.5.1. DENSIDAD DE CGR EN RETINAS INTACTAS

En nuestro grupo, hemos caracterizado la población de CGRs-Brn3a⁺ en retinas de ratón y rata (*Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011*). En ratón pigmentado, la población total de CGRs-Brn3a⁺ es de 34.627 ± 1821 , con una densidad media de 2.522 ± 193 CGRs-Brn3a⁺ /mm² (*Galindo-Romero y cols., 2011*).

Sin embargo, esta densidad media es engañosa, ya que la población de CGRs no es homogénea en la retina, siendo más densa en el centro que en la periferia (*Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011*). Así, el rango de densidad de CGRs-Brn3a⁺ en ratón oscila de 3.571 CGRs/mm² en el centro a 1.883 CGRs/mm² en la periferia. En cuanto a la densidad de CGRs-RBPMS⁺, varía de 4890 ± 220 CGRs/mm² en el centro a 1847 ± 286 CGRs/mm², en la periferia de la retina (*Rodriguez y cols., 2014*).

I.6. CÉLULAS DE LA GLÍA EN LA RETINA

Históricamente, se han considerado a las neuronas como el tipo celular más importante del SN. Pero éstas no podrían desempeñar su papel sin contar con el apoyo de otras células que forman la denominada neuroglía, glía o células gliales. Las células de la glía pueden dividirse en dos grandes grupos: la microglía y la macroglía (**Figura 9**). En el SNC, se observa un tipo de célula macroglial ausente en la retina, el oligodendrocito, cuya función principal es la de recubrir con su membrana plasmática el axón de la neurona y así mejorar la velocidad de conducción del mismo (*Nave, 2010*).

En la retina se observan dos tipos de células de la macroglía (células de Müller y astrocitos) y las células de la microglía. Las células de la macroglía comparten el mismo origen embrionario, el ectodermo, salvo la microglía, que tiene un origen mesodérmico.

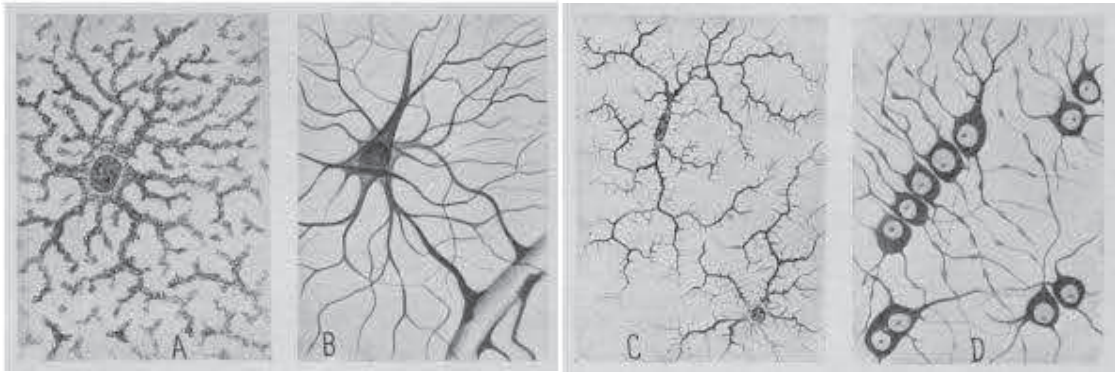


Figura 9: Las cuatro especies de corpúsculos intersticiales ("células gliales ") en el tejido nervioso humano:

A) célula neuroglial (astrocito) de tipo protoplásmico, en la sustancia gris cerebral; **B)** célula neuroglial (astrocito), de tipo fibroso típica en la sustancia blanca cerebral; **C)** microglía; **D)** glía interfascicular (oligodendrocitos) de la sustancia blanca del encéfalo. Imágen tomada de: *Tremblay y cols., 2015*.

Las CMs son los macrófagos residentes del SNC. Realizan numerosas funciones requeridas para el bienestar del SNC, como mantener la homeostasis, defensa de patógenos o fagocitar los cuerpos de las células muertas (*Chen L y cols., 2002, Madeira y cols., 2015; Orihuela R y cols., 2016; Lana, 2021*).

Aunque fueron descritas hace más de un siglo, han cobrado un papel relevante en los últimos años y hoy hay muchas líneas de investigación que indican que la desregulación de la microglía contribuye a la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas.

I.1.6.1. DESCUBRIMIENTO DE LA MICROGLÍA

Don Santiago Ramón y Cajal (**figura 10 A**) puso a punto una tinción para marcar los astrocitos, específicamente mediante el método del cloruro de oro sublimado, diferenciándolos así del resto de células del SNC (*Ramón y Cajal, 1913*). Sin embargo, no logró una clara separación entre microglía y oligodendrocitos, clasificados en un primer momento dentro del mismo grupo como células adendríticas o "el tercer elemento".

El primer científico en diferenciar la microglía como un tipo celular en sí mismo fue Don Nicolás Achúcarro (**Figura 10 B**) mediante una tinción de taninos y nitrato de plata amoniacal (**Figura 11**). Con esta tinción, Achúcarro diferenció claramente unas células fagocíticas granuloadiposas de otras con forma de estrella, fibrillas neurogliales y prolongaciones dirigidas hacia los vasos sanguíneos, que se correspondían con microglía y astrocitos respectivamente (*Achúcarro, 1911*).

Las células gliales ayudan a mantener la homeostasis en la retina mediante la regulación del intercambio iónico, la glucosa, nutrición, transporte de neurotransmisores y la neuroprotección de las células nerviosas e inmunidad del SNC (**Figura 6**) (*Vecino y cols., 2016*).

Las CMs tienen una función importante como "células de vigilancia" altamente especializadas que vigilan continuamente el microambiente y responden rápidamente a las lesiones neuronales mediante la fagocitosis de desechos neuronales potencialmente perniciosos, la secreción de mediadores inflamatorios locales y la comunicación con otras posibles células efectoras del sistema inmunitario (*Hanisch y Kettenmann, 2007*).

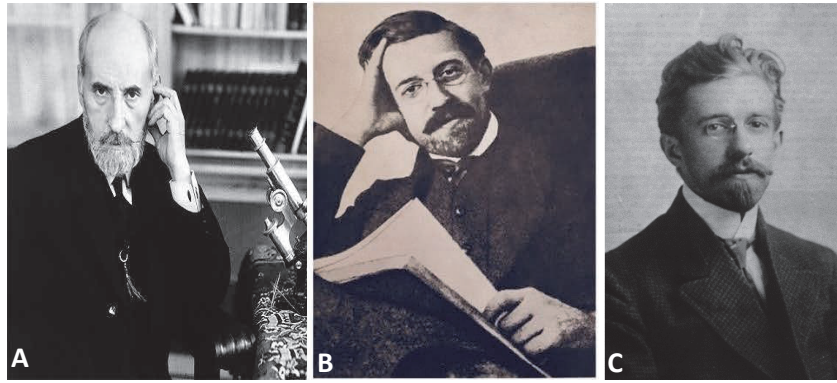


Figura 10: El descubrimiento de las CMs.

(A) Don Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) médico especializado en histología y anatomía patológica. Compartió el premio Nobel de medicina con Don Camilo Golgi en 1906. (B) Don Nicolás Achúcarro y Lund (1880-1918) médico neurocientífico especializado en enfermedades mentales. (C) Don Pío del Río Hortega (1882-1945) médico especialista en histología y neuroanatomía. Imágenes tomadas de: www.google.es.

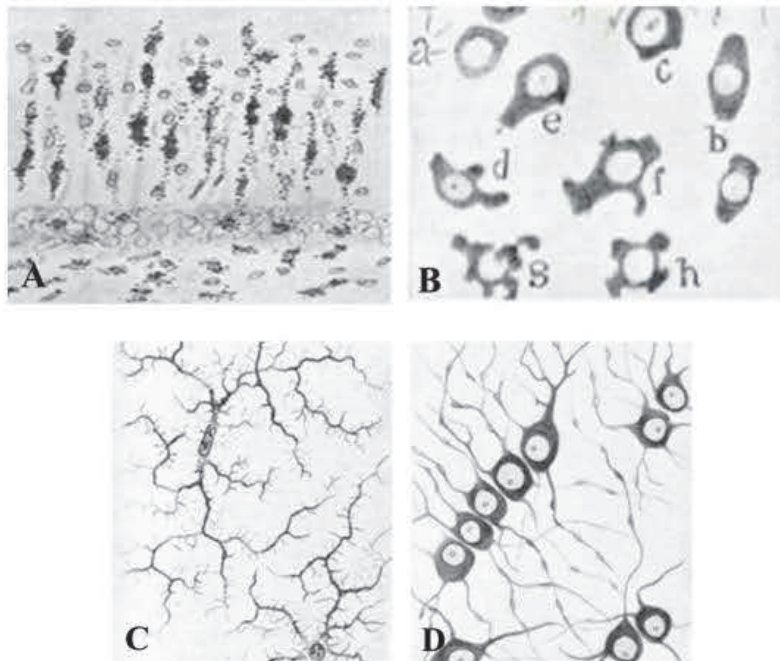


Figura 11: Dibujos esquemáticos de los métodos histológicos que permitieron identificar las CMs.

(A) El método de taninos y nitrato de plata amoniacal desarrollado por Achúcarro permitió observar la capacidad fagocítica de la microglía (a las que denominó células granuloadiposas) en el cerebro de un conejo con rabia. (B) Ramón y Cajal introdujo su método de cloruro de oro sublimado, que permitió diferenciar los astrocitos de otras células débilmente marcadas, a las cuales denominó “el tercer elemento”. Río-Hortega completó el trabajo de ambos, por medio del método de carbonato de plata diferenció la microglía (C) de los oligodendrocitos (D), éstos últimos identificados con el método Golgi-Hortega. Dibujo modificado de: *Tremblay y cols., 2015*.

I.1.6.2. IDENTIFICACIÓN Y MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA

El Dr. Pío del Río-Hortega (**figura 10 C**) discípulo del Dr. Nicolás Achúcarro puso a punto el método del carbonato de plata que mostraba que “*la microglía se caracteriza por su núcleo pequeño y oscuro envuelto por escaso protoplasma y sus extensiones torcidas y ramificadas, adornadas con espinas laterales*” y así logró diferenciar claramente la microglía de los oligodendrocitos en 1919 (**Figura 12**). El Dr. Del Río Hortega denominó a esta técnica método Golgi-Hortega (*Río-Hortega, 1919a, 1919b, 1919c, 1919d, 1922*).

De esta forma, Río-Hortega pudo realizar una descripción detallada de la microglía como un tipo celular diferenciado y cuya entidad prevalece hasta hoy día. Durante el desarrollo embrionario y postnatal, estas células migran desde los vasos sanguíneos del CC, NO y vasos hialoideos del parénquima retiniano (*Vecino y cols., 2016*).

Cuando la respuesta microglial local es insuficiente para hacer frente a la lesión, monocitos procedentes del torrente sanguíneo son capaces de penetrar en el tejido nervioso y transformarse en macrófagos.

Macrófagos y microglía presentan características morfológicas, de migración y moléculas de expresión similares, lo que hace difícil su diferenciación. Una vez el estímulo ha cedido, estas células activas retornan a un estado inactivo basal (*Wohl y cols., 2010*).

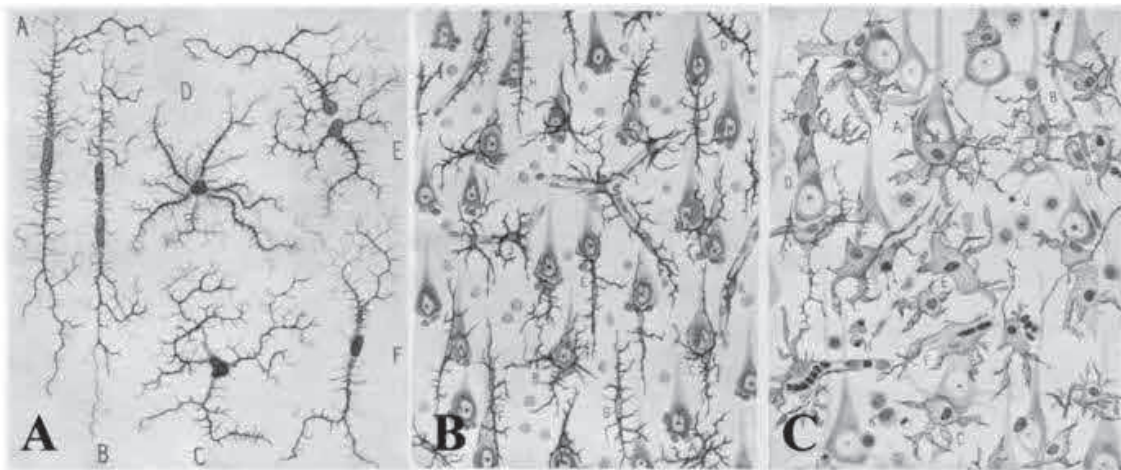


Figura 12: Ilustraciones de microglía realizadas por Pío del Río-Hortega.

(A) Principales formas de microglía observadas en un cerebro humano sano. (B) Morfología de la microglía de un paciente con meningitis aguda. (C) Microglía del cortex cerebral de un conejo en una zona cercana a una herida tras 48 h de evolución. Imagen tomada de: *Sierra y cols., 2016*.

A pesar de que Del Río-Hortega describió dos tipos de CMs (activa e inactiva), hoy en día, se sabe que existen más fenotipos de microglía. Cada uno de estos fenotipos se asocia a determinadas funciones requeridas para preservar el medio (*Holloway y cols., 2019*) y que responden a las citoquinas y quimioquinas derivadas del daño asociado (*Laprell y cols., 2021*).

Así las CMs fueron descritas a principios del siglo XIX por neurocientíficos españoles Don Santiago Ramón y Cajal, Don Pío del Río-Hortega y Don Nicolas Achucarro y suponen entre un 33% a 66% de la masa cerebral total (Azevedo y cols., 2009; Herculano-Houzel, 2014) (Figura 10). Actualmente se han descrito 5 fenotipos de CMs según el estado de activación (Jonas y cols., 2012):

I) Microglía ramificada

Este fenotipo se caracteriza por presentar un soma redondeado del que emergen numerosas prolongaciones (Figura 13). Se trata de un estado inactivo y con una movilidad reducida cuya función principal es vigilar el medio en busca de elementos o estímulos dañinos, así como el de fagocitar detritus celulares y productos de desecho del espacio extracelular secundarios a la actividad celular de la retina. Característicamente presenta una alta expresión de P2RY12 (Dubbelaar y cols., 2018; Waller y cols., 2019). Otros autores han clasificado las CMs en diferentes estadios de activación, clasificando este fenotipo como un estadio 1A (Jonas y cols., 2012).

A)



Figura 13: Ilustración de Del Río-Hortega (1919) de microglía ramificada.

Se observa una ilustración de microglía ramificada realizada por: Pío De Río-Hortega en 1919.

II) Microglía activada

Como resultado de una lesión o infección, las CM cambian su morfología a un estado activado, perdiendo sus ramificaciones y convirtiéndose en ameboides (Jonas y cols., 2012; Cai y cols., 2020). Cuando se activan, las CMs son capaces de migrar al sitio del daño y fagocitar los restos celulares para mantener la integridad del tejido (revisado en (Chen y cols., 2002; Madeira y cols., 2015). La expresión de CD68 aumenta a medida que la CMs cambia a un estado fagocítico, lo que indica su activación (Rojas y cols., 2014; Zhou y cols., 2017). Las CMs pueden sufrir dos tipos diferentes de activación: M1 y M2 (Chlor y cols., 2013; Ransohoff 2016; Tang y Le., 2016), aunque esta clasificación actualmente está en discusión por la variedad de estados intermedios, en esta tesis para simplificar usaremos esta nomenclatura.

La microglía M1, definida como activación clásica, suele actuar en la primera línea de defensa y es responsable de la producción de mediadores proinflamatorios con propiedades citotóxicas, como la interleucina-1 β (**IL-1 β**), el factor de necrosis tumoral- α (**TNF- α**), o especies reactivas de oxígeno (**ROS**) (*Chlor V y cols., 2013*) a través de la activación de la señalización NF- κ B (*Akhmetzyanova y cols., 2019*).

La microglía M2, definida como la activación alternativa de las CMs a través de la fosforilación de STAT1 y JAK1 (*Akhmetzyanova y cols., 2019*), expresa factores neurotróficos, como el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (**IGF1**) y citocinas antiinflamatorias, como el factor de crecimiento tumoral- β (**TGF- β**), IL-13, IL-10 e IL-4a, que facilitan la reparación tisular y la reconstrucción de la matriz extracelular (*Li y cols., 2021; Horie y cols., 2013; Crain y cols., 2013*).

En respuesta a la apoptosis neuronal, la microglía M2 sobreexpresa los marcadores M2 típicos, como Arg1, Fizz1 y CD206, y restauran el tejido dañado fagocitando células apoptóticas (*Chlor V y cols., 2013*).

Por lo tanto, las CMs después de una lesión del SNC pueden tener: funciones perjudiciales / neurodegenerativas ó beneficiosas / neuroprotectoras (*Tang y Le., 2016*). Funciones proinflamatorias que si se cronifican pueden ser perjudiciales y funciones beneficiosas que restauran el tejido.

Recientemente, se han descrito tres subtipos de M2. Las células M2a con funciones neuroprotectoras y de eliminación de detritus celulares que se encuentran favorecidas por citoquinas antiinflamatorias como la interleuquina 10 (**IL-10**), el factor de crecimiento simultaneo insulina (**IGF-1**). Las M2b con funciones fagocíticas que se activan por estimulación IL-1 β y lipopolisacáridos (**LPS**). Las M2c están estimuladas por factores como IL-10 y glucocorticoides e incrementan a su vez factores como TGF- β . Estos subtipos de microglía activa no son excluyentes si no que la estimulación de ambas debe ser proporcional para evitar la polarización de la respuesta microglial y así evitar procesos patológicos (*Gao & Hong, 2008; Walker & Lue, 2015*). Autores como Jonas han clasificado a estas células en un estadio 3A (*Jonas y cols., 2012*).

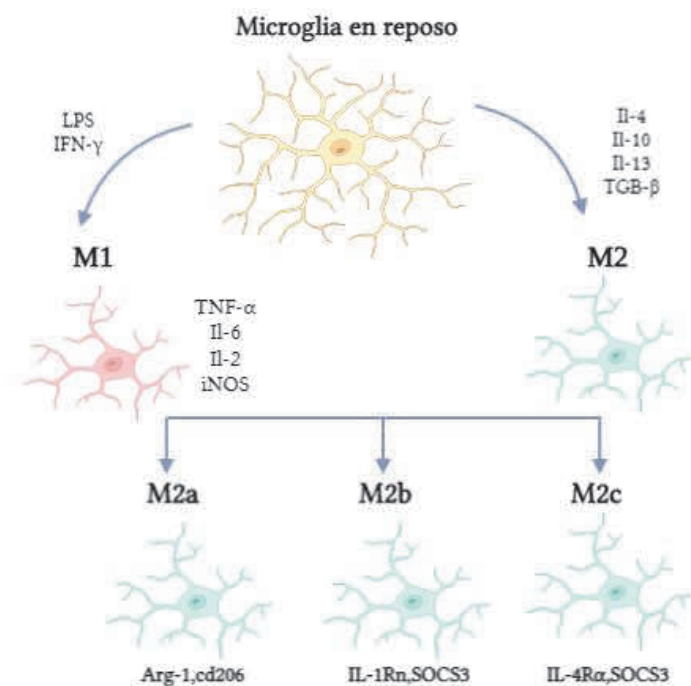


Figura 14: Representación esquemática de los diferentes fenotipos de la microglía.

Representación realizada en: www.biorender.com.

III) Microglía hiperramificada

Algunas veces, la activación de la microglía ramificada provoca la formación de una microglía hiperramificada que morfológicamente se caracteriza por un soma de mayor tamaño y de aspecto lobular y grueso del que emergen procesos citoplasmáticos que son más largos, gruesos y abundantes (Torres-Platas y cols., 2014). Según otros autores, este tipo celular se encontraría en un estadio 4A de activación (Jonas y cols., 2012).

IV) Microglía ameboide

Este tipo de microglía se caracteriza por una morfología redondeada, grande con pocos o ausencia de procesos citoplasmáticos, este morfotipo celular suele aparecer cuando el estímulo se extiende en el tiempo (Torres-Platas y cols., 2014). Este tipo celular es clasificado por otros autores como el estadio máximo de activación microglial o estadio 6A (Jonas y cols., 2012).

V) Microglía en bastón

Presenta una morfología alargada. Son células que se encuentran próximas a las neuronas y a las fibras nerviosas y su función todavía sigue sin determinarse (De Hoz y cols., 2013; Taylor y cols., 2014).

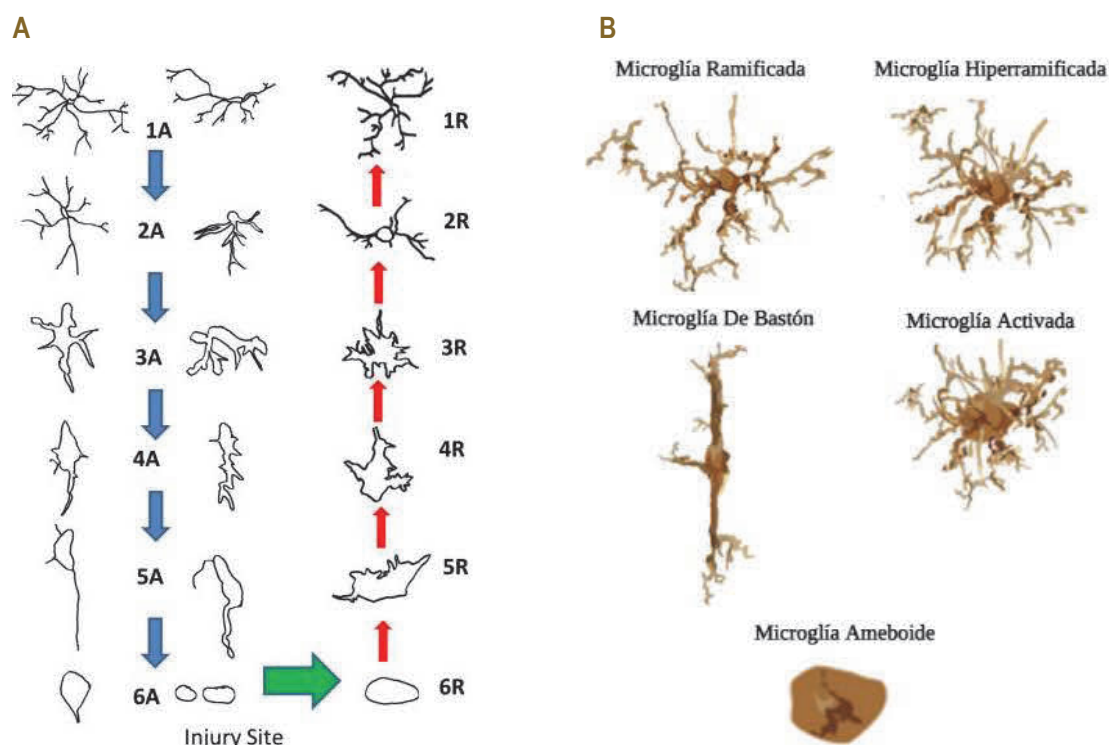


Figura 15: Esquema de los diferentes estados de la microglía.

A) El dibujo son trazados de la microglía activada en reposo que comienza en la etapa de reposo 1A, continúa hasta la etapa 6A activada, se transforma en la etapa 6R y luego vuelve a la etapa de reposo 1R. Las flechas azules indican el aumento de activación y la flecha verde indica la transición de activado a retorno. Imagen tomada de: *Jonas RA y cols., 2012*. B) Esquema con los diferentes tipos de microglía. Imagen modificada de: *Holloway y cols., 2019*.

I.1.6.3. MICROGLIA EN LA RETINA

En la retina sana, las CMs se encuentran distribuidas homogéneamente en cuatro capas: CFNR, CCG, CPI y CPE (*Sobrado-Calvo y cols., 2007; Santos y cols., 2008; Nadal-Nicolás y cols., 2017*) (**Figura 16**).

En la retina de los mamíferos, las CMs residentes se activan tras una lesión o degeneración y su morfología difiere de una retina intacta (*Barron y cols., 1986; Schnitzer y Scherer, 1990; Thanos y cols., 1994; Humphrey y Moore, 1996; Raibon y cols., 2002; Panagis y cols., 2005; Zhang y cols., 2005a,b*), mostrando los signos de activación que acabamos de describir y que es común en lesiones que provocan la muerte de CGRs o distrofias retinianas que producen muerte de fotorreceptores (*Di Pierdomenico y cols., 2019, 2020a, 2020b*), aunque existen diferencias fenotípicas y topográficas de la microglía en respuesta a la muerte de cada tipo neuronal.

La microglía y la neuroinflamación resultante se han implicado en la patología de muchas enfermedades neurodegenerativas (*Silverman y Wong, 2018*). En la retina se ha descrito que las CMs no tienen un papel en la degeneración de las CGRs por axotomía (*Hilla y cols., 2017*), sin embargo, su ubicación atenuaría la muerte de fotorreceptores en distrofias retinianas (*Di Pierdomenico y cols., 2019*).

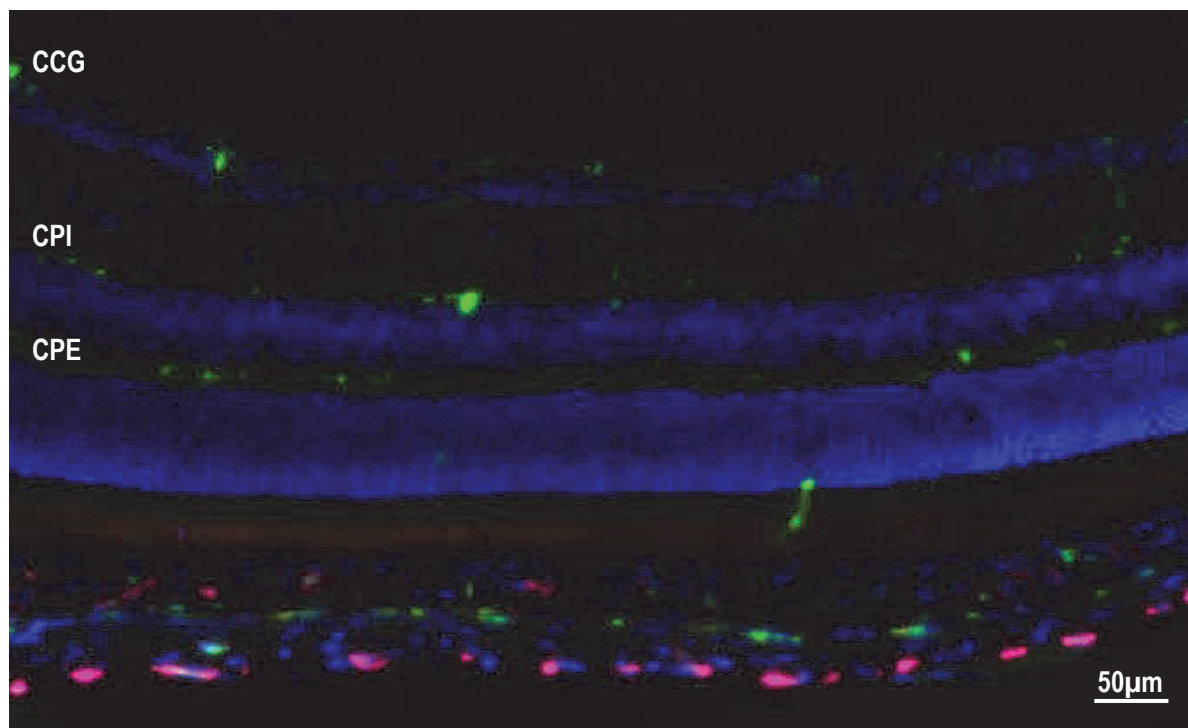


Figura 16: Imagen de una sección transversal de retina intacta.

Se observan CMs teñidas con Iba1 (verde), CD206 (rojo), CD68 (rosa) y DAPI (azul) en diferentes capas de la retina. *Imagen tomada durante el desarrollo de esta tesis doctoral.*

I.1.6.4. IDENTIFICACIÓN DE MICROGLIA

Los marcadores de CMs utilizados en este trabajo son los siguientes:

IBA1: La molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba-1), que es una proteína citoplásmica, se considera un marcador panmicroglial (*Walker y cols., 2015*). Iba1 está involucrada en la reorganización del citoesqueleto, la alteración de la membrana de los procesos microgliales y la reticulación de actina necesaria para la migración celular (*Ohsawa y cols., 2004; Minett y cols., 2016*), lo que refleja la motilidad microglial y las propiedades de migración. Varios estudios han demostrado que su expresión se correlaciona con la activación e inflamación microglial (*Ito y cols., 1998; Streit y cols., 2009; Minett y cols., 2016; Waller y cols., 2019*). Se expresa en toda la microglía y en macrófagos activados.

CD68: es de los marcadores más útiles y descriptivos para identificar microglía activa. Esta proteína se localiza en la membrana lisosomal de la microglía y los monocitos, y se regula positivamente en las células fagocíticas activas (*Zotova y cols., 2013*). Tanto microglía como macrófagos polarizados M1 y M2 pueden expresar CD68 (*Martinez y cols., 2013*).

CD206: Suele utilizarse para la identificación del fenotipo M2 de la microglía. Es un receptor de manosa de los macrófagos (MMR, por sus siglas en inglés), es una glicoproteína transmembrana de cadena única de tipo I con una estructura de receptores multilectina. Se detectó por primera vez en los macrófagos tisulares, se expresa principalmente en células dendríticas inmaduras y en una amplia variedad de otro tipo de células (*Chen y cols., 2002; Chror y cols., 2013; Horie y cols., 2013; Zhou y cols., 2017*). Ausente en los linfocitos y monocitos, el receptor de manosa aumenta en los monocitos durante su diferenciación a macrófagos (*Chen y cols., 2002; Chlor y cols., 2013; Zhou y cols., 2017*).

I.1.7. CÉLULAS DE MACROGLIA

Las células de la macroglía son las encargadas de mantener las funciones y el metabolismo de las neuronas. Sus prolongaciones forman vínculos anatómicos y funcionales en las neuronas y en los capilares sanguíneos para intercambian sustancias como nutrientes, iones, agua o productos de desecho (*Reichenbach & Bringmann, 2020*). En la retina se pueden diferenciar dos tipos de células de la macroglía: **las células de Müller y los astrocitos**.

I.1.7.1. CÉLULAS DE MÜLLER

Las células de Müller representan el 90% de la glía de la retina y destacan por una singular morfología radial desde la MLI hasta la CNE, que permite interactuar con todas las células de la retina. Son responsables del soporte funcional, estructural y metabólico de las neuronas (*Newman y Reichenbach 1996; Vecino y cols., 2016*). El soma de las células de Müller se encuentra en la CNI y se alarga en dos troncos principales que van hacia la MLI que recubre la CFNR, así como hacia la MLE directamente adyacente a los fotorreceptores.

Las células de Müller envuelven a las neuronas de la retina y se vuelven glióticas (activadas) después de casi cualquier desafío patológico en la retina (*Wang y cols., 2002; Bringmann y cols., 2009; Hernández y cols., 2010*).

Las células de Müller participan en el establecimiento de la barrera hematorretiniana (**BHR**), equilibran los iones y equilibran el transporte de agua a través de canales de agua especializados como la acuaporina-4 (**AQP4**) (*Bringmann y cols., 2005; Cunha-Vaz, Bernardes, y Lobo 2011*). La rápida eliminación del glutamato de las hendiduras sinápticas durante la neurotransmisión es realizada por el transportador de glutamato/aspartato (**GLAST**), presente en las células de Müller, protegiendo a las neuronas de la excitotoxicidad producida por un exceso del glutamato (*Bringmann y cols, 2013*). Estas células producen y secretan factores neurotróficos, factores de crecimiento y citoquinas vitales para la supervivencia neuronal (*Cao y cols., 1997; Harada y cols., 2000; Del Rio y cols., 2011*). También promueven la supervivencia de las CGRs mediante la producción de factores neurotróficos como el factor neurotrófico ciliar, que ha demostrado tener potentes efectos neuroprotectores en el glaucoma (*Pease y cols., 2009*).

Se han descrito diversos subtipos de células de Müller que reaccionan de manera diferente a una lesión, posiblemente debido a la diferente proximidad espacial a las células que se están muriendo (*Roesch, Stadler y Cepko 2012*).

Además del importante papel en el mantenimiento de la homeostasis de la retina, las células de Müller son responsables de guiar la luz a través de la retina, actuando como "fibras ópticas" que transfieren de forma fiable la luz con baja dispersión desde la superficie de la retina a la capa de células fotorreceptores (Franze y cols., 2007).

I.1.7.2. ASTROCITOS

Los astrocitos son células gliales en forma de estrella y en la retina están presentes principalmente en la CFNR y GCL, las capas más internas de la retina (Figura 17). Se han descrito tres subclases de astrocitos: astrocitos bipolares cuyas prolongaciones se extienden entre los haces de las fibras nerviosas de las células ganglionares y los astrocitos perivasculares y los estrellados que se sitúan entre las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos (Ramirez y cols., 1994; Reichenbach & Bringmann, 2020). Los astrocitos son importantes para el apoyo neurotrófico, el apoyo mecánico mejorado para la degeneración de los axones y el mantenimiento de la integridad de la BHR (Cunha-Vaz, Bernardes y Lobo 2011; Vecino y cols., 2016).

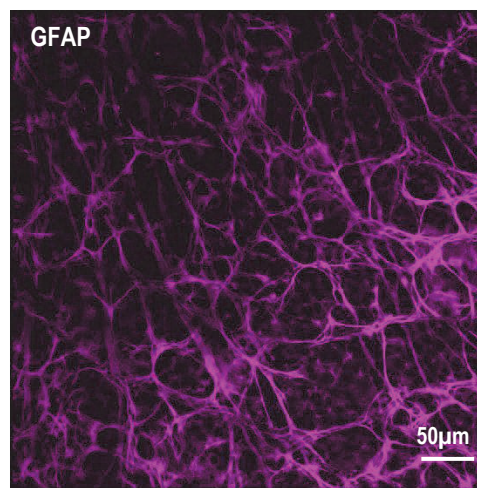


Figura 17: Imagen de una retina a plano de ratón que muestra los astrocitos.

Se muestran los astrocitos inmunomarcados contra la proteína GFAP. Los astrocitos se sitúan en CFNR y forman una red densa que se asemeja a un panal de abejas. *Imagen tomada durante el desarrollo de esta tesis doctoral.*

I.1.7.3. IDENTIFICACIÓN DE MACROGLÍA DE LA RETINA

En esta tesis doctoral, hemos usado GFAP y Vimentina para estudiar la macroglia.

GFAP: (proteína ácida fibrilar glial) que se expresa en los astrocitos en reposo y en las células de Müller activadas. También se expresa en células de diferentes regiones del cerebro, así como en las células madre neuronales (Middeldorp y cols., 2011; Oberheim, y cols., 2011; Agnieszka y cols., 2021). La función general de GFAP es de apoyar mecánicamente a los astrocitos (Liedtke y cols., 1996; Stavale y cols., 2013; Agnieszka y cols., 2021). Cuando los astrocitos se activan e hipertrofian, aumentará la expresión de GFAP.

Vimentina: Uno de los marcadores de células de Müller más utilizados es la vimentina, que es estructuralmente similar a GFAP. Se puede encontrar también en fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y linfocitos (Evans 1998; Bramanti y cols., 2010; Agnieszka y cols., 2021). En el SNC adulto normal, la vimentina se expresa principalmente en algunas células gliales especializadas como Bergmann y glía radial o células endodiales (Luo y cols., 2017).

La inmunorreactividad de la vimentina es normalmente baja en las células de Müller, pero aumenta después de su activación (Zamanian y cols., 2012; Agnieszka y cols., 2021).

I.1.8. DEGENERACIÓN DEL SISTEMA VISUAL

I.1.8.1. VENTAJAS DE TRABAJAR EN EL SISTEMA VISUAL COMO MODELO DE DEGENERACIÓN DEL SISTEMA VISUAL

Abundantes autores y publicaciones, y nosotros en la realización de esta tesis, utilizamos la retina de los roedores como modelo en investigaciones sobre degeneración del SNC, ya que posee numerosas ventajas con respecto al resto de zonas del SNC (Aguayo y cols., 1987; Bray y cols., 1987; Vidal-Sanz y cols., 2012) tales como:

- I) Su localización, ya que la retina se encuentra dentro del globo ocular aislada del resto de SNC, por lo que es fácilmente accesible para manipulaciones y evita alteraciones en el resto de SNC, permitiendo realizar estudios a largo plazo (Vidal-Sanz y cols., 1991; Nadal-Nicolás y cols., 2015a, 2017; Sánchez-Migallón y cols., 2018).
- II) La población de CGRs y de fotorreceptores está muy bien caracterizada anatómicamente y funcionalmente, y puede ser estudiada tanto en secciones transversales como en retinas montadas a plano (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Ortín-Martínez y cols., 2010; Di Pierdomenico y cols., 2019, 2020).
- III) La técnica del electroretinograma, así como la OCT nos permite estudiar la funcionalidad y anatomía, representativamente de la retina en animales *in vivo* (Alarcón-Martínez y cols., 2009, 2010; García-Ayuso y cols., 2019; Norte-Muñoz y cols., 2021).
- IV) Los axones de las CGRs forman el NO y están organizados topográficamente (Guillery y cols., 1995; Fitzgibbon and Taylor, 1996; Jeffery, 2001; Jeffery y cols., 2008).
- V) La sección del nervio óptico (SNO) y el ApNO son un modelo de lesión específica de las CGRs (Peinado-Ramón y cols., 1996; Parrilla-Reverter y cols., 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2014, 2015b, 2017; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013b).
- VI) El vítreo es un reservorio natural en el que se pueden administrar fármacos para tratar la retina (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; Lindqvist y cols., 2004; Sánchez-Migallón y cols., 2016; Lucas-Ruiz y cols., 2019; Galindo-Romero y cols., 2021).

VII) Las terapias neuroprotectoras se pueden administrar bien de manera sistémica (oral, intravenosa, intraperitoneal); bien retrógradamente desde los núcleos de proyección del SNC; bien mediante inyecciones locales intravítreas, camerales o subretinianas; o bien de manera tópica, mediante gotas en la córnea.

I.1.8.2. MODELOS DE DEGENERACIÓN NEURONAL EN LA RETINA

I.1.8.2.1. Isquemia retiniana

La isquemia retiniana se produce cuando la circulación es insuficiente para llevar a cabo la demanda metabólica requerida por la retina. Mientras que la parte externa de la retina se nutre de la coroides, una capa altamente vascular, las capas internas de la retina se nutren de las ramas de la arteria central de la retina, que nace directamente de la arteria oftálmica y entra al ojo en la vaina meníngea del NO, junto con las venas de la retina. Cualquier alteración en este flujo sanguíneo suele producir la muerte de las CGRs. Existen varios modelos experimentales de isquemia: la isquemia inducida por elevación de la presión intraocular (*Sellés-Navarro y cols., 1996; Gallego-Ortega y cols., 2020*), isquemia mediante la ligadura de los vasos oftálmicos (*Vidal-Sanz y cols., 2001a, 2001b; Lafuente y cols., 2002a, 2002b; Lönngren y cols., 2006*) o ablación fotodinámica (*revisado en Osborne y cols., 2004*). En todos los modelos, cuanto mayor es el tiempo de la isquemia, mayor es el daño producido en las CGRs. En este modelo también se produce degeneración de los fotorreceptores.

I.1.8.2.2. Excitotoxicidad

El glutamato es el aminoácido excitatorio predominante en varias regiones del SNC, incluido la retina. La neurotransmisión mediada por glutamato es la que se produce en las sinapsis de los FR a las células bipolares, de éstas a las CGRs, y de las CGRs al cerebro. Los receptores glutamatérgicos de la retina están localizados en la CPE, donde se producen las conexiones sinápticas entre los FR y las células bipolares y horizontales; y en la CPI, donde sinaptan las bipolares con CGRs y amacrinas. El daño excitotóxico se produce cuando el exceso de glutamato se une a sus receptores como el N-metil-D-Aspartato (**NMDA**) desencadena un influjo de calcio y activa cascadas de señalización intraneuronales proapoptóticas, que llevan a la neurodegeneración. Las células gliales son las responsables de eliminar el exceso de glutamato y si hay un déficit en esta función, se produce un daño neuronal (*revisado en Almasieh y cols., 2012*).

Algunos modelos experimentales realizan una inyección intravítrea de NMDA, que produce una muerte progresiva de las CGRs por excitotoxicidad (*Lam y cols., 1999; Nash y cols., 1999; Schlamp y cols., 2001; Casson y cols., 2004*).

Por otra parte, la inhibición de los receptores de glutamato tiene un efecto neuroprotector en modelos experimentales de isquemia retiniana o glaucoma lo que sugiere que en estos modelos al menos parte de la muerte de las CGRs está causada por una liberación masiva de glutamato o por una disminución de la actividad glial que elimina el glutamato liberado (*Dong y cols., 2008; Almasieh y cols., 2012*).

I.1.8.2.3. Hipertensión ocular

Las neuropatías ópticas glaucomatosas son un grupo de enfermedades que cursan con la degeneración progresiva de las CGRs y sus axones, produciendo así defectos en el campo visual y finalmente ceguera. La etiología del glaucoma no se conoce con exactitud, sin embargo, se sabe que el principal factor de riesgo es el aumento de la presión intraocular.

Pese a que no todos los glaucomas se asocian a elevación de la presión intraocular, cómo ésta suele ser el factor de riesgo más importante en humanos, la mayoría de los tratamientos farmacológicos tienen como objetivo la disminución de la misma (*Vidal-Sanz y cols., 2012, Agudo-Barriuso y cols., 2013*).

Hasta la fecha existen varios modelos animales de experimentación que se han utilizado para poder entender los mecanismos de degeneración de CGRs en glaucoma. Algunos de ellos, tratan de reproducir el daño glaucomatoso mediante el ApNO o la isquemia transitoria, pero, en general, los más usados son los que se basan en reproducir el factor de riesgo más común, la hipertensión ocular. Los métodos utilizados para aumentar la presión intraocular son la cauterización de las venas episclerales (*García-Valenzuela y cols., 1995*), la deformación del globo ocular (*Selles-Navarro y cols., 1996*), la inyección de suero salino hipertónico en las venas episclerales (*Morrison y cols., 1997*), fotocauterización por láser de las venas limbares y episclerales (*WoldeMussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002; Cuenca y cols., 2010; Salinas-Navarro y cols., 2010*) y la inyección de microesferas en cámara anterior (*Sappington y cols., 2010; Chen y cols., 2011*).

I.1.8.2.4. Modelos de axotomía del nervio óptico

Se entiende por axotomía la interrupción de los axones, bien por corte de los mismos (*Berkelaar y cols., 1994; Madison y cols., 1993; Villegas-Pérez y cols., 1993; Nadal-Nicolás y cols., 2009*) o bien por aplastamiento (*Berkelaar y cols., 1994; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla-Reverter y cols., 2009, 2009a*). La lesión del NO en roedores induce en pocos días la degeneración retrograda y muerte de gran parte de la población de CGRs. Las CGRs que no mueren inmediatamente tras producirse la lesión, continúan muriendo con el paso del tiempo. Este es el modelo que usaremos en esta tesis.

Tras ApNO, tanto astrocitos como las células de Müller cambian de forma, tamaño y número. De igual forma, la expresión de GFAP aumenta como signo de reactividad (*Gallego y cols., 2012*), se vuelven hipertróficos (*Crain y cols., 2013*) y forman un borde cicatricial para sellar el tejido dañado (*Escartin y cols., 2021*).

Todas estas respuestas al ApNO no se limitan a la retina lesionada, sino que también afecta a la retina contralateral a la lesión, donde se produce la activación de astrocitos y células de Müller (*Ramirez y cols., 2015; Sánchez-Migallón y cols., 2016; Lucas-Ruiz y cols., 2019; Maeda y cols., 2019*).

En ratón, el curso de la muerte temporal de las CGRs es la misma tras SNO o el ApNO, siempre y cuando ésta se realice a la misma distancia del disco óptico (*Sánchez-Migallón y cols., 2016*). Se produce en dos fases, una de muerte rápida y otra de muerte lenta.

La fase rápida ocurre en los primeros 7-9 días tras la lesión (revisado en *Vidal Sanz y cols., 2017*). La pérdida de CGRS es ya significativa a los 3 días, alcanza el 50% de la población a los 5 días y a los 7 días se ha perdido el 65% de la población original. A partir de los 7 días, comienza la etapa lenta de muerte, que es constante y lenta como se muestra en la figura 5. A los 90 días sólo un 2% sobrevive (revisado en *Vidal-Sanz y cols., 2017*; *Sánchez-Migallón y cols., 2018*) (figura 18).

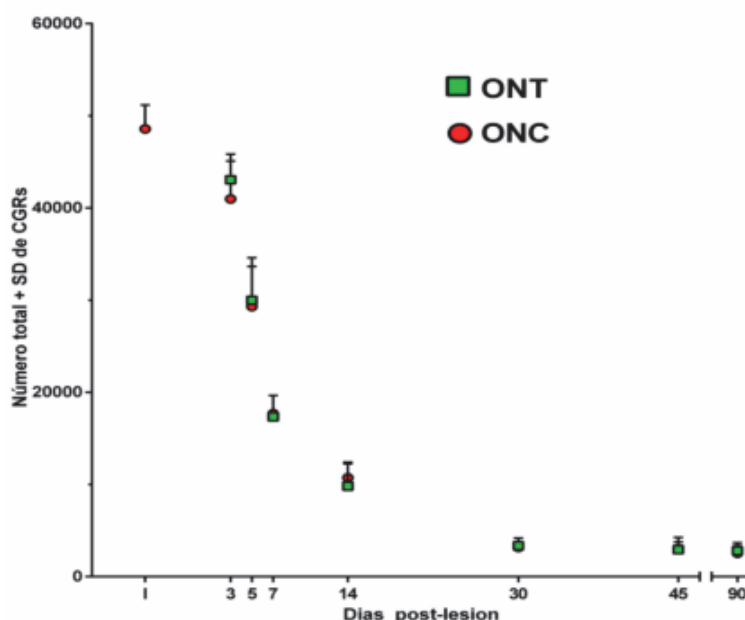


Figura 18: Fases de pérdida temporal de CGRs-*Bmn3a*⁺ tras SNO o ApNO en ratón albino. Gráfico que representa el número total + desviación estándar (SD) de CGRs-*Bmn3a*⁺ que sobrevive a tiempos crecientes tras SON o ApNO, donde puede apreciarse el transcurso de la muerte en dos fases, una rápida y otra lenta, independientemente de la lesión producida. Datos tomados de: *Sánchez-Migallón y cols., 2016* I: Intactas: retinas a las que no se le realizó ninguna lesión.

I.1.9. EFECTO CONTRALATERAL: SIGNIFICADO Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Shenker y cols. (2003) propusieron que el significado biológico de la respuesta contralateral puede ser la protección de los tejidos y la limitación del daño. Por lo tanto, el cuerpo prepara la región no dañada para combatir mejor el daño que ya se ha producido en el lugar del espejo. Se trata de un mecanismo preciso y, por lo tanto, según su teoría, es económico porque evita una respuesta sistémica que ahorra energía y evita el (posible) efecto nocivo de una reacción inflamatoria excesiva.

Shenker y cols. (2003) también especularon sobre las propiedades de la respuesta contralateral. En primer lugar, el daño debe ser de una magnitud mínima antes de desencadenar una reacción en la región contralateral. En segundo lugar, el efecto contralateral debe ser topográficamente preciso. En tercer lugar, la respuesta contralateral es específica del estímulo, es decir, si la lesión provoca una respuesta inflamatoria en la zona dañada, la respuesta contralateral también es inflamatoria.

En cuarto lugar, la respuesta contralateral es una sombra de la lesión original, tanto en términos de tiempo como de magnitud. Como discutimos más adelante, todos los efectos contralaterales reportados en el SNC cumplen con estas propiedades.

I.1.10. EFECTO CONTRALATERAL DESPUÉS DE AXOTOMIA DEL NO

Durante años se ha sabido que las lesiones unilaterales del NO inducen una respuesta bilateral que provoca una respuesta inflamatoria y microglial en las retinas contralaterales a la lesión (*Bodeutsch y cols., 1999*). Aun así, en numerosos estudios han utilizado el ojo contralateral a la lesión como control.

En estos últimos años, se ha corroborado esta observación y se ha ampliado el conocimiento de la respuesta bilateral en diferentes modelos animales y en humanos (*Panagis y cols., 2005; Sánchez-Migallón y cols., 2018; Cen y cols., 2015; Kanamori y cols., 2005; Ramirez y cols., 2015; Sanchez-Migallon y cols., 2018*).

En la enfermedad humana, los ojos contralaterales muestran lesiones tanto en la coroides como en el EPR (*Kaplan y cols., 1986*). La punción e inserción de un hilo de hierro en un ojo en retinas causo en ambos ojos una degeneración del EPR con macrófagos e infiltración de células T; en comparación con los ojos dañados, los ojos contralaterales a la lesión tenían más macrófagos y menos linfocitos.

En ratones, después del ApNO, hay una fuerte reacción de CMs en la retina contralateral (no lesionada) que es constante, dispersa e independiente de la tasa de supervivencia de CGRs en la retina axotomizada (*Galindo-Romero y cols., 2013a*).

También se ha observado en la hipertensión ocular unilateral o la axotomía del NO (ApNO o SNO) macrogliosis, activación microglial, división y fagocitosis, regulación positiva del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII) y expresión aberrante de la subunidad H del neurofilamento axonal altamente fosforilada. (*Bodeutsch y cols., 1999; Panagis y cols., 2005; Kanamori y cols., 2005; Lonngren y cols., 2006; Cen y cols., 2015; Ramirez y cols., 2015; Sanchez-Migallon y cols., 2018*) en la retina no lesionada. En ratas albinas, (*Macharadze y cols., 2009*) observaron, además de la activación microglial, que había pérdida de CGRs ipsilaterales en la retina no lesionada, pérdida que fue controlada con dexametasona. Se ha demostrado que en la retina contralateral al ApNO hay una pérdida del 15% de CGRs, que depende de la distancia del NO donde se realizó la axotomía y que es rescatada con tratamiento (*Lucas-Ruiz y cols., 2019*). Es importante destacar que esta respuesta bilateral a un estímulo unilateral no se produce solo después de estímulos nocivos, sino también después de tratamientos aparentemente inocuos, como la administración tópica de brimonidina que provoca la regulación positiva de los factores de crecimiento en ambas retinas (*Lonngren y cols., 2006*).

Así, que una axotomía unilateral del NO desencadena una respuesta bilateral que mata las CGRs en la retina no lesionada, una muerte que se controla con tratamientos antiinflamatorios y antimicrogliales (*Lucas-Ruiz y cols., 2019*) y una reacción inflamatoria con activación de macro y microglía. Por lo tanto, las retinas contralaterales no deben usarse como controles.

I.1.11. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE RETINA

Los cultivos organotípicos de retina (CORs) se desarrollaron por primera vez en la década de los 30 (Tansley, 1933) y es una técnica que permite cultivar la retina *in vitro* con un tiempo limitado con mantenimiento de arquitectura e interacciones celulares del tejido. Esto lo convierte en un reemplazo deseable para las exploraciones experimentales de células disociadas “*in vitro*” es decir, cultivos celulares. En general, se usan dos tipos de CORs: el cultivo de neuroretina (Taylor y cols., 2013) o el cultivo de retina intacto con la neuroretina adherida a la capa del epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Pinzón-Duarte y cols., 2000).

In vitro, algunos estudios han demostrado que los cultivos prolongados no muestran viabilidad de más de 15 días (Pinzon-Duarte y cols., 2000) y la retina se adelgaza con una apariencia oblicua y rosácea (Ogilvie y cols., 1999).

La degeneración neuronal se inicia a 2 o 3 días después de la disección con una pérdida significativa de fotorreceptores, seguidas de pérdida de neuronas y de CGRs.

El cultivo organotípico de neuroretina de donantes adultos es un modelo *in vitro* de degeneración inducida por la lesión del NO (Niyadurupola y cols., 2011) o del desprendimiento de retina (Kung y cols., 2017; Taylor y cols., 2013). Este es el cultivo que usaremos en adelante para nuestro estudio.

Las principales ventajas de utilizar COR serían:

- I) Menos sufrimiento y dolor para los animales de experimentación (Valdés y cols., 2016).
- II) Menos animales sacrificados porque se pueden usar las dos retinas de cada animal y además y cada retina se puede dividir en 2 partes (Taylor y cols., 2017).
- III) Candidato ideal para pruebas farmacológicas y toxicológicas. Los medicamentos que se analizaran podrían agregarse directamente al medio de cultivo en concentraciones conocidas (Miguel N.C y cols., 2012; El Zaoui y cols., 2015).
- IV) Es un sistema inherente de axotomía y de desprendimiento de retina (Taylor y cols., 2013; Kung y cols., 2017).
- V) Permiten experimentar con retinas humanas procedentes de donantes, lo que no es posible de otro modo.
- VI) Dado que en las CORs mueren tanto las CGRs como los fotorreceptores, son un modelo muy bueno para estudiar la interacción entre ambas degeneraciones como la que se observa en modelos *in vivo* de isquemia-reperfusión (Palmhof y cols., 2019).

Las principales desventajas de utilizar CORs serían:

- I) Los CORs no son un modelo muy preciso para probar terapias neuroprotectoras específicas para las CGRs, porque en los CORs hay otros factores que pueden alterar los resultados, principalmente la muerte concomitante de otras neuronas, y la diferente activación glial que ocurre cuando los fotorreceptores y las CGRs están afectados.
- II) En los CORs e independientemente de la población neuronal que se estudie, se pierde la contribución sistémica lo que puede alterar la eficacia de la misma terapia cuando se prueba *in vivo*.
- III) Los estudios son a corto plazo, y a largo plazo los estudios habría que hacerlos *in vivo*.

II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.2. HIPÓTESIS

Nuestra primera hipótesis es que tras ApNO, en la retina lesionada habría un aumento de la microglía total y de la microglía M2, reflejando el curso de muerte rápido de las CGRs. De igual forma, en la retina contralateral a la lesión sucederá lo mismo, aunque de una forma más moderada. Nuestra segunda hipótesis es que la muerte de CGRs y la respuesta glial sería diferente entre los CORs y las retinas axotomizadas.

II.2.1. OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de este estudio son:

- 1) Estudiar la respuesta glial en retinas axotomizadas y contralaterales a la lesión.
- 2) Estudiar y comparar el curso de muerte de CGRs y la repuesta glial en CORs y en retinas axotomizadas
- 3) Analizar y comparar cuantitativamente la morfología de las CMs en retinas intactas, axotomizadas, contralaterales a la lesión y en CORs.

II.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para llevar a cabo cada uno de los objetivos anteriores, llevamos a cabo los siguientes objetivos específicos:

- I) **Estudiar la respuesta glial en retinas axotomizadas y contralaterales a la lesión.**
 - ❖ Caracterización de los dos estados de las CMs en retinas intactas de ratón.
 - ❖ Caracterización de los fenotipos de microglía tras ApNO en retinas lesionadas y contralaterales a la lesión montadas a plano a diferentes tiempos.
 - ❖ Caracterización de los fenotipos de microglía tras ApNO en retinas lesionadas y contralaterales a la lesión en secciones transversales de retina a diferentes tiempos.
- II) **Estudiar la muerte de CGRs y la repuesta glial en CORs, así como hacer una comparación con retinas axotomizadas.**
 - ❖ Analizar el curso de muerte de las CGRs en CORs y en retinas axotomizadas.
 - ❖ Evaluar la activación microglial en CORs y compararlo con retinas axotomizadas.
 - ❖ Evaluar la activación macroglial en CORs y compararlo con retinas axotomizadas.

III) Analizar la morfología de las CMs cuantitativamente en retinas intactas, axotomizadas, contralaterales a la lesión y en los CORs.

Para ello se realizaron los siguientes análisis:

- Longitud total
- Número de procesos
- Volumen
- Tamaño del soma
- Área y perímetro
- Circularidad del soma
- Análisis sholl

III.MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA

III.2. APLASTAMIENTO DEL NERVIO ÓPTICO

III.3. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA

III.4. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.

III.5. PROCESADO HISTOLÓGICO

III.6. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

III.7. ANTICUERPOS

III.8. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

III.9. PROCESAMIENTO DE IMAGEN DIGITAL DE DOMINIO PÚBLICO

III.10. PROCESADO DE IMÁGENES

III.11. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL. MAPAS TOPOGRÁFICOS

III.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA

Para la realización de los experimentos que conforman esta tesis se utilizaron un total de 42 ratones adultos pigmentados machos de la cepa C57BL/6 y 32 ratones hembra de la cepa C57BL/6 con un peso entre 25-35 gr (machos) y 17-24 gr (hembras) y de edades comprendidas entre las 8 y 12 semanas de edad (**Figura 19**).

Para el objetivo número 1 se realizaron 7 grupos de 6 animales, con un total de 42 ratones. Para el objetivo número 2 se realizaron 6 grupos de 4 animales, con un total de 32 animales. Para el objetivo número 3 se utilizaron los mismos animales que en el objetivo 1 y 2. Para las retinas intactas, se utilizaron un total de 6 animales. Todo esto viene detallado en el diseño experimental de cada objetivo que se incluye y se explica en resultados.



Figura 19: Ratón adulto de 2 meses de edad, de la cepa C57BL/6. Ilustración tomada de: <https://www.criver.com/>.

Los animales procedían de Charles River (Wilmington, Massachusetts, Estados Unidos), o de la colonia de cría de la Universidad de Murcia (Murcia, España). Los ratones se mantuvieron en jaulas con una dieta estándar, en habitaciones con control de temperatura (20-22°C) y bajo periodos de 12 horas de luz/oscuridad en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Murcia (CEIB).

Los animales fueron tratados según la normativa europea (Directiva 86/609/CEE) y nacional (R1201/2005) sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Igualmente se siguieron las directrices sobre el uso de animales en experimentación oftálmica y del sistema visual de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) y siguiendo los procedimientos adecuados por la CARM y el comité de experimentación animal (CEEA) de la U.M (A1320140704). Así mismo, cuento con la acreditación de manejo de animales categoría B y C, según la normativa vigente (2021RCI0046).

Para todas las manipulaciones y procedimientos experimentales que implicaban dolor, sufrimiento o lesión, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla de Ketamina (70mg/kg de peso corporal Ketolar®, Pfizer, Alcobendas, Madrid, España), Xilacina (10 mg/kg de peso corporal, Rompun®, Bayer, Kiel, Alemania) y buprenorfina diluida 1:20 en suero salino (Buprex®, Schering-Plough SA, San Agustín de Guadalix, Madrid, España), dependiendo del peso del animal como se representa en la tabla (**Tabla 1**).

Las manipulaciones microquirúrgicas se efectuaron con la ayuda de un microscopio quirúrgico OPMI-11-FC (Carl Zeiss, S.A.) instalado sobre una columna S-21 (Carl Zeiss, S.A.) y con el instrumental de microcirugía apropiado.

Inmediatamente después de la cirugía, se les aplicó a los animales en la córnea un ungüento oftalmológico con tobramicina (Tobrex®, Alcon-Cusí, S.A., El Masnou, Barcelona, España) para prevenir la desecación corneal y la infección. Los animales fueron devueltos a su jaula y colocados bajo una fuente de luz emisora de calor hasta su recuperación de la anestesia y posteriormente fueron devueltos a sus habitáculos, donde permanecieron hasta su sacrificio.

Peso (g)	Ketamina 5% (ml)	Xilacina 2% (ml)	Buprenorfina 5% (ml)
15	0,021	0,008	0,051
20	0,028	0,010	0,064
25	0,035	0,013	0,080
30	0,042	0,015	0,096
35	0,049	0,018	0,112
40	0,056	0,020	0,128

Tabla 1: Anestesia y Analgesia.

III.2. APLASTAMIENTO DEL NERVIÓ ÓPTICO

El NO izquierdo se aplastó (ApNO) a 0,5 mm de su origen en el disco óptico, según las técnicas descritas anteriormente (Vidal-Sanz y cols., 1987; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla-Reverter y cols., 2009a; Galindo-Romero y cols., 2013a, Sánchez-Migallón y cols., 2016, 2018). Brevemente, se rasura la cabeza del animal y se realiza una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo. Se abate la piel de la parte izquierda del rostro y se ejecuta una incisión sobre el reborde superior de la órbita ocular. Posteriormente, se secciona la musculatura del recto superior y del recto externo, y se tracciona el globo ocular para visualizar el NO. Una vez expuesta la región supero-posterior del ojo izquierdo (OI) del ratón, se procede a la apertura de las cubiertas durales del NO y a su aislamiento en sí, seguidamente se aplasta con una pequeña pinza angulada durante 10 segundos (Figura 20). Finalmente, se vuelve a suturar la piel del animal con seda quirúrgica de grosor 4/0, se aplica un ungüento sobre las corneas de ambos ojos y se comprueba que la integridad de la vasculatura de la retina sea funcional mediante funduscopia directa del fondo de ojo a través del microscopio quirúrgico.

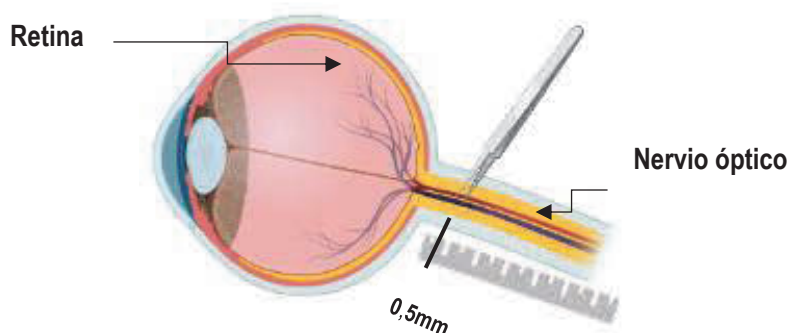


Figura 20: Esquema representativo del aplastamiento del NO.

El aplastamiento se hizo a 0,5 mm desde la cabeza del NO durante 5 segundos. Ilustración realizada en: www.biorender.com.

III.3. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

De acuerdo con técnicas previamente establecidas (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988) y estandarizadas en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, el OHSt se aplicó en ambos CS (Figura 21). El procedimiento para la realización de este marcaje implica la rasuración de la parte dorsal de la cabeza del animal, realizando una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo, para exponer el cráneo del animal.

Tras una craneotomía parietal bilateral con ayuda de una fresadora (Free-Wheeler, Cordless Moto-tool, Model 850; Dremel), se reseca con ayuda de una micropipeta conectada a un sistema de aspirado (Ordisi S.A., L'Hospitalet, Barcelona, España) la porción de encéfalo e hipocampo necesario para exponer bilateralmente la parte posterior del tálamo y ambos CS.

En el ratón no es necesario retirar la piamadre que recubre los CS, simplemente se exponen los CS. Una vez expuestos ambos CS, se aplica una pequeña porción de esponja de fibrina (Spongostan® Film; Ferrosan, Dinamarca) previamente empapada en OHSt diluido al 10%, en una disolución de 10% dimetilsulfóxido (DMSO) en suero salino (**Figura 21**).

Finalmente, se tapa la superficie del CS con esponja de fibrina y se sutura la piel del animal con seda de 4/0 (Lorca Marín S.A., Murcia, España).



Figura 21: Esquema del trazado retrógrado de las CGRs aplicando el trazador en el CS.

El trazador con OHSt se aplicó en ambos CS para marcar todas las CGRs que proyectan a éstos.

El tiempo que tarda el trazador en llegar a las CGRs desde el día de su aplicación en los CS es de 5-7 días, tanto en rata como en ratón (*Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Galindo-Romero y cols., 2013; Nadal-Nicolas y cols., 2015a*). Por ello, en este experimento se realizó primero el trazado con OHSt. A los 7 días se realizó ApNO y se diseccionaron retinas para CORs [ver capítulo IV. Resultados (diseño experimental)].

II.4. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA

Todos los CORs se llevaron a cabo en la sección de cultivos del servicio de apoyo a las ciencias experimentales (SACE) del LAIB (UMU/ IMIB Arrixaca), y se realizaron en campana de flujo y en condiciones de esterilidad.

En primer lugar, se prepara el medio de cultivo básico (**Tabla 2**), seguidamente se coge una placa multipocillos (24 pocillos) y se añaden 10-14 ml de H₂O estéril entre los pocillos para evitar la deshidratación de las retinas. Luego se añaden 300 µl del medio de cultivo básico (**Tabla 2**) a los 8 pocillos centrales para evitar la descompensación de temperatura y humedad entre pocillos, y se deja en la incubadora a 37°C con 5% CO₂ durante 24 horas antes de la disección. Pasado este periodo de tiempo, se prepara el medio de cultivo completo (**Tabla 3**) a partir del medio básico y se guarda en la incubadora a 37°C con 5% CO₂ durante 2h.

Transcurrido ese periodo de tiempo, se comienza con la realización del procedimiento de obtención de CORs. En primer lugar, se sacrifica al animal mediante exposición a CO₂ y se procede a la enucleación oftálmica. Seguidamente, se enjuagan los ojos en EtOH y se pasa al medio de cultivo básico. Después se limpia el ojo de tejido muscular y de glándulas. Luego se hace un corte en la córnea con el bisturí apoyando el ojo con las pinzas de 90°, se corta la córnea a 1-1'5 mm del limbus y paralelo a este y se retira el cristalino. Se identifica un lugar en el que esté separada la retina de la esclera y se coge ese punto con unas pinzas Dumont #5 y se insertan las pinzas Dumont #5 curvas para ir despegando la retina de la esclera.

