



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**TESIS DOCTORAL**

Estudio de la Respuesta Inflamatoria en el Sistema Nervioso Central tras el Aplastamiento completo del Nervio Óptico en Ratón.

**D. José María Cabrera Maqueda**

**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Estudio de la Respuesta Inflamatoria en el Sistema Nervioso Central tras el Aplastamiento completo del Nervio Óptico en Ratón.

Autor: D. José María Cabrera Maqueda

Director/es: D. Manuel Vidal Sanz y D.<sup>a</sup> Caridad Galindo Romero







**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. José María Cabrera Maqueda

doctorando del Programa de Doctorado en

Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Estudio de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central tras el aplastamiento completo del nervio óptico en ratón.

y dirigida por,

D./Dña. Caridad Galindo Romero

D./Dña. Manuel Vidal Sanz

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 2 de Mayo de 2023

Fdo.: José María Cabrera Maqueda

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

**AGRADECIMIENTOS**

**ANEXOS ADMINISTRATIVOS**

**RESUMEN**

**SUMMARY**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**LISTA DE ILUSTRACIONES**

**ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS**

**HALLAZGOS ORIGINALES**

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....</b>	<b>2</b>
1.1.1.	NEURONAS .....	3
1.1.2.	CÉLULAS DE LA GLÍA .....	3
1.1.2.1.	Microglía .....	5
1.1.2.2.	Macroglía .....	6
<b>1.2.</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE REGIONES DE ESTUDIO.....</b>	<b>7</b>
1.2.1.	COLÍCULO SUPERIOR .....	7
1.2.2.	HIPOCAMPO .....	10
1.2.3.	BULBO OLFATORIO .....	13
1.2.4.	CEREBELO.....	15
1.2.5.	MÉDULA ESPINAL .....	17
<b>1.3.</b>	<b>CONEXIONES INTERHEMISFÉRICAS.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4.</b>	<b>EI SISTEMA VISUAL .....</b>	<b>21</b>
1.4.1.	LA RETINA DEL ROEDOR.....	22
1.4.2.	CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA Y SUS PROYECCIONES .....	25
1.4.2.1.	Células ganglionares de la retina .....	25
1.4.2.2.	Nervio óptico y vía visual .....	27
1.4.3.	CÉLULAS DE LA GLÍA DE LA RETINA. ....	29
1.4.3.1.	Células de Müller .....	29
1.4.3.2.	Astrocitos .....	30
1.4.3.3.	Microglía .....	31
<b>1.5.</b>	<b>MODELOS DE DEGENERACIÓN DEL SNC .....</b>	<b>31</b>
1.5.1.	APLASTAMIENTO DEL NERVIO ÓPTICO (ApNO) COMO MODELO DE DEGENERACIÓN DEL SNC .....	32
1.5.1.1.	Respuesta de la retina contralateral tras axotomía del nervio óptico...	36

1.5.1.2.	Mecanismos implicados en la respuesta contralateral en el ApNO.....	38
1.5.2.	EFFECTO CONTRALATERAL O REMOTO A LA AXOTOMÍA DEL NERVIO ÓPTICO EN OTRAS ÁREAS DEL SNC .....	39
1.5.2.1.	Efecto en el Sham o inflamación vía sistémica .....	40
<b>1.6.</b>	<b>LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA (BHE).</b> .....	<b>40</b>
1.6.1.	ANATOMÍA DE LA BHE.....	41
1.6.2.	OTRAS BARRERAS ANATOMO-FUNCIONALES EN EL SNC.....	43
1.6.2.1.	La barrera sangre-líquido cefalorraquídeo .....	43
1.6.2.2.	La barrera meníngea o subaracnoidea.....	44
1.6.2.3.	La barrera hematorretiniana .....	45
1.6.3.	PERMEABILIDAD DE LA BHE.....	46
1.6.4.	LA BHE TRAS EL ApNO .....	47
<b>1.7.</b>	<b>NEUROINFLAMACIÓN</b> .....	<b>49</b>
1.7.1.	MARCADORES DE GLIOSIS .....	49
1.7.1.1.	AQ4 .....	49
1.7.1.2.	GFAP .....	50
1.7.1.3.	Iba 1 .....	51
1.7.1.4.	CD68.....	52
1.7.1.5.	MHC II.....	52
1.7.1.6.	TSPO .....	53
1.7.2.	MARCADORES INFLAMATORIOS .....	54
1.7.2.1.	CXCR1.....	54
1.7.2.2.	IL-1 $\beta$ .....	55
1.7.2.3.	Lcn2 .....	55
1.7.2.4.	TNF- $\alpha$ .....	56
1.7.2.5.	IL-6.....	57
1.7.2.6.	CD206.....	59
1.7.2.7.	IL-4.....	59
1.7.2.8.	TGF- $\beta$ 1.....	60
1.7.3.	MARCADORES DE APOPTOSIS.....	61
1.7.3.1.	Caspasa-3.....	61
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
<b>2.1.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>64</b>
<b>2.2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>64</b>
2.2.1.	OBJETIVOS GENERALES .....	64
2.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	64

<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>66</b>
<b>3.1.</b>	<b>ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</b> .....	<b>67</b>
<b>3.2.</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>67</b>
<b>3.3.</b>	<b>APLASTAMIENTO DEL NERVIÓ ÓPTICO (ApNO) O CIRUGÍA SHAM</b> .....	<b>70</b>
3.3.1.	APLASTAMIENTO DEL NERVIÓ ÓPTICO.....	70
3.3.2.	CIRUGÍA SHAM .....	71
<b>3.4.</b>	<b>EXTRACCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR</b> .....	<b>71</b>
3.4.1.	DISECCIÓN DE TEJIDOS EN FRESCO .....	71
3.4.2.	EXTRACCIÓN DE ARN .....	72
3.4.3.	SÍNTESIS DE ADNc.....	72
3.4.4.	PCR CUANTITATIVA .....	73
3.4.4.1.	Genes de estudio.....	73
3.4.5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	74
<b>3.5.</b>	<b>DISECCIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO</b> .....	<b>75</b>
3.5.1.	SACRIFICIO, PERFUSIÓN Y FIJACIÓN DEL ANIMAL.....	75
3.5.2.	DISECCIÓN DEL ENCÉFALO .....	75
3.5.3.	PROCESADO HISTOLÓGICO DEL ENCÉFALO .....	75
3.5.4.	SECCIONES DE CEREBRO.....	76
3.5.5.	INMUNOHISTOFLUORESCENCIA .....	76
3.5.5.1.	Anticuerpos primarios y poblaciones inmunodetectadas .....	77
3.5.5.2.	Anticuerpos secundarios .....	79
3.5.6.	ADQUISICIÓN DE IMÁGENES.....	80
3.5.7.	PROCESADO DE IMÁGENES.....	81
3.5.7.1.	Cuantificación semiautomática de las células de la microglía.....	81
3.5.7.2.	Estudio del área celular de las células de la microglía .....	82
3.5.7.3.	Cuantificación automática del área ocupada por GFAP.....	84
3.5.8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	85
3.5.8.1.	Análisis del estudio histológico de la microglía .....	85
3.5.8.2.	Análisis del estudio histológico de la macroglía .....	87
<b>3.6.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>87</b>
<b>3.7.</b>	<b>TABLAS RESUMEN DE METODOLOGÍA</b> .....	<b>88</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>91</b>
<b>4.1.</b>	<b>ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SNC</b> ....	<b>92</b>
4.1.1.	ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA RETINA TRAS EL ApNO.....	93
4.1.1.1.	Respuesta inflamatoria en la retina tras la cirugía Sham .....	93
4.1.1.2.	Respuesta inflamatoria en la retina tras el ApNO .....	94

4.1.2.	ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN OTRAS REGIONES DEL SNC .....	100
4.1.2.1.	Colículo superior .....	100
4.1.2.2.	Hipocampo .....	107
4.1.2.3.	Bulbo Olfatorio .....	113
4.1.2.4.	Cerebelo .....	118
4.1.2.5.	Médula espinal.....	124
<b>4.2.</b>	<b>ESTUDIO ANATOMO-PATOLÓGICO DE LA RESPUESTA GLIAL EN EL CEREBRO TRAS EL ApNO .....</b>	<b>129</b>
4.2.1.	ACTIVACIÓN MICROGLÍAL .....	129
4.2.1.1.	Colículo superior .....	129
4.2.1.2.	Hipocampo .....	145
4.2.1.3.	Bulbo Olfatorio .....	161
4.2.2.	ACTIVACIÓN MACROGLIAL .....	177
4.2.2.1.	Colículo superior .....	177
4.2.2.2.	Hipocampo.....	190
4.2.2.3.	Bulbo olfatorio .....	203
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>217</b>
<b>5.1.</b>	<b>RESPUESTA EN LA RETINA LESIONADA Y EN LA CONTRALATERAL AL ApNO.....</b>	<b>218</b>
<b>5.2.</b>	<b>RESPUESTA EN EL COLÍCULO SUPERIOR IPSI- Y CONTRALATERAL AL ApNO.....</b>	<b>222</b>
<b>5.3.</b>	<b>RESPUESTA EN REGIONES DEL SNC FUERA DE LA VÍA VISUAL Y A DIFERENTES DISTANCIAS AL ApNO.....</b>	<b>225</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>232</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>235</b>



## AGRADECIMIENTOS

---

La Tesis Doctoral acabada: por más que intenté planificar su final, nunca habría imaginado este trayecto. Aquello que empezó cruzando solo el puente entre el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y el IMIB-Pascual Parrilla en una tierra muy nueva para mí, Murcia, buscando un grupo de investigación para seguir lo que me movía, aprender más, me ha permitido mucho más que eso. A día de hoy, varios años después, este trabajo me ha permitido conocer a buenas personas, ha contribuido a mi desarrollo profesional y ha sido testigo de mi crecimiento personal. Por todo ello, escribo estas líneas de agradecimiento.

Comienzo por la Dra. Caridad Galindo-Romero, co-directora de esta Tesis y amiga. Sin su ayuda, este proyecto no se habría podido desarrollar. Espero que continuemos juntos nuestro dibujo de la línea del tiempo.

Al Prof. Manuel Vidal, por su impulso siempre para que continuara compatibilizando la investigación en el laboratorio con el hospital. A la Dra. Marta Agudo, madrina de esta tesis por sus conocimientos, su trabajo y su generosidad; gracias por transmitirme tu pasión por “cultivar la ciencia por sí misma”.

A la Prof. Mari Paz Villegas, gracias siempre por tu interés y tus ánimos. Al Dr. Marcelino Avilés, por su ayuda en los primeros pasos en el laboratorio.

A los miembros del laboratorio. Especialmente, a Fran, compañero de Doctorado desde el inicio, por sus podcasts y nuestras conversaciones, por seguir estando siempre cerca. A Juan Antonio, porque esta tesis nos ha permitido ser compañeros de laboratorio y de hospital. A los Dres. Fernando Lucas, María José González y María Norte, por toda la ayuda técnica que siempre han ofrecido con paciencia a un *naïve* como yo. A los Dres. Jhonny di Pierdomenico, Diego García Ayuso, Manuel Salinas y Javier Valiente, por todo el trabajo desarrollado durante estos años que nos permite avanzar a los demás. A José Manuel y Lola, igualmente gracias por vuestra disponibilidad.

A las Dras. Ana Raquel Santiago, Raquel Boia y resto de miembros del *Retinal Dysfunction & Neuroinflammation Lab* en el *Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research*, por la acogida y por permitirme vivir la experiencia durante la formación como neurólogo de integrarme en horario completo durante tres meses en un laboratorio de investigación.

A mis jefes de la Unidad de Neuroinmunología del Hospital Clínic de Barcelona, el Dr. Albert Saiz y la Dra. Yolanda Blanco, por la confianza depositada en mí y por transmitirme tanta sabiduría en tan poco tiempo. A los Dres. Francesc Graus y Josep Dalmau, por permitirme disfrutar de su conocimiento. A mis compañeras, la Dra. Eugenia Martínez-Hernández, la Dra. Sara Llufrí, la Dra. María Sepúlveda y la Dra. Mar Guasp, porque son personas

inspiradoras. Y, especialmente, a Elianet Fonseca, mi co-fellow, por su ayuda y nuestra complicidad. Sin duda, el desarrollo de esta Tesis Doctoral no habría sido el mismo sin la experiencia de estos dos últimos años rodeado de este nuevo equipo.

A los residentes de mi generación de Murcia: Luna, Gabi, Ana Esther, Fani y Jose. Gracias por entenderme siempre, por vuestros ánimos, y por formar para siempre el núcleo duro.

A mi hermana, Mónica, por estar siempre a mi lado; y a mis padres, José María y Paqui, por transmitirme, con su ejemplo, la constancia en el trabajo, y por su comprensión.

Y, por último, a Antonio, el compañero de viaje que se incorporó a mi Tesis en medio de mi vida. Por su nobleza y apoyo incondicional.



## ANEXOS ADMINISTRATIVOS

Autorización de los directores de la Tesis para su presentación: **Dra. Caridad Galindo Romero y Dr. Manuel Vidal Sanz:**



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

### Autorización de los directores de la Tesis Doctoral para su presentación

Prof. Manuel Vidal Sanz, Catedrático de Oftalmología del área de Oftalmología del Dpto. de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia.

Dra. Caridad Galindo Romero, Profesora Contratada Doctora Permanente del área de Optometría del Dpto. de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia.

### AUTORIZAN

La presentación de la tesis doctoral titulada: "Estudio de la Respuesta Inflamatoria en el Sistema Nervioso Central tras el Aplastamiento Completo del Nervio Óptico en Ratón", realizada por D. José María Cabrera Maqueda bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 9 de mayo de 2023

Fdo. Prof. Manuel Vidal Sanz



Fdo. Dra. Caridad Galindo Romero

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

Edificio Departamental/ LAIB 5ª planta, Ctra. Buenavista s/n, 30120 El Palmar, Murcia. T. 868667574/7575

Informes de **revisor externo 1**: Informe favorable de la **Dra. Lies de Groef** del **Biology Department of Leuven Brain Institute, University of KU Leuven, Lovaina, Bélgica.**



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

**INFORME DE EXPERTO DOCTOR PERTENECIENTE A UNA INSTITUCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR O INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN NO ESPAÑOL PARA OPTAR A MENCIÓN DE «DOCTORADO INTERNACIONAL»**  
**EXTERNAL REVIEWER'S REPORT FOR**  
**THE "INTERNATIONAL DOCTORATE" MENTION**

**DATOS DE LA TESIS DOCTORAL / DOCTORAL THESIS DETAILS**

Nombre y apellidos del doctorando / PhD student's name and surname(s): <b>Jose María Cabrera Maqueda</b>
Centro de origen / Institution of origin: <b>Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia</b>
Programa de Doctorado / Doctoral Programme: <b>Ciencias de la Visión/ Vision Sciences Programme</b>
Título de la tesis / Thesis title: <b>Estudio de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central tras el aplastamiento completo del nervio óptico en ratón/ Study of the inflammatory response in the central nervous system after complete optic nerve crush in mice.</b>

**DATOS DEL EXPERTO QUE EMITE EL INFORME / EXTERNAL REVIEWER'S DETAILS**

Nombre y apellidos / First name and family name: <b>Lies De Groef</b>
D.N.I./Pasaporte / I.D./Passport number: <b>870807-270.45</b>
E-mail: <b>lies.degroef@kuleuven.be</b>
Doctor por la Universidad de / PhD institution: <b>KU Leuven</b>
Año de defensa de la tesis doctoral / PhD date: <b>June 16, 2015</b>
Institución/ Instituto de Investigación a la que pertenece / Current affiliation: <b>KU Leuven</b>
Departamento/Centro / Department/Centre: <b>Biology Department, Leuven Brain Institute</b>
País / Country: <b>Belgium</b>

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

GENERAL DOCTORATE COMMITTEE AT THE UNIVERSITY OF MURCIA (Spain)



**1. INFORME RAZONADO SOBRE LA IDONEIDAD DE LA TESIS AL EFECTO DE ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR: / EXTERNAL REVIEWER'S ASSESSMENT OF THE THESIS' QUALITY**

**1.1. Especificar los motivos que avalan la calidad de la tesis antes indicada al objeto de acceder al grado académico de doctor (objetivos, originalidad del trabajo, metodología, antecedentes y bibliografía, resultados, etc.) (Adjunte cuantas hojas adicionales estime oportuno)**

**Specify reasons for endorsing the quality of the above-mentioned thesis in order to obtain the PhD award (objectives, originality of the research conducted, framing in the relevant literature, methodology, results, ...) (Please add as many additional pages as necessary)**

Jose María has performed research on the inflammatory response produced after a localised traumatic injury to the optic nerve and its extension to different regions of the central nervous system. This thesis is based on a well-reasoned hypothesis, and is structured in three main objectives, which are well defined and written together in a coherent story. Jose María has learnt basic laboratory techniques with experimental animals, both anatomical and molecular, and has acquired knowledge to set up an experimental design, analyse results and interpretation data.

In addition, the writing is clear, the content and illustrations are carefully produced and the format is well thought out. This doctoral thesis is a great effort and the results shown are solid and lay the basis for future studies.

Overall, José María is ready to defend his PhD and start a career as a young independent researcher.

-----  
Jose María ha llevado a cabo una investigación sobre la respuesta inflamatoria producida tras una lesión traumática localizada y la extensión de la misma a diferentes regiones del Sistema Nervioso Central.

Esta tesis tiene una hipótesis precisa y bien razonada. Para llevarla a cabo, la tesis se estructura en tres objetivos principales, bien definidos y secuenciales entre sí, para los cuales Jose María ha aprendido técnicas básicas de laboratorio con animales de experimentación, tanto anatómicas como moleculares y ha adquirido conocimientos para llevar a cabo un diseño experimental, análisis de resultados e interpretación de los mismos.

Además, la redacción es muy clara, el contenido y las ilustraciones están cuidadosamente realizadas y el formato muy cuidado. Esta tesis doctoral supone un gran esfuerzo y los resultados mostrados son sólidos y sientan las bases para futuros estudios.

Teniendo en cuenta lo arriba expuesto, José María está preparado para defender su doctorado y continuarlo con una posición postdoctoral y comenzar su carrera como joven investigador independiente.



- 1.2. Valoración absoluta y/o ponderada de la tesis presentada en comparación con otros trabajos de investigación en su campo de conocimiento / Overall and/or balanced assessment of the thesis in comparison with other research studies in the same disciplinary domain:

I hereby rate this thesis as excellent, both for the scientific work done and for the quality of the document and illustrations. Therefore, I **strongly and favourably recommend Maria to obtain a doctoral degree** from the graduate program in Visual Sciences.

-----

Por la presente, califico esta tesis como excelente, tanto por el trabajo científico realizado como por la calidad del documento y las ilustraciones. Por lo tanto, **recomiendo decidida y favorablemente a Jose María para que obtenga el título de doctor** del programa de postgrado en Ciencias de la Visión.

- 1.3. ¿Considera usted que la tesis doctoral es apta para su defensa pública? / Do you consider the work submitted is ready for the PhD viva?

SI/YES

NO/NO

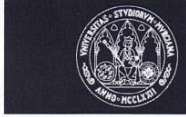
- 1.4. Comentarios, observaciones u otras sugerencias para la mejora del trabajo / Comments, observations and suggestions intended to improve this thesis:

Leuven, May 17, 2023 / Place and date

Firmado/Signed\*. **Dr. Lies De Groef**

(\*) Se deben firmar todas las hojas del informe/ All pages of this report ought to be signed

Informes de revisor externo 2: Informe favorable del Dr. Carlo Nucci del Department of Experimental Medicine/ Ophthalmology Unit, University of Rome Tor Vergata, Roma, Italia.



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

**INFORME DE EXPERTO DOCTOR PERTENECIENTE A UNA INSTITUCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR O INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN NO ESPAÑOL PARA OPTAR A MENCIÓN DE «DOCTORADO INTERNACIONAL»**  
**EXTERNAL REVIEWER'S REPORT FOR**  
**THE "INTERNATIONAL DOCTORATE" MENTION**

**DATOS DE LA TESIS DOCTORAL / DOCTORAL THESIS DETAILS**

Nombre y apellidos del doctorando / PhD student's name and surname(s): <b>Jose María Cabrera Maqueda</b>
Centro de origen / Institution of origin: <b>Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia</b>
Programa de Doctorado / Doctoral Programme: <b>Ciencias de la Visión/ Vision Sciences Programme</b>
Título de la tesis / Thesis title: <b>Estudio de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central tras el aplastamiento completo del nervio óptico en ratón/ Study of the inflammatory response in the central nervous system after complete optic nerve crush in mice.</b>

**DATOS DEL EXPERTO QUE EMITE EL INFORME / EXTERNAL REVIEWER'S DETAILS**

Nombre y apellidos / First name and family name: Carlo NUCCI
D.N.I./Pasaporte / I.D./Passport number: YA8965882
E-mail: nucci@med.uniroma2.it
Doctor por la Universidad de / PhD institution: University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy
Año de defensa de la tesis doctoral / PhD date: 2000
Institución/ Instituto de Investigación a la que pertenece / Current affiliation: University of Rome Tor Vergata
Departamento/Centro / Department/Centre: Experimental Medicine, Unit of Ophthalmology
País / Country: Italy

*Carlo Nucci*

**COMISIÓN GENERAL DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA (España)**  
GENERAL DOCTORATE COMMITTEE AT THE UNIVERSITY OF MURCIA (Spain)





1. INFORME RAZONADO SOBRE LA IDONEIDAD DE LA TESIS AL EFECTO DE ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR: / EXTERNAL REVIEWER'S ASSESSMENT OF THE THESIS' QUALITY

1.1. Especificar los motivos que avalan la calidad de la tesis antes indicada al objeto de acceder al grado académico de doctor (objetivos, originalidad del trabajo, metodología, antecedentes y bibliografía, resultados, etc.) (Adjunte cuantas hojas adicionales estime oportuno)

Specify reasons for endorsing the quality of the above-mentioned thesis in order to obtain the PhD award (objectives, originality of the research conducted, framing in the relevant literature, methodology, results, ...) (Please add as many additional pages as necessary)

The thesis " **Study of the inflammatory response in the Central Nervous System after optic nerve crush in mice**" by José María Cabrera Maqueda presents the work performed to achieve the degree of Doctor of Philosophy in the Visual Sciences Programme.

The thesis includes a detailed study of the inflammatory response that occurs in the retina, superior colliculi and other Central Nervous System regions after a localized trauma, such as optic nerve crush. In this study, José María shows the mechanisms in which glial cells are involved in neuronal degeneration in a distance-dependent manner.

This thesis is very well written, includes a comprehensive literature overview, and the illustrations and figures in this work are clear and have a high quality. Moreover, this thesis includes anatomical study of glial cells in different brain areas and molecular techniques to understand mechanisms implicated in the inflammatory response. Overall, this work shows that José María has not only learnt many techniques, but most importantly also how to design an experiment to answer a question, how to gather and analyze data, and how to present them in an intelligible way.

-----  
La tesis "**Estudio de la respuesta inflamatoria en el Sistema Nervioso Central tras el aplastamiento del nervio óptico en ratón**" de José María Cabrera Maqueda presenta el trabajo realizado para obtener el grado de Doctor en Filosofía en el Programa de Ciencias de la Visión.

La tesis incluye un estudio detallado de la respuesta inflamatoria que se produce en la retina, el colículo superior y otras regiones del Sistema Nervioso Central tras un traumatismo localizado, como es el aplastamiento del nervio óptico. En este estudio, José María muestra los mecanismos en los que las células gliales están implicadas en la degeneración neuronal de forma distancia-dependiente. Esta tesis está muy bien escrita, incluye una amplia revisión bibliográfica, y las ilustraciones y figuras de este trabajo son claras y tienen una gran calidad. Además, esta tesis incluye técnicas anatómicas y moleculares para comprender los mecanismos implicados en la respuesta inflamatoria. En general, este trabajo demuestra que José María no sólo ha aprendido muchas técnicas, sino sobre todo cómo diseñar un experimento para responder a una pregunta, cómo recopilar y analizar datos y cómo presentarlos de forma inteligible. Teniendo en cuenta lo arriba expuesto, José María está preparado

Carlos M...



para defender su doctorado y continuarlo con una posición postdoctoral y comenzar su carrera como joven investigador independiente.

- 1.2. Valoración absoluta y/o ponderada de la tesis presentada en comparación con otros trabajos de investigación en su campo de conocimiento / Overall and/or balanced assessment of the thesis in comparison with other research studies in the same disciplinary domain:

Overall, this work clearly shows that José María has the necessary capacities to perform sound scientific research. Therefore, I **do inform very favorably this work to obtain the Ph.D. Degree in the postgraduate programme of Visual Sciences.**

-----  
En conjunto, este trabajo demuestra claramente que José María tiene las capacidades necesarias para realizar una investigación científica sólida. Por todo ello, **informo muy favorablemente este trabajo para la obtención del Grado de Doctor en el programa de postgrado de Ciencias de la Visión.**

- 1.3. ¿Considera usted que la tesis doctoral es apta para su defensa pública? / Do you consider the work submitted is ready for the PhD viva?

SI/YES

NO/NO

- 1.4. Comentarios, observaciones u otras sugerencias para la mejora del trabajo / Comments, observations and suggestions intended to improve this thesis:

En xx a xxx de 20xx / Place and date

Rome 22.05.2023

Firmado/Signed\*. Dr.:

Carlo Nucci

(\* Se deben firmar todas las hojas del informe/ All pages of this report ought to be signed



### INTRODUCCIÓN

Una lesión focal al Sistema Nervioso Central (SNC) provoca la muerte neuronal y una respuesta glial cuyo objetivo es limitar el daño, generándose un entorno inflamatorio. Un daño sistémico, como una intervención quirúrgica, puede también provocar una respuesta inflamatoria sistémica que alcance el SNC. La retina y los nervios ópticos son elementos del SNC relativamente accesibles y ampliamente estudiados en nuestro laboratorio. La axotomía mediante aplastamiento unilateral del nervio óptico a nivel intraorbitario (ApNO) es un modelo de neurodegeneración inducida que genera una respuesta inflamatoria.

El ApNO en ratón provoca la muerte por apoptosis de las células ganglionares de la retina (CGR) en dos fases independientes de la distancia física entre el aplastamiento y la cabeza del nervio óptico: durante los primeros 9-14 días, se pierde el 85% de las CGR y, a partir de entonces, las CGR mueren lentamente hasta alcanzar una supervivencia aproximada del 1,5% de la población original en el día 90. En la retina contralateral, provoca una muerte fija del 15% de las CGR, que puede ser modulada temporalmente por la distancia del ApNO: si la lesión se realiza más cerca del ojo no lesionado, la pérdida se produce antes. Además, el ApNO desencadena una activación micro y macroglial bilateral en ambas retinas, que es más fuerte, precoz y duradera en la retina lesionada.