Una vez que se tienen separadas 3 cuartas partes de la retina, se invierte la esclera para que salga la retina y se despega el resto de retina. Una vez llegado a este punto, se cogen las pinzas Dumont #5 y se mantiene sujeta la esclera en la placa Petri mientras que con las pinzas Dumont #5 curvas se van retirando el CC y el vítreo. Inmediatamente se procede a cortar el NO con las tijeras. Finalmente se corta la retina por la mitad.

A continuación, se corta el extremo de una punta p1000 para absorber la retina sin que sufra daño y se transporta al inserto. Se quita el medio de disección y se estira la retina con un pincel húmedo sobre el inserto con la cara de fotorreceptores pegada a la membrana del inserto "Cell Culture Insert 0,4µl 12mm diámetro" (Millipore, Darmstadt, Alemania). Una vez colocada la retina, se colocan los insertos dentro de los pocillos con medio de cultivo básico (**Tabla 2**) y se mantiene la placa a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 horas tras la disección. Posteriormente se cambia por medio de cultivo completo (**tabla 3**). Este último paso, se repite cada 24h hasta la fijación de los CORs (**ver apartado 5.5**).

MEDIO DE CULTIVO BÁSICO		
	Concentración	Volumen (hasta 50 ml)
Medio Basal Modificado (DMEM)	-	49 ml
Penicilina /Estreptomicina	100 units/ml penicilina 100 µg/ml estreptomicina	0.5 ml
L-Glutamina	200mM	0.5ml

Tabla 2: Composición del medio de cultivo básico de los CORs.

MEDIO DE CULTIVO COMPLETO		
	%	Volumen (hasta 50 ml)
Medio Básico	50%	25 ml
Suero fetal bovino (SFB)	25%	12.5 ml
Solución salina balanceada de Hank sin Ca ²⁺ ni Mg ²⁺ (HBSS)	25%	12.5 ml

Tabla 3: Composición del medio de cultivo completo de los CORs.

III.5. PROCESADO HISTOLÓGICO

III.5.1. SACRIFICIO, PERFUSIÓN Y FIJACIÓN DEL ANIMAL

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis i.p. de Pentobarbital sódico al 20% (Dolethal Vetoquinol®; Especialidades Veterinarias SA; Alcobendas; Madrid, España). Una vez el animal ya no respondía a estímulos dolorosos ni presentaba reflejos, pero aún mantenía el latido cardiaco, se procedía a la perfusión intracardiaca.

En primer lugar, se corta la piel desde el apéndice xifoides hacia los hombros. Seguidamente se secciona el diafragma y posteriormente el músculo y las costillas desde la de línea esternal media hacia las clavículas, con cuidado de no cortar los pulmones. Después se levanta y clampa el peto costal dejando al descubierto el tórax. Posteriormente, se secciona la aurícula derecha dejando que la sangre salga durante unos segundos. Con una aguja de 20G en el ventrículo izquierdo se inyecta un volumen entre 30-40 ml de suero salino al 0,9% para eliminar la sangre presente en los vasos y órganos y seguidamente, se inyecta por esta aguja un volumen de entre 50-60 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en 0,1 M de tampón fosfato salino (PBS).

III.5.2. ENUCLEACIÓN DEL GLOBO OCULAR

Para saber la correcta orientación de la retina, se procede a realizar un punto de sutura en el párpado superior de cada ojo. Cada ojo tiene un punto de sutura diferente para así poder identificarlo más adelante, así el ojo derecho (OD) se hace una sutura igual de larga en ambos lados y en el OI una sutura con un lado un lado más largo que otro.

Para la enucleación de los ojos se realiza una incisión en la zona nasal y temporal de la ceja, luego se secciona rodeando el ojo el tejido que rodea y sujeta el globo ocular a la órbita ósea. Finalmente, se tracciona el globo ocular hacia delante y se realiza un corte del NO.

El globo ocular se postfija durante una hora en PFA al 4%. Posteriormente, se lava con PBS 0,1M y se deja en este a 4°C hasta su posterior manipulación para montajes globales de retina o preparación del globo ocular para secciones.

III.5.3. RETINAS A PLANO

Para la disección y montaje global de la retina a plano, se comienza retirando el tejido que rodea el ojo, luego, se realiza una incisión en el limbo esclero-corneal y se retira la córnea. Seguidamente se extraen las estructuras del polo anterior del ojo: iris y cristalino, obteniendo la copa óptica donde se aprecia la retina. Se realizan cuatro cortes transversales de la copa óptica desde el limbo esclero-corneal hasta cerca del disco óptico. Estos cortes radiales se practican en los polos inferior, nasal, temporal y superior del ojo, siendo el corte realizado en el polo superior el más profundo y próximo al disco óptico para permitir orientar las retinas correctamente más adelante.

Una vez realizados los cuatro cortes transversales, se extrajeron las retinas separándolas de la coroides, la esclerótica y el CC con la ayuda de unas pinzas. Una vez separada de la coroides, la retina queda sujeta al resto de la copa óptica por el NO, así que se procede a cortarlo con unas tijeras.

Las retinas inmediatamente eran puestas a plano con la cara vítrea hacia arriba en un portaobjetos microscópico y se procede a la eliminación de los restos de vítreo adheridos a la retina con dos pinceles con mucho cuidado de no dañarla. Una vez limpia, la retina se coloca sobre un papel de filtro Whatman nº 1 (Whatman, Internacional Ltd. Maidstone, Reino Unido) al que queda adherida por su superficie vítrea y se postfija en PFA al 4% en PBS 0,1M durante 1 hora a 4°C. Por último, se mantienen en PBS 0,1M a 4°C hasta realizar la inmunohistofluorescencia.

III.5.4. PROCESADO HISTOLÓGICO DE LA RETINA PARA SECCIONES TRANSVERSALES

Para realizar secciones transversales de retina, una vez extraído el ojo, se procede en primer lugar a la limpieza integral de los tejidos que rodean al ojo. Después se realiza una incisión en el limbo esclero-corneal y se retira la córnea. Seguidamente se extraen las estructuras del polo anterior del ojo: iris y cristalino, obteniendo la copa óptica. A continuación, se coge la copa óptica obtenida y se postfija durante 1 hora en PFA 4%. La copa óptica se lava con PBS 0,1M y se crioprotege mediante inmersión en soluciones secuencialmente crecientes de sacarosa (Panreac Química S.A., Barcelona, España) al 15% y 30% en PBS 0,1M durante 24 horas en cada solución.

Después, el ojo se incluye en un medio de montaje para su congelación (Tissue-Tek®, OCT; Sakura, Finetek, Torrance, CA, EE. UU.) orientadas correctamente.

Se congelan rápidamente en isopentano (2-metilbutano, Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España) a -80°C. Posteriormente, se realizan las secciones sagitales de 14µm de grosor usando un criostato (Leica, Jung CM3000, Alemania). Las secciones se recogen en portaobjetos especialmente pretratados para este fin (SuperFrost®Plus, VWR International, Eurolabs SL, Barcelona, España), y finalmente se guardan a -20°C hasta su posterior análisis e inmunodetección.

III.5.5. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE RETINA

En primer lugar, se añaden 400 µl de PFA 4% en una placa 24 pocillos. Se trasladan los insertos con los explantes de retinas a la placa con los pocillos que contienen el PFA 4%. Lentamente se añade 400 µl de PFA 4% dentro del inserto, ya que si se hace rápidamente pueden despegarse los explantes de la membrana. Después, se guardan a 4°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se retira el PFA y el inserto con la retina se traspa a una placa nueva que contiene PBS. Por último, se añaden 400 µl de PBS dentro del inserto. A partir de este punto se pueden guardar 3 días como máximo a 4°C antes de realizar la inmunodetección.

III.6. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

III.6.1 INMUNOHISTOFLUORESCENCIA DE RETINA MONTADAS A PLANO

-Permeabilización: las retinas se incuban en agitación durante lavados consecutivos en PBS Tritón® X-100 0.5% (3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente), posteriormente se congelan a -80°C durante 15 minutos en este mismo tampón y tras la descongelación se vuelven a lavar 3 veces también en el mismo tampón.

-Incubación con el/los anticuerpo/s primario/s: Las retinas se incuban con el/los anticuerpo/s específicos de antígeno correspondiente/s en una solución de bloqueo que contiene suero del animal en el que está hecho el anticuerpo secundario, bien suero normal de burro (Normal Donkey Serum, **NDS**, Jackson Inmuno Research Inc., Cambridge, Reino Unido) o suero normal de cabra (Normal Goat Serum **NGS**, Jackson Inmuno Research Inc, Cambridge, Reino Unido) diluido al 2% en Tritón® X-100 al 2% en PBS para el bloqueo de las uniones inespecíficas. Se incuban a una temperatura de 4°C durante toda la noche en el frigorífico. Al día siguiente, se lavan las retinas en PBS-Tritón® X-100 0,5% (3x10 min. a temperatura ambiente).

-Incubación con el/los anticuerpos/s secundario/s: Los anticuerpos secundarios están unidos a distintos fluoróforos que emiten fluorescencia a distinta longitud de onda. Los anticuerpos se diluyen en Tritón® X-100 al 2% en PBS y las retinas se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Tras acabar la incubación, se lavan las retinas en PBS-Tritón® X-100 0,5% 3 veces a temperatura ambiente y posteriormente un último lavado en PBS.

La retina se monta sobre un portaobjetos, colocando su cara vítrea hacia arriba, con un medio de montaje, (glicerol al 50% y p- fenilendiamina al 0,04% en tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9,0; (*Dodd y cols., 1984*), y se tapa con un cubreobjetos, que se sella con esmalte de uñas.

III.6.2. INMUNOHISTOFUORESCENCIA EN SECCIONES TRANSVERSALES DE RETINA

-**Permeabilización:** Previa a la permeabilización se procede al atemperado de los portas que contienen las secciones y a la eliminación del Tissue-tek® adherido a las secciones y al porta mediante un lavado con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el tejido se permeabiliza con 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tritón® X-100 0,1% a temperatura ambiente.

-**Incubación con el/los anticuerpo/s primario/s:** Se realiza la incubación de las secciones con el anticuerpo o anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo con NDS o NGS en PBS-Tritón® X-100 0,5% durante toda la noche a 4°C.

Para evitar la evaporación de la solución durante el periodo de incubación, tras la aplicación del anticuerpo, el porta con las secciones se cubre con una capa de plástico elástico (Parafilm®, Bemis Company Inc., Neenah, Wisconsin, EE.UU.). Al día siguiente, se lavan las retinas 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente en PBS-Tritón® X-100 0,1%.

- **Incubación con el/los anticuerpo/s secundario/s:** Se incuban las secciones con el anticuerpo o los anticuerpos secundarios en PBS-Tritón® X-100 0,5% durante 2 horas, cubriendo el porta con las secciones con el Parafilm®. Tras la incubación, se lavan las retinas con PBS-Tritón® X-100 0,1%. Se realizan 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente y por último un lavado con PBS para retirar los restos de detergente que puedan quedar.

Finalmente, se montaron con medio de montaje para la fluorescencia que contiene DAPI (Vectashied®, Laboratorios Vector, Inc., Burlingame, CA, EE. UU.) (**ver apartado 7.3**) y se tapa con un cubreobjetos, que se sella con esmalte de uñas.

III.6.3. TINCIÓN DE LOS NÚCLEOS CON DAPI

Para teñir los núcleos presentes en la retina se utiliza como marcaje el 4',6-diamidino-2-fenilindol (**DAPI**), que se intercala en la doble cadena de ADN tiñendo los núcleos de todas las células. El máximo de absorción es una longitud de onda de 358 nm (**ultravioleta**) y su máximo de emisión es 461 nm (**azul**).

Después de la inmunodetección, las secciones transversales (**Figura 22**) se montaron con medio de montaje para la fluorescencia que contiene DAPI (Vectashied®, Laboratorios Vector, Inc., Burlingame, CA, EE. UU.)

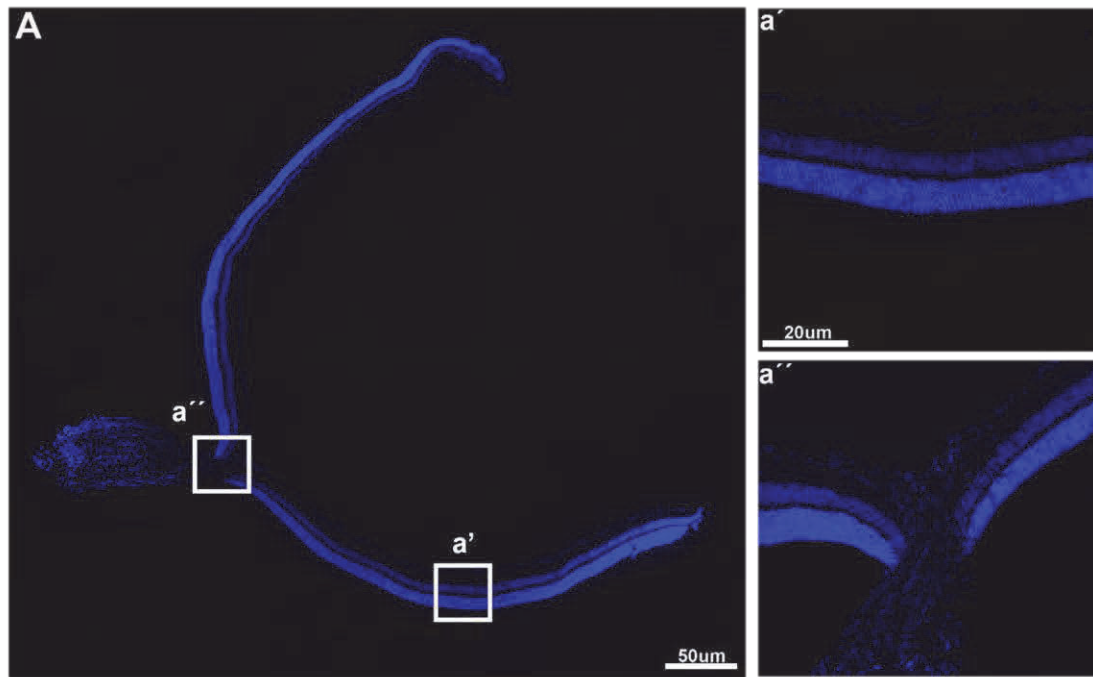


Figura 22: Fotomontaje de una sección transversal de retina de ratón teñida con DAPI. **A:** fotomontaje. **a':** magnificación de la sección transversal del fotomontaje. **a'':** magnificación de la cabeza del NO. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

III.6.4. INMUNOHISTOFLORESCENCIA DE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA

Los explantes deben estar dentro de un pocillo de una placa de 24 multipocillos en suspensión.

-Permeabilización: Se comienza retirando el PBS de los pocillos y se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tritón® X-100 0,1% a temperatura ambiente. Seguidamente se añade la solución de bloqueo (PBS-Tritón® X-100 0,2% y NDS y/o NGS al 5%) y se mantiene en agitación suave durante 1h y 30 min a temperatura ambiente.

-Incubación con el/los anticuerpo/s primario/s: Se realiza la incubación de los cultivos con el anticuerpo o los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo (NDS o NGS en PBS-Tritón® X-100 0,2%) a 4°C durante 24 horas en agitación suave. Tras la incubación se realizan 6 lavados de 10 minutos de duración en agitación suave en PBS-Tritón® X-100 0,1%.

-Incubación con el/los anticuerpo/s secundario/s: Seguidamente, se incuban los cultivos con el/los anticuerpo/s secundario/s en PBS-Tritón® X-100 0,2% durante 2 horas y agitación suave. Tras la incubación se realizan 6 lavados de 10 minutos con PBS-Tritón® X-100 0,1% a temperatura ambiente y agitación suave. Los cultivos se montan sobre un portaobjetos, colocando su cara vítrea hacia arriba, con el medio de montaje, y se tapa con un cubreobjetos, que se sella con esmalte de uñas.

III.7. ANTICUERPOS PRIMARIOS

Los anticuerpos, diluciones y casas comerciales que se utilizaron para la inmunodetección de las diferentes poblaciones celulares, se muestran en las **Tablas 4 y 5**.

IDENTIFICACIÓN	ANTÍGENO	ANTICUEPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN PRIMARIO
CMs	Iba-1	Conejo α Iba-1	ab178846, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:500
CMs M2	CD206	Cabra α CD206	Biotechne_AF2535	1:1200
CMs activadas	CD68	Rata α CD68	Ab53444, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:750
Astrocitos	GFAP	Conejo α GFAP	G9269 Sigma-Aldrich	1:500
		Cabra α GFAP	Ab53554, Abcam, Cambridge, Reino Unido	
Células de Müller	Vimentina	Cabra α GFAP	sc-7557, Santa Cruz Biotechnology, INC, Heidelberg, Alemania	1:250
CGRs	Brn3a	Ratón IgG1 α Brn3a	MAB1585, Milipore, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos	1/300
	Rbpms	Conejo α RBPMS	GTX118619, Genetex, Irvine, California, Estados Unidos	1:750
	BIII tubulina	Conejo α BIII tubulina	Rabbit anti-BIII, T2200-200 ul	1:1000
	Gamma sinucleína	Ratón α Gamma sinucleína	mAb mouse anti-SNCG (21-127) H00006623-M01	1:1000

Tabla 4: Relación de los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo.

III.7.1. ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Para detectar los anticuerpos primarios, se utilizaron anticuerpos hechos en burro y cabra conjugados a su vez con distintos fluoróforos: Alexa Fluor 488®, Alexa Fluor 594®, Alexa Fluor 555® y Alexa Fluor 647®, que, tras ser excitados por una longitud de onda concreta, emiten fluorescencia verde, roja y rojo lejano respectivamente, como se muestra en la **tabla 5**.

Anticuerpo Secundario	Casa Comercial	Dilución Secundario
Burro α Conejo, Alexa Fluor 488® o 647®	Molecular Probes, Thermo Fisher, Madrid, España	1:500
Burro α Cabra, Alexa Fluor 555®		
Burro α ratón, Alexa Fluor 594® o 555®		

Tabla 5: Relación de los anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.

III.8. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

III.8.1. MICROSCOPIA

III.8.1.1. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA LEICA DM6 B

Las retinas se examinarán y se fotografiarán en un microscopio óptico, equipado con un sistema de adquisición de imágenes digitales (Leica DM4 B, Alemania). El microscopio presenta cuatro láseres: láser de onda continua ultravioleta de 405 nm; láser multilínea de Argón de 458, 476, 488, y 514 nm; un láser amarillo DPSS de 561 nm; y un láser rojo HeNe de 633nm. Cuenta también con diferentes objetivos: 5x, 10x, 20x, 40x y 63x. Dicho equipo está controlado por el programa informático (Leica Application Suite X (LAS X), y por la cámara (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemania), que permite la captura de imágenes en "Z-Stack", y posteriormente su reconstrucción tridimensional.

III.8.1.2. MICROSCOPIO CONFOCAL LEICA TCS SP8

Para la captura de detalles con alta resolución y para la reconstrucción tridimensional de las imágenes en profundidad de retinas a plano y explantes, se adquirieron imágenes individuales con el microscopio confocal (Microscopio Confocal Leica TCS SP8, Alemania). El microscopio confocal está equipado cuatro láseres: láser de onda continua ultravioleta de 405 nm; láser multilínea de Argón de 458, 476, 488, y 514 nm; un láser amarillo DPSS de 561 nm; y un láser rojo HeNe de 633nm.

El equipo está controlado mediante el programa informático (Leica Application Suite X (LAS X), Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemania), que permite la captura de imágenes en “Z-Stack”, y la posterior reconstrucción tridimensional de tejido capturado, así como imágenes más limpias (**Figura 23**).

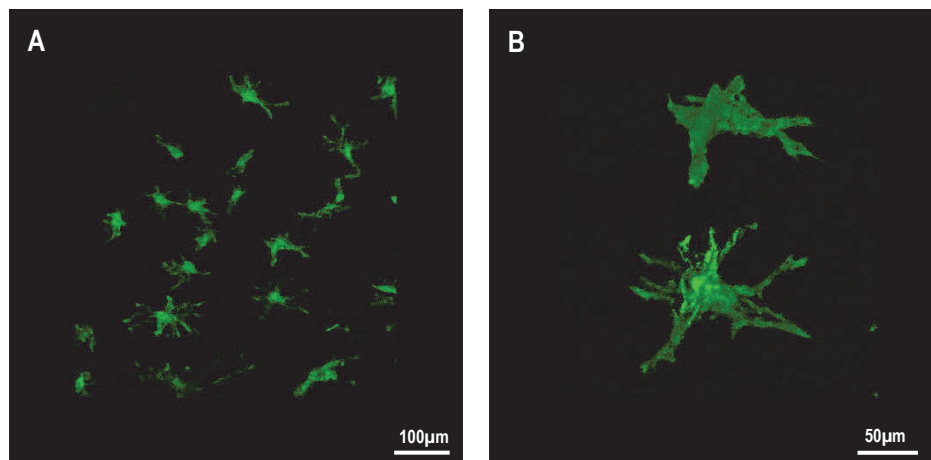


Figura 23: Ejemplo de magnificaciones de las CMs en CORs a 3 días mediante microscopia confocal. En esta figura se pueden observar CMs-*Iba1*⁺ con el filtro verde. (A). Magnificación a 20X. (B). Magnificación a 63X. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

III.8.2. FOTOMONTAJES

Para la reconstrucción y fotomontaje de las retinas a plano y secciones trasversales de retina (**Figuras 22 y 24 A**), se realiza la adquisición automática secuencial de campos microscópicos contiguos, sin uniones ni solapamientos entre campos con el microscopio Leica DM6B, siguiendo el patrón de muestreo de una matriz de celdas regulares con un área preestablecida que cubría la superficie de la retina, utilizando el objetivo de 20x. El tamaño del campo de captura fue de 0,24 mm². Cada microfotografía fue enfocada manualmente antes de ser capturada y almacenada digitalmente dentro del programa de análisis de imagen IPP. Todas las imágenes que componen una retina se guardan en un archivo como imágenes de color de 24 bit usando el módulo control del microscopio Scope-Pro® 5.0 for Windows® del programa IPP. Estas imágenes pueden ser combinadas automáticamente dentro de una sola imagen de alta resolución del fotomontaje de la retina para un posterior estudio de la imagen.

III.8.3. MAGNIFICACIONES EN DETALLE

Las imágenes en detalle se adquirieron bien con en el microscopio confocal Leica TCS SP8 (objetivos de 20x y 63x, **Figura 23**) o con el microscopio de fluorescencia Leica DM6B (objetivo de 20x, **Figura 24 B**).

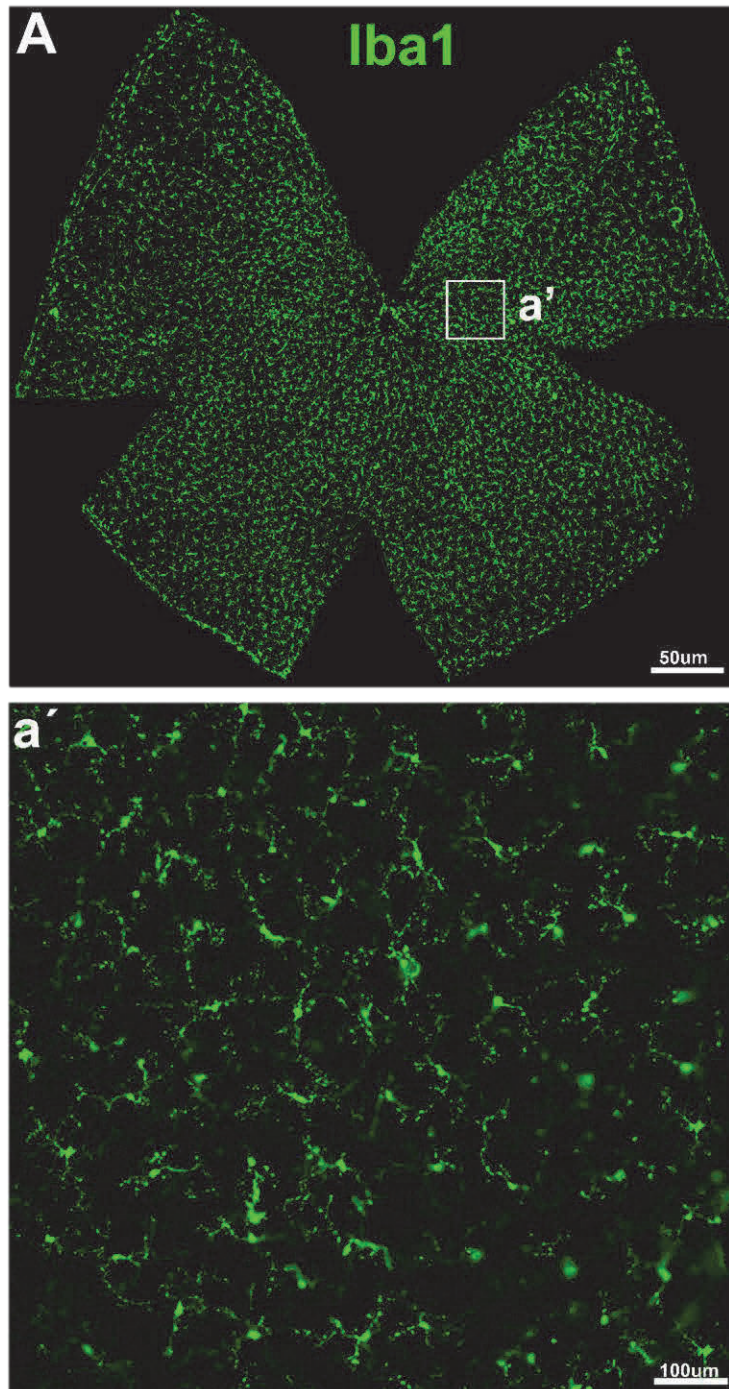


Figura 24: Reconstrucción fotográfica o fotomontaje de una retina de ratón intacta a partir de campos microscópicos individuales. A: Fotomontaje de retina montada a plano en la que se observan las CMs-Iba1⁺. El cuadro representa el campo microscópico (a'). *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

Para representar la colocalización de señales se fotografiaron las distintas señales de fluorescencia de manera secuencial y consecutiva, controlado por el programa LAS X (ver apartado III.9.2).

III.9. CUANTIFICACIÓN

III.9.1. CUANTIFICACIÓN MANUAL EN RETINAS A PLANO

Iba1⁺ y CD68⁺

La cuantificación manual de CGRs y CMs se realizó en 12 campos microscópicos, 3 por cuadrante y 4 por área/región de 0,24 mm² en cada cuadrante de la retina (centro, medio y periferia) (*Parrilla-Reverter y cols., 2009b*) (Figuras 25 y 26).

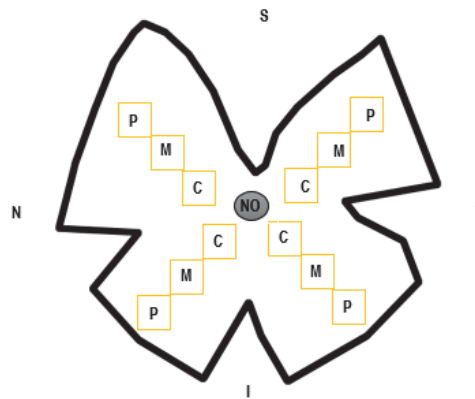


Figura 25. Representación esquemática del método de conteo manual del número de CMs en cada una de las tres regiones (centro, media y periferia).

En este dibujo se ilustra las muestras seleccionadas manualmente en cada fotomontaje para la cuantificación manual. Se tienen 4 fotografías por área {central (C), media (M) y periférica (P)}. En cada cuadrante se analizaron 3 fotografías equidistantes, tomando como referencia el NO. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior.

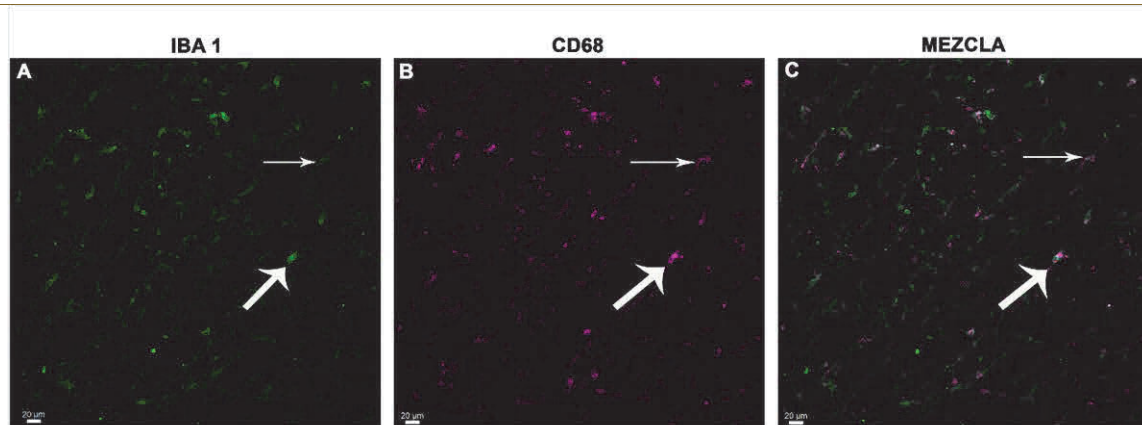


Figura 26. Representación de microfotografías de fotomontajes globales con el marcador Iba1 y el marcador CD68.

Se puede observar un campo microscópico individual adquirido con el filtro verde (A) para detectar las células microgliales Iba1⁺, con el filtro rojo lejano (B), se detectan las CMs que expresan CD68⁺ y finalmente una combinación de ambos (C). Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. Barra en A, B y C= 20 µm. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

B) CMs CD206⁺

Para cuantificar el número de células en la retina de ratón que expresan el fenotipo de microglía M2, se obtuvieron montajes globales de retina inmunodetectadas con el marcador CD206, y posteriormente se analizaron mediante el programa Adobe Photoshop. Se cuantificó el número total de CMs CD206⁺ en la retina entera, el NO, así como el CC (Figura 27).

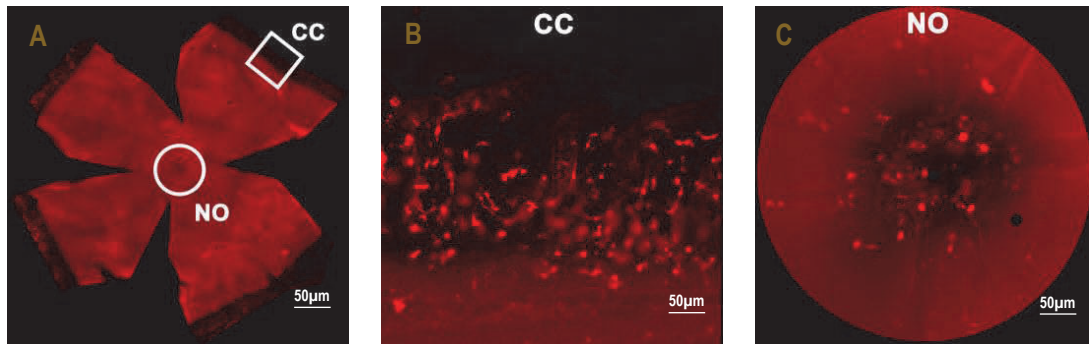


Figura 27. Representación de fotomontajes globales de retina (A), CC (B) y NO (C) con el marcador CD206. Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.

C) CGRs y Microglía

En las retinas montadas a plano trazadas con OHSt desde el CS, se procedió a la cuantificación manual de las CMs fagocíticas OHSt⁺ e Iba-1⁺, utilizando magnificaciones a detalle de la zona central y periferia de las retinas montadas a plano (Figura 28) y de los CORs. En retinas montadas a plano y en CORs, se cuantificó manualmente el número de CMs-OHSt-Iba1⁺ y de CGRs-Brn3a⁺ RBPMS⁺ utilizando magnificaciones a detalle de la zona central y periférica de la retina (Figura 29).

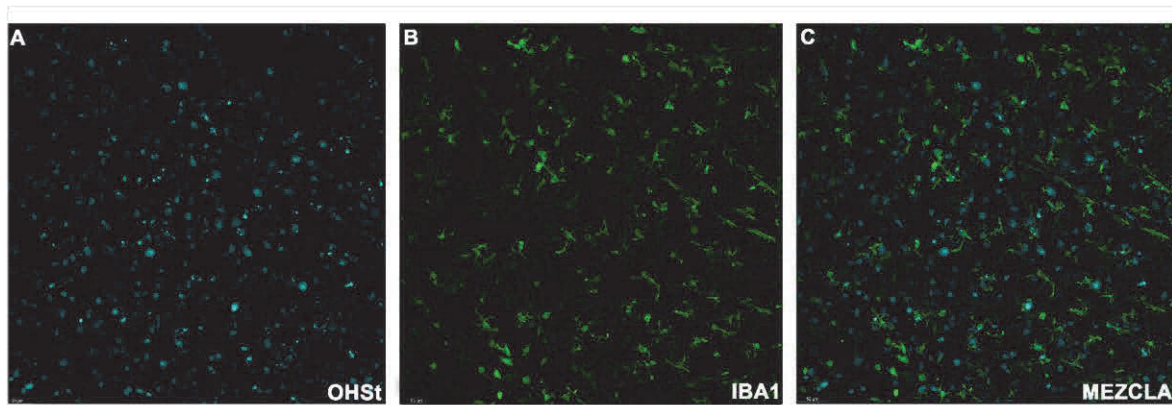
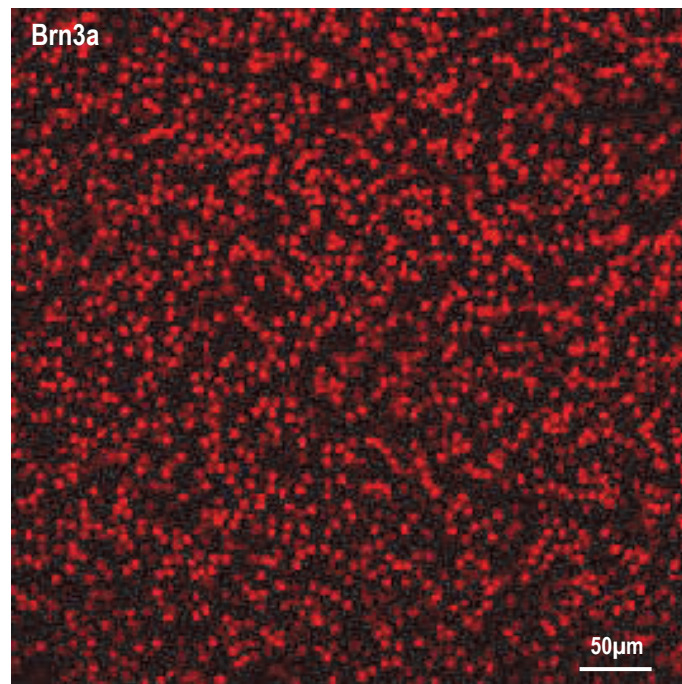


Figura 28. Representación de microfotografías a detalle de retinas trazadas con OHSt en retinas montadas a plano y su colocalización con Iba1.

Se puede observar el trazador OHSt en A y el marcador Iba1 en B. La superposición de ambos marcadores en C. Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. Barra en A, B, C= 50 μm. Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.

A



B

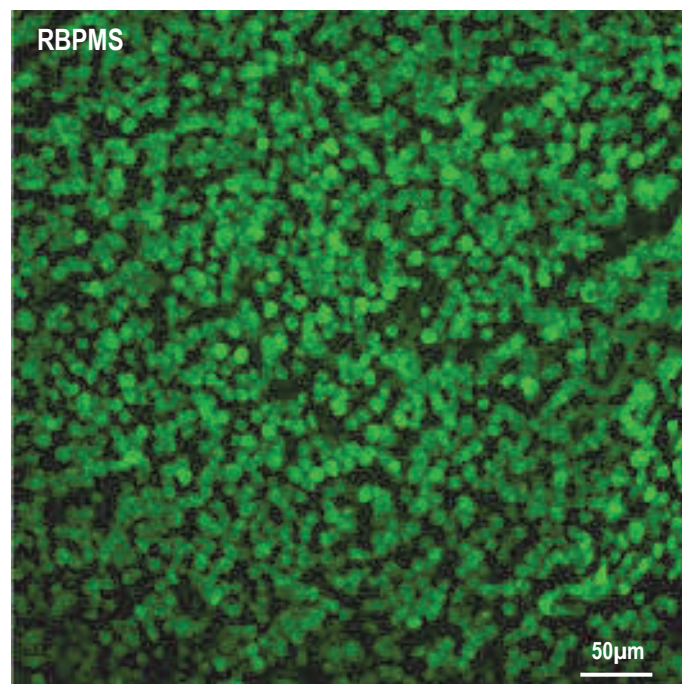


Figura 29. Representación del marcaje de **Brn3a** y **RBPMS** en secciones transversales al ApNO.

Se puede observar **Brn3a** en A y **RBPMS** en B. Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

III.9.2. MANUAL EN SECCIONES TRASVERSALES DE RETINA

A) CMs Iba1⁺, CD68⁺ y CD206⁺

Una vez obtenidos las secciones transversales, se analizaron 3 fotomontajes por animal y grupo experimental. A continuación, se acoplaron con el programa Adobe Photoshop® los fotomontajes capturados con los diferentes filtros (**Figura 30**) y se cuantificó manualmente el número de CMs-Iba1⁺ que, a su vez, eran CMs-CD68⁺ en las diferentes capas de la retina. Los datos se obtienen en densidad (cels/mm²).

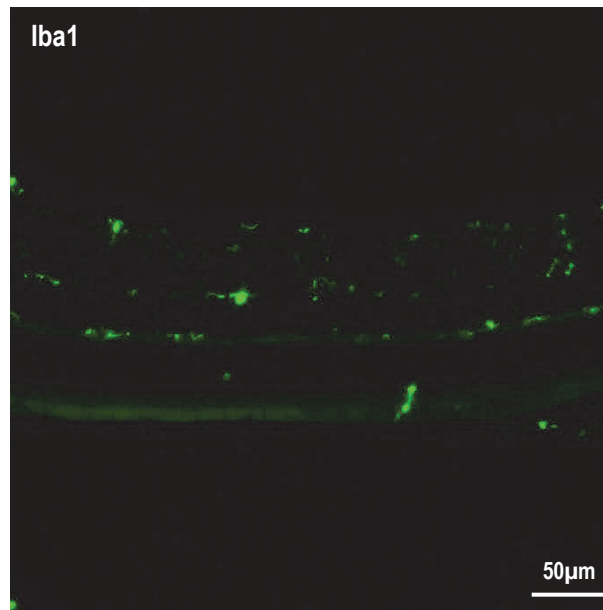


Figura 30. Representación del marcaje de Iba1 en secciones transversales al ApNO.

Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

III.9.3. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL. MAPAS TOPOGRÁFICOS

El estudio de la distribución espacial de las CGRs en la retina es muy importante para estudiar cualquier tipo de patología o degeneración. En nuestro laboratorio se han diseñado protocolos informáticos, que partiendo de los procedimientos desarrollados previamente para la cuantificación automática permiten obtener datos sobre la densidad espacial.

Estas densidades bien son tratadas teniendo de referencia un área de interés y calculando el número de células que contiene (mapas de isodensidad), o bien partiendo de una célula y calculando las células próximas a ella dentro de un radio conocido (mapas de número de vecinos **Figura 31**). En la realización de esta tesis doctoral, se ha utilizado el mapa de vecino.

III.9.3.1 MAPAS DE VECINOS

La realización de estos mapas permite determinar específicamente las coordenadas de cada CMs con respecto a un origen, el NO. Otros datos necesarios que se tienen en cuenta son: el número total de la población y el área de la retina, que se obtiene utilizando una rutina desarrollada en el programa Image-Pro® Plus 5.1 for Windows®. Para cada célula, estos datos son procesados en distintas fases mediante una rutina desarrollada en JAVA, descrito anteriormente en nuestro laboratorio (*Galindo-Romero y cols., 2013b*).

En conclusión, mediante un programa de representación gráfica (SigmaPlot® 9.0 for Windows®, Systat Software, Inc., Richmond, CA, EE. UU.) se representa cada célula en función de su posición con respecto al NO y el número de vecinos que posee.

En el mapa, este número de vecinos viene definido por una escala de color, de manera que los colores fríos (gama de **azules**) corresponden a un menor número de vecinos de 0-2 células y los colores más cálidos (gama de **rojos**) un mayor número de vecinos de 19-21 células o más en un radio de 0,20 mm (**Figura 31**) (*Galindo-Romero y cols., 2013b; Nadal-Nicolás y cols., 2014, 2015c; Valiente-Soriano y cols., 2014, 2015a; Vidal-Sanz y cols., 2015*).

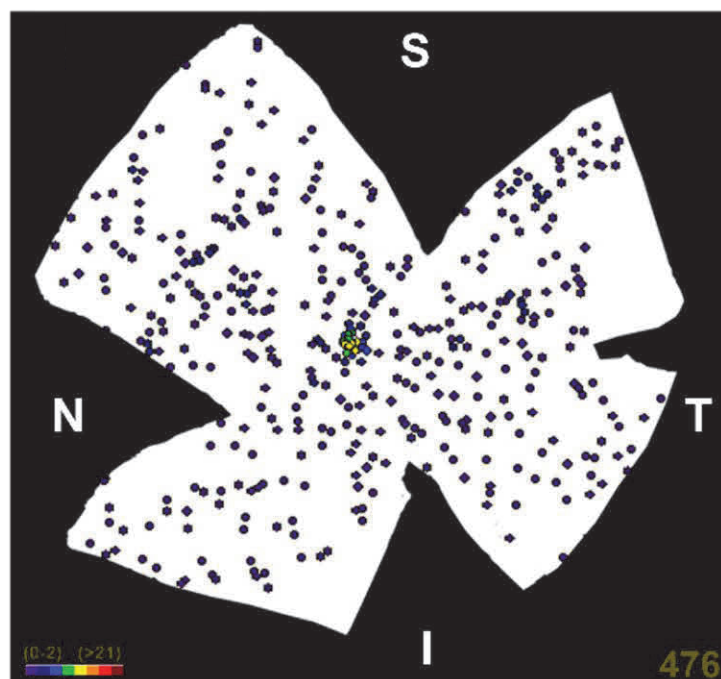


Figura 31: Visualización de la distribución de las CMs M2 en una retina de ratón usando mapas de vecinos.

En esta imagen se muestra una retina de ratón representativa, correspondientes a una retina experimental izquierda. La escala de colores de cada célula nos muestra el número de células vecinas que tiene en un radio determinado. Las células lilas poseen un rango de entre 0-2 células vecinas, y aumenta el número hasta las células granates que tienen entre 19-21 células vecinas o más en un radio de 0,20mm. En la parte inferior izquierda se muestra el número total de CMs de cada retina. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm. *Imagen tomada mediante la realización de esta tesis doctoral.*

III.9.4. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES MEDIANTE IMAGE J

IMAGE J

Image j es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado por java y desarrollado por Wayne Rasband, (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Se puede descargar fácilmente a través de siguiente enlace: [<https://imagej.nih.gov/ij>].

Fue diseñado para poder mostrar, editar, analizar, procesar, guardar, e imprimir diferentes imágenes. También puede leer varios formatos de imagen y formatos RAW. En esta tesis doctoral se utiliza para cuantificar y analizar:

- I) La densidad media de CMs-Iba1⁺, CMs-CD68⁺ y CMs-CD206⁺ en secciones transversales de retina (**Figuras 32 y 33**)
- II) El tamaño del soma de las CMs-Iba1⁺ en montajes a plano de retina y en CORs (**Figura 34**)
- III) Circularidad del soma de las CMs-Iba1⁺ en montajes a plano de retina y en CORs (**Figura 34**)

Cuantificación de las CMs-Iba1⁺ y CMs-CD68⁺ en secciones transversales de retina

Una vez obtenidos las secciones transversales, se analizaron 3 fotomontajes por animal y grupo experimental. A continuación, se cuantificó manualmente el número de CMs-Iba1⁺, CMs-CD68⁺ (Figura 32) y CMs-CD206⁺ (Figura 33) mediante el programa Image J. Los datos se obtuvieron en población total para las CMs-CD206⁺ y en densidad para las CMs-Iba1⁺.

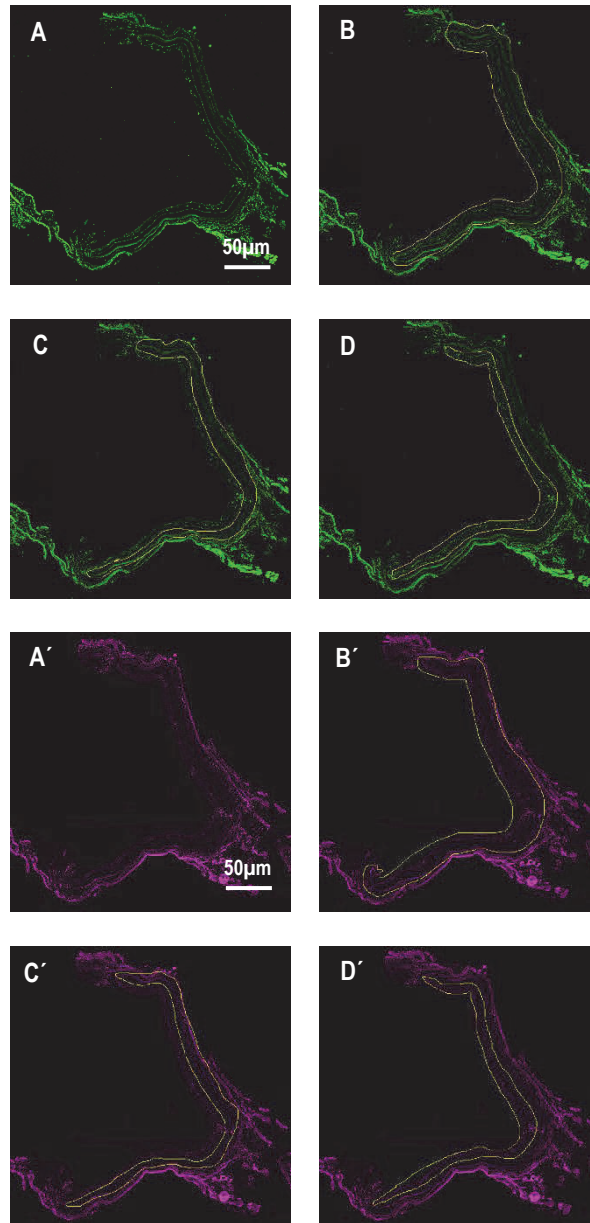


Figura 32. Representación esquemática del método de conteo manual del número de CMs-Iba1⁺ y CMs-CD68⁺ en la retina intacta. A, A') Imagen de una sección transversal de retina inmunoteñida con Iba1 y CD68. B, B') Retina total. C, C') Retina Interna. D, D') Retina Externa. Imagen tomada mediante la realización de esta tesis doctoral.

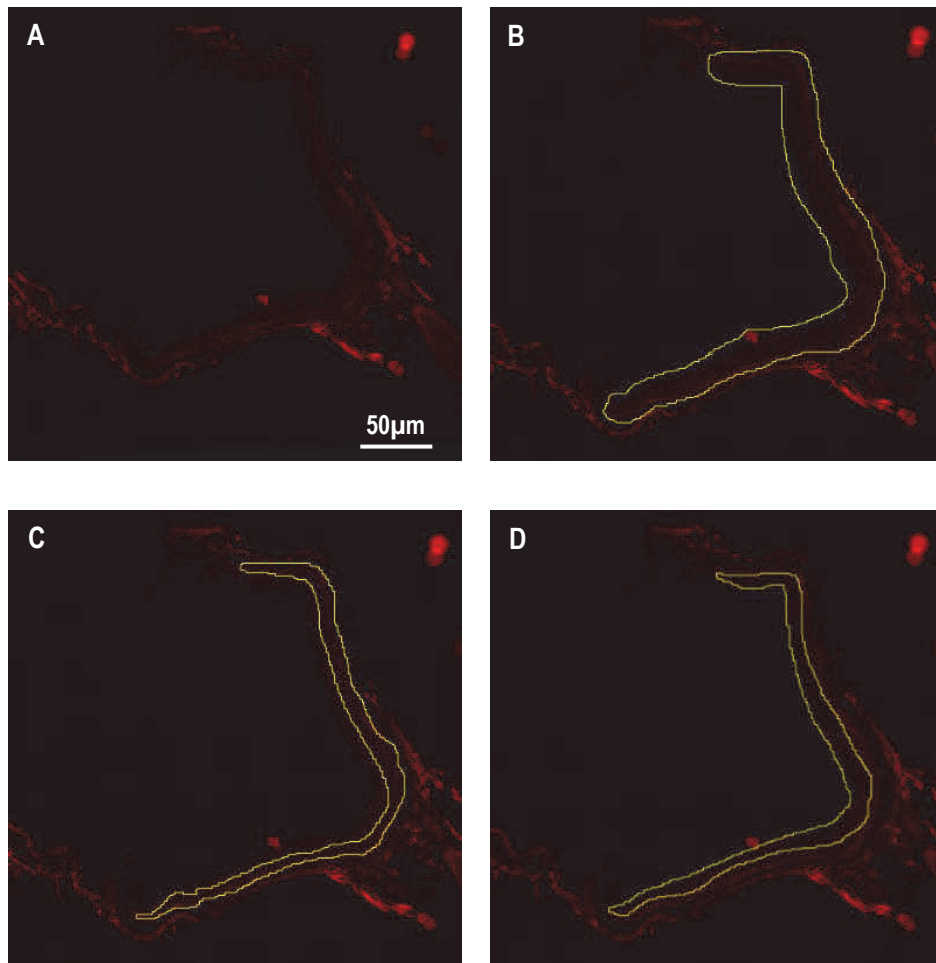
Cuantificación de las CMs-CD206⁺ en secciones transversales de retina

Figura 33. Representación esquemática del método del conteo del número total de CMs-CD206⁺ en la retina intacta. A) Imagen de una sección transversal de retina inmunoteñida con CD206⁺. B) Retina total. C) Retina Interna. D) Retina Externa. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

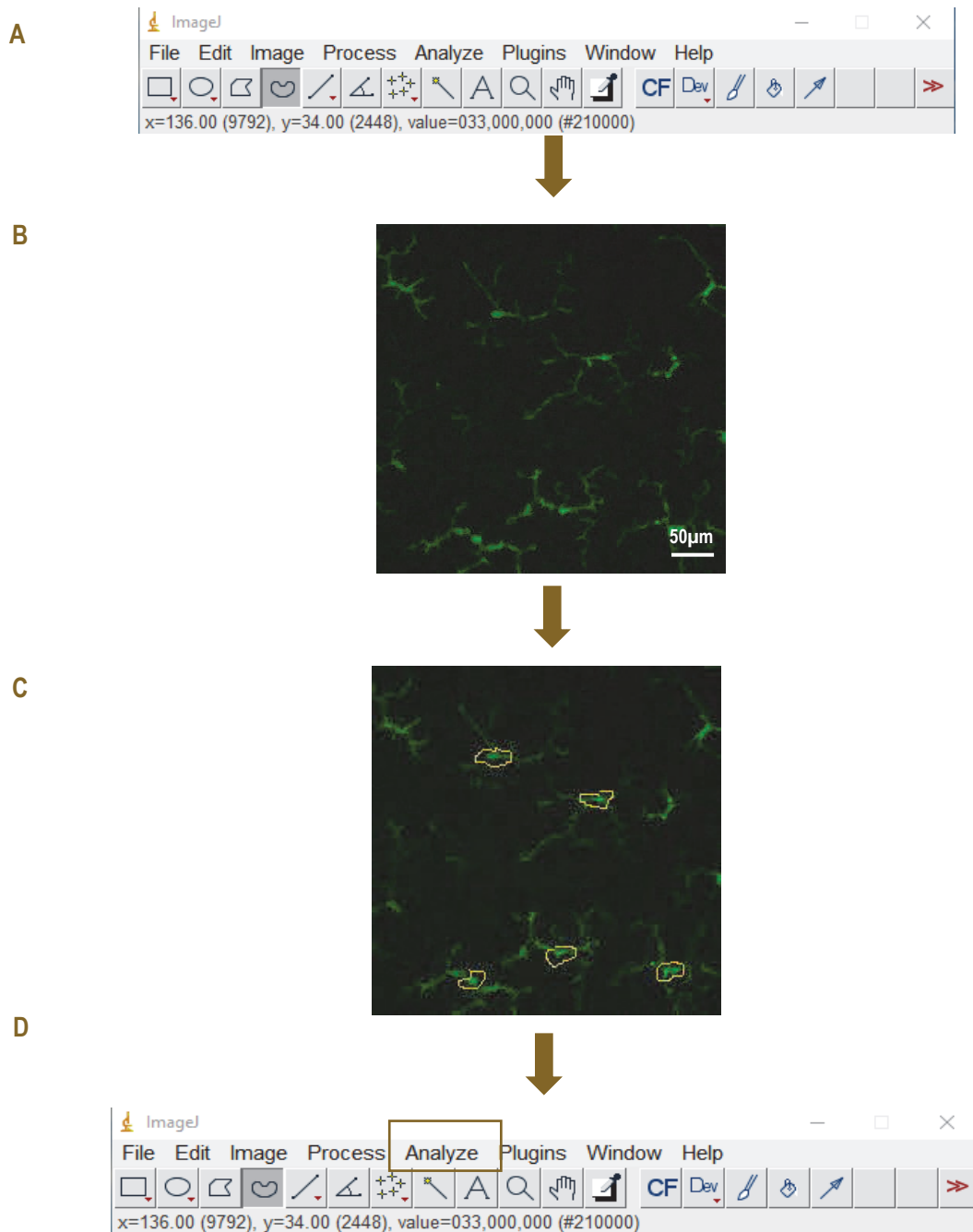


Figura 34: Reconstrucción del proceso de cuantificación del tamaño, circularidad y soma de las CMs. A) Programa Image J. **B)** Carga de la imagen para cuantificar. **C)** Selección del área a medir. **D)** Con el programa Image J se procede a analizar y medir el área. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

III.9.5. ANALISIS MORFOMÉTRICO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES MEDIANTE IMAGE J FIJI

IMAGE J FIJI

Se usó el “Simple Neurite Tracer” (SNT), un complemento de software gratuito distribuido por Fiji-Image J, desarrollado por Mark Longair en 2011 (*Longair y cols., 2011*). La descarga es gratuita y la documentación están disponibles en “http://fiji.sc/Simple_Neurite_Tracer”. SNT se diseñó en un primer momento para rastrear neuritas, lo que permitió el rastreo semiautomático de estructuras similares a tubos en pilas Z de microscopio confocal. Para usar SNT para reconstruir una microglía, el usuario debe seleccionar puntos a lo largo de la línea media del proceso microglial. Si realmente existe un camino entre los puntos, el software los conectará, incluso si están distantes entre sí (**Figuras 35 y 36**). Este proceso semiautomático ayuda a evitar errores de reconstrucción y al mismo tiempo asegura la correcta tortuosidad del proceso. Proporciona métodos para medir longitud y volumen de las neuronas, una interfaz para el análisis de Sholl y poder visualizar las imágenes en 3D. También, como parte del marco de Fiji, Simple Neurite Tracer interactúa con otros complementos de ImageJ para un mayor análisis y visualización, además de admitir una selección de opciones de importación y exportación. La aplicación está diseñada para imágenes de microscopía de luz como confocal (*Longair y cols., 2011*).

RECONSTRUCCIÓN DE LAS CMs

Mediante el programa Image J Fiji se realizaron las reconstrucciones de las CMs en CORs y en retinas axotomizadas, contralaterales a la lesión e intactas (**Figuras 35 y 36**). Para ello, las imágenes se adquirieron en z-stack con un objetivo de 40x en el microscopio confocal Leica DM6 B. El intervalo entre cada imagen Z es de 0,5 μm . Se adquirieron con toda la profundidad (en el plano Z) de la célula y con todas las ramificaciones está dentro del campo.

A través de esta reconstrucción, se obtuvieron los siguientes datos:

- Número de procesos totales, basales y apicales de las CMs en montajes a plano y en CORs (**Figura 35**)
- Longitud Total y longitud de las ramas basales y apicales de las CMs en montajes a plano y en CORs (**Figura 35**)
- Imagen en 3D en montajes a plano y en CORs (**Figura 36**)
- Volumen en montajes a plano y en CORs (**Figura 37**)
- Análisis Sholl en montajes a plano y en CORs (**Figura 38**)

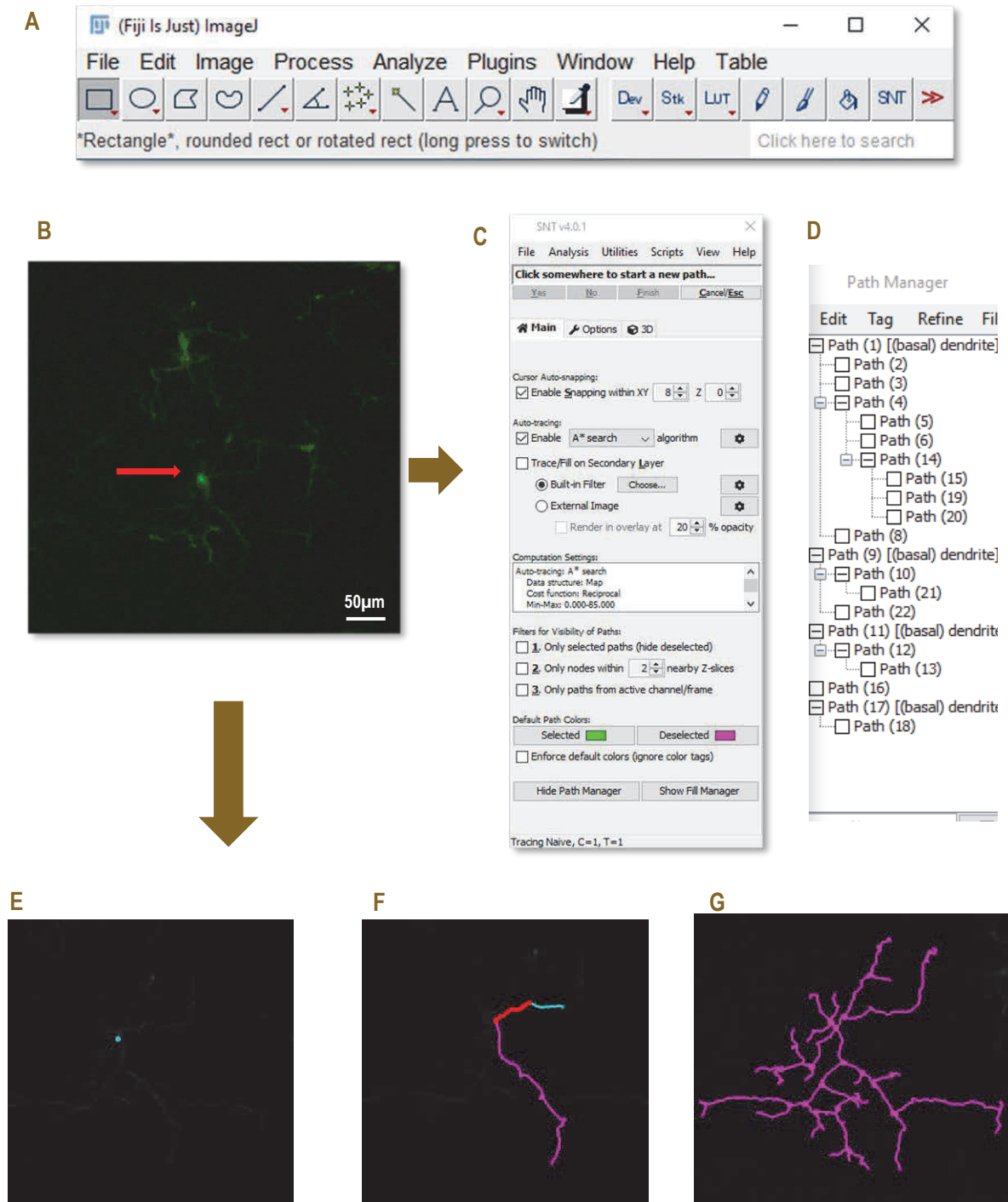


Figura 35: Reconstrucción del número de procesos y de la longitud total (basal y apical) de las CMs utilizando SNT. A y B) Carga de imágenes confocales en el software Fiji para la reconstrucción microglial; C) menú de Simple Neurite Tracer (SNT); D) ejemplo de reconstrucción de las CMs con todos los procesos trazados discriminados en la ventana "All paths" (panel central). E, F, G) Paso a paso de cómo se reconstruye una CMs. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

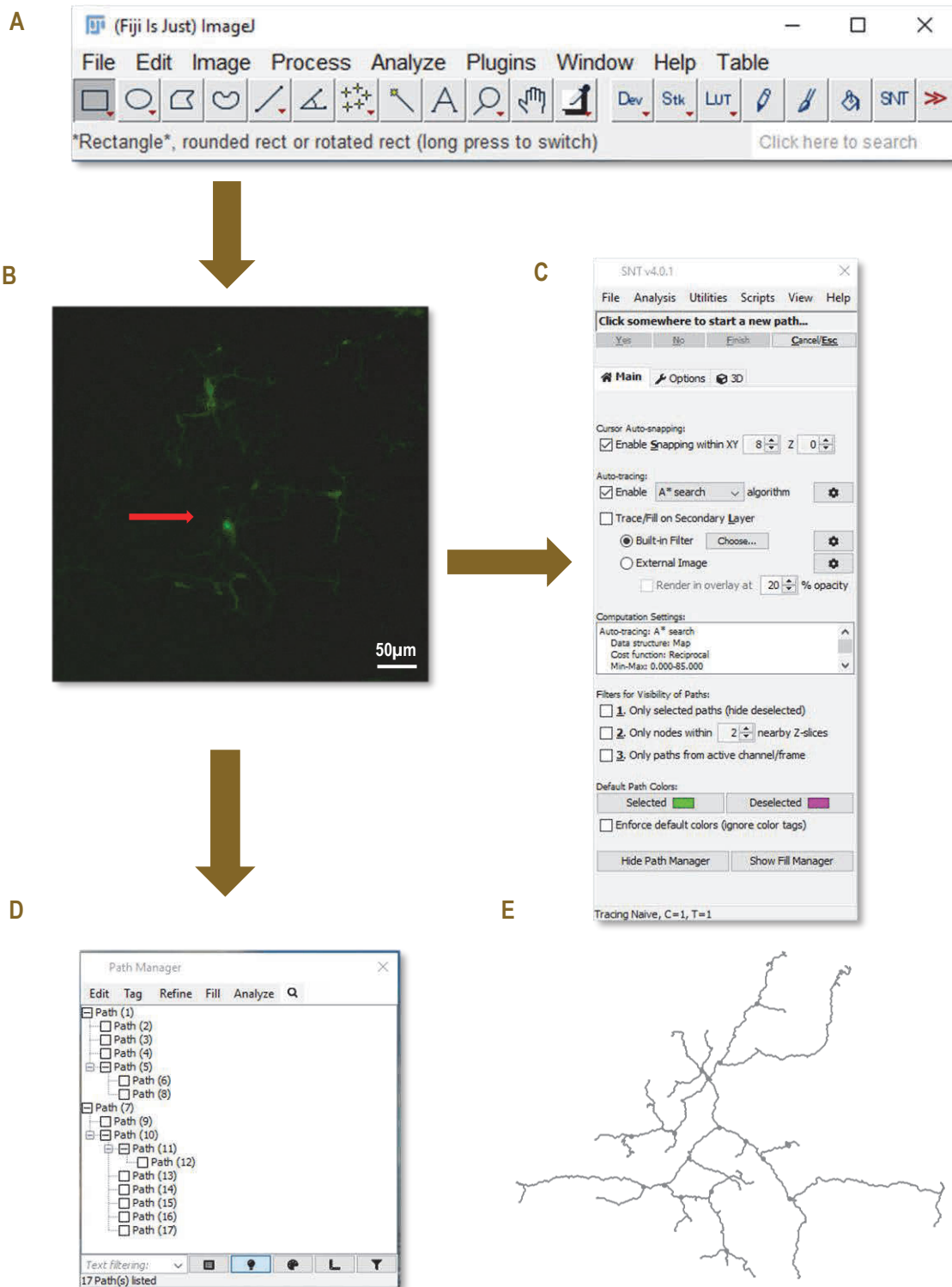


Figura 36: Reconstrucción de la morfología 3D de las CMs utilizando SNT. A y B) Carga de imágenes confocales en el software Fiji para la reconstrucción microglial; **C)** menú de Simple Neurite Tracer (SNT); **D)** ejemplo de reconstrucción 3D con todos los procesos trazados discriminados en la ventana "All paths" (panel central). *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

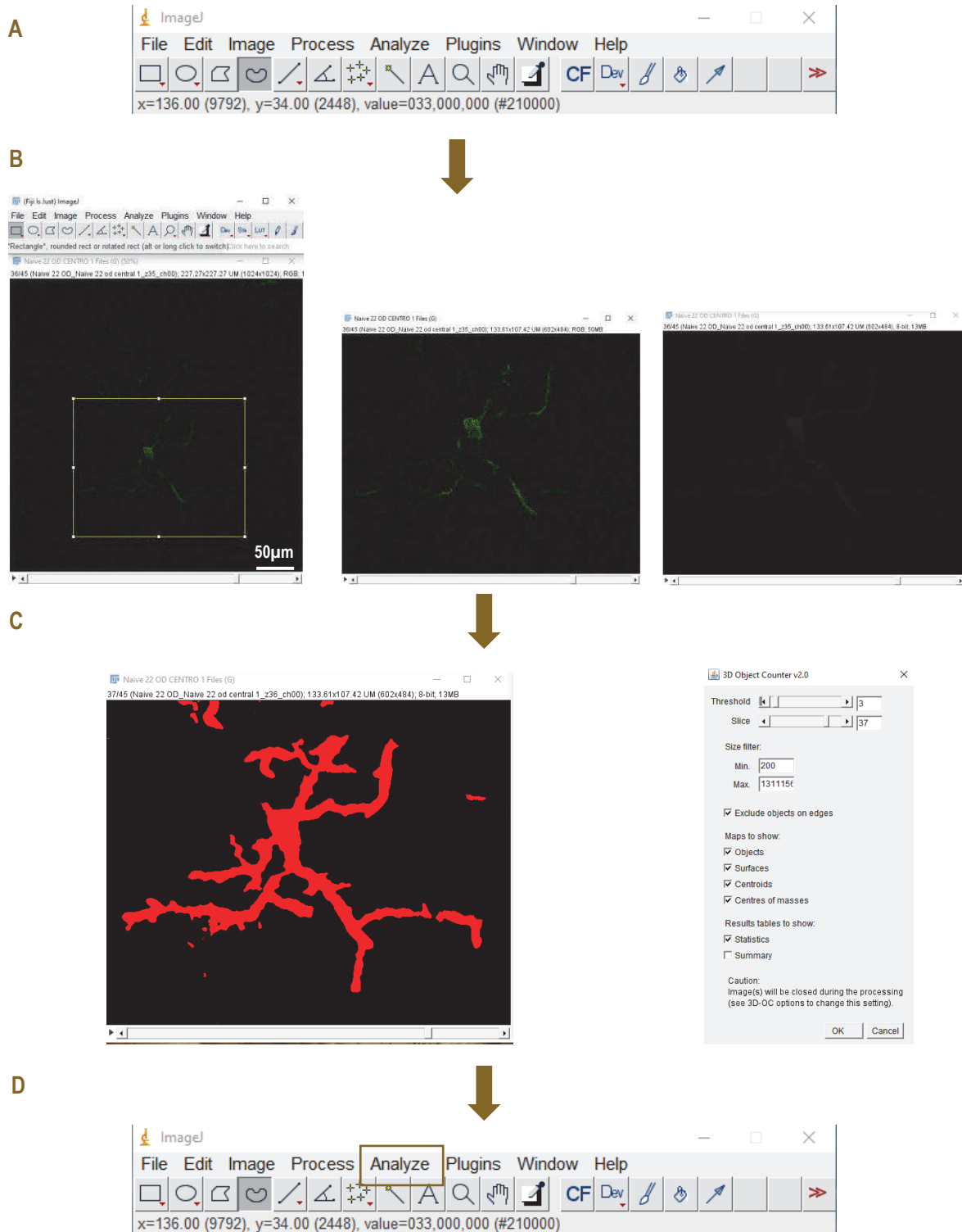


Figura 37: Reconstrucción del proceso de cuantificación del volumen, área y perímetro de las CMs. A) Programa Image J. B) Carga de la imagen para cuantificar. C) Selección del volumen a medir. D) Medición del volumen. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

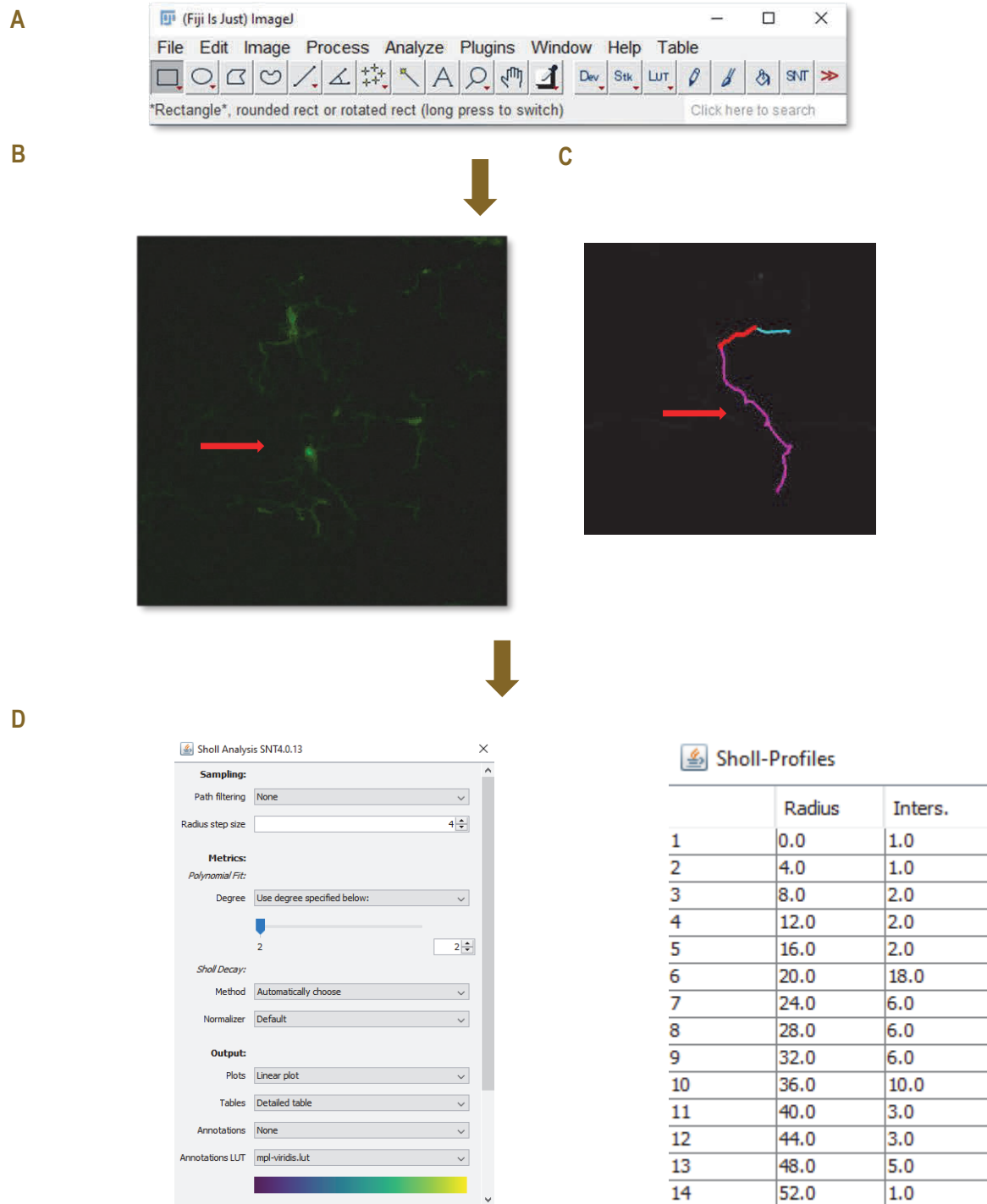


Figura 38: Reconstrucción del proceso de cuantificación del sholl de las CMs. A) Programa Image J. B) Carga de la imagen para cuantificar. C) Selección "path 0" para comenzar a medir. D) Análisis del radio máximo y el número de intersecciones. *Imagen tomada durante la realización de esta tesis doctoral.*

III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico y de representación gráfica Graph Pad® Prism v6 (Graph Pad, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

Para la comparación de más de dos grupos se realiza un análisis de comparación múltiple por parejas, el *test ANOVA* con post-análisis: *Tukey Dunn* tras cumplir la condición de que la *F global* del *test ANOVA* sea estadísticamente significativa. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Para la comparación de los grupos se utilizó “t-test” prueba no paramétrica y posteriormente un post-análisis; Kruskal-Wallis. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

IV.RESULTADOS

IV.RESULTADOS

IV.1. CURSO DE LA ACTIVACIÓN GLIAL A LARGO PLAZO EN RETINAS LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN TRAS UNA AXOTOMÍA UNILATERAL

IV.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE CURSO DE MUERTE DE CGRs Y ACTIVACIÓN MICROGLIAL ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS

IV.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA DE LA MICROGLIA ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS

IV. RESULTADOS

IV.1. CURSO DE LA ACTIVACIÓN GLIAL A LARGO PLAZO EN RETINAS LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN TRAS UNA AXOTOMÍA UNILATERAL

IV.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el siguiente esquema se muestra el diseño experimental del primer objetivo, en el que se han utilizado un total de 42 ratones macho de la cepa C57/BL6 (Figura 39).

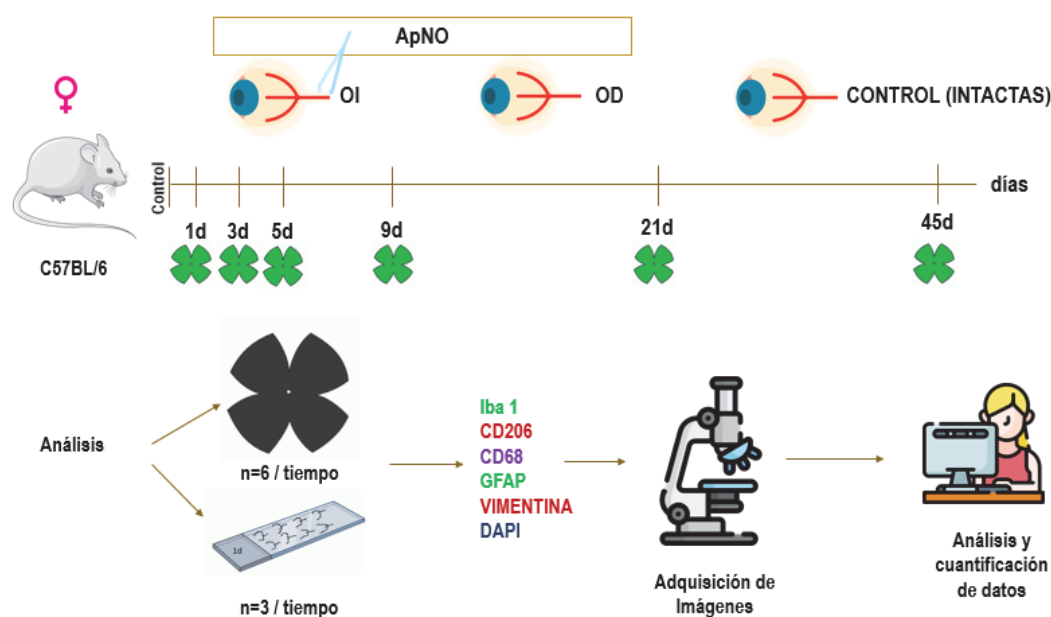


Figura 39: Diseño experimental del estudio de activación glial en retinas intactas y tras ApNO unilateral.

IV.1.2. Activación microglial en retinas intactas, lesionadas y contralaterales a la lesión.

IV.1.2.1. Activación microglial en retinas intactas

El primer objetivo de este estudio fue el de caracterizar los dos estados de las CMs en las retinas intactas (control) (Figura 39). Las CMs se evaluaron con Iba1 (activación e inflamación microglial), CD68 (microglía activa) y CD206 (fenotipo microglía M2) (Figura 40).

En retinas intactas, se encontraron CMs-Iba1⁺ en la CFNR, CCG, CPI y CPE con una morfología ramificada, indicativa de un estado de reposo. (Figura 40 A). En la CCG, las CMs-Iba1⁺ se distribuyeron uniformemente tal y como se ha descrito anteriormente (*Nimmerjahn y cols., 2005* ; *Sobrado-Calvo y cols.,2007* ; *Nadal-Nicolas y cols.,2017*) (Figura 40 B).

La expresión de CD68 (Figura 40 C, D) y CD206 (Figura 40 E, F), marcadores de activación de las CMs, se observó en muy pocas CMs y que se localizaron preferentemente alrededor NO y en el CC (Figura 40 D, F).

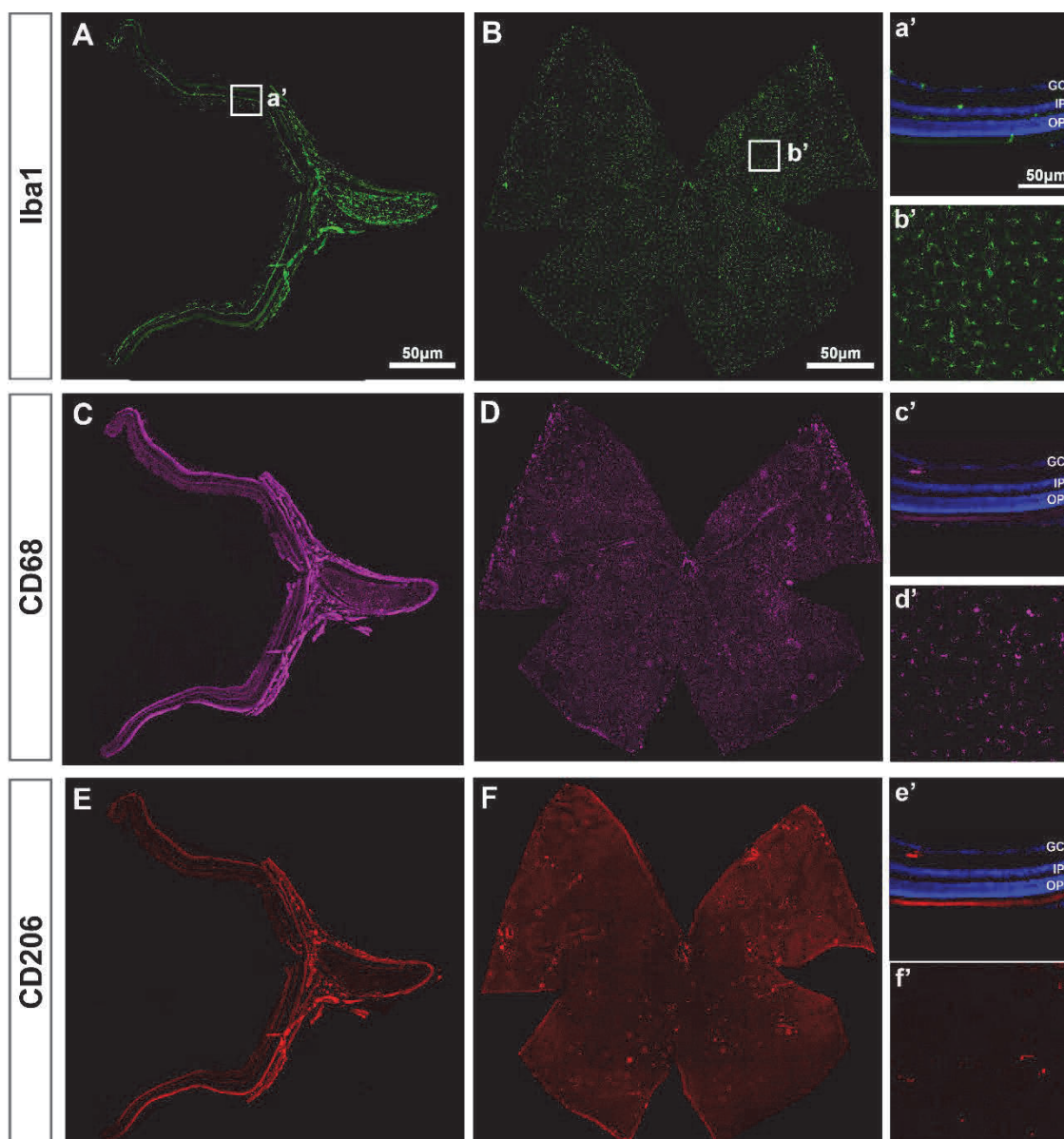


Figura 40: CMs en retinas intactas (A – F).

Fotomontajes de una sección trasversal de la retina (A, C, E) y retinas montadas a plano (B, D, F) donde se han inmunodetectado *Iba1*, *CD68* y *CD206* para identificar todas las CMs-*Iba1*⁺ y sus estados de activación (*CD68*⁺ y *CD206*⁺). Las ampliaciones en (a' – f') son de las áreas enmarcadas en (A – F). GCL: capa de células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; OPL: capa plexiforme externa.

IV.1.2.2. Activación microglial en retinas lesionadas

En secciones transversales de retina tras el ApNO, se observó una activación morfológica de las CMs-Iba1⁺ y un aumento de la expresión de CD68⁺ desde el día 5 tras ApNO (**Figura 41**) en comparación con las retinas intactas (**Figura 40 A, C**). Todas las CMs CD68⁺ eran Iba1⁺ pero no al revés.

En la retina total (interna y externa) hubo un aumento progresivo y paralelo de CMs-CD68⁺ e CMs-Iba1⁺ que fue significativamente más alto que en retinas intactas a los 3, 5 y 9 días tras la lesión y disminuyó a niveles basales a los 21 días (**Figura 42 C**). Cuando analizamos la retina interna (**Figura 42 A**) y externa (**Figura 42 B**) por separado, observamos que la densidad de CMs-Iba1⁺ y CD68⁺ aumentó en la retina interna y disminuyó en la externa, como las CMs-CD206⁺.

Las CMs-Iba1⁺ también eran CD68⁺. Las CMs-CD206⁺ tenían una morfología diferente a las CMs-Iba1⁺ y CD68⁺, ya que eran muy pequeñas. En la retina total (interna y externa) hubo un aumento de CMs-CD206⁺ que fue significativamente más alto que en las retinas intactas a los 5, 9 y 21 días y disminuyó a 45 días por debajo del control (**Figura 43 C**). Cuando analizamos la retina interna (**Figura 43 A**) y externa (**Figura 43 B**) por separado, observamos que la densidad de CMs-CD206⁺ aumentó en la retina interna y disminuyó en la externa. Estos datos sugieren que las CMs migran desde la retina externa a la CCG donde las CGRs están muriendo.

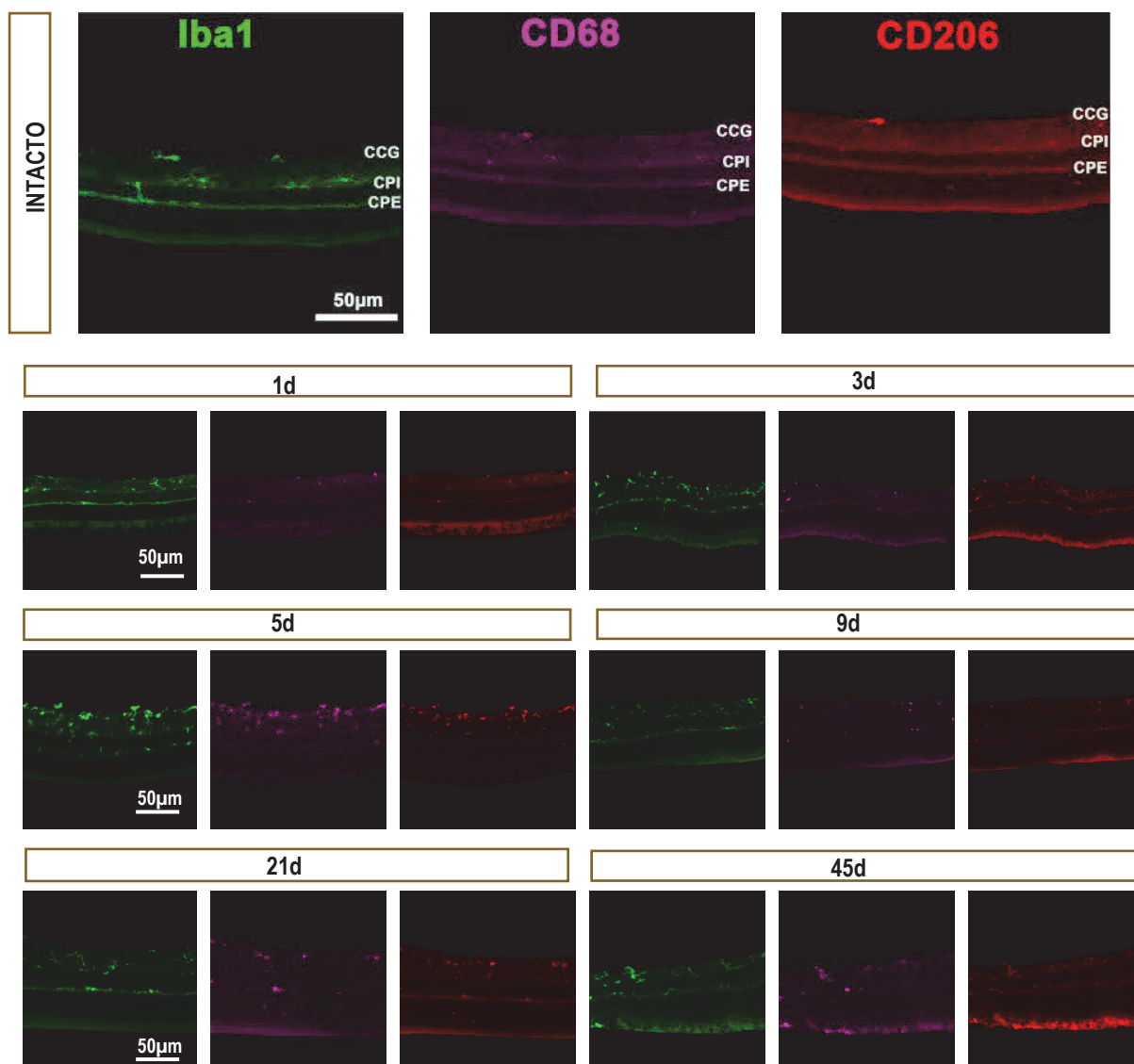
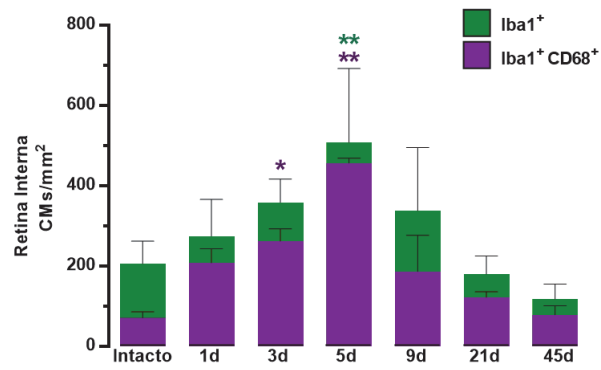


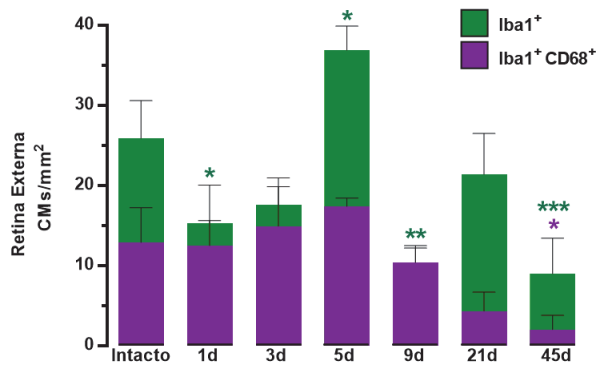
Figura 41: Activación microglial en secciones transversales de retinas axotomizadas.

Magnificaciones de secciones transversales de retinas intactas y lesionadas analizadas a tiempos crecientes después de lesión e inmunoteñidas con Iba1, CD68 y CD206. CCG: capa de células ganglionares de la retina; CPI: capa plexiforme interna; CPE: capa plexiforme externa.

A



B



C

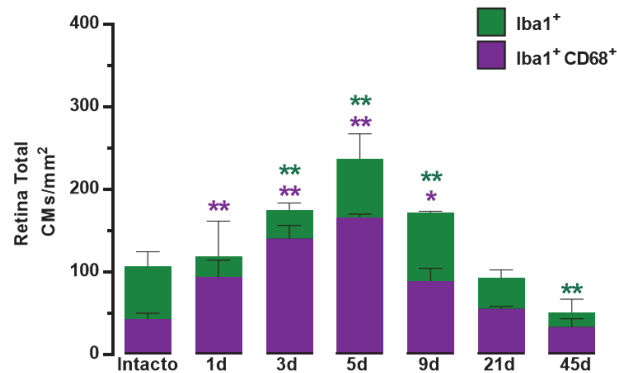


Figura 42: Densidad media (CMs/mm²) \pm DE de CMs-Iba⁺ y CD68⁺. En la retina interna (A), externa (B) y total (C) en retinas axotomizadas. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con las retinas intactas, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

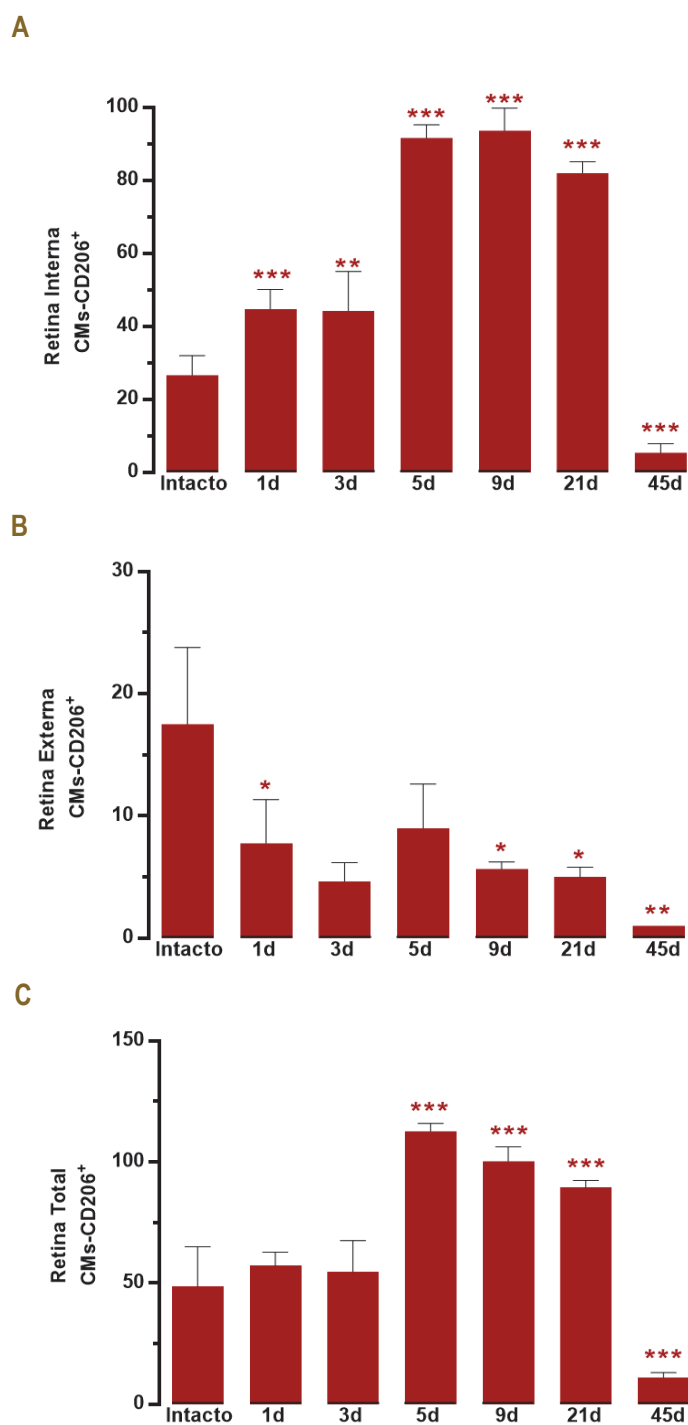


Figura 43: Número total \pm DE de CMs-CD206⁺ en secciones transversales de retinas axotomizadas. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En las retinas a plano y en la CCG, las CMs mostraron ya en el día 1 una expresión clara de CD68⁺ (Figura 44). La densidad de CM aumentó significativamente a los 5, 9 y 21 días, y su número volvió a la normalidad a los 45 días. Sin embargo, la densidad de CMs-CD68⁺ aumentó significativamente el día 3 y permaneció más alta que el control hasta 45 d (Figura 45).

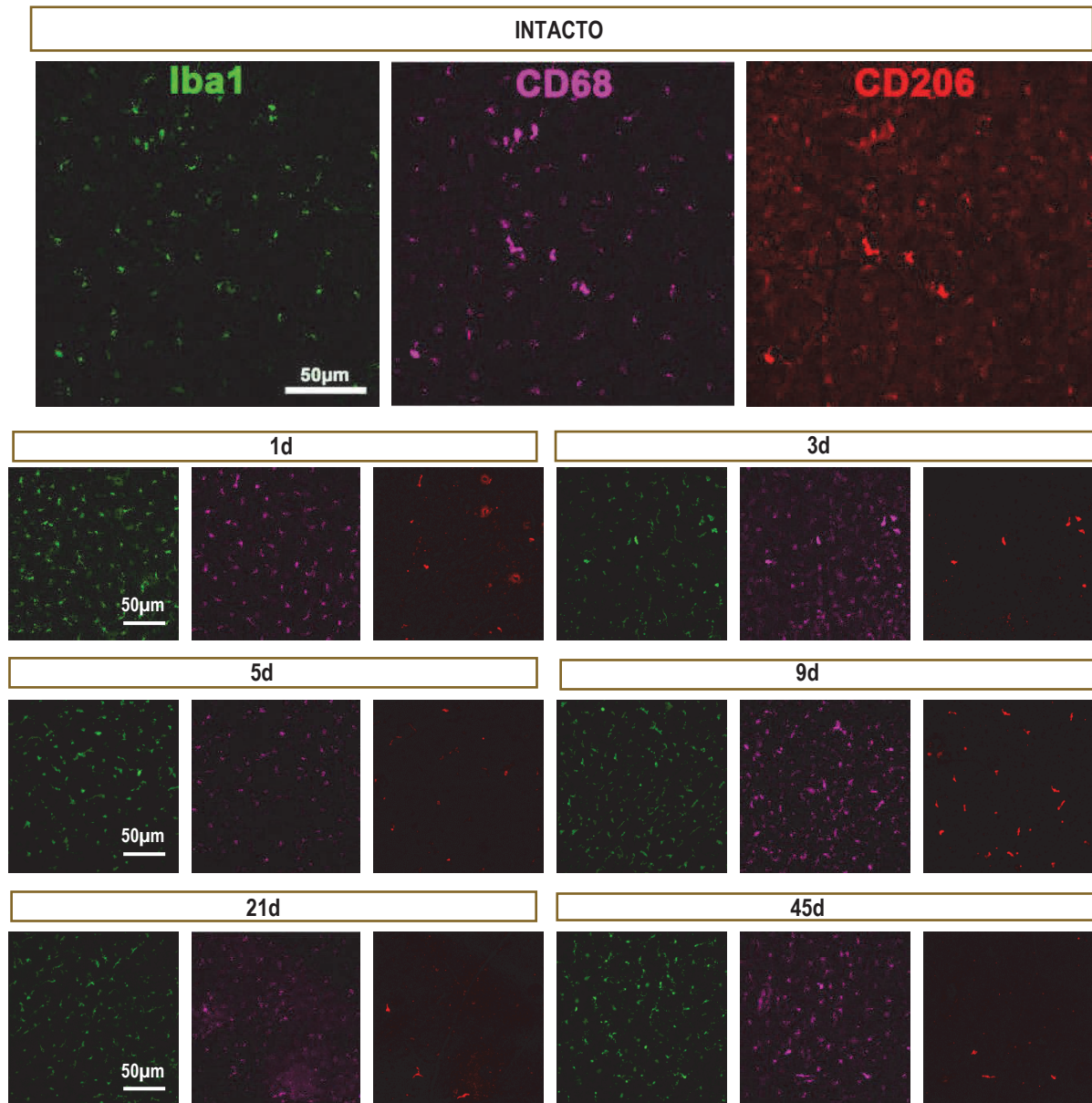


Figura 44: CMs en la CCG de retinas axotomizadas. Ampliaciones de retinas montadas a plano intactas y lesionadas enfocadas en el CCG y que muestran inmunotinción de Iba1⁺, CD68⁺ y CD206⁺.

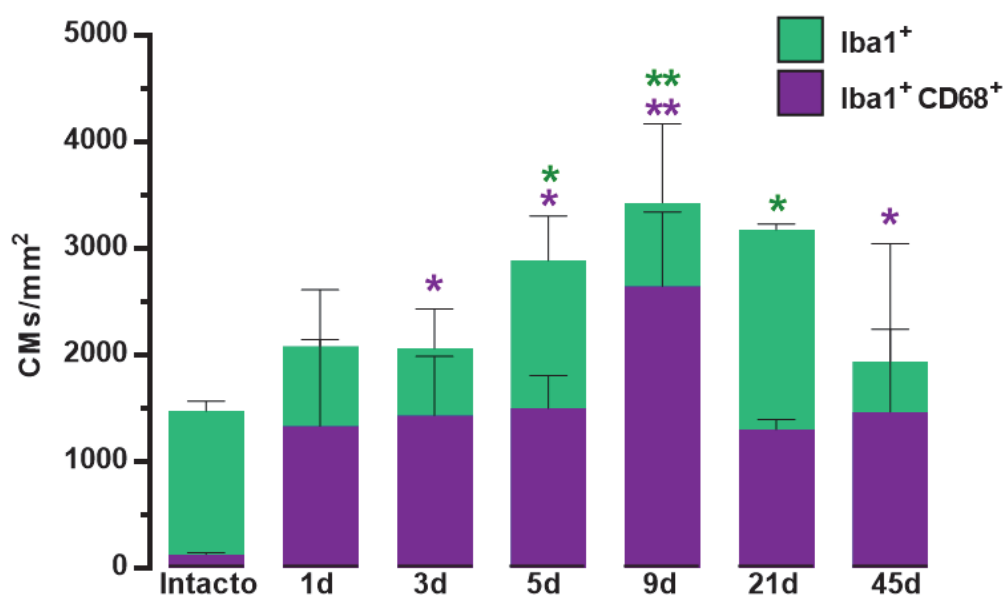


Figura 45: Densidad media (CMs/mm²) ± DE de CMs-Iba1⁺ y CD68⁺ en la CCG. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Topográficamente, las CMs-CD206⁺ en retinas intactas son más abundantes en la periferia y alrededor del NO y difusas en el resto de la retina (**Figura 46**). Tras la axotomía, su densidad aumenta en el resto de la retina medial/central y en la retina periférica, disminuyendo alrededor del NO (**Figuras 46 y 47**).

Curiosamente, también hubo un aumento del número de CMs-CD206⁺ en el CC, que precedió al de la retina (**Figura 47 C**). Finalmente, en las retinas intactas, las CMs-CD206⁺ tenían una morfología redondeada, con pocas o ninguna ramificación. Después de la lesión, su morfología cambia y se observaron alargadas y más delgadas, y en la cabeza NO y CC mostraron una orientación polarizada (**Figura 48**).

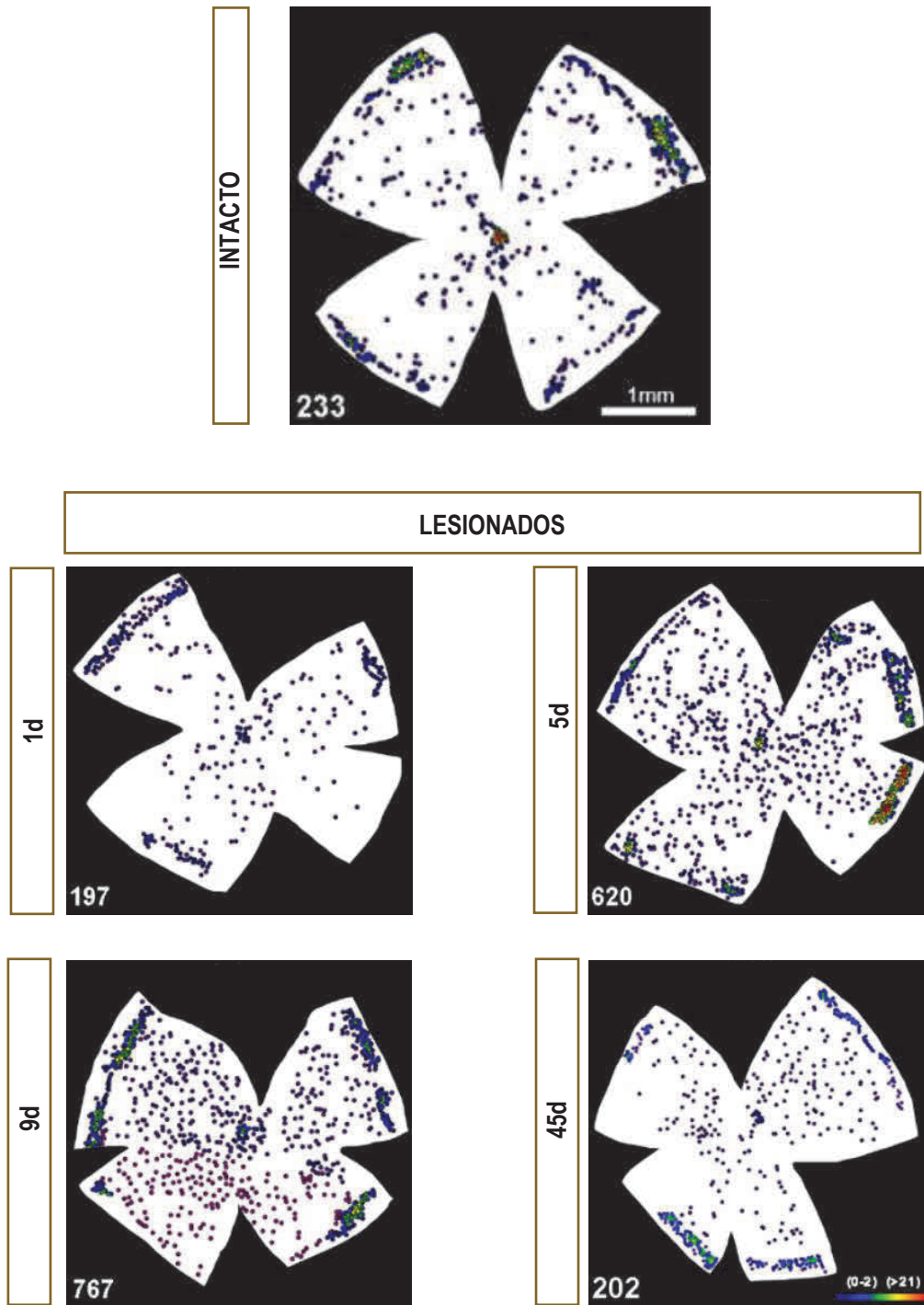


Figura 46: Mapas de vecinos de CMS-CD206⁺ tras ApNO en retinas axotomizadas a diferentes tiempos tras la lesión.

Los colores fríos (gama de azules) corresponden a un menor número de vecinos y tienen un rango de tamaño de 0-2 células vecinas y los colores más cálidos (gama de rojos) a un mayor número de vecinos con un rango de tamaño de 19-21 células vecinas o más. Vemos como en estos mapas de vecinos, a 1 día hay un menor número de vecinos (colores azules y violetas) y como a 5 y 9 días (colores rojos, naranjas) este número aumenta considerablemente con respecto a intacto. A 45 días el número de vecinos es parecido a una retina intacta.

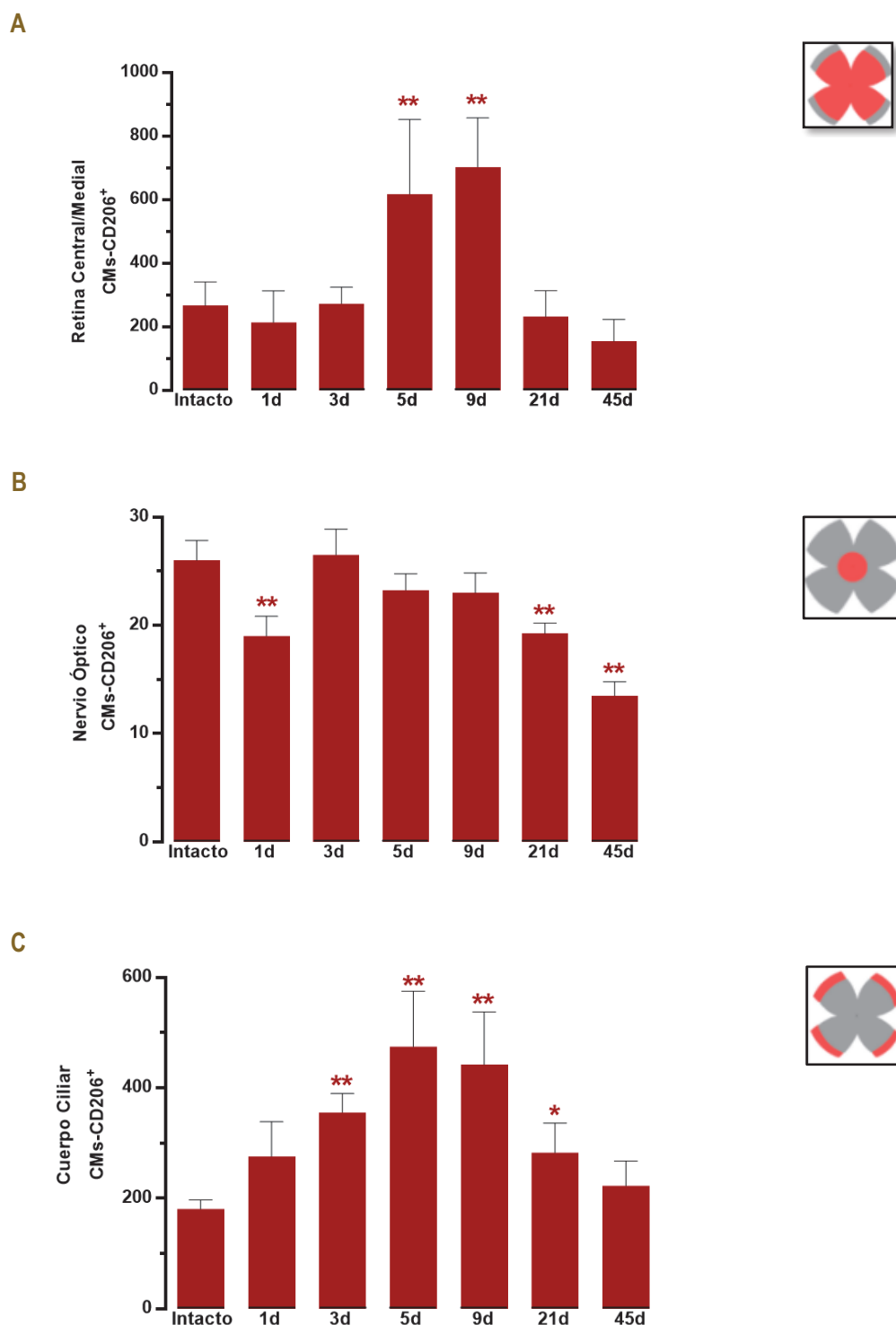


Figura 47: Número total \pm DE de CMs-CD206⁺ en la capa de CCG, en la cabeza del NO y en el CC en las retinas intactas y axotomizadas. Observamos como a 1 día hay un menor número de CMs-CD206⁺ en el CC que va aumentando hasta 5 días y como a partir de ahí vemos como ese número de CMs-CD206⁺ va disminuyendo. En cuanto al NO vemos como a 1 día hay un número menor de CMs-CD206⁺ y como a partir de ahí va incrementando hasta 5 días y 9 días el número de CMs-CD206⁺ hasta que vuelve a bajar a 45 días. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0.01$, ** $p < 0,01$.

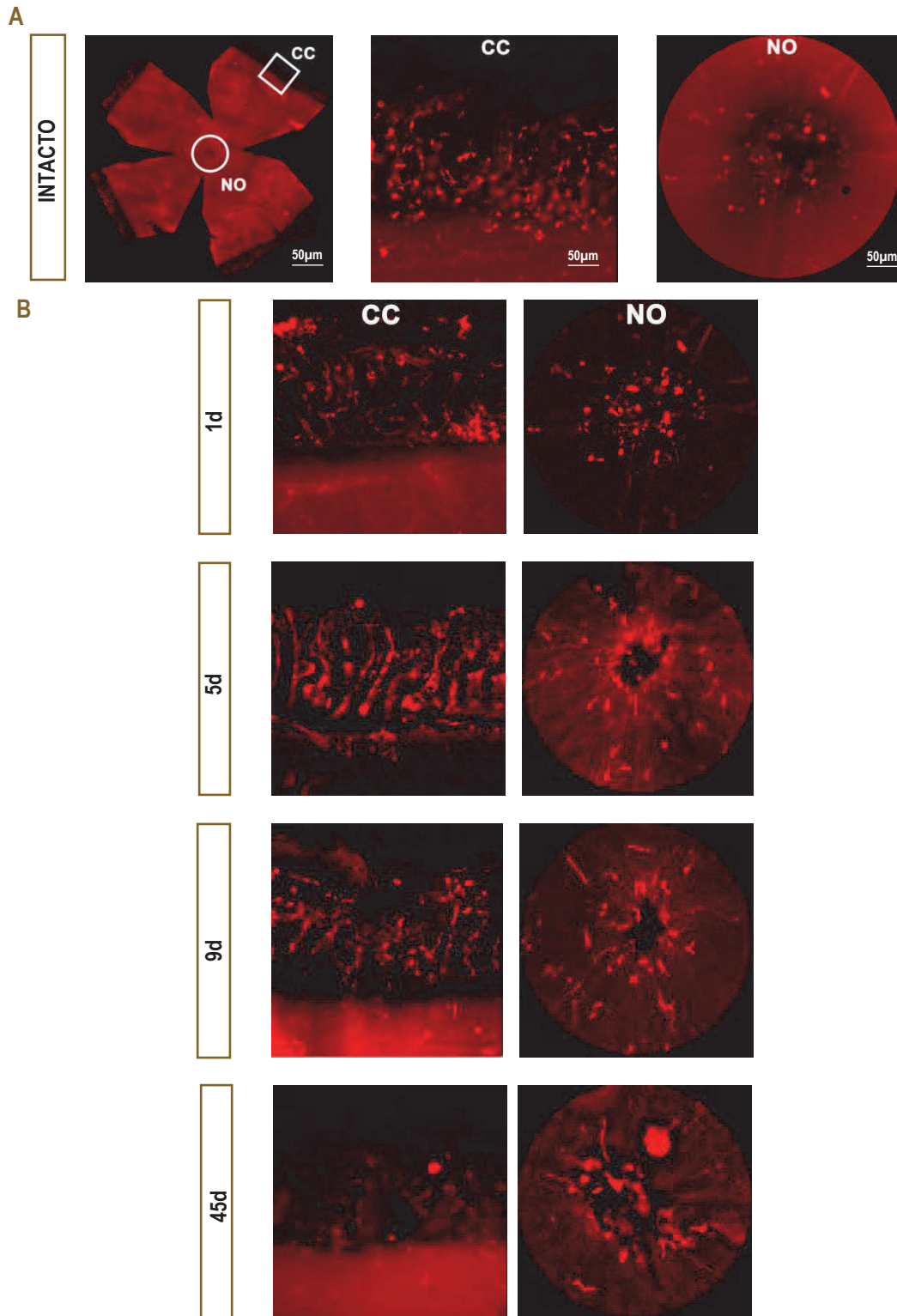


Figura 48: CMs-CD206⁺ en la retina, en el CC y en la cabeza NO en retinas intactas y axotomizadas a diferentes tiempos tras la lesión. (A): Izquierda: fotomontaje de una retina intacta montada en plano que muestra inmunodetección de CD206. Medio, magnificación del CC y a la derecha, magnificación de la cabeza del NO. Estos aumentos son de las áreas enmarcadas que se muestran en el fotomontaje. (B): Magnificaciones de la cabeza del NO y del CC en retinas axotomizadas a diferentes tiempos tras lesión.

IV.1.2.3. Activación microglial en retinas contralaterales a la lesión

La respuesta de las CMs en las retinas no lesionadas contralaterales siguió el mismo curso que en las lesionadas, pero, como era de esperar, esta respuesta fue diferente de la lesionada (Figura 49). Así, en secciones observamos que tanto en la retina total como en la retina interna (Figuras 49 y 50), hubo un aumento significativo de CMs-Iba1⁺ y CMs-CD68⁺ activada a 5 días, mientras que en la retina externa (Figura 50 B) la densidad de CMs-Iba1⁺ y CD68⁺ disminuyó a todos los tiempos temporales. Con respecto a las CMs-CD206⁺ en la retina total (interna y externa) hubo un aumento significativo a 1 día y a partir de ahí una disminución hasta los 45 días al igual que en la retina interna. En cambio, en la retina externa hay una disminución desde el día 1 hasta el día 45 (Figuras 49 y 51).

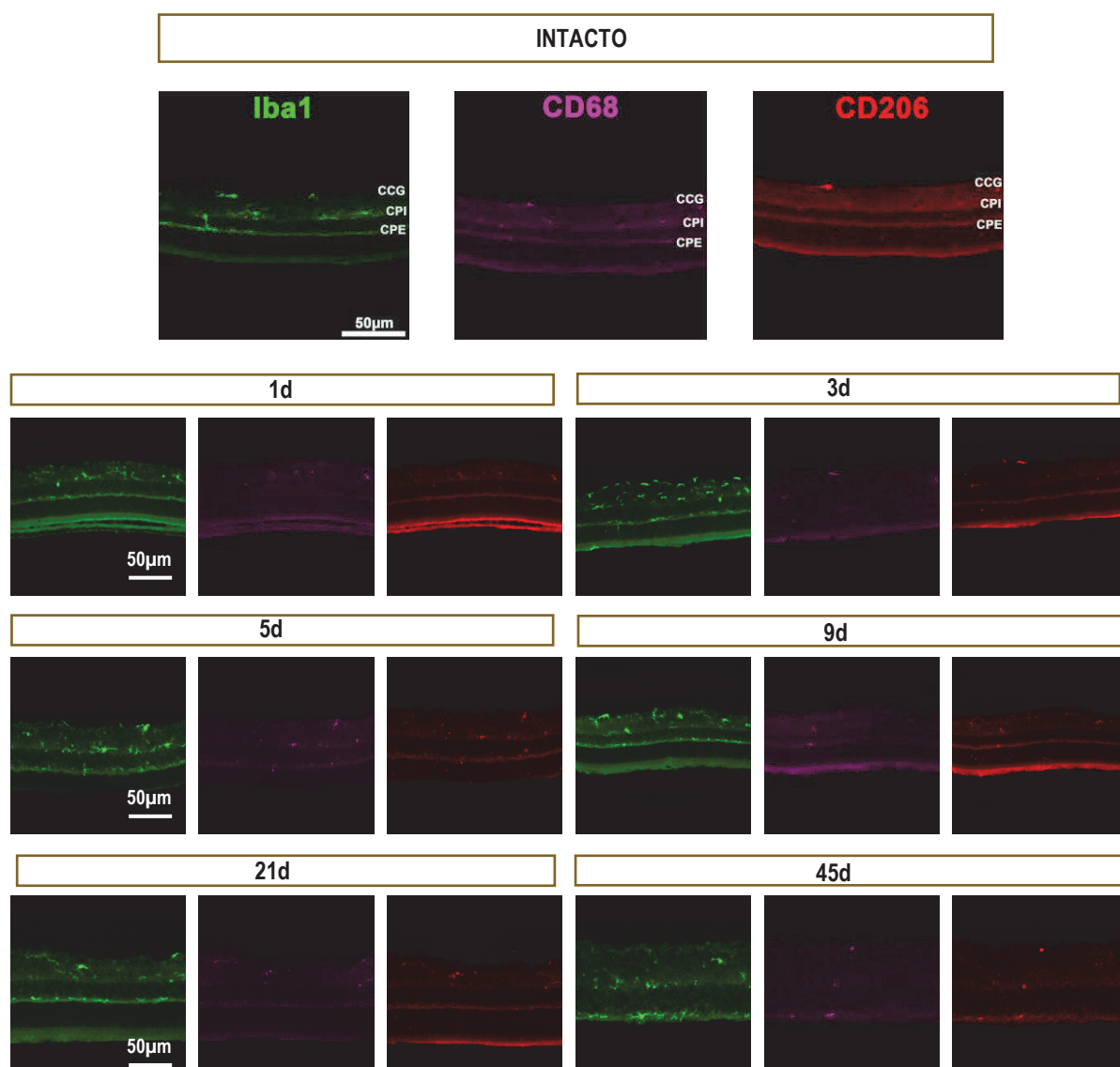
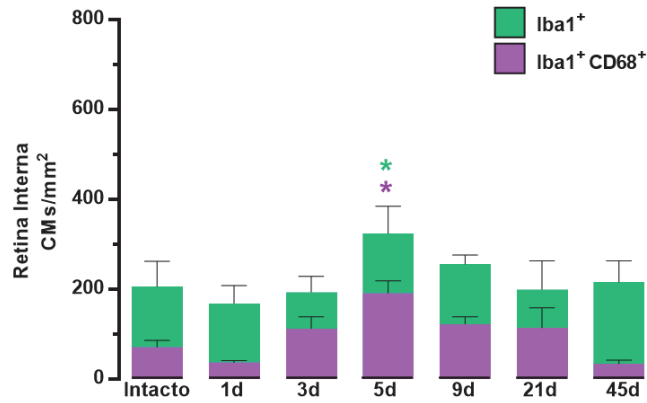
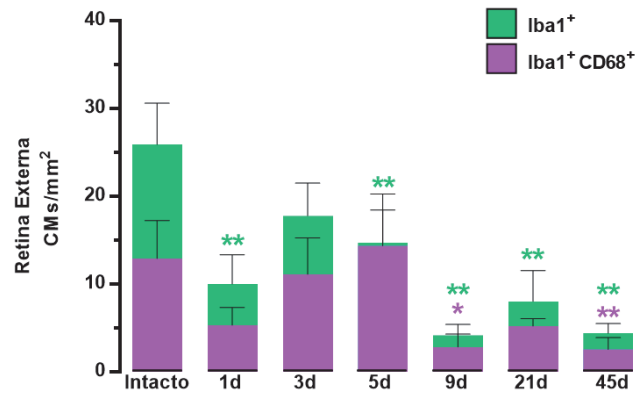


Figura 49: CMs en secciones transversales de retinas contralaterales al ApNO unilateral. Ampliaciones de retinas transversales intactas y contralaterales ilesas analizadas tras ApNO e inmunoteñidas contra Iba1⁺, CD68⁺ y CD206⁺.

A



B



C

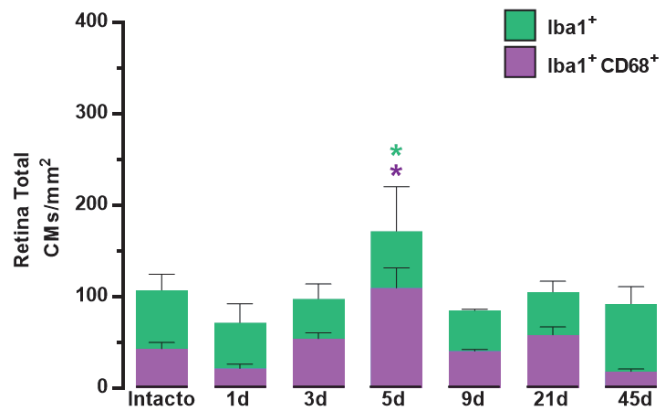


Figura 50: Densidad media (CMs/mm²) ± DE de CMs-Iba1⁺ y CD68⁺ en la retina interna (A), externa (B) y total (C) en retinas contralaterales tras ApNO unilateral. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con las retinas intactas, * p < 0,05, ** p < 0,01.

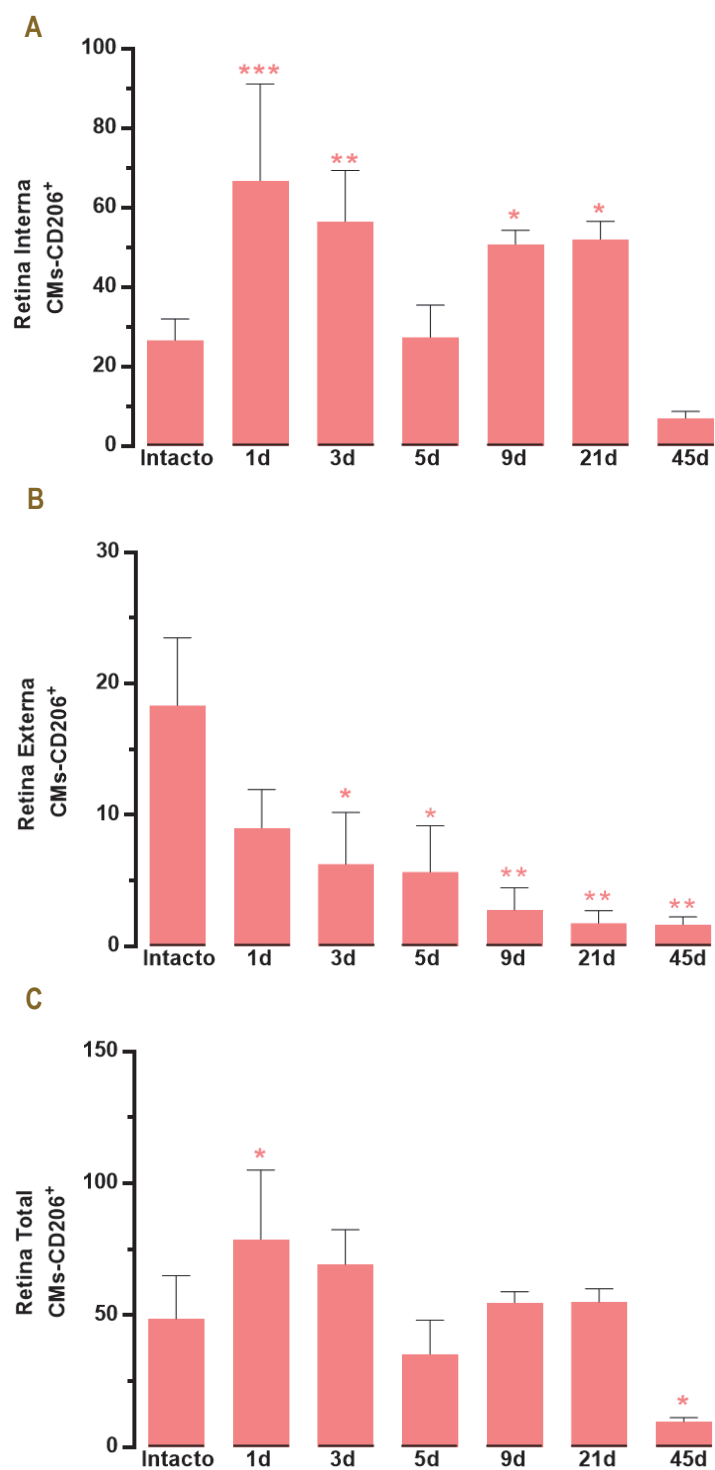


Figura 51: Número total \pm DE de CMs-CD206⁺ en CCG, NO y en CC en las retinas intactas y contralaterales al ApNO unilateral. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En el CCG, la densidad de CMs-Iba1⁺ aumentó significativamente a los 5 días, mientras que la densidad de CMs-CD68⁺ activadas fue significativamente mayor de 1 a 45 días después de ApNO (Figuras 52 y 53).

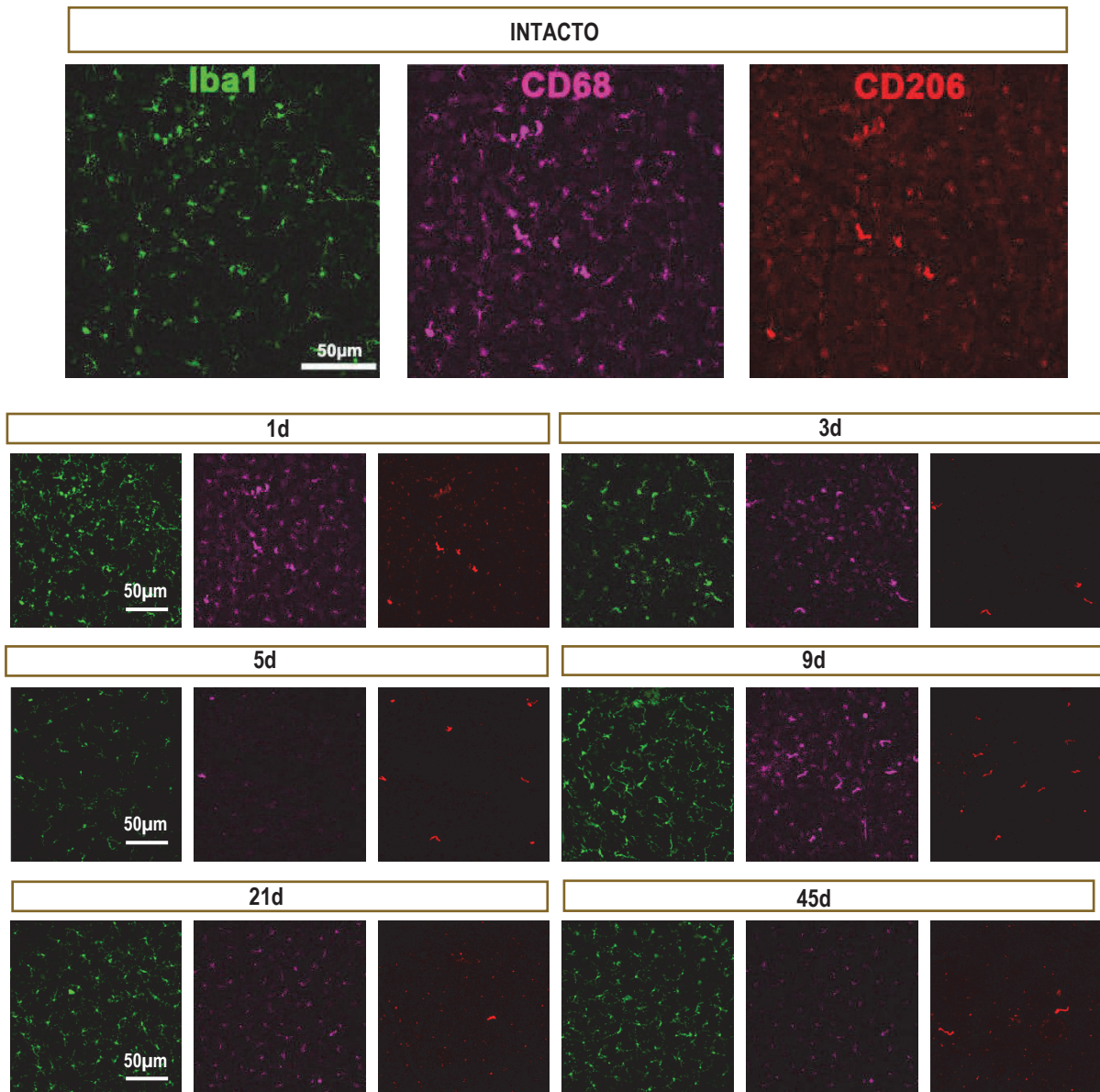


Figura 52: Densidad y activación de CMs en CCG de retinas contralaterales al ApNO unilateral. Ampliaciones de retinas montadas planas intactas contralaterales ilesas enfocadas en la CCG y que muestran inmunotinción de Iba1⁺, CD68⁺ y CD206⁺.

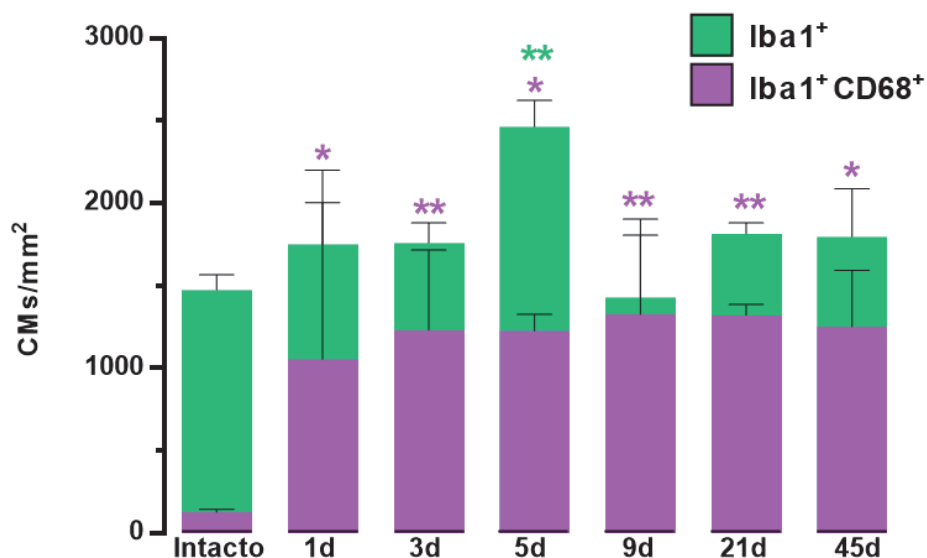


Figura 53: Densidad media (CMs/mm²) ± DE de CMs-Iba1⁺ y CD68⁺ en la CCG de las retinas contralaterales tras ApNO unilateral. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Contrariamente a la respuesta en la retina lesionada, el número total de CMs-CD206⁺ en las retinas contralaterales a la lesión disminuyó a día 1 en el NO y en la retina central/medial, y su número permaneció bajo hasta 45 días. En el CC, el número de CMs-CD206⁺ aumentó significativamente a los 5 días, disminuyendo posteriormente (Figuras 54 y 55). Alrededor del NO se observaron CMs-CD206⁺ claramente activados, cambiando su morfología de manera similar a los de la retina lesionada.