El ApNO induce una neurodegeneración anterógrada y una disfunción de la barrera hematoencefálica a lo largo de la vía visual. Sin embargo, la propagación de la inflamación en áreas retino-receptoras como el colículo superior (CS) o regiones remotas del SNC (RRSNC), fuera de la vía visual, ha sido menos estudiada. El estudio de la activación de las células gliales o del perfil de marcadores pro- o antiinflamatorios y de apoptosis puede ayudarnos a comprender los mecanismos implicados en la extensión de la respuesta inflamatoria.

### OBJETIVOS

Los objetivos generales de esta tesis son:

1. Analizar la expresión génica en la respuesta inflamatoria tras el ApNO en la retina lesionada y en la contralateral.
2. Analizar la expresión génica en la respuesta inflamatoria tras el ApNO en regiones del SNC, ipsi- y contralaterales a la lesión: el CS, principal centro de proyección de las CGR en el ratón, y RRSNC (hipocampo -H-, bulbo olfatorio -BO-, cerebelo -CE- y médula espinal -ME-) a diferentes distancias de la lesión.



3. Estudiar a nivel histológico la respuesta glial al ApNO en tres regiones representativas del SNC, ipsi- y contralaterales a la lesión: CS y algunas RRSNC (H y BO).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales experimentales fueron ratones macho pigmentados (C57BL/6) de edades adultas. Se diferenciaron 3 grupos experimentales: animales con aplastamiento del nervio óptico izquierdo a 0,5 mm del disco óptico (ApNO); ratones en los que se realizó toda la cirugía salvo el aplastamiento (Sham) y un grupo de intactos que se usó como control. Se llevaron a cabo dos estudios:

- Estudio molecular: Se realizó la disección en fresco de ambas retinas, CS y RRSNC a los días 1, 3, 9 o 30 tras el ApNO o la cirugía Sham. Se extrajo su ARN y, mediante qPCR, se determinaron los niveles de *Tgf-β1*, *Il-1β*, *Tnf-α*, *Iba1*, *Gfap*, *Mhc II* y *Tspo* en las retinas y en el resto de regiones del SNC a estudio. En los extractos de CS, H, BO, CE y ME, se determinó también *Caspasa-3*, *Cxcr1*, *Lcn2*, *Il-6*, *Cd206*, *Il-4* y *Aq4*. Los genes se clasificaron como marcadores de apoptosis (*Caspasa-3*), pro-inflamatorios (*Cxcr1*, *Il-1*, *Il-1β*, *Lcn2*, *Tnf-α*, *Il-6*), antiinflamatorios (*Cd206*, *Il-4*, *Tgf-β1*) y de gliosis (*Aq4*, *Gfap*, *Iba1*, *Mhc II*, *Tspo*). El análisis se realizó con referencia a la expresión constitutiva de *Hprt* y *Gapdh* como genes *housekeeping*.
- Estudio anatómo-patológico: Se realizó en secciones sagitales de cerebro a los 3, 9 o 30 días tras el ApNO o la cirugía Sham. Se cuantificó el área ocupada por la señal GFAP y se evaluó la detección de MHC II (macroglía, CMa), así como la densidad de células *Iba1*<sup>+</sup> y la expresión de CD68 (microglía, CMi), tanto en CS como en algunas RRSNC (H y BO).

Se analizó la respuesta de los animales con ApNO vs. intactos o Sham, entre regiones ipsi- (i) vs. contralaterales (c) a la lesión y entre los diferentes tiempos de supervivencia.

## RESULTADOS

En la retina, la cirugía Sham per se fue suficiente para modificar la expresión génica de marcadores gliales e inflamatorios en ambos ojos. Por tanto, para aislar la respuesta al ApNO, comparamos los animales ApNO vs. Sham. Tras el ApNO, *Tnf-α* se sobreexpresó precozmente en ambas retinas y *Tgf-β1* se sobreexpresó antes en la retina contralateral que en la lesionada. La sobreexpresión de *Gfap* fue exclusiva de la retina lesionada mientras que el incremento de *Iba1*, *Mhc II* y *Tspo* se observó en ambas. A los 30 días, la respuesta glial se normalizó al nivel del Sham pero *Il-β* persistió elevada en la retina lesionada y *Tspo* sobreexpresada en ambas.

Las CMi Iba1<sup>+</sup> mostraron una baja expresión constitutiva de CD68 y la densidad celular fue similar en el CS (357±23 cel/mm<sup>2</sup>), H (310±54 cel/mm<sup>2</sup>) y BO (351±31 cel/mm<sup>2</sup>) en el ratón intacto. MHC II no se inmunodetectó en células gliales excepto en el BO.

La cirugía Sham causó una respuesta inflamatoria y glial en el resto de regiones del SNC que no se modificó de forma sustancial tras el ApNO (excepto el CS): hubo un incremento generalizado de la densidad de células Iba1<sup>+</sup> o de la expresión de *Iba1* pero sin cambios histológicos, y sobreexpresión de marcadores pro-inflamatorios (principalmente, *Cxcr1*) así como de *Caspasa-3*. Además, los signos de activación glial (sobreexpresión de *Tspo* o *Mhc II*) se presentaron siempre en regiones ipsilaterales (BOi, CEi, MEi), donde la reacción pro-inflamatoria fue también mayor, y la respuesta en la ME fue menor y más tardía que en otras RRSNC. No obstante, el ApNO contribuyó a que la respuesta inflamatoria perdurara al menos hasta el día 30 tras la cirugía.

En el CS, la activación microglial anatómica (somas celulares redondeados CD68<sup>+</sup>) se observó en el CSc desde el día 3 en adelante, junto con una sobreexpresión significativa de *Caspasa-3*. En el CSi tras el ApNO o en ambos CS en los animales Sham, la CMi no presentó signos de activación. *Gfap* se sobreexpresó y los astrocitos se hipertrofiaron en ambos CS desde el día 9 tras el ApNO, pero la respuesta macroglial también se presentó tras la cirugía Sham. Además, como ocurrió en la retina, el grupo Sham mostró cambios en la expresión génica de los marcadores estudiados. Por lo que comparando ONC vs. Sham, aunque *Cxcr1* se sobreexpresó el día 1 tras el ApNO en ambos CS, el incremento de *Tspo* y *Mhc II* fue exclusivo del CSc y la respuesta pro-inflamatoria y la sobreexpresión de *Caspasa-3* fue mayor y más duradera en el CSc.

En el H, la CMi fue más sensible al daño que la de otras RRSNC. En comparación con el ratón intacto, los animales Sham mostraron un incremento del número de CMi con área mayor a 20 mm<sup>2</sup> que no se observó en otras regiones cerebrales, aunque no se asoció a sobreexpresión de *Tspo* o *Mhc II*. El ApNO provocó una respuesta con un patrón similar a la presentada en el CS pero de menor intensidad: hubo un incremento de la densidad microglial o de expresión de *Iba1* en ambos H y la respuesta pro-inflamatoria permaneció elevada en el Hc a los 30 días tras el ApNO. Sin embargo, no se evidenciaron cambios histológicos y la CMA o los niveles de *Caspasa-3* permanecieron en valores similares al Sham.

## CONCLUSIONES

1. La cirugía Sham es suficiente para modificar la expresión génica de los marcadores inflamatorios y gliales en ambas retinas. La retina cuyo nervio óptico ha sido

expuesto pero sin aplastamiento presenta una reacción pro-inflamatoria mayor y más precoz que la retina contralateral.

2. La cirugía Sham causa una respuesta inflamatoria y glial en todas las RRSNC así como en ambos CS, donde también se observa un incremento del área ocupada por GFAP.
3. El ApNO, en comparación con los animales Sham, genera una reacción mayor en ambos CS. Sin embargo, el ApNO no modifica de forma sustancial la respuesta apoptótica, glial o inflamatoria ya inducida por la cirugía Sham en las RRSNC.
4. La respuesta inflamatoria y glial está presente desde el primer día tras el ApNO en ambas retinas, aunque es más larga y duradera en la retina lesionada. La reacción macroglial ocurre solamente en la retina lesionada mientras que la respuesta microglial se encuentra en ambas. Los marcadores de gliosis vuelven a valores similares al Sham a los 30 días en ambas retinas pero la respuesta pro-inflamatoria persiste en la retina lesionada.
5. El ApNO genera una respuesta mayor en el CSc: se observa una intensa activación microglial junto con una respuesta pro-inflamatoria que conduce a la apoptosis.
6. La respuesta glial e inflamatoria en la vía visual (retina y CS) ocurre en relación a la conexión entre las CGR axotomizadas y ambas retinas o los CS. Fuera de la vía visual (RRSNC), la reacción es más global y podría seguir un gradiente en relación a su disposición anatómica y la lesión.
7. El hipocampo muestra una mayor susceptibilidad inflamatoria a la cirugía Sham y al ApNO que otras RRSNC.
8. Para el análisis experimental de cualquier tejido del SNC donde sea de interés aislar la respuesta del ApNO, o cualquier otra lesión, del efecto de la cirugía en sí, se debería usar un animal Sham como control.

### INTRODUCTION

Direct focal injury to the Central Nervous System (CNS) results in neuronal death and triggers a glial response aimed at reducing damaging and controlling further neuronal death, leading to an inflammatory environment. Systemic insults, such as a surgical procedures, can also elicit a systemic inflammatory response that reaches the CNS. The retinas and optic nerves are relatively easy accessible elements of the CNS and have been extensively studied in our laboratory. Axotomy through unilateral intraorbital optic nerve crush (ONC) is a model for induced neurodegeneration, which in turn induces an inflammatory response.

ONC in mice causes apoptotic death of retinal ganglion cell (RGC) in two distinct phases regardless of the physical distance between the crush site and the optic nerve head: during the first 9-14 days, 85% of RGCs are lost, followed by a slow decline resulting in approximately 1.5% of the original population surviving by day 90. In the contralateral retina, ONC causes to a consistent loss of 15% of RGCs, temporally modulated by distance of ONC: the closer the injury is performed to uninjured eye, the earlier the degeneration appears. Additionally, ONC triggers bilateral micro and macroglial reactivation in both retinas, which is more pronounced, starts earlier and lasts longer in the injured retina.

ONC induces anterograde neurodegeneration and dysfunction of hematoencephalic barrier along the visual pathway. However, limited research has been conducted on the extent of inflammation in retino-recipient regions such as the Superior Colliculi (SCi) or remote regions of CNS (RRCNS), outside the visual pathway. Studying the reactivation of glial cells as well as the profile of pro- or anti-inflammatory and apoptosis markers can provide insights into the mechanisms involved in the spread of inflammatory response.

### OBJECTIVES

The general objectives of this thesis are as follows:

1. To investigate gene expression in the inflammatory response after ONC in the both injured and contralateral fellow retina.
2. To examine gene expression in the inflammatory response in some ipsi- and contralateral CNS regions to ONC: SCi, main projection area of RGCs in mice, and RRCNS (hippocampus -H-, olfactory bulb -OB-, cerebellum -CE- and spinal cord -SC-) located at different distances from the lesion.
3. To analyse histologically glial response in three representative ipsi- and contralateral CNS regions to ONC: SCi and some RRCNS (H and OB).

## MATERIAL AND METHODS

The left optic nerves of adult pigmented C57BL/6 male mice were crushed (ONC) at 0.5 mm from the optic disk or underwent surgery without crushing (Sham). One group of intact mice was used as controls. Two studies were carried out:

- Molecular study: At 1,3,9 or 30 days after ONC or Sham-surgery (dpl) both retinas, SCi or RRCNS were freshly dissected and their RNA extracted. Using qPCR we measured the expression levels of *Tgf-β1*, *Il-1β*, *Tnf-α*, *Iba1*, *Gfap*, *Mhc II* and *Tspo* in retinas and in the rest of CNS regions under study. In SCi, H, OB, CE and SC extracts we also analysed *Caspase-3*, *Cxcr1*, *Lcn2*, *Il-6*, *Cd206*, *Il-4* and *Aq4*. We classified genes in apoptosis (*Caspase-3*), pro-inflammatory (*Cxcr1*, *Il-1*, *Il-1β*, *Lcn2*, *Tnf-α*, *Il-6*), anti-inflammatory (*Cd206*, *Il-4*, *Tgf-β1*) and gliosis markers (*Aq4*, *Gfap*, *Iba1*, *Mhc II*, *Tspo*). *Hptr* and *Gapdh* were used as housekeeping genes.
- Anatomopathological study: Immunodetection of microglia (CMi) and macroglial (CMA) cells was performed in sagittal brain sections at 3,9 or 30 dpl. The area occupied by GFAP and MHC II signals, as well as the density of *Iba1*<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> cells were quantified in both SCi and selected RRCNS (H and OB).

We analysed the response in mice with ONC compared to intact or Sham animals, ipsi- (i) vs. contralateral (c) regions to lesion and at different survival intervals.

## RESULTS

In the retina, Sham surgery alone induced modifications in glial and inflammatory gene expression in both retinas compared to intact animals. Therefore, in order to isolate the specific effect of ONC, we compared the response ONC vs. Sham. After ONC, the expression of *Tnf-α* was upregulated early in both retinas and *Tgf-β1* exhibited overexpression first in the contralateral retina and subsequently in the injured retina. Overexpression of *Gfap* was exclusively observed in the injured retina, whereas *Iba1*, *Mhc II* and *Tspo* showed overexpression in both eyes. The glial response in the ONC group was similar to Sham animals at 30 dpl, but there was an upregulation of *Il-1β* in the injured retina, and *Tspo* overexpression remained in both retinas.

*Iba1*<sup>+</sup> cells showed a low expression of CD68, and cell density was similar in SCi (357±23 cel/mm<sup>2</sup>), H (310±54 cel/ mm<sup>2</sup>) and OB (351±31 cel/mm<sup>2</sup>) in intact mice. MHC II was not detected in glial cells, except in the OB.

Sham surgery caused an inflammatory and glial response in the rest of the CNS regions which is not markedly altered by crushing (except in SCi). There was a general increase of *Iba1*<sup>+</sup> cell density or *Iba1* expression, but no histological changes in glial cells. Additionally,

there was an upregulation of pro-inflammatory markers (especially, *Cxcr1*) and overexpression of *Caspase-3*. The signs of glial reactivation (*Tspo* or *Mhc II* upregulation) were presented just in ipsilateral regions (i-OB, i-hemiCE, i-SC), where the pro-inflammatory reaction was also stronger, and response in SC was delayed and less pronounced compared to other RRCNS. However, ONC contributed to the prolongation of the inflammatory response, persisting until at least 30 dpl.

In SCi, anatomical reactivation of microglia (characterized by rounded somas and CD68 expression) was observed in the cSCi from 3 dpl onward after ONC, accompanied by significant overexpression of *Caspase-3*. In the iSCi after ONC, or in both SCi in Sham animals, CMi did not show signs of activation. *Gfap* showed overexpression, and astrocytes hypertrophied in both SCi from day 9 after ONC, although CMa response was also observed in Sham animals. Furthermore, Sham mice displayed changes in the gene expression of glial and inflammatory markers, as described in the retina. Therefore, when comparing ONC vs. Sham animals, although *Cxcr1* was upregulated in both SCi at 1 dpl, *Tspo* and *Mhc II* overexpression was exclusive to the cSC, and the pro-inflammatory response and upregulation of *Caspase-3* were more pronounced and sustained in the cSC.

In the H, CMi exhibited greater susceptibility to damage compared to other RRCNS. Sham animals showed a significant increase of number of CMi  $> 20 \text{ mm}^2$  without *Tspo/Mhc II* overexpression, which was not observed in the other brain regions. ONC induced a response with a similar pattern but of lower intensity than what was observed in the SCi: *Iba1* overexpression or increased *Iba1*<sup>+</sup> cell density occurred in both H, with pro-inflammatory response persisting in cH at 30dpl. However, there were no histological changes and CMa or *Caspase-3* remained similar to that of Sham animals.

## CONCLUSIONS

1. Sham surgery alone is sufficient to modify the gene expression of inflammatory and glial markers in both retinas. The retina of the exposed optic nerve without crushing exhibits an earlier and more pronounced pro-inflammatory response compared to the contralateral fellow retina.
2. Sham surgery induces a molecular inflammatory and glial response in all RRCNS as well as both SCi, where an increase in the area occupied by GFAP is also observed.
3. ONC, in comparison to Sham surgery, elicits a heightened response in both SCi. However, ONC does not markedly alter the apoptosis, glial or inflammatory reactions already induced by Sham surgery in RRCNS.
4. The inflammatory and glial response becomes evident in both retinas from the first day after ONC, although it persists for a longer duration in the injured retina. The macroglial reaction is exclusive to the injured retina, while the microglial response occurs in both retinas. Gliosis markers return to levels similar to those of Sham

animals at 30 dpl in both retinas, but the pro-inflammatory response continues in the injured retina.

5. ONC elicits a more pronounced response in the cSCI, including microglial reactivation and a pro-inflammatory response that leads to apoptosis.
6. The glial and inflammatory response in the visual pathway (retina and SCi) happens in relation to the connection between axotomized RGC and both retinas or the retino-recipient SCi. Outside the visual pathway (RRCNS), the reaction is more widespread and may follow a gradient depending on the anatomical distance to the lesion.
7. The H exhibits a higher susceptibility to inflammatory changes caused by both Sham surgery and ONC compared to other RRCNS.
8. In the experimental analysis of any CNS tissue where isolating the response of ApNO or any other lesion from the effect of the surgery itself is of interest, a Sham control should be used.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ApNO: Aplastamiento del Nervio Óptico/ONC: Optic Nerve Crush	DEM: Desviación Estándar de la Media
AQ4: Aquoporina 4	dpl: days post-lesion
BHE: Barrera Hematoencefálica	GFAP: Glicoproteína Fibrilar Ácida
BO: Bulbo Olfatorio	h: hemi-
c: contralateral	H: Hipocampo
CA: Cuerno de Amón	i: ipsilateral
CCG: Capa de Células Ganglionares	Iba1: Proteína transmembrana adaptadora de unión de calcio ionizada
CD206: Receptor de manosa de los macrófagos tipo C	IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 $\beta$
CD68: Cluster of Differentiation 68	IL-4: Interleuquina 4
CE: Cerebelo	IL-6: Interleuquina 6
CFNR: Capa de Fibras Nerviosas de la Retina	Lcn2: Lipocalin-2
CGR: Células Ganglionares de la Retina/RGC: Retinal Ganglion Cells	ME: Médula Espinal
CMA: Células de la Macroglía	MHC II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad II
CMi: Células de la Microglía	NGdL: Núcleo Geniculado Dorsolateral
CNS: Central Nervous System/SNC: Sistema Nervioso Central	NO: Nervio Óptico
CS: Colículo Superior/SCi: Superior Colliculus	OHT: Hipertensión Ocular Unilateral
CXCR1: C-X-C Motif Chemokine Receptor 1	qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
	RRCNS: Remote regions of Central Nervous System/RRSNC: Regiones Remotas del Sistema Nervioso Central



SNO: Sección del Nervo Óptico

TFG- $\beta$ 1: Factor de crecimiento transformante beta 1 (Transforming growth factor beta 1)

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor necrosis factor alpha)

TSPO: Proteína translocadora de la mitocondria

## LISTA DE ILUSTRACIONES

### Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema del SNC de los vertebrados. ....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo de la neurona. ....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema de las células principales células de la glía en relación con neuronas. 4	
<b>Figura 4.</b> Estadios de las células de la microglía.....	5
<b>Figura 5.</b> Colículo superior en un esquema de un corte sagital del cerebro de ratón....	8
<b>Figura 6.</b> Esquema de la organización retinotópica y laminar del CS del ratón.....	9
<b>Figura 7.</b> Principales tipos de neuronas en el CS según su morfología. ....	10
<b>Figura 8.</b> Esquema de la región hipocampal.. ....	12
<b>Figura 9.</b> Esquema del bulbo olfatorio y corte histológico coronal teñido de cerebro de ratón.....	14
<b>Figura 10.</b> Diagrama de las proyecciones principales del bulbo olfatorio principal y accesorio.....	15
<b>Figura 11.</b> Cerebelo de ratón.....	16
<b>Figura 12.</b> Dibujo representativo de la citoarquitectura del cerebelo de ratón. ....	17
<b>Figura 13.</b> Fotografía de encéfalo y médula espinal de ratón C57BL/6 expuestos. 18	
<b>Figura 14.</b> Sección transversal de un segmento de medula cervical de ratón.....	19
<b>Figura 15.</b> Esquema de las conexiones interhemisféricas. ....	20
<b>Figura 16.</b> Corte de cerebro de ratón representativo de las regiones de estudio. ..	21
<b>Figura 17.</b> Sistema visual humano. ....	22
<b>Figura 18.</b> Esquema de la retina de vertebrados realizado por Santiago Ramón y Cajal.....	23
<b>Figura 19.</b> Esquema de la organización laminar de la retina y sus principales tipos celulares.....	24
<b>Figura 20.</b> Células ganglionares de la retina ortotópicas y desplazadas.....	26
<b>Figura 21.</b> Esquema de la vía visual del ratón.....	28
<b>Figura 22.</b> Esquema representativo de las CGR retino-retinianas.....	29

<b>Figura 23.</b>	<b>Sección de retina humana teñida con anticuerpos contra la proteína fijadora de retinaldehído celular (CRALBP).</b>	<b>30</b>
<b>Figura 24.</b>	<b>Imagen de microscopía confococal de astrocito de la retina de ratón.</b>	<b>30</b>
<b>30 Figura 25.</b>	<b>Imagen de microscopía confococal de células de la microglía de la retina de ratón.</b>	<b>31</b>
<b>Figura 26.</b>	<b>Curso de muerte de las CGR tras una sección del nervio óptico en rata a diferentes distancias de la papila.</b>	<b>33</b>
<b>Figura 27.</b>	<b>Curso temporal de muerte de CGR de la retina lesionada tras sección del NO (SNO) y ApNO en ratón.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 28.</b>	<b>Curso temporal de muerte de CGR de la retina contralateral tras el ApNO a 2 o 0,5 mm del ojo ipsilateral a la lesión.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 29.</b>	<b>Barreras celulares en la superficie del SNC.</b>	<b>41</b>
<b>Figura 30.</b>	<b>Esquema de la barrera hematoencefálica.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 31.</b>	<b>Esquema de la barrera hematoliquoral.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 32.</b>	<b>Esquema de la barrera meníngea.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 33.</b>	<b>Esquema de la barrera hematorretiniana.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 34.</b>	<b>Permeabilidad de la BHE tras la sección del nervio óptico.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 35.</b>	<b>Expresión de Aq4 tras el ApNO.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 36.</b>	<b>Esquema de la señalización de IL-6.</b>	<b>58</b>
<b>Figura 37.</b>	<b>Polarización de la microglía en la inflamación en el SNC.</b>	<b>61</b>
<b>Figura 38.</b>	<b>Esquema del diseño experimental para el estudio molecular.</b>	<b>68</b>
<b>Figura 39.</b>	<b>Esquema del diseño experimental para el estudio anatomopatológico.</b>	<b>69</b>
<b>Figura 40.</b>	<b>Encéfalo de ratón seccionado en dos mitades a través del eje sagital mayor.</b>	<b>76</b>
<b>Figura 41.</b>	<b>Imagen representativa del estudio de microglía por inmunohistofluorescencia.</b>	<b>78</b>
<b>Figura 42.</b>	<b>Imagen representativa del estudio de la macroglía por inmunohistofluorescencia.</b>	<b>79</b>
<b>Figura 43.</b>	<b>Proceso de cuantificación de células Iba1<sup>+</sup> en un hipocampo de un ratón intacto con Fiji®.</b>	<b>82</b>
<b>Figura 44.</b>	<b>Ejemplo del proceso de cuantificación de la distribución por área celular de células Iba1<sup>+</sup> en una sección estudiada con Fiji®.</b>	<b>83</b>

<b>Figura 45.</b>	<b>Proceso para la cuantificación del área ocupada por GFAP con Fiji®. .</b>	<b>85</b>
<b>Figura 46.</b>	<b>Esquema de le estructura para el análisis de la expresión génica en cada tejido.....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 47.</b>	<b>Expresión de los marcadores inflamatorios por qPCR en la retina lesionada y contralateral. ....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 48.</b>	<b>Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en la retina lesionada y contralateral.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 49.</b>	<b>Resumen del curso de la expresión de los marcadores estudiados tras el ApNO en relación a la muerte de CGR y la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup>. ....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 50.</b>	<b>Expresión de los marcadores pro-inflamatorios y de apoptosis por qPCR en el CS contra- e ipsilateral al ApNO.....</b>	<b>104</b>
<b>Figura 51.</b>	<b>Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en el CS contra- e ipsilateral al ApNO. ....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 52.</b>	<b>Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en el CS contra- e ipsilateral al ApNO. ....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 53.</b>	<b>Expresión de los de los marcadores pro-inflamatorios y de apoptosis por qPCR en el hipocampo contra- e ipsilateral al ApNO.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 54.</b>	<b>Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en el hipocampo contra- e ipsilateral al ApNO.....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 55.</b>	<b>Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en el hipocampo contra- e ipsilateral al ApNO. ....</b>	<b>112</b>
<b>Figura 56.</b>	<b>Expresión de los marcadores pro-inflamatorios por qPCR en el BO contra- e ipsilateral al ApNO. ....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 57.</b>	<b>Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en el BO contra- e ipsilateral al ApNO. ....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 58.</b>	<b>Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en el BO contra- e ipsilateral al ApNO. ....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 59.</b>	<b>Expresión de los marcadores pro-inflamatorios y de apoptosis por qPCR en el hemicerebelo contra- e ipsilateral al ApNO.....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 60.</b>	<b>Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en el hemicerebelo contra- e ipsilateral al ApNO.....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 61.</b>	<b>Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en el hemicerebelo contra- e ipsilateral al ApNO. ....</b>	<b>123</b>

<b>Figura 62.</b>	<b>Expresión de los marcadores pro-inflamatorios y de apoptosis por qPCR en la hemimédula contra- e ipsilateral al ApNO.....</b>	<b>126</b>
<b>Figura 63.</b>	<b>Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en la hemimédula contra- e ipsilateral al ApNO.....</b>	<b>127</b>
<b>Figura 64.</b>	<b>Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en la hemimédula contra- e ipsilateral al ApNO.....</b>	<b>128</b>
<b>Figura 65.</b>	<b>Inmunodetección de CMi en una sección sagital de colículo superior de un ratón C57BL/6 intacto. ....</b>	<b>131</b>
<b>Figura 66.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>133</b>
<b>Figura 67.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>134</b>
<b>Figura 68.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>135</b>
<b>Figura 69.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>137</b>
<b>Figura 70.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>138</b>
<b>Figura 71.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>139</b>
<b>Figura 72.</b>	<b>Porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> en el colículo superior de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO. ....</b>	<b>142</b>
<b>Figura 73.</b>	<b>Estudio del área de las CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO o Sham. ....</b>	<b>144</b>
<b>Figura 74.</b>	<b>Figura resumen de la respuesta de las CMi Iba1<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> en el CS contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 75.</b>	<b>Inmunodetección de CMi en una sección sagital de hipocampo de un ratón C57BL/6 intacto. ....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 76.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>149</b>
<b>Figura 77.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>150</b>
<b>Figura 78.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....</b>	<b>151</b>