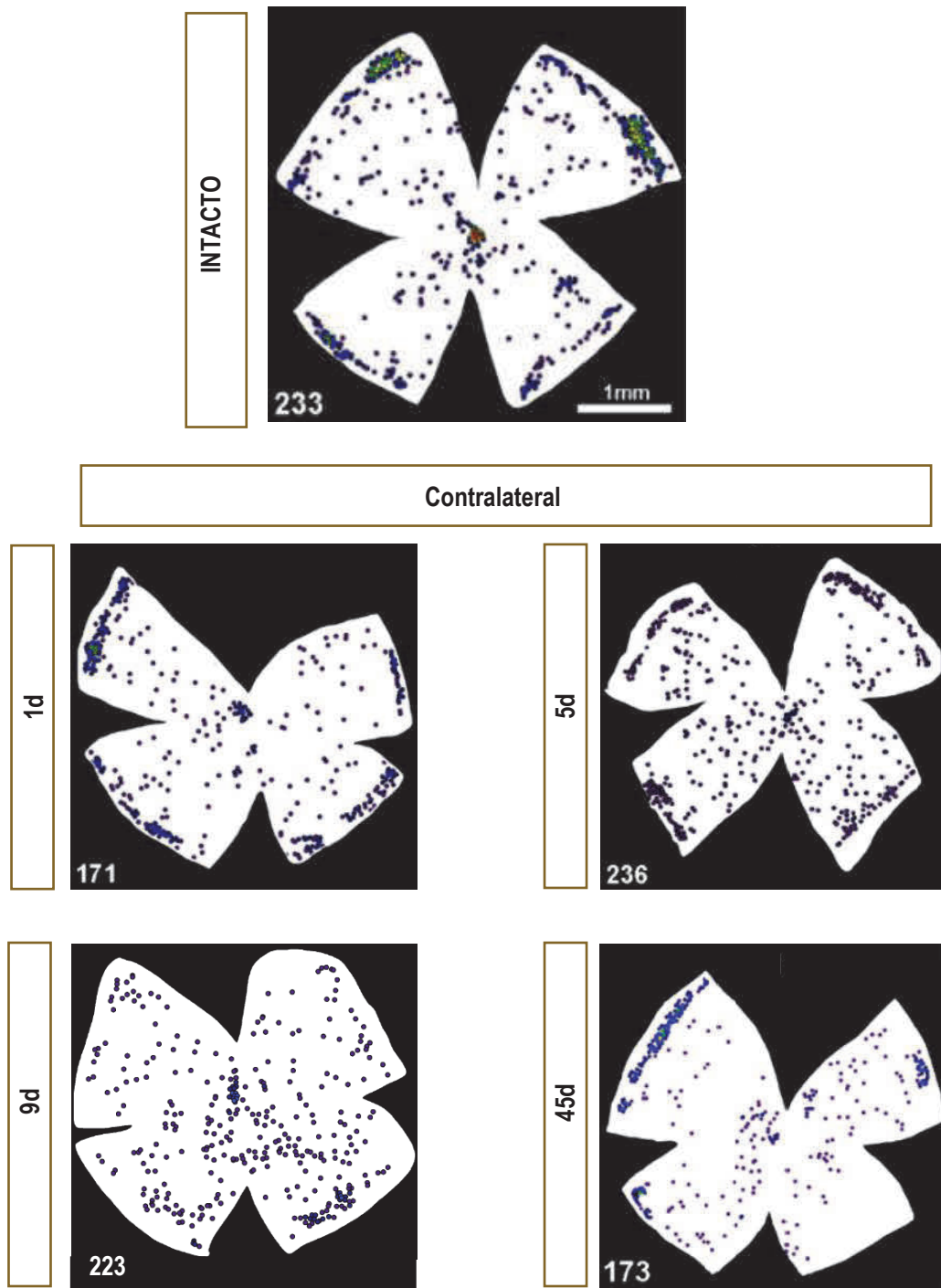


Figura 54: Mapas de vecinos de CMs-CD206⁺ en retinas contralaterales al ApNO unilateral. Los colores fríos (gamas de azules) corresponden a un menor número de vecinos y tienen un rango de tamaño de 0-2 células vecinas y los colores más cálidos (gama de rojos) a un mayor número de vecinos con un rango de tamaño de 19-21 células vecinas. Vemos como en estos mapas de vecinos, tanto a 1 día como a 5 y 9 días hay un r número de vecinos similar al grupo intacto (colores azules y violetas) y como a 45 días el número de vecinos es ligeramente menor al grupo intacto.

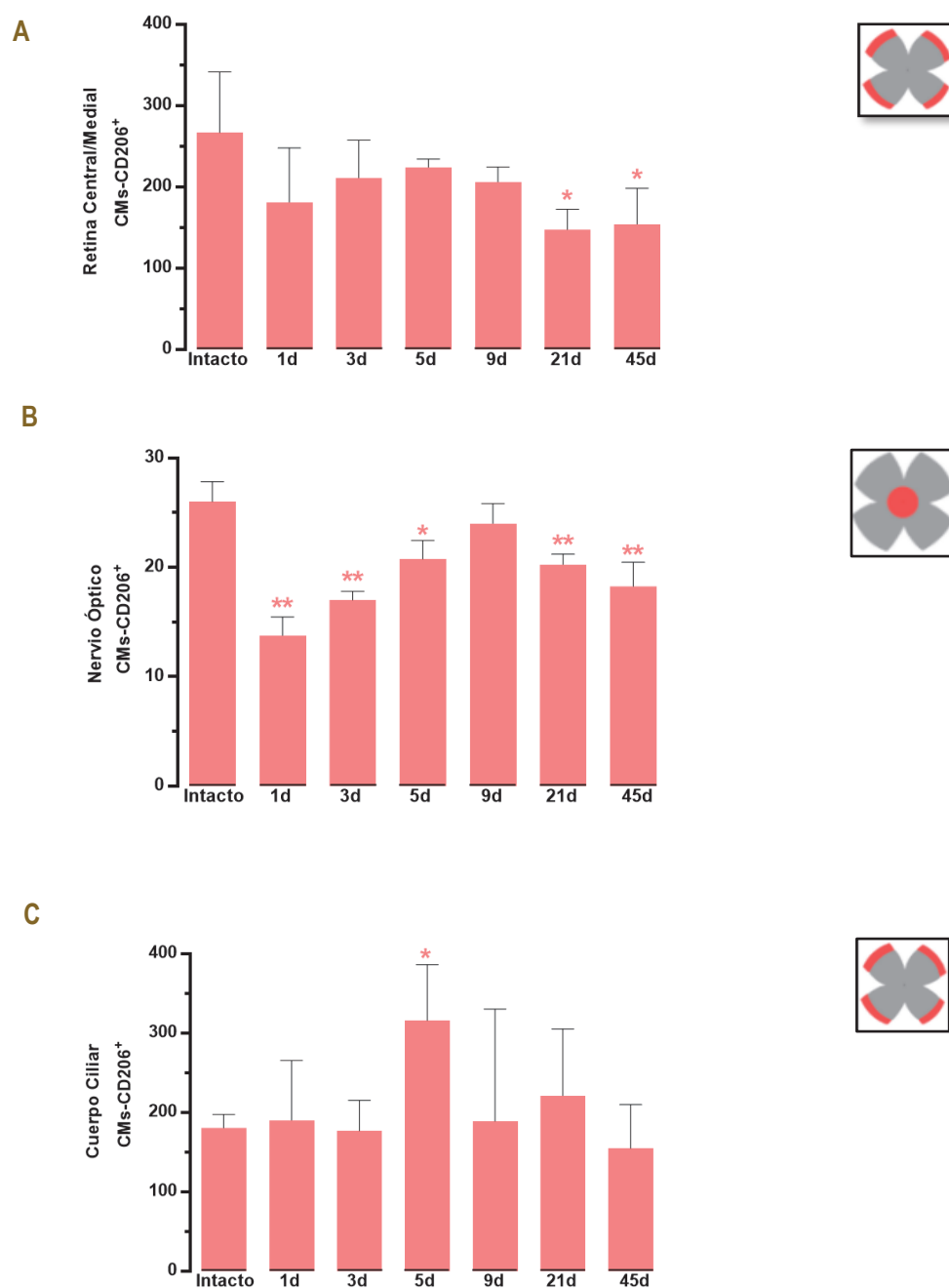


Figura 55: Número total \pm DE de CMS-CD206⁺ en la CCG (A), en la cabeza del NO (B) y en el CC (C), en retinas intactas y contralaterales al ApNO unilateral. Observamos como a 1 día hay un elevado número de CMS-CD206⁺ en el CC que va aumentando hasta 5 días y como a partir de ahí vemos como ese número de CMS-CD206⁺ va disminuyendo. En cuanto al NO vemos como a 1 día hay un número menor de CMS-CD206⁺ y como a partir de 5 días y 9 días incrementa el número de CMS-CD206⁺ hasta que vuelve a bajar a 45 días. Prueba de Kruskal-Wallis, significativamente diferente en comparación con retinas intactas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

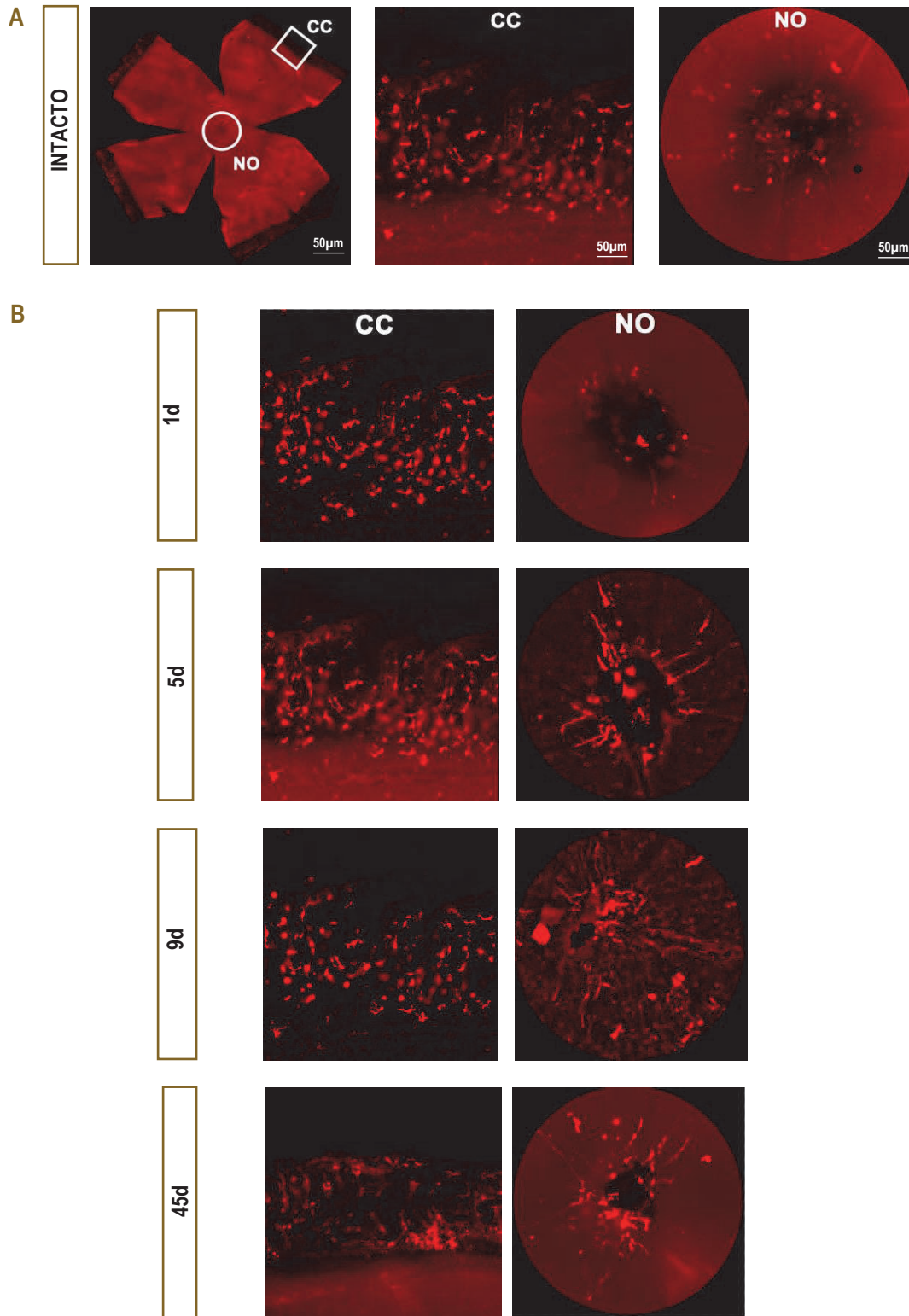


Figura 56: Cms-CD206⁺ en la cabeza del NO y en el CC en retinas intactas y contralaterales tras ApNO unilateral a diferentes días. (A): Izquierda: fotomontaje de una retina intacta montada en plano que muestra inmunodetección de CD206. Medio, magnificación del CC y a la derecha, magnificación de la cabeza del NO. Estos aumentos son de las áreas enmarcadas que se muestran en el fotomontaje. (B): Magnificaciones de la cabeza del NO y del CC en retinas contralaterales a la lesión a diferentes tiempos.

IV.1.3. ACTIVACIÓN MACROGLIAL EN RETINAS LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN

IV.1.3.1. Activación macroglial en retinas lesionadas

En retinas intactas, la expresión de GFAP y vimentina se restringió en la CCG (Figura 57). Después de la axotomía, la señal de GFAP y vimentina aumentó en la CCG a los 5 y 9 días y disminuyó a los 21 días, lo que indica una hipertrofia transitoria de los astrocitos y de las células de Müller (Figura 57). Con respecto a la expresión de GFAP y de las células de Müller (desde la retina interna a la externa), fue sorprendente ver que no hubo mucha activación, excepto 9 días después de la lesión cuando se observó tinción de GFAP a lo largo de las células de Müller (Figura 57). En consecuencia, el aumento de la señal de vimentina fue sutil pero evidente de 5 a 21 días después de la lesión.

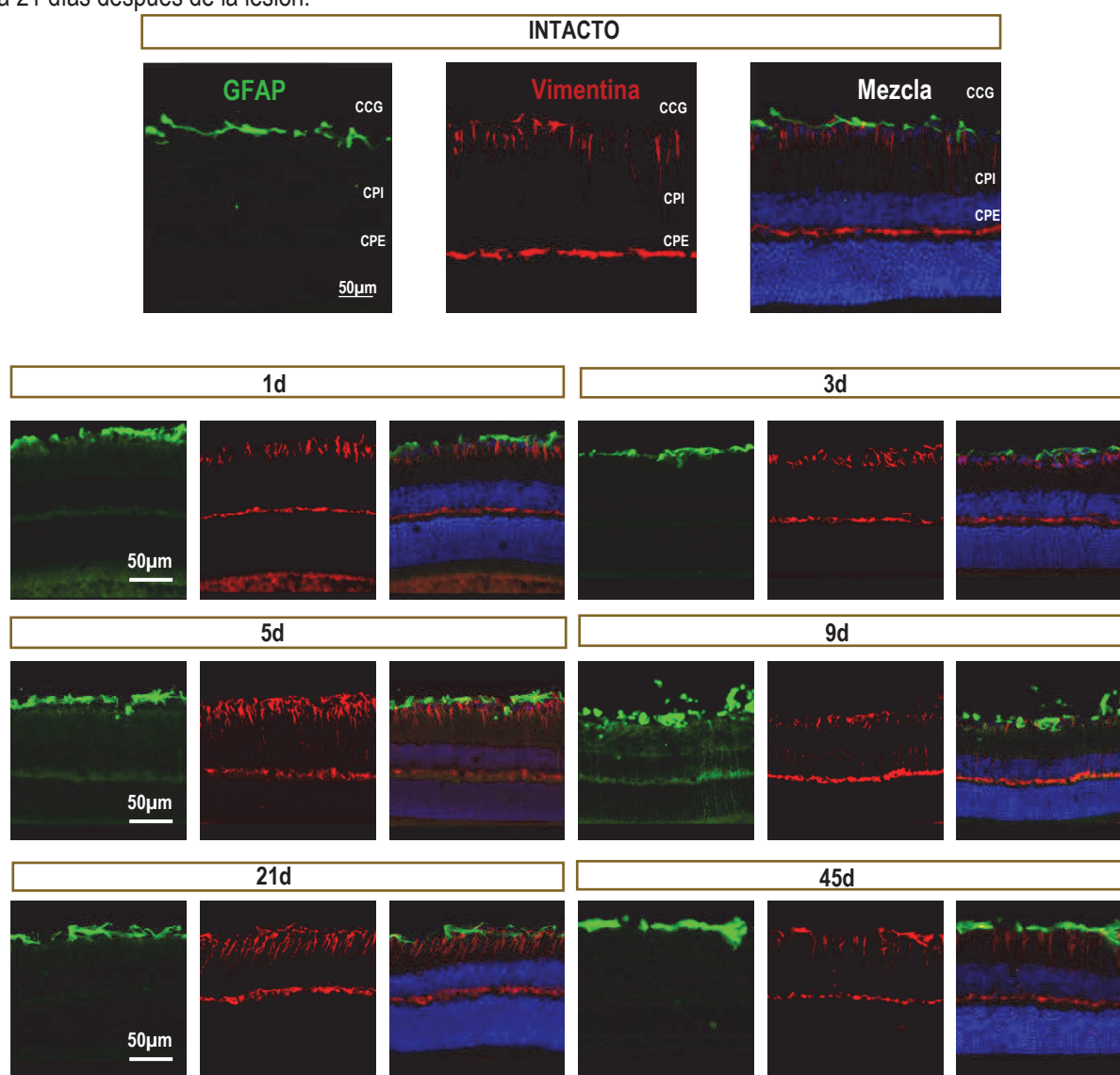


Figura 57: Activación de astrocitos y células de Müller en retinas axotomizadas. Aumentos de retinas en sección transversal intactas y lesionadas inmunoteñidas contra GFAP y vimentina, y contrateñidas con DAPI. CCG: capa de células ganglionares; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna.

IV.1.3.2. Activación macroglial en retinas contralaterales

En las retinas contralaterales a la lesión, no hubo cambios cualitativos en la expresión de estas dos proteínas en comparación con las retinas intactas, excepto en el día 3 post-lesión cuando en la CCG la señal de GFAP y vimentina fue más brillante que en el resto de los puntos temporales (Figura 58), lo que indica una hipertrofia transitoria de los pies de los astrocitos y las células de Müller.

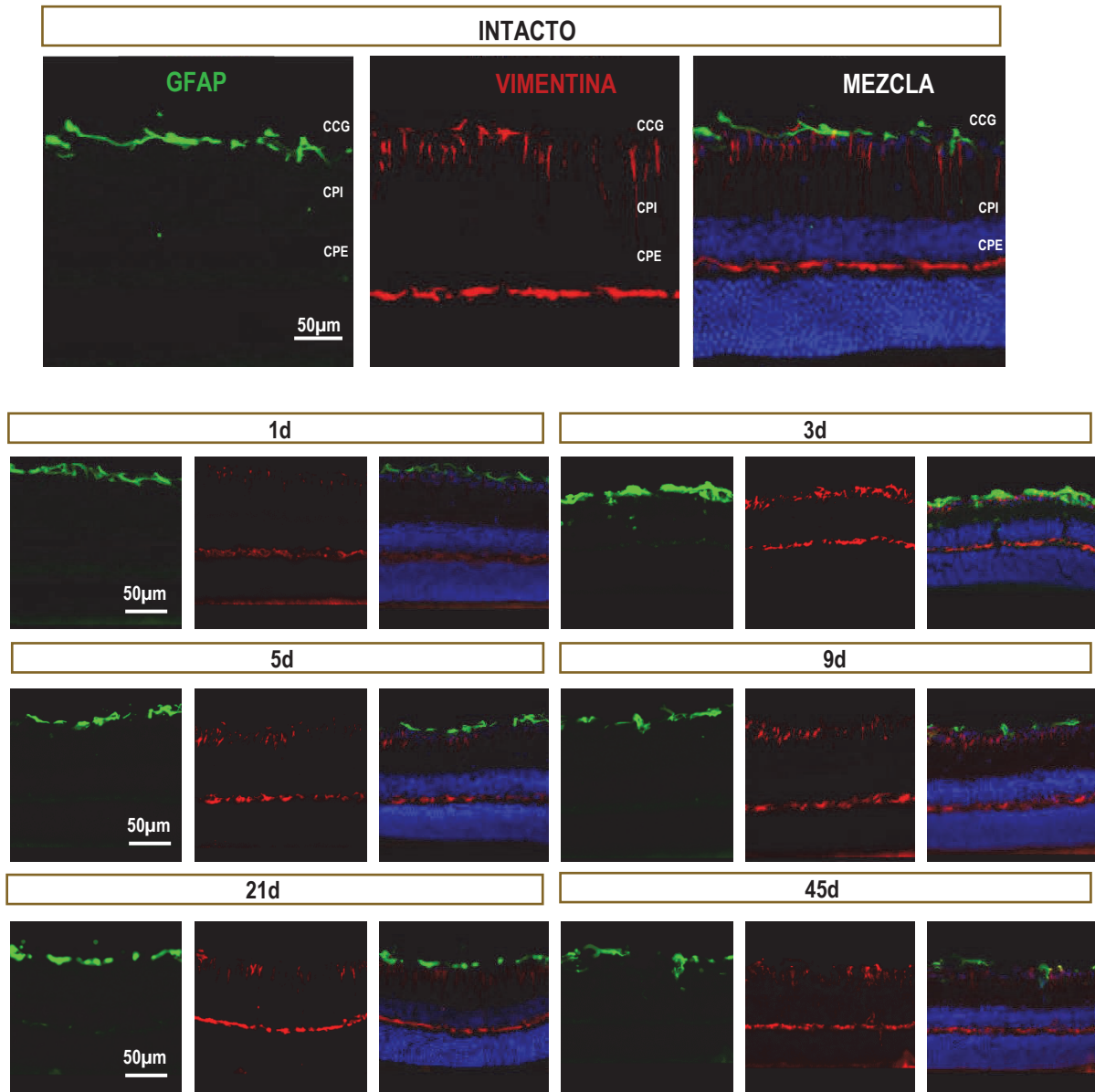


Figura 58: Activación de astrocitos y células de Müller en retinas contralaterales al ApNO unilateral. Aumentos de retinas en sección transversal intactas y lesionadas inmunoteñidas contra GFAP y vimentina, y contrateñidas con DAPI. CCG: capa de células ganglionares; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna.

IV.1.4. RESUMEN

MICROGLIA

- I) En retinas intactas, las CMs-Iba1⁺ tenían una morfología ramificada y estaban distribuidas uniformemente por la retina, indicando un estado de reposo. Las CMs activadas, CD68⁺ y CD206⁺ se observaron alrededor del NO y en el CC y su morfología era más redondeada, con pocas o ninguna ramificación.
- II) En secciones transversales de retina, se observó que la densidad de CMs-Iba1⁺ y CD68⁺ aumentaban en la retina interna y disminuían en la retina externa tras axotomía. Estos datos sugerían que las CMs-Iba1⁺ y CD68⁺ migraban desde la retina externa a la CCG donde los CGRs se estaban muriendo.
- III) En secciones transversales de retina contralaterales a la lesión, se observó el mismo patrón de CMs-Iba1⁺ y CD68⁺ que en las retinas axotomizadas, pero más atenuado.
- IV) En retinas montadas a plano, las CMs-CD206⁺ se encontraron principalmente alrededor del NO y en el CC, y algunas dispersas por la retina. Tras la axotomía hubo una relación inversa entre el aumento del número total de CMs-CD206⁺ en CCG y la disminución alrededor de la cabeza del NO. También hubo un aumento del número de CMs-CD206⁺ en el CC, que precedió al de la retina. En cuanto a la morfología, las CMs-CD206⁺ cambiaban, y se observó unas CMs más alargadas y delgadas. Además, en la cabeza del NO y CC mostraron una orientación polarizada hacia la retina.
- V) En la retina contralateral a la lesión, al estudiar la densidad de las CMs-Iba1⁺ en la CCG se vio un aumento significativamente a los 5 días, mientras que la densidad de CMs-CD68⁺ activadas fue significativamente mayor de 1 a 45 días después de ApNO. Al analizar el número total de CMs-CD206⁺ se vio como estas disminuyeron. Alrededor de la cabeza del NO se observaron CMs-CD206⁺ claramente activadas, cambiando su morfología de manera similar a los de la retina lesionada.

MACROGLIA

- VI) En retinas intactas, la expresión de GFAP y vimentina se restringió en la CCG.
- VII) En retinas lesionadas, la señal de GFAP y vimentina aumentó en la CCG a los 5 y 9 días y disminuyó a los 21 días, lo que indica una hipertrofia transitoria de los astrocitos y de los pies terminales de las células de Müller.
- VIII) En retinas contralaterales la señal de GFAP y vimentina a 3 días fue más brillante que en el resto de los puntos temporales, lo que indica una hipertrofia transitoria de los astrocitos y las células de Müller.

IV.1.5. SUMMARY

MICROGLÍA

- I) In intact retinas, MCs-Iba1⁺ had a branched morphology and were evenly distributed throughout the retina, indicating a resting state. Activated, MCs-CD68⁺ and MCs-CD206⁺ CMs were observed around the ON and in the CB and their morphology was more rounded, with little or no branching.
- II) In retinal cross-sections, it was observed that the density of Iba1⁺ and CD68⁺ CMs increased in the inner retina and decreased in the outer retina after axotomy. These data suggested that MCs-Iba1⁺ and MCs-CD68⁺ migrated from the outer retina to the GCL where RGCs were dying.
- III) In retinal cross-sections contralateral to the lesion, the same pattern of MCs-Iba1⁺ and MCs-CD68⁺ was observed as in axotomized retinas but more attenuated.
- IV) In flat-mounted retinas, the MCs-CD206⁺ were mainly found around the ON and in the CB, with some scattered throughout the retina. After axotomy, there was an inverse relationship between the increase in the total number of MCs-CD206⁺ in the GCL and the decrease around the NO head. There was also an increase in the number of MCs-CD206⁺ in the CB, which preceded that in the retina. In terms of morphology, the MCs-CD206⁺ CMs changed, and more elongated and thinner MCs were observed. In addition, in the ON and CB head, they showed a polarised orientation towards the retina.
- V) In the contralateral to the lesion retina, studying the density of MCs-Iba1⁺ in the GCL showed a significant increase at 5 days, while the density of activated MCs-CD68⁺ was significantly higher from 1 to 45 days after ONC. Analysis of the total number of MCs-CD206⁺ showed a decrease in the number of MCs-CD206⁺. Around the ON head, clearly activated CD206⁺-MCs were observed, changing their morphology similar to those in the injured retina.

MACROGLIA

- VI) In intact retinas, GFAP and vimentin expression was restricted in the GCL.
- VII) In lesioned retinas, GFAP and vimentin signal increased in the GCL at 5 and 9 days and decreased at 21 days, indicating transient hypertrophy of astrocytes and Müller cell endfeet.
- VIII) In contralateral retinas the GFAP and vimentin signal at 3 days was brighter than in the rest of the time points, indicating a transient hypertrophy of astrocyte and Müller cell.

IV.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE CURSO DE MUERTE DE CGRs Y ACTIVACIÓN MICROGLIAL ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS

IV.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el siguiente esquema se muestra el diseño experimental del segundo objetivo, en el que se han utilizado un total de 32 ratones hembra de la cepa C57/BL6 (Figura 59).

Las retinas *in vivo* e *in vitro* se analizaron en puntos de tiempo crecientes tras la lesión o los días de cultivo (n = 4-6 retinas/punto de tiempo/análisis). Como control se utilizaron retinas intactas procesadas como CORs o como retinas montadas a plano estándar (n = 4-6 retinas/análisis) como se ve en la Figura 59.

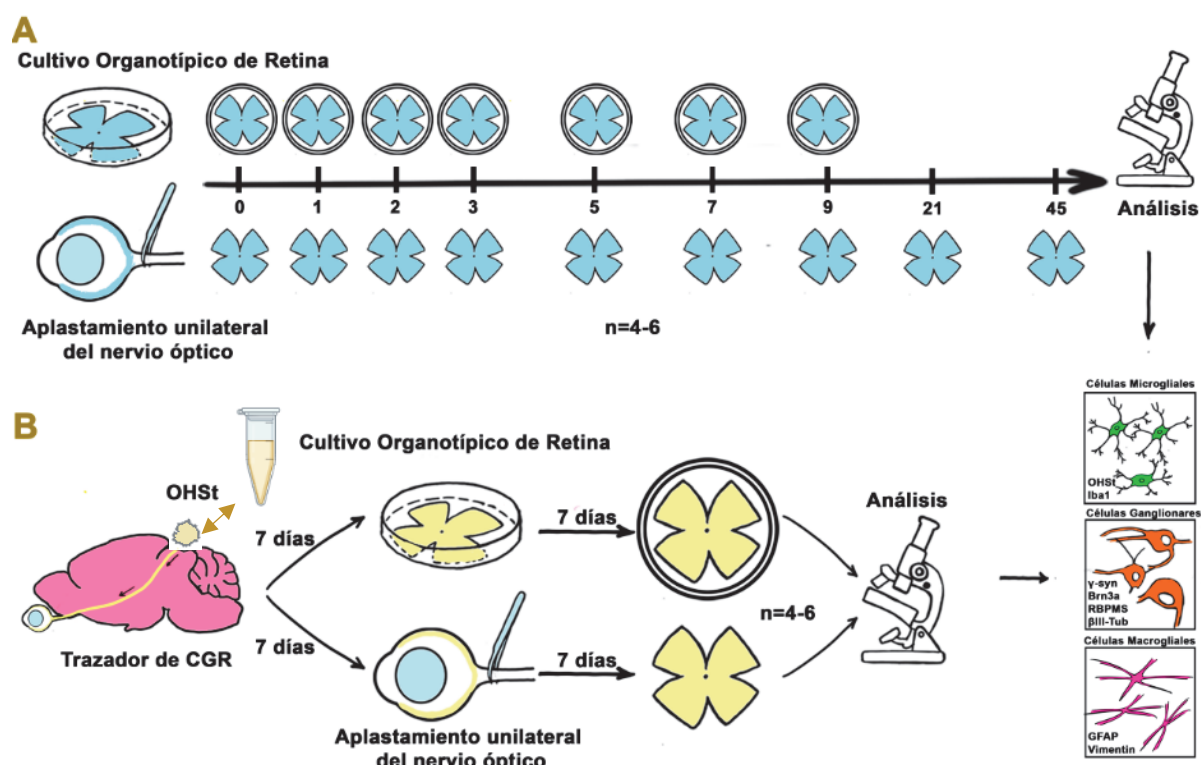


Figura 59: Diseño experimental.

IV.2.2. CURSO TEMPORAL DE MUERTE DE LAS CGRs: CORs vs. ApNO

En primer lugar, caracterizamos la población de CGRs con dos marcadores Brn3a y RBPMS, en retinas intactas procesadas con dos técnicas diferentes: para el estudio *in vivo* las retinas se obtuvieron de animales intactos perfundidos transcárdialmente (ver apartado III.5.3 de materiales y métodos). Para las retinas *in vitro* se diseccionaron en fresco a partir de animales intactos utilizando la técnica de disección de explantes, pero sin colocarlos en los insertos (ver apartado III.5.5 de material y métodos). Una vez obtenidas las retinas de ambos grupos, se inmunodetectaron inmediatamente y se analizaron.

Inmunodetectamos las CGRs con los marcadores más utilizados, Brn3a y RBPMS (Nadal-Nicolas y cols., 2009; Kwong y cols., 2010; Galindo-Romero y cols., 2011; Rodríguez y cols., 2014). Brn3a es un factor de transcripción que se regula a la baja cuando la CGRs está comprometida con la muerte (Sánchez-Migallón y cols., 2016), es decir, Brn3a es un marcador de viabilidad, mientras que la expresión de RBPMS es somática y su regulación a la baja aún no se ha relacionado con la viabilidad de las CGRs.

Como se muestra en la **Figura 60**, las técnicas de disección y fijación no afectaron a la inmunodetección de las CGRs. Por lo tanto, aunque para cada análisis utilizamos los controles apropiados (es decir, perfundidos para ApNO; disecados en fresco para las CORs) las llamaremos retinas intactas (**Figura 61**). Cabe destacar que la densidad media de CGRs-RBPMS⁺ es ligeramente superior a la de CGRs-Brn3a⁺. Brn3a sólo se expresa en las CGRs que forman la visión, mientras que RBPMS también se expresa en las CGRs intrínsecamente fotosensibles, que en el ratón representan el 7,5% de todas las CGRs (Cheng y cols., 2021).

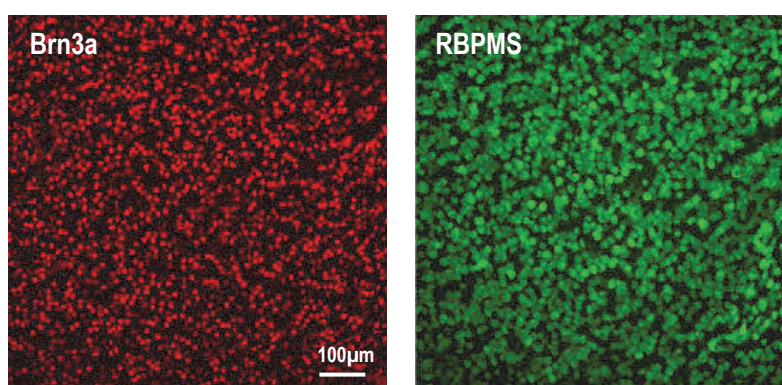


Figura 60: CGRs en retinas intactas. Ampliaciones representativas de retinas intactas que muestran las CGRs-Brn3a⁺ (rojo) y RBPMS⁺ (verde).

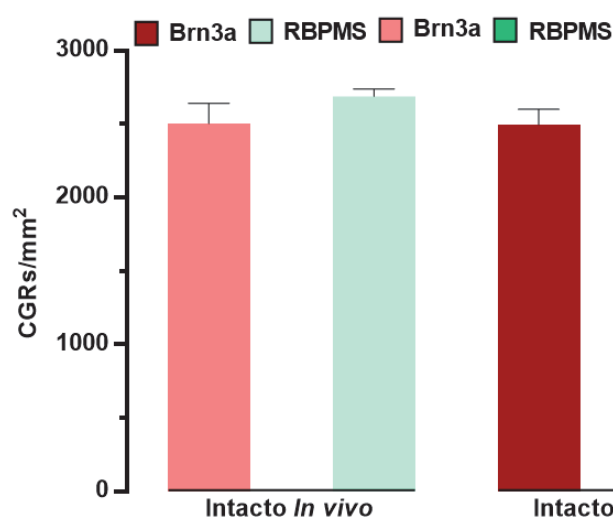


Figura 61: Densidad media (cels/mm²) ± DE de CGRs-Brn3a⁺ (A) y CGRs-RBPMS⁺ (B) en retinas intactas.

La muerte de CGRs tras ApNO siguió el curso descrito por nuestro laboratorio (*Galindo-Romero y cols., 2011, 2013; Sánchez-Migallón y cols., 2016*) alcanzando significación estadística con ambos marcadores a los 3 días de la lesión. En las CORs, la pérdida de CGRs fue significativa al día 1 o al día 2 dependiendo del marcador utilizado (**Figura 62**).

En el día 7 *in vitro*, la densidad de CGRs inmunodetectadas con Brn3a descendió a un tercio de la densidad encontrada tras ApNO. Sorprendentemente, este fuerte descenso no se observó en la inmunodetección de RBPMS (**Figuras 62 y 63**).

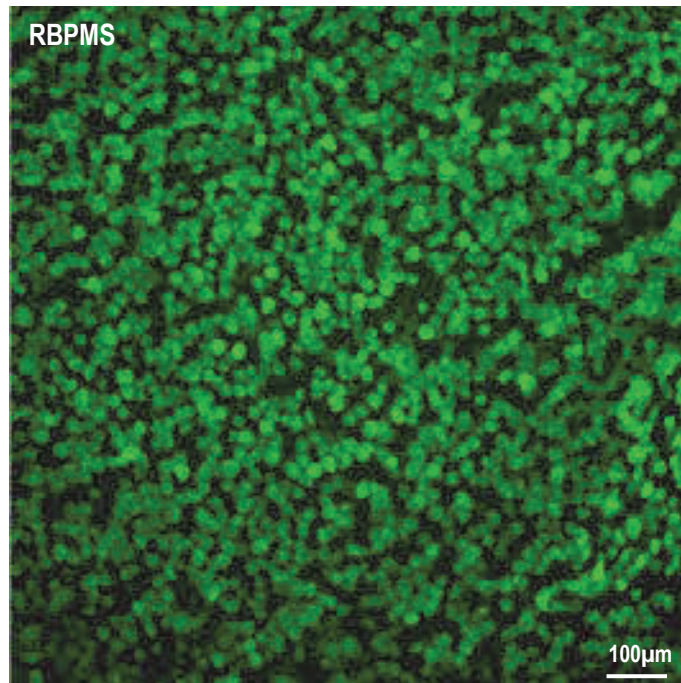
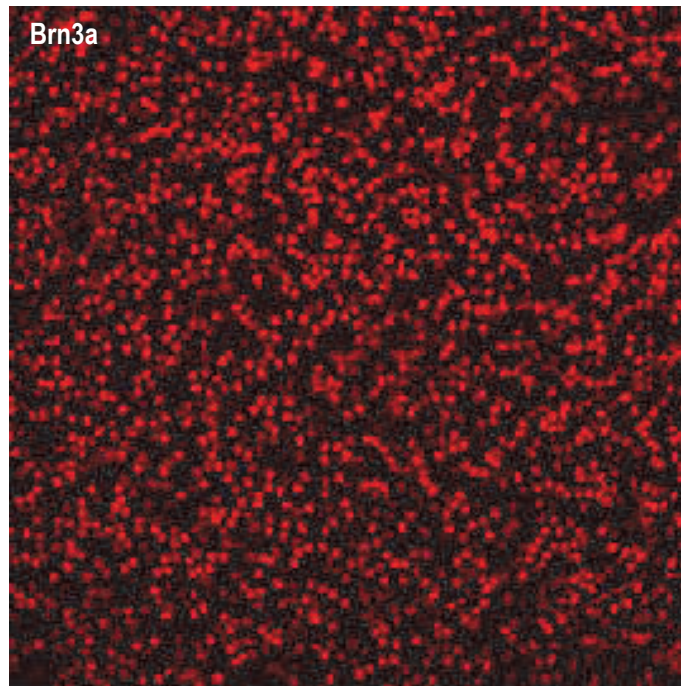
Al comparar los modelos y los marcadores, los análisis de regresión mostraron que la pérdida de CGRs no difería entre los modelos y los marcadores hasta el día 5 (pendiente -pérdida calculada de densidad celular/día- para Brn3a -128 (ApNO) y -139 (CORs); para RBPMS -130 (ApNO) y -139 (CORs); $p > 0,05$). Por lo tanto, durante esta ventana de tiempo (0-5 días) la pérdida de CGRs sigue la misma cinética en ambos modelos y con ambos marcadores (**Figura 63**).

Del día 5 al 7 hubo diferencias entre modelos y marcadores. Cuando las CGRs se identificaron con Brn3a el curso de la muerte fue significativamente más rápido en los CORs que después de ApNO (pendientes -131 (ApNO) y -455 (CORs); $p < 0,0001$) y cuando las CGRs se identificaron con RBPMS ocurrió lo contrario: La pérdida de CGRs fue significativamente más rápida después de ApNO (pendiente -115) que en los CORs (pendiente -70. $p = 0,048$) (**Figura 63**).

A continuación, calculamos la relación Rbpms: Brn3a. De acuerdo con los análisis de regresión, esta relación osciló entre 1,1 y 1,2 desde la línea de base (intacta) hasta el día 9 después de ApNO y desde la línea de base hasta el día 5 en los CORs. Sin embargo, a los días 7 y 9 en los CORs había, respectivamente, 3,5 y 5,2 más CGRs-Rbpms⁺ que CGRs-Brn3a⁺ (**Figura 63**).

Para comprobar si otras proteínas estructurales seguían presentes en las CORs cuando las CGRs habían perdido su viabilidad, analizamos la expresión de β -III tubulina y γ -sinucleína, ambas proteínas del citoesqueleto y marcadores de CGRs, en retinas intactas y en CORs de 7 días (*Buckingham y cols., 2008; Miller y cols., 2020*). Como se observa en la **Figura 64**, la densidad de las CGRs marcadas con estos dos marcadores no difiere de la encontrada en las RBPMS, lo que significa que las proteínas estructurales, pero no las de viabilidad, siguen presentes en el tejido.

INTACTO



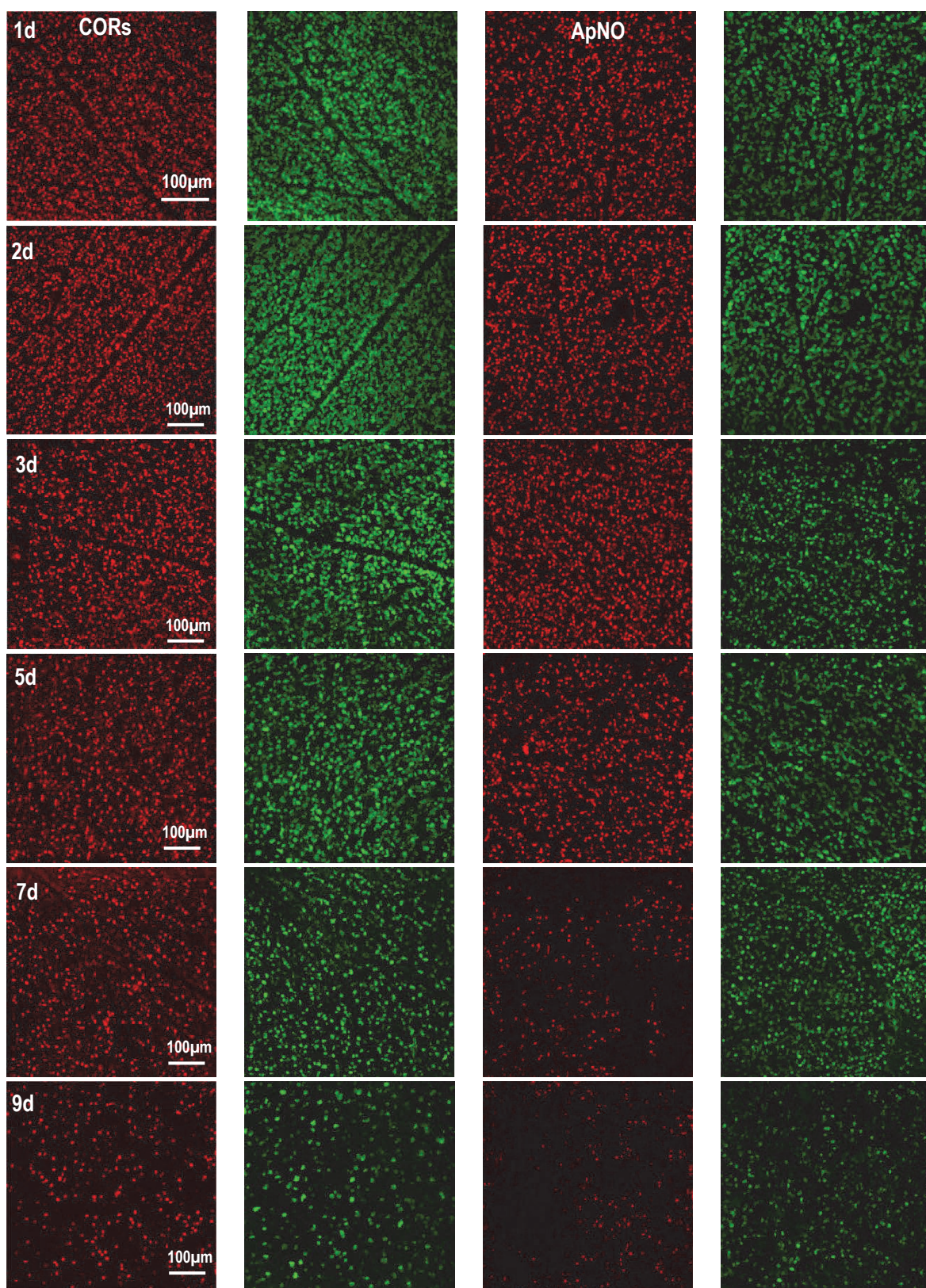


Figura 62: CGRs en retinas intactas y tras CORs y ApNO unilateral. Ampliaciones representativas de retinas intactas y de retinas analizadas de 1 a 9 días después de CORs y de ApNO que muestran las CGRs-Brn3a⁺ (rojo) y RBPMS⁺ (verde).

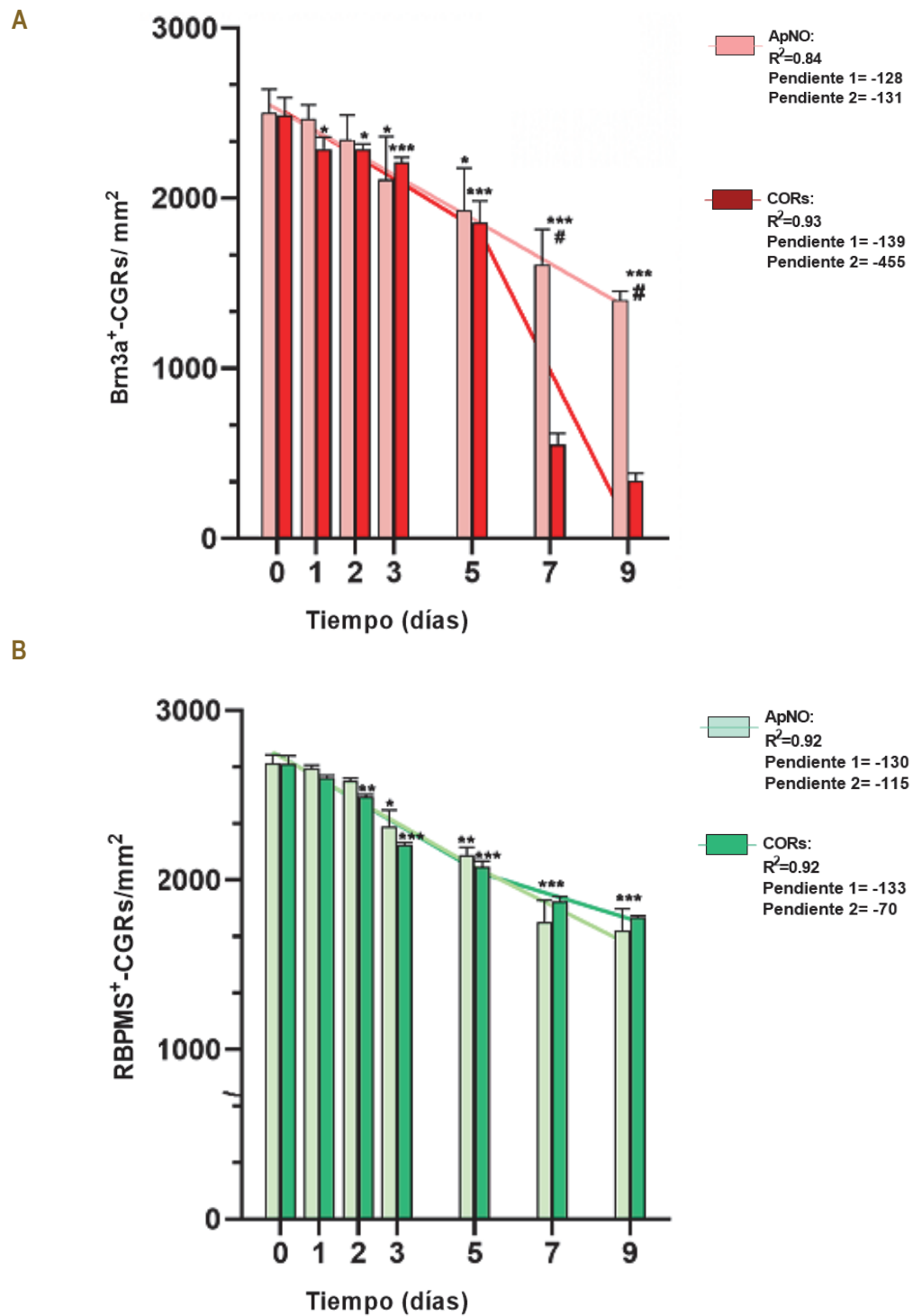


Figura 63: Gráficos X, Y (tiempo frente a células) que muestran la densidad media \pm DE (células/mm²) de CGRs-Brn3a⁺ (A) y CGRs-Rbpms⁺ (B) en ambos grupos. El tiempo 0 son datos de retinas intactas. La regresión lineal se calculó en dos fases (X₀ en el día 5). La pendiente 1 no difiere entre modelos o marcadores. La pendiente 2 es significativamente más pronunciada en los CORs que después de ApNO para Brn3a, y después de ApNO que en los CORs para RBPMS (p<0,0001). * Intacto frente a experimental (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, prueba de Kruskal-Wallis, prueba de comparaciones múltiples de Dunn); # ApNO frente a CORs (#p<0,001, prueba de Mann-Whitney). n=4-6 retinas/grupo/punto temporal.

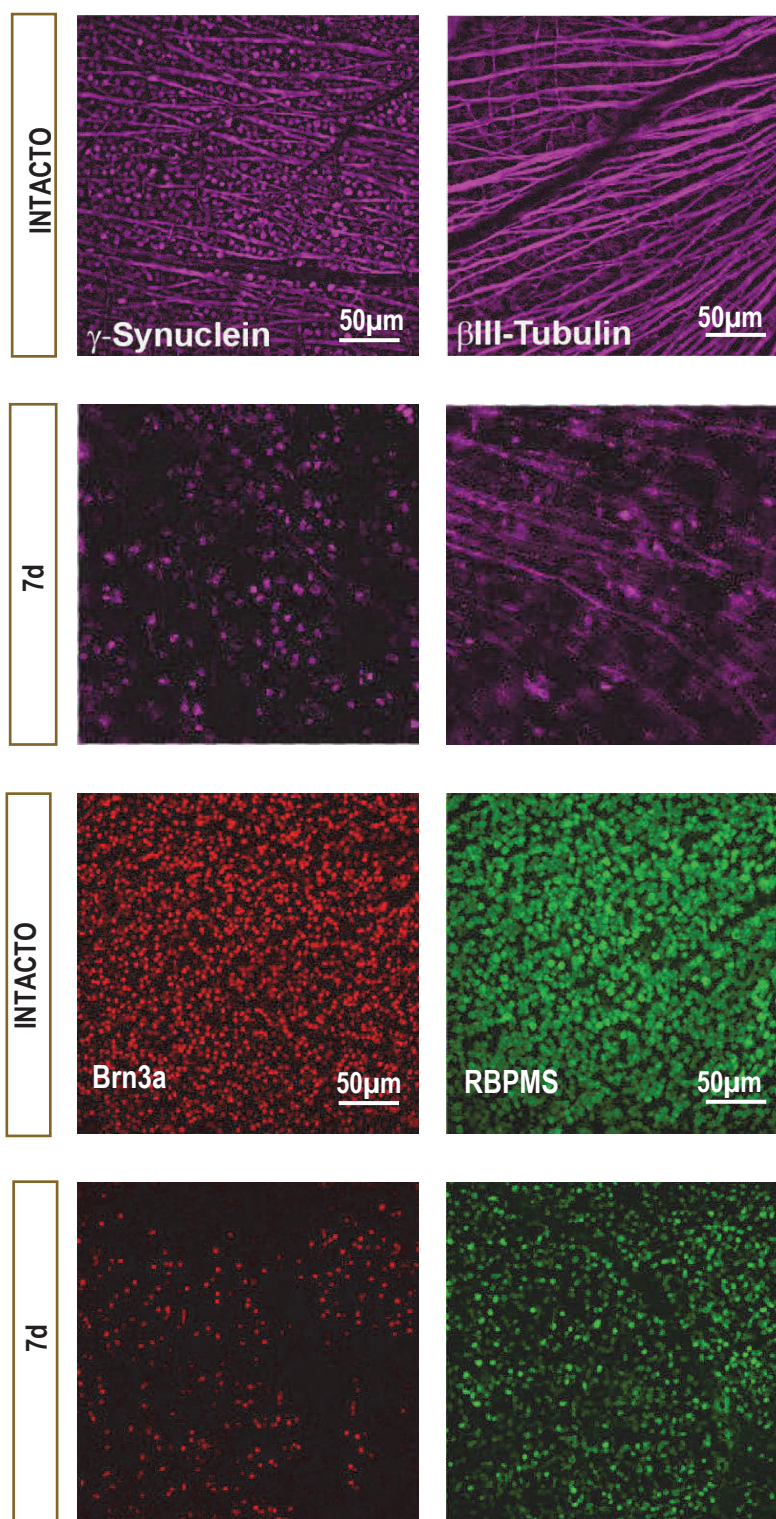


Figura 64: CGRs a 7 días en CORs inmunodetectadas con diferentes marcadores. Ampliaciones representativas de retinas intactas y CORs a los 7 días que muestran la inmunodetección de γ -sinucleína, β III tubulina, Brn3a y RBPMS.

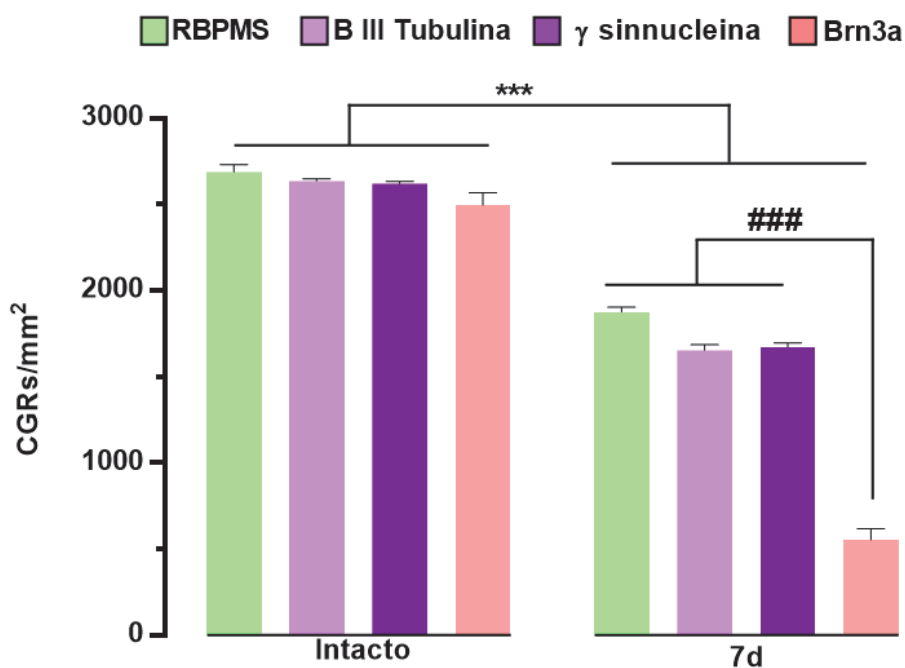


Figura 65: Densidad media (cels/mm²) ± DE de CGRs inmunodetectadas con cada marcador en retinas intactas y 7 días después de CORs. * Diferencia significativa entre las retinas intactas y las de 7 días (**p<0,001, prueba de Mann-Whitney); # No hay diferencia significativa entre los marcadores a los 7 días (###p<0,001, prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, Dunn). n=4-6 retinas/grupo.

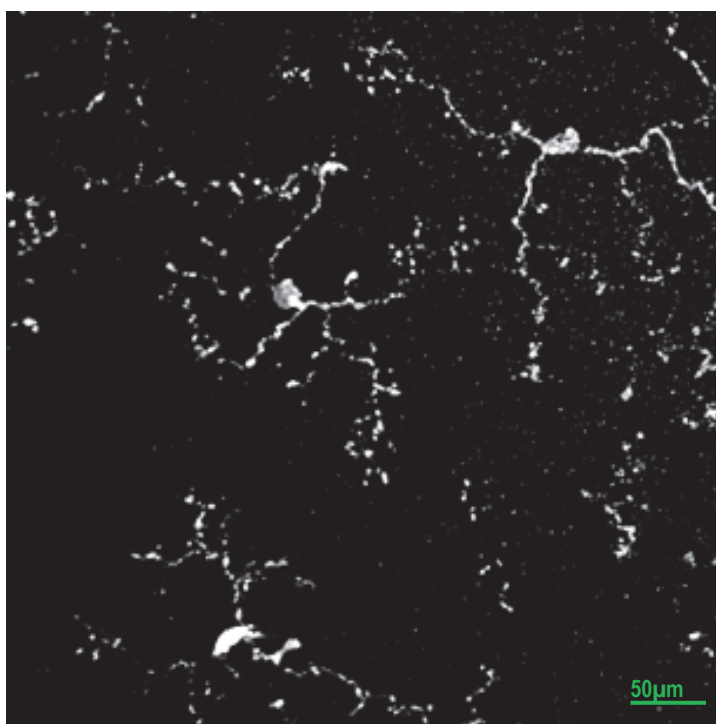
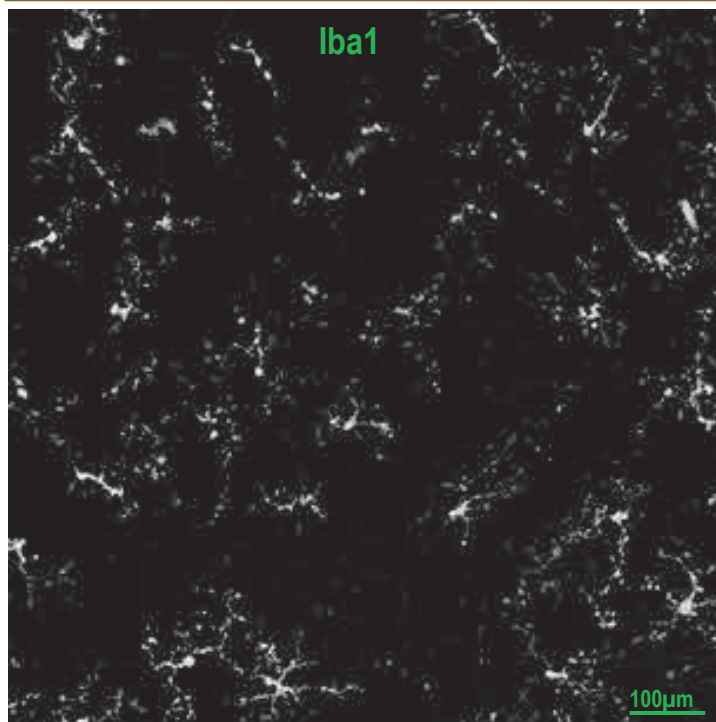
IV.2.3. ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN LOS CORS vs ApNO

A continuación, se estudió las CMs en la CCG de las retinas intactas, en los CORs y después de ApNO. En cuanto a la morfología, ya que la microglía es un factor importante en la eliminación de las CGRs muertas del tejido.

En las retinas tras ApNO, las CMs mostraron cambios morfológicos tempranos de activación, como somas redondeados y prolongaciones más cortas y menos numerosas que en su estado de reposo (Figura 66). A partir de los 5 días, muchas CMs tenían una morfología alargada con dos procesos principales y se encontraban a lo largo de los axones de las CGRs, irradiando desde la cabeza del NO como se ha informado (Nadal-Nicolás y cols., 2017; González-Riquelme y cols., 2021). Este patrón topográfico no se observó en las CORs.

INTACTO

Iba1



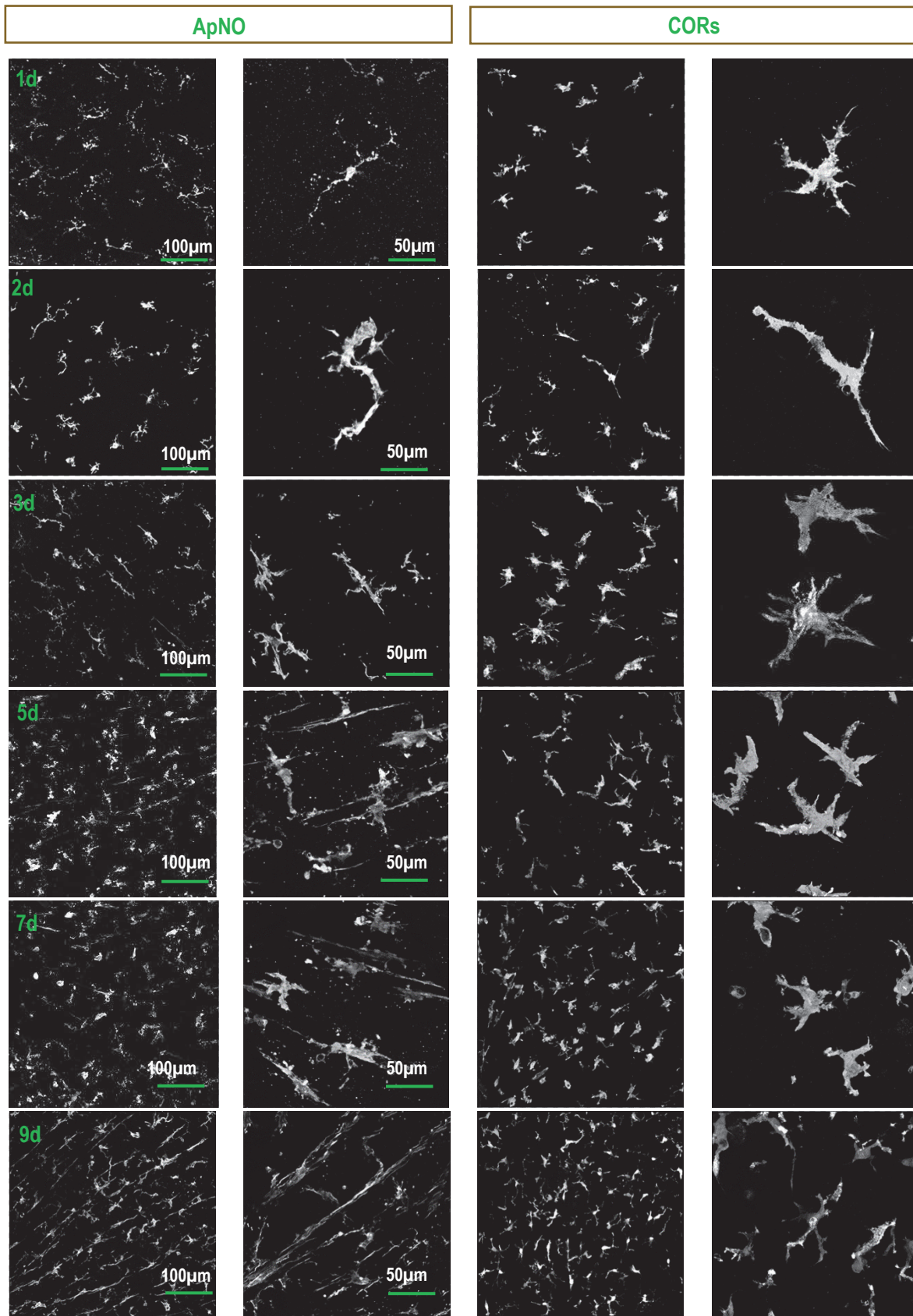


Figura 66: Pérdida de CMs en CCG de los CORs y tras ApNO unilateral. Ampliaciones representativas de retinas intactas y retinas analizadas de 1 a 9 días después de CORs y ApNO que muestran CMs-Iba1⁺.

En las CORs, las CMs también mostraron una activación temprana, pero su morfología difería de la de las retinas tras ApNO con somas más grandes y ramas más gruesas. Esta morfología engrosada se observó en todos los puntos temporales y fue especialmente clara a los 3 días *in vitro* (Figura 66).

Tras ApNO, la densidad de células Iba1⁺ en la CCG aumentó linealmente desde el día 1, tal y como se ha descrito (Galindo-Romero y cols., 2013a; González-Riquelme y cols., 2021). En las CORs, hubo una disminución significativa de las células Iba1⁺ en el día 1 y posteriormente su densidad aumentó linealmente (Figura 67), pero esta densidad fue en todos los puntos temporales significativamente menor que en las retinas tras ApNO.

En ambos modelos la densidad de las CMs aumenta con el tiempo. Sin embargo, la cinética de este aumento del día 1 al 9 es significativamente mayor después de ApNO que en los CORs (pendiente 13 para los CORs y 15 para ApNO; $p=0,048$) (Figura 67).

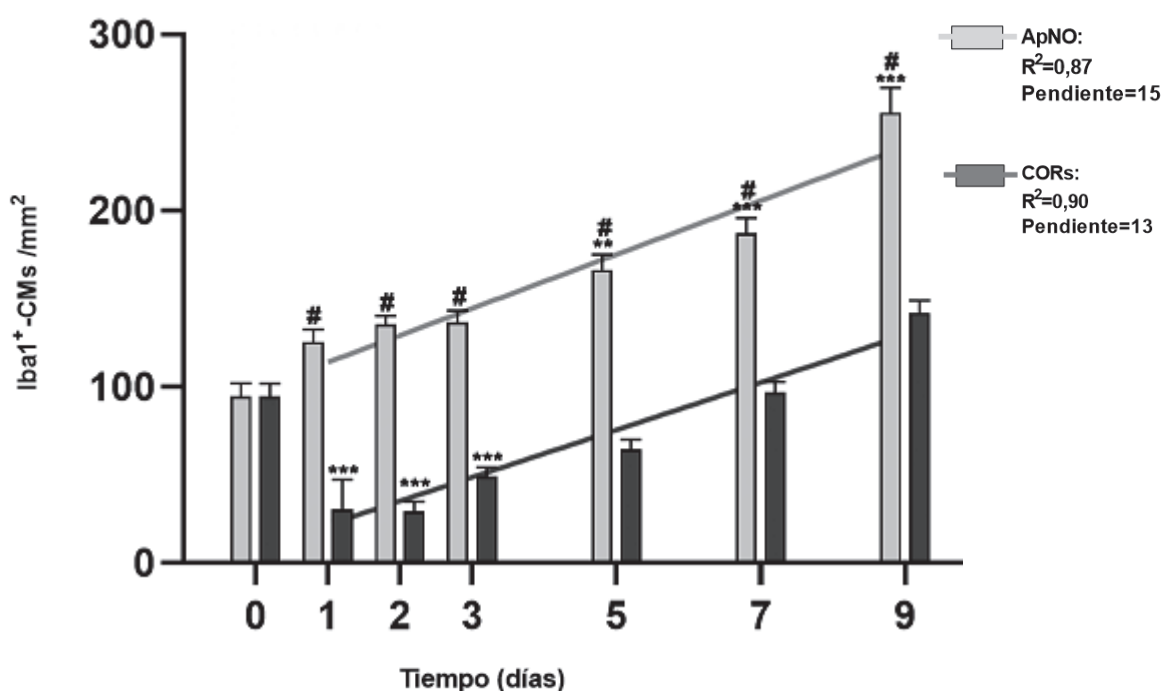


Figura 67: Gráficos X, Y (tiempo frente a células) que muestran la densidad media \pm DE (células/mm²) de células Iba1⁺ en ambos grupos.