<b>Figura 79.</b>	Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	153
<b>Figura 80.</b>	Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	154
<b>Figura 81.</b>	Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	155
<b>Figura 82.</b>	Porcentaje de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el hipocampo de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO. ....	158
<b>Figura 83.</b>	Estudio del área de las CMi Iba1 <sup>+</sup> en el hipocampo de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO o Sham. ....	160
<b>Figura 84.</b>	Figura resumen de la respuesta de las CMi Iba1 <sup>+</sup> CD68 <sup>+</sup> en el hipocampo contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días. ....	161
<b>Figura 85.</b>	Inmunodetección de CMi en una sección sagital de bulbo olfatorio de un ratón C57BL/6 intacto. ....	163
<b>Figura 86.</b>	Secciones sagitales de un BO intacto y de BO contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO.....	165
<b>Figura 87.</b>	Secciones sagitales de un BO intacto y de BO contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO.....	166
<b>Figura 88.</b>	Secciones sagitales de un BO intacto y de BO contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO.....	167
<b>Figura 89.</b>	Secciones sagitales de un BO intacto y de BO ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	169
<b>Figura 90.</b>	Secciones sagitales de un BO intacto y de BO ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	170
<b>Figura 91.</b>	Secciones sagitales de un BO intacto y de BO ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	171
<b>Figura 92.</b>	Porcentaje de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el BO de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO.....	174
<b>Figura 93.</b>	Estudio del área de las CMi Iba1 <sup>+</sup> en el bulbo olfatorio de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO o Sham.....	175
<b>Figura 94.</b>	Figura resumen de la respuesta de las CMi Iba1 <sup>+</sup> CD68 <sup>+</sup> en el bulbo olfatorio contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días. ....	176
<b>Figura 95.</b>	Inmunodetección de CMA en una sección sagital de colículo superior de un ratón C57BL/6 intacto. ....	178

<b>Figura 96.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>180</b>
<b>Figura 97.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>181</b>
<b>Figura 98.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>182</b>
<b>Figura 99.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>184</b>
<b>Figura 100.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>185</b>
<b>Figura 101.</b>	<b>Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>186</b>
<b>Figura 102.</b>	<b>Porcentaje de área ocupada por GFAP en el CS de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO.</b>	<b>189</b>
<b>Figura 103.</b>	<b>Figura resumen de la respuesta de las CMa GFAP<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> en el CS contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.</b>	<b>190</b>
<b>Figura 104.</b>	<b>Inmunodetección de CMa en una sección sagital de hipocampo de un ratón C57BL/6 intacto.</b>	<b>191</b>
<b>Figura 105.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>193</b>
<b>Figura 106.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>194</b>
<b>Figura 107.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>195</b>
<b>Figura 108.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>197</b>
<b>Figura 109.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>198</b>
<b>Figura 110.</b>	<b>Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO.</b>	<b>199</b>
<b>Figura 111.</b>	<b>Porcentaje de área ocupada por GFAP en el hipocampo de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO.</b>	<b>202</b>
<b>Figura 112.</b>	<b>Figura resumen de la respuesta de las CMa GFAP<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> en el hipocampo contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.</b>	<b>203</b>

<b>Figura 113.</b> Inmunodetección de CMA en una sección sagital de bulbo olfatorio de un ratón C57BL/6 intacto. ....	204
<b>Figura 114.</b> Secciones sagitales de BO contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	206
<b>Figura 115.</b> Secciones sagitales de BO contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	207
<b>Figura 116.</b> Secciones sagitales de BO contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	208
<b>Figura 117.</b> Secciones sagitales de BO ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	210
<b>Figura 118.</b> Secciones sagitales de BO ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	211
<b>Figura 119.</b> Secciones sagitales de BO ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. ....	212
<b>Figura 120.</b> Porcentaje de área ocupada por GFAP en el BO de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO. ....	215
<b>Figura 121.</b> Figura resumen de la respuesta de las CMA GFAP <sup>+</sup> MHC II <sup>+</sup> en el bulbo olfatorio contra e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días. ....	216

#### Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Resumen de respuesta de retina lesionada y contralateral al ApNO. ....	37
<b>Tabla 2.</b> Características de los cambios disruptivo y no disruptivo de la BHE. ....	47
<b>Tabla 3.</b> Secciones de hemiencéfalo usadas para el estudio de la la reacción micro o macroglial tras el ApNO en las regiones cerebrales de interés. ....	69
<b>Tabla 4.</b> Primers utilizados de los genes de interés para qPCR. ....	74
<b>Tabla 5.</b> Listado de anticuerpos usados en la inmunohistofluorescencia. ....	80
<b>Tabla 6.</b> Preguntas a responder, revisión de la literatura y metodología usada. ....	89
<b>Tabla 7.</b> Marcadores estudiados para el estudio de neuroinflamación. ....	89
<b>Tabla 8.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en la retina Sham y la contralateral al ApNO respecto a la retina intacta a los días 1, 3, 9 ó 30 del ApNO. ....	94
<b>Tabla 9.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en la retina lesionada y la contralateral al ApNO respecto a sus correspondientes Sham a los días 1, 3, 9 ó 30 del ApNO. ....	98



<b>Tabla 10.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en el CS contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días.....	102
<b>Tabla 11.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en el CS contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. ....	103
<b>Tabla 12.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en el H contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días.....	108
<b>Tabla 13.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en el H contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. ....	109
<b>Tabla 14.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en el BO contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días.....	114
<b>Tabla 15.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en el BO contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. ....	115
<b>Tabla 16.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en el hemicerebelo contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días.....	119
<b>Tabla 17.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en el hemicerebelo contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días.....	120
<b>Tabla 18.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en la hemimédula contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días.....	125
<b>Tabla 19.</b> Resumen de la expresión de los genes estudiados en la hemimédula contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. ....	125
<b>Tabla 20.</b> Densidad media (cel/mm <sup>2</sup> ) ± DEM (desviación estándar de la media) de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el CS de animales intactos en ambos hemisferios y la media ± DEM entre ambos.....	130
<b>Tabla 21.</b> Densidad media ± DEM de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el CS contralateral al ApNO con sus respectivos Sham.....	132
<b>Tabla 22.</b> Densidad media ± DEM de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el CS ipsilateral al ApNO con sus respectivos Sham.....	136
<b>Tabla 23.</b> Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1 <sup>+</sup> en el CS contralateral en relación al CS intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.....	140
<b>Tabla 24.</b> Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1 <sup>+</sup> en el CS ipsilateral en relación al CS intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.....	141

<b>Tabla 25.</b> Variación relativa en porcentajes de la densidad de la microglía en el CS en relación al CS Sham ipsilateral o contralateral correspondiente.....	141
<b>Tabla 26.</b> Densidad media $\pm$ DEM de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el hipocampo de animales intactos en ambos hemisferios y la media $\pm$ DEM entre ambos. ....	146
<b>Tabla 27.</b> Densidad media $\pm$ DEM de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el hipocampo contralateral al ApNO con sus respectivos Sham.....	148
<b>Tabla 28.</b> Densidad media $\pm$ DEM de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el hipocampo ipsilateral al ApNO con sus respectivos Sham.....	152
<b>Tabla 29.</b> Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1 <sup>+</sup> en el hipocampo contralateral en relación al hipocampo intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. ....	156
<b>Tabla 30.</b> Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1 <sup>+</sup> en el hipocampo ipsilateral en relación al hipocampo intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.....	157
<b>Tabla 31.</b> Variación relativa en porcentajes de la densidad de la CMi Iba1 <sup>+</sup> en el hipocampo en relación al hipocampo Sham ipsilateral o contralateral. ....	157
<b>Tabla 32.</b> Densidad media $\pm$ DEM de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el BO de animales intactos en ambos hemisferios y la media $\pm$ DEM entre ambos. ....	162
<b>Tabla 33.</b> Densidad media $\pm$ DEM de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el BO contralateral al ApNO con sus respectivos Sham.....	164
<b>Tabla 34.</b> Densidad media $\pm$ DEM de CMi Iba1 <sup>+</sup> en el BO ipsilateral al ApNO con sus respectivos Sham.....	168
<b>Tabla 35.</b> Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1 <sup>+</sup> en el BO contralateral en relación al BO intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.....	172
<b>Tabla 36.</b> Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1 <sup>+</sup> en el BO contralateral en relación al BO intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.....	173
<b>Tabla 37.</b> Variación relativa de la densidad de la CMi Iba1 <sup>+</sup> en porcentaje en el BO en relación al BO Sham ipsi- o contralateral.....	173
<b>Tabla 38.</b> Área $\pm$ DEM ocupada por GFAP en el CS contralateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto. ....	179
<b>Tabla 39.</b> Área $\pm$ DEM ocupada por GFAP en el CS ipsilateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto.....	183

<b>Tabla 40.</b> Porcentaje de área ocupada por GFAP en el CS contralateral en relación al colículo superior intacto .....	187
<b>Tabla 41.</b> Porcentaje de área ocupada por GFAP en el CS ipsilateral en relación al colículo superior intacto. ....	188
<b>Tabla 42.</b> Variación relativa del área ocupada por GFAP del CS en relación al CS Sham ipsilateral o contralateral.....	188
<b>Tabla 43.</b> Área $\pm$ DEM ocupada por GFAP en el hipocampo contralateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto. ....	192
<b>Tabla 44.</b> Área $\pm$ DEM ocupada por GFAP en el hipocampo ipsilateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto. ....	196
<b>Tabla 45.</b> Porcentaje de área ocupada por GFAP en el hipocampo contralateral en relación al hipocampo intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.. ....	200
<b>Tabla 46.</b> Porcentaje de área ocupada por GFAP en el hipocampo ipsilateral en relación al hipocampo intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.. ....	201
<b>Tabla 47.</b> Variación relativa del área ocupada por GFAP del hipocampo en relación al hipocampo Sham ipsilateral o contralateral. ....	201
<b>Tabla 48.</b> Área $\pm$ DEM ocupada por GFAP en el BO contralateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto. ....	205
<b>Tabla 49.</b> Área $\pm$ DEM ocupada por GFAP en el BO ipsilateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto.....	209
<b>Tabla 50.</b> Porcentaje de área ocupada por GFAP en el BO contralateral en relación al colículo superior intacto a los distintos tiempos tras la lesión.....	213
<b>Tabla 51.</b> Porcentaje de área ocupada por GFAP en el BO ipsilateral en relación al colículo superior intacto. ....	214
<b>Tabla 52.</b> Variación relativa del área ocupada por GFAP del CS en relación al BO Sham ipsilateral o contralateral.....	214
<b>Tabla 53.</b> Tabla resumen de los resultados del estudio anatómico y molecular de las regiones estudiadas en el SNC.....	231

## ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

En esta tesis se distinguen siete partes: **introducción, hipótesis y objetivos, material y métodos, resultados, discusión, conclusiones y bibliografía.**

El **capítulo 1** es la **introducción** y consta de varios apartados. En primer lugar, se repasan los conceptos anatómicos y fisiológicos básicos del SNC. Dentro de este apartado, se describen las regiones que se han usado para el estudio realizado en esta tesis. Además, se exponen brevemente las conexiones interhemisféricas cerebrales. A continuación, se revisa el sistema visual del roedor y el aplastamiento del nervio óptico (ApNO) como modelo de degeneración del SNC. En el siguiente apartado, se da una visión general de la barrera hematoencefálica. Finalmente, se detallan los marcadores usados para el estudio de la respuesta glial, inflamatoria y apoptosis, y de la evidencia sobre su utilización para estudiar el ApNO.

En un **capítulo 2**, se exponen la **hipótesis y los objetivos** generales y específicos de esta tesis. El **capítulo 3** se dedica a **Material y Métodos**. Se expone el modelo animal usado para la axotomía del nervio óptico; el diseño experimental; y las metodologías usadas para la extracción de ARNm y posterior PCRc, así como para la disección de muestras para el estudio histológico cerebral por inmunohistofluorescencia y los métodos de análisis de imagen empleados. Además, se especifican las comparaciones realizadas para el análisis de los resultados en relación a los objetivos planteados.

En el **capítulo 4** se exponen los **resultados**. Este capítulo está dividido en dos bloques: el estudio molecular y el estudio histológico. En la primera parte, se expone el análisis de la expresión génica de marcadores inflamatorios y gliales en la retina, y se realiza una correlación con la muerte de las CGR y la activación microglial. A continuación, se amplía el análisis de la expresión génica en el colículo superior (CS), como principal área de proyección de las CGR, y fuera de la vía visual, en regiones remotas del SNC (hipocampo, bulbo olfatorio, médula y cerebelo). En la segunda parte, se estudia por inmunohistofluorescencia la respuesta micro y macroglial en el CS, hipocampo y bulbo olfatorio.

El **capítulo 5** desarrolla la **discusión**. Para facilitar la comprensión, la discusión de los resultados se ha llevado a cabo en relación a los objetivos específicos de esta tesis y el análisis crítico de los mismos con la literatura existente.

En el **capítulo 6**, se enumeran las principales **conclusiones** del trabajo. En el **capítulo 7**, la **bibliografía**, se incluyen las referencias de los trabajos citados en esta tesis.

## HALLAZGOS ORIGINALES

---

La realización de esta Tesis Doctoral nos ha permitido documentar los siguientes hallazgos:

- La cirugía Sham fue suficiente para modificar la expresión génica de todos los marcadores inflamatorios y gliales en las retinas junto con *Caspasa-3* como marcador de apoptosis en el resto de las regiones estudiadas del SNC (colículo superior, hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y médula espinal), al menos durante los 30 días posteriores al procedimiento. La retina cuyo nervio óptico fue expuesto pero no aplastado presentó una reacción pro-inflamatoria más precoz y mayor que la contralateral. En el resto del SNC, aunque hubo un incremento generalizado de densidad de células Iba1<sup>+</sup> o sobreexpresión de *Iba1*, no se detectaron cambios morfológicos en la microglía por inmunohistofluorescencia. Sin embargo, los astrocitos se hipertrofiaron en ambos colículos superiores, dando lugar a un aumento del área ocupada por GFAP, si bien *Gfap* se sobreexpresó también de forma global.
- Este “efecto Sham” apoya el uso de un control experimental Sham cuando interese aislar la respuesta a la lesión del procedimiento quirúrgico, sobre todo en el análisis de expresión génica o en el estudio de la macroglía.
- El aplastamiento del nervio óptico no cambia de forma sustancial la reacción apoptótica, glial o inflamatoria ya obtenida por la cirugía Sham en regiones del SNC fuera de la vía visual, lo que induce a concluir que: la cirugía per se contribuye a la respuesta; y que la mayor reacción en la vía visual (retina lesionada, contralateral y colículos superiores) ocurre en relación a la desaferentización tras la axotomía de las CGR en la retina lesionada, contralateral y los colículos superiores.
- Aunque había datos en otros modelos de axotomía (sección del nervio óptico o hipertensión ocular), en este trabajo se caracteriza por primera vez el cambio morfológico de la microglía en el colículo superior, mostrando células redondeadas con capacidad fagocítica CD68<sup>+</sup> hasta los 30 días tras el ApNO, y se amplía la caracterización de la respuesta molecular en el SNC.

**Artículos**

- **José María Cabrera-Maqueda, Raquel Boia, Fernando Lucas-Ruiz, María José González-Riquelme, António Francisco Ambrósio, Ana Raquel Santiago, Manuel Vidal-Sanz, Marta Agudo-Barriuso, Caridad Galindo-Romero. Neuroinflammation and gliosis in the injured and contralateral retinas after unilateral optic nerve crush. Enviado 22/12/2022: *Experimental Eye Research*. En revisión.**
- **María José González-Riquelme, Caridad Galindo-Romero, Fernando Lucas-Ruiz, Marina Martínez-Carmona, Kristy T Rodríguez-Ramírez, José María Cabrera-Maqueda, María Norte-Muñoz, Manuel Vidal-Sanz, Marta Agudo-Barriuso. Axonal Injuries Cast Long Shadows: Long Term Glial Activation in Injured and Contralateral Retinas after Unilateral Axotomy. *Int J Mol Sci* 2021;22(16):8517.**

**Comunicaciones a congresos**

- Comunicación oral: **José María Cabrera-Maqueda, Caridad Galindo-Romero, Fernando Lucas-Ruiz, Raquel Boia, Manuel Vidal-Sanz, Marta Agudo-Barriuso. Brain inflammatory response after an unilateral optic nerve damage in brain. *VII International Congress of research in retina and vision*, 24 al 26 de Junio de 2021, Murcia, España.**
- Comunicación oral: **Caridad Galindo-Romero, José María Cabrera-Maqueda, María José González-Riquelme, Raquel Boia, Fernando Lucas-Ruiz, Ana Raquel Santiago, Manuel Vidal-Sanz, Marta Agudo-Barriuso. Glial response in the injured and contralateral retinas after unilateral optic nerve crush. *Optic nerve Meeting*, 13 al 15 de Diciembre de 2022, Obergurgl, Austria.**
- Simposium: **José María Cabrera-Maqueda, Raquel Boia, Fernando Lucas-Ruiz, María José González-Riquelme, António Francisco Ambrósio, Ana Raquel Santiago, Manuel Vidal-Sanz, Marta Agudo-Barriuso, Caridad Galindo-Romero. Inflammatory response of both retinas and superior colliculi to unilateral optic nerve axotomy. *26<sup>th</sup> EVER Congress*, 26 al 28 de Octubre, Valencia, España. Abstract aceptado.**

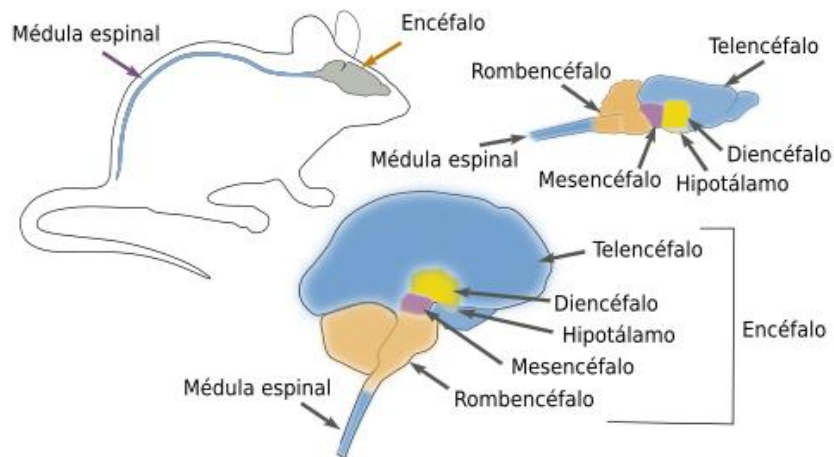
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados se considera constituido por el encéfalo (coloquialmente llamado cerebro), la médula espinal, ambos nervios ópticos y la retina.

Basándonos en el desarrollo embriológico del SNC de los vertebrados, diferenciamos las siguientes estructuras que según el desarrollo evolutivo de cada especie, podemos encontrar adaptadas (**Figura 1**). La médula espinal presenta una organización relativamente homogénea en toda su extensión. El encéfalo, de rostral a caudal, se divide en prosencéfalo, mesencéfalo y romboencéfalo:

- El **proencéfalo**, a su vez, se divide en una porción más rostral formada por el telencéfalo y por los hipotálamos, y una porción caudal o diencefalo. El telencéfalo está constituido por los hemisferios cerebrales, los núcleos basales y el bulbo olfatorio. El diencefalo engloba al tálamo, hipotálamo, neurohipófisis y glándula pineal.
- El **mesencéfalo**.
- Del **romboencéfalo** deriva en la protuberancia, el bulbo raquídeo y el cerebelo. En los mamíferos, se conoce como tronco del encéfalo al mesencéfalo, protuberancia y bulbo raquídeo.



**Figura 1.** Esquema del SNC de los vertebrados. La imagen muestra las diferentes divisiones del SNC en el cerebro humano y en el de ratón. Imagen tomada de (Megías et al., 2023).

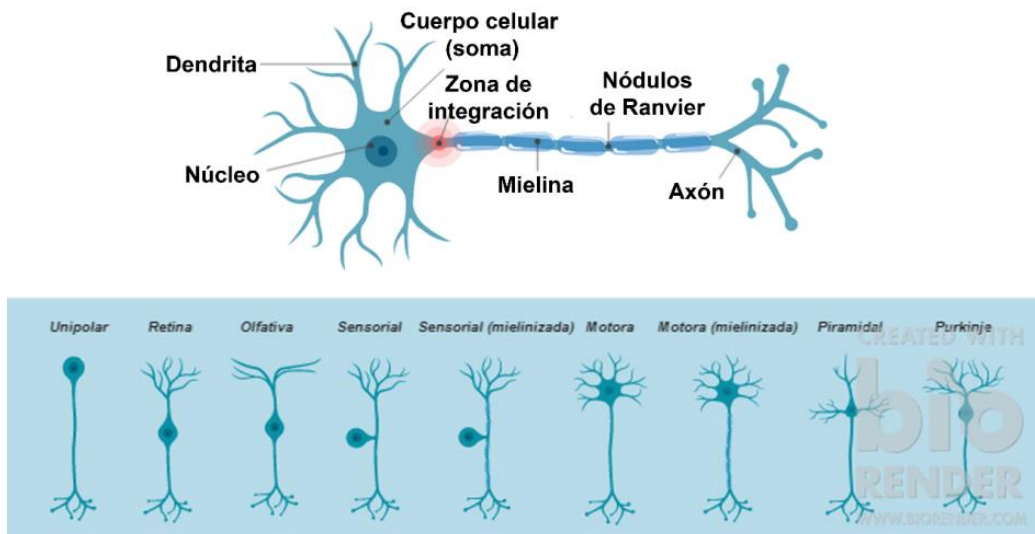
Las principales células del SNC son las neuronas y las células de la glía.



### 1.1.1 NEURONAS

Santiago Ramón y Cajal usando la tinción mejorada de Golgi descubrió que el SNC estaba formado por “entidades individuales”, que luego se llamaron neuronas, que se comunicaban no por continuidad sino por contacto, posteriormente reconocido como sinapsis (Cajal, 1889).

Las neuronas son células derivadas del ectodermo con una alta diferenciación y una morfología particular: se componen de un soma, donde se encuentra el núcleo y la mayoría de las organelas, del que parten numerosas ramificaciones denominadas dendritas; y el axón, cuya función principal es la transmisión del impulso nervioso (**Figura 2**). La transmisión del impulso, a otra neurona o a otro tipo celular, como la célula muscular, se realiza a través del potencial de acción. Para conseguir una transmisión más eficaz, gran parte de los axones y siempre en el SNC, se encuentran revestidos por una vaina de mielina sintetizada por el oligodendrocito. De esta manera, se habla de sustancia gris como aquella rica en somas neuronales y de sustancia blanca como la parte rica en axones y, por tanto, mielina.



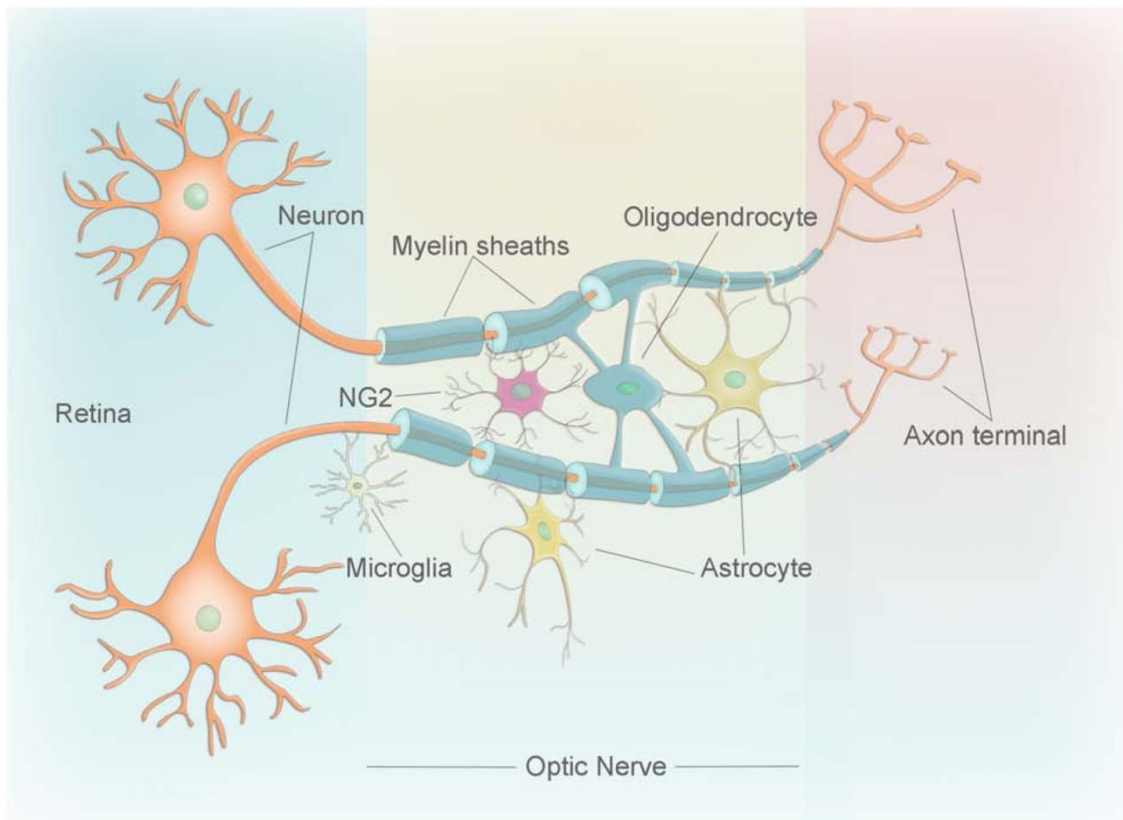
**Figura 2.** Esquema representativo de la neurona. Arriba, esquema de los elementos principales de una neurona. Abajo, ejemplos de algunas neuronas con especialización morfológica característica (por ejemplo, véase en último lugar, las neuronas de Purkinje del cerebelo). Imagen tomada de (Lucas-Ruiz, 2019).

### 1.1.2 CÉLULAS DE LA GLÍA

Rudolf Virchow caracterizó el tejido glial como una especie de pegamento para las neuronas (Virchow, 1846) pero fue Santiago Ramón y Cajal quien las diferenció como otras células

del tejido nervioso (García-Marín et al., 2007; Ramon y Cajal, 1909). La principal diferencia frente a las neuronas es que no producen potenciales de acción. Las células gliales son todas las células del sistema nervioso que no son neuronas ni células endoteliales o sanguíneas, de forma que suponen más del 90% de la población celular (Pelvig et al., 2008). Además de la función de sostén, están implicadas en funciones tróficas o de homeostasis celular, modulación de las sinapsis y tienen un claro papel inmunitario.

En el SNC, las células gliales se pueden diferenciar en células microgliales o microglía (CMi), con un origen mesodérmico, o células de la macroglía (CMA), derivadas del ectodermo como las neuronas. Dentro de la CMA, podemos diferenciar los astrocitos, los oligodendrocitos, la glía positiva a NG2 y los epindemocitos (**Figura 3**).



**Figura 3.** Esquema de las células principales células de la glía en relación con neuronas. La imagen representa las CMi y CMA (astrocitos, oligodendrocitos, glía NG2 - epindemocitos no mostrados-) en relación a las células ganglionares de la retina y sus axones constituyendo el nervio óptico. Imagen tomada de (Yazdankhah et al., 2021).

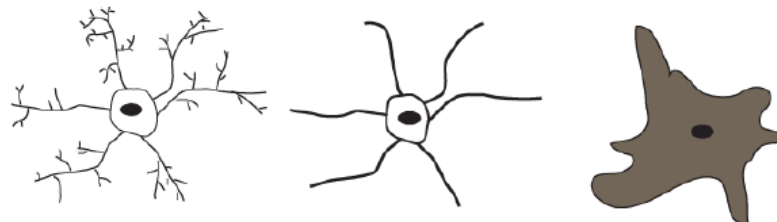
Dado que en esta tesis, además del encéfalo, estudiaremos también la retina, destacaremos que en este tejido no hay epindemocitos pero se observa un tipo de CMA específico, la célula de Müller.

### 1.1.2.1 Microglía

Pío del Río Hortega acuñó el término CMi para diferenciar esta población celular de las neuronas y la CMA y, además, fue el primero en proponer el origen embrionario mesodérmico.

A diferencia de las neuronas y de la CMA, tanto en el ratón como en el humano, la CMi proviene del saco de Yolk: durante la etapa embrionaria, antes de iniciar la hematopoyesis, una población de progenitores mieloides hematopoyéticos invade el SNC para diferenciarse en CMi (Saijo & Glass, 2011). Por su origen y función, se consideran los macrófagos residentes del SNC (Huang et al., 2018).

Su función principal es la de “vigilancia” para detectar estímulos nocivos. De esta manera, cuando las CMi están en estado vigilante, presentan un soma pequeño del que parten varias prolongaciones multiramificadas en movimiento que les permiten cubrir una amplia superficie, entre 15-30  $\mu\text{m}$  (Chen et al., 2002; Madeira et al., 2015; Saijo & Glass, 2011). Cuando detectan un daño, las CMi cambian su morfología a estado activo, pierden sus ramificaciones y adquieren un aspecto ameboide con capacidad fagocítica, presentando una mayor expresión de la glicoproteína transmembrana CD68 (Jonas et al., 2012; Paolicelli et al., 2022; Rojas et al., 2014; Zhou et al., 2017) (**Figura 4**).



**Microglía vigilante**

**Microglía activa**

**Microglía fagocítica**

**Figura 4.** **Estadíos de las células de la microglía.** De izquierda a derecha: microglía en estado vigilante, con soma diferenciado y numerosos procesos multiramificados; microglía activa, con pérdida de procesos; microglía fagocítica, con aspecto ameboide. Imagen tomada y modificada de (Verkhratsky & Butt, 2007).

Aunque puede haber variaciones locorregionales y en función del estímulo (Kettenmann & Verkhratsky, 2011), tradicionalmente se han definido 2 fenotipos de activación para las CMi, M1 y M2. La microglía M1 (activación clásica) se lleva a cabo mediante señalización del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), es la primera línea de defensa y son los responsables de la producción de mediadores pro-inflamatorios como interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o especies reactivas de oxígeno (ROS) (Akhmetzyanova et al.,

2019a; Chhor et al., 2013). La microglía M2 (activación alternativa) a través de la vía STAT/JAK1 permite dirigir la respuesta a un fenotipo más antiinflamatorio mediante la expresión de CD206, Arg-1, factores neurotróficos (como el factor de crecimiento similar a la insulina-1) o TFG-1 $\beta$ , IL-10, IL-13, IL-4 (Akhmetzyanova et al., 2019a; Iwata et al., 2021; J. Li et al., 2021). La microglía M2 se puede identificar mediante la detección de la glicoproteína transmembrana CD206, también presente en macrófagos u otras células dendríticas en ambiente inflamatorio (L. Chen et al., 2002; Horie et al., 2013).

No obstante, dado que ambos tipos pueden coexistir como respuesta a un daño y el perfil de liberación de citoquinas puede variar, las recomendaciones de expertos recomiendan huir de la simplificación dicotómica y abordar una clasificación teniendo en cuenta características morfológicas, transcriptómicas, metabólicas y funcionales de CMi en condiciones patológicas (Chhor et al., 2013; Paolicelli et al., 2022; Ransohoff, 2016).

Además de la función inmune, las CMi intervienen en la poda sináptica durante el neurodesarrollo (Wake et al., 2013) o en la regulación de las sinapsis en la vida adulta (Parkhurst et al., 2013; Schafer et al., 2012). Dados sus múltiples roles y su relación con numerosas patologías, constituyen un elemento clave en el estudio del SNC (Y. Zhang & Cui, 2021).

La CMi supone más del 5% de las células gliales del cerebro humano (Pelvig et al., 2008). Existen algunos trabajos en los que se aprecian diferencias regionales de densidad de CMi (Lawson et al., 1990; Verkhratsky & Butt, 2007), mientras que otros observan que la densidad de CMi es similar en diferentes regiones cerebrales de mamíferos de diferentes especies evolutivas, a diferencia del número de neuronas (Dos Santos et al., 2020; Grabert et al., 2016).

### 1.1.2.2 Macroglía

#### **Astrocitos**

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC. Presentan una morfología estrellada porque desde el soma parten prolongaciones citoplasmáticas ricas en gliofilamentos, como la proteína glial fibrilar ácida GFAP (del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*).

La principal función es crear una red de soporte físico y metabólico a las neuronas, pero también intervienen en el control del microambiente neuronal y son un elemento constitutivo de la barrera hemato-encefálica (BHE). Además, modulan las sinapsis cerebrales de una forma activa (Perea & Araque, 2010) y contribuyen en la neurogénesis (Mori et al., 2005).

Los astrocitos también reaccionan ante un daño en el SNC (proceso conocido como astrogliosis) fundamentalmente aumentando su tamaño y dirigiendo sus proyecciones a la zona dañada. Se han descrito dos fenotipos astrocitarios de forma análoga a la CMi: A1, neurotóxico; y A2, neuroprotector (Escartin et al., 2021; Grimaldi et al., 2019). Además, aunque el rol fagocítico se había vinculado tradicionalmente con la CMi por su origen, cada vez hay más evidencia de la capacidad fagocitaria del astrocito y de la sinergia con las CMi (Konishi et al., 2022; Nguyen et al., 2011).

### **Oligodendrocitos**

Los oligodendrocitos son un tipo de célula glial de menor tamaño que los astrocitos, con un soma pequeño del que parten sus proyecciones. Las prolongaciones astrocitarias constituyen la vaina de mielina que envuelve a los axones, que se estructura a intervalos regulares a lo largo del axón formando los nodos de Ranvier, posibilitando la conducción saltatoria y más eficiente del impulso nervioso. Su célula homóloga en el SNP es la célula de Schwann pero, a diferencia del oligodendrocito que contacta con varios axones, envuelve a un único terminal (Kaplan et al., 2001; Verkhratsky & Butt, 2007).

### **Glía positiva a NG2**

Este tipo de célula glial ha sido la última en describirse (Verkhratsky & Butt, 2007). Estas células son positivas para un proteoglicano de condroitín sulfato llamado NG2 y no expresan GFAP ni marcadores de oligodendrocito maduro. No obstante, se considera que pertenecen a la línea oligodendrocitaria, de hecho actúan como progenitoras de oligodendrocitos (Butt et al., 1999). Son las únicas células gliales capaces de formar sinapsis eléctricas con neuronas (Bergles et al., 2000; Butt et al., 2005). Además, se ha demostrado su función en el control de la respuesta inflamatoria (Nakano et al., 2017).

## **1.2 DESCRIPCIÓN DE REGIONES DE ESTUDIO**

En esta Tesis, nos centraremos en el análisis de 5 regiones cerebrales: el colículo superior, como principal región retino-recipiente en el SNC del ratón; y varias regiones fuera de la vía visual, que denominaremos como regiones remotas del SNC (RRSNC): hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y médula espinal.

### **1.2.1 COLÍCULO SUPERIOR**

#### **Función**

El colículo superior (CS) es una estructura diseñada para integrar la información visual, auditiva y somatosensorial e iniciar las órdenes motoras (Seabrook et al., 2017). Se sitúan

bilateralmente en la parte dorsal del mesencéfalo, rostrales al colículo inferior y recibe la mayoría de las proyecciones de las células ganglionares de la retina (CGR) (**Figura 5**).



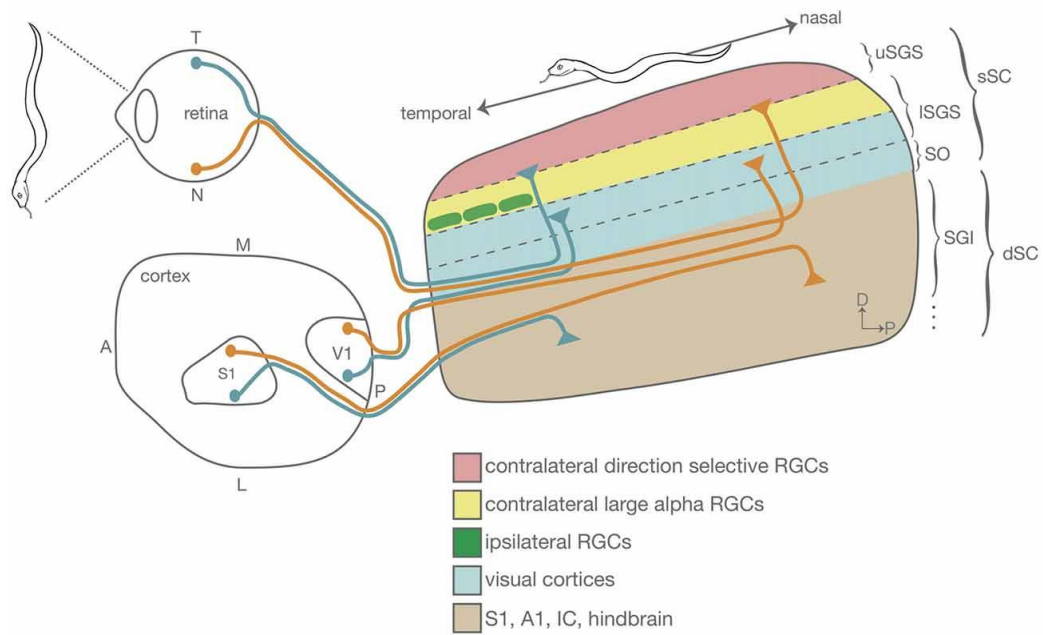
**Figura 5.** Colículo superior en un esquema de un corte sagital del cerebro de ratón. Corte sagital de cerebro de ratón con tinción de Nissl. En línea discontinua, se señala el segmento de CS analizado. El CS se sitúa inmediatamente caudal a la corteza granular y agranular retrosplenica; rostral al colículo inferior. Imagen tomada y modificada de (D. G. Paxinos, 2014).

Hay varios aspectos que sugieren que el procesamiento de la información visual es diferente entre el CS del primate y el ratón (S. Ito & Feldheim, 2018). En el ratón, aproximadamente el 85-90% de todas las CGR proyectan al CS (Ellis et al., 2016; Salinas-Navarro et al., 2009). En cambio, en los primates sólo reciben directamente los axones del 10% de las CGR (Perry & Cowey, 1984). Por otro lado, el CS del ratón recibirá inputs de CGR selectivas a determinadas direcciones de movimiento, mientras que en el primate no se conocen muy bien las proyecciones de este tipo de CGR (Weng et al., 2005).

### **Estructura**

El CS se puede diferenciar en superficial (sSC) o profundo (dSC). En el sSC se encuentra: el *stratum griseum superficiale* (SGS) o la capa gris superficial (formado a su vez por la lámina alta o *upper stratum griseum superficiale*, uSGS, y la lámina intermedia o baja del SGS, ISGS, del inglés *lower SGS*), y el *stratum opticum* (SO) o capa óptica por la que acceden las fibras visuales procedentes del tracto óptico. El sSC también se conoce como la región del CS que contiene las capa visuales. El resto supone el CS profundo o dSC, del inglés *deep SC*, recibe aferencias multimodales (Cang et al., 2018; S. Ito & Feldheim, 2018) (**Figura 6**).

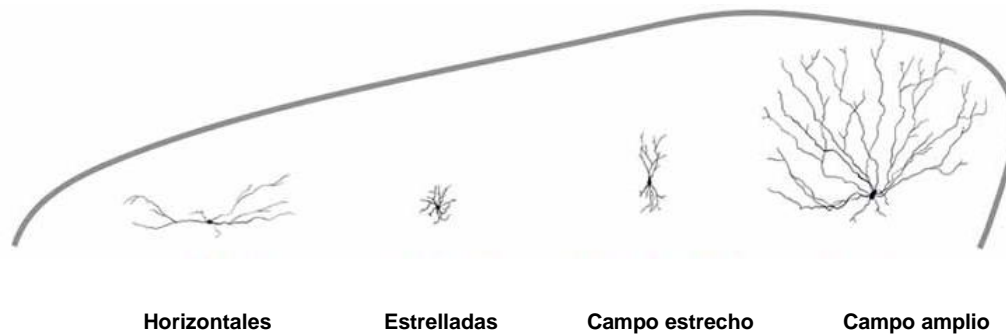




**Figura 6. Esquema de la organización retinotópica y laminar del CS del ratón.** La imagen representa cómo el objeto detectado (serpiente) en el eje temporal-nasal en la retina se representa topográficamente en el eje anterior-posterior en el CS; igualmente ocurre con el eje dorso-ventral en la retina a medio-lateral en el CS. Las CGR proyectan sus axones al CS superficial (sSC), fundamentalmente al uSGS. El SO y el ISGS reciben proyecciones de la corteza visual primaria (V1). El CS inferior o profundo (dSC) recibe proyecciones de la corteza somatosensorial (S1) y de los núcleos auditivos del mesencéfalo (A1), entre otras aferencias. Imagen tomada de (S. Ito & Feldheim, 2018).

### Células

Cada neurona del CS recibe invasión de aproximadamente 5 CGR (Chandrasekaran et al., 2007). Centrándonos en el SGS, morfológicamente en el ratón se han identificado 4 tipos de neuronas que además, difieren en las estructuras con las que tienen conexión. Se pueden distinguir las células horizontales, estrelladas, de campo estrecho y de campo amplio (Gale & Murphy, 2014) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Principales tipos de neuronas en el CS según su morfología. Tomada y modificada de (S. Ito & Feldheim, 2018).

### **Conexiones**

Se han estudiado en numerosas especies de mamíferos, apreciando que se trata de una región con una estructura con entradas sensoriales organizadas en láminas o estratos bastante conservada. Los estratos superficiales son los visuales y, los más profundos, multimodales y premotores. Todas las capas comparten un mismo mapa topográfico alineado con respecto al campo visual. Esta organización alineada permite la integración de la información multisensorial y la orientación de la respuesta motora hacia el estímulo (Cang et al., 2018).

## **1.2.2 HIPOCAMPO**

### **Función**

La región hipocámpal (RH) ha sido una de las áreas más analizadas del SNC, tanto por su estructura como por su conectividad (Watson et al., 2011). La RH pertenece al conocido como circuito de Papez, un circuito que conecta varias regiones cerebrales que forman parte del sistema límbico, implicado en el control de las emociones: conecta el córtex cingulado con el hipotálamo a través de los cuerpos mamilares, la RH y el tálamo anterior (Weininger et al., 2019). Además, tiene un papel fundamental en la memoria, siendo por ejemplo el foco de afectación inicial en la enfermedad de Alzheimer (Mufson et al., 2015; Poo et al., 2016).

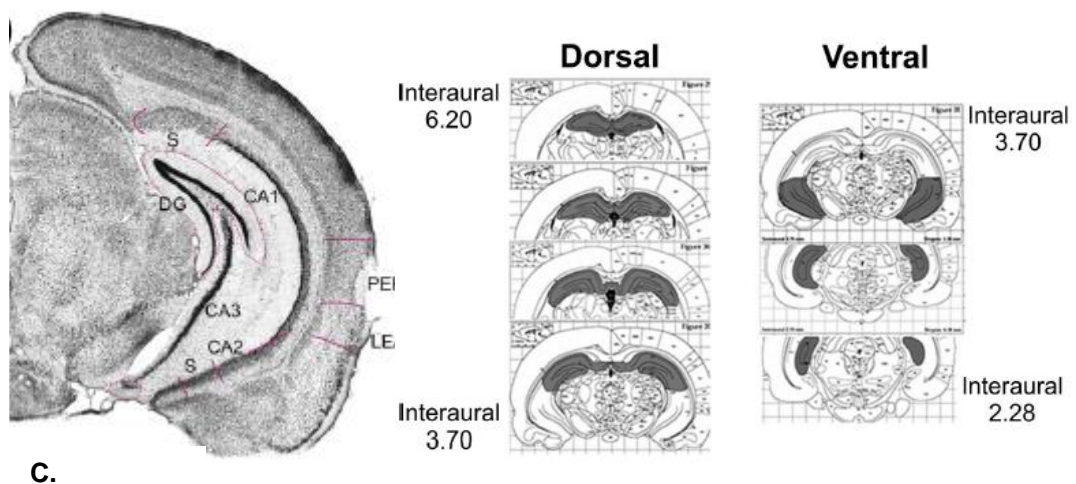
### **Estructura**

La RH es una estructura elongada de la región medial del lóbulo temporal cuyo eje mayor se extiende en forma de coma desde los núcleos septales en dirección rostródorsal, por encima y detrás del diencefalo. Dentro de la RH, podemos diferenciar la formación



hipocampal (FH) y la región parahipocampal (RpH) (Scharfman et al., 2000). La diferenciación entre las dos se debe al número de capas corticales y a su conectividad. La RpH comprende 5 áreas diferentes, todas con más de 3 capas: corteza perirrinal, entorrinal, postrinal, presbículum y parasubículum. La corteza entorrinal se considera el núcleo de la formación parahipocampal por sus conexiones con la formación hipocampal y con áreas adyacentes al parahipocampo.

En esta Tesis nos centraremos en el estudio de la FH, a la que de forma general se la reconoce como hipocampo (H). Comprende 3 divisiones citoarquitectónicas: giro dentado, hipocampo propiamente dicho o cuerno de Amón (CA, que se subdivide en CA3, CA2 y CA1) y el subículum. El subículum es la parte más baja de la FH, entre CA1 y el inicio de la corteza entorrinal de la región parahipocampal, es la principal región eferente del hipocampo (Figura 8).



**Figura 8. Esquema de la región hipocampal.** **A.** Sección coronal en dirección rostro (arriba)-caudal (abajo) de la región hipocampal (RH), constituida por la formación hipocampal, FH -giro dentado (DG), cuerno de Amón (C1, C2, C3) y subículum- y la región parahipocampal, RpH- corteza entorrinal lateral (LEA) y perirrinal (PER)-. Imagen tomada de (Watson et al., 2011). **B.** En un esquema de cortes coronales, se puede diferenciar la porción ventral y dorsal de la FH gracias al método descrito por (Banar et al., 2006); imagen tomada de (Banar et al., 2006). **C.** Dado que en esta tesis los cortes para estudio histológico se hicieron con orientación sagital, el estudio se realizó de la FH (lateral 0,60-2,16mm), señalada en línea discontinua. Imagen de corte sagital de cerebro de ratón teñida con método de Nissl, tomada y modificada (D. G. Paxinos, 2014).

### Células

Las 3 divisiones de la FH comparten la morfología tricapa, característica típica del allocórtex: 2 capas plexiformes de proyecciones neuronales y entre ellas una capa con alta densidad de células (Witter et al., 1989). Las células piramidales son el elemento celular principal del CA. El giro dentado contiene gran cantidad de células pequeñas granulares y es una de las regiones donde hay neurogénesis en el adulto. Además de estas neuronas de carácter excitatorio, existen numerosas interneuronas, muchas de ellas con señales inhibitorias GABAérgicas (Watson et al., 2011). La CMI de la RH se ha reportado ser más sensibles a cambios inmunológicos que la de otras regiones del cerebro (Grabert et al., 2016).

### Conexiones

A nivel intrahipocámpico, la mayoría de las conexiones son unidireccionales: comienzan en la corteza entorrinal, llega hasta el giro dentado y desde ahí, las células granulares emiten sus axones, conocidos como fibras musgosas, a CA3. Las células piramidales de CA3 conectan con CA1, desde donde se pasa a subículo y acaba de nuevo en la corteza entorrinal (Rao et al., 2022).

La mayor parte de las aferencias del hipocampo provienen de la corteza entorrinal, a la que a su vez llegan estímulos vía perforante del propio hipocampo o vía fimbria/fórnix del resto del prosencéfalo y subcorticales (núcleos pontinos, rafe medial, tálamo, amígdala, etc.).

El subículum es la principal vía eferente del hipocampo. Las proyecciones son múltiples desde sus diferentes áreas: corteza entorrinal, tálamo, núcleos septales del circuito olfatorio, neocórtex, hipotámo. De forma interesante, el área CA3 es capaz de hacer sinapsis con CA1, CA2 y CA3 del hipocampo contralateral (Andersen et al., 2006).

### 1.2.3 BULBO OLFATORIO

#### **Función**

El bulbo olfatorio principal (BO) es una estructura neural del prosencéfalo de los vertebrados situada en el extremo más rostral al córtex. Pertenece al sistema olfatorio y, además de encargarse de la identificación de olores o feromonas, interviene en otros procesos como el comportamiento de búsqueda de alimentos, las relaciones sociales, el comportamiento reproductivo, el refuerzo, las respuestas emocionales, el aprendizaje y la memoria (G. Paxinos, 2004).

Las neuronas sensitivas olfativas (NSO) o neuroepitelio olfatorio principal se encuentra en el techo de la cavidad nasal. Tiene la función de traducir la información olorosa captada a través de los receptores olfatorios (RO) a los glomérulos de cada bulbo olfatorio. Las NSO con un mismo receptor olfativo proyectan a un glomérulo del BO, que es inervado por la dendrita apical de una única célula mitral. Por tanto, cada célula mitral representa la activación de un único tipo de RO. Las células mitrales están íntimamente relacionadas con el segundo tipo de células de proyección del BO, las células en penacho, que pueden inervar varios glomérulos y cuyos axones son los principales elementos neurales que proyectan fuera del BO. Tras un procesamiento horizontal mediante interneuronas periglomerulares y granulares fundamentalmente, la información se proyecta al resto de estructuras telencefálicas, incluyendo la corteza olfatoria principal o piriforme.

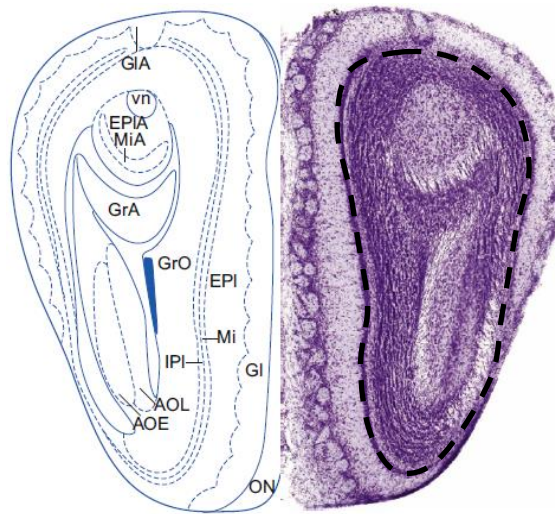
Por otro lado, el órgano vomeronasal, situado bilateralmente del septo nasal, está implicado en la detección de las feromonas. Las neuronas sensoriales vomeronasales traducen el estímulo sensorial al bulbo olfatorio accesorio (BOa), que se encuentra en la parte posterodorsal del BO, formando una vía paralela e independiente.

#### **Estructura**

El BO principal es estructura con morfología bulbar en el que se pueden identificar 7 capas. La capa del nervio olfatorio (ON) contiene todos los axones amielínicos de las neuronas sensitivas olfativas y gran cantidad de astrocitos. La capa glomerular (GI) está constituida por los glomérulos del BO, cada uno de ellos rodeado por astrocitos periglomerulares que les confieren cierta segregación anatómico-funcional, y por células en penacho. La capa de células mitrales contiene estas células y algunas granulares (Mi). Las dendritas de las células mitrales (Mi) y granulares conectan con los glomérulos del BO dando lugar a la EPI. La IPI contiene los axones de las células mitrales y en penacho. La capa de células granulares (GrO) contiene gran cantidad de células granulares, células sin axón que se organizan en circunferencias concéntricas y cuyas dendritas actúan como interneuronas.

Las células subependimarias se sitúan en la pared de la extensión del ventrículo lateral, constituyen una fuente de progenitores neurales y gliales, además de ser el trayecto para las neuronas provenientes de la zona subventricular en los ventrículos laterales a través la ruta migratoria rostral para el reemplazamiento continuo de las NSO.

Dado que a nivel histológico, el límite entre Mi y la EPI era fácilmente diferenciable, el estudio del BO se realizó principalmente desde este borde a su interior, integrando principalmente a las células granulares y las capas del BOa (**Figura 9**).