El tiempo 0 son datos de retinas intactas. Tras una disminución significativa de las células Iba1⁺ entre el día 0 y el 1 en los CORs, los datos se ajustan a una regresión lineal a partir del día 1. La pendiente entre ambos modelos es significativamente más pronunciada después de ApNO que en los CORs ($p=0,048$). *Experimental frente a intacto (** $p<0,01$, *** $p<0,001$, prueba de Kruskal-Wallis, prueba de comparaciones múltiples de Dunn); # ApNO frente a CORs (# $p<0,001$, prueba de Mann-Whitney). $n=4-6$ retinas/grupo/punto temporal.

La morfología anormal de la microglía en las CORs, junto con su número disminuido y su cinética más lenta, así como el hecho de que los marcadores estructurales de las CGRs fueron inmunodetectados cuando las CGRs ya había muerto, nos llevó a pensar que puede ser que las CMs *in vitro* fagociten menos CGRs que *in vivo* (Figura 66).

Para comprobar esta hipótesis, primero trazamos CGRs con OHSt colocadas sobre el CS y una vez trazadas se realizó ApNO o CORs. Siete días después, se cuantificó las CMs-Iba1+OHSt⁺ en todas las muestras. El OHSt es un trazador retrógrado fluorescente que no puede ser degradado por las CMs tras la fagocitosis de una CGRs trazada y, por tanto, se acumula en sus fagolisosomas (Figura 68). Así, la colocalización de OHSt e Iba1 significa que una célula microglial ha engullido al menos una CGR trazada (Galindo-Romero y cols., 2013; Nadal-Nicolas y cols., 2017).

Como se muestra en la Figura 69, hubo una densidad significativamente mayor de CMs-Iba1+OHSt⁺ después de ApNO que en los CORs. Para evaluar si esto estaba relacionado con un menor número de CMs o con una menor actividad fagocítica, se calculo la proporción de CMs: células microgliales fagocíticas (Iba1⁺: Iba1+OHSt⁺) en el día 7. La proporción fue similar en ambos modelos (1,5 en los CORs y 1,4 tras ApNO). Por lo tanto, nuestros datos muestran que las CGRs en los CORs se eliminan más lentamente que *in vivo* porque hay menos CMs en la CCG.

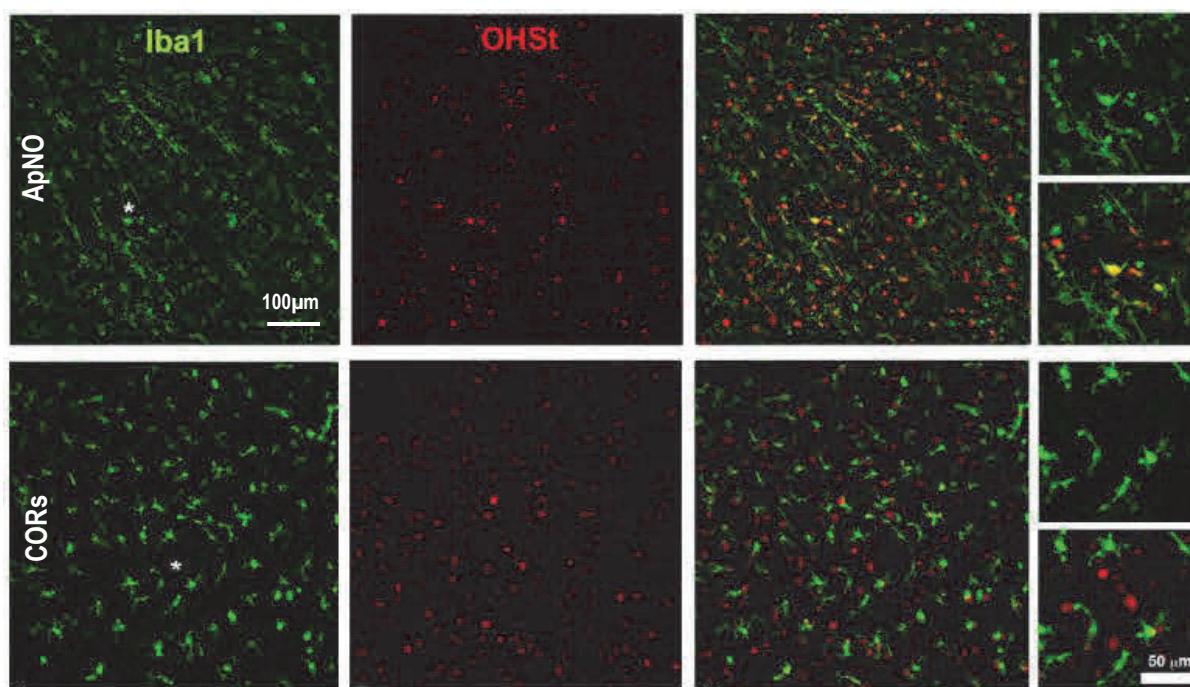


Figura 68: Los CORs tienen una menor densidad de CMs fagocíticas en la CCG que las retinas axotomizadas.

Ampliaciones representativas de retinas trazadas 7 días después de ApNO y CORs que muestran las células trazadas (OHSt, rojo) y las CMs-Iba1⁺ (verde). Las células Iba1⁺OHSt⁺ son CMs fagocíticas. Los asteriscos en los paneles de Iba1 marcan la zona de la que se tomaron los aumentos de la derecha.

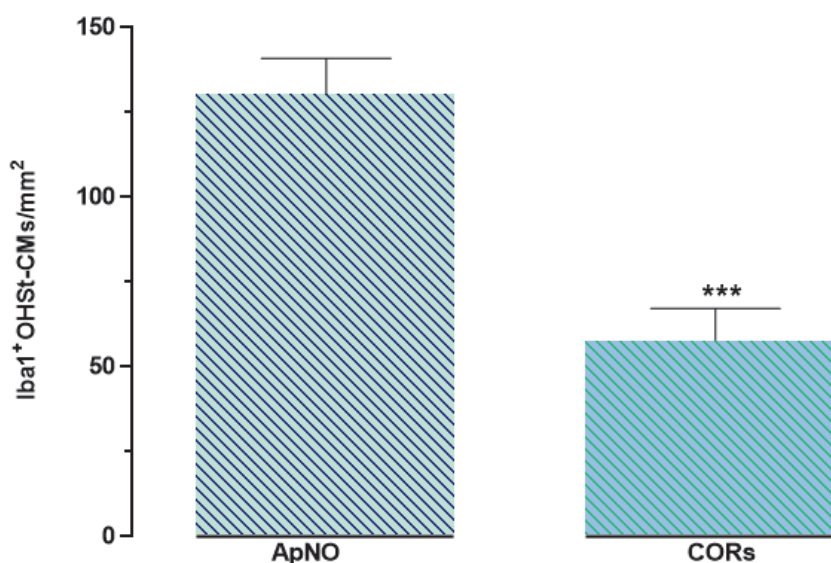


Figura 69: Densidad media \pm DE (células/mm²) de las CMs fagocíticas en CORs y después de ApNO. * ApNO frente a CORs (***) $p < 0,001$, test de Mann-Whitney). n=4-6 retinas/grupo.

IV.2.4. ACTIVACIÓN MACROGLIAL

Por último, analizamos la gliosis de las células de Müller y de los astrocitos en los CORs a lo largo del tiempo. En los CORs se realizó una doble inmunodetección para GFAP (astrocitos y células de Müller activadas) y vimentina (células de Müller), ambos filamentos intermedios que se regulan al alza en la gliosis (*Bringmann y cols., 2006*). Los astrocitos estaban hipertrofiados desde el día 2, con procesos más gruesos y una señal GFAP más fuerte que en el día 1, y en el día 7 su cobertura de la CCG disminuyó (**Figura 70**).

La activación de las células de Müller se analizó en las reconstrucciones confocales 3D. A los 2 y 3 días del cultivo, algunas células de Müller estaban hipertrofiadas y mostraban la expresión de GFAP a lo largo de su soma y tallos, atravesando la retina (**Figura 70, flechas**). A partir del día 4, la activación de las células de Müller abarcaba la retina interna y externa con una señal de GFAP que abarcaba todas las capas de la retina. Por cierto, las reconstrucciones en 3D permitieron también observar que en el día 7, cuando la expresión de Brn3a disminuyó drásticamente, los CORs se habían adelgazado considerablemente.

Las retinas axotomizadas mostraron un aumento de la expresión de GFAP y Vimentina de 5 a 9 días en la CCG, indicando una hipertrofia de los astrocitos y de los pies terminales de las células de Müller. Sin embargo, la gliosis de las células de Müller en el resto de la retina fue casi insignificante. Por último, tras ApNO no hubo un adelgazamiento visible de la retina hasta 45 días después de la lesión (**ver apartado IV.1.3**).

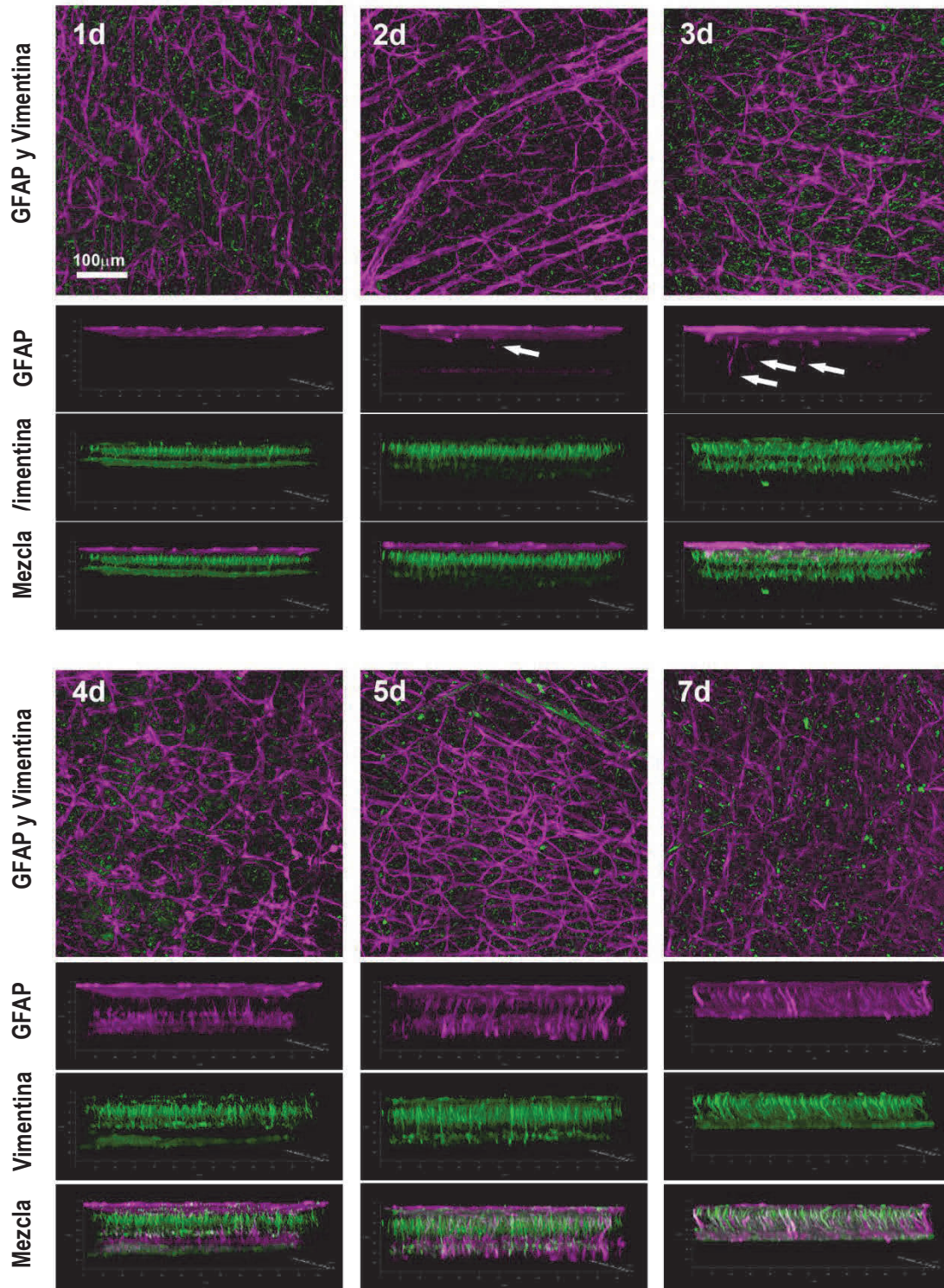


Figura 70: Inducción temprana de macrogliosis en los CORs. Microfotografías confocales representativas enfocadas en la de los CORs inmunodetectadas contra GFAP (púrpura) y Vimentina (verde). Debajo de cada imagen se muestran las representaciones en 3D del espesor total de cada CORs. Las flechas señalan las células de Müller activadas. n=4-6 retinas/grupo/tiempo. Barra: 100µm.

IV.2.5. RESUMEN

- I) La muerte de CGRs tras ApNO es significativa a 3 días con ambos marcadores, mientras que en los CORs es ya significativa a 3 días con Brn3a, pero no con RBPMS.
- II) Se observó que la pérdida de CGRs-Brn3a⁺ fue similar en ambos modelos durante los 5 primeros días. *In vivo* la expresión de Brn3a Y RBPMS fue paralela, sin embargo, a partir de 5 días *in vitro* la señal de RBPMS se mantiene. También se observó la menor población de células microgliales *in vitro*. Al probar otros marcadores de CGRs, se vio que sucedía lo mismo que con el RBPMS y que a partir de 5 días la señal se mantenía. Lo que nos indica que los marcadores estructurales están presentes pero que no son de viabilidad como si lo es el Brn3a.
- III) La comparación de los dos modelos muestra que la muerte de CGRs es más rápida en CORs que tras ApNO, aunque el patrón de muerte es similar.
- IV) Las CMs- Iba1⁺ *in vitro* tienen una morfología diferente que las CMs- Iba1⁺ tras ApNO.
- V) Hay una menor cantidad de densidad de CMs-Iba1⁺ *in vitro* que *in vivo*.
- VI) Al trazar las CGRs con OHSt se observó que hay menos células que fagocitan las CGRs en CORs que tras ApNO, lo que indica que marcadores estructurales están presentes, ya que aún quedan células muertas.
- VII) Al estudiar la activación microglial en CORs se observó cómo los astrocitos estaban hipertrofiados y con procesos más mayor que tras ApNO.

IV.2.6. SUMMARY

- I) Death of RGCs after ONC is significant at 3 days with both markers, while in ROCs it is already significant at 3 days with Brn3a, but not with RBPMS.
- II) It was observed that the loss of RGCs-Brn3a⁺ was similar in both models during the first 5 days. *In vivo* the expression of Brn3a and RBPMS was parallel, however, after 5 days *in vitro* the RBPMS signal is maintained. The lower microglial cell population *in vitro* was also observed. When testing other RGCs markers, the same was observed as with RBPMS, and after 5 days the signal was maintained. This indicates that the structural markers are present but that they are not viability markers as is the case with Brn3a.
- III) Comparison of the two models shows that RGCs death is faster in ROCs than after ONC, although the pattern of death is similar.
- IV) MCs- Iba1⁺ *in vitro* have a different morphology than MCs- Iba1⁺ after ONC.
- V) There is a lower amount of MCs-Iba1⁺ density *in vitro* than *in vivo*.
- VI) When RGCs were traced with OHSt, it was observed that fewer cells phagocytosed RGCs in ROCs than after ONC, which indicates that structural markers are present, as there are still dead cells.
- VII) Studying microglial activation in ROCs showed that astrocytes were hypertrophied and with more extensive processes than after ONC.

IV.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DE MICROGLIA ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS

IV.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El siguiente objetivo de este estudio fue analizar cuantitativamente los cambios morfológicos de las CMs a diferentes tiempos para conocer su estado de activación y la relación con la muerte neuronal en modelos preclínicos *in vivo* e *in vitro*. Para ello se analizaron retinas intactas, retinas axotomizadas (donde se analizó la retina lesionada y la contralateral) y en CORs (Figuras 72 y 73). Se utilizaron los mismos animales que en el primer y segundo objetivo como muestra el diseño experimental (Figura 71).

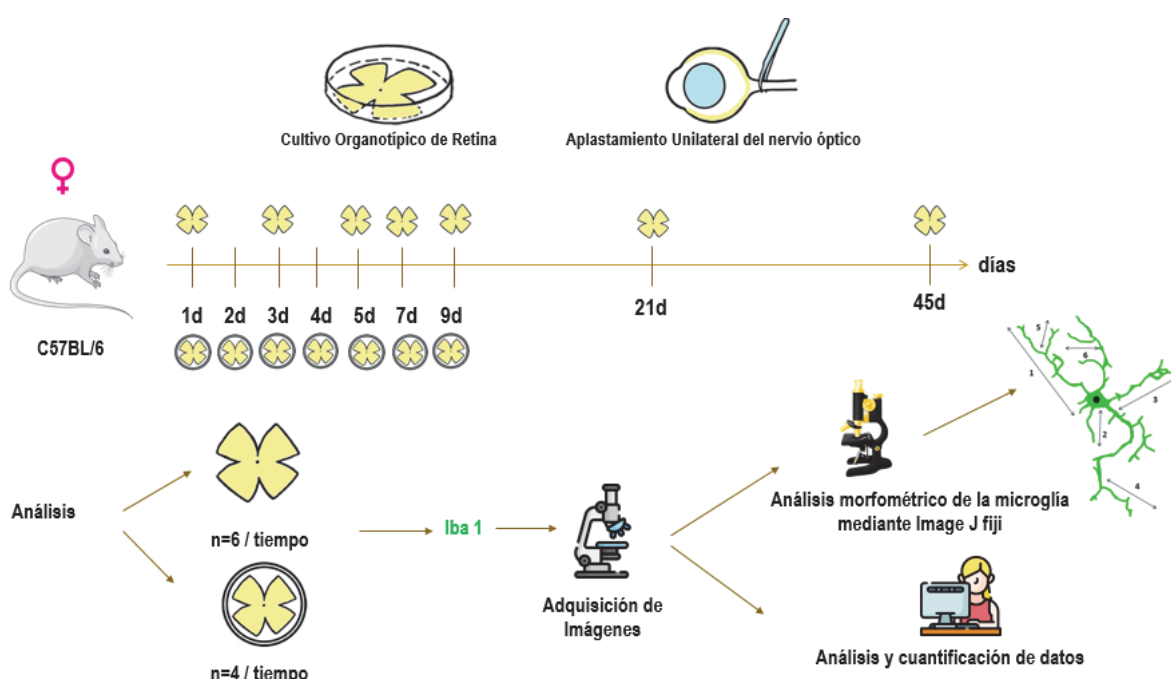


Figura 71: Diseño experimental.

Para realizar este estudio cuantitativo, se realizaron dibujos y representaciones en 3D de las imágenes adquiridas de las CMs-Iba1⁺ (Figuras 72 y 73), según se describe en el apartado de **material y métodos**. La comparación entre CMs de retinas lesionadas con ApNO y CORs muestra diferencias entre ambos modelos siendo el tamaño del soma mayor en el modelo *in vitro* que *in vivo* (Figura 72). La comparación entre CMs de retinas lesionadas y contralaterales a la lesión muestra mayor número de procesos en las retinas contralaterales a la lesión, así como mayor longitud total (Figura 73). En retinas lesionadas y contralaterales se observa cualitativamente que las CMs difieren de las retinas intactas, puesto que estas tienen un mayor número de procesos y una mayor longitud total (Figura 73).

Estos esquemas sirvieron para la obtención de los siguientes parámetros, que se detallan en profundidad en los siguientes apartados: **número de procesos, tamaño del soma, longitud total, volumen, área y perímetro, circularidad del soma y análisis Sholl**.

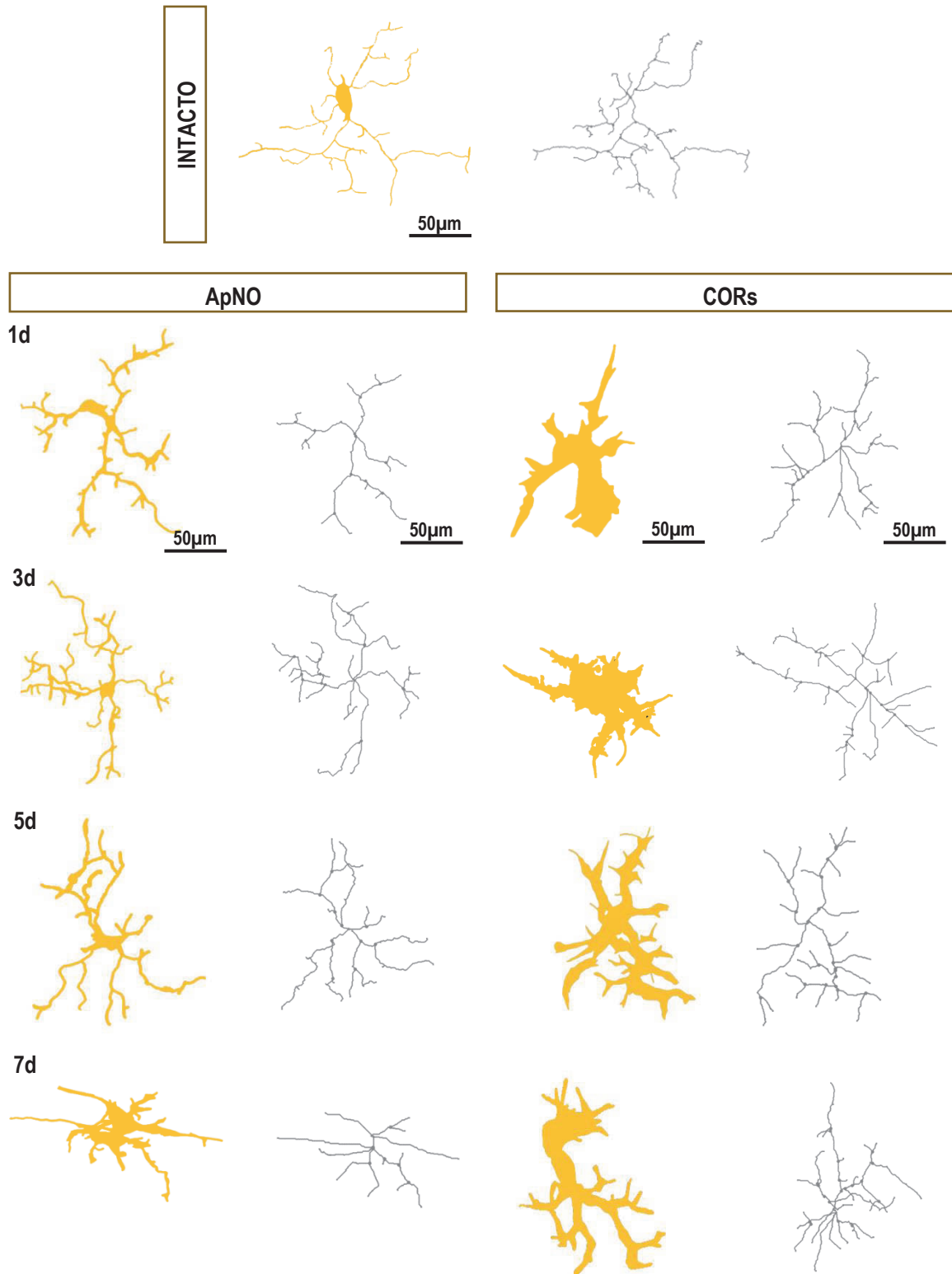
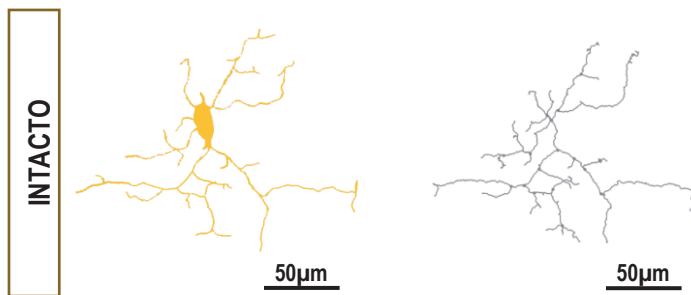
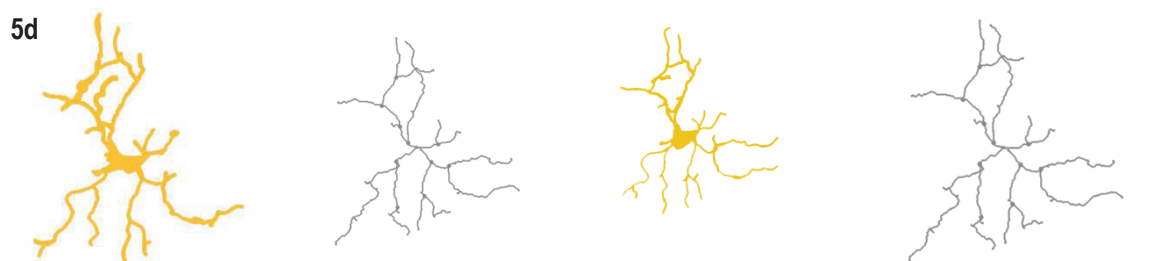
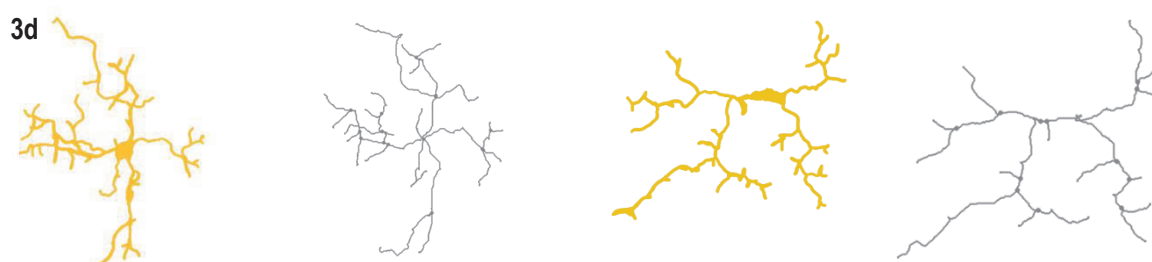
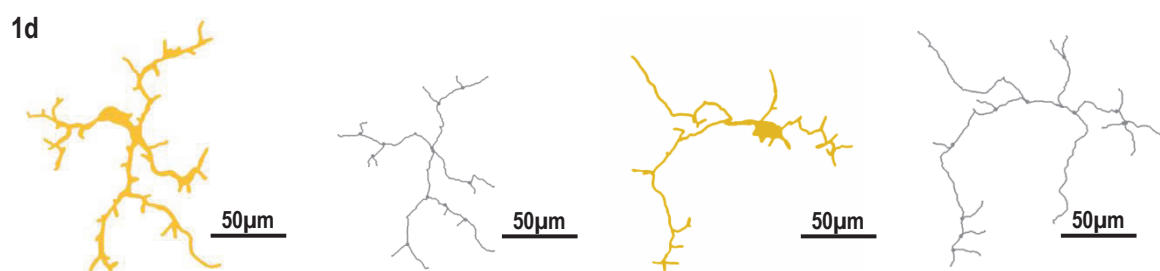


Figura 72: Dibujos (amarillo) y representación 3D (gris) de las CMs tras ApNO y en CORs a tiempos crecientes tras la lesión o *in vitro*. Estos dibujos y esquemas se utilizaron para obtener los parámetros cuantitativos de la morfología que se describen en las siguientes imágenes.



Lesionados	Contralateral
------------	---------------



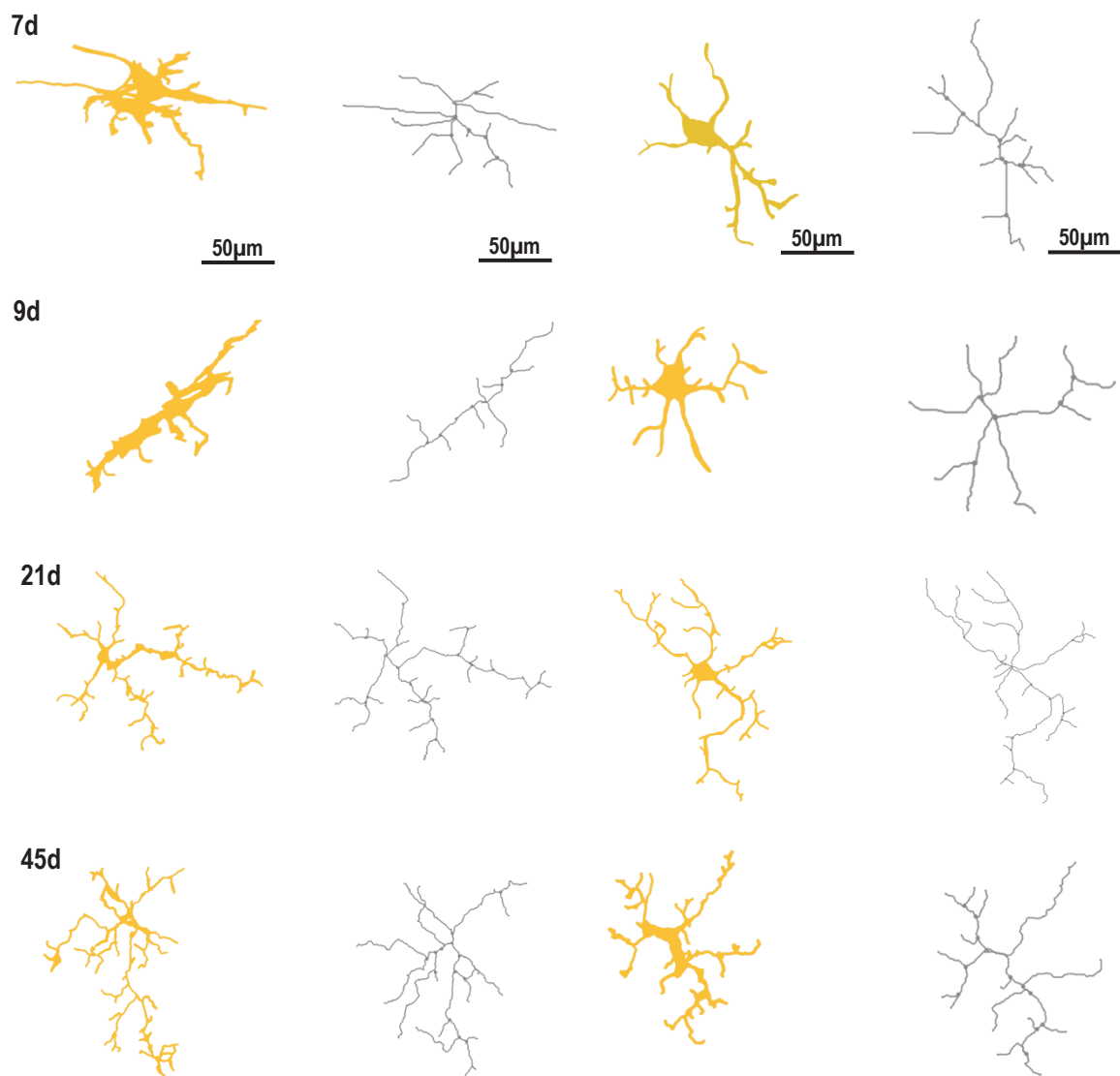


Figura 73: Dibujos (amarillo) y representación 3D (gris) de CMs representativas tras ApNO y en COR a tiempos crecientes. Estos dibujos y esquemas se utilizaron para obtener los parámetros cuantitativos de la morfología que se describen en las siguientes imágenes.

IV.3.2. NÚMERO DE PROCESOS

Se procedió a la cuantificación del número total de procesos que tiene cada CMs mediante Image J Fiji (**Figura 74**), analizando las CMs en tres zonas de la retina: zona central, zona medial y zona periférica (**Figura 75**), y en toda la retina (**Figura 76**), y comparándolas con las retinas intactas.

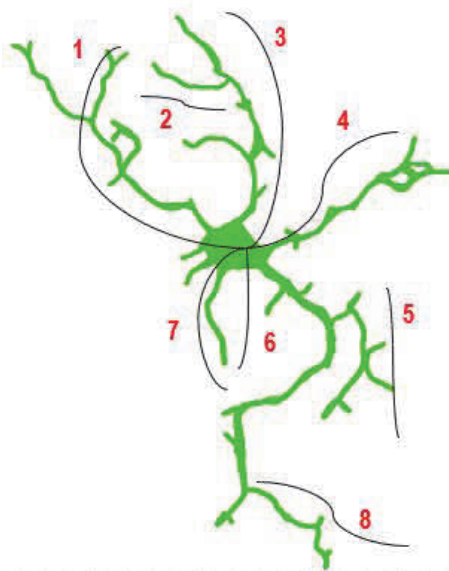


Figura 74: Dibujo representativo de una CMs axotomizada a 21 días tras ApNO. En ella se puede ver el número de procesos que se cuentan.

Dividiendo la retina en las tres zonas (central, medial y periferia), se observó diferencias significativas en CORs y en retinas tras ApNO a diferentes tiempos con respecto al intacto en el número de procesos (**Figura 75**).

En CORs se pudo observar cómo hay una disminución significativa de procesos en la zona central a diferentes días (1,3 y 7). En la zona medial se observó también una disminución significativa a todos los tiempos. En la zona periférica se vio también una disminución significativa a diferentes días (4 y 7) (**Figura 75 A**).

Tras ApNO, se analizó la retina lesionada y la contralateral a la lesión. Mientras que, en las retinas lesionadas, se observó una disminución significativa a diferentes días (5,7,9,21) en las tres zonas de la retina (**Figura 75 B**), en las retinas contralaterales a la lesión se observó también una disminución significativa a diferentes días (7 y 9) en las tres zonas de la retina (**Figura 75 C**).

Aunque se observó diferencias entre las 3 zonas de la retina a diferentes tiempos, para facilitar la lectura se decidió realizar un análisis total (**Figura 76**).

El análisis de la retina total mostró una disminución significativa en el número de procesos entre el modelo *in vivo* e *in vitro* (**Figura 76 A y 76 B**).

Al comparar la retina lesionada y la contralateral a la lesión entre sí, se vio cómo en la retina contralateral a la lesión las CMs tenían un mayor número de procesos a los mismos tiempos post-lesión (**Figura 76 C**).

La comparación entre ambos modelos mostró que en ambos modelos se observó una disminución significativa del número de procesos desde el día 1 al 7 con respecto al grupo intacto, siendo más agravada en el modelo *in vitro* (**Figura 77 A**). De igual forma, después del ApNO, tanto en retinas lesionadas como contralaterales a la lesión (**Figura 77 B y C**) el número de procesos disminuyó significativamente a los mismos tiempos con respecto al grupo intacto.

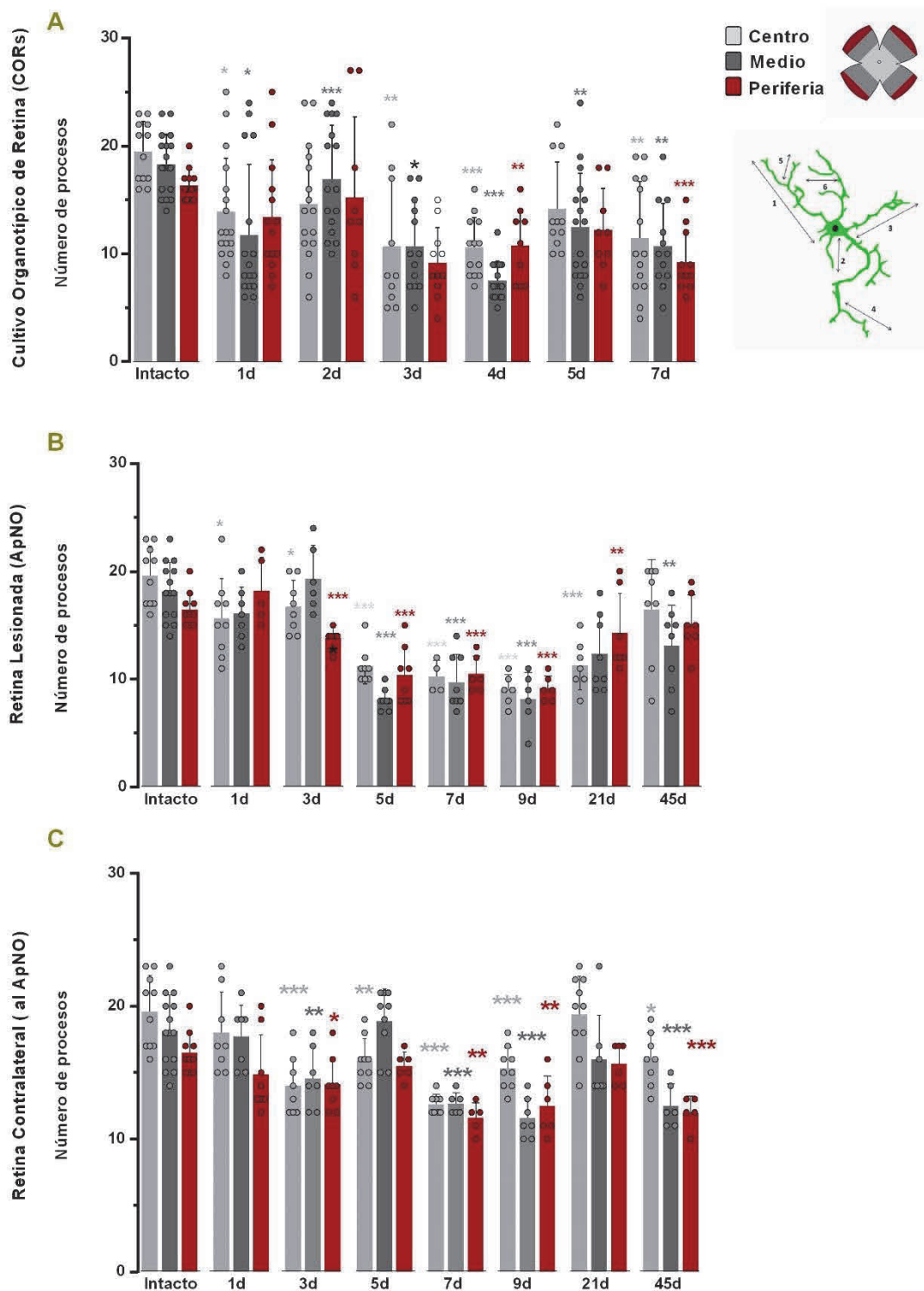


Figura 75: Número de procesos \pm DE de las CMs en diferentes zonas de la retina. A: CORS. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica(rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).

En las retinas axotomizadas se vio como a tiempos largos esta disminución en el número de procesos se mantenía comparado con el grupo intacto (Figura 75).

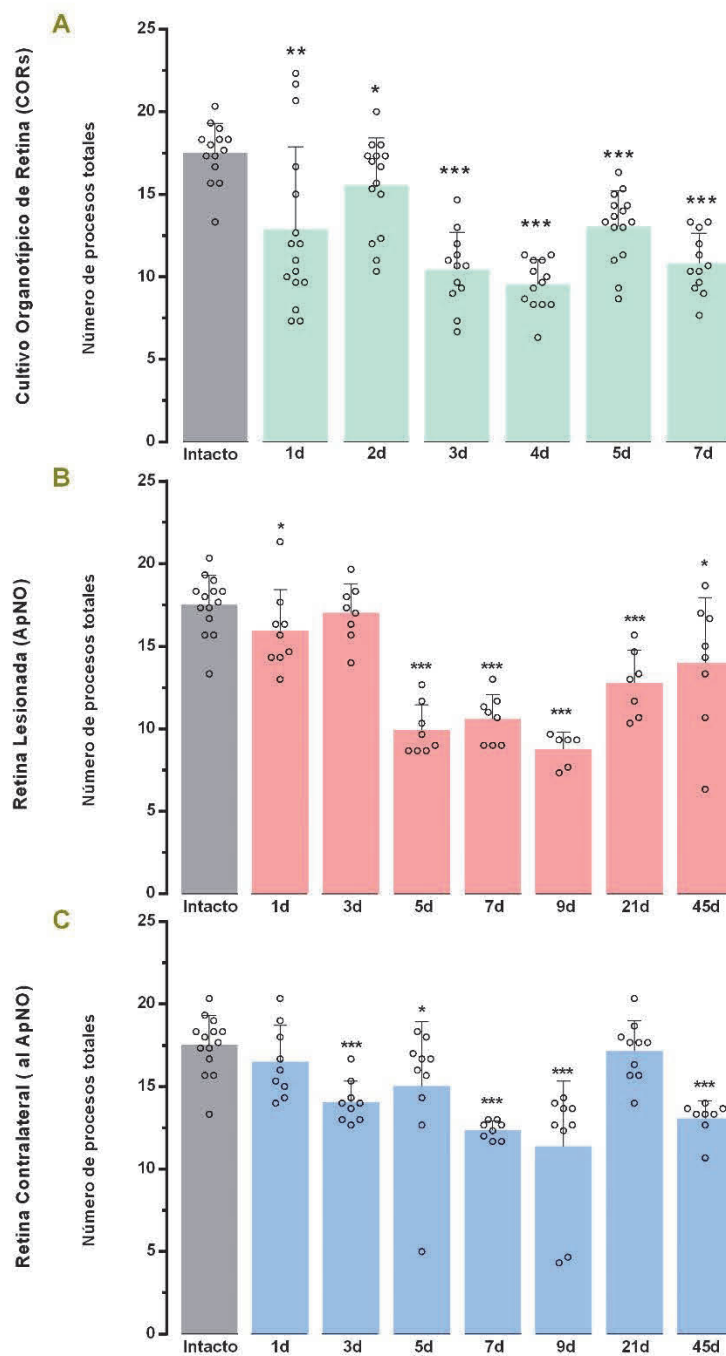


Figura 76: Número total de procesos \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales al ApNO en comparación con las retinas intactas. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

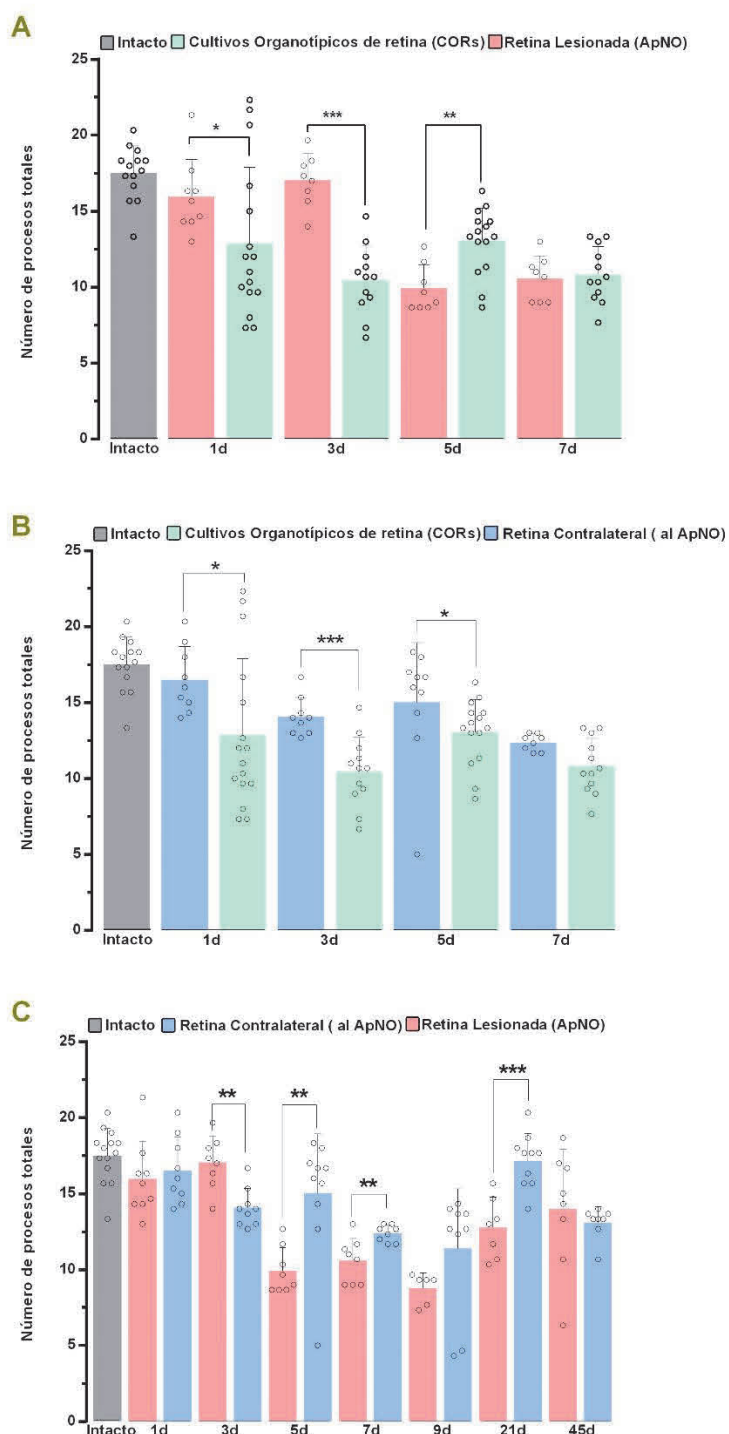


Figura 77: Gráficos comparativos que muestran el número de procesos \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ A Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).

IV.3.2.1 NÚMERO DE PROCESOS DE RAMAS BASALES Y APICALES

A continuación, se realizó un análisis cuantitativo para determinar las ramas basales y apicales de las CMs usando el programa Image J Fiji (**ver materiales y métodos**). Las ramas basales o primarias son las que salen del soma de las CMs (**Figura 78 A**), mientras que las ramas apicales o secundarias son las que parten de las ramas basales o primarias (**Figura 78 B**).

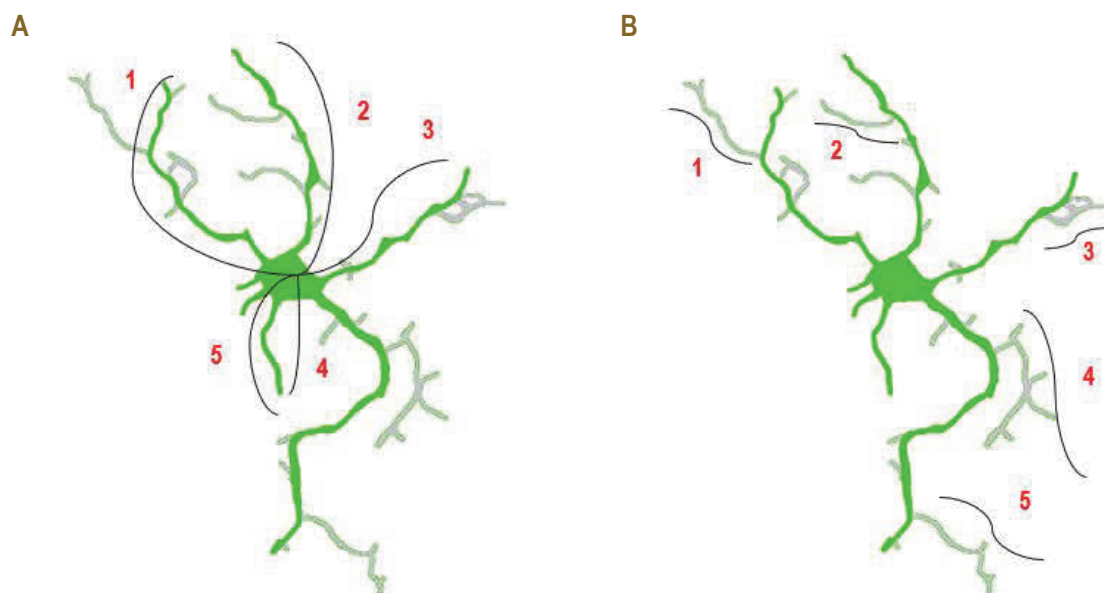


Figura 78: Ilustración donde se muestra cómo se calculó el número de procesos de las ramas basales y apicales en las CMs en la retina. **A y B:** Ramas basales en color verde y ramas apicales en color gris. **A y B)** Microglía de una retina axotomizadas a 21 días.

Siguiendo el mismo procedimiento del apartado anterior, se analizó el número de procesos de las CMs de 3 zonas de la retina: zona central, zona medial y zona periférica (**Figuras 79 y 80**), y de la retina completa (**Figura 81 y 82**) y se comparó con el grupo intacto.

Dividiendo en tres zonas la retina, los resultados mostraron diferencias significativas tanto en CORs como en retinas tras ApNO a diferentes tiempos tanto en ramas basales como apicales (**Figuras 79 y 80**).

Tanto en CORs como tras ApNO (lesionadas y contralaterales a la lesión), la comparación entre las tres zonas no mostró diferencias significativas en el número de ramas basales (**Figura 79**). Sin embargo, la comparación con el grupo intacto mostró diferencias significativas en los tres grupos analizados a los diferentes tiempos.

En cuanto a las ramas apicales, se obtuvieron unos resultados similares al de las ramas basales: no hubo diferencias entre zonas analizadas, pero sí un menor número de ramas apicales que en el grupo intacto a tiempos tempranos en CORs (3,4 y 7 días, **Figura 80 A**) y más tardíos tras ApNO en retinas lesionadas (de 5 a 45 días, **Figura 80 B**). En las retinas contralaterales, las diferencias con el intacto fueron a 7 y 9 días (**Figura 80 C**).

Las ramas apicales fueron en CORs al igual que el apartado anterior similares entre zonas, sin diferencias significativas (**Figura 80**). En cambio, con respecto al grupo intacto si se encontraron diferencias significativas a 3,4 y 7 días (**Figura 80 A**). En retinas lesionadas, Así se observó diferencias significativas de 5 a 45 días entre las distintas zonas y el grupo intacto (**Figura 80 B**). En retinas contralaterales a la lesión tampoco se observaron cambios entre zonas, pero sí con respecto al grupo intacto. Se observaron diferencias significativas a 7 y 9 días (**Figura 80 C**).

Debido a la ausencia de cambios entre las diferentes zonas de la retina en los tres grupos analizados, el análisis de las ramas basales de la retina total (sin diferenciar en las tres zonas) mostró los mismos resultados en ramas basales (**Figura 81**) y apicales (**Figura 82**).

Finalmente, se compararon los dos modelos (CORs y ApNO) y los resultados mostraron que en las ramas basales no se encontraron cambios entre sí entre el modelo *in vitro* con las retinas axotomizadas (**Figura 83 A**), en cambio, al comprar el modelo *in vitro* con las retinas contralaterales a la lesión se observó diferencias significativas a 3 y 5 días (**Figura 83 B**). Por último, al comparar la retina lesionada y la contralateral entre sí, se vio diferencias significativas a 5 y 45 días (**Figura 83 C**).

Al analizar las ramas apicales se observó como en CORs hay una disminución significativa del número de procesos desde el día 3 al 7 con respecto al grupo control (**Figura 82 A**). Al analizar las retinas axotomizadas se observó una disminución de 5 a 9 días con respecto al intacto y como a partir de ahí y hasta 45 días es casi igual que intacto (**Figura 82 B**). Cuando se analizó las retinas contralaterales a la lesión no se vieron grandes cambios, con la excepción de 7 días (**Figura 82 C**).

Al comparar entre sí el modelo *in vitro* con las retinas axotomizadas se encontraron diferencias significativas a 3 y 5 días (**Figura 84 A**), en cambio, al comprar el modelo *in vitro* con las retinas contralaterales a la lesión no observamos diferencias (**Figura 84 B**). Por último, al comparar la retina lesionada y la contralateral entre sí, vemos diferencias significativas a 5 días (**Figura 84 C**).

Al analizar las ramas basales se observó como en CORs hay una disminución significativa del número de procesos desde el día 3 al 7 con respecto al grupo control (**Figura 81 A**).

Al analizar las retinas axotomizadas se observó una disminución hasta 5 días con respecto al intacto y como a partir de ahí y hasta 45 días es casi igual que intacto (**Figura 81 B**).

Cuando se analizó las retinas contralaterales a la lesión se vio como a partir de 5 días hay una disminución que perdura hasta los 45 días (**Figura 81 C**).

Al comparar entre sí el modelo *in vitro* con las retinas axotomizadas no encontramos cambios entre ellos (**Figura 83 A**), en cambio, al comprar el modelo *in vitro* con las retinas contralaterales a la lesión observamos diferencias significativas a 3 y 5 días (**Figura 83 B**). Por último, al comparar la retina lesionada y la contralateral a la lesión entre sí, se vio diferencias significativas a 5 y 45 días (**Figura 83 C**).

Al analizar las ramas apicales se observó como en CORs hay una disminución significativa del número de procesos desde el día 3 al 7 con respecto al grupo intacto (**Figura 82 A**).

Al analizar las retinas axotomizadas se observó una disminución de 5 a 9 días con respecto al intacto y como a partir de ahí y hasta 45 días es casi igual que intacto (**Figura 82 B**).

Cuando se analizó las retinas contralaterales a la lesión no se vieron grandes cambios, con la excepción de 7 días (**Figura 82 C**).

Al comparar entre sí el modelo *in vitro* con las retinas axotomizadas se encontraron diferencias significativas a 3 y 5 días (**Figura 84 A**), en cambio, al comprar el modelo *in vitro* con las retinas contralaterales a la lesión no se observaron diferencias (**Figura 84 B**). Por último, al comparar la retina lesionada y la contralateral a la lesión entre sí, se vieron diferencias significativas a 5 días (**Figura 84 C**).

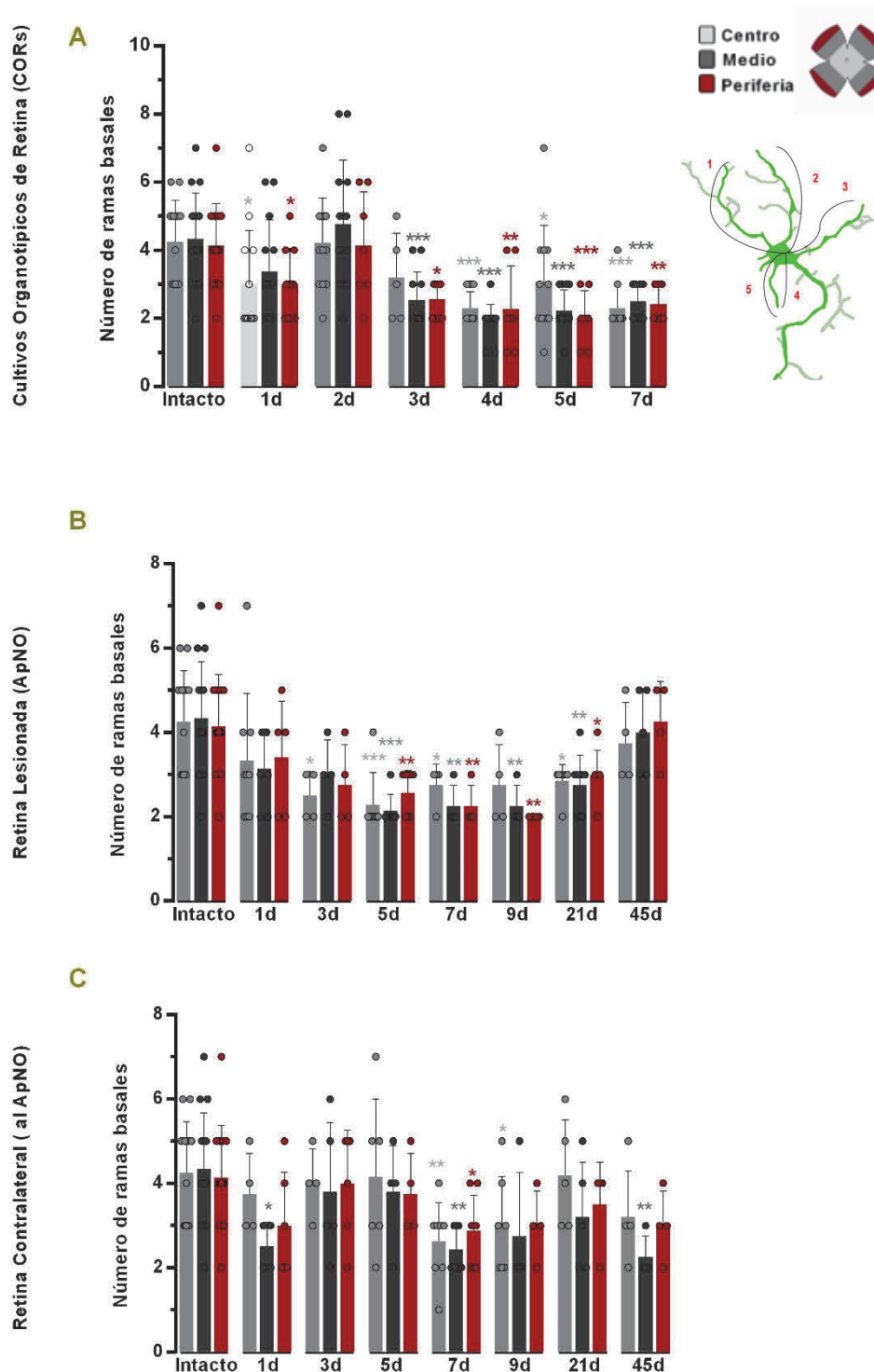


Figura 79: Número de procesos de ramas basales \pm DE de las CMs en diferentes zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).

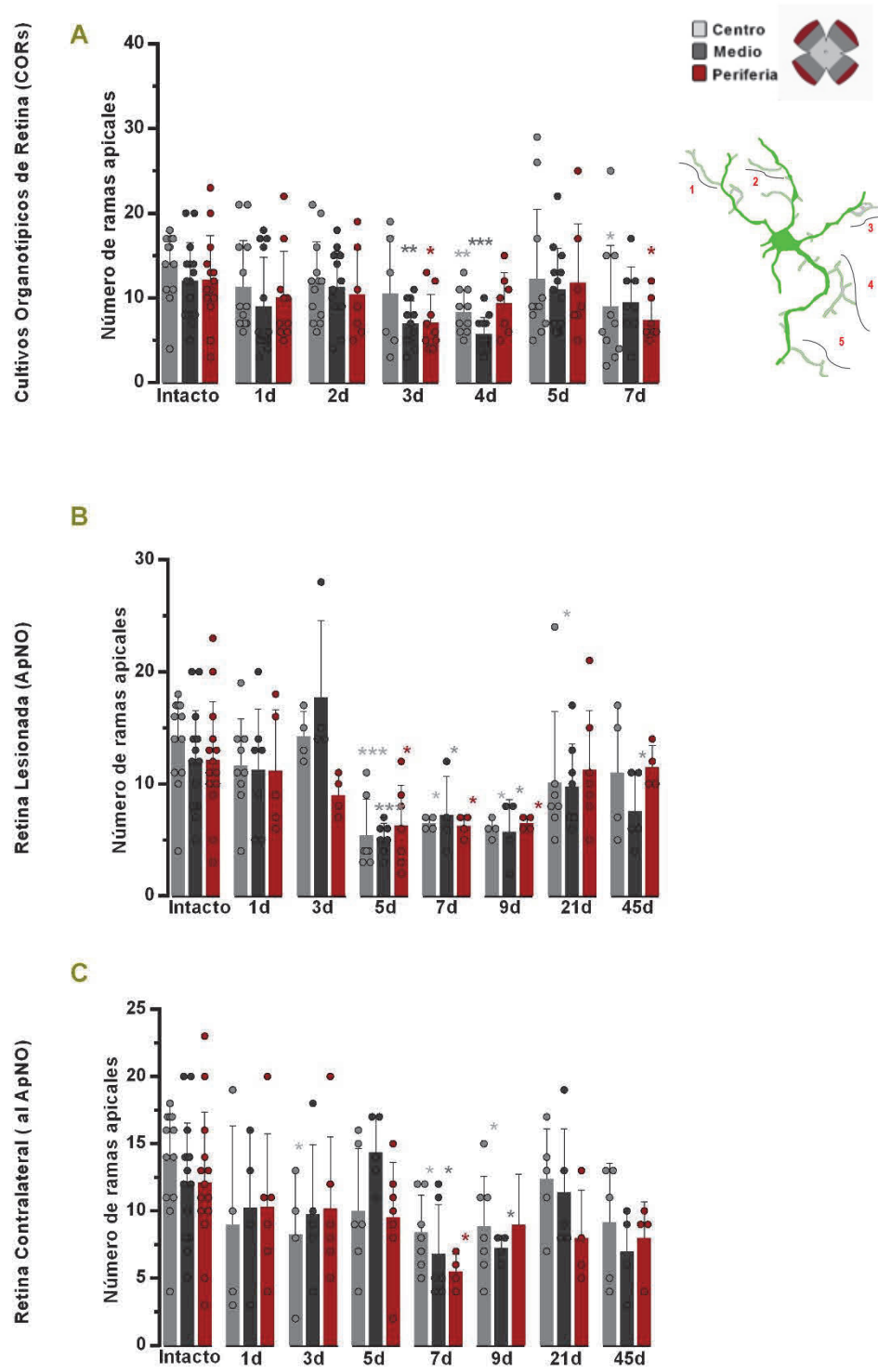


Figura 80: Número de procesos de ramas apicales \pm DE de las CMs en diferentes zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).

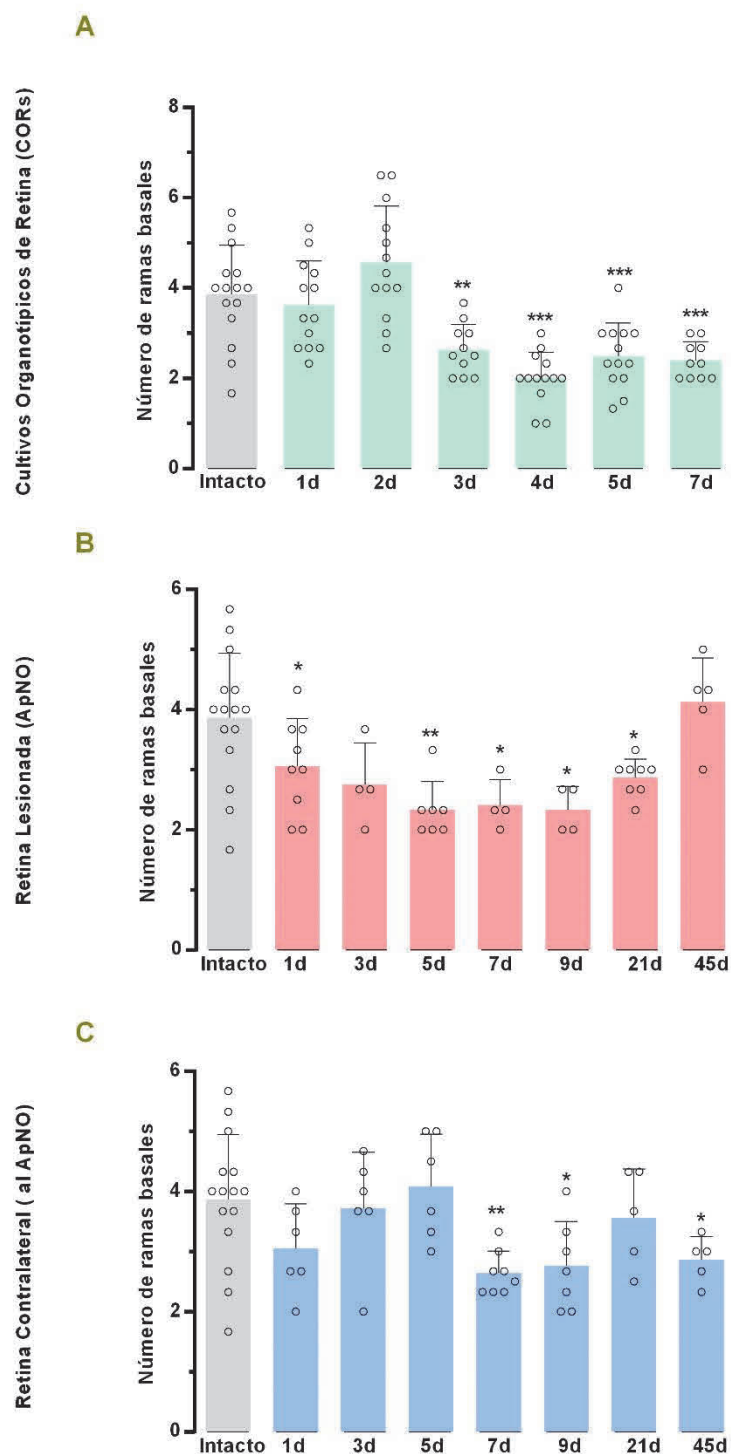


Figura 81: Número total de procesos de las ramas basales \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).