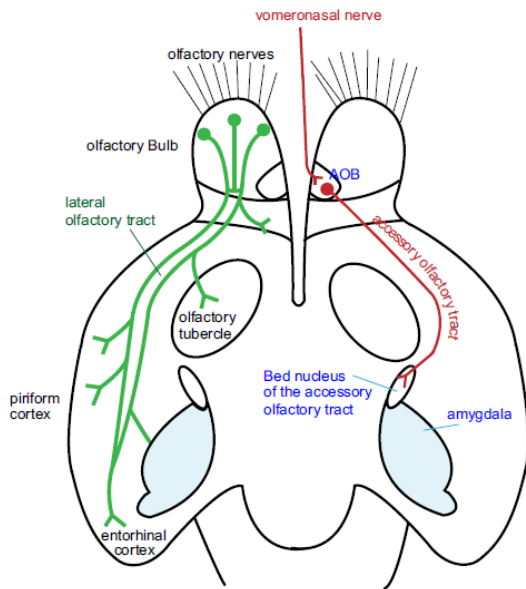
**Figura 9.** Esquema del bulbo olfatorio y corte histológico coronal teñido de cerebro de ratón. A la izquierda, diagrama de las capas; a la derecha, corte con tinción de Nissl. El BO presenta una extensión del ventrículo lateral en el interior del mismo, en cuya pared se encuentran las células progenitoras neurogliales, y alrededor del mismo se identifican 7 capas: capa del nervio olfatorio (ON), glomerular (GI), plexiforme externa (EPI), de células mitrales (Mi), plexiforme interna (IPI), granular (GrO) y subependimaria. GrA: Capa granular del BOa; MiA: Capa mitral del BOa, EPIA: Capa plexiforme externa del BOa, vn: nervio vomeronasal. En línea discontinua, se marca el área analizada: células granulares y las capas del BOa. Imagen tomada de (Watson et al., 2011).

### Conexiones

Las conexiones intrabulbares se realizan a través de los axones de células mitrales y en penacho mientras que a nivel extra-bulbar, es a expensas de las células en penacho.

Las proyecciones centrifugas o aferentes del BO principal se organizan a través de los tractos olfativos medial y lateral y se dirigen a los tubérculos olfatorios, a la corteza piriforme, amígdala, corteza entorrinal e hipocampo (Arisi et al., 2012). El BOa envía sus proyecciones hacia algunos núcleos del sistema límbico: el núcleo de la cama de la estría

terminal, el núcleo de la cama del tracto olfatorio accesorio, y principalmente a los núcleos medial amigdaloides y el núcleo cortical posteromedial de la amígdala, éstos dos últimos son llamados comúnmente amígdala vomeronasal (Scalia & Winans, 1975) (**Figura 10**). A diferencia del mapa retinotópico, en la vía olfativa no existe una organización topográfica tan establecida. El BO recibe pocas conexiones centrípetas, la mayoría de ellas relacionadas con núcleos del tronco cerebral con funciones modulatorias sobre la actividad del BO.



**Figura 10.** Diagrama de las proyecciones principales del bulbo olfatorio principal y accesorio. Imagen tomada y modificada de (Watson et al., 2011).

## 1.2.4 CEREBELO

### Función

El cerebelo (CE) se sitúa en la parte más caudal del encéfalo en el roedor (**Figura 11**). Su función principal es la coordinación del movimiento, regulando el tono muscular y el equilibrio; aunque también participa en procesos cognitivos (Caston et al., 1998; Sotelo, 2004).

### Estructura

En la organización externa del CE, podemos distinguir una estructura central, llamada vermis, flanqueada por los hemisferios cerebelosos. En su superficie, el CE presenta surcos (denominados como fisuras) que permiten diferenciar los lóbulos cerebelosos (Sillitoe & Joyner, 2007). A nivel de organización interna, podemos diferenciar la corteza cerebelosa y los núcleos cerebelosos profundos. El CE del ratón pigmentado C57BL6 representa el 11% del peso del ratón, por debajo del tamaño medio en comparación con otras especies (Wahlsten & Anderson, 1991).





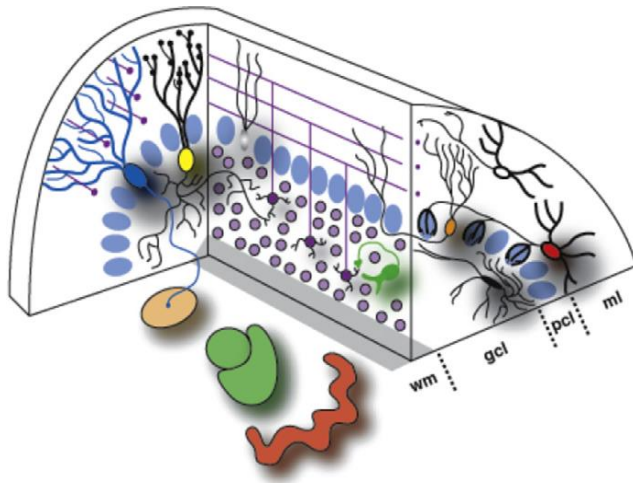
**Figura 11. Cerebelo de ratón.** En línea discontinua, se señala el cerebelo, que se estudió en toda su extensión. Para analizar la respuesta en función de la lateralidad, se dividió en hemiserebelo derecho (contralateral al ApNO) e izquierdo (ipsilateral al ApNO) a través de un corte sagital a través de la línea media del vermis. Imagen de corte sagital de cerebro de ratón teñida con método de Nissl, tomada y modificada de G. Paxinos, 2004.

### Células

Las tres capas de la corteza cerebelosa resultan de la disposición que adquieren las neuronas más representativas del cerebelo, las células de Purkinje (CP) (**Figura 12**):

- Capa molecular (CM), por encima de la capa de CP. Presenta un patrón de neuropilo al estar constituida por las dendritas de las CP, los axones de las neuronas granulares y otros terminales sinápticos.
- Capa de CP (CCP), constituida por los somas de las CP dispuestos en monocapa. En esta capa, se encuentran los somas de un tipo especial de glía, la glía de Bergmann: se trata de una célula glial radial que, además de su papel en el desarrollo temprano del cerebelo, desempeña funciones similares a los astrocitos.
- Capa granular (CG), se sitúa por debajo de la CCP y está constituida por neuronas granulares. Además, se encuentran otras interneuronas como las células de Glogi o las células de Lugaro (Sillitoe & Joyner, 2007; Watson et al., 2011).

La capa más interna es la sustancia blanca, donde se encuentra la mayor cantidad de células gliales. Además, en el interior de la misma, podemos encontrar tres pares de núcleos de sustancia gris: el núcleo fastigial, el núcleo interpuesto y el núcleo dentado. Las CP envían sus axones inhibitorios a los núcleos de la sustancia blanca (M. Ito, 2006, 2008).



**Figura 12. Dibujo representativo de la citoarquitectura del cerebelo de ratón.** Se pueden diferenciar la capa molecular (ml), capa de células de Purkinje (pcl), la capa granular (gcl) y la sustancia blanca (wb). Tomada y modificada de (Watson et al., 2011).

### **Conexiones**

El CE se encuentra conectado con el tronco del encéfalo a través de los pedúnculos cerebelosos. Las principales conexiones aferentes son: las vías corticopontocerebelosa, cerebrolivocerebelosa, cerebroreticulocerebelosa y aferencias espinales. Las fibras eferentes parten de los núcleos de la sustancia blanca, y conectan con el núcleo vestibular lateral y otros núcleos del tronco del encéfalo (Watson et al., 2011).

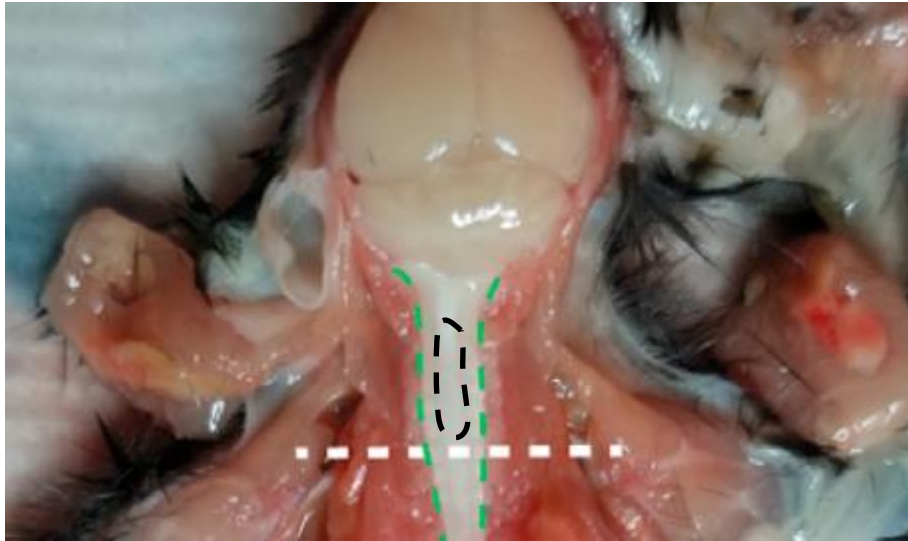
## **1.2.5 MÉDULA ESPINAL**

### **Función**

La médula espinal (ME) es la estructura más caudal del SNC y constituye la principal vía aferente, fundamentalmente sensitiva, y eferente, sobre todo motora, del encéfalo.

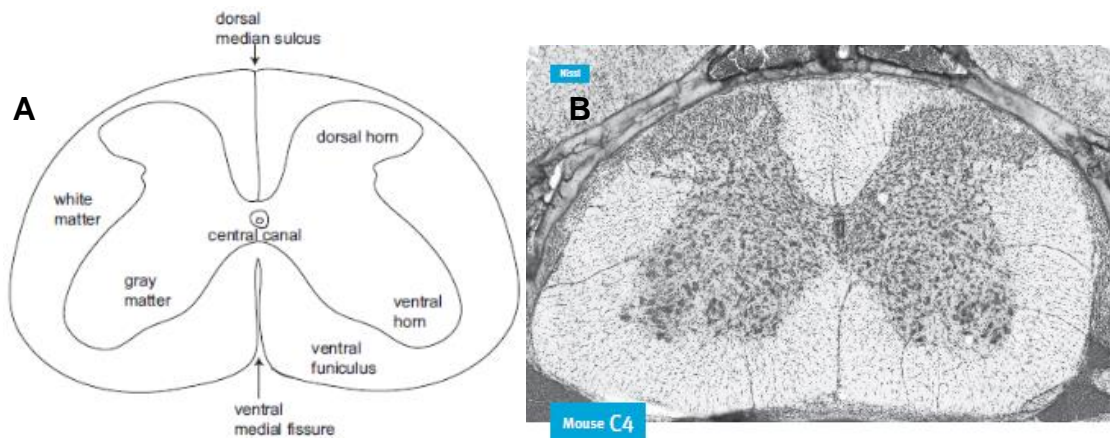
### **Estructura**

La ME del ratón es una estructura cilíndrica ligeramente aplanada en sentido anteroposterior (**Figura 13**). Se extiende dentro del canal vertebral desde el final del romboencéfalo, a la altura del foramen magnum, a la parte más caudal de la columna vertebral, a la altura de la sexta vértebra lumbar (en el ratón, hay entre 25-30 vértebras). Se pueden diferenciar 34 segmentos: 8 cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacros y 3 coccígeos; presentando un engrosamiento cervical, a la altura del plexo cervical, y otro engrosamiento lumbar, origen de las raíces lumbares (Watson et al., 2011).



**Figura 13.** Fotografía de encéfalo y médula espinal de ratón C57BL/6 expuestos. En línea discontinua verde, se delimita el canal espinal; en color blanco, el segmento cervical y en negro, se señala el segmento de estudio, de 4-6 mm, de C1 a C5 aproximadamente. Imagen tomada y modificada de (Dong et al., 2021).

A nivel interno, en un corte transversal se pueden diferenciar dos regiones (**Figura 14**). La sustancia gris que se dispone constituyendo las astas medulares, ocupa una posición central, y es donde se localizan los somas de las neuronas espinales (sensitivas, motoras e interneuronas). En la zona central, se encuentra el canal endimario, tapizado por epindemocitos, y por donde circula el líquido cefalorraquídeo. La sustancia blanca, que rodea las astas medulares, y está formada por axones propioespinales (se inician en las neuronas espinales y no abandonan la ME), espinoencefálicos (ascendentes), y encéfaloespinales (descendentes) (Watson et al., 2011).





**Figura 14.** **Sección transversal de un segmento de medula cervical de ratón.** **A.** Diagrama representativo en el que se muestra la morfología medular ligeramente aplanada y la división en dos hemimédulas mediante la fisura media anterior (*ventral medial fissure*) y el surco mediano posterior (*dorsal median sulcus*). La sustancia blanca (*white matter*) se dispone alrededor de la sustancia gris (*gray matter*), en la que se puede diferenciar el asta ventral o motora (*ventral horn*) y el asta dorsal o sensitiva (*dorsal horn*). En el centro, el canal central medular (central canal). Tomada y modificada de (Watson et al., 2011). **B.** Inmunohistoquímica de sección transversal del segmento medular C4 de ratón C57BL/6 con tinción de Nissl. Imagen tomada y modificada de (Watson et al., 2009)

### **Conexiones**

Los axones de la sustancia blanca constituyen las principales vías aferentes y eferentes medulares. Se pueden diferenciar según donde se encuentre el soma celular de estos axones: ascendentes (el cuerpo celular está en la ME y ascienden al encéfalo, como el tracto espinotalámico o la columna dorsal), descendentes (el soma celular está en el encéfalo, como el tracto corticoespinal) y propioespinales (tanto el soma como los axones están localizados en la ME y conectan distintos niveles intramedulares). Otros tractos espinales son los tractos vestibuloespinales y los espinotalámicos (Nudo & Masterton, 1988; Watson et al., 2011).

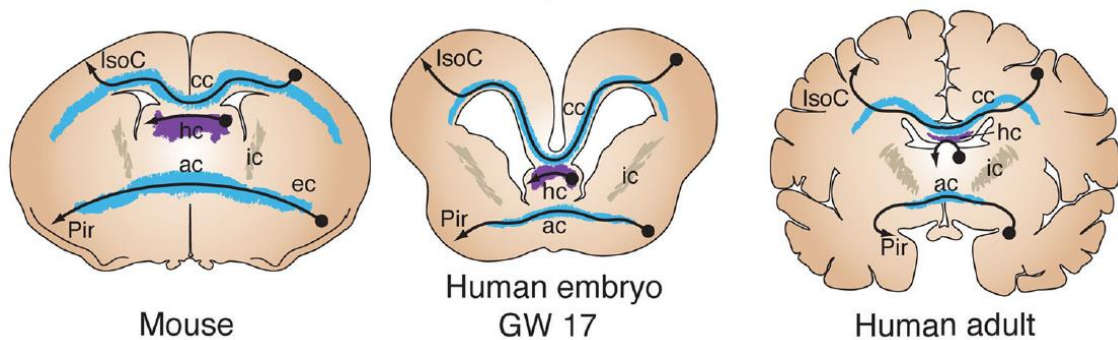
## **1.3 CONEXIONES INTERHEMISFÉRICAS**

En animales con simetría bilateral, la integración de la información multimodal se realiza en el cerebro a través del sistema comisural. La presencia de estructuras que garanticen la comunicación interhemisférica cerebral entre los animales vertebrados es un patrón altamente conservado entre especies. No obstante, su complejidad ha ido *in crescendo*: el desarrollo de la estructural del isocórtex de 6 capas de los mamíferos, trajo consigo el desarrollo del mayor sistema comisural, el cuerpo caloso (Suárez et al., 2014).

De forma general, se trata de un sistema de axones que se decusan para conectar zonas funcionalmente relacionadas: de una región a la misma pero en el hemisferio contralateral (homotópica) o desde una región a otra distinta del otro lado (heterotópica). Para la formación del sistema comisural, es imprescindible la intermediación de células de la glía y aunque el sistema se desarrolle durante la embriogénesis, resulta fundamental la arborización de las proyecciones en la etapa postnatal (Mizuno et al., 2010; C.-L. Wang et al., 2007).

Podemos diferenciar (**Figura 15**):

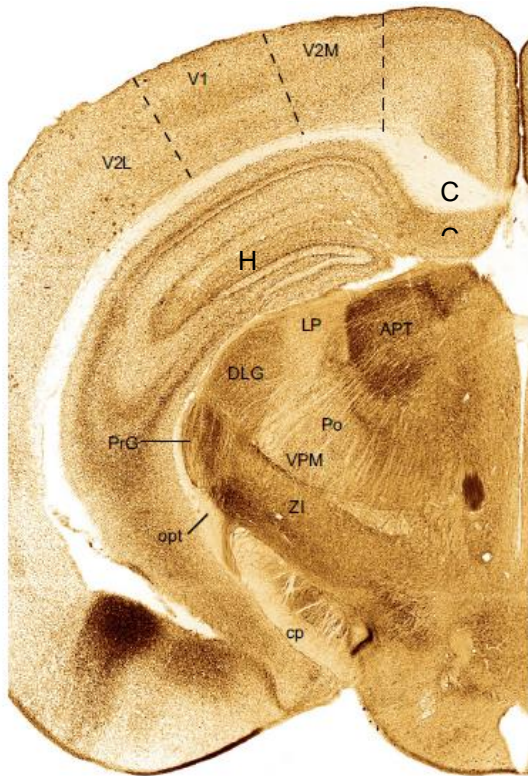
- **Cuerpo calloso:** Se ubica en la cisura interhemisférica y se extiende entre ambos hemisferios cerebrales para conectar el córtex cingular y prácticamente toda la corteza cerebral, salvo las áreas temporales, más relacionadas entre sí por la comisura anterior. En un corte sagital, se puede diferenciar, de ventral a rostral: el rostro o pico, la rodilla o rodete, el tronco o cuerpo y el esplenio (Yorke & Caviness, 1975).
- **Comisura hipocampal:** Se encuentra insertada en la parte más posterior del cuerpo calloso, el esplenio. Conecta ambos hipocampos, fundamentalmente ambos CA3, así como proyecciones heterotópicas entre el hipocampo y la corteza entorrinal (Wyss et al., 1980; Yorke & Caviness, 1975).
- **Comisura anterior:** Se encuentra por debajo del pico del cuerpo calloso y sobre el quiasma óptico, interconecta ambos BOs, corteza piriforme y córtex temporal (Yorke & Caviness, 1975).



**Figura 15. Esquema de las conexiones interhemisféricas.** El dibujo representa secciones coronales de cerebro (ratón, embrión humano de la semana 37 de gestación y el humano adulto) en el que se señalan el cuerpo calloso (cc) uniendo el isocórtex de ambos hemisferios, la comisura hipocampal cruzando el esplenio del cuerpo calloso (hc) y la comisura anterior (ac), uniendo regiones olfatorias de ambos hemisferios, como la corteza piriforme (Pir). Imagen tomada de (Suárez et al., 2014).

Por tanto, aunque topográficamente la vía visual (en concreto, el núcleo geniculado dorsolateral, el CS, y la corteza visual) estén cerca del hipocampo, no existen conexiones robustas entre ambos sistemas. El BO, anatómicamente más alejado de las otras dos regiones de estudio, presenta conexiones con el hipocampo. Por su parte, ambos hipocampos se interconectan por la cisura hipocampal (**Figura 16**).

**Figura 16. Corte de cerebro de ratón representativo de las regiones de estudio.**

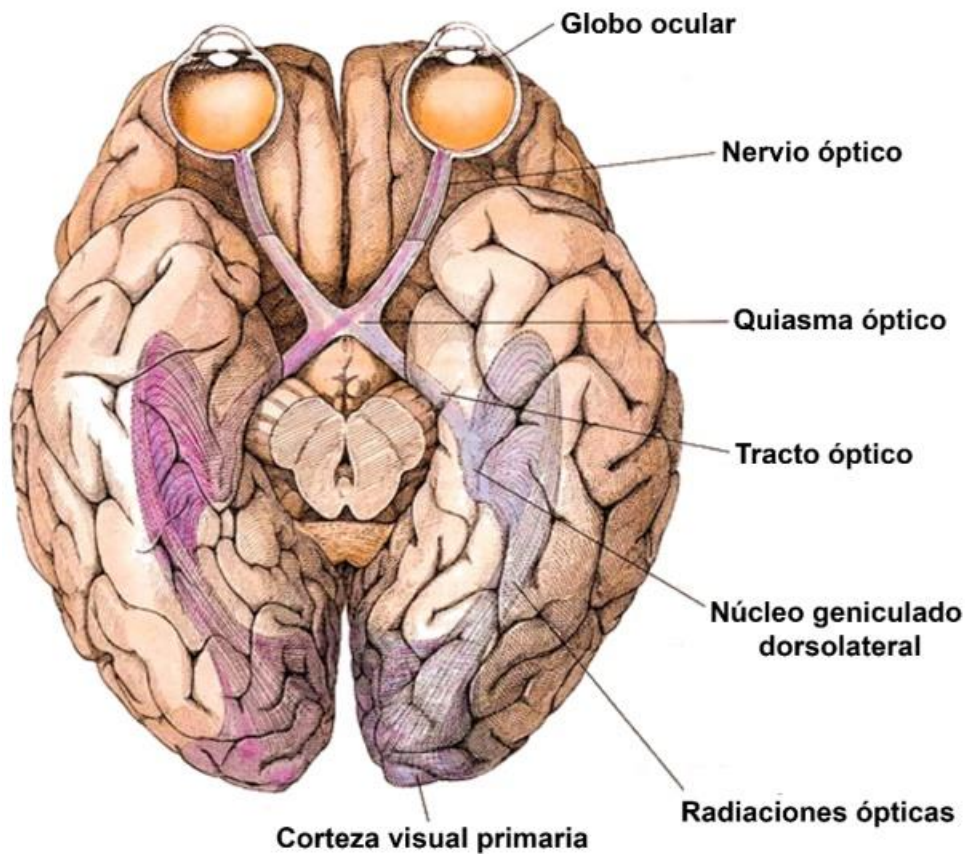


Corte coronal de ratón teñido con acetilcolinesterasa. La imagen muestra la estrecha relación topográfica entre el sistema visual (corteza visual primaria, V1, y asociativa, V2M y V2L; núcleo geniculado dorsolateral, DLG; tracto óptico, opt) y el hipocampo (H). Resto de abreviaturas: APT: anterior pretectal área; CP: cerebral peduncle; CC: cuerpo calloso; LP: lateral posterior nucleus of thalamus; Po: posterior nucleus of thalamus; PrG: pregeniculate nucleus (ventral lateral geniculate nucleus); VPM: ventral posteromedial nucleus of thalamus; Zi: zona incerta. Tomada y modificada de (G. Paxinos, 2004).

## 1.4 EI SISTEMA VISUAL

El sistema visual es el responsable de recibir, procesar e interpretar los estímulos visuales. Se considera que está constituido por ambos ojos, nervios ópticos, quiasma, tractos ópticos, cintillas ópticas, núcleos geniculados dorsolaterales (NGdL), CS, radiaciones ópticas y la corteza visual (**Figura 17**).

Los ojos captan el estímulo luminoso visual a través de la pupila y los medios transparentes, y mediante la potencia dióptrica de la córnea y el cristalino, se enfoca la imagen invertida en la retina. La información visual recogida en retina se manda al cerebro a través de los axones de las CGR, que en su conjunto constituyen el nervio óptico (NO).



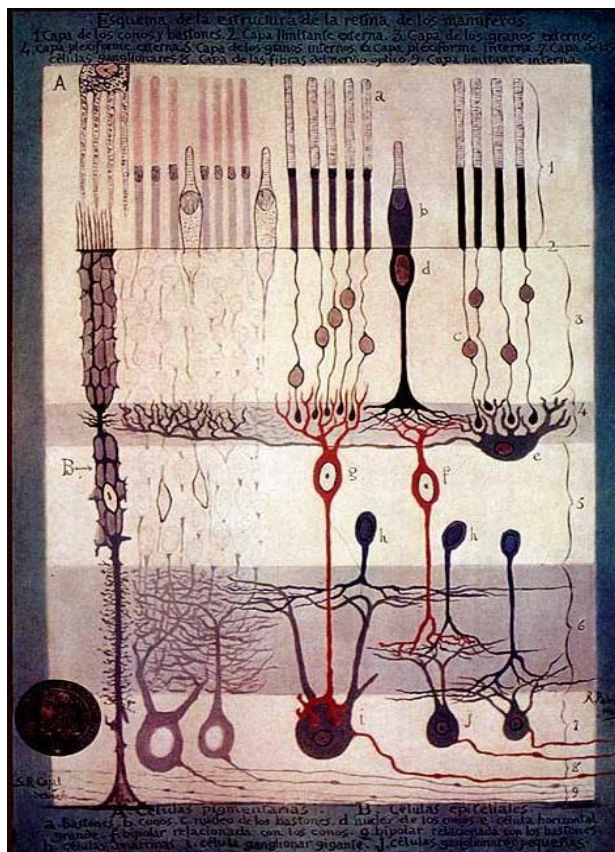
**Figura 17. Sistema visual humano.** La retina recibe el estímulo visual que se envía por las vías ópticas hasta la corteza visual, para que con las áreas de asociación, sea interpretado por el cerebro. Imagen tomada y modificada de (Hubel, 2000).

Las proyecciones de ambos NO se entrecruzan en el quiasma de una manera estructurada, y se continúan a través de los tractos o cintillas ópticas hasta los NGdL y CS. Desde ahí, las radiaciones ópticas envían la información a la corteza primaria visual que interpretará el estímulo en conexión con otras áreas corticales asociadas.

#### 1.4.1 LA RETINA DEL ROEDOR

La retina, como el resto del SNC, proviene del neuroectodermo, generada a través de una prolongación llamada vesícula óptica. De esta manera, al ser una extensión del SNC con mayor facilidad de acceso, constituye un modelo de gran utilidad para el estudio del mismo. Santiago Ramón y Cajal, describió la retina como “una extensión periférica del Sistema Nervioso Central, cuya delicadeza, transparencia y otras características estructurales la hacen especialmente apta para el análisis histológico” (Ramon y Cajal, 1892) (**Figura 18**).



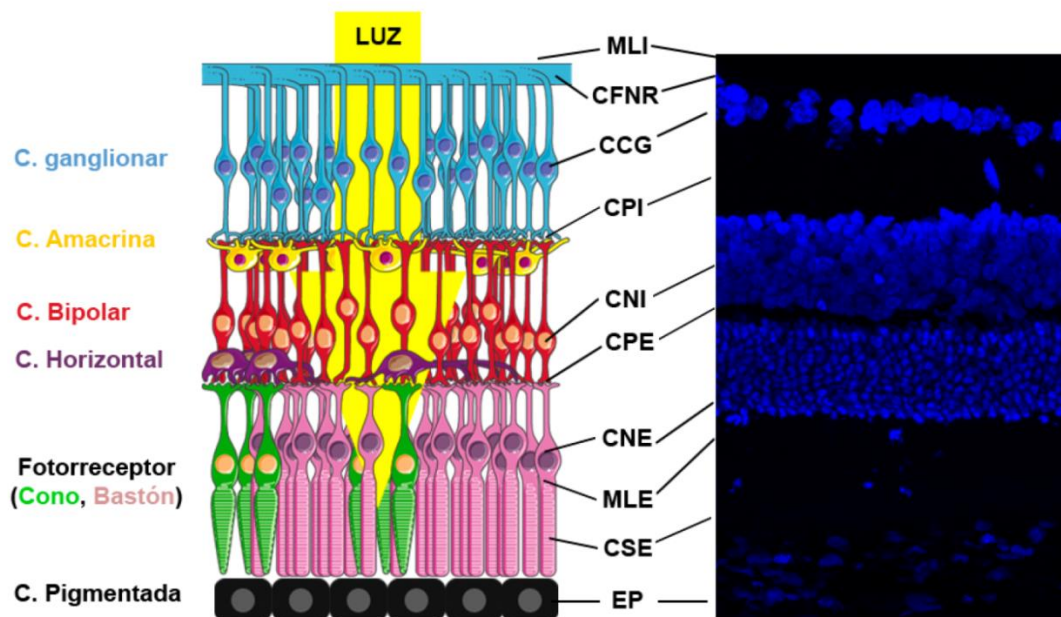


**Figura 18.** Esquema de la retina de vertebrados realizado por Santiago Ramón y Cajal.

El sistema visual de todos los mamíferos presenta gran similitud, por lo que el sistema visual del roedor constituye un buen modelo con potencial traslación de los datos. Aunque cada especie de mamífero pueda tener algún rasgo particular, la organización funcional de la retina en capas es idéntica. De la capa más interna, más cerca al humor vítreo, a la externa, más cerca de la coroides, se distinguen (**Figura 19**):

- Membrana limitante interna (MLI): lámina basal de glicoproteínas adheridas a las células de Müller que separa la retina del humor vítreo.
- Capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR): constituida por los axones de las CGR que se organizan para salir a través de la papila para formar el NO.
- Capa de células ganglionares (CCG): está formada por los somas de las CGR y de las células amacrinas desplazadas.
- Capa plexiforme interna (CPI): se producen las sinapsis entre las células amacrinas, bipolares, interplexiformes y las CGR.
- Capa nuclear interna (CNI): se encuentran los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas, interplexiformes, células de Müller y las CGR desplazadas.
- Capa plexiforme externa (CPE): se producen las conexiones sinápticas de los fotorreceptores y las células bipolares, horizontales e interplexiformes.

- 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 de los 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., 1992; revisado en Bowmaker y cols., 2006; Ortín-Martínez y cols., 2010, 2014).
- Capa de segmentos externos (SE) e internos (SI) de los fotorreceptores, encargada de captar la información lumínica.
- 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.
- Epitelio pigmentario de la retina (EPR): formado por una monocapa de células epiteliales que externamente limita con la capa más interna de la coroides mediante la membrana de Brunch. Este epitelio contiene pigmento de melanina, responsable de la absorción y reflexión de la luz, y no es una capa nerviosa propia de la retina, pues tiene un origen embrionario diferente.



**Figura 19.** Esquema de la organización laminar de la retina y sus principales tipos celulares. A la izquierda se muestra un esquema de la estructura básica de la retina y a la derecha una microfotografía de un corte sagital de una retina del roedor inmunodetectada con DAPI. Imagen cedida por el Dr. Fernando Lucas-Ruíz. Abreviaturas: MLI, membrana limitante interna; CFNR, capa de las fibras nerviosas de la retina; CCG, capa de las CGR; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa; MLE, membrana limitante externa; SEF, segmentos externos de los FR; y EP, epitelio pigmentario.

El estímulo luminoso tiene que atravesar todas las capas de la retina para llegar a los fotorreceptores, que se encargan de transformar la energía electromagnética (estímulo luminoso) en eléctrica (cambio del potencial de membrana del fotorreceptor). Los ftopigmentos se encuentran en los SE de los fotorreceptores, que mandan esa señal a las células bipolares, que a su vez las envían a las CGR. Las CGR reciben esta información, previamente modulada en las capas plexiformes por otras neuronas retinianas (células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes).

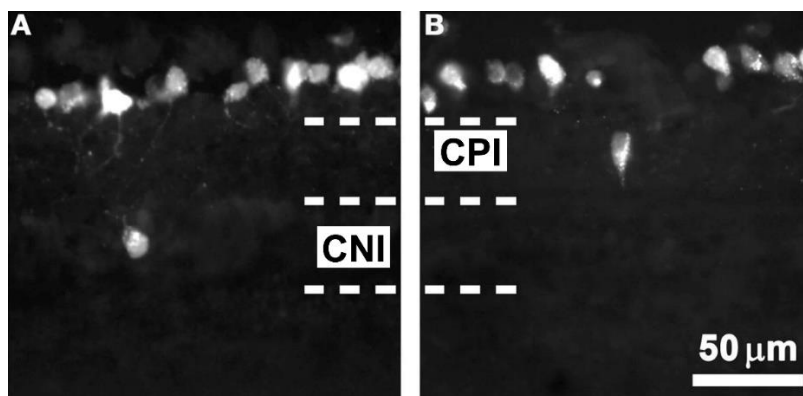
En el caso en concreto de la retina del roedor, cabe destacar que no posee fovea como los humanos y los primates. La fovea es una especialización regional de la retina, con una alta densidad celular que obtiene la máxima agudeza visual. En ella, las capas internas se desplazan lateralmente para que la luz acceda directamente a los conos, no habiendo en su punto central ni bastones ni capilares. En la región parafoveal, se encuentra la zona de mayor densidad de CGR y células bipolares (Wybar, 1977). Por el contrario, los roedores presentan una región de alta densidad de CGR denominada estría visual (Galindo-Romero et al., 2011a; Salinas-Navarro, Mayor-Torroglosa, et al., 2009; Salinas-Navarro, Jiménez-López, et al., 2009).

El motivo fundamental de usar en esta Tesis el ratón macho pigmentado C57BL/6 como modelo experimental es que tanto la población de CGR como la vía visual ha sido ampliamente estudiado en nuestro grupo (Galindo-Romero et al., 2011a; González-Riquelme et al., 2021; Salinas-Navarro, Jiménez-López, et al., 2009). Los ratones son un modelo animal ampliamente usado pues son económicos y manejables, fáciles de criar en cautividad y con un ciclo vital rápido, lo que permite reproducir y comparar experimentos en poco tiempo. A partir de ahora, en esta Tesis nos referiremos siempre al modelo del roedor a menos que se especifique lo contrario.

## **1.4.2 CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA Y SUS PROYECCIONES**

### **1.4.2.1 Células ganglionares de la retina**

El 97% de las CGR se encuentran en la CCG (CGR ortotópicas) y el resto se encuentra en la CNI o en la CPI (CGR desplazadas) (Nadal-Nicolás et al., 2014) (**Figura 20**). Asimismo, en la CCG también se pueden encontrar células amacrinas desplazadas, que son difícilmente distinguibles en el estudio de la retina con hematoxilina-eosina (Villegas-Pérez et al., 1988) pero se trazan retrógradamente con Fluorogold (Nadal-Nicolás et al., 2012) o se inmunodetectan con anticuerpos específicos, como se verá más adelante (Galindo-Romero et al., 2011a; Lucas-Ruiz et al., 2019; Nadal-Nicolás et al., 2009).



**Figura 20.** Células ganglionares de la retina ortotópicas y desplazadas. Secciones transversales de retina de rata en la que se muestran CGR ortotópicas, en la de capa CGR (arriba) y CGR desplazadas en la CNI (A) y en la CPI (B), trazadas retrógradamente con fluorogold. Tomado y modificado de (Nadal-Nicolás et al., 2014).

El número total de CGR varía ampliamente entre las distintas especies, con un rango aproximado en ratón de 32.000-87.000 o en rata entre 70.000-120.000, con un porcentaje de células amacrinas desplazadas del 59% y 50% de las células de la CCG, respectivamente. En humanos y primates, con ojos de similar tamaño, el número de CGR oscila entre 700.000-1.500.000 y el porcentaje de células amacrinas desplazadas tiene una distribución muy variable, pudiendo llegar al 80% en la retina periférica (L. Chen et al., 2016; Nadal-Nicolás et al., 2023; Nadal-Nicolás et al., 2015).

El 85,6% de las CGR de ratón (Galindo-Romero et al., 2011a) y el 92,2% de rata (Nadal-Nicolás et al., 2009), independientemente de su disposición, recogen la información visual recibida en los fotorreceptores. Además de esta población responsable de la visión “formadora de imágenes”, existe un subgrupo de CGR intrínsecamente fotosensibles (denominadas como tal, CGRip, o melanopsínicas) porque contienen un fotopigmento llamado melanopsina, homólogo a la rodopsina y opsina de conos, pero con menor sensibilidad que la de los fotorreceptores. Este sistema visual no formador de imágenes, tiene como función principal la sincronización de los ritmos circadianos por su proyección mayoritaria al núcleo supraquiasmático (NSQ), así como la respuesta pupilar a través de la proyección al núcleo de la oliva pretectal (Hattar et al., 2002; Provencio et al., 2000; Ramsey et al., 2013).

Las CGR, además de su clasificación en función a su localización o a su funcionalidad, pueden diferenciarse en función de la inmunodetección. Las CGR con función visual expresan Brn3a, un factor de transcripción con dominio POU clase IV (Pou4f), que permite su estudio morfológico (Badea & Nathans, 2011), así como ser un buen marcador para su detección y cuantificación en retinas intactas o tras una lesión. Por ejemplo, se ha demostrado que el ApNO provoca la disminución de las CGR-Brn3a<sup>+</sup> en la retina lesionada



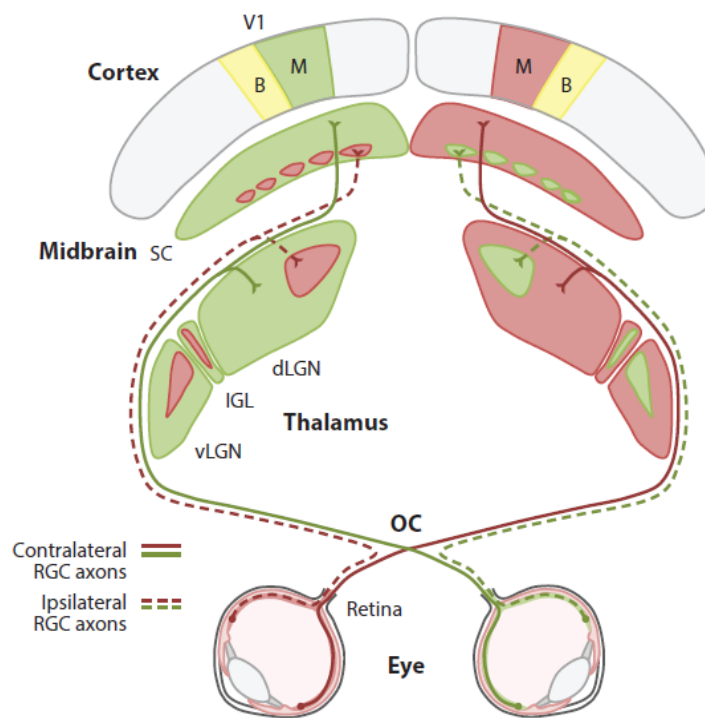
y en la contralateral a tiempos largos, que coincide con la muerte de las mismas y es, por tanto, un marcador de viabilidad (Galindo-Romero et al., 2011a, 2013a; González-Riquelme et al., 2023; Nadal-Nicolás et al., 2009). En cambio, las CGRip son detectables por su expresión de melanopsina, sólo presente en este subtipo celular (Galindo-Romero et al., 2013a).

#### 1.4.2.2 Nervio óptico y vía visual

Independientemente de su función y su localización, cada CGR proyecta su axón que se une al resto de axones de las CGR en la CFNR, formando una capa de axones amielínicos que viajan hacia la papila para formar el NO. Para salir de la esclera, en humanos atraviesan una región colaginososa fenestrada denominada lámina cribosa. En roedores, no existe una estructura tan bien diferenciada, pero resulta equivalente a la del primate u otros mamíferos superiores (L. Chen et al., 2016). A su salida del globo ocular, los axones se mielinizan y constituyen el NO, el segundo y único nervio craneal considerado como parte del SNC (Graw, 2010).

Ambos NO llegan al quiasma óptico, donde los axones se decusan al tracto óptico contralateral. En roedores, esta decusación es casi completa (95% de los axones de las CGR), sólo una minoría proyecta ipsilateralmente, mientras que en humanos la decusación es de aproximadamente el 50% (Lund, 1965; Nadal-Nicolás et al., 2012; Salinas-Navarro, Jiménez-López, et al., 2009).

Las CGR de roedores proyectan a 6 regiones del cerebro: NSQ, núcleo óptico accesorio, núcleo pretectal, núcleo accesorio, NGdL y el CS. No obstante, la región recitino-recipiente principal son los CS, situados en las regiones dorsolaterales del mesencéfalo (Linden & Perry, 1983; Lund, 1965; Rodieck, 1979) (**Figura 21**); a diferencia de los primates (y los humanos), donde el área retino-recipiente principal es el NGdL.

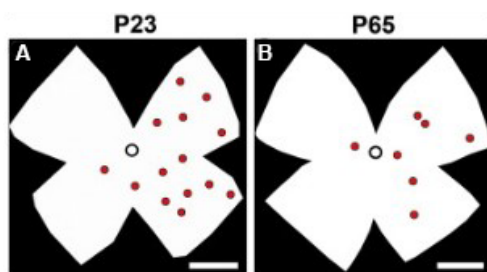


**Figura 21. Esquema de la vía visual del ratón.** Los axones de las CGR mantienen una organización retinotópica a lo largo de toda la vía visual. A su salida del globo ocular, constituyen los nervios ópticos, que se decusan en el quiasma (línea continua) salvo un 5% de los axones (línea discontinua), formando los tractos ópticos. Estas proyecciones se dirigen a varias regiones cerebrales, a destacar el núcleo geniculado dorsolateral (dLGN) y el colículo superior (SC). Las neuronas del dLGN envían sus axones a la corteza visual primaria (V1): la zona monocular o M sólo recibe información del ojo contralateral y la zona binocular o B recibe ímputs de ambos ojos. Imagen tomada y modificada de (Seabrook et al., 2017).

Las CGRip proyectan sus axones a diferentes núcleos cerebrales de los que proyectan las CGR. El principal centro retinorecipiente de CGRip es el NSQ, cuya función principal es la regulación de los ritmos circadianos mediante la estimulación de la secreción de melatonina por la glándula pineal (Gooley et al., 2001; Hannibal et al., 2002). Las proyecciones de las CGRip responsables del reflejo pupilar llegan a la lámina intergeniculada y al núcleo de la oliva pretectal. Las CGRip, al contrario que el resto de las CGR, no mantienen la típica ordenación retinotópica (Vidal-Villegas et al., 2021).

Una pequeña proporción de axones de las CGR, proyectan sus axones a la retina contralateral, son las denominadas CGR retino-retinianas (CGR ret-ret) (Avellaneda-Chevrier et al., 2015). Las CGR ret-ret han sido descritas en anuros (Tennant et al., 1993) y mamíferos (Müller & Holländer, 1988; Thanos, 1999), principalmente roedores (Avellaneda-Chevrier et al., 2015; Bunt et al., 1983; Nadal-Nicolás, Valiente-Soriano, et al., 2015) (**Figura 22**).

La función de las CGR ret-ret no está bien establecida. Aunque se ha demostrado su presencia a nivel histológico y que son células funcionalmente activas, pudiendo comunicar directamente ambos ojos entre sí, no conocemos su función (Tang et al., 2016). Dado que existe un mayor número de CGR ret-ret en ratones jóvenes que va disminuyendo conforme el animal se hace adulto, se cree que ayudan al desarrollo paralelo entre ambas retinas (Nadal-Nicolás, Valiente-Soriano, et al., 2015). En roedores adultos, las CGR ret-ret representan un bajo porcentaje de la población total de las CGR y se sitúan y proyectan en la retina nasal. En rata albina suponen el 0,006% de la población de CGR y en ratón pigmentado el 0,03% (Nadal-Nicolás, Valiente-Soriano, et al., 2015). En humanos se ha podido demostrar la presencia de fibras que llegan a la retina a través de la papila, pero no hay estudios precisos que documenten ni cuantifiquen la existencia de CGR retino-retinianas (Honrubia & Elliott, 1968).



**Figura 22.** Esquema representativo de las CGR retino-retinianas. El esquema representa dos retinas montadas a plano. Cada punto equivale a una CGR que proyecta a la retina contralateral. Las CGR fueron identificadas con marcaje retrógrado desde el ojo contralateral en edades postnatales 23 y 65. Imagen tomada de (Nadal-Nicolás, Valiente-Soriano, et al., 2015).

### 1.4.3 CÉLULAS DE LA GLÍA DE LA RETINA.

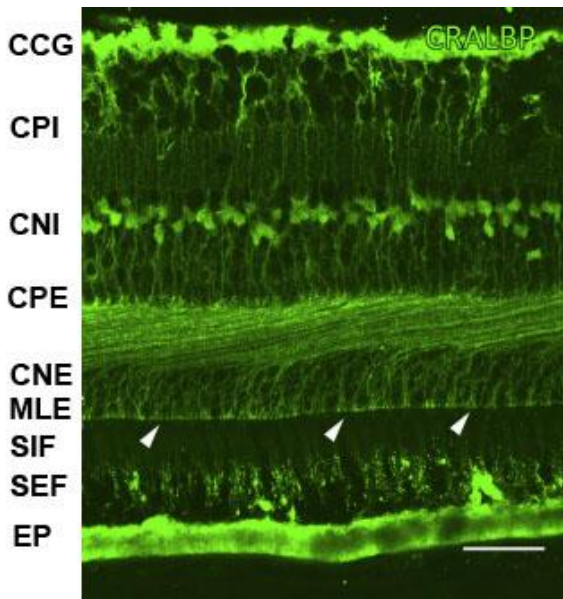
Además de las neuronas, la retina contiene varios tipos de células gliales que, a diferencia del resto del SNC, se encuentran una menor proporción respecto a las neuronas. Podemos diferenciar una población de CMA, formada por astrocitos y células de Müller, y la CMI.

#### 1.4.3.1 Células de Müller

Las células de Müller son un tipo específico de glía de la retina y constituyen la población predominante. Se disponen verticalmente a lo largo de todo el espesor de la retina: el soma se encuentra en la CNI, desde donde se extienden dos prolongaciones en sentidos opuestos, una hacia la MLE y otra a la MLI (García & Vecino, 2003) (**Figura 23**).

Se cree que su función principal es el mantenimiento de la citoarquitectura de la retina, pero también son esenciales para mantener la homeostasis retiniana (Kanamori et al., 2005) o

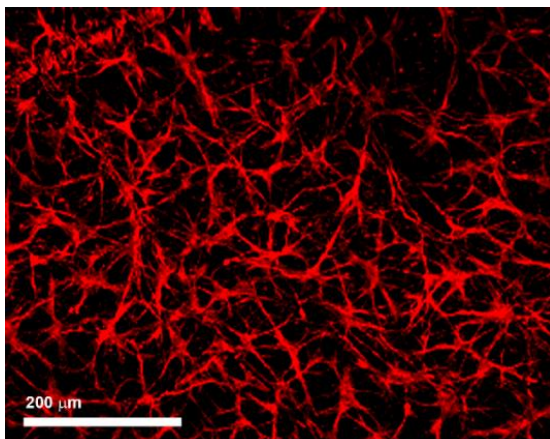
promoviendo la supervivencia de las CGR mediante la producción de factores neutróficos como el factor neurotrófico ciliar (Kugler & Beyer, 2003; Pease et al., 2009).



**Figura 23.** Sección de retina humana teñida con anticuerpos contra la proteína fijadora de retinaldehído celular (CRALBP). Se pueden apreciar los somas de las células de Müller en la CNI, sus procesos internos que se dirigen hacia el interior de la retina (arriba en la imagen) y sus procesos externos, que forman la MLE (puntas de flecha). Imagen cedida por el Dr. Fernando Lucas.

#### 1.4.3.2 Astrocitos

Son células con morfología estrellada por las numerosas prolongaciones citoplasmáticas irradiadas desde el soma (**Figura 24**). Se disponen en la parte más interna de la retina, en la CFNR y CGR, y alcanzan una mayor densidad en la papila, punto de salida del NO. Presentan una relación estrecha con los vasos sanguíneos y forman parte de la barrera hematorretiniana (**Ver Apartado 1.1.2. Células de la Glía**) (Bodnar et al., 2021; Kanamori et al., 2005). Su principal función es crear una red de soporte físico y metabólico a las neuronas, pero también intervienen en mantener la homeostasis retiniana mediante procesos inflamatorios incluso con capacidad fagocítica (Nguyen et al., 2011).

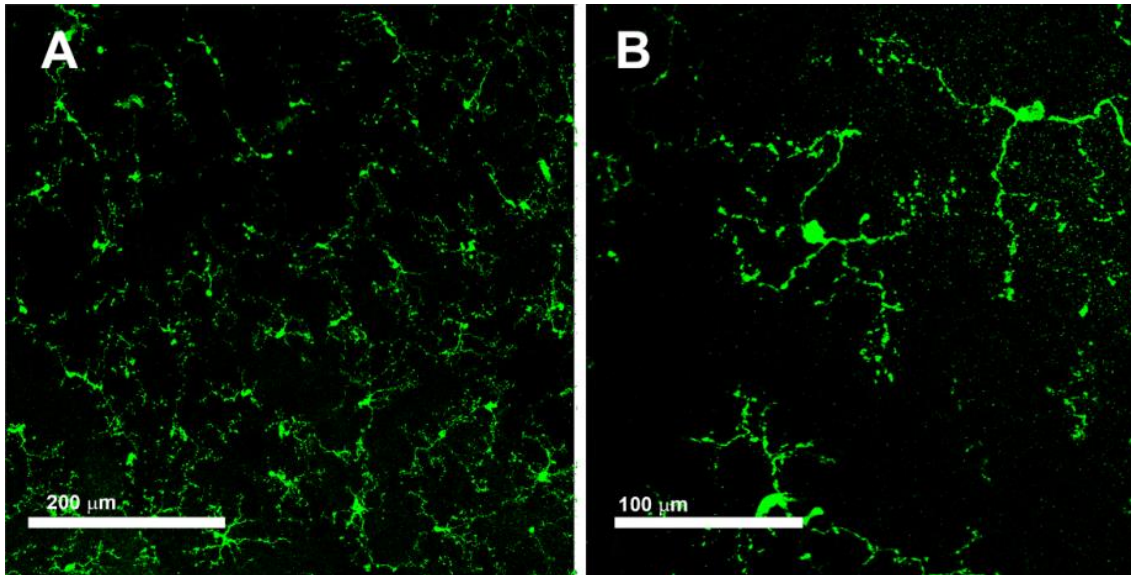


**Figura 24.** Imagen de microscopía confocal de astrocitos de la retina de ratón. En la fotografía se muestra una magnificación de retina de ratón montada a plano con astrocitos inmunodetectados con anticuerpos anti-GFAP. Imagen cedida por el Dr. Johnny di Pierdomenico.

Tanto los astrocitos como las células de Müller expresan GFAP (Gardner et al., 1997), una proteína constituyente de los filamentos intermedios del citoesqueleto, por lo que la inmunodetección de la misma nos permitirá la identificación de estas células o estudiar los cambios en su morfología respecto a distintos estímulos (Varela & Hernandez, 1997).

### 1.4.3.3 Microglía

En la retina adulta, se encuentran de forma preferente en la CFNR, CCG, CPI y CPE (Nadal-Nicolás et al., 2017; Sobrado-Calvo et al., 2007) (**Figura 25**). De forma constitutiva, las CMi expresan Iba1 y baja expresión de Clúster de Diferenciación 68 (CD68) (D. Ito et al., 1998). Como se ha expuesto en el **Apartado 1.1.2. Células de la Glía**, su función principal es la vigilancia inmunitaria, para lo que adaptan su morfología en función de su estado funcional (Paolicelli et al., 2022).



**Figura 25.** Imagen de microscopía confocal de células de la microglía de la retina de ratón. **A.** Imagen de microscopía confocal (10X) en la que se muestra una magnificación de retina a plano de ratón con células la CMi de la CCG inmunodetectadas con el anticuerpo anti-Iba1 en estado homeostático (Paolicelli et al., 2022). **B.** Magnificación 20X. Imagen cedida por el Dr. Fernando Lucas-Ruíz.

## 1.5 MODELOS DE DEGENERACIÓN DEL SNC

La retina es un modelo de estudio del SNC ampliamente utilizado debido a que su anatomía organizada en capas es bien conocida (Cajal et al., 2021; Dowling, 2012; Galindo-Romero et al., 2011a; Nadal-Nicolás, Valiente-Soriano, et al., 2015; Salinas-Navarro, Jiménez-López, et al., 2009); es fácilmente accesible, lo que permite su estudio anatómico y funcional (Gallego-Ortega et al., 2020; Kasi et al., 2019; Sims et al., 2021); y se pueden hacer

pruebas terapéuticas con diferentes vías de administración (Lindqvist et al., 2004; Lucas-Ruiz et al., 2019; Parrilla-Reverter et al., 2009).

Existen modelos de degeneración retiniana hereditaria (degeneración de fotorreceptores o hipertensión ocular) o inducida (axotomía, exotoxicidad, isquemia o hipertensión ocular), entre los que se encuentran:

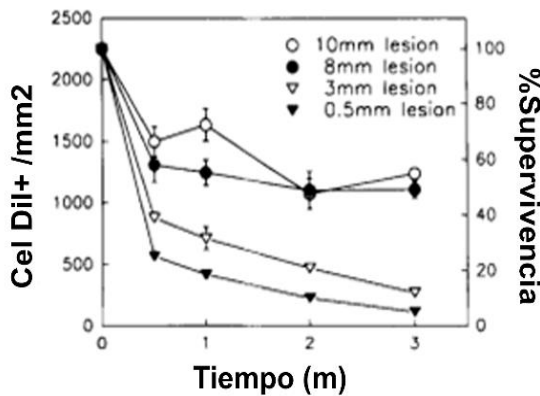
- Sección del nervio óptico, SNO (Vidal-Sanz et al., 1987; Villegas-Pérez et al. 1988, 1993; Sharma et al., 2012; Choe et al., 2014; Sánchez-Migallón et al., 2018).
- Hipertensión ocular, OHT (Wang et al., 2000; Ramírez et al., 2010; 2020a, b; Gallego et al., 2012; De Hoz et al., 2013; Frankfort et al., 2013; Chen et al., 2015; Sapienza et al., 2016; De Hoz et al., 2018; Tribble et al., 2019).
- Isquemia/reperfusión (Gallego-Ortega et al., 2020; Lafuente et al., 2001; Sellés-Navarro et al., 1996; Kerr et al., 2012; Ulbrich et al., 2016).
- Inyección intravítrea (Lam et al., 1996; Di Pierdomenico et al., 2016; Vidal-Villegas et al., 2019).
- Trauma ocular (Lam et al., 1996; Bricker-Anthony and Rex, 2015).
- Aplastamiento del nervio óptico, ApNO (Macharadze et al., 2009; Lehmann et al., 2010; Huang et al., 2018; Sánchez-Migallón, 2018; Lucas-Ruiz et al., 2019; Mesentier-Louro et al., 2019). Dado que el modelo usado en esta Tesis es el ApNO, nos centraremos en el estudio del mismo de aquí en adelante.