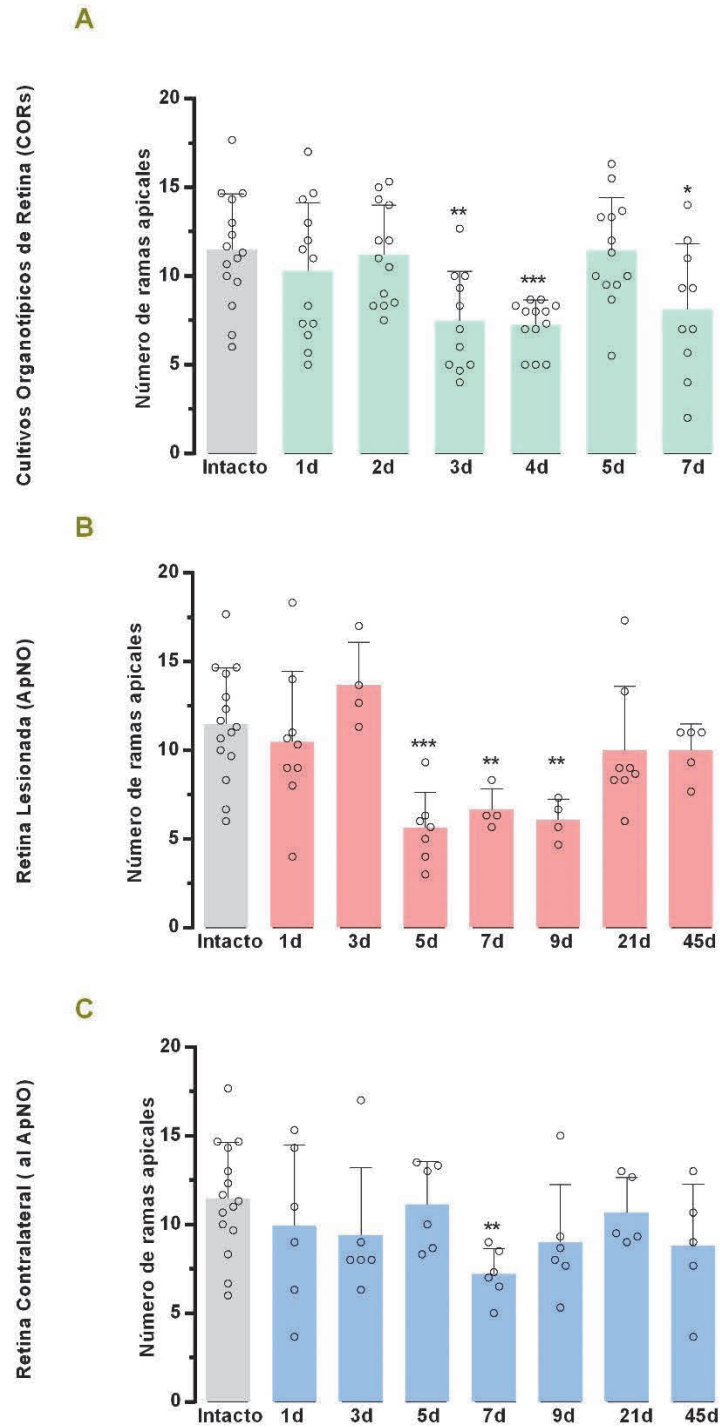


Figura 82: Número total de procesos de las ramas apicales ± DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. **A:** CORs. **B:** retinas lesionadas (ApNO). **C:** retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

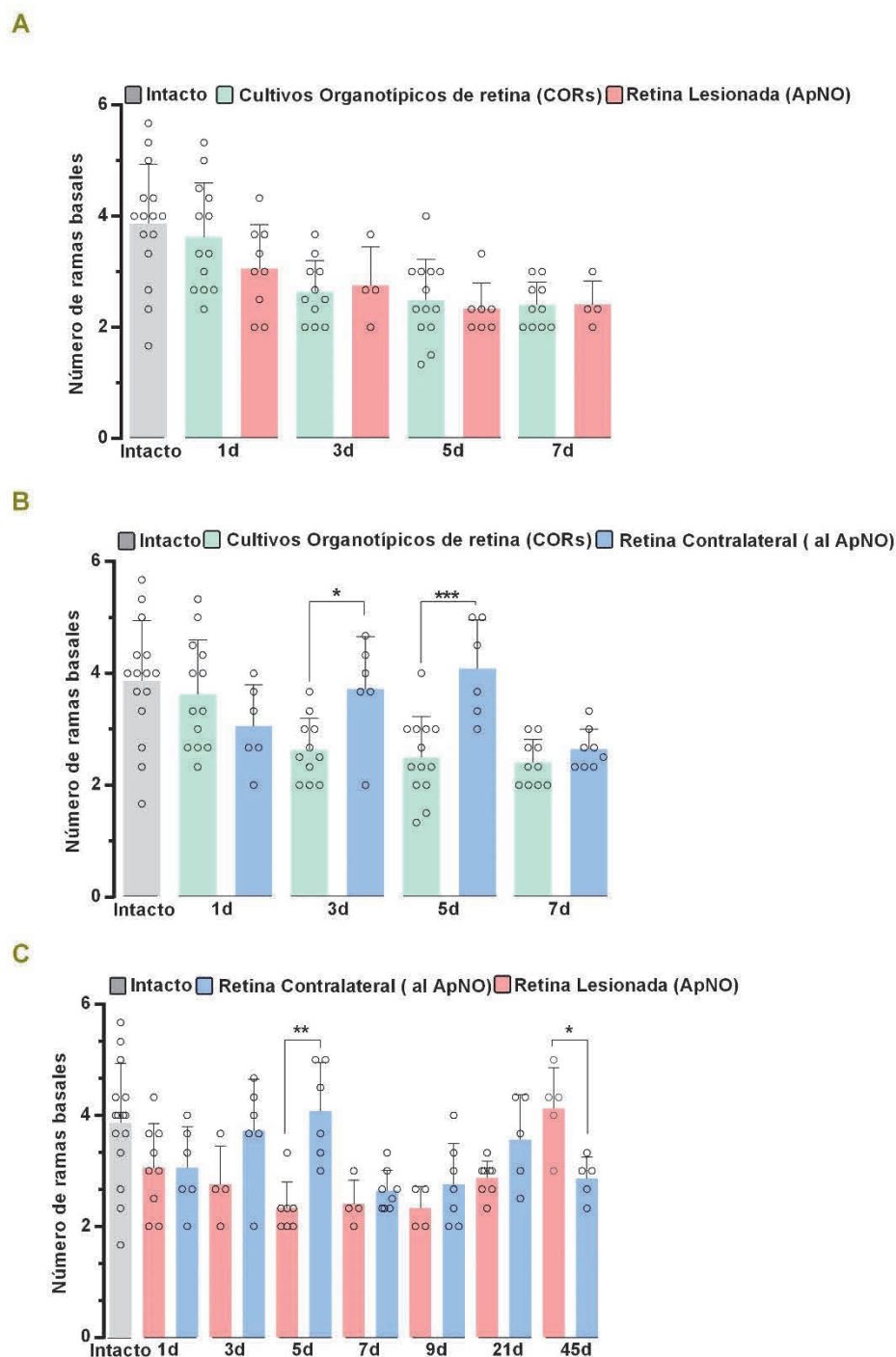


Figura 83: Gráficos comparativos que muestran el número de procesos de las ramas basales \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. **A:** CORs y retinas lesionadas (ApNO). **B:** CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). **C:** retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ A Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

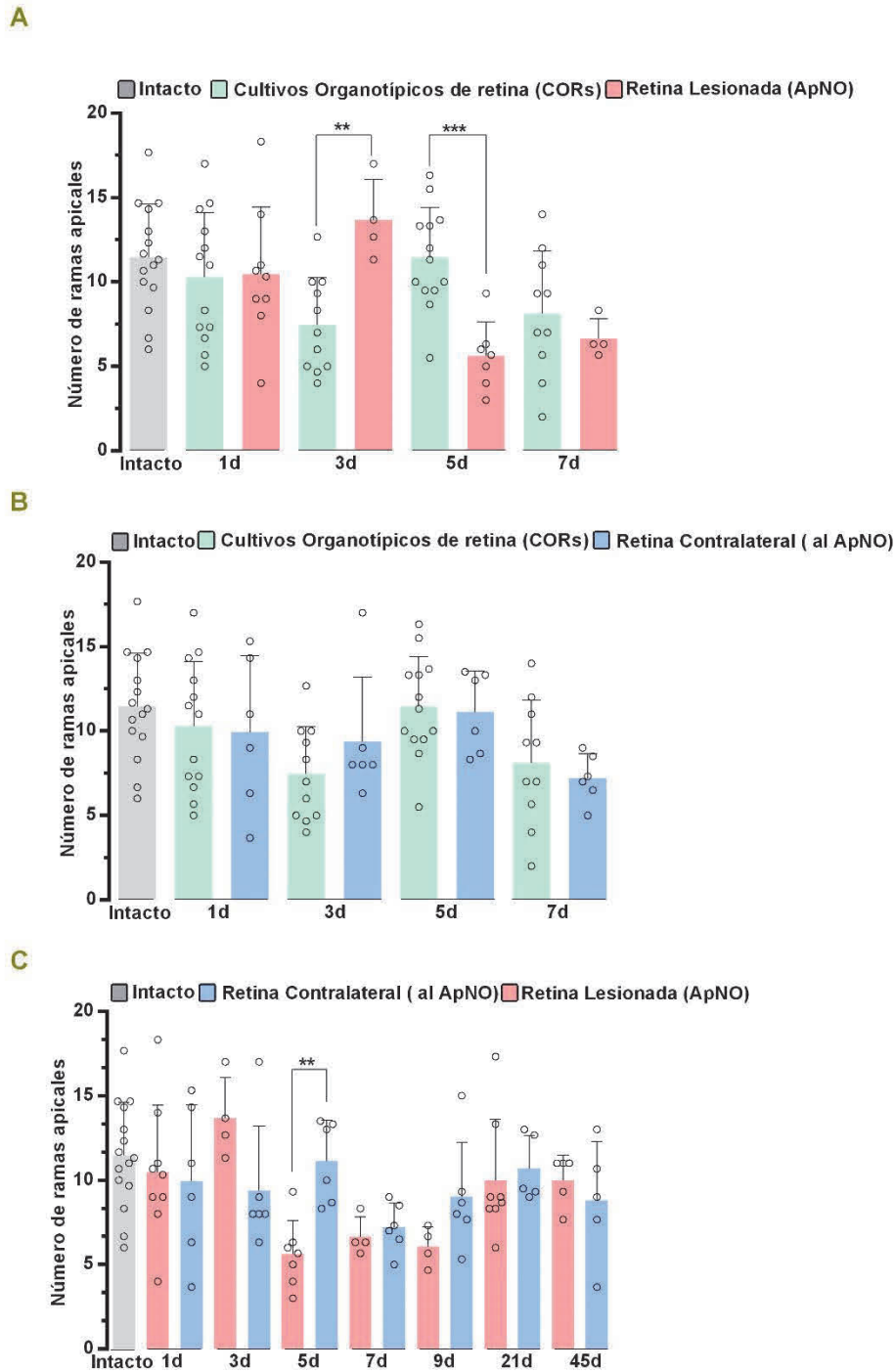


Figura 84: Gráficos comparativos que muestran el número de procesos de ramas apicales \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. **A:** CORs y retinas lesionadas (ApNO). **B:** CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). **C:** retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ A Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

IV.3.3. TAMAÑO DEL SOMA

Para calcular el tamaño del soma de las CMs, se utilizó una sección del Image J, que permitía contornear el soma de la microglía y calcular su área (**Figura 85**).

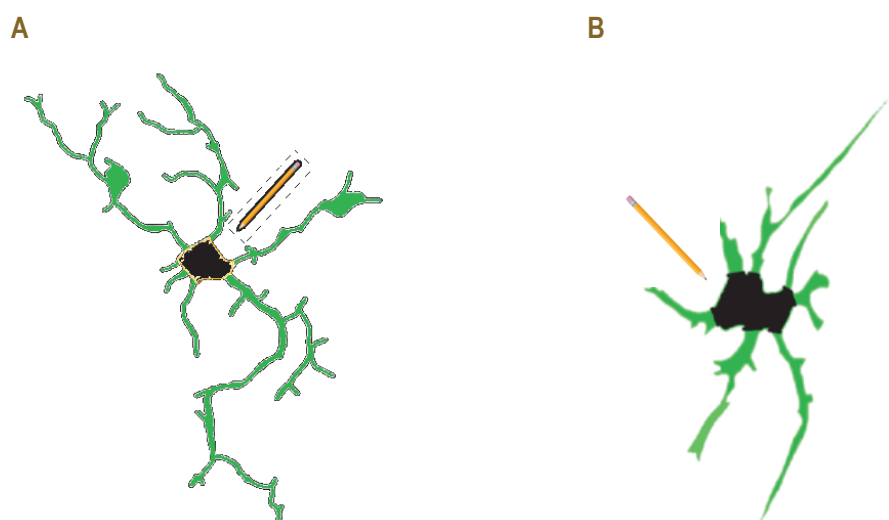


Figura 85: Ilustración donde se muestra cómo se calculó el tamaño del soma en las CMs en la retina. A) Microglía de una retina axotomizadas a 21 días. B) Microglía de un CORs a 3 días. Soma en color negro.

Los resultados mostraron que, en retinas intactas, el tamaño medio del soma es de $76,37 \pm 28,01 \mu\text{m}^2$ y en retinas *in vivo* y *ex vivo* fue de $142,20 \pm 85,52 \mu\text{m}^2$ y de $684,03 \pm 383,24 \mu\text{m}^2$ respectivamente.

En los tres grupos de estudio, se observó que el tamaño del soma aumentó significativamente a partir de 1 día en CORs y retinas lesionadas tras ApNO (**Figura 86 A y B**), y a 5 días en retinas contralaterales a la lesión (**Figura 86 C**).

En CORs, el aumento del tamaño del soma fue significativamente mayor que en ApNO. el tamaño medio del soma alcanzó su máximo tamaño a 2 días, alcanzando una media de $1116,81 \pm 730,37 \mu\text{m}^2$ en CORs y una media de $103,43 \pm 43,50 \mu\text{m}^2$ en ApNO.

Separando las CMs por rango de tamaños **se observó que** en CORs se observó a 2 y 3 días las CMs tenían un rango de tamaño de >1000 (**Figura 87 A**). En retinas tras ApNO, se vio también el incremento de las CMs a 5 y 7 días con un rango de tamaño de 150-250 y 250-500 (**Figura 87 B y C**). A partir de 7 días en retinas tras ApNO se vio cómo va disminuyendo el rango de tamaño y a 45 días ya es parecido a las retinas intactas (**Figura 87 B y C**).

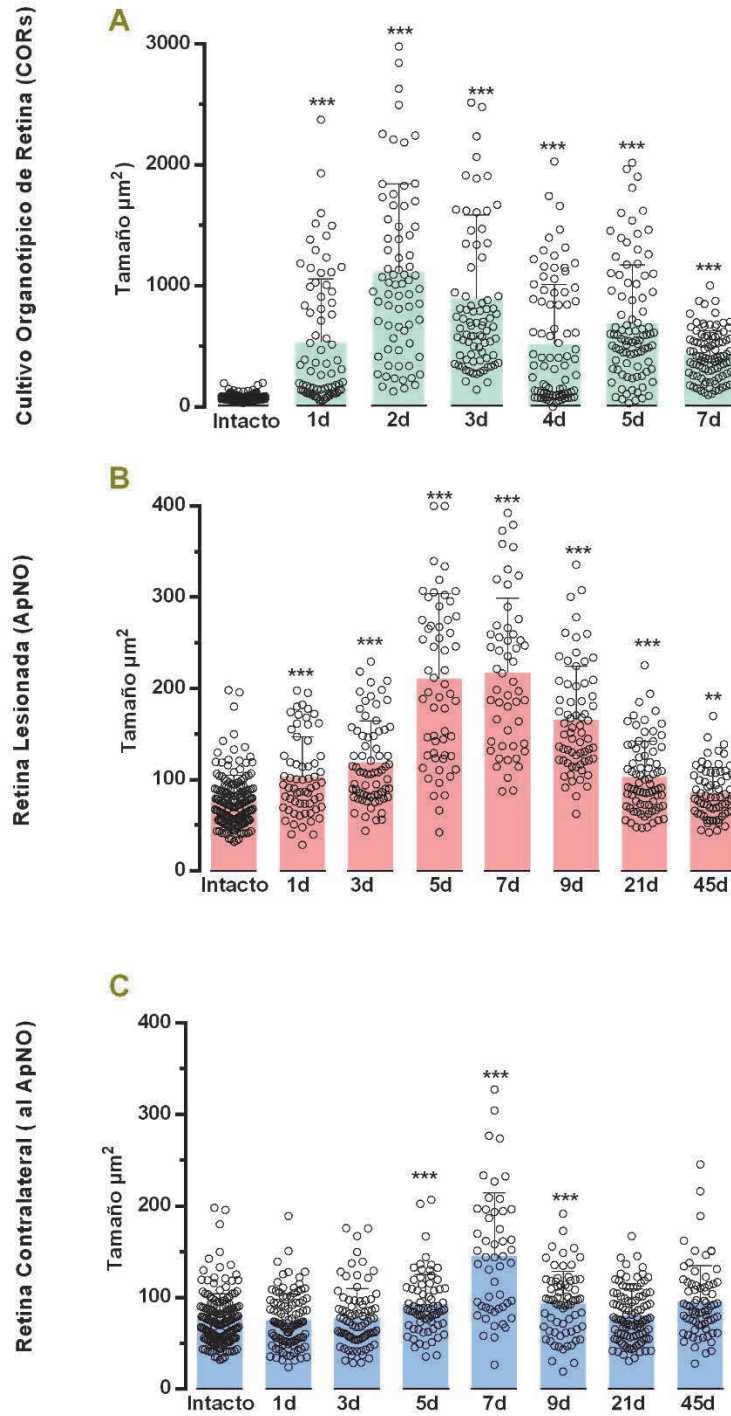


Figura 86: Media del tamaño del soma de la microglía (μm^2) \pm DE. A: CORS. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORS), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacta. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

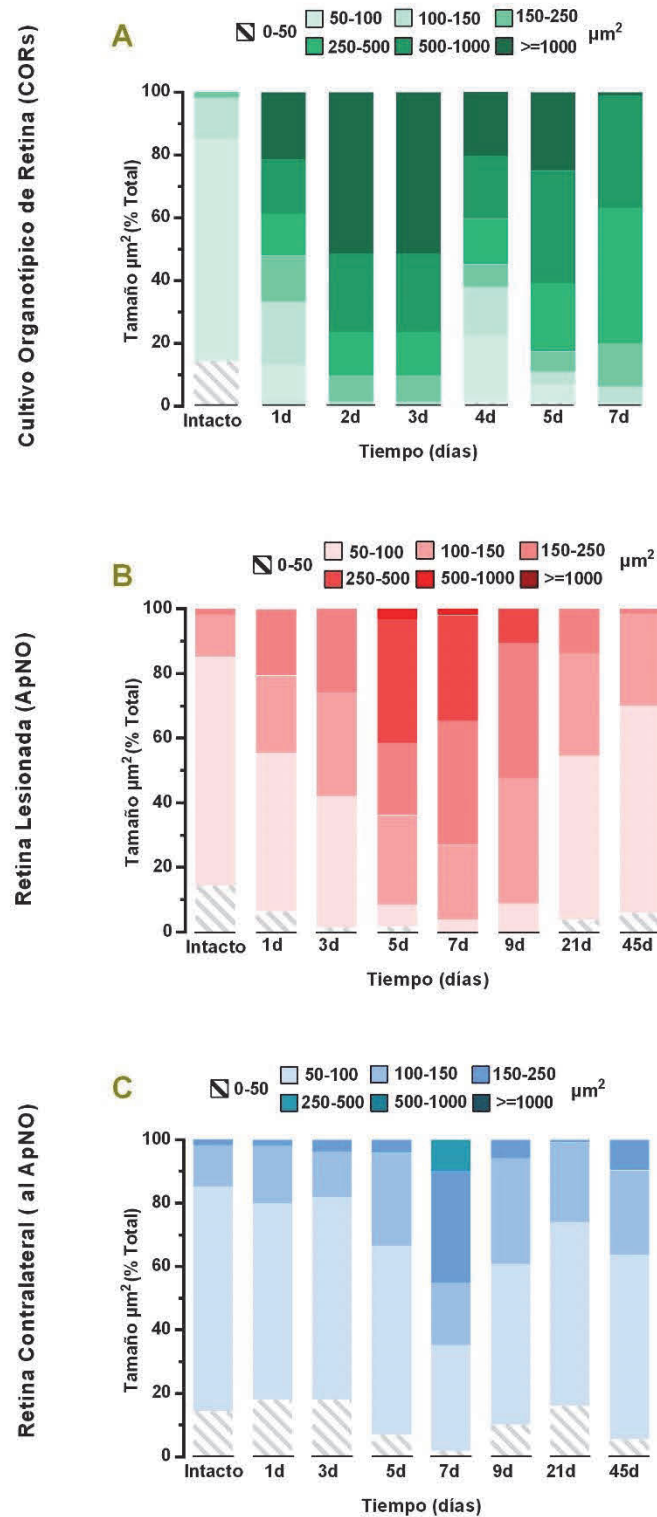


Figura 87: Gráficos agrupados que muestran el % de las CMs dentro de cada grupo y día con un rango de tamaño (100% todas las CMs dentro de cada grupo). A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO).

IV.3.4. LONGITUD TOTAL DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

Se procedió a la cuantificación de la longitud total que tiene cada CMs (**Figura 88**) mediante Image J Fiji (**ver materiales y métodos**), analizando las CMs en tres zonas de la retina: zona central, zona medial y zona periférica (**Figura 89**), y en toda la retina (**Figura 90**), y comparándolas con las retinas intactas.

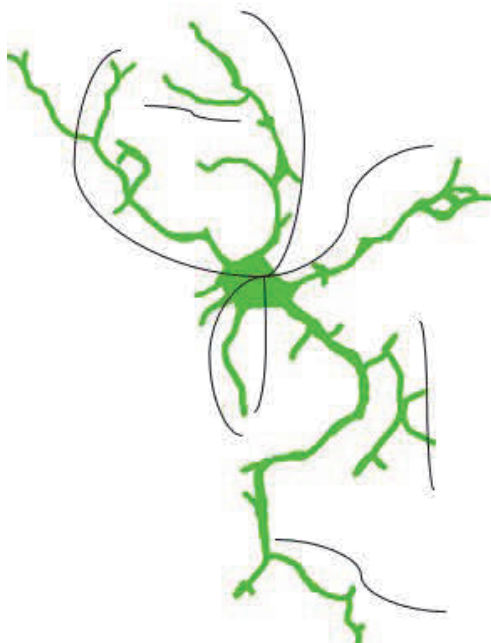


Figura 88: Dibujo representativo de una CMs axotomizada a 21 días tras ApNO. En ella se puede ver el número como que es y cómo se calcula la longitud total.

Dividiendo la retina en las tres zonas (central, medial y periferia), se observó diferencias significativas en CORs y en retinas tras ApNO a diferentes tiempos (**Figura 89**).

En CORs se pudo observar cómo hay una disminución significativa a 1,2,3 y 7 días con respecto a intacto en la zona central. En la zona medial se observó también una disminución significativa a todos los tiempos comparada con el grupo intacto. En la zona periférica se vio también una disminución significativa a diferentes días (3,5 y 7) con respecto al grupo intacto (**Figura 89 A**).

Tras ApNO, en retinas lesionadas, se observó una disminución significativa de 1 a 21 días con respecto a intacto en las tres zonas de la retina (**Figura 89 B**).

Y en contralaterales se observó también una disminución significativa a diferentes días con respecto a intacto en las tres zonas de la retina. (**Figura 89 C**).

Aunque se observó diferencias entre las 3 zonas de la retina a diferentes tiempos, para facilitar la lectura se decidió realizar un análisis total (**Figura 90**).

En CORs se observó una disminución de la longitud total de 1 a 7 con respecto al grupo intacto (**Figura 90 A**). De igual forma, después del ApNO, tanto en retinas lesionadas como contralaterales a la lesión (**Figura 90 A y B**) la longitud total disminuyó significativamente a los mismos tiempos con respecto al grupo intacto. En las retinas axotomizadas se vio como a tiempos largos esta disminución en la longitud total se mantenía comparado con el grupo intacto (**Figura 90 B y C**).

Al comparar entre sí ambos modelos se observó una disminución significativa de la longitud total entre el modelo *in vivo* e *in vitro*, siendo mayor en el modelo *in vitro* (**Figura 91 A y B**).

Al contrario, la retina lesionada con la retina contralateral a la lesión y se observó como la longitud total es mayor en la retina contralateral a la lesión a diferentes días post-lesión (**Figura 91 C**).

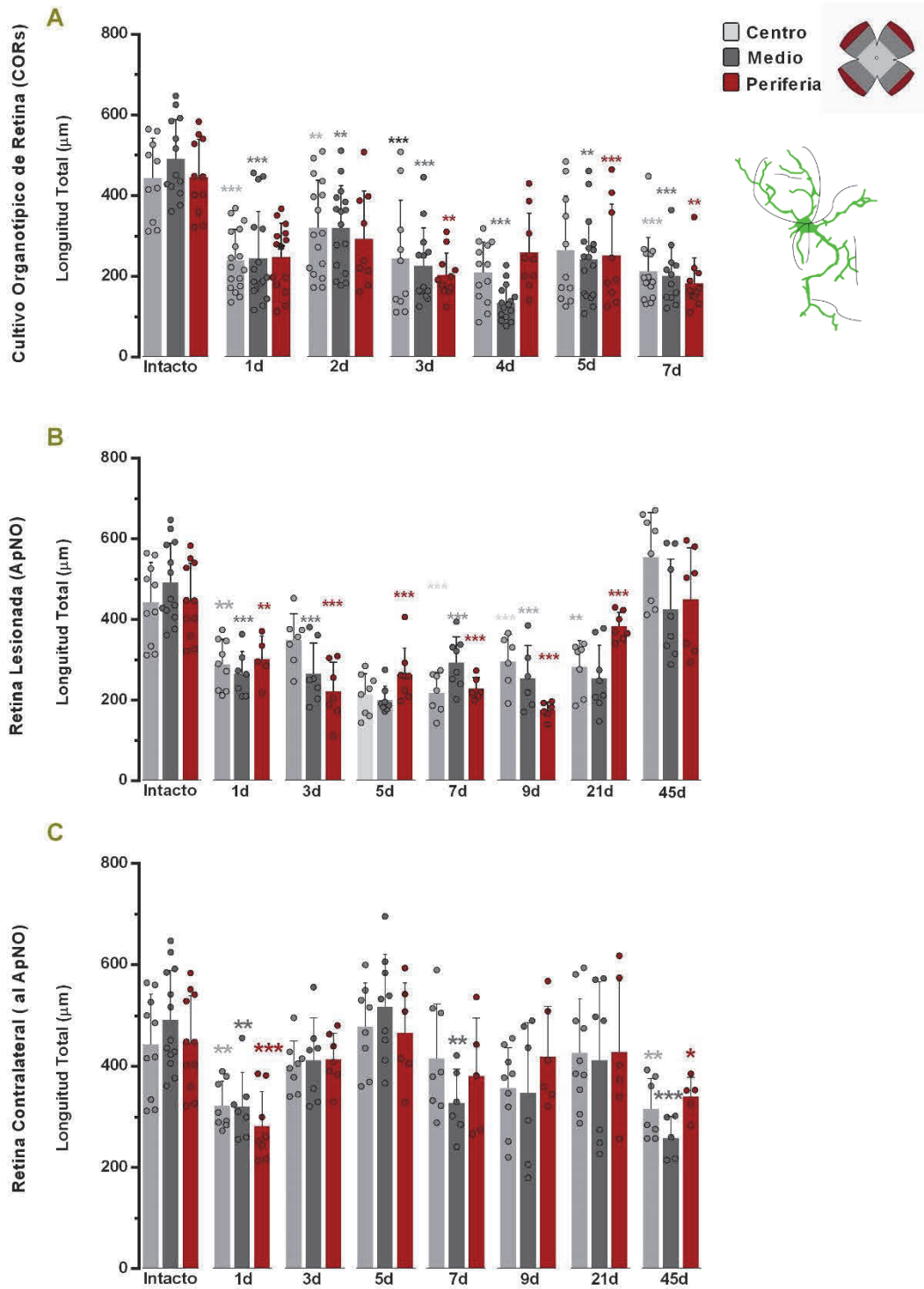


Figura 89: Longitud total \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple. prueba de Mann-Whitney).

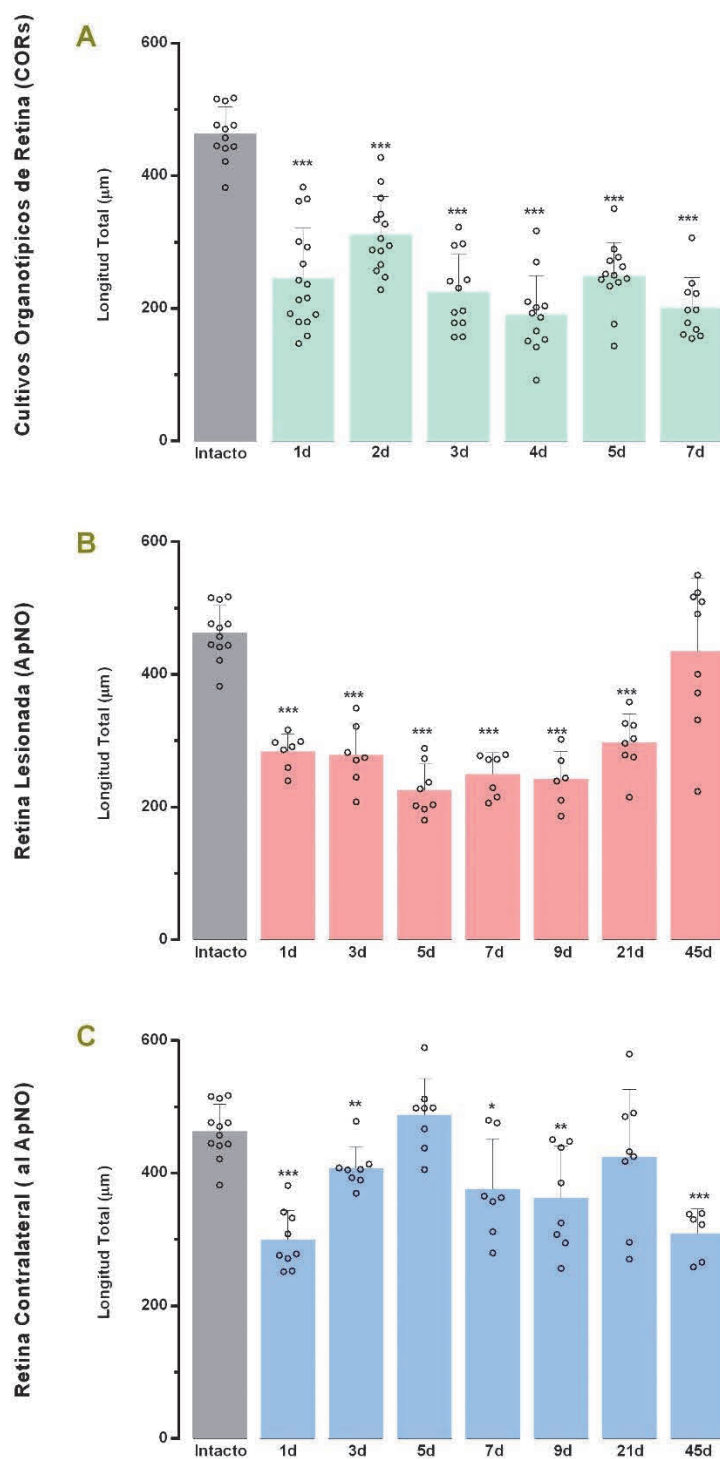


Figura 90: Longitud total \pm DE de las CMs en la retina. **A:** CORs. **B:** retinas lesionadas (ApNO). **C:** retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intactas), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple prueba de Mann-Whitney).

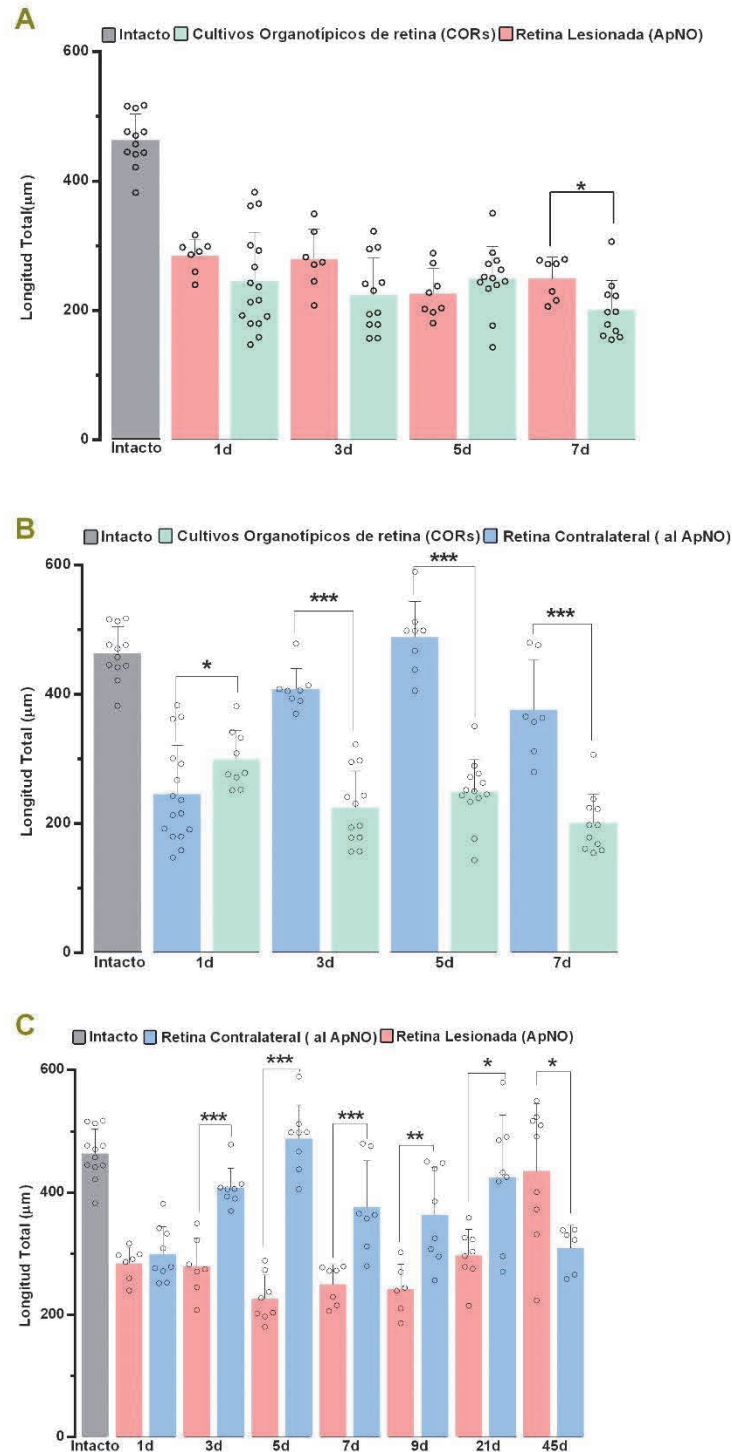


Figura 91: Gráficos comparativos que muestran la longitud total \pm DE de las CMs en CORs y retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).**

IV.3.4.1 LONGITUD TOTAL DE LAS RAMAS BASALES Y APICALES

A continuación, se realizó un análisis cuantitativo para determinar la longitud de las ramas basales y apicales de las CMs usando el programa Image J Fiji (**ver materiales y métodos**). Recordemos que las ramas basales o primarias son las que salen del soma de las CMs, mientras que las ramas apicales o secundarias son las que parten de las ramas basales o primarias (**Figura 92**).

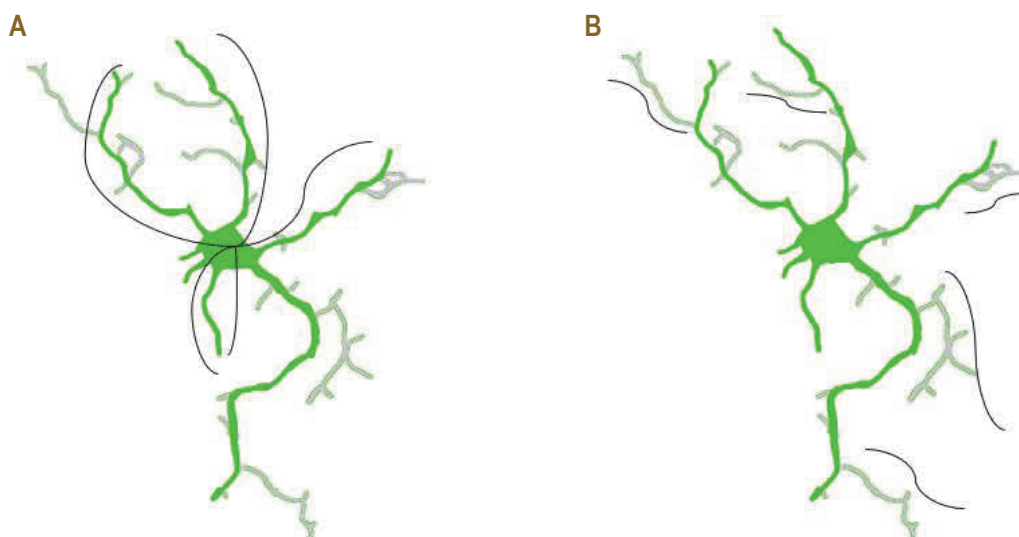


Figura 92: Ilustración donde se muestra cómo se calculó el número de procesos de las ramas basales y apicales en las CMs en la retina. **A y B:** Ramas basales en color verde y ramas apicales en color gris. **A y B)** Microglía de una retina axotomizadas a 21 días.

Siguiendo el mismo procedimiento del apartado anterior, se analizó la longitud total de las ramas basales y apicales de las CMs de 3 zonas de la retina: zona central, zona medial y zona periférica (**Figuras 93 y 94**), y de la retina completa (**Figuras 95 y 96**).

Dividiendo en tres zonas la retina y en comparación con el grupo intacto, los resultados mostraron diferencias significativas en CORs como en retinas tras ApNO en las 3 zonas de la retina a diferentes tiempos con respecto al intacto tanto en ramas basales como apicales (**Figuras 93 y 94**).

Las ramas basales fueron en CORs similares entre zonas, sin diferencias significativas entre ellas. En cambio, con respecto al grupo intacto si se encontraron diferencias significativas a diferentes días (**Figura 93 A**).

En retinas lesionadas, tampoco hubo diferencias entre zonas, pero sí con respecto al grupo intacto. Así se observó diferencias significativas de 1 a 21 días entre las distintas zonas y el grupo intacto (**Figura 93 B**).

En retinas contralaterales a la lesión tampoco se observaron cambios entre zonas, pero sí con respecto al grupo intacto. Se observaron un aumento a 3 y 5 días y a partir de ahí una disminución con respecto al grupo intacto (**Figura 93 C**).

Las ramas apicales fueron en CORs al igual que el apartado anterior similares entre zonas, sin diferencias significativas (**Figura 94**). En cambio, con respecto al grupo intacto si se encontraron diferencias significativas a todos los tiempos (**Figura 94 A**).

En retinas lesionadas, tampoco hubo diferencias entre zonas, pero sí con respecto al grupo intacto. Así se observó diferencias significativas a todos los tiempos entre las distintas zonas y el grupo intacto (**Figura 94 B**). En retinas contralaterales a la lesión tampoco se observaron cambios entre zonas, pero sí con respecto al grupo intacto. Se observaron diferencias significativas a 7 y 9ª todos los tiempos (**Figura 94 C**).

Aunque se observó diferencias entre las 3 zonas de la retina a diferentes tiempos, para facilitar la lectura se decidió realizar un análisis del número de procesos de las CMs en toda la retina en comparación con retina intacta (**Figuras 95 y 96**).

Al analizar la longitud de las ramas apicales se observó como en CORs hay una disminución significativa de la longitud desde el día 1 al 7 con respecto al grupo intacto (**Figura 95 A**).

Al analizar las retinas axotomizadas se observó una disminución hasta 7 días con respecto al intacto y como a partir de ahí y hasta 45 días es casi igual que intacto (**Figura 95 B**).

Cuando se analizó las retinas contralaterales a la lesión se vio como hasta 5 días hay un aumento de la longitud y como a partir de ahí una disminución que perdura hasta los 45 días (**Figura 95 C**).

Al comparar entre sí el modelo *in vitro* con las retinas axotomizadas se encontraron diferencias significativas a 5 días (**Figura 97 A**), en cambio, al comprar el modelo *in vitro* con las retinas contralaterales a la lesión si se observó diferencias significativas a 3 y 5 días siendo mayo la longitud en las retinas contralaterales a la lesión (**Figura 97 B**). Por último, al comparar la retina lesionada y la contralateral entre sí, se vieron diferencias significativas a 5 días siendo mayor la longitud en las retinas contralaterales a la lesión (**Figura 97 C**).

Al analizar la longitud de las ramas apicales se observó como en CORs hay una disminución significativa de la longitud desde el día 1 hasta el día 7 con respecto al grupo intacto (**Figura 96 A**).

Al analizar las retinas axotomizadas se observó una disminución a todos los tiempos con respecto al intacto (**Figura 96 B**).

Cuando se analizó las retinas contralaterales a la lesión se observó una disminución a tos los tiempos con respecto al intacto (**Figura 96 C**).

Al comparar entre sí el modelo *in vitro* con las retinas axotomizadas no se encontraron diferencias significativas (**Figura 98 A**), en cambio, al comprar el modelo *in vitro* con las retinas contralaterales a la lesión si se observaron diferencias a 3 días, siendo la longitud mayor en las retinas contralaterales a la lesión (**Figura 98 B**). Por último, al comparar la retina lesionada y la contralateral entre sí, se vieron diferencias significativas a 5 días, siendo mayor en las retinas contralaterales a la lesión (**Figura 98 C**).

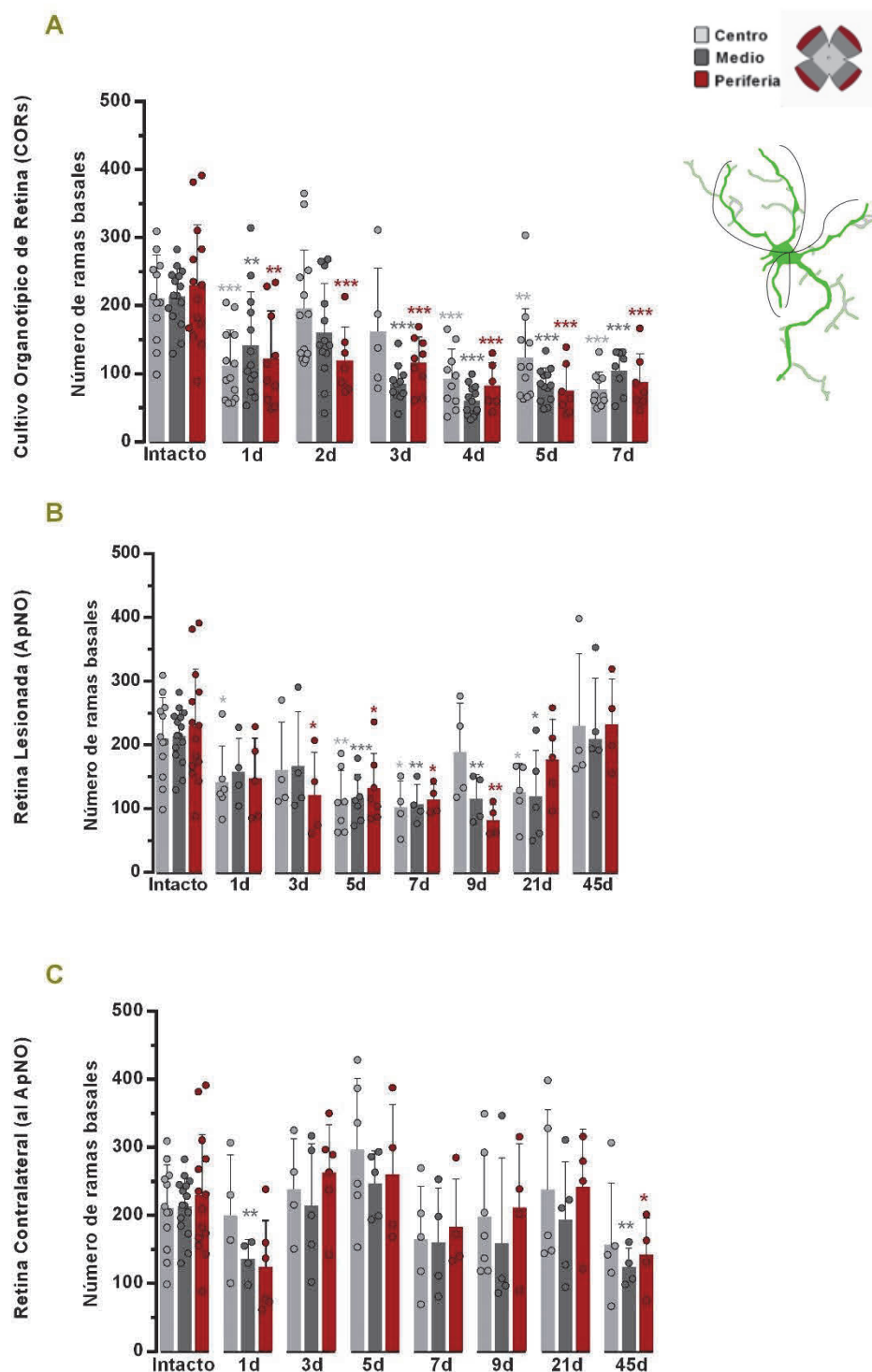


Figura 93: Longitud total de las ramas basales \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

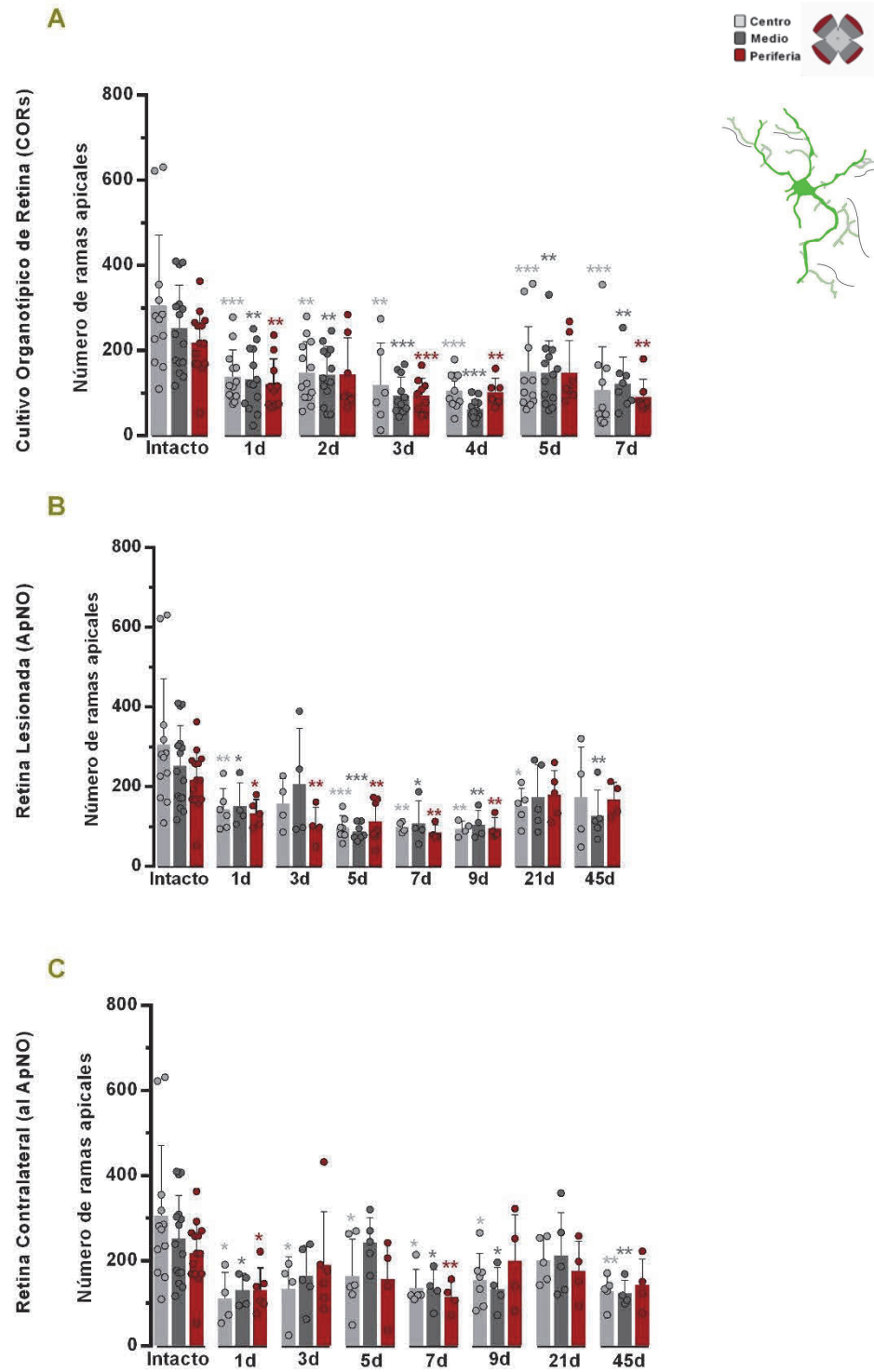


Figura 94: Longitud total de las ramas apicales \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

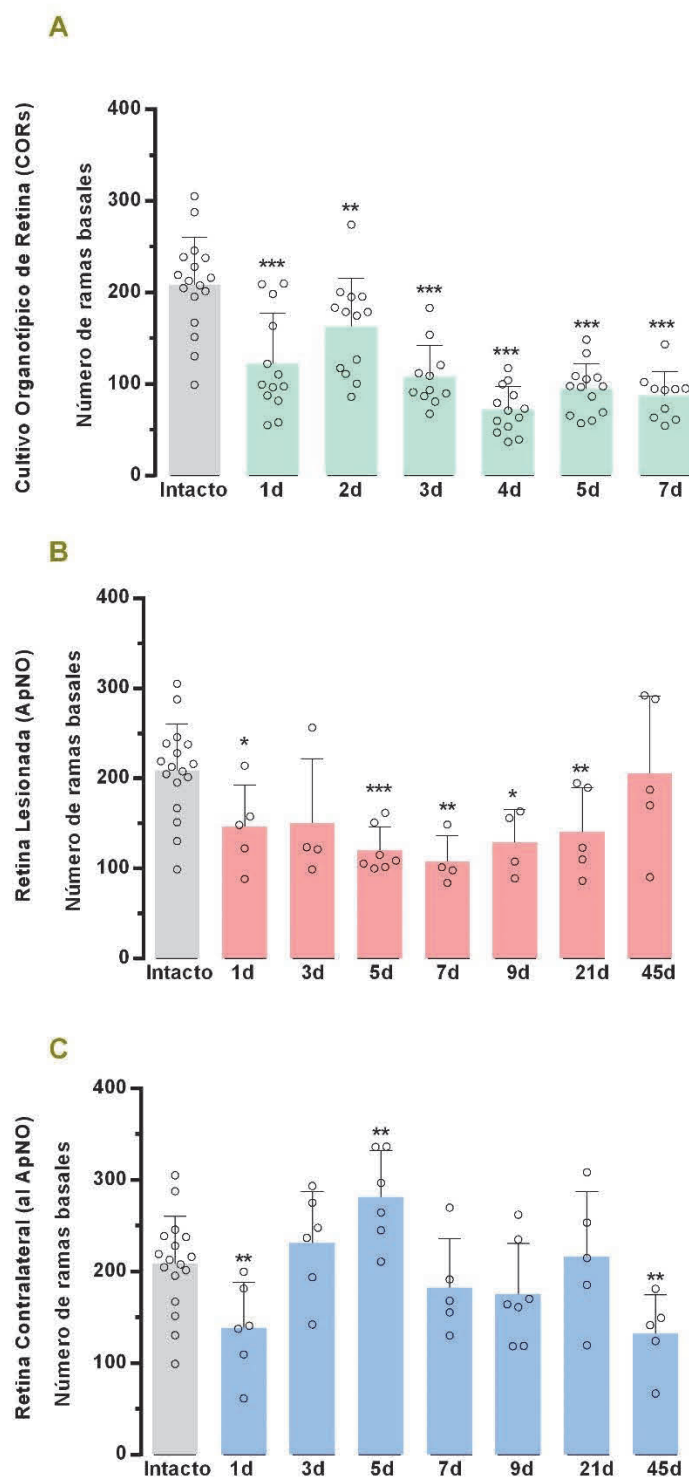


Figura 95: Longitud total de las ramas basales \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORS. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intactas), verde (CORS), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. ($p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ Anova comparación. multiple prueba de Mann-Whitney).

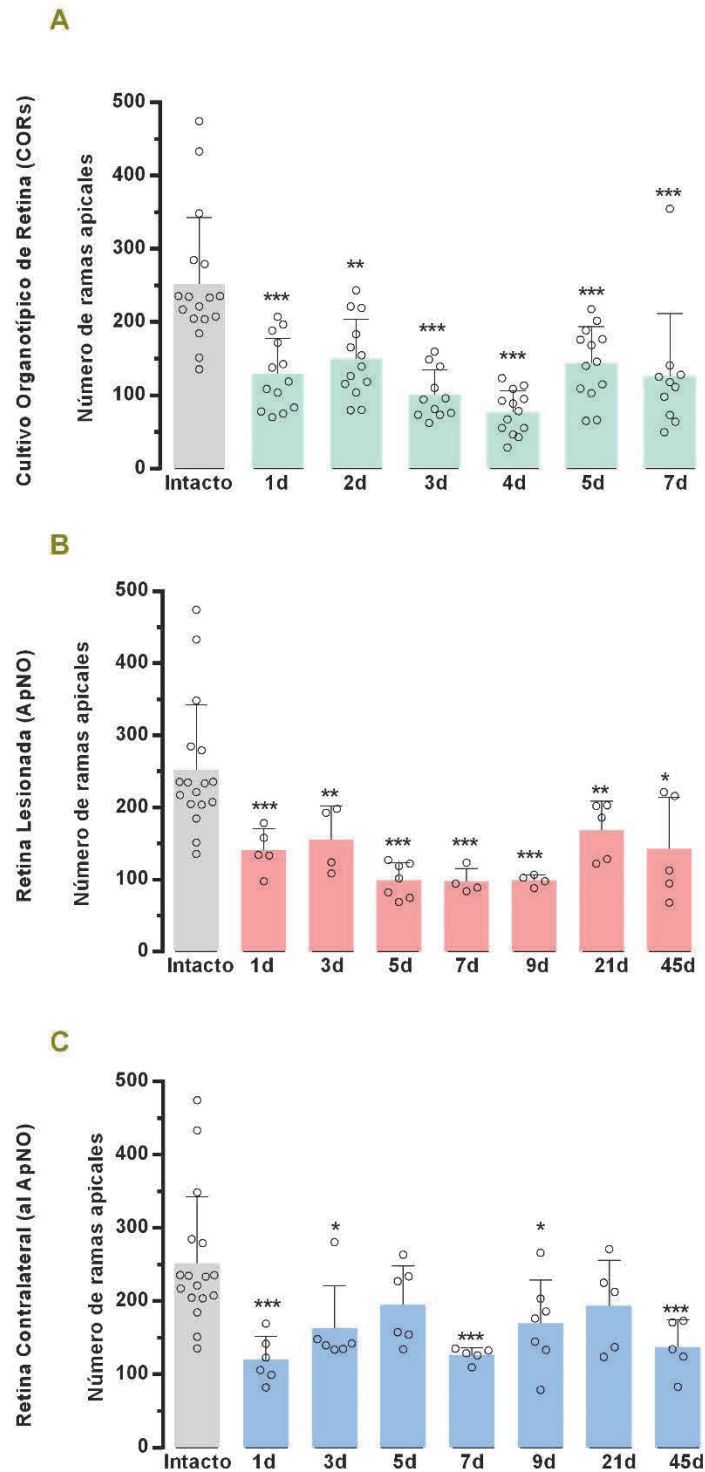


Figura 96: Longitud total de las ramas apicales \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intactas), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. multiple prueba de Mann-Whitney).

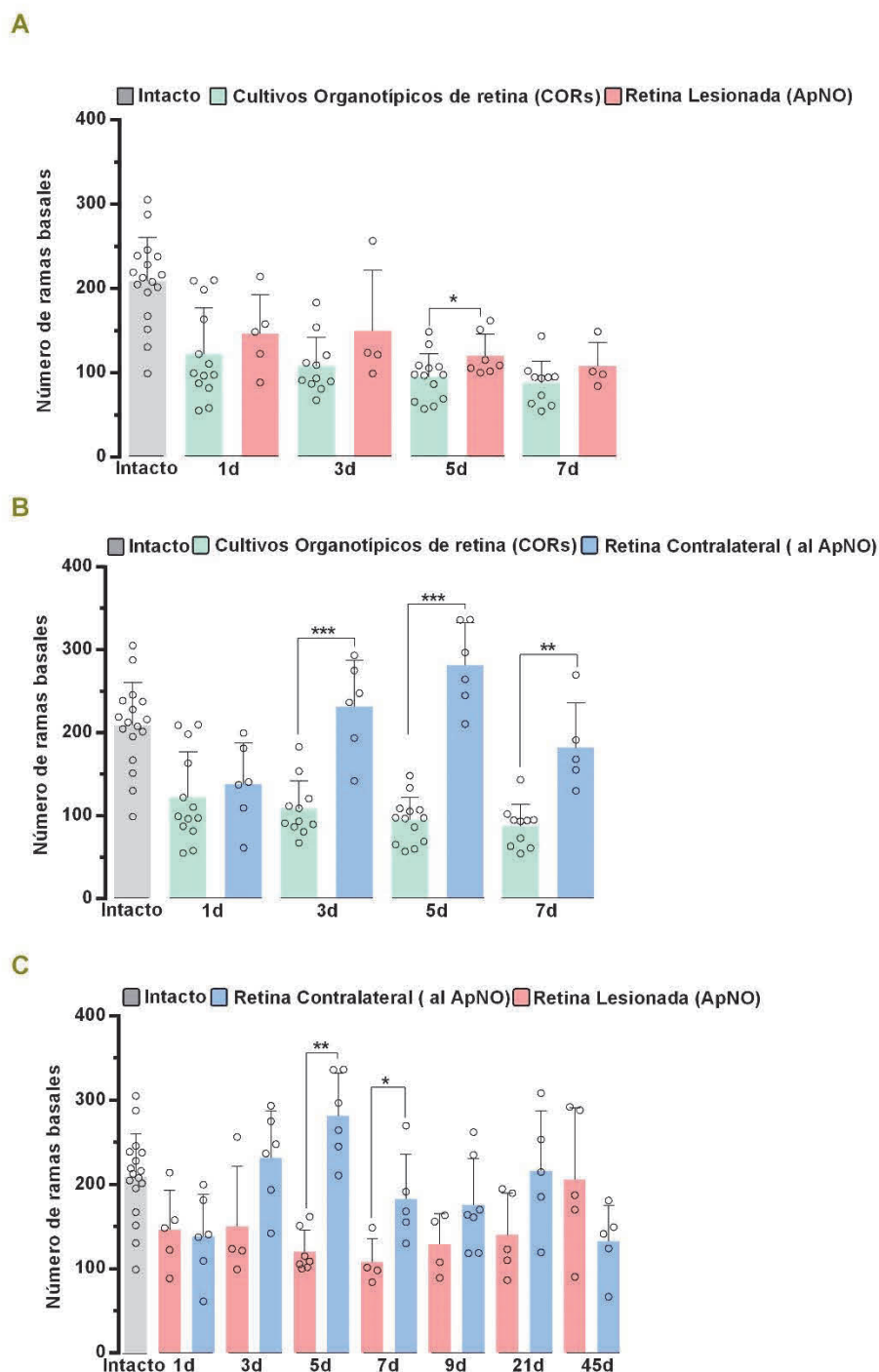


Figura 97: Gráficos comparativos que muestran la longitud total del número de ramas basales \pm DE de las CMs en CORs y retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. **A:** CORs y retinas lesionadas (ApNO). **B:** CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). **C:** retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

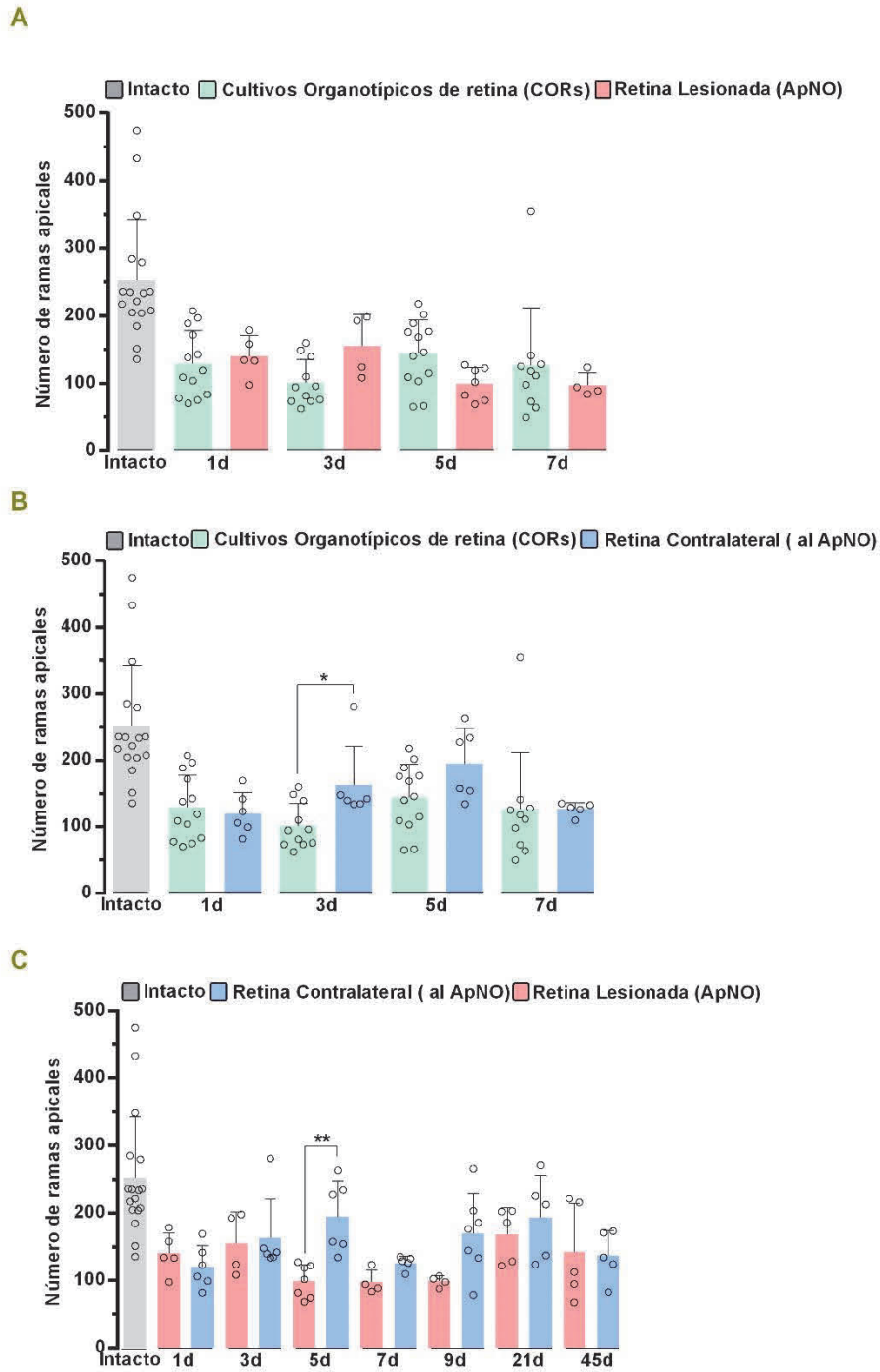


Figura 98: Gráficos comparativos que muestran la longitud total del número de ramas apicales \pm DE de las CMs en CORs y retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. **A:** CORs y retinas lesionadas (ApNO). **B:** COR y retinas contralaterales (ApNO). **C:** retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación. múltiple. prueba de Mann-Whitney).

IV.3.5. VOLUMEN TOTAL DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

En cuarto lugar, se procedió a calcular el volumen de las CMs en CORs y en retinas axotomizadas mediante el programa Image J (ver apartado de materiales y métodos).

Se vio como en CORs hay un aumento significativo a todos los tiempos estudiados comparado con el grupo intacto (Figura 99 A). Con respecto a las retinas lesionadas y contralaterales a la lesión se vio también un aumento significativo a todos los tiempos post-lesión comparado con el grupo intacto (Figura 99 B y C).