### **1.5.1 APLASTAMIENTO DEL NERVIÓ ÓPTICO COMO MODELO DE DEGENERACIÓN DEL SNC**

#### **Neurodegeneración**

El ApNO es un modelo ampliamente estudiado como degeneración neuronal del SNC dado que la lesión produce una muerte por apoptosis de la mayoría de las CGR (Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás, Valiente-Soriano, et al., 2015; Parrilla-Reverter et al., 2009; Sánchez-Migallón et al., 2011, 2016, 2018; Vidal-Sanz et al., 2000; Villegas-Pérez et al., 1988, 1993) (**Figura 26**).

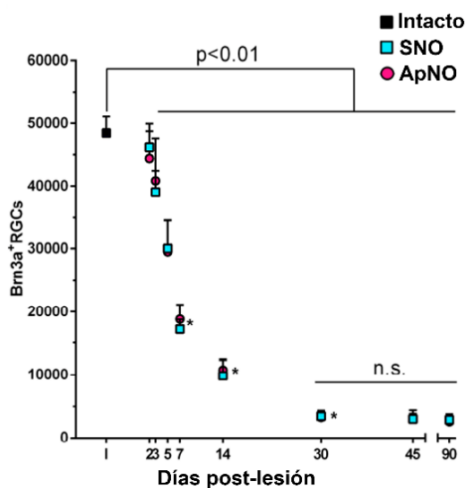




**Figura 26.** Curso de muerte de las CGR tras una sección del nervio óptico en rata a diferentes distancias de la papila. La gráfica muestra que cuánto mayor es la distancia de la lesión al ojo, más lenta se produce la muerte. Tomada y modificada de (Villegas-Pérez et al., 1993).

La SNO, en la que se provoca un corte completo, produce un daño similar al descrito en el ApNO (Peinado-Ramón et al., 1996; Sánchez-Migallón et al., 2016) (**Figura 27**). En definitiva, la axotomía por ApNO o SNO, produce una degeneración anterógrada, afectando al resto del segmento axonal que se incorpora a la vía visual, y retrógrada, lo que produce la muerte del soma (Hendry, 1975; Lam & Bray, 1992).

El patrón de muerte de CGR tras la axotomía del NO en el roedor sigue un patrón bien definido en el que se pueden diferenciar dos fases (**Figura 27**): una fase aguda durante los primeros 14 días en los que mueren el 85% de las CGR; y una fase crónica, en la que continúa la degeneración neuronal más lentamente, quedando a los 90 días entre 1-2% de las CGR (Barron et al., 1986; Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás, Valiente-Soriano, et al., 2015; Thanos, 1988; Villegas-Pérez et al., 1993). En rata, se ha descrito que este patrón temporal difiere en función de la distancia a la que se practique la lesión en el NO con respecto al globo ocular: las secciones más proximales a la retina (segmento del NO intraorbitario), producirían una muerte de CGR más rápida que las más distales (segmento del NO intracraneal) (**Figura 26**) (Domenici et al., 1991; Villegas-Pérez et al., 1988, 1993). En el ratón, sólo se han estudiado distancias intraorbitarias, y el curso de muerte no se modifica entre ellas (Lucas-Ruiz, Galindo-Romero, Rodríguez-Ramírez, et al., 2019).



**Figura 27. Curso temporal de muerte de CGR de la retina lesionada tras SON y ApNO en ratón.** En ratón no existe diferencia entre ambas lesiones. A los 3 días, se produce un descenso significativo de CGR y en los primeros 14 días se provoca la degeneración de casi el 85% de las CGR. Tomada y modificada de Sánchez-Migallón y cols, 2016.

Teniendo en cuenta que aproximadamente el 40% de las células que conforman la retina son CGR, su muerte genera una atrofia de la CFNR observable por OCT (Chauhan et al., 2012; Choe et al., 2014; Nadal-Nicolás, Sobrado-Calvo, et al., 2015). No obstante, existe un margen temporal entre la muerte de las CGR y la desaparición de sus axones intrarretinianos, que es la causante del descenso de grosor de la CFNR (Liu et al., 2014; Munguba et al., 2014). Por ejemplo, en rata albina existe un margen de aproximadamente 9 días entre la desaparición de las CGR y sus axones intrarretinianos, siendo evidente de forma inicial a los 12 días tras el ApNO y progresando hasta los 4 meses (atrofia del 72% de CFNR). De hecho, en los primeros 3 a 12 días tras el ApNO, se puede observar un engrosamiento en la CFNR a nivel del disco óptico, hasta que posteriormente comienza la atrofia, que comienza a ser significativa a los 21 días (Rovere et al., 2015). Estos hallazgos también se han podido observar en modelos de OHT aguda o crónica (C. J. Abbott, Choe, Burgoyne, et al., 2014; C. J. Abbott, Choe, Lusardi, et al., 2014), podrían ser consecuencia de la reacción glial y la inflamación secundaria al daño, y contribuirían además a limitar el flujo axónico anterógrado (Pease et al., 2000; Rovere et al., 2016).

Sin embargo, el grosor y la funcionalidad de la retina más externa parecen no afectarse tras la axotomía, sugiriendo que la retina podría ser capaz de compartimentalizar el daño tras la axotomía (Lypka et al., 2022).

La muerte rápida de las CGR tras la axotomía podría deberse a la falta de aporte de factores neurotróficos, que de forma natural reciben retrógradamente desde el cerebro, además de la vía intraocular a través del epitelio pigmentario y las células de Müller (Almasieh et al., 2012; Kolomeyer & Zarbin, 2014). El ApNO supone una alteración del citoesqueleto de los axones y un enlentecimiento del transporte de proteínas a través del mismo (McKerracher et al., 1990). De forma similar, en un modelo de axotomía por OHT, se



demuestra la interrupción del transporte retrógrado de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) y de su receptor TrkB (Pease et al., 2000). De hecho, existen numerosos trabajos que describen la eficacia de los factores neurotróficos tras la axotomía del NO como neuroprotectores para la muerte de las CGR (Galindo-Romero et al., 2013a; Parrilla-Reverter et al., 2009; Sánchez-Migallón et al., 2011, 2011).

La axotomía del NO produce una muerte selectiva de las CGR, ya estén en la CCG o se encuentren desplazadas, sin afectar a otras neuronas retinianas, como las células amacrinias desplazadas (Nadal-Nicolás, Sobrado-Calvo, et al., 2015; Villegas-Pérez et al., 1993). La muerte se produce por apoptosis dependiente de Caspasa-3 cuya forma activa sólo se expresa en las CGR. Durante los primeros 9 días tras el ApNO, la mitad de las CGR expresan niveles inmunodetectables de Caspasa-3 activa (Sánchez-Migallón et al., 2016), y a nivel de ARN, esta sobreexpresión se detecta a los 3 días (Lucas-Ruiz, Galindo-Romero, Rodríguez-Ramírez, et al., 2019). No obstante, se han descrito otros mecanismos de apoptosis caspasa-independiente en cultivos de CGR (Tezel & Yang, 2004).

La pérdida de CGR tras axotomía del NO, por SNO o ApNO, ha sido estudiada en profundidad en ratón pigmentado y albino (Galindo-Romero et al., 2011a, 2013a; Sánchez-Migallón et al., 2016, 2018), en rata albina (Parrilla-Reverter et al., 2009; Sánchez-Migallón et al., 2011; Villegas-Pérez et al., 1993) así como en cultivos organotípicos de retina (González-Riquelme et al., 2023). Se han demostrado alteraciones funcionales (Casson et al., 2004; McGrady et al., 2022), metabólicas (Agudo-Barriuso et al., 2013; Lindqvist et al., 2002) y de expresión génicas (Agudo et al., 2008, 2009; Nadal-Nicolás et al., 2009). Por ello, constituye un buen modelo para el estudio de neurodegeneración, respuesta inflamatoria y neuroprotección (Galindo-Romero et al., 2013a; Lucas-Ruiz et al., 2019; Sánchez-Migallón et al., 2016, 2016).

### **Inflamación**

Las CMi, que en homeostasis se sitúan en las capas más externas de la retina (CFNR, CCG, CPI y CPE), migran hasta la CCGR y la CFNR, donde se está produciendo la muerte neuronal descrita. Las CMi expresan marcadores de activación como CD68 y CD206 (González-Riquelme et al., 2021).

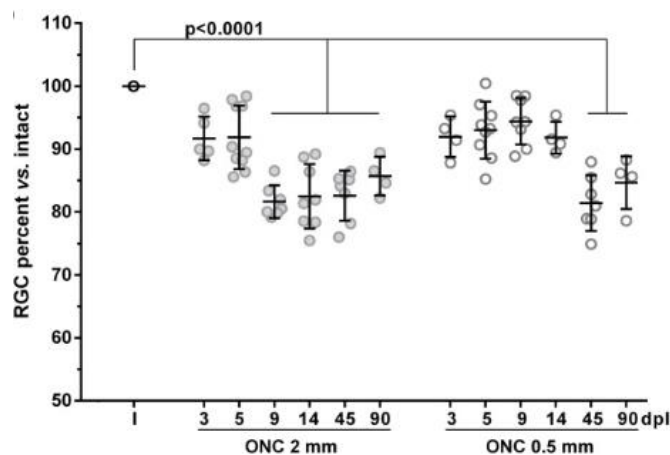
Las CMA, astrocitos y células de Müller, presentan una respuesta también localizada fundamentalmente en la CCG, donde se ha podido demostrar una hipertrofia transitoria en los primeros 9 días tras el ApNO (González-Riquelme et al., 2021).

### 1.5.1.1 Respuesta de la retina contralateral tras la axotomía del nervio óptico

Varios modelos experimentales han demostrado que la lesión unilateral en la retina o en el NO produce una respuesta en la retina contralateral, siempre de menor intensidad a la retina ipsilateral pero significativamente mayor a una retina intacta. Los modelos más estudiados son el de OHT (Gallego et al., 2012; Ramírez et al., 2010; Rojas et al., 2014) y el ApNO (Bodeutsch et al., 1999; Galindo-Romero et al., 2013b; González-Riquelme et al., 2021; Macharadze et al., 2009; Sánchez-Migallón et al., 2018; Sobrado-Calvo et al., 2007). Para su exposición en este apartado, nos centraremos en el ApNO.

#### Neurodegeneración

El ApNO produce en ratones adultos la muerte del 15% de la población de CG de la retina contralateral en los primeros 45 días, sin que haya un fenómeno de neurodegeneración progresivo posterior como se describía en la retina ipsilateral. La muerte de las CGR es más precoz (9 días tras la lesión) si el ApNO se ha realizado a 2 mm de la salida del NO ipsilateral -es decir, más cerca del NO contralateral- que si se realiza a 0,5 mm (45 días) (Bodeutsch et al., 1999; Lucas-Ruiz et al., 2019; Macharadze et al., 2009) (**Figura 28**). Se ha demostrado una sobreexpresión de *Caspasa-3* coincidente con estos tiempos estudiados, por lo que se presupone que la muerte es por apoptosis (Lucas-Ruiz, Galindo-Romero, Rodríguez-Ramírez, et al., 2019). No obstante, no se ha podido demostrar que el número de CGR *Caspasa-3*<sup>+</sup> incremente, probablemente sea una cuestión técnica en relación a la expresión transitoria (Sánchez-Migallón et al., 2016).



**Figura 28. Curso temporal de muerte de CGR de la retina contralateral tras el ApNO a 2 o 0,5 mm del ojo ipsilateral a la lesión.** Cuando el ApNO se realiza a 2 mm, el primer descenso significativo se produce a los 9 días y, a 0,5mm, a los 45 días. En ambos casos, el ApNO provoca la muerte del 15% de CGR en los primeros 45 días, sin neurodegeneración posterior. Tomada y modifica de (Lucas-Ruiz, Galindo-Romero, Rodríguez-Ramírez, et al., 2019).

Dado que la muerte de CGR es mucho más limitada en la retina contralateral, no se ha demostrado edema transitorio ni atrofia de CFNR medida por OCT (Rovere et al., 2015).

### Inflamación

En la retina contralateral al ApNO, hay trabajos que demuestran aumento del número de CMi (Galindo-Romero et al., 2013a; Panagis et al., 2005) y otros que demuestran que no proliferan ni cambian su disposición (S. Liu et al., 2012). No obstante, se ha comprobado que existe una activación microglial fagocítica mediante la expresión de CD68+ y menos CMi CD206+ que en la retina lesionada (González-Riquelme et al., 2021).

El resumen de la respuesta en la retina lesionada y contralateral al ApNO se expone en la **Tabla 1**, a continuación.

	Retina ipsilateral	Retina contralateral
<b>CGR</b>	1ª fase (0-14 días): muerte del 85% de las CGR.  2ª fase (0-90 días): muerte del resto hasta 2% a los 90 días.	Fase única (0-45 días): muerte del 15% de las CGR, posteriormente estable*.
<b>CMi</b>	Morfología de CMi activa.  Migración de capas externas a internas.	Morfología de CMi activa.  No cambios en disposición.
<b>CMa</b>	No cambios en disposición.  Hipertrofia transitoria a los 9 días.	No cambios en disposición.  Hipertrofia transitoria a los 3 días.

**Tabla 1. Resumen de respuesta de retina lesionada y contralateral al ApNO.** Ambas sufren neurodegeneración y activación glial, siendo ambos procesos de mayor intensidad en la retina del ApNO. \*Muerte del 15% de CGR, a los 45 días si el ApNO es a 0,5 mm y a los 9 días si el ApNO es a los 2 mm.

El estudio del efecto contralateral en el SNC ha sido estudiado fundamentalmente en modelos animales y los ejemplos de afectación contralateral en los humanos son escasos.

La oftalmia simpática es una enfermedad en la que los pacientes que tienen un daño traumático en un ojo, presentan una reacción inflamatoria uveal en el ojo contralateral (Cunningham et al., 2017). No obstante, también se ha explicado por un mecanismo autoinmune antígenos oculares liberados tras la lesión inicial. Aunque el modelo del ApNO podría inducirnos a su traslación a las neuritis ópticas, lo cierto es que su fisiopatología inflamatoria hace que se estudien mejor mediante el modelo de encefalitis autoinmune experimental (Redler & Levy, 2020). En el caso de las neuritis ópticas en la Esclerosis Múltiple, dado que existe un fenómeno neurodegenerativo progresivo con adelgazamiento de CFNR en ambas retinas, no se ha podido demostrar un efecto retino-retiniano (Petzold et al., 2017). En el caso de las neuritis ópticas asociada a anticuerpos anti-AQ4 (Neuromielitis Óptica) o anticuerpos anti-MOG (Enfermedad asociada a anticuerpos anti-MOG), dado que en ambos casos hay un daño inflamatorio primario en la retina, tampoco se ha demostrado un efecto contralateral (Oertel et al., 2021). No obstante, Oertel y colaboradores (Oertel et al., 2022) observaron que los pacientes con neuritis óptica asociada a anticuerpos anti-MOG presentan menor grosor de la CFNR en el ojo no afecto que pacientes anti-MOG positivos sin neuritis óptica, sugiriendo un daño retino-retiniano contralateral.

### **1.5.1.2 Mecanismos implicados en la respuesta contralateral en el ApNO.**

Se han propuesto 5 mecanismos implicados en la respuesta contralateral, que actuarían por separado o de forma conjunta (de Hoz et al., 2013; Gallego et al., 2012; Lucas-Ruiz et al., 2021; Ramírez et al., 2010, 2015):

- **Muerte de las CGR retino-retinianas:** La axotomía del NO provocaría un daño primario en las CGR que proyectan su axón a la retina contralateral, cuya degeneración walleriana podría ser el desencadenante de la respuesta en el lado opuesto.
- **Liberación de señales de estrés por las CGR retino-retinianas:** Varios trabajos han demostrado la sobreexpresión en la retina contralateral de marcadores de muerte neuronal y citoquinas pro-inflamatorias (Bodeutsch et al., 1999; Lucas-Ruiz, Galindo-Romero, Salinas-Navarro, et al., 2019; Macharadze et al., 2009).
- **Propagación de la reacción glial desde el NO dañado a la retina contralateral a través del quiasma.** La respuesta glial sería la responsable de extender la respuesta inflamatoria.
- **Degeneración retrógrada en la retina de las áreas cerebrales desafrentadas:** El 5% de las CGR de la retina contralateral a la lesión que no decusan y proyectan directamente al CS de su lado, que sería el desafrentado por la axotomía, vehicularían el daño de forma retrógrada.

- **Efecto sistémico:** En un modelo de OHT, se ha demostrado infiltración monocitaria sanguínea en la retina contralateral (Tribble et al., 2021). Además, la propia intervención quirúrgica o la manipulación animal, podrían favorecer una reactividad en ambas retinas (Lönngren et al., 2006).

### 1.5.2 EFECTO CONTRALATERAL O REMOTO A LA AXOTOMÍA DEL NERVIÓ ÓPTICO EN OTRAS ÁREAS DEL SNC

En estudios de axotomía por SNO en rata, se ha descrito una disfunción de la BHE desde la zona de la lesión y en toda la vía visual (Smith et al., 2016, 2018). Esto contribuye a la inflamación y la gliosis en las zonas de proyección de las CGR (Smith et al., 2018). Además, se ha demostrado degeneración neuronal anterógrada en el NGdL y en la corteza visual primaria (You et al., 2012).

En regiones fuera de la vía visual, aunque hay mucha literatura que describe la inflamación inducida por un daño traumático en la zona primaria de estímulo o adyacente, el efecto neuroinflamatorio o degenerativo remoto, contralateral o no, está menos caracterizado (Block et al., 2005; Viscomi & Molinari, 2014; Weishaupt et al., 2016).

En modelos de daño cerebral traumático, se ha observado que la lesión unilateral puede provocar una respuesta macro y microglial, ipsi y contralateral a la lesión (J. Zhao et al., 2019), con un aumento de citoquinas en el hemisferio no dañado (Niesman et al., 2014; Taib et al., 2017). A diferencia del trauma del ApNO, en el que se puede focalizar y dirigir el estímulo, un traumatismo craneal con una intensidad suficiente puede generar un daño axonal cerebral difuso con una respuesta inflamatoria global (Hill et al., 2016). No obstante, no se podría descartar que también intervengan los mecanismos descritos en el apartado anterior (J. Zhao et al., 2019).

Otros estudios describen que un daño traumático en la ME provocan activación glial en el cerebro (Hausmann, 2003). Además, un daño en un nervio periférico como el ciático puede alterar la barrera hemato-espinal y promover el desplazamiento de monocitos/macrófagos y de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  al parénquima de la ME (Echeverry et al., 2011).

A nivel clínico, es bien conocido el efecto que puede tener a distancia un daño en una zona concreta del SNC: la diasquisis (Finger et al., 2004). Se trata de un fenómeno fisiológico basado en la depresión reversible de funciones conectadas anatómica o funcionalmente al área lesionada (González-Aguado et al., 2000). Recientemente, se ha avanzado más en su estudio por las técnicas de neuroimagen funcional avanzada y por su potencial uso en rehabilitación (Demeurisse et al., 1990; Weishaupt et al., 2016). No obstante, la

fisiopatología subyacente sigue sin ser bien conocida y no está claro que sea un fenómeno inflamatorio.

### 1.5.2.1 Efecto en el Sham o inflamación vía sistémica

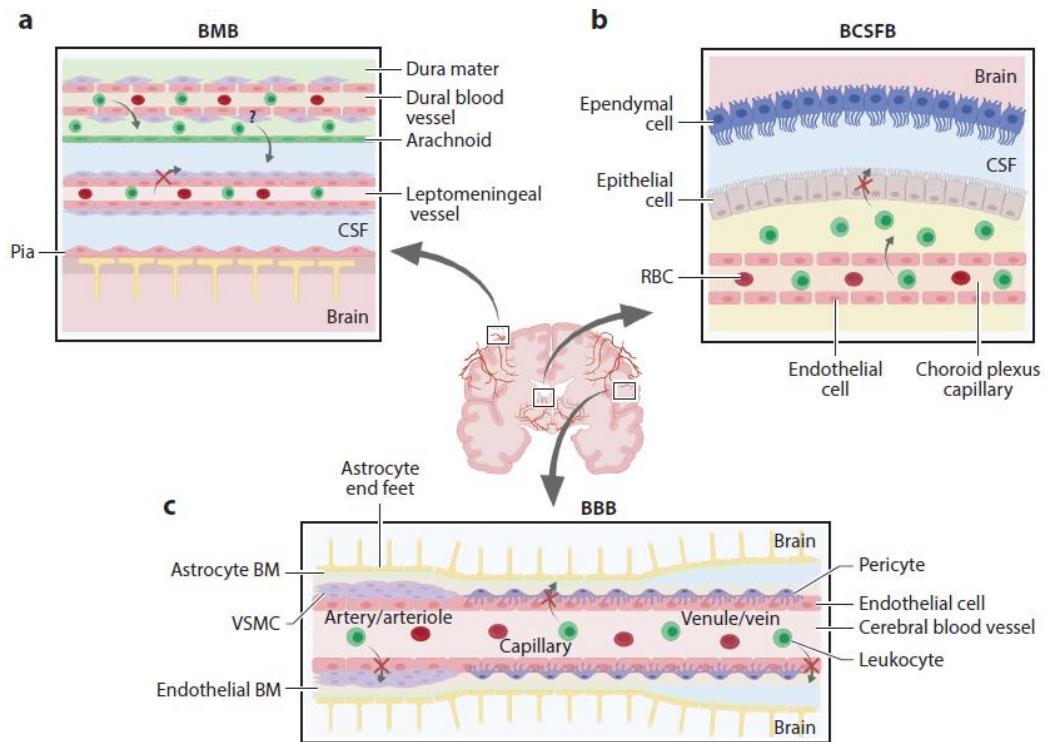
Por lo general, la intervención sobre un animal, por inocua que parezca, desencadena una respuesta que se ha podido observar principalmente en estudios que evalúan la respuesta inflamatoria. Algunos autores sugieren que la respuesta en la retina contralateral al ApNO, podría estar en relación con sensibilidad de las CMi a cualquier cambio que se produzca en el tejido nervioso (Lönngren et al., 2006; Thanos et al., 1996), aunque no se ha estudiado el tráfico de células del sistema inmune de fuera a dentro de la BHE.

De hecho, hay algunos trabajos que demuestran que diseños experimentales, a priori, Sham, generan una respuesta igual o mayor que el experimental. En términos de investigación, se considera Sham a la intervención en la que se realiza todo el procedimiento salvo la lesión objeto de estudio. Por ejemplo, en el trabajo de Ezaki y colaboradores (Ezaki et al., 2016) se demuestra que la neurodegeneración en hipocampo se relaciona más con la herida en el cuero cabelludo que con el traumatismo craneoencefálico.

La afectación en el cerebro a estímulos sistémicos es diversa. Por ejemplo, Hamadi y colaboradores (Hamadi et al., 2016) observaron que tras una adrenalectomía bilateral provoca gliosis y muerte neuronal en hipocampo más que en animales Sham. Aunque el mecanismo no está claro, podría ser consecuencia de la dependencia de las neuronas en hipocampo de las hormonas adrenocorticales. La inflamación sistémica sin un daño directo al SNC puede generar una respuesta inflamatoria: Brandi y colaboradores (Brandi et al., 2022) demuestran que la inyección intraperitoneal de LPS consigue la respuesta micro y microglial en 16 regiones de estudio cerebrales, como en la sepsis (Zrzavy et al., 2019). Un estímulo más focal, como una fractura ósea provocada en ratón, también induce la reactividad microglial (Lai et al., 2020).

## 1.6 LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

El SNC está rodeado por una serie de barreras que, aunque tradicionalmente se les atribuye un rol de aislamiento, realmente ejercen un papel de alta regulación para proteger el parénquima de posibles daños externos que accedan a través de la circulación sanguínea periférica. En la **Figura 29** se muestran las 3 barreras que recubren la superficie del SNC: la barrera hematomeníngea o subaracnoidea (BHM), sangre-líquido cefalorraquídeo o hematlíquido (BHL) y hematoencefálica (BHE) (en inglés "*Blood Brain Barrier, BBB*").



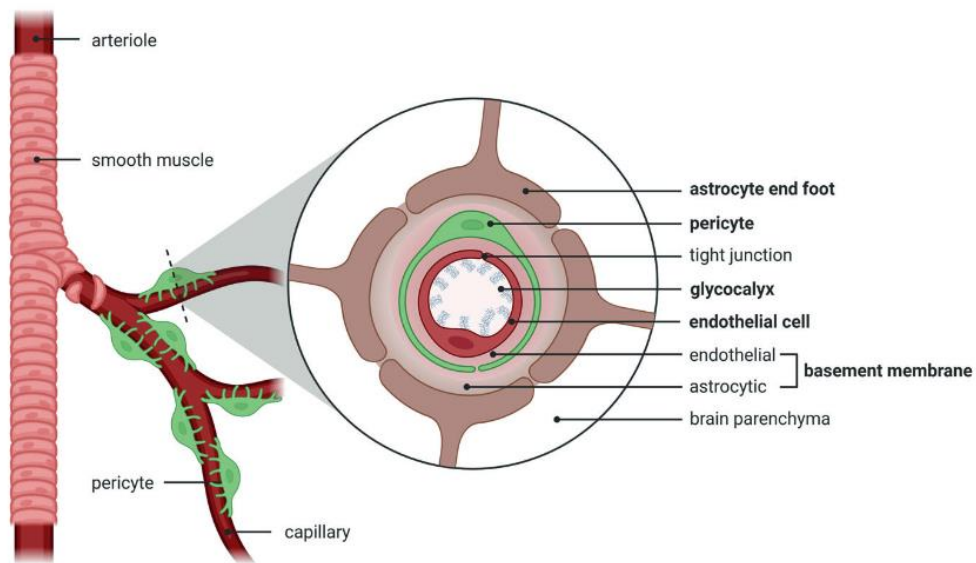
**Figura 29. Barreras celulares en la superficie del SNC.** Tomada de Alves de Lima et al., 2020.