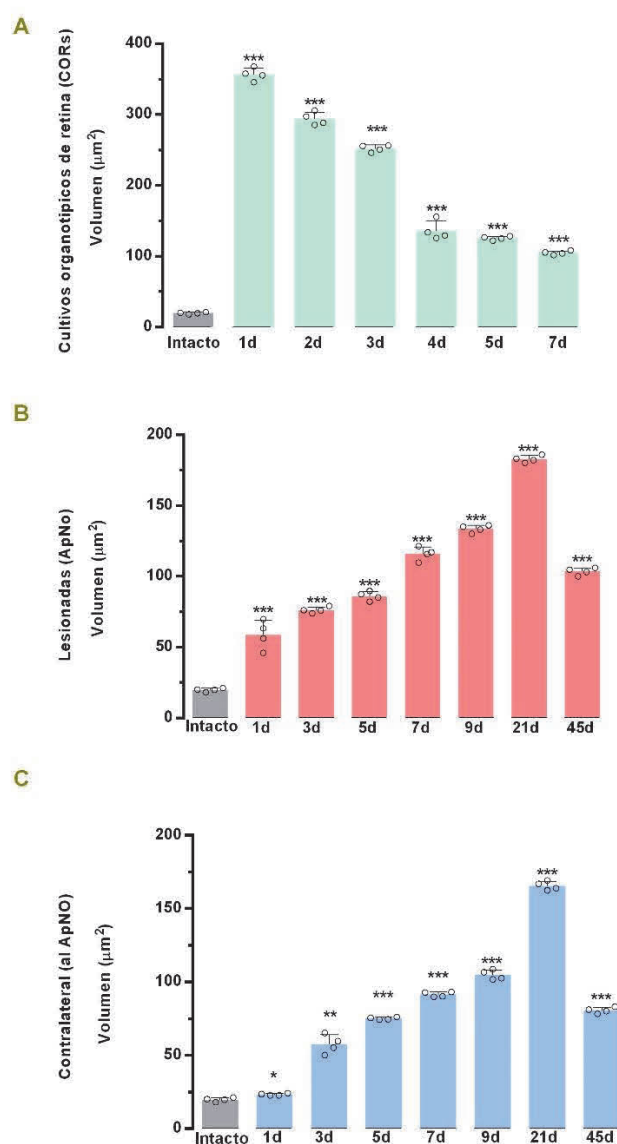


Figura 99: Volumen ± DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).

Al comparar entre sí ambos modelos se observó un aumento significativo del volumen entre el modelo *in vivo* e *in vitro*, siendo mayor en el modelo *in vitro* (Figura 100 A y B).

En las retinas axotomizadas se vio como a tiempos largos el volumen sigue aumentando con respecto al grupo intacto. Se vio también diferencias significativas entre retinas lesionadas y contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos post-lesión (Figura 100 C).

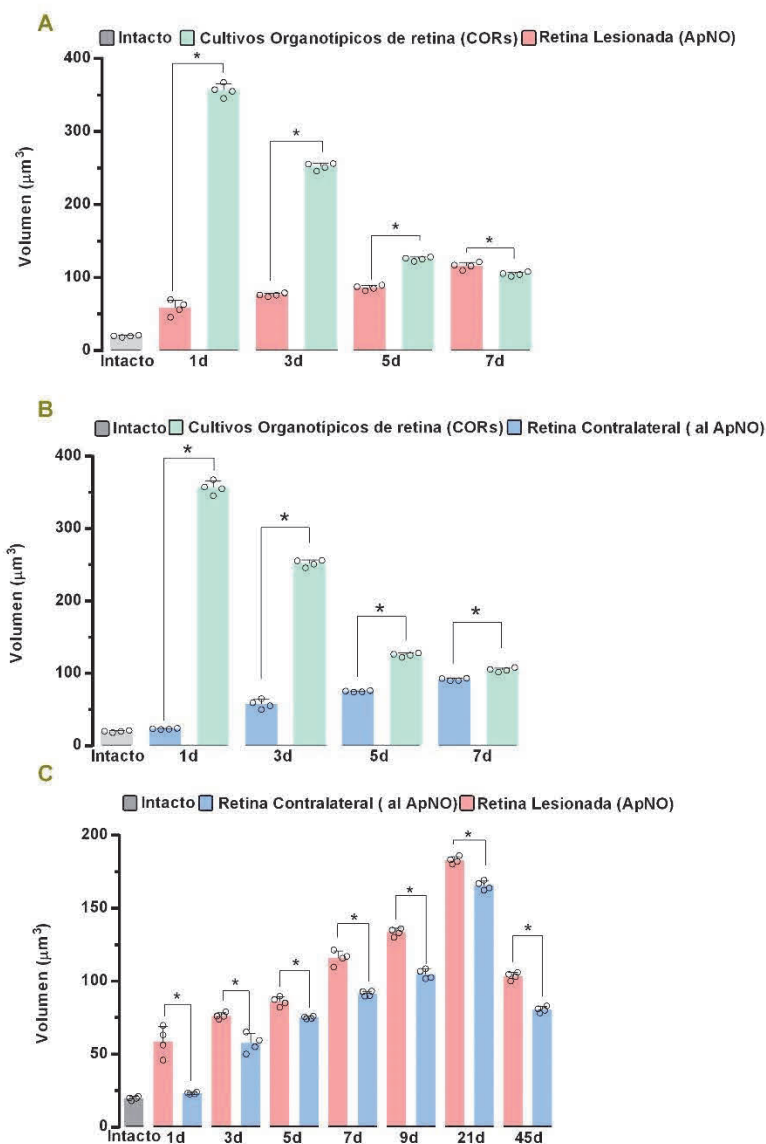


Figura 100: Gráficos comparativos que muestran el volumen \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina control), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).

IV.3.6. ÁREA Y PERÍMETRO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

A continuación, se midió el área y perímetro que tenía cada CMs mediante Image J Fiji (**ver materiales y métodos**). Al igual que en apartados anteriores, se analizaron en 3 zonas de la retina: zona central, zona medial y zona periférica (**Figuras 101 y 102**). Se observó diferencias significativas en el área y en el perímetro en las 3 zonas de la retina a todos los tiempos con respecto al intacto en CORs (**Figuras 101 y 102**). En la retina lesionada como en la retina contralateral a la lesión se observó también diferencias significativas en el área y en el perímetro a diferentes tiempos con respecto al intacto (**Figuras 101 y 102**). Aunque se observó diferencias entre las 3 zonas de la retina a diferentes tiempos, para facilitar la lectura se decidió realizar un análisis total (**Figuras 103 y 104**).

En cuanto al área, en CORs se vio un aumento significativo de 1 a 7 días con respecto al grupo intacto (**Figura 103 A**). De igual forma este aumento significativo se vio también de 1 a 7 días con el perímetro (**Figura 105 A**).

Con respecto a la retina lesionada, se observó un aumento significativo en el área de 1 a 9 días con respecto al grupo intacto y a partir de ahí comienza una disminución, siendo a 45 días el área parecida al grupo intacto (**Figura 103 B**). Al estudiar también el perímetro, se observó un aumento significativo de 1 a 9 días y a partir de ahí una disminución, siendo a 45 días parecido al grupo intacto (**Figura 105 B**).

En la retina contralateral a la lesión hay una disminución en el área a los diferentes tiempos post-lesión (**Figura 103 C**). Con respecto al perímetro se observó que es parecido al grupo intacto (**Figura 105 C**).

Al comparar entre sí ambos modelos se observó un aumento significativo del área entre el modelo *in vivo* e *in vitro*, siendo mayor en el modelo *in vitro* (**Figura 106 A y B**).

En las retinas axotomizadas se vio como a diferentes tiempos el área es parecida al grupo intacto (**Figura 104 C**). En cambio, al comparar estas retinas, se vio como a tiempos cortos (1-7 días) hay un ligero aumento del perímetro en la retina lesionada con respecto a la contralateral a la lesión y que en tiempos largos (9-45 días) esta disminuía con respecto a la retina contralateral a la lesión (**Figura 106 C**).

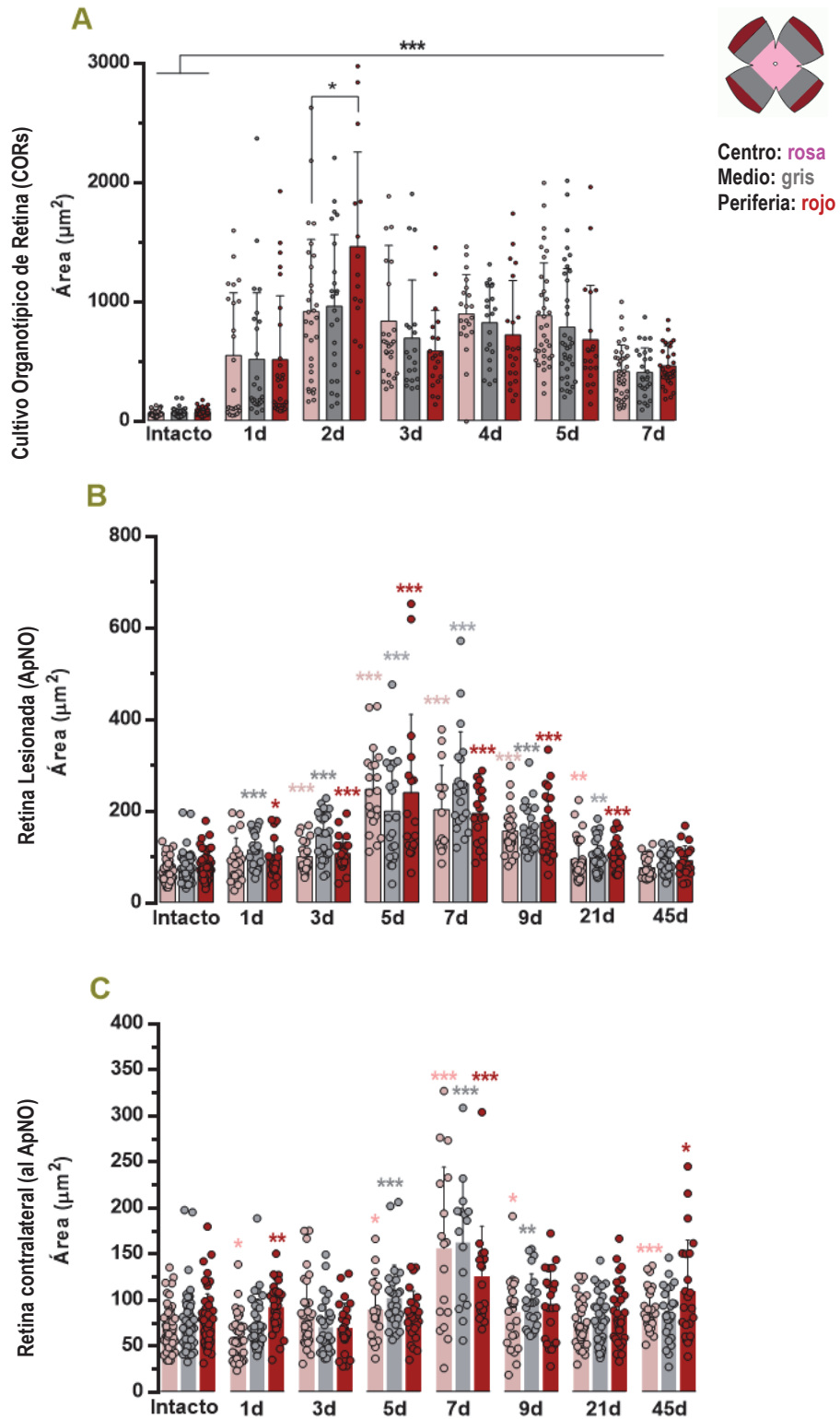


Figura 101: Área \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORS. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).

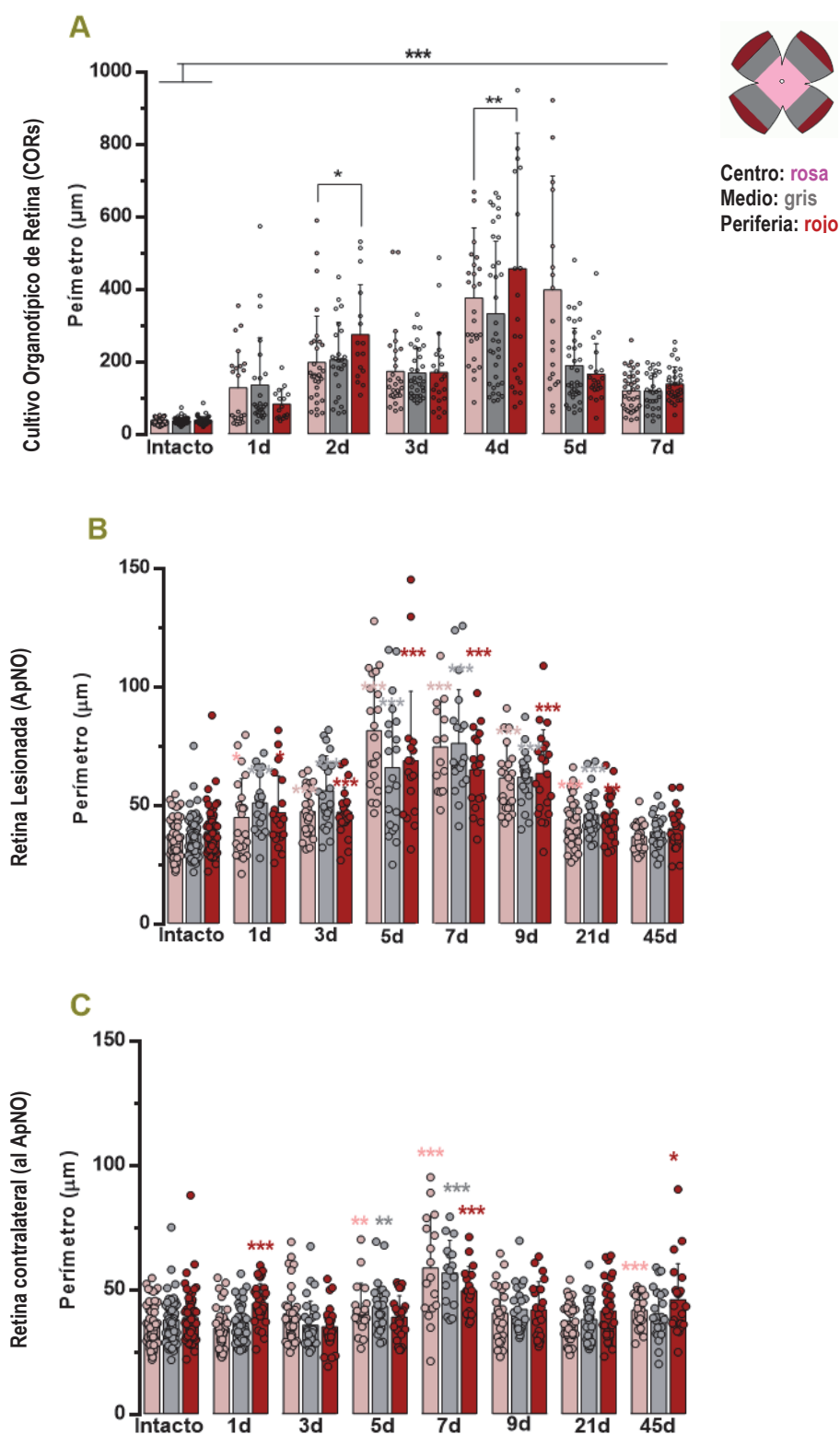


Figura 102: $\text{Perímetro} \pm \text{DE}$ de las CMs en las 3 zonas de la retina. **A:** CORs. **B:** retinas lesionadas (ApNO). **C:** retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple, prueba de Mann-Whitney).

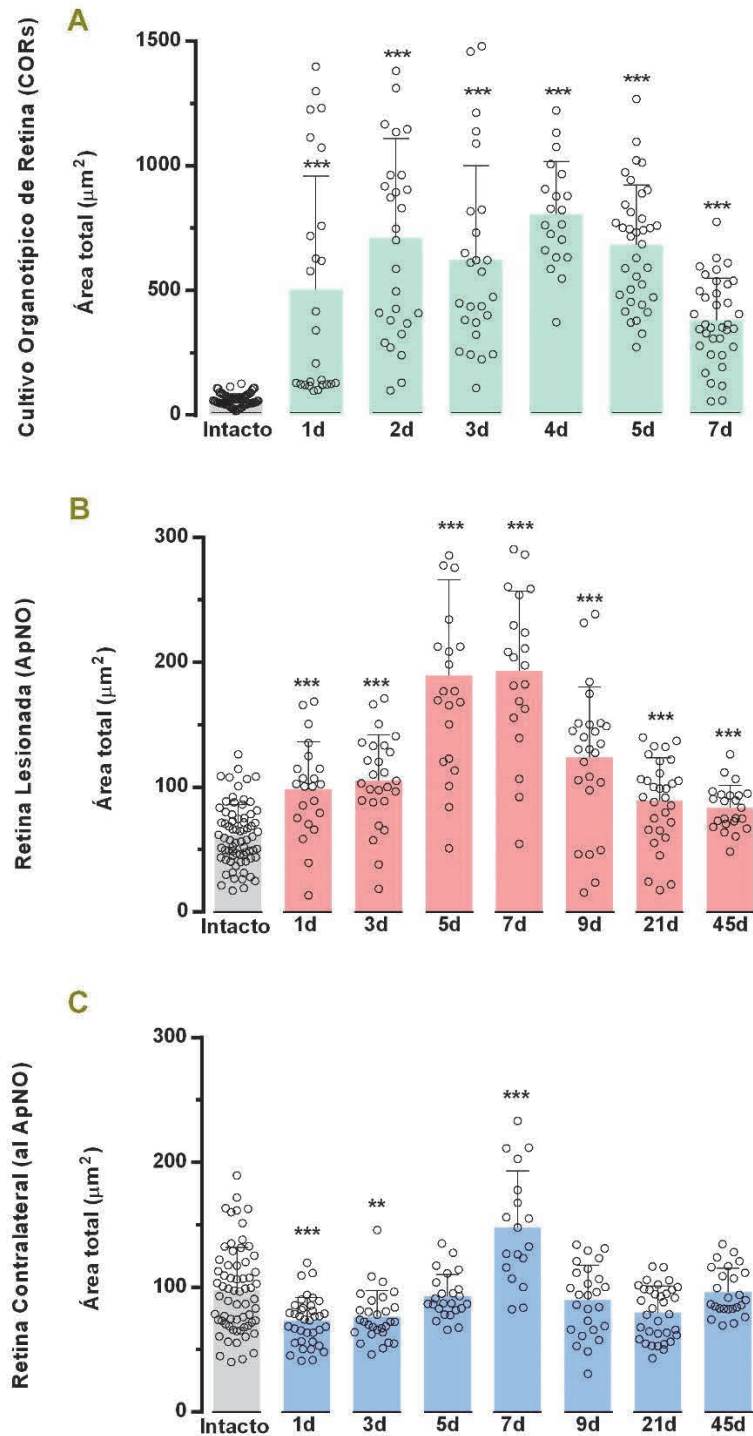


Figura 103: Área total \pm DE de las CMs en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).

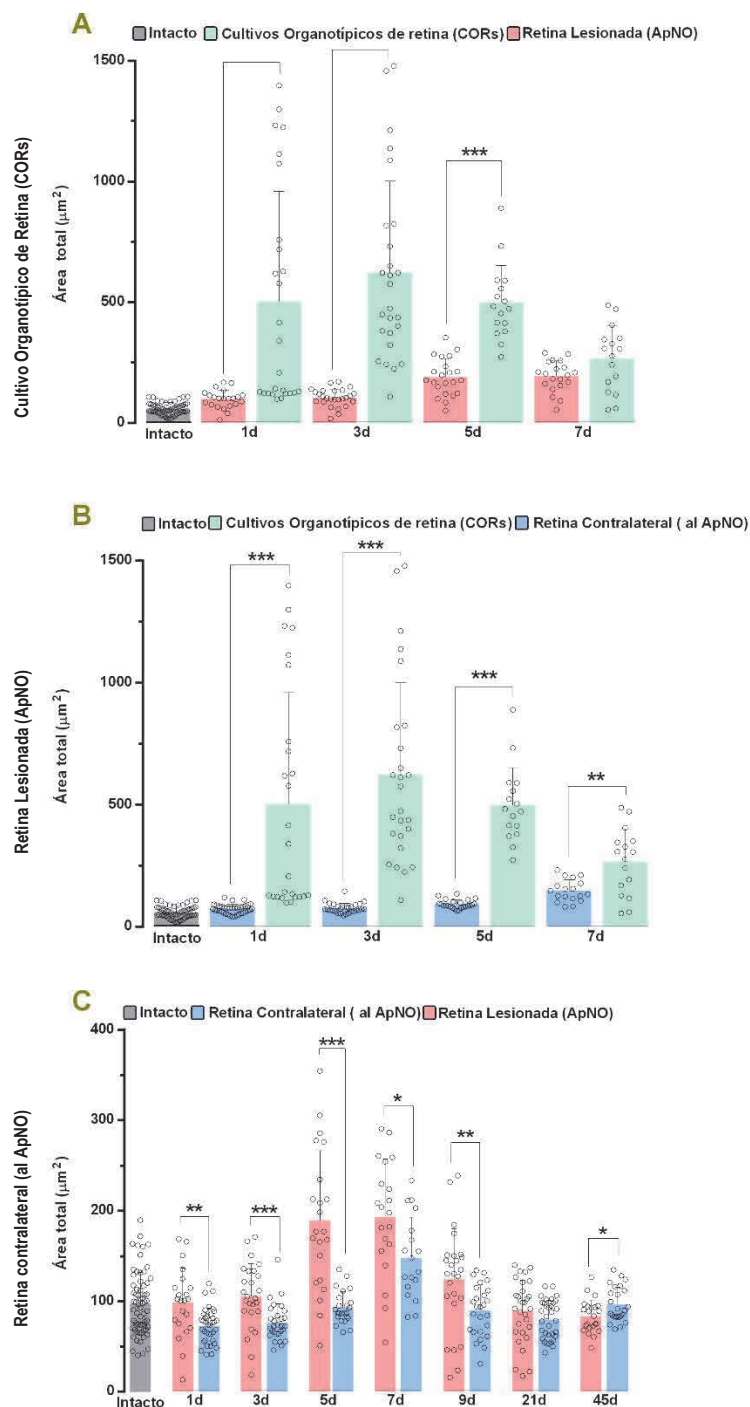


Figura 104: Gráficos comparativos del área \pm DE de las CMs sen la retina. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). B: CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). C: retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNo y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).**

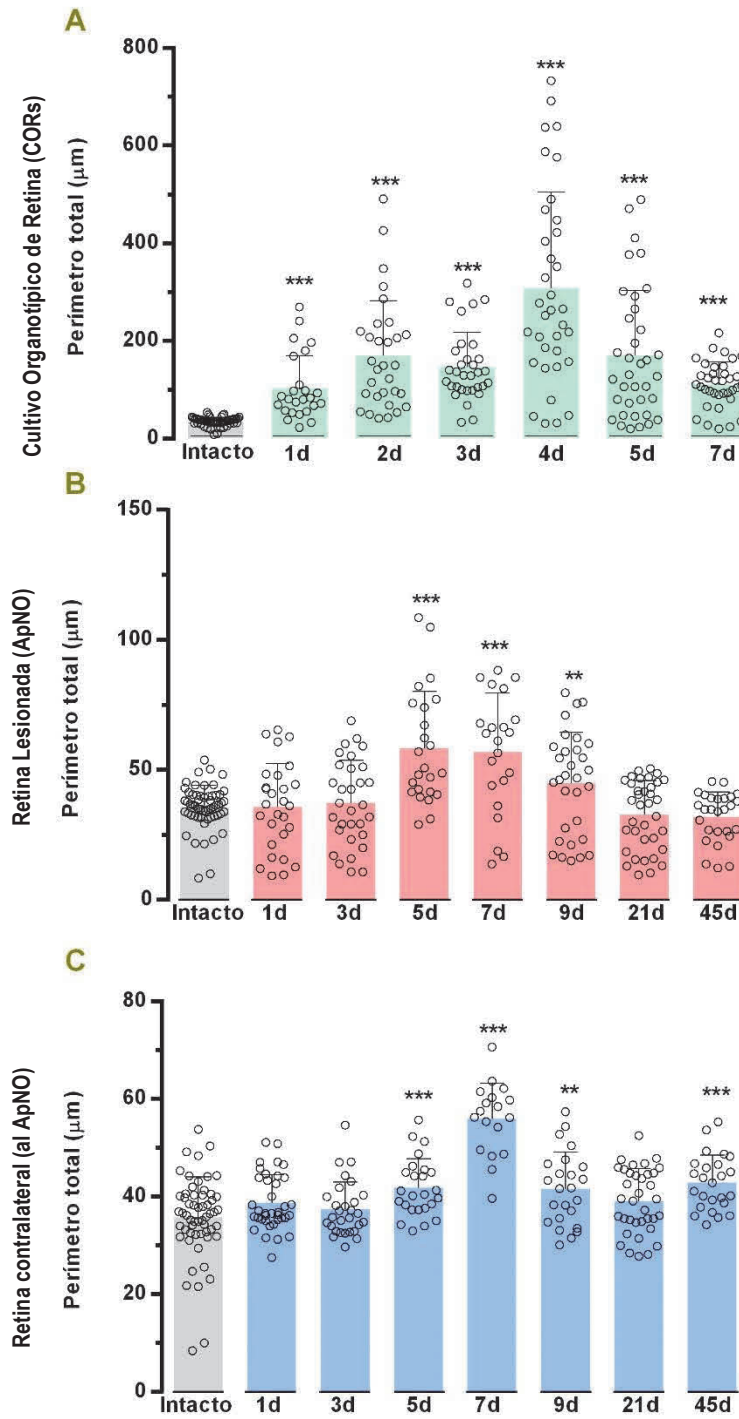


Figura 105: **Perímetro total ± DE de las CMs en la retina. A:** CORs. **B:** retinas lesionadas (ApNO). **C:** retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).

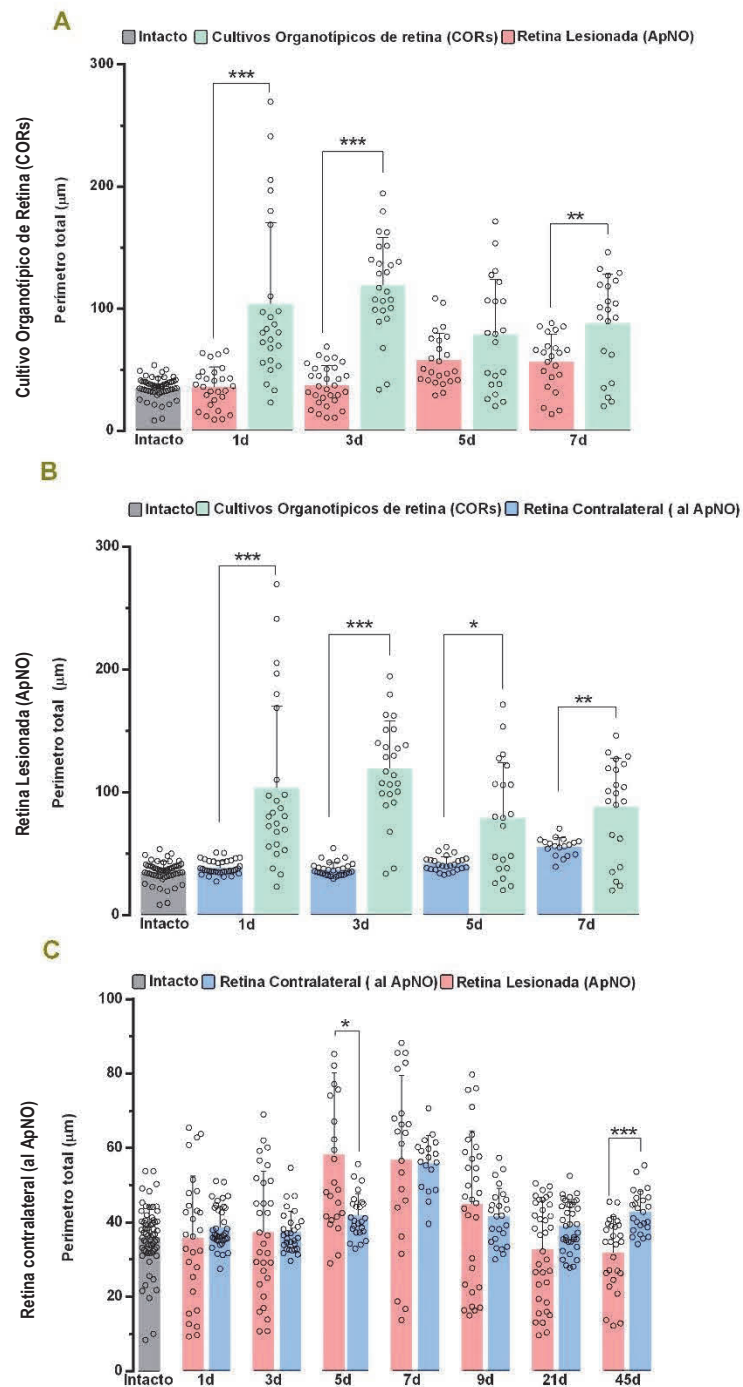


Figura 106: Gráficos comparativos del perímetro \pm DE de las CMs en la retina. A: CORs y retinas lesionadas (ApNO). **B:** CORs y retinas contralaterales a la lesión (ApNO). **C:** retina lesionada (ApNO) y retinas contralaterales a la lesión (ApNO), Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparando entre CORs y ApNO y entre retinas axotomizadas (lesionada vs contralateral a la lesión). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).

IV.3.7. CIRCULARIDAD DEL SOMA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

Después se procedió a calcular la circularidad del soma de las CMs mediante el programa Image J (**ver materiales y métodos**).

Un valor de circularidad de 1,0 nos indica un soma circular perfecto y valores cercanos a 0 nos indican un soma alargado.

Al igual que en apartados anteriores, se analizaron en 3 zonas de la retina: zona central, zona medial y zona periférica (**Figura 107**). Se observó diferencias significativas en las 3 zonas de la retina a todos los tiempos con respecto al intacto en CORs (**Figura 107**). En la retina lesionada como en la retina contralateral a la lesión se observó también diferencias significativas a diferentes tiempos con respecto al intacto (**Figura 107**). Aunque se observó diferencias entre las 3 zonas de la retina a diferentes tiempos, para facilitar la lectura se decidió realizar un análisis total (**Figura 107**).

Se observó como en CORs la circularidad de las CMs es más cercana a 0, mostrando que las CMs son células con el soma más alargado (**Figura 108 A**). Con respecto a las CMs tras ApNO, se observó como en retinas lesionadas la circularidad es más parecida a 0 en los diferentes tiempos post-lesión indicativo de un soma alargado, pero se vio como a 45 días la circularidad es más cercana a 1, lo que indicaba un soma circular (**Figura 108 B**). En las retinas contralaterales a la lesión se vio como a todos los tiempos la circularidad es más próxima a 0, indicando soma circular (**Figura 108 B**).

Al comparar entre sí ambos modelos no se observaron diferencias en la circularidad del soma de las CMs entre el modelo *in vivo* e *in vitro*, (**Figura 108 A y B**). Con respecto a las CMs tras ApNO, tampoco se observaron cambios en la morfología entre la retina lesionada y contralateral a la lesión (**Figura 108 C**).

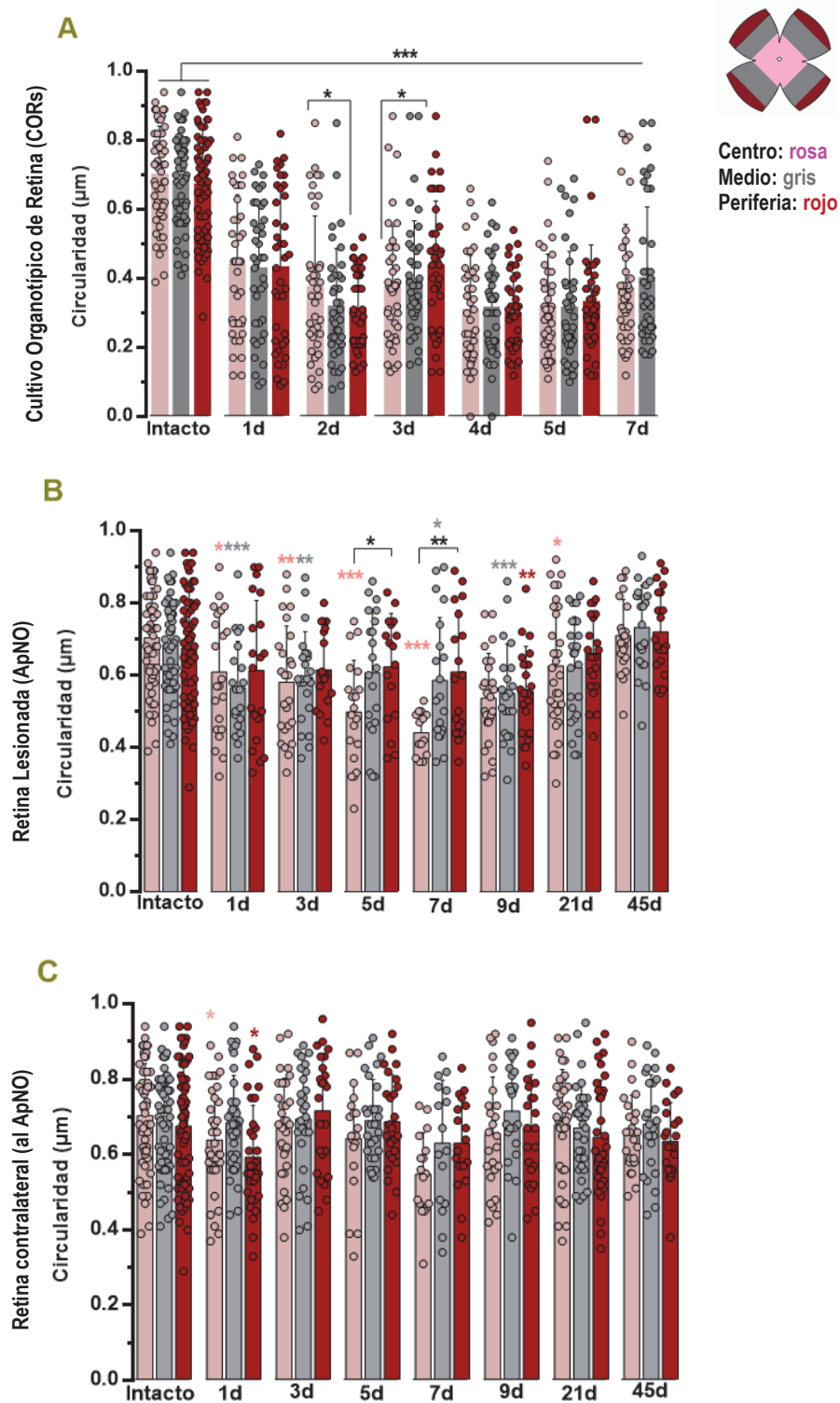


Figura 107: Circularidad \pm DE de las CMs en las 3 zonas de la retina. A: CORs. B: retinas lesionadas (ApNO). C: retinas contralaterales a la lesión (ApNO). Zona central (gris claro), zona medial (gris oscuro) y zona periférica (rojo). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney).

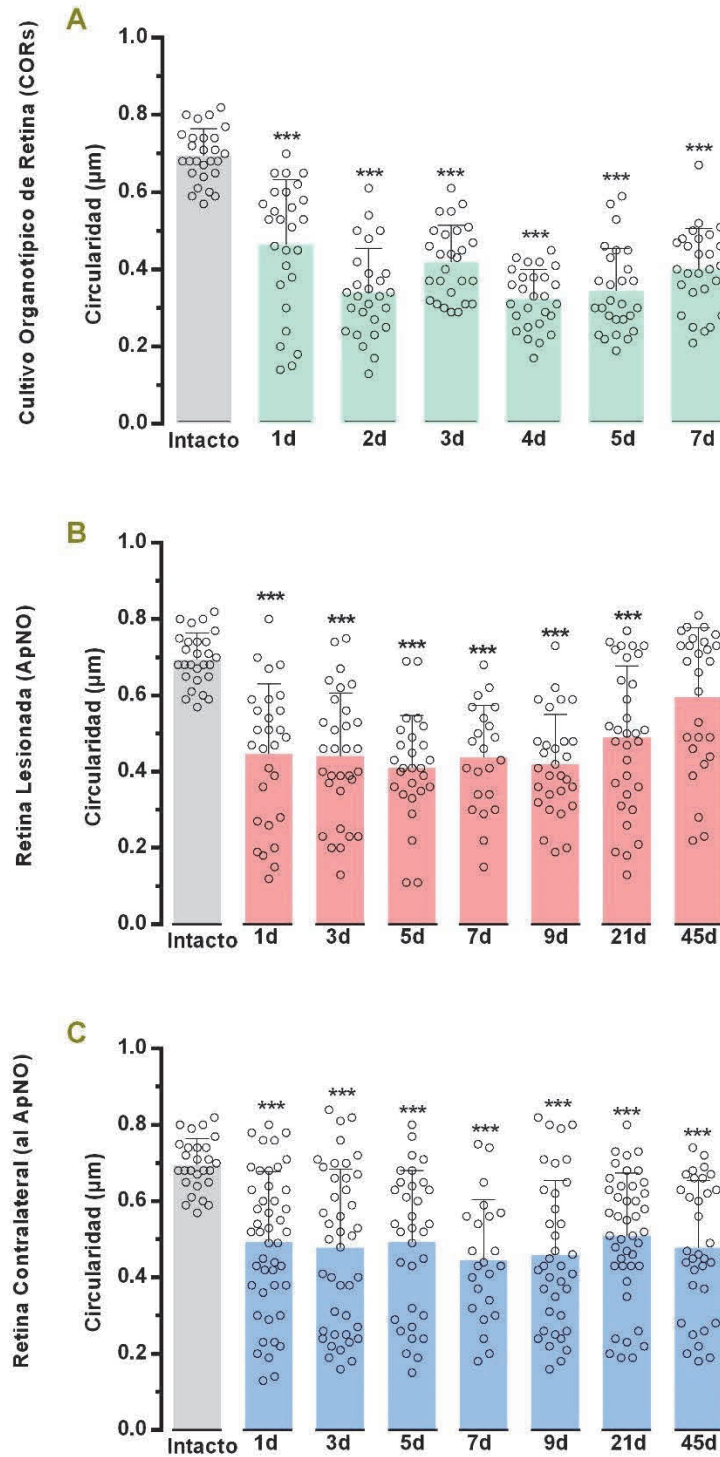


Figura 108: Circularidad \pm DE de las CMs en CORs, Retina lesionada (ApNO) y Retina contralateral a la lesión (ApNO). * Diferencia significativa comparado con intacto. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación multiple. prueba de Mann-Whitney). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión).

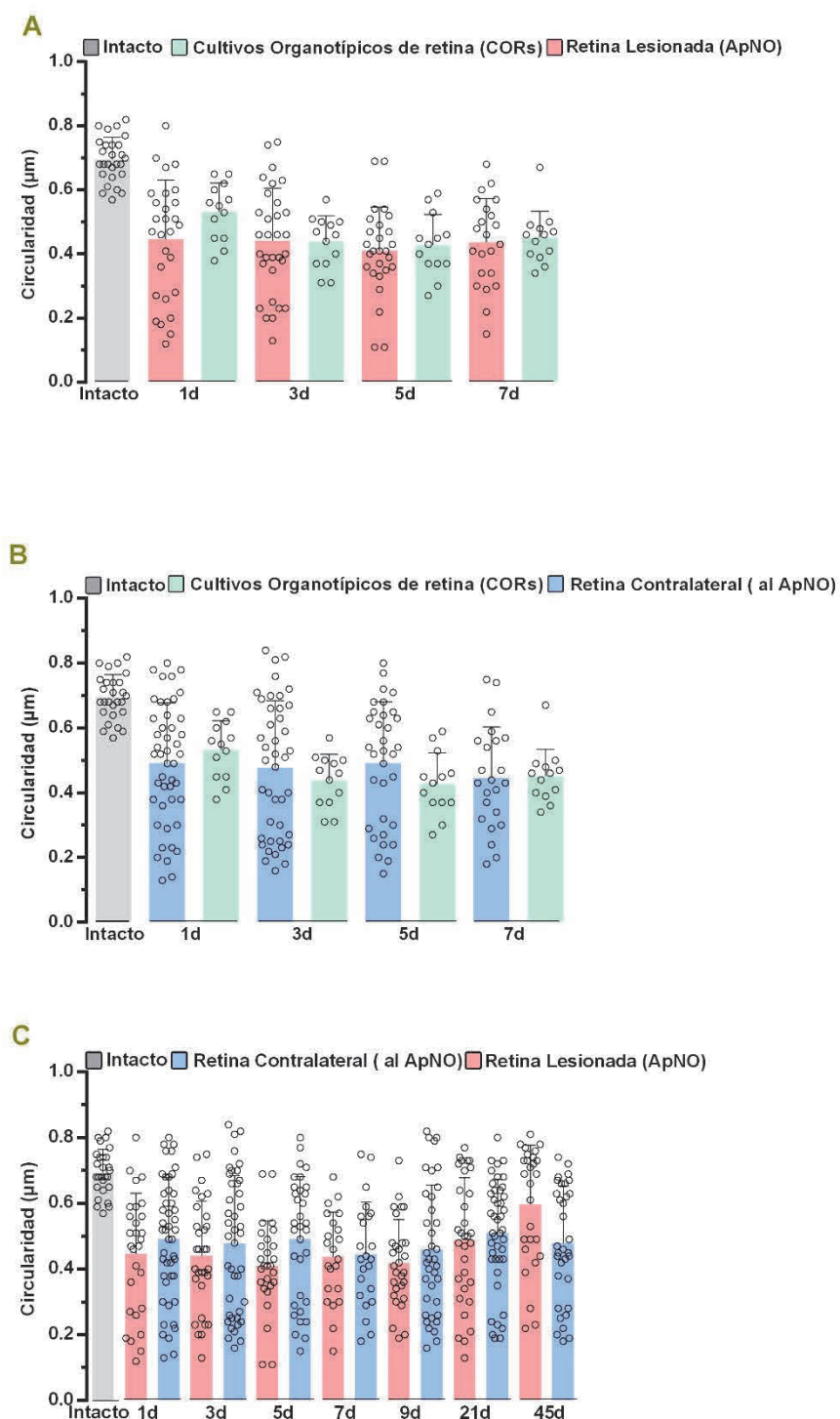


Figura 109: Gráficos comparativos de la circularidad \pm DE de las CMs en la retina. Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión). * Diferencia significativa comparado con intacto (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Anova comparación múltiple. prueba de Mann-Whitney).

IV.3.8. SHOLL DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

El análisis de Sholl nos permitió evaluar el número de intersecciones de las CMs que tiene cada célula a determinadas distancias del núcleo. Se procedió a realizar este análisis en ambos modelos (**Figuras 111 y 112**). El radio máximo de intersección (extraído del análisis de Sholl) en CORs, disminuía conforme pasan los días, siendo a 7 días parecido al grupo intacto (**Figura 110 A**). Tras ApNO, se vio como en la retina lesionada el radio máximo disminuía a todos los tiempos post-lesión (**Figura 110 B**). En cambio, en la retina contralateral a la lesión el radio máximo logra ser superior al grupo intacto a tiempos largos (**Figura 110 C**).

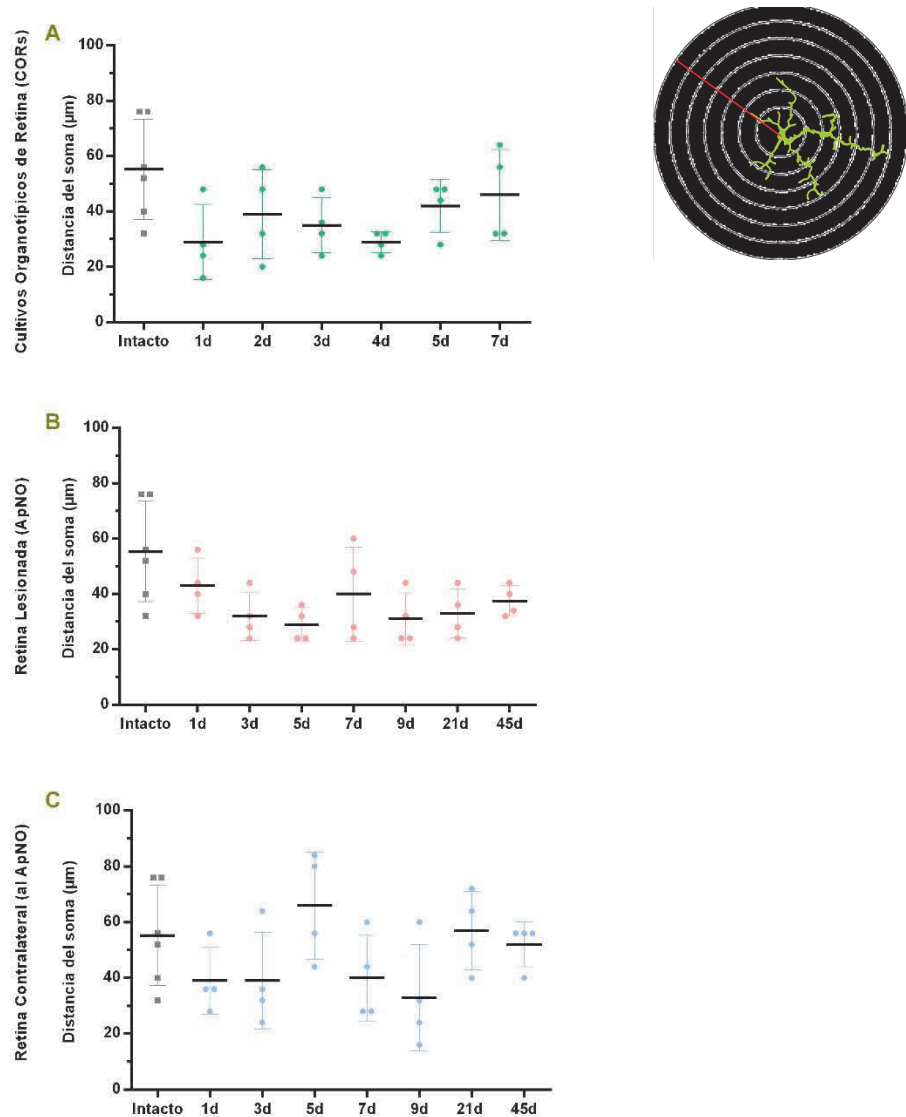


Figura 110: Radio máximo en el que interseccionan las CMs tomando como centro su soma. A: CORs. B: Retina lesionada. C: Retina Contralateral a la lesión. Gris (Retina intacta), verde (COR), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral).

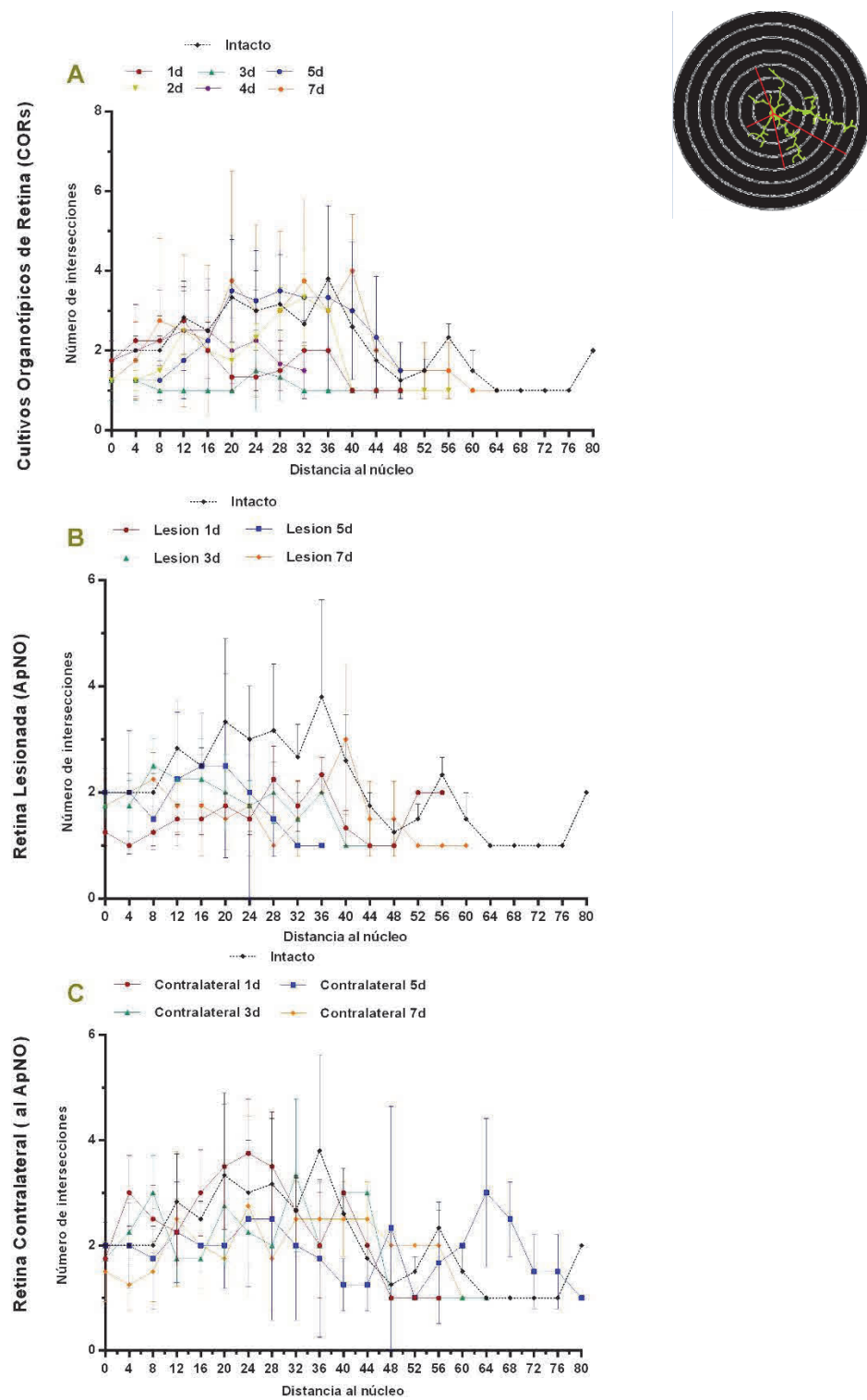


Figura 111: Número de intersecciones a cada radio a tiempos cortos tras ApNO y en CORs. Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión).

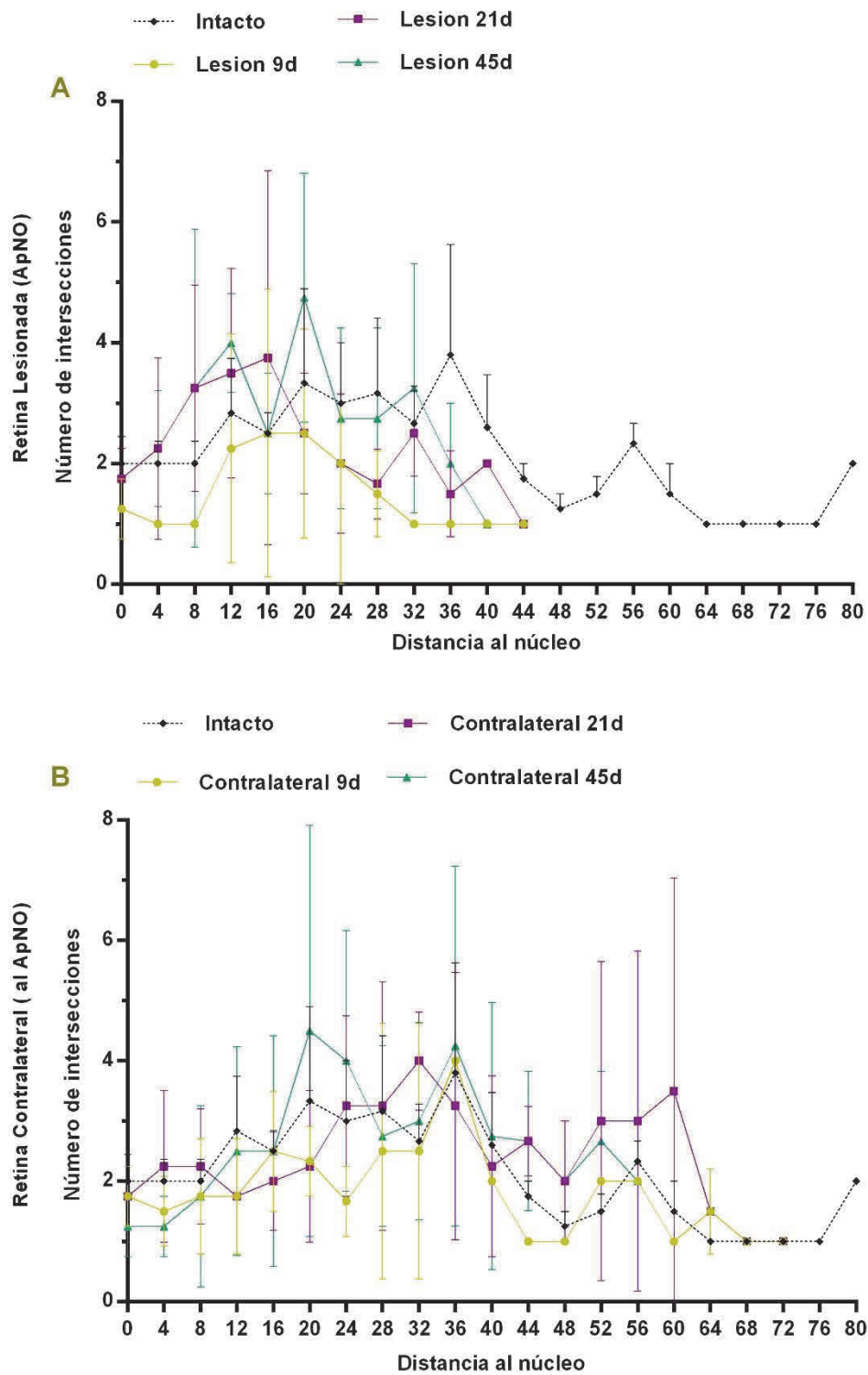


Figura 112: Número de intersecciones a cada radio a tiempos largos en retinas lesionadas (A) y contralaterales a la lesión (B). Gris (Retina intacta), verde (CORs), rojo (retina lesionada) y azul (retina contralateral a la lesión).

IV.3.9. RESUMEN

- I) Las CMs en CORs con respecto a intacto:**
- Aumentan de tamaño de soma
 - Disminuye su longitud total
 - Disminuye del número de procesos, tanto basales como apicales
 - Aumenta su volumen
 - Aumento del área y el perímetro
 - Cambia su circularidad de esféricas a alargadas
 - Disminuye su radio máximo (extraído del análisis del Sholl)
- II) Las CMs en la retina lesionada con respecto a intacto:**
- Aumentan de tamaño de soma
 - Disminuye su longitud total, tanto basales como apicales
 - Disminuye del número de procesos, tanto basales como apicales
 - Aumenta su volumen
 - Aumenta su área y perímetro
 - Cambia su circularidad de esféricas a alargadas
 - Disminuye su radio máximo (extraído del análisis del Sholl)
- III) Las CMs en la retina contralateral a la lesión con respecto a intacto:**
- Aumentan de tamaño de soma
 - Disminuye su longitud total, tanto basales como apicales
 - Disminuye del número de procesos, tanto basales como apicales
 - Aumenta su volumen
 - Aumenta su área y perímetro
 - Cambia su circularidad de esféricas a alargadas
 - Aumenta su radio máximo (extraído del análisis del Sholl)
- IV) Las CMs en CORs comparado con retinas axotomizadas:**
- Aumento del tamaño del soma *in vitro* mayor que *in vivo*
 - Menor números de procesos *in vitro* que *in vivo*
 - Mayor disminución *in vitro* que *in vivo* en la longitud total
 - Circularidad parecida entre *in vitro* e *in vivo*
 - Menor volumen, área y perímetro *in vivo* que *in vitro*
 - Menor radio máximo *in vitro* que *in vivo*

IV.3.10. SUMMARY**I) MCs in ROCs with respect to intact:**

- Increase in soma size
- Decrease in total length
- Decrease in the number of processes, both basal and apical
- Increase in volume
- Increase in area and perimeter
- Change in their circularity from spherical to elongated
- Decrease in maximum radius (extracted from Sholl's analysis)

II) MCs in the injured retina with respect to intact:

- Increase in soma size
- Decreases in overall length, both basal and apical
- Decreases in the number of processes, both basal and apical
- Increase in volume
- Increase in area and perimeter
- Change of their circularity from spherical to elongated
- Decrease in maximum radius (extracted from Sholl's analysis)

III) MCs in the contralateral retina with respect to intact:

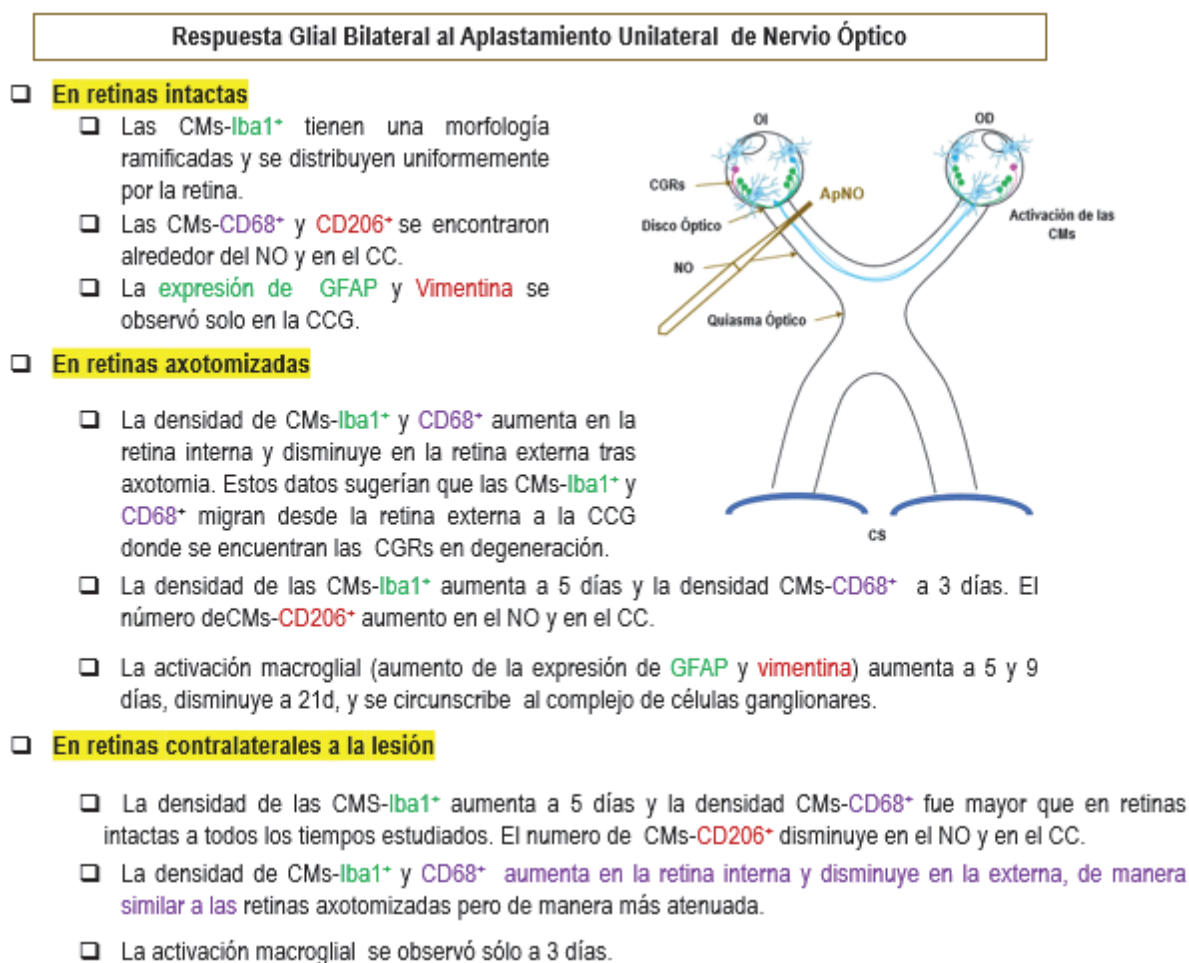
- Increase in soma size
- Decreases in overall length, both basal and apical
- Decreases in the number of processes, both basal and apical
- Increase in volume
- Increase in area and perimeter
- Changes its circularity from spherical to elongated
- Increases its maximum radius (extracted from the Sholl analysis)

IV) MCs in ROCs compared to ONC retinas:

- Larger increase in soma size *in vitro* than *in vivo*
- Smaller number of processes *in vitro* than *in vivo*
- Greater decrease *in vitro* than *in vivo* in total length
- Similar circularity between *in vitro* and *in vivo*
- Smaller volume, area and perimeter *in vivo* than *in vitro*
- Smaller maximum radius *in vitro* than *in vivo*

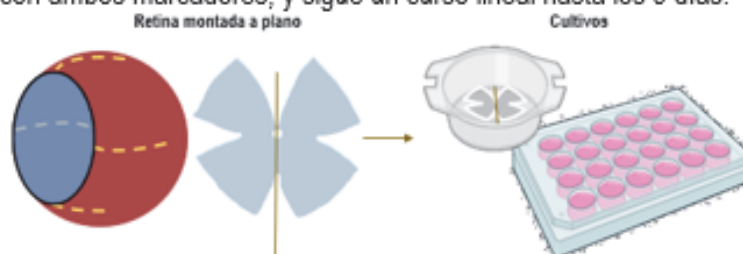
IV.4. RESUMEN GRÁFICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

A continuación, se muestra un esquema gráfico de todos los resultados obtenidos durante esta tesis para obtener una visión global de los mismos (Figura 111).



Muerte neuronal y activación glial: CORs vs. ApNO

- ❑ La muerte de CGRs tras ApNO es significativa a 3 días con ambos marcadores, mientras que en los CORs es significativa a 2 días con **Brn3a**, y a 3 con **RBPMS**. El curso de muerte de las CGRs es igual con ambos marcadores, y sigue un curso lineal hasta los 9 días.



- ❑ El curso de muerte en los CORs e *in vivo* es igual hasta los 5 días y con ambos marcadores
- ❑ A partir de los 5 días, en los CORs hay una muerte masiva de CGRs que se visualiza con **Br3na** pero no con **RBPMS** u otros marcadores estructurales.
- ❑ En los CORs las células de la micro y macroglía se activan antes y de manera morfológicamente diferente que en las retinas axotomizadas
- ❑ En los CORs la densidad de células de la microglía en la CCG es menor que *in vivo*, y la limpieza de los cuerpos de las CGRs no es tan rápida, explicando porqué aún se inmunodetectan marcadores estructurales a los 7 días *in vitro*.

Cambios morfológicos

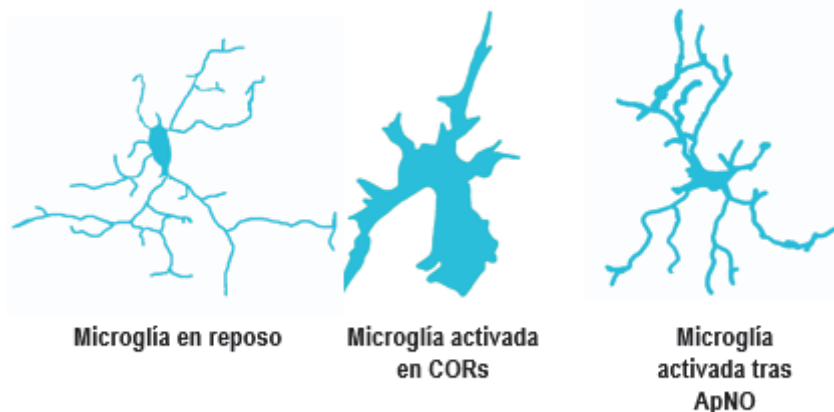
Cambios morfológicos de las CMs-Iba1⁺ en CORs, retinas lesionadas y contralaterales a la lesión comparada con CMs en reposo en retinas intactas:

- Aumentan de tamaño.
- Disminución de la longitud total y el número de procesos.
- Área ,perímetro y volumen mayor.
- Soma más largo.
- Los cambios en la retina contralateral siempre de menor magnitud que en la retina lesionada y en ésta que en los CORs.



Microglía en retinas axotomizadas y CORs

- La activación morfológica de las CMs *in vitro* e *in vivo* es muy diferente.



- In vitro*, la densidad de CMs en la CCG es significativamente menor que *in vivo* a todos los tiempos estudiados.

Figura 111: Esquema gráfico

V.DISCUSIÓN

V.1 CURSO DE ACTIVACIÓN GIAL EN RETINAS LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN TRAS UNA AXOTOMIA UNILATERAL

V.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE MUERTE DE CGR Y ACTIVACIÓN MICROGLIAL ENTRE CORs Y RETINAS AXOTOMIZADAS

V.3 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA DE LA MICROGLIA ENTRE CORs Y RETINAS AXOTOMIZADAS

V. DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral, hemos estudiado el curso de activación de las células gliales después de ApNO en ratones. Posteriormente se analizó el curso de muerte de las CGRs y el curso de activación de la glía en CORs. Por último, se realizó un estudio exhaustivo de los cambios morfológicos de la glía en ambos modelos.

V.1 CURSO DE ACTIVACIÓN GIAL EN RETINAS LESIONADAS Y CONTRALATERALES A LA LESIÓN TRAS UNA AXOTOMIA UNILATERAL

Al estudiar el curso de activación glial se observó que tras ApNO, la glía de las retinas lesionadas y contralaterales reacciona a la lesión. Esta respuesta bilateral, el llamado efecto contralateral, se está estudiando intensamente en el sistema visual, y durante la última década han aparecido más piezas a este rompecabezas (*Shenker y cols., 2003; Gallego y cols., 2012; De Hoz y cols., 2013; Galindo-Romero y cols., 2013a; Rojas y cols., 2014; Lucas-Ruiz y cols., 2019; Di Pierdomenico y cols., 2019, 2020a; Ramírez y cols., 2020*), cuyos mecanismos fisiológicos aún se desconocen (*; Ramírez y cols., 2012; Lucas-Ruiz y cols., 2019*). Aun así, en todos los informes, las características de este efecto, postulado por Shenker (*Shenker y cols., 2003*), prevalecen: primero, el daño debe alcanzar una magnitud mínima para provocar una respuesta contralateral, y segundo, la respuesta de la región contralateral es la misma que la de la dañada pero atenuada en tiempo y magnitud. Nuestros datos aquí se adhieren a esas características, ya que la activación microglial y macroglial observada en las retinas lesionadas es más fuerte, comienza antes y dura más que en las contralaterales. Quizás los resultados más controvertidos son la expresión duradera del marcador de fagocitosis CD68 en ambas retinas y la activación inesperadamente baja de las células de Müller.

RESPUESTA MACROGLIAL

Sorprendentemente, la activación macroglial, aunque observada en ambas retinas es más intensa en las retinas lesionadas. Se restringió principalmente a la CCG, lo que indica que los astrocitos y los extremos de las células de Müller son los principales responsables de la muerte de las CGRs. La hipertrofia de las células de Müller evaluada por la expresión de GFAP y la sobreexpresión de vimentina en sus pies terminales, somas y procesos distantes, fue muy baja y solo se observó en la retina lesionada.

Los pies terminales de las células de Müller forman la lámina basal interna, que es esencial para la supervivencia de CGRs. Por lo tanto, esperábamos una reacción más fuerte de las células de Müller a la muerte de CGRs. Se ha observado hipertrofia de todas las células de Müller en ambas retinas en modelos de hipertensión ocular aguda (*Crain y cols., 2013*). Este es un modelo muy diferente de la axotomía, ya que provoca la degeneración de los fotorreceptores (*Ortín-Martínez y cols., 2015; Vidal-Sanz y cols., 2017*).

La degeneración de los fotorreceptores desencadena una fuerte activación de las células de Müller, así como de las células microgliales, pero no tanto de la activación de los astrocitos (*Bringmann y cols., 2006*). La axotomía del NO es una lesión limpia que afecta específicamente a las CGRs, por lo que no es sorprendente que los astrocitos, conectados a los axones y vasos de las CGRs, se hipertrofién cuando las CGRs están muriendo. Además, la activación de las CMs en la CCG puede activar los astrocitos y la región interna de las células de Müller, ya que existe una relación entre las neuronas, la microglía y la macroglía. Por tanto, puede ser que los astrocitos sean más sensibles a la muerte de CGRs y / o degeneración axonal, es decir, afectación del complejo CGRs, mientras que toda la célula de Müller responde cuando hay pérdida de fotorreceptores y probablemente neuronas de la CNI.

RESPUESTA MICROGLIAL

Estudios previos han mostrado que las células microgliales que han fagocitado las CGRs muertas, visualizadas por marcaje transcelular (*Thanos y cols., 1991; Galindo-Romero y cols., 2013; Walker y cols., 2015*), aparecen 3 días después de ApNO en ambas retinas. En las retinas lesionadas, su número aumenta linealmente a medida que las CGRs mueren con una cinética paralela pero opuesta. En la retina ilesa, las CGR también mueren, pero su pérdida es muy lenta y no progresa más a partir de los 9 o 45 días (*Lucas-Ruiz y cols., 2019; 2021*). En consecuencia, el número de CMs marcados transcelularmente permanece bastante constante. Nuestros datos aquí concuerdan con trabajos previos (*Galindo-Romero y cols., 2013*), agregando tres conjuntos importantes de datos: aumento de la densidad microglial, un estado activado fagocítico de larga duración y la dinámica CMs M2. La densidad microglial aumenta en la retina interna y CCG, disminuyendo en la retina externa. Con el tiempo, la densidad de CMs vuelve a valores normales en la retina interna pero no en la externa. Este comportamiento dinámico ya se ha demostrado en ratas (*Nadal-Nicolas y cols., 2017*), y puede indicar que la población de CMs residentes en la CCG no es suficiente para hacer frente a la pérdida masiva de CGRs y / o que la muerte de las CGRs las atrae a la CCG. La última hipótesis es más probable para la retina contralateral.

El aumento de CMs dura más tiempo y es mayor en las retinas lesionadas (1.4 a 2.15 veces entre 3 y 9 días) que en las retinas contralaterales (1.6 veces a los 5 días). El aumento de la densidad de CMs en las retinas lesionadas se ajusta a la ventana de tiempo en la que la mayoría de las CGR mueren después de la axotomía (de 3 a 21 días (*Galindo-Romero y cols., 2013; Sanchez-Migallon y cols., 2018; Lucas-Ruiz y cols., 2019*)). En la retina contralateral, este aumento precede a la pérdida significativa de CGRs (*Lucas-Ruiz y cols., 2019*) pero no a la aparición de CMs marcados transcelularmente (*Galindo-Romero y cols., 2013*).

Curiosamente, aunque la densidad de CMs en la CCG vuelve a la línea de base con el tiempo, las CMs no están en un estado de reposo / vigilancia, sino que están activados, ya que sobreexpresan CD68. La presencia de CMs-CD68 se explica por el hecho de que en ambas retinas hay CGRs que continúan muriendo a largo plazo.

En la retina lesionada, > 90% de las CGRs mueren durante las primeras 2 a 3 semanas y las restantes mueren de manera constante pero muy lenta hasta los 3 meses [(por ejemplo, entre los días 45 y 90 después de la lesión, entre ~ 500 y 800 CGRs mueren (*Sanchez-Migallon y cols.,2018; Lucas-Ruiz y cols.,2019*)]. En las retinas contralaterales, la muerte de las CGRs es muy lenta: cuando la lesión se realiza a 0,5 mm de la cabeza óptica de la retina lesionada, las CMs marcados transcelularmente aparecen muy temprano (*Galindo-Romero y cols., 2013*), pero la pérdida de CGRs alcanza significación a los 45 días (*Lucas-Ruiz y cols.,2019*). Sin embargo, surge la pregunta, ¿se activan las células microgliales debido a la muerte constante de CGRs o las CGRs mueren debido a la activación microglial no resuelta? La activación alternativa de M2 se refiere a CMs que son fagocíticas para ayudar a limpiar el tejido y restaurar la homeostasis, de ahí su alta expresión de CD68 y que secretan mediadores antiinflamatorios para amortiguar el entorno inflamatorio agudo creado por la agresión. Expresan antígenos específicos de M2, como CD206 (*Huxlin y cols., 1992; Horie y cols., 2013*). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que describe CMs M2 en la retina. Su morfología y ubicación son bastante diferentes a las de las CMs en reposo o activados clásicamente

En las retinas contralaterales, la morfología de las CMs no cambia en el CC pero sí en la cabeza del NO a día 5. Al contrario de la dinámica observada en las retinas lesionadas, ¿Cuál es el significado de este comportamiento? ¿Ocupan la retina lesionada a través del NO y el CC? ¿Migran desde la retina contralateral a través del quiasma óptico hasta la retina lesionada? Y lo más importante, ¿cuál es su función en este modelo? En la médula espinal se ha demostrado, como mostramos aquí, que hay una respuesta rápida y mantenida de CM activados clásicamente en el sitio de la lesión que supera la respuesta M2 comparativamente más pequeña y transitoria, que promueve un crecimiento regenerativo en los axones sensoriales adultos (*Walker y cols.,2015*).

Por lo tanto, ¿un aumento más prolongado y fuerte de CMs M2 en la retina rescataría las CGRs, retrasaría su muerte y / o aumentaría la regeneración axonal? Se necesitan más experimentos para dilucidar este punto.

V.2 ANÁLISIS COMPARATIVO DE MUERTE DE CGR Y ACTIVACIÓN MICROGLIAL ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS

En esta tesis doctoral se muestra por primera vez una comparación exhaustiva entre retinas axotomizadas y CORs. Es importante reconocer que ningún modelo imita a la perfección la enfermedad que pretende representar y, por lo tanto, hay que reconocer sus deficiencias y centrarse en los aspectos que son relevantes. Ambos modelos se utilizan para evaluar la degeneración de las CGRs y para probar terapias neuroprotectoras, ya que en ambos modelos las CGRs son axotomizadas. Sin embargo, difieren en puntos importantes que explican las diferencias observadas en este trabajo. Mientras que *in vivo* la retina sufre una lesión (la axotomía del NO) *in vitro* existen otros factores como la desconexión del cuerpo, el desprendimiento de la retina y la falta de perfusión sanguínea y de soporte vítreo.

Los datos del recuento de CGRs son consistentes con los ya descritos en la literatura, tanto en CORs (Bull y cols., 2011; Johnson y cols., 2016), como en retinas después de ApNO (Galindo-Romero y cols., 2011, 2013; Vidal-Sanz y cols., 2017; Lucas-Ruiz y cols., 2021). La novedad de este estudio es que se ha realizado un estudio utilizando 4 marcadores de CGRs como son Brn3a, Rbpms, β -III Tubulin y γ -Synuclein. Tanto *in vivo* como *in vitro* vemos una disminución de estos marcadores de CGRs con el tiempo después de la axotomía del NO.

En los CORs, las CGRs se han estudiado hasta 7 días utilizando marcadores de CGRs que también marcan las células amacrinias desplazadas (Bull, 2011), o que son estructurales, como la tubulina β -III (Johnson y cols., 2016; Pattamatta y cols., 2016). Estos últimos autores utilizaron Rbpms y β III-tubulina y sus resultados sobre RBPMS entran en conflicto con los nuestros, ya que no observaron la tinción de RBPMS más allá de 1 día *in vitro*. Esta diferencia podría deberse a los protocolos de fijación e inmunodetección que difieren entre su trabajo y el nuestro.

En cuanto a la supervivencia de las CGRs *in vitro*, la principal diferencia entre ambos modelos se observa a los 7 días, cuando hay una disminución muy acusada de la expresión de Brn3a en los CORs pero no tras ApNO.

Brn3a es un marcador de viabilidad que se regula a la baja una vez que las CGRs están comprometidas con la muerte (Sánchez-Migallón y cols., 2018). Así, nuestros datos muestran que, en los CORs, entre los 5 y 7 días, se produce una oleada masiva de muerte de CGRs, que no sigue la muerte lineal observada en retinas axotomizadas con Brn3a, Rbpms o trazado (Galindo-Romero y cols., 2011, 2013; Rodríguez y cols., 2014; Vidal-Sanz y cols., 2017; Sánchez-Migallón y cols., 2018; Lucas-Ruiz y cols., 2021). Sin embargo, en los CORs a 7 días, RBPMS y los marcadores estructurales de las CGRs seguían presentes y, por tanto, se inmunodetectaban.

Los CORs es un modelo bastante agresivo y provoca una rápida y grave degeneración de la retina interna y externa, como se ha visto aquí y en otros trabajos (Johnson y Martin, 2008; Müller y cols., 2017), mientras que *in vivo*, el entorno es más estable para las neuronas (van Adel y cols., 2005; Lee y cols., 2009).

La muerte de las CGRs tras la axotomía es rápida y homogénea en toda la retina, muriendo la mitad de estas neuronas (~20.000 CGRs en ratones) en 5 días. Aquí mostramos que la misma proporción de CGRs han muerto en CORs en el mismo tiempo.

Las CMs migran desde las capas plexiformes a la CGRs para hacer frente a esta muerte masiva y limpiar el tejido (*Galindo-Romero y cols., 2013; Nadal-Nicolás y cols., 2015*) con la ayuda de un nuevo suministro de macrófagos procedentes tanto de las CMs que entran en la retina a través del NO como de la infiltración de células mieloides (*Ma y cols., 2017; Rathnasamy y cols., 2019*).

En los modelos de degeneración de fotorreceptores, que también provocan una muerte neuronal rápida y extensa, el número de CMs aumenta por división y también hay entrada de macrófagos desde la coroides (*Di Pierdomenico y cols., 2019, 2020b*). Así, *in vivo*, cuando la muerte neuronal supera la capacidad fagocítica de las CMs residentes, para cumplir con los requisitos para resolver el daño las CMs se dividen o se reponen desde el NO o mediante el reclutamiento de macrófagos sistémicos.

En los CORs, tanto las CGRs como los fotorreceptores mueren (*Müller y cols., 2017*) y las CMs residentes se movilizan hacia la retina interna y externa. Sin embargo, en los CORs no hay reclutamiento o recambio microglial (*Tassoni y cols., 2015*) explicando, por qué la densidad de CMs en la CCG de los CORs es menor que *in vivo*. La degeneración de las CGRs tras ApNO y los fotorreceptores explica por qué la densidad de CMs en la CCG disminuye en el día 1 por debajo de los valores intactos, mientras que la imposibilidad de reclutamiento externo explica por qué, aunque su densidad en la CCG aumenta con el tiempo, siempre es menor que *in vivo*. En otras palabras, en los CORs las CMs residentes no son suficientes para hacer frente a la degeneración neuronal masiva. Por lo tanto, y de acuerdo con nuestros datos, la fagocitosis de las CGRs está disminuida en los CORs, ya que no hay suficientes CMs, y éstas pueden tener una capacidad fagocítica deteriorada. Así, los somas de las CGRs muertas siguen presentes en el tejido y se inmunodetectan marcadores estructurales, pero no de viabilidad.

Por último, después ApNO, la activación de las células de Müller se restringe principalmente a sus extremos situados en la CCG (*González-Riquelme y cols., 2021*). En las distrofias de la retina, la hipertrofia de las células de Müller es más fuerte en sus somas y procesos madre (*Bringmann y cols., 2006; Luna y cols., 2016*). En los ROCs, se activan días antes que tras ApNO y muestran signos de activación en sus extremos, somas y procesos madre, imitando la hipertrofia observada en las agresiones isquémicas (*Kuhr y cols., 2008*).

V.3 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA DE LA MICROGLIA ENTRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA Y RETINAS AXOTOMIZADAS

Las CMs están cada vez más implicadas en enfermedades neurodegenerativas, neuropatología y en el envejecimiento. Su morfología diversa y cambiante suele estar relacionada con las funciones que realizan, lo que nos permite estudiar y evaluar su actividad gracias al análisis de imágenes (Choi y cols., 2022).

Las CMs tienen una respuesta morfológica inmediata y diferente a las diversas alteraciones en la fisiología cerebral (Davalos y cols., 2005). Estas van desde una mayor hiperramificación y morfologías altamente complejas hasta las morfologías desramificadas y ameboides (Karperien y cols., 2013). La microglía puede también polarizarse y adoptar forma de bastón (Taylor y cols., 2014). La ramificación celular de la microglía se define como una forma compleja que tiene múltiples procesos y, diferentes longitudes de los procesos celulares. Dado que la microglía está sintonizada con la función neuronal y glial a través de la comunicación cruzada continua entre células y la motilidad *in vivo* (Nimmerjahn y cols., 2005; Abiega y cols., 2016), las morfologías de la microglía pueden servir como indicadores de diversas funciones y disfunciones celulares en el cerebro. Es necesario un análisis cuantitativo exhaustivo para describir adecuadamente la diversidad de estos cambios morfológicos y poder distinguir las diferencias que hay entre las células ramificadas que ocurren con perturbaciones fisiológicas sutiles (como la epilepsia y la conmoción cerebral) (Abiega y cols., 2016; Morrison y cols., 2017; Wyatt-Johnson SK y cols., 2017) además de lesiones graves (como un accidente cerebrovascular) (Gyoneva and Traynelis, 2013). Por eso hay que realizar estudios morfológicos más profundos en diferentes enfermedades para poder comprender mejor el papel de las CMs (Young and Morrison., 2018).

En esta tesis doctoral se realiza un estudio exhaustivo de las CMs en dos modelos de degeneración neuronal, como son los CORs y tras ApNO. Hasta la fecha, hay pocos estudios que estudien tan a fondo las CMs, y menos en dos modelos de degeneración.

Por lo general, las CMs se encuentran en estado de reposo, una definición que se ha revisado recientemente y ahora se conoce como estado de vigilancia porque las CMs no descansan, sino que escanean activamente su entorno en busca de daños o infecciones (Holloway y cols., 2019; Rashid y cols., 2019). En este estado, tienen ramas largas y ampliamente ramificadas y pequeños cuerpos celulares (Jonas y cols., 2012). Por el contrario, durante el daño en la retina, las células acortan sus ramas, desarrollan soma y migran al sitio de la lesión para reconocer patrones de daño y actuar para retardar la neurodegeneración (Cai y cols., 2020; Ito y cols., 1998; Jonas y cols., 2012).

En salud, las CMs tienen tres funciones esenciales: (i) función centinela que implica una exploración constante del entorno con sus procesos altamente dinámicos, (ii) función de limpieza fisiológica que incluye la remodelación sináptica y la migración a los sitios de muerte neuronal para fagocitar células muertas y (iii) protección contra agentes perjudiciales (*Orihuela y cols., 2016; Hickman y cols., 2018*). A pesar de su papel en el mantenimiento de la homeostasis, la microglía está profundamente involucrada en la neuroinflamación, ya que una respuesta sostenida de la microglía puede tener efectos nocivos.

Tras la activación, la microglía se vuelve muy móvil, disminuye de tamaño, retrae sus procesos y libera una plétora de factores que incluyen citocinas inflamatorias, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno (*Kiettenmann y cols., 2011; Madeira y cols., 2015; Hickman y cols., 2018*).

Nuestros datos concuerdan con estas afirmaciones, ya que se observó un menor número de procesos y de longitud total de las CMs tanto *in vivo* como *in vitro*. Nuestros datos nos permiten observar como el soma de las CMs difiere entre ambos modelos ya que en los CORs el tamaño es mucho mayor que tras ApNO. Morfológicamente encontramos grandes diferencias entre CORs y retinas después de ApNO. En los CORs, las células parecían más grandes, más hipertrofiadas y ameboides que en las CMs *in vivo*. En retinas intactas, las CMs tienen un aspecto ramificado con soma redondeado con múltiples prolongaciones e intersecciones. Esta microglía es similar a la descrita por otros autores en retinas intactas de ratón (*Rojas et al., 2014; de Hoz et al., 2018*). Además, a partir de los 5 días de ApNO, las CMs comienzan a "radializarse" hacia el NO, migrando así al lugar de la lesión. En cambio, en los CORs las CMs no presentan este fenómeno y tienen una apariencia más estática. Estudios previos de CMs *in vitro* (*Cádiz y cols., 2022*) han encontrado que la microglía cultivada consta de subpoblaciones dispares marcadas por diferentes firmas moleculares características de la microglía en lesiones y enfermedades, y que las redes de genes de estas poblaciones están radicalmente alteradas en comparación con la microglía *ex vivo*. Esto podría explicar las diferencias morfológicas de las CMs entre CORs y ApNO.

En nuestro estudio, las CMs en retinas intactas tienen un mayor número de procesos y a su vez estos presentan una longitud mayor mostrando una morfología ramificada como han descrito estudios previos (*Karperien y cols., 2013*). En cambio, tras ApNO observamos como en las retinas lesionadas disminuyen los números de procesos, así como su longitud total. En las retinas contralaterales a la lesión vemos el mismo efecto, pero de una manera más lenta, por lo que podemos confirmar lo que otros autores ya observaron, el llamado efecto contralateral (*Lucas-Ruiz y cols., 2019*). Estos cambios en la morfología de las CMs han de ser estudiados exhaustivamente, porque quizás al estudiar las CMs, estas nos avancen con anterioridad una enfermedad, como la epilepsia, la degeneración macular asociada a la edad (**DMAE**), la hipertensión ocular... (*Young and Morrison., 2018*).

La edad suele ser uno de los principales factores de riesgo en enfermedades neurodegenerativas, como pueden ser la enfermedad de Alzheimer, Parkinson o DMAE. En estas enfermedades se ha descubierto una microglía activada (*Ma y cols., 2012; Patel y cols., 2021; Candlish y cols., 2021*).

Tras ApNO las CMs tienen un volumen, área y perímetro menor tanto en la retina lesionada como en la retina contralateral al compararlo con las CMs *in vitro*. Estos datos nos sugieren que las CMs actúan de forma diferente *in vivo* e *in vitro*. Aunque ambos modelos son modelos de axotomía, las condiciones son diferentes, por eso es importante analizar las CMs en diferentes enfermedades.

Una posible explicación de la no radialización y de su morfología tan diferente que hemos encontrado en las CMs de los CORs es que, en ausencia del NO, las CMs no reconocen el daño al NO y, por lo tanto, se enfocan en actuar en otra parte de la retina. Pero también puede ser, como hemos dicho, que cuando se elimina el entorno *in vivo*, la microglía sufre un caso grave de "choque cultural", modulando drásticamente su estado de red reguladora transcripcional de homeostático ha activado a través de la regulación positiva de módulos de genes específicos de cultivo. Por lo cual, la microglía cultivada se comporta como un tipo de célula dispar que no recapitula las firmas homeostáticas de la microglía *in vivo* (Cadiz y cols., 2022).

Los CORs son modelos inherentes a la axotomía del NO (Li y cols., 2018), y sus principales ventajas con respecto al modelo *in vivo* son: i/ reduce el sufrimiento de los animales al evitar los procedimientos postoperatorios; ii/ número reducido de animales utilizados, ya que ambas retinas pueden utilizarse como grupos experimentales, e incluso varias porciones de retina pueden utilizarse con diferentes condiciones experimentales; iii/ mejor intacto de la concentración de drogas utilizadas, aumentando así la confiabilidad de los datos.

De esta forma, los cultivos organotípicos implementan los principios de las 3R. Cabe señalar que los modelos *in vitro* deben tener en cuenta variables que no están presentes en los modelos *in vivo*, por lo que se debe tener cuidado con las extrapolaciones para la prueba de fármacos ya que podrían tener un efecto contraproducente en otras células que no se han tenido en cuenta en los modelos *in vitro*. O el comportamiento de algunos tipos celulares es diferente *in vitro* comparado con *in vivo*, como hemos demostrado en este trabajo con CMs.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Los resultados del curso de activación glial en retinas lesionadas y contralaterales a la lesión tras una axotomía unilateral nos permiten concluir:

- I. El ApNO unilateral desencadena una activación bilateral y persistente de las CMs y una respuesta opuesta de las CMs M2 entre ambas retinas.
- II. Tras ApNO, se observó una hipertrofia macroglial transitoria y limitada a la CCG tanto en ambas retinas.

Los resultados del análisis comparativo del curso de muerte de CGR y activación microglial entre CORs y retinas axotomizadas nos permiten concluir:

- I. La muerte de las CGRs en CORs e *in vivo* es similar hasta 5 días, lo que significa que durante esta ventana terapéutica los CORs pueden ser útiles para estudiar nuevos fármacos protectores de las CGRs.
- II. En los CORs, la activación morfológica de las CMs es diferente tras ApNO y su número en la CCG es menor que *in vivo*, retrasando la fagocitosis de las CGRs muertas.
- III. En los CORs la activación macroglial es más extensa que tras ApNO.
- IV. La diferente activación glial entre CORs y ApNO puede alterar la eficacia de las terapias probadas *in vitro* al ensayarlas *in vivo*.

Los resultados del análisis comparativo de la morfología de la microglía entre CORs y retinas axotomizadas nos permiten concluir:

- I. En todos los parámetros estudiados la morfología de las CMs en los grupos experimentales difiere de la CMs en reposo.
- II. Los cambios mayores se observan en CORs, seguido de las retinas lesionadas y finalmente de las retinas contralaterales a la lesión, indicando que los CORs son un modelo más agresivo que el ApNO.

VI. CONCLUSIONS

The results of the course of glial activation in lesioned retinas contralateral to the lesion after unilateral axotomy allow us to conclude:

- I. Unilateral ONC triggers a bilateral and persistent activation of MCs and an opposing response of M2 MCs between both retinas.
- II. After ONC, a transient macroglial hypertrophy limited to the GCL was observed in both retinas.

The results of the comparative analysis of the course of RGC death and microglial activation between ROCs and axotomized retinas allow us to conclude:

- I. The course of RGC death in ROCs and *in vivo* is similar up to 5 days, which means that during this therapeutic window ROCs may be useful for studying new RGC-protective drugs.
- II. In ROCs, the morphological activation of MCs is different than after ONC and their number in the GCL is lower than *in vivo*, delaying the phagocytosis of dead RGCs.
- III. Macroglial activation in ROCs is more extense and marked than after ONC.
- IV. The different glial activation between ROCs and ONC may alter the efficacy of therapies tested *in vitro* when tested *in vivo*.

The results of the comparative analysis of microglia morphology between ROCs and axotomized retinas allow us to conclude:

- I. In all the parameters studied, the morphology of the MCs in the experimental groups differs from that of the resting MCs.
- II. The greatest changes are observed in ROCs, followed by axotomized retinas and finally by contralateral retinas, indicating that ROCs are a more aggressive model than ONC.

VII.BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

Abiega O, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Nadjar A, Layé S, Leyrolle Q, Gómez-Nicola D, Domercq M, Pérez-Samartín A, Sánchez-Zafra V, Paris I, Valero J, Savage JC, Hui CW, Tremblay MÈ, Deudero JJ, Brewster AL, Anderson AE, Zaldumbide L, Galbarriatu L, Marinas A, Vivanco Md, Matute C, Maletic-Savatic M, Encinas JM, Sierra A (2016). Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. *PLoS Biol.* 2016 May 26;14(5): e1002466. doi: 10.1371/journal.pbio.1002466. Erratum in: *PLoS Biol.* 2016 Jun;14(6): e1002508. Erratum in: *PLoS Biol.* 2016 Sep;14(9): e1002554. PMID: 27228556; PMCID: PMC4881984.

Achúcarro, N. (1911). Nuevo método para el estudio de la neuroglía y del tejido conjuntivo. *Boletín Soc. Española Biol.* 1, 139–141. **Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Filho, W. J., Lent, R., & Herculano-Houzel, S. (2009).** Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513(5), 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>.

Aguayo AJ, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez, MP, Bray GM (1987). Growth and connectivity of axotomized retinal neurons in adult rats with optic nerves substituted by PNS grafts linking the eye and the midbrain. *Ann NY Acad. Sci.* 495, 1e9.

Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, de Imperial JM, Vidal-Sanz M (2013). Anatomical and functional damage in experimental glaucoma. *Curr Opin Pharmacol.* 13:5-11.

Alarcón-Martínez L, de la Villa P, Avilés-Trigueros M, Blanco R, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. (2009). Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats. *Mol Vis.* 15:2373-83.

Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, Valiente-Soriano J, Agudo-Barriuso M, Villa P de L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. (2010). ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection. *Vision Res.* 50:2176-2187.

Akhmetzyanova E, Kletenkov K, Mukhamedshina Y, & Rizvanov A. (2019). Different Approaches to Modulation of Microglia Phenotypes After Spinal Cord Injury. *Frontiers in systems neuroscience*, 13, 37. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00037>.

B

Baden T, Berens P, Franke K, Román Rosón M, Bethge M, & Euler T (2016). The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature*, 529(7586), 345–350. <https://doi.org/10.1038/nature16468>.

Bae JA, Mu S, Kim JS, Turner NL, Tartavull I, Kemnitz N, Jordan CS, Norton AD, Silversmith WM, Prentki R, Sorek M, David C, Jones DL, Bland D, Sterling A, Park J, Briggman KL, Seung HS, & Eyewirers (2018). Digital Museum of Retinal Ganglion Cells with Dense Anatomy and Physiology. *Cell*, 173(5), 1293–1306.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.040>

Barnstable CJ, Dräger UC (1984). Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 11: 847-55.

- Barron KD, Dentinger G, Krohel G, Easton SK, Mankes R (1986).** Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer in rat after intraorbital optic nerve crush. *J Neurocytol.* 15:345–362.
- Bernstein SL, Koo JH, Slater BJ, Guo Y, Margolis FL (2006).** Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol. Vis.* 12: 147-55.
- Berson DM (2003).** Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.* 26:314-320.
- Bowmaker JK, Hunt DM (2006).** Evolution of vertebrate visual pigments. *Curr Biol.*16:484-489.
- Bray GM, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ (1987).** Regeneration of axons from the central nervous system of adult rats. *Prog Brain Res.* 71:373-379.
- Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Iandiev I, Reichenbach A, Wiedemann P (2005).** 'Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina', *Acta Ophthalmol Scand*, 83: 528-38.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A (2006).** Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* Jul;25(4):397-424. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003. Epub 2006 Jul 12. PMID: 16839797.
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. (2009).** Progress in retinal and eye research. *Prog Retin Eye Res.*; 28:423–451.
- Bringmann A, Grosche A, Pannicke T, Reichenbach A. (2013).** 'GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4: 48.
- Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, Vetter ML, Marsh-Armstrong N, Horner PJ (2008).** Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J. Neurosci.* 28: 2735–2744.
- Bull, N. D., Johnson, T. v, Welsapar, G., Dekorver, N. W., Tomarev, S. I., & Martin, K. R (2011).** *Use of an Adult Rat Retinal Explant Model for Screening of Potential Retinal Ganglion Cell Neuroprotective Therapies.* <https://doi.org/10.1167/iov.10-6873>.

C

- Cadiz, M. P., Jensen, T. D., Sens, J. P., Zhu, K., Song, W. M., Zhang, B., Ebbert, M., Chang, R., & Fryer, J. D. (2022).** Culture shock: microglial heterogeneity, activation, and disrupted single-cell microglial networks in vitro. *Molecular neurodegeneration*, 17(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00531-1>.
- Cai XF, Lin S, Geng Z, Luo LL, Liu YJ, Zhang Z, Liu WY, Chen X, Li X, Yan J, & Ye, J. (2020).** Integrin CD11b Deficiency Aggravates Retinal Microglial Activation and RGCs Degeneration After Acute Optic Nerve Injury. *Neurochemical research*, 45(5), 1072–1085. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02984-6>.
- Candlish, M., & Hefendehl, J. K (2021).** Microglia Phenotypes Converge in Aging and Neurodegenerative Disease. *Frontiers in neurology*, 12, 660720. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.660720>.

Cao W, Wen R, Li F, Lavail MM, Steinberg RH (1997). 'Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina', *Exp Eye Res*, 65: 241-8.

Cen LP, Han M, Zhou L, Tan L, Liang JJ, Pang CP, Zhang M (2015). Bilateral retinal microglial response to unilateral optic nerve transection in rats. *Neuroscience*. 2015 Dec 17; 311:56-66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.067. Epub 2015 Oct 1. PMID: 26432953.

Chen L, Yang P, Kijlstram, (2002). A. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 10, 27–39.

Chen CK., Kiyama T, Weber N, Whitaker CM, Pan P, Badea TC, Massey SC, & Mao C.A (2021). Characterization of Tbr2-expressing retinal ganglion cells. *The Journal of comparative neurology*, 529(15), 3513–3532. <https://doi.org/10.1002/cne.25208>.

Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré MV, Celador IL, Josserand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Sävman, K, Mallard C, Gressens P, & Fleiss B. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain, behavior, and immunity*, 32, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.005>.

Choi, S., Hill, D., Guo, L., Nicholas, R., Papadopoulos, D., & Cordeiro, M. F (2022). Automated characterisation of microglia in ageing mice using image processing and supervised machine learning algorithms. *Scientific reports*, 12(1), 1806. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05815-6>.

Crain, JM, Nikodemova M, & Watters JJ. (2013). Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *Journal of neuroscience research*, 91(9), 1143–1151. <https://doi.org/10.1002/jnr.23242>.

Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C (2011). 'Blood-retinal barrier', *Eur J Ophthalmol*, 21 Suppl 6: S3-9.

D

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. Jun;8(6):752-8. doi: 10.1038/nn1472. Epub 2005 May 15. PMID: 15895084.

De Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Gallego BI, Salazar JJ, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros, M, VillegasPérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM (2013). Rod-like microglia are restricted to eyes with laser-induced ocular hypertension but absent from the microglial changes in the contralateral untreated eye. *PLoS One.*; 8(12): e83733.

De Hoz R, Ramírez AI, González-Martín R, Ajoy D, Rojas B, Salobarra-García E, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM, Salazar JJ (2018). Bilateral early activation of retinal microglial cells in a mouse model of unilateral laser-induced experimental ocular hypertension. *Exp Eye Res*. Jun;171:12-29. doi: 10.1016/j.exer.2018.03.006. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29526796.

Del Monte DW, Kim T (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg*. Mar;37(3):588-98. doi: 10.1016/j.jcrs.2010.12.037. PMID: 21333881.

Del Rio P, Irmiler M, Arango-Gonzalez B, Favor J, Bobe C, Bartsch U, Vecino E, Beckers J, Hauck SM, Ueffing M. (2011). 'GDNF-induced osteopontin from Müller glial cells promotes photoreceptor survival in the Pde6brd1 mouse model of retinal degeneration', *Glia*, 59: 821-32.

Di Pierdomenico, J., García-Ayuso, D., Jiménez-López, M., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M., & Villegas-Pérez, M. P. (2016). Different ipsi- and contralateral glial responses to anti- VEGF and triamcinolone intravitreal injections in rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(8), 3533–3544. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19618>.

Di Pierdomenico, J., García-Ayuso, D., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M., & Villegas-Pérez, M. P. (2019). Role of microglial cells in photoreceptor degeneration. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 14, Issue 7, pp. 1186–1190). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.251204>.

Di Pierdomenico, J., García-Ayuso, D., Rodríguez González-Herrero, M. E., García-Bernal, D., Blanquer, M., Bernal-Garro, J. M., García-Hernández, A. M., Vidal-Sanz, M., & Villegas-Pérez, M. P. (2020a). Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Transplants Decrease Retinal Gliosis in Two Animal Models of Inherited Photoreceptor Degeneration. *International journal of molecular sciences*, 21(19), 7252. <https://doi.org/10.3390/ijms21197252>

Di Pierdomenico, J., Martínez-Vacas, A., Hernández-Muñoz, D., Gómez-Ramírez, A. M., Valiente-Soriano, F. J., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., & García-Ayuso, D. (2020b). Coordinated intervention of microglial and Müller cells in light-induced retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 61(3). <https://doi.org/10.1167/iovs.61.3.47>

Dodd J, Solter D, Jessell (1984). TM. Monoclonal antibodies against carbohydrate differentiation antigens identify subsets of primary sensory neurones. *Nature*. Oct 4-10;311(5985):469-72. doi: 10.1038/311469a0. PMID: 6207435.

Dowling JE., & Ripps H. (1976). Potassium and retinal sensitivity. *Brain Research*, 107(3), 617– 622. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90149-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90149-9).

Dowling JE (1987). *The retina: an approachable part of the brain*. Cambridge, MA: Belknap.

Dräger UC, Olsen JF (1981). Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 20, 285–293.

Dubbelaar M. L, Kracht L, Eggen B. J. L., & Boddeke, E. W. G. M. (2018). The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. In *Frontiers in immunology* (Vol. 9, p. 1753). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01753>.

E

El Zaoui I, Behar-Cohen F and Torriglia A (2015). Glucocorticoids exert direct toxicity on microvasculature: analysis of cell death mechanisms. *Toxicol. Sci.* 143: 441-453.

Escartin C., Galea E., Lakatos A., O'Callaghan J.P., Petzold GC., Serrano-Pozo A., Verkhratsky A (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat. Neurosci.* 24, 312–325.

F

Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck, J (2007). 'Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 8287-92.

G

Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011). Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res.* 92(5):377-87.

Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2013a). Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1;54(2):974-85.

Galindo-Romero C, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M (2013b). Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp Eye Res.* 108:84-93.

Gallego, B. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A. I., Salinas-Navarro, M., Ortín-Martínez, A., Valiente-Soriano, F. J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (2012). IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *Journal of neuroinflammation*, 9, 92. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-92>.

Gao HM & Hong JS (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in immunology*, 29(8), 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.05.002>.

García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2010). Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res.* 91(6):800-10.

García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo-Barriuso M, Alarcón-Martínez L, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2011). Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis.* 17:1716-33.

Gyoneva S, Traynelis SF (2013). Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J Biol Chem.* May 24;288(21):15291-302. doi: 10.1074/jbc.M113.458901. Epub 2013 Apr 2. PMID: 23548902; PMCID: PMC3663549.

González-Riquelme MJ, Galindo-Romero C, Lucas-Ruiz F, Martínez-Carmona M, Rodríguez-Ramírez KT, Cabrera-Maqueda JM, Norte-Muñoz M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2021). Axonal Injuries Cast Long Shadows: Long Term Glial Activation in Injured and Contralateral Retinas after Unilateral Axotomy. *Int J Mol Sci.* Aug 7;22(16):8517. doi: 10.3390/ijms22168517. PMID: 34445225; PMCID: PMC8395228.

Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci.* 4(12):1165.

H

- Hanisch UK, Kettenmann H (2007).** Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*; 10:1387–1394.
- Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B, Fahrenkrug J (2002).** The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci*. 1;22(1):RC191.
- Harada T, Harada C, Nakayama N, Okuyama S, Yoshida K, Kohsaka S, Matsuda H, Wada, K (2000).** 'Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration', *Neuron*, 26: 533-41.
- Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, Berson DM (2006).** Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol*. 20;497(3):326-49.
- Herculano-Houzel, S. (2014).** The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. In *GLIA* (Vol. 62, Issue 9, pp. 1377–1391). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>.
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J (2018).** Microglia in neurodegeneration. *Nature neuroscience*, 21(10), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>.
- Hilla AM, Diekmann H, & Fischer D (2017).** Microglia Are Irrelevant for Neuronal Degeneration and Axon Regeneration after Acute Injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(25), 6113–6124. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0584-17.2017>.
- Holloway, O. G., Canty, A. J., King, A. E., & Ziebell, J. M. (2019).** Rod microglia and their role in neurological diseases. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 94, pp. 96– 103). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.02.005>.
- Hofbauer A, Dräger UC (1985).** Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J. Comp. Neurol*. 234: 465-74.
- Horie S, Robbie SJ, Liu J, Wu WK, Ali RR, Bainbridge JW, Nicholson LB, Mochizuki, M, Dick AD, & Copland, D. A. (2013).** CD200R signaling inhibits pro-angiogenic gene expression by macrophages and suppresses choroidal neovascularization. *Scientific reports*, 3, 3072. <https://doi.org/10.1038/srep03072>.
- Hubel DH (1999).** *Ojo, Cerebro y Visión*. Universidad de Murcia. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Murcia (España). ISBN: 84-8371-143-5.
- Humphrey MF, Moore SR (1996).** Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. *Glia*, Apr;16(4):325-41. doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199604)16:4<325::AID-GLIA5>3.0.CO;2-Z. PMID: 8721673.
- Huxlin KR, Sefton AJ, Furby JH (1992).** The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. *J Neurocytol*. Jul;21(7):530-44. doi: 10.1007/BF01186955. PMID: 1500949.

I

Ito D., Imai Y., Ohsawa K., Nakajima K., Fukuuchi Y., Kohsaka S (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998, 57, 1–9.

J

Jeon CJ, Strettoi E, & Masland RH (1998). The major cell populations of the mouse retina. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(21), 8936–8946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08936.1998>.

Johnson, T. v., & Martin, K. R (2008). Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(8), 3503–3512. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1601>.

Johnson TV, Oglesby EN, Steinhart MR, Cone-Kimball E, Jefferys J, Quigley HA (2016). Time-Lapse Retinal Ganglion Cell Dendritic Field Degeneration Imaged in Organotypic Retinal Explant Culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jan 1;57(1):253-64. doi: 10.1167/iovs.15-17769. PMID: 26811145; PMCID: PMC4736988.

Jonas R. A, Yuan T. F, Liang Y. X, Jonas J. B, Tay D. K. C, & Ellis-Behnke, R. G. (2012). The spider effect: Morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030763>.

K

Karperien A, Ahammer H, Jelinek HF (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci.* 2013 Jan 30; 7:3. doi: 10.3389/fncel.2013.00003. PMID: 23386810; PMCID: PMC3558688.

Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.

Kung F, Wang W, Tran T and Townes-Anderson E (2017). Sema3A reduces sprouting of adult rod photoreceptors in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58:4318-4331.

Kuhr H, Wurm A, Karl A, Iandiev I, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A, & Pannicke T (2008). Müller cell gliosis in retinal organ culture mimics gliotic alterations after ischemia in vivo. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 26(7), 745–751. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.07.003>

Kwong JM, Caprioli J, Piri N (2010). RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Feb;51(2):1052-8. doi: 10.1167/iovs.09-4098. Epub 2009 Sep 8. PMID: 19737887; PMCID: PMC3979483.

Kwong JM, Quan A, Kyung H, Piri N, Caprioli J (2011). Quantitative analysis of retinal ganglion cell survival with Rbpms immunolabeling in animal models of optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 28;52(13):9694-702.

Kwong JM, Vo N, Quan A, Nam M, Kyung H, Yu F, Piri N, Caprioli J (2013). The dark phase intraocular pressure elevation and retinal ganglion cell degeneration in a rat model of experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 112:21-8.

L

- Lafuente M., Villegas-Pérez MP, Sobrado-Calvo P, García-Avilés A, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M (2001).** Neuroprotective effects of $\alpha 2$ -selective adrenergic agonists against ischemia-induced retinal ganglion cell death. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(9), 2074–2084. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11481275/>.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Selles-Navarro I, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M (2002a).** Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience* 109:157-68.
- Lafuente López-Herrera MP, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2002b).** Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol*. 178:243-258.
- Lammert, E., Zeeb M (2014).** *Metabolism of Human Diseases, Organ Physiology and athophysioogy.*
- Lana D, Ugolini F, Nosi D, Wenk G.L, Giovannini M.G. (2021).** The Emerging Role of the Interplay Among Astrocytes, Microglia, and Neurons in the Hippocampus in Health and Disease. *Front. Aging Neurosci.* 13, 651973.
- Langmann T (2007).** Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol.*; 81:1345–1351.
- Laprell L, Schulze C, Brehme M. L, & Oertner, T. G. (2021).** The role of microglia membrane potential in chemotaxis. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02048-0>.
- Lee JE, Liang KJ, Fariss RN, Wong WT (2008).** Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Sep;49(9):4169-76. doi: 10.1167/iops.08-2076. Epub 2008 May 16. PMID: 18487378; PMCID: PMC2652634.
- Lee, T. I., Yang, C. S., Fang, K. M., & Tzeng, S. F (2009).** Role of ciliary neurotrophic factor in microglial phagocytosis. *Neurochemical Research*, 34(1), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9682-0>.
- Leung CK, Lindsey JD, Crowston JG, Ju WK, Liu Q, Bartsch DU, Weinreb RN (2008).** In vivo imaging of murine retinal ganglion cells. *J Neurosci Methods*. 168: 475-8.
- Li, Y., Zhang, Y., Qi, S., & Su, G (2018).** Retinal organotypic culture – A candidate for research on retinas. In *Tissue and Cell* (Vol. 51, pp. 1–7). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.01.005>
- Luna, G., Keeley, P. W., Reese, B. E., Linberg, K. A., Lewis, G. P., & Fisher, S. K (2016).** Astrocyte structural reactivity and plasticity in models of retinal detachment. *Experimental Eye Research*, 150, 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.03.027>
- Li J, Yu S, Lu X, Cui K, Tang X, Xu Y, & Liang X. (2021).** The phase changes of M1/M2 phenotype of microglia/macrophage following oxygen-induced retinopathy in mice. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 70(2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01427-w>.
- Linden R, Perry VH (1983).** Massive retinotectal projection in rats. *Brain Research* 272: 145–149.

Longair MH, Baker DA, Armstrong J Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics*. Sep 1;27(17):2453-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btr390. Epub 2011 Jul 4. PMID: 21727141.

Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Rodríguez-Ramírez KT, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2019). Neuronal Death in the Contralateral Un-Injured Retina after Unilateral Axotomy: Role of Microglial Cells. *Int J Mol Sci*. Nov 15;20(22):5733. doi: 10.3390/ijms20225733. PMID: 31731684; PMCID: PMC6888632.

Lucas-Ruiz F, Galindo-Romero C, Albaladejo-García V, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2021). Mechanisms implicated in the contralateral effect in the central nervous system after unilateral injury: focus on the visual system. *Neural Regen Res*. Nov;16(11):2125-2131. doi: 10.4103/1673-5374.310670. PMID: 33818483; PMCID: PMC8354113.

Lund RD (1965). Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science* 149: 1506–1507.

M

Ma, W., Zhao, L., & Wong, W. T (2012). Microglia in the outer retina and their relevance to pathogenesis of age-related macular degeneration. *Advances in experimental medicine and biology*, 723, 37–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0631-0_6.

Ma, W., Zhang, Y., Gao, C., Fariss, R. N., Tam, J., & Wong, W. T. (2017). Monocyte infiltration and proliferation reestablish myeloid cell homeostasis in the mouse retina following retinal pigment epithelial cell injury. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08702-7>

Madeira M.H, Boia R, Santos P.F, Ambrosio A.F, Santiago A.R. (2015). Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators Inflamm*. 2015, 673090.

Maeda S, Osaga S, Maeda T, Takeda N, Tamechika SY, Naniwa T, & Niimi A (2019). Circulating Th17.1 cells as candidate for the prediction of therapeutic response to abatacept in patients with rheumatoid arthritis: An exploratory research. *PLoS one*, 14(11), e0215192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215192>.

Malyshev, I., & Malyshev, Y. (2015). Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *BioMed research international*, 2015, 341308. <https://doi.org/10.1155/2015/341308>.

Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (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*. 91:1632–1636.

Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jiménez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A, Gordon S (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*. Feb 28;121(9): e57-69. doi: 10.1182/blood-2012-06-436212. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23293084.

Miguel NC., Matsuda M., Portes AL., Allodi S., Mendez-Oter, R., Puntar T., Sholl-Franco, A., Krempel PG., & Monteiro, ML. (2012). In vitro effects of bevacizumab treatment on newborn rat retinal cell proliferation, death, and differentiation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(12), 7904–7911. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10283>.

Miller, D. A., Grannonico, M., Liu, M., Kuranov, R. V., Netland, P. A., Liu, X., & Zhang, H. F (2020). Visible-Light Optical Coherence Tomography Fibergraphy for Quantitative Imaging of Retinal Ganglion Cell Axon Bundles. *Translational vision science & technology*, 9(11), 11. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.11.11>.

Minett T, Classey J, Matthews FE, Fahrenhold M, Taga M, Brayne C, Ince PG, Nicoll JA, Boche D; MRC CFAS (2016). Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation*. Jun 2;13(1):135. doi: 10.1186/s12974-016-0601-z. PMID: 27256292; PMCID: PMC4890505.

Morrison H, Young K, Qureshi M, Rowe RK, Lifshitz J (2017). Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Sci Rep*. Oct 16;7(1):13211. doi: 10.1038/s41598-017-13581-z. PMID: 29038483; PMCID: PMC5643511.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 116. 201-211.

Müller, B., Wagner, F., Lorenz, B., & Stieger, K (2017). Organotypic cultures of adult mouse retina: Morphologic changes and gene expression. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(4), 1930–1940. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20718>.

N

Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009). Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50:3860-3868.

Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Albuquerque-Béjar JJ, Vidal-Sanz M, Agudo- Barriuso M (2012). Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One*. 7(11): e49830.

Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Nieto-López L, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2013). Displaced Retinal Ganglion Cells in the Adult Albino and Pigmented Rats. *Ophthalmic Res*. 50:27–53. 50, pp. 40.

Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2014). Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front Neuroanat*. Oct 6; 8:99. doi: 10.3389/fnana.2014.00099. PMID: 25339868; PMCID: PMC4186482.

Nadal-Nicolás FM, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2015a). Retino-retinal projection in juvenile and young adult rats and mice. *Exp Eye Res*. May; 134:47-52.

Nadal-Nicolás FM, Sobrado-Calvo P, Jiménez-López M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2015b). Long-Term Effect of Optic Nerve Axotomy on the Retinal Ganglion Cell Layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 56(10):6095-6112.

Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2015 C). Two methods to trace retinal ganglion cells with fluorogold: from the intact optic nerve or by stereotactic injection into the optic tract. *Exp Eye Res.* Feb;131:12-9. doi: 10.1016/j.exer.2014.12.005. Epub 2014 Dec 4. PMID: 25482219.

Nadal-Nicolás, F. M., Rodríguez-Villagra, E., Bravo-Osuna, I., Sobrado-Calvo, P., Molina-Martínez, I., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., & Herrero-Vanrell, R. (2016). Ketorolac Administration Attenuates Retinal Ganglion Cell Death After Axonal Injury. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(3), 1183–1192. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18213>.

Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2017). Microglial dynamics after axotomy-induced retinal ganglion cell death. *J Neuroinflammation.*;14(1):218.

Nave K. A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, 468(7321), 244–252. <https://doi.org/10.1038/nature09614>.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo (2005). *Science*. May 27;308(5726):1314-8. doi: 10.1126/science.1110647. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831717.

Niyadurupola N, Sidaway P, Osborne A, Broadway DC and Sanderson J (2011). The development of human organotypic retinal cultures (HORCs) to study retinal neurodegeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 95:720–726.

Norte-Muñoz M, Lucas-Ruiz F, Gallego-Ortega A, García-Bernal D, Valiente-Soriano FJ, de la Villa P, Vidal-Sanz M, & Agudo-Barriuso M (2021). Neuroprotection and Axonal Regeneration Induced by Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Depend on the Type of Transplant. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 772223. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.772223>.

Norte-Muñoz M, Gallego-Ortega A, Lucas-Ruiz F, González-Riquelme MJ, Changa-Espinoza YI, Galindo-Romero C, Ponsaerts P, Vidal-Sanz M, García-Bernal D, & Agudo-Barriuso M (2022). Immune recognition of syngeneic, allogeneic and xenogeneic stromal cell transplants in healthy retinas. *Stem cell research & therapy*, 13(1), 430. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03129-y>.

O

Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem.* Feb;88(4):844-56. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x. PMID: 14756805.

Ogilvie JM, Speck JD, Lett J.M and Fleming TT (1999). A reliable method for organculture of neonatal mouse retina with long-term survival. *J. Neurosci. Methods*; 87:57–65

Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British journal of pharmacology*, 173(4), 649–665. <https://doi.org/10.1111/bph.13139>.

Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2010). Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:3171-3183.

Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Albuquerque-Béjar JJ, Nieto-López L, GarcíaAyuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2014). Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain. *PLoS One.* ;9(7): e102392.

Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2015). Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors. *Exp Eye Res.* Mar; 132:17-33. doi: 10.1016/j.exer.2015.01.006. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25576772.

P

Panagis L, Thanos S, Fischer D, Dermon CR (2005). Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation. *Eur J Neurosci.*;21(8):2305-9.

Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009a). Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp. Eye Res.* 89: 32–41.

Parrilla-Reverter G, Agudo M, Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López, M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009b). Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vision Res.* 49: 2808-25.

Pattamatta, U., McPherson, Z., & White, A (2016). A mouse retinal explant model for use in studying neuroprotection in glaucoma. *Experimental Eye Research*, 151, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.07.010>.

Patel, P., & Sheth, V (2021). New and Innovative Treatments for Neovascular Age-Related Macular Degeneration (nAMD). *Journal of clinical medicine*, 10(11), 2436. <https://doi.org/10.3390/jcm10112436>.

Paxinos G, Franklin KB (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Formato digital.

Pease ME, Zack DJ, Berlinicke C, Bloom K, Cone F, Wang Y, Klein RL, Hauswirth WW, Quigley HA (2009). Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 50:2194–2200.

Perry VH (1979). The ganglion cell layer of the retina of the rat: A Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 23;204(1156):363-75.

Perry VH (1981). Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neurosci.* 6: 931-934.

Perry VH, Morris RJ, Raisman G (1984). Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve? *J. Neurocytol.* 13: 809-24.

Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985). Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*; 15:313–326.

Pinzón-Duarte G, Kohler K, Arango-Gonzalez B and Guenther E (2000). Cell differentiation, synaptogenesis, and influence of the retinal pigment epithelium in a rat neonatal organotypic retina culture. *Vision Res.*40:3455–3465.

Provencio I, Rodríguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MDn (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci.* Jan 15;20(2):600-5.

R

Raibon E, Sauvé Y, Carter DA, Gaillard F (2002). Microglial changes accompanying the promotion of retinal ganglion cell axonal regeneration into peripheral nerve grafts. *J Neurocytol.* Jan;31(1):57-71. doi: 10.1023/a:1022527800181. PMID: 12652088.

Ramirez, JM, Triviño A, Ramirez AI, Salazar JJ, Garcia-Sanchez, J (1994). Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Research*, 34(15), 1935– 1946. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(94\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0042-6989(94)90024-8).

Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM (2010). Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Nov;51(11):5690-6. doi: 10.1167/iovs.10-5248. Epub 2010 Jun 10. PMID: 20538983.

Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salobar-García E, Valiente-Soriano FJ, Triviño A, & Ramirez JM (2015). Macro- and microglial responses in the fellow eyes contralateral to glaucomatous eyes. *Progress in brain research*, 220, 155–172. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.05.003>.

Ramírez, A. I., de Hoz, R., Fernández-Albarral, J. A., Salobar-García, E., Rojas, B., Valiente-Soriano, F. J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., Ramírez, J. M., & Salazar, J. J. (2020). Time course of bilateral microglial activation in a mouse model of laser-induced glaucoma. *Scientific reports*, 10(1), 4890. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61848-9>.

Ramón y Cajal S (1892). The Structure of the retina. Charles C. Thomas, Springfield Illinois.

Ramón y Cajal, S. (1913). Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid XI*, 215–315.

Ransohoff, R.M (2016). A polarizing question: ¿Do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci*, 19, 987–991.

Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T (2019). Microglia in Retinal Degeneration. *Front Immunol.* Aug 20;10:1975. doi: 10.3389/fimmu.2019.01975. PMID: 31481963; PMCID: PMC6710350.

Rathnasamy, G., Foulds, W. S., Ling, E. A., & Kaur, C (2019). Retinal microglia – A key player in healthy and diseased retina. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 173). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.05.006>

Reichenbach A, Bringmann A. (2020). Glia of the human retina. *Glia*, 68(4), 768–796. <https://doi.org/10.1002/glia.23727>.

Rheume BA, Jereen A, Bolisetty M, Sajid MS, Yang Y, Renna K, Sun L, Robson P, & Trakhtenberg EF (2018). Single cell transcriptome profiling of retinal ganglion cells identifies cellular subtypes. *Nature communications*, 9(1), 2759. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05134-3>.

Río-Hortega, P. (1919a). El “tercer elemento” de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. *Boletín Soc. Española Biol.* 8, 67–82.

Río-Hortega, P. (1919b). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos granuloaliposos). *Boletín Soc. Española Biol.* VIII, 91–103.

Río-Hortega, P. (1919c). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. III. Naturaleza probable de la microglía. *Boletín Soc. Española Biol.* VIII, 108–115.

Río-Hortega, P. (1919d). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Boletín Soc. Española Biol.* VIII, 154–166.

Río-Hortega, P. (1922). ¿Son homologables la glía de escasas radiaciones y la célula de Schwann? *Boletín Soc. Española Biol.* X, 1–4.

Rodieck RW (1979). Visual pathways. *Annual Reviews of Neuroscience* 2: 193–225.

Rodríguez AR, de Sevilla Müller LP and Brecha NC (2014). The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J Comp Neurol.*; 522(6):1411-43.

Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez, MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, & Ramírez, JM. (2014). Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *Journal of neuroinflammation*, 11, 133. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-133>.

S

Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas- Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009a). A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49:115-126.

Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano F, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009b). Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerised analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res.* 49:636-646.

Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010). Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res.* Jan;90(1):168- 83.

Sánchez-Migallón MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011). Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res.* 92(4):260-7.

Sánchez-Migallón MC, Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2016). Apoptotic Retinal Ganglion Cell Death After Optic Nerve Transection or Crush in Mice: Delayed RGC Loss with BDNF or a Caspase 3 Inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jan 1;57(1):81-93.

- Sánchez-Migallón MC, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, VidalSanz M, Agudo-Barriuso M (2018).** Nerve fibre layer degeneration and retinal ganglion cell loss long term after optic nerve crush or transection in adult mice. *Exp Eye Res.* May; 170:40-50.
- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martín-Oliva D, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA (2008).** Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.* Jan 10;506(2):224-39. doi: 10.1002/cne.21538. PMID: 18022954.
- Schmidt TM, Chen SK, Hattar S (2011).** Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* Nov;34(11):572-80. Review.
- Schnitzer, J., & Scherer, J (1990).** Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *The Journal of comparative neurology*, 302(4), 779–791. <https://doi.org/10.1002/cne.903020410>.
- Sefton AJ y Dreher B (1985).** Visual system: The art nervous system. Paxinos G, ed. vol 2. Academic Press, New York. USA. Pp. 169-222.
- Sefton AJ, Dreher B, Harvey A (2004).** Visual system: The art nervous sytem. Paxinos G, ed. Elsevier. USA. 1083–1165.
- Shenker N, Haigh R, Roberts E, Mapp P, Harris N, Blake D (2003).** A review of contralateral responses to a unilateral inflammatory lesion. *Rheumatology (Oxford).* Nov;42(11):1279-86. doi: 10.1093/rheumatology/keg397. Epub 2003 Jul 16. PMID: 12867588.
- Selles-Navarro I, Villegas-Péraz MP, Salvador- Silva M, Ruiz- Gómez JM, Vidal- Sanz M (1996).** Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure- induced ischemia and survival intervals. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 2002- 2014.
- Siddiqui AM, Sabljic TF, Koeberle PD, Ball AK (2014).** Downregulation of BM88 after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 28;55(3):1919-29.
- Sierra, A., de Castro, F., Del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., & Kettenmann, H (2016).** The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, 64(11), 1801–1840. <https://doi.org/10.1002/glia.23046>.
- Silverman, S. M., & Wong, W. T (2018).** Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annual review of vision science*, 4, 45–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034425>.
- Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., & Villegas-Pérez, M. P (2007).** Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *The Journal of comparative neurology*, 501(6), 866–878. <https://doi.org/10.1002/cne.21279>.
- Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N (2011).** Retinal glangion cells loss in a rata ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 434-441.
- Stein BE (1984).** Development of the superior colliculus. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 95-125.

Streit, W. J., Braak, H., Xue, Q. S., & Bechmann, I (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 118(4), 475–485. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0556-6>.

Szél, A., Röhlich, P., & Van Veen, T (1993). Short-wave sensitive cones in the rodent retinas. *Experimental eye research*, 57(4), 503–505. <https://doi.org/10.1006/exer.1993.1153>.

T

Tang Y, Le W (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.* 53, 1181–1194.

Tansley K (1933). The formation of rosettes in the rat retina. *Br. J. Ophthalmol.* 1933; 17,321–336.

Tassoni, A., Gutteridge, A., Barber, A. C., Osborne, A., & Martin, K. R (2015). Molecular Mechanisms Mediating Retinal Reactive Gliosis Following Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation. <https://doi.org/10.1002/stem.2095>.

Taylor L, Moran D, Arner K, Warrant E, Ghosh F (2013). Stretch to see: lateral tension strongly determines cell survival in long-term cultures of adult porcine retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; 54:1845-1856.

Taylor, L., Arnér, K., Kolewe, M., Pritchard, C., Hendy, G., Langer, R., & Ghosh, F (2017). Seeing through the interface: poly(ϵ -Caprolactone) surface modification of poly(glycerol-co-sebacic acid) membranes in adult porcine retinal explants. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11(8), 2349–2358. <https://doi.org/10.1002/term.2135>.

Taylor SE, Morganti-Kossmann C, Lifshitz J, & Ziebell JM (2014). Rod microglia: A morphological definition. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097096>.

Thanos, S., & Thiel, H. J (1991). Mechanisms governing neuronal degeneration and axonal regeneration in the mature retinofugal system. *Journal of cell science. Supplement*, 15, 125–134. https://doi.org/10.1242/jcs.1991.supplement_15.17.

Thanos, S., Kacza, J., Seeger, J., & Mey, J (1994). Old dyes for new scopes: the phagocytosis-dependent long-term fluorescence labelling of microglial cells in vivo. *Trends in neurosciences*, 17(5), 177–182. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90098-1).

Tran NM, Shekhar K, Whitney IE, Jacobi A, Benhar I, Hong G, Yan W, Adiconis X, Arnold ME, Lee JM, Levin JZ, Lin D, Wang C, Lieber CM, Regev A, He Z, & Sanes J R (2019). Single-Cell Profiles of Retinal Ganglion Cells Differing in Resilience to Injury Reveal Neuroprotective Genes. *Neuron*, 104(6), 1039–1055.e12. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.006>.

Tremblay, M. È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., & Sierra, A (2015). From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in neuroanatomy*, 9, 45. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00045>VIDA

Torres-Platas SG, Comeau S, Rachalski A, Bo GD, Cruceanu C, Turecki G, Giros B, & Mechawar N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *Journal of Neuroinflammation*, 11. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-12>.

V

Valdés P and Schneider BL (2016). Gene Therapy: A Promising Approach for Neuroprotection in Parkinson's Disease? *Front Neuroanat.* 2016 Dec; 20; 10:123.

Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vugler AA, Vidal-Sanz M (2014). Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Front Neuroanat.* 20; 8:131.

Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2015). Effects of ocular hypertension in the visual system of pigmented mice. *PLoS One.* Mar 26;10(3): e0121134. doi: 10.1371/journal.pone.0121134. PMID: 25811653; PMCID: PMC4374934.

van Adel, B. A., Arnold, J. M., Phipps, J., Doering, L. C., & Ball, A. K (2005). Ciliary Neurotrophic Factor Protects Retinal Ganglion Cells from Axotomy-Induced Apoptosis via Modulation of Retinal Glia In Vivo. *J Neurobiol*, 63, 215–234. <https://doi.org/10.1002/neu.20117>.

Vecino, E., Rodríguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 51, pp. 1–40). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>.

Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Pérez MP, Thanos S, Aguayo AJ (1987). Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci.* Sep;7(9):2894-909. doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-09-02894.1987. PMID: 3625278; PMCID: PMC6569122.

Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ (1988). Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp Neurol.* 102(1):92-101.

Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., & Aguayo, A. J (1991). Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *Journal of neurocytology*, 20(11), 940–952. <https://doi.org/10.1007/BF01190471>.

Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP (2001a). Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol.* 45 Suppl 3: S261-7; discussion S273-6.

Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor-Torroglosa S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP (2001b). Brimonidine's neuroprotective effects against transient ischaemia-induced retinal ganglion cell death. *Eur J Ophthalmol.* 11 Suppl 2: S36-40

Vidal-Sanz M (2006). La vía visual como modelo para el estudio de la degeneración, regeneración y neuroprotección en el sistema nervioso central. Academia de Ciencias de la Región de Murcia Ed. Murcia.

Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, de Imperial JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP (2012). Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res.* Jan;31(1):1-27. Review.

Vidal-Sanz M, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, García-Ayuso D, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP (2015). Retinal neurodegeneration in experimental glaucoma. *Prog Brain Res.*; 220:1-35. doi: 10.1016/bs.pbr.2015.04.008. Epub 2015 Jul 2. PMID: 26497783.

Vidal-Sanz, M., Galindo-Romero, C., Valiente-Soriano, F. J., Nadal-Nicolás, F. M., Ortin-Martinez, A., Rovere, G., Salinas-Navarro, M., Lucas-Ruiz, F., Sanchez-Migallon, M. C., Sobrado-Calvo, P., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P., & Agudo-Barriuso, M (2017). Shared and differential retinal responses against optic nerve injury and ocular hypertension. *Frontiers in Neuroscience*, 11(APR). <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00235>.

Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1988). Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci. Jan*;8(1):265-80.

Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ (1993). Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol.* ;24(1):23-36.

W

Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J, Fortune B (2002). 'Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 1088-94.

Walker DG, Lue LF (2015). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: Challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res. Ther.* 2015, 7, 56.

Waller R, Baxter L, Fillingham DJ, Coelho S, Pozo JM, Mozumder M, Frangi AF, Ince PG, Simpson JE, Robin Highley J. (2019). Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions. *PLoS ONE*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210888>.

Waller R, Baxter L, Fillingham D. J, Coelho S, Pozo J. M, Mozumder M, Frangi A. F, Ince P. G, Simpson J. E., & Robin Highley, J. (2019). Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions. *PLoS ONE*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210888>.

Wohl SG, Schmeer CW, Witte OW, Isenmann S (2010). Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 2686-96.

Woldemussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA (2001). Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 2849– 2855.

Wyatt-Johnson SK, Herr SA, Brewster AL (2017). Status Epilepticus Triggers Time-Dependent Alterations in Microglia Abundance and Morphological Phenotypes in the Hippocampus. *Front Neurol.* Dec 18; 8:700. doi: 10.3389/fneur.2017.00700. PMID: 29326654; PMCID: PMC5741821.

Y

Ying Li, Yan Zhang, Shounan Qi and Guanfang Su (2018). Retinal organotypic culture-A candidate for research on retinas. Department of ophthalmology, Second Hospital of Jilin University, Jilin, China; 2018.

Young K, Morrison H (2018). Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. J Vis Exp. Jun 5;(136):57648. doi: 10.3791/57648. PMID: 29939190; PMCID: PMC6103256.

Z

Zhang C, Lam TT, Tso MO (2005a). Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. Exp Eye Res. 2005 Dec;81(6):700-9. doi: 10.1016/j.exer.2005.04.008. Epub 2005 Jun 20. PMID: 15967434.

Zhang C, Shen JK, Lam TT, Zeng HY, Chiang SK, Yang F, Tso MO (2005b). Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. Mol Vis. Oct 27; 11:887-95. PMID: 16270028.

Zhou T, Huang Z, Sun X, Zhu X, Zhou L, Li M, Cheng B, Liu X, He C (2017). Microglia Polarization with M1/M2 Phenotype Changes in rd1 Mouse Model of Retinal Degeneration. Front. Neuroanat. 2017, 11, 77.

Zotova E, Bharambe V, Cheaveau M, Morgan W, Holmes C, Harris S, Neal JW, Love S, Nicoll JA, Boche D (2013). Inflammatory components in human Alzheimer's disease and after active amyloid- β 42 immunization. Brain. 2013 Sep;136(Pt 9):2677-96. doi: 10.1093/brain/awt210. Epub 2013 Aug 13. PMID: 23943781.