De forma particular, nos centraremos en el estudio de la BHE. Se trata de una estructura altamente especializada que regula el microambiente del SNC y controla la comunicación con el resto del cuerpo con el objetivo fundamental de protegerlo de procesos sistémicos que puedan suponer un daño, como tóxicos, infecciones o inflamación.

### 1.6.1 ANATOMÍA DE LA BHE

La BHE puede definirse como una propiedad funcional de los vasos sanguíneos del SNC por la que se limita el intercambio libre de solutos entre el plasma sanguíneo y el tejido nervioso (Goldstein & Betz, 1986). La BHE está compuesta por varios componentes: componentes extracelulares (glicocálix y membrana basal) y celulares (células endoteliales, pericitos, astrocitos) (Bodnar et al., 2021; Galea, 2021) (**Figura 30**).





**Figura 30.** Esquema de la barrera hemato-encefálica. Imagen tomada de Galea, 2021.

**Glicocáliz.** El glicocáliz consiste en una red de glicosaminoglicanos segregado por las células endoteliales. Su principal función es la de ser un tamiz molecular que reduce la capacidad de difusión de moléculas mayores a 40 kiloDalton. Además, el glicocáliz posee una carga negativa que inhibe la permeabilidad de la BHE a las proteínas cargadas negativamente (Butt et al., 1990). Aunque es un elemento constitutivo en todo el árbol circulatorio, en el SNC adquiere mayor grosor. Ante inflamación sistémica, el glicocáliz reduce su grosor y aumenta su permeabilidad (N. J. Abbott et al., 2010; Erickson & Banks, 2018).

**Células endoteliales.** Presentan varias características que las diferencian del resto del árbol vascular:

- La presencia de un sellado intercelular del endotelio a través de “*tight junctions*” o uniones estrechas, unas estructuras celulares proteicas únicas al citoesqueleto que aproximan para unir las membranas lipídicas de células adyacentes. Funcionalmente, impiden cualquier comunicación directa entre los espacios intravascular y extracelular cerebral (Greene & Campbell, 2016; Huber et al., 2001; Tietz & Engelhardt, 2015).
- La ausencia de fenestraciones en las células endoteliales, excepto en los vasos de las áreas cerebrales sin BHE (Haddad-Tóvolli et al., 2017).
- La carencia relativa de vesículas de pinocitosis o endocitosis, en comparación con el elevado número de vesículas observable en otros órganos (N. J. Abbott et al., 2010).
- La presencia de un gran número de sistemas transportadores que controlan el intercambio de moléculas y menos proteínas de adhesión leucocitaria (Tietz & Engelhardt, 2015).

No obstante, las células endoteliales del SNC expresan receptores celulares capaces de responder a la inflamación sistémica (IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ ; por ejemplo) y alterar su funcionalidad (Engelhardt & Sorokin, 2009).

**Membrana basal.** La membrana basal (MB) es una matriz extracelular amorfa pero altamente organizada formada por 4 tipos de proteínas: colágeno IV, nidógenos, proteoglicanos, heparán sulfato y laminina. Estructuralmente, podemos diferenciar 2 capas, una de ella derivada del endotelio, y otra, de los astrocitos. Entre estas capas, existe un espacio perivascular donde residen macrófagos de forma fisiológica, con una función de limpieza (*scavenging*) pero capaces de responder a estímulos inflamatorios (Van Hove et al., 2019).

La MB juega un rol importante en la permeabilidad de la BHE a las células. La migración celular se produce en capilares y especialmente en las vénulas postcapilares. En la capa endotelial hay algunas zonas con baja expresión de laminina que actúan como puntos de salida para la extravasación celular. Tras atravesar la capa endotelial de la MB, los leucocitos acceden al espacio perivascular, donde pueden permanecer retenidos o atravesar la capa glial. Para ello, es necesario la escisión selectiva del destróglicano, un receptor celular que ancla los extremos de los astrocitos a la capa glial de la MB. Por tanto, la capa glial supone una barrera más importante que su homóloga endotelial (Castro Dias et al., 2019; Sofroniew, 2015).

**Pericitos.** Los pericitos son células derivadas de la cresta neural que se encuentran en envolviendo las células endoteliales de los capilares y vénulas de todo el cuerpo, siendo la proporción pericitos/endotelio en cerebro la más alta de todo el organismo. Los pericitos desempeñan un doble papel en la regulación de la BHE: por un lado, tienen la capacidad de inhibir la transcitosis y, por otro, pueden intervenir el flujo cerebral mediante la regulación del diámetro capilar (Armulik et al., 2010; Brown et al., 2019).

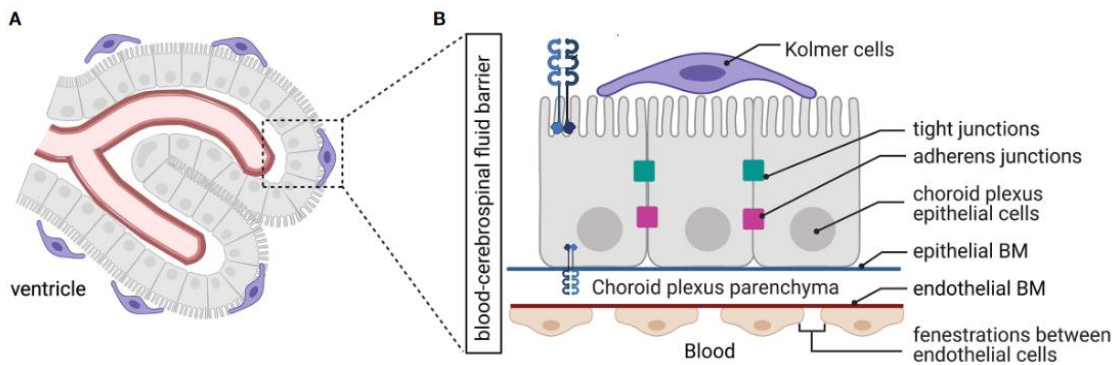
**Astrocitos.** Los pies astrocitarios constituyen la capa más interna de la BHE. Aunque no se unen entre sí, tienen capacidad de control sobre las uniones estrechas del endotelio a través de la síntesis de angiotensinógeno o angiopoyetina-1. Además, expresan aquaporina 4 (AQ4), lo que permite regular el flujo de agua en la BHE (Neuwelt et al., 2011).

## 1.6.2 OTRAS BARRERAS ANATOMO-FUNCIONALES EN EL SNC

### 1.6.2.1 La barrera sangre-líquido cefalorraquídeo

La barrera hematoquefálica es la que se encuentra presente en los plexos coroideos, las estructuras encargadas de la producción de LCR (Liddelow, 2015) (**Figura 31**). Se

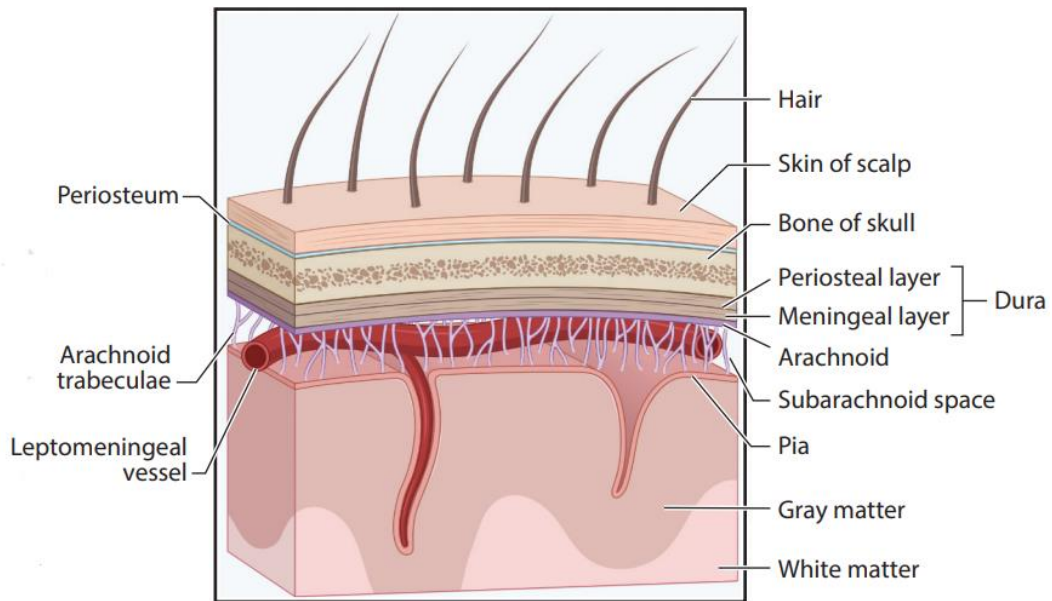
constituye un epitelio cuboide ciliado cuyas células permanecen unidas entre sí mediante uniones estrechas, similares a las de la BHE, tapizando los capilares fenestrados de los plexos coroideos. De forma análoga a los macrófagos que residen de forma fisiológica en el espacio perivascular de la BHE, en este caso se denominan como células de Kolmer y se sitúan unidas a las microvellosidades del epitelio (Gherzi-Egea et al., 2018; Ling et al., 1998). Al igual que las células endoteliales en la BHE, las células epiteliales tienen numerosos transportadores que permiten controlar el flujo de sustancias y monitorizar la composición de LCR (Bodnar et al., 2021; Engelhardt et al., 2001).



**Figura 31. Esquema de la barrera hematoliquoral.** A diferencia de la BHE, las células endoteliales de los capilares de los plexos son fenestradas y las uniones estrechas se establecen entre el epitelio cuboide ciliado. Tomada y modificada de (Bodnar et al., 2021).

### 1.6.2.2 La barrera meníngea o subaracnoidea

Las meninges son las membranas compuestas fundamentalmente por tejido conectivo que cubren y protegen el SNC (Alves de Lima et al., 2020) (**Figura 32**). Podemos diferenciar 3 capas con 2 espacios intermedios, de fuera hacia dentro. La duramadre limita con el periostio en el encéfalo y, bajo ella, se encuentra el espacio subdural, que contiene una escasa cantidad de LCR. La aracnoides se sitúa justo debajo de la duramadre y está compuesta por dos capas separadas: la capa celular, que supone una extensión de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo, y la capa trabecular, que delimita el espacio subaracnoideo, donde se encuentra la mayor cantidad de LCR y los vasos sanguíneos. La piamadre es la capa más profunda y se encuentra adherida a la superficie del cerebro o la ME, donde a su vez se dispone una densa red glial de astrocitos que se entrelazan con las células de la piamadre. La capa pial está compuesta por células mesoteliales planas superpuestas formando una capa conectiva estrecha, unidas por desmosomas y *gap junctions*, que hacen que sea impermeable al LCR. Esta capa permite separar físicamente los vasos sanguíneos: tanto en su recorrido por el espacio subaracnoideo como cuando entran en el tejido neural, aumentando así la eficacia de la BHE.



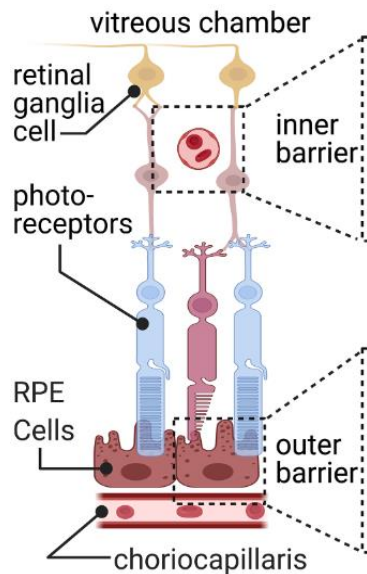
**Figura 32.** Esquema de la barrera meníngea. Tomada y modificada de Alves de Lima et al., 2020.

Recientemente, se ha descubierto una cuarta capa meníngea llamada membrana subaracnoidea linfática (SLYM, del inglés “*subarachnoid lymphatic-like membrane*”), que divide el espacio subaracnoideo en dos compartimentos diferentes. Se encuentra presente tanto en el humano como en el ratón. Morfo-inmunofenotípicamente es similar a una membrana mesotelial, se encuentra en íntima relación con el endotelio de los vasos venosos meníngeos y permite el intercambio de pequeños solutos entre el LCR y los vasos venosos (Møllgård et al., 2023).

### 1.6.2.3 La barrera hematorretiniana

Aunque el objetivo funcional es el mismo, la organización de la barrera hematorretiniana (BHR) es distinta a la de la BHE. En la retina, podemos diferenciar la BHR interna y externa, que son responsables de la irrigación de los 2/3 internos y del tercio externo, respectivamente, de la retina (**Figura 33**).

- La BHR interna es la que se conforma en toda la microcirculación retiniana y la que sigue una estructura similar a la BHE: células endoteliales unidas mediante uniones estrechas, pericitos y, además de astrocitos, células de Müller (Trost et al., 2016).
- La BHR externa actúa de limitante de la retina de la capa coriocapilar. Está formada básicamente el epitelino pigmentario de la retina, cuyas células se unen igualmente por uniones estrechas. Supondría una estructura equivalente a la barrera hematoliquoral (Cunha-Vaz et al., 2011).



**Figura 33. Esquema de la barrera hematorretiniana.** En la imagen se muestra la BHR externa y la BHR interna. Imagen modificada de (Bodnar et al., 2021).

### 1.6.3 PERMEABILIDAD DE LA BHE

La terminología para referirse a la permeabilidad de la BHE puede ser confusa en la literatura porque a menudo se ha relacionado con la difusión a través de la BHE. Sin embargo, aunque la difusión, el mecanismo por el que se produce paso de una sustancia de una zona de alta concentración a otra de baja sin aporte de energía, es un proceso importante; la mayoría de moléculas o células están sujetas a un transporte más específico.

La permeabilidad de la BHE puede verse afectada en función de diversos estímulos. Un aumento de la permeabilidad de la BHE, independientemente del origen, lleva a un daño neuronal mediado por células del sistema inmune y/o citoquinas pro-inflamatorias. Podemos diferenciar esta respuesta al cambio en función de si lleva consigo una rotura física (cambio disruptivo) o no (cambio no disruptivo) de los elementos que la integran (Varatharaj & Galea, 2017) (**Tabla 2**).

	<b>CAMBIO DISRUPTIVO DE LA BHE</b>	<b>CAMBIO NO DISRUPTIVO DE LA BHE</b>
<b>Modificación</b>	A nivel histológico	A nivel molecular
<b>Funcionalidad</b>	Cambio en anatomía	Cambio en función
<b>Detección</b>	Detectable usando trazadores inertes	No detectable usando trazadores inertes
<b>Especificidad</b>	No específicos	Específicos para algunas moléculas
<b>Transmigración celular</b>	No es necesario para que se produzca transmigración celular. Los cambios disruptivos pueden producirse si la transmigración es intensa.	Principal mecanismo subyacente en el tráfico celular.
<b>Cambios celulares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Glicocálix: degradación.</li> <li>-Endotelio: laxitud en uniones estrechas, aumento transcitosis, daño endotelial (endoteliopatía).</li> <li>-Membrana basal: degradación de capa glial.</li> <li>-Astrocitos: daño astrocitario (astrocitopatía).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Endotelio: producción de citoquinas, sobreexpresión de receptores celulares y transportadores.</li> <li>-Astrocitos: modulación de su función.</li> </ul>

**Tabla 2.** Características de los cambios disruptivo y no disruptivo de la BHE. Tomada y modificada de Varatharaj & Galea, 2017.

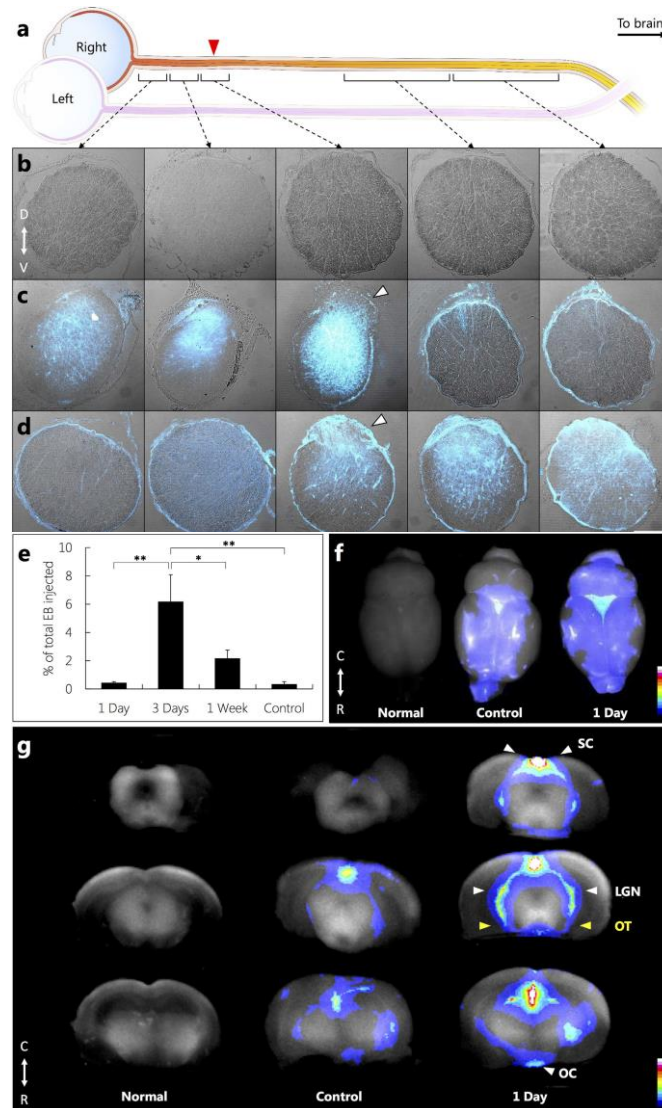
Habrán estímulos, como la inflamación (Schmitt et al., 2012), una infección sistémica (Galea, 2021) o un daño traumático fuera del SNC (S. Yang et al., 2017; T. Yang et al., 2020), que puedan provocar ambos cambios en función de su origen o intensidad (Varga et al., 2020). En cambio, causas que provoquen de forma intrínseca un daño claro de alguno de los elementos de la BHE (Smith et al., 2016), originarán de forma primaria un cambio disruptivo (Gust et al., 2017) y, de forma secundaria, una cascada inflamatoria que dará lugar al aumento de la permeabilidad de la BHE (Bodnar et al., 2021).

#### 1.6.4 LA BHE TRAS EL ApNO

La axotomía del nervio óptico, por ApNO o por SNO, supone un daño directo al SNC y su impacto en la permeabilidad de la BHE ha sido escasamente estudiado. Se ha demostrado que una SNO parcial en rata desencadena una apertura transitoria de la BHE en el quiasma, los tractos ópticos, los núcleos geniculados laterales y los CS mediante mapas de imagen multiespectrales (**Figura 34**) (Smith et al., 2016). En el estudio histológico del



cerebro en un trabajo posterior del mismo grupo, no detectaron fluorescencia Evans Blue, probablemente por el procesado, y sólo encontraron evidencia clara de permeabilidad de la BHE en el tracto óptico contralateral (Smith et al., 2018). Además, se detectaron macrófagos/microglía activada (Iba1<sup>+</sup> ED1<sup>+</sup>) en los ventrículos laterales (Smith et al., 2016), zona ya reconocida como de tráfico de células inflamatorias (Schmitt et al., 2012).



**Figura 34.** Permeabilidad de la BHE tras la sección del nervio óptico. La imagen muestra el recorrido de la fluorescencia *Evans Blue* en modelo de SNO parcial en rata adulta. Se observa permeabilidad de la BHE desde el día 1, siendo máxima a los 7 días (figura E). Imagen tomada de (Smith et al., 2016).

Por tanto, hasta el momento sólo hay evidencia de disfunción clara de la BHE en regiones cerebrales conectadas al estímulo primario.



## 1.7 NEUROINFLAMACIÓN

Como se ha expuesto en apartados anteriores, las células gliales ejercen un papel fundamental en la vigilancia del SNC. Ante un estímulo nocivo se activan dando lugar a una gliosis, lo que implica cambios morfológicos y moleculares que en el caso de que no se controlen pueden acabar en una disregulación glial que provoque disfunción o muerte neuronal. Tanto si el estímulo es directo sobre el SNC (por ejemplo, el ApNO) como si es un cuadro sistémico, la BHE o BHR pueden alterarse, afectando a la homeostasis del SNC.

En el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral, estudiaremos la respuesta inflamatoria y glial del SNC a nivel histológico y molecular. A continuación se detallan los marcadores de gliosis estudiados, que nos informarán de los cambios en la CMa y/o CMi; y los marcadores inflamatorios, que nos permitirá conocer el perfil pro- o antiinflamatorios producto principalmente de la glía o las células del sistema inmune. Además, evaluaremos la expresión de Caspasa-3 como marcador de apoptosis.

### 1.7.1 MARCADORES DE GLIOSIS

La CMi expresan en su membrana la proteína transmembrana adaptadora de unión de calcio ionizada (Iba1), y dado que la activación induce cambios morfológicos severos, constituye un buen marcador para evaluar los cambios morfológicos. Además, las CMi activadas sobreexpresan la proteína translocadora de la mitocondria (TSPO), así como la glicoproteína CD68, principalmente cuando adquieren capacidad fagocítica.

Las CMa estudiadas en esta Tesis, astrocitos y células de Müller en la retina, expresan GFAP (Gardner et al., 1997) en los filamentos intermedios del citoesqueleto, por lo que la inmunodetección de la misma permite la identificación de estas células o estudiar los cambios en su morfología respecto a distintos estímulos (Varela & Hernandez, 1997). Asimismo, expresan AQ4, el canal de agua más frecuente en el SNC.

Además, la glía o las neuronas, en condiciones patológicas, pueden expresar el Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (MHC II), una proteína heterodimérica propia de células presentadoras de antígenos como los linfocitos B, las células dendríticas o los macrófagos.

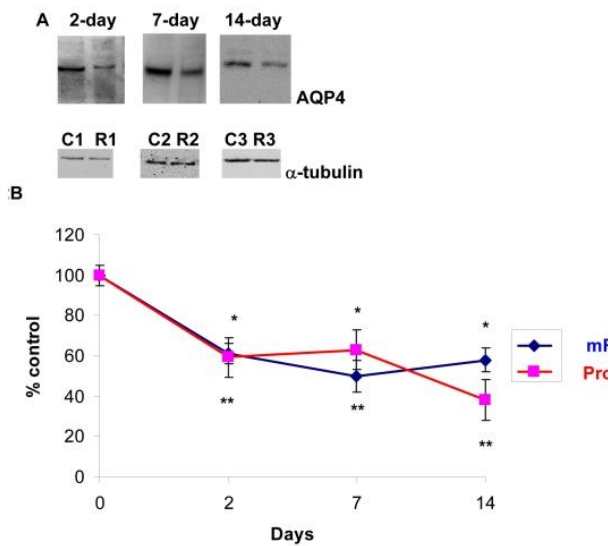
#### 1.7.1.1 AQ4

La AQ4 pertenece a la familia de las acuoporinas, canales transmembrana que transportan principalmente agua. Las acuoporinas presentan una expresión diferencial en función del tejido y su expresión y función se regula en respuesta a difentes señales celulares (Geng & Yang, 2017).

La AQ4 es la más prevalente en el SNC (Saadoun & Papadopoulos, 2010). A nivel cerebral, se encuentra localizada fundamentalmente en los pies astrocitarios que se disponen alrededor de la BHE y en los epindemocitos (Nagelhus et al., 2004). En el sistema visual, se encuentra en el NO y en la retina, principalmente en procesos celulares de las células de Müller (Gleiser et al., 2016).

La función principal de la AQ4 es participar en la homeostasis del SNC, fundamentalmente mediante el transporte de agua, pero también parece estar implicada en el balance iónico o en la eliminación de residuos (sistema glinfático) (Hubbard et al., 2018).

Dibas y colaboradores (Dibas et al., 2010) demostró en un modelo de ApNO en ratón que la expresión de AQ4 se redujo en los días 2, 7 y 14 tras el ApNO, sugiriendo una disfunción del intercambio de moléculas de agua tras el ApNO que podría interferir en la función retiniana (**Figura 35**).



**Figura 35. Expresión de AQ4 tras el ApNO.** El ApNO induce una infraexpresión de la proteína AQ4 medida por Western Blot (A) y de su ARNm (B) analizado por qPCR frente a la retina del animal intacto. Imagen tomada y modificada de (Dibas et al., 2010).

Su significación clínica más conocida es la Neuromielitis óptica, una enfermedad desmielinizante en la que en la mayoría de los pacientes se detectan anticuerpos anti-AQ4, dando lugar a una astrocitopatía que se manifiesta clínicamente en brotes inflamatorios en el NO (neuritis ópticas) o en la ME (mielitis longitudinalmente extensas), principalmente (Lennon et al., 2004; Sepúlveda et al., 2016).

### 1.7.1.2 GFAP

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es un filamento intermedio del citoesqueleto de los astrocitos y las células de Müller de la retina (Gardner et al., 1997). Su función fundamental

es proporcionar la citoarquitectura del astrocito para que actúe como célula de soporte físico y funcional de las neuronas (Z. Yang & Wang, 2015). La expresión de *Gfap* está regulada por numerosos factores, como la propia actividad neuronal, a través de cambios iónicos o por factores humorales, como algunas hormonas (D. Li et al., 2020).

La activación de los astrocitos (astrogliosis) lleva consigo un incremento de la expresión de GFAP, que puede ser consecuencia de estímulos inflamatorios, ictus, neurodegeneración o un daño traumático (Hol & Pekny, 2015; Olabarria & Goldman, 2017).

La expresión de *Gfap* en la retina tras el ApNO ha sido estudiada en modelos murinos. Por lo general, los estudios demuestran que el primer día tras el ApNO se mantiene sin cambios y se sobreexpresó a partir del segundo o tercer día de la lesión, siendo mantenido al menos 2 semanas (Chen & Weber, 2002; Dibas et al., 2010; Tonari et al., 2012). Por inmunohistoquímica, González-Riquelme y colaboradores (González-Riquelme et al., 2021) demostramos un incremento transitorio de astrocitos y células de Müller entre los 5 y 21 días tras el ApNO en la retina lesionada y sólo en el día 3 en la retina contralateral.

A nivel clínico, la medida de GFAP en sangre se puede usar como un biomarcador de un daño astrocitario. En enfermedades como la neuromielitis óptica, en la que los anticuerpos anti-AQ4 del pie astrocitario, causan una reacción inflamatoria glial, la GFAP puede liberarse al LCR y al suero (H. Kim et al., 2022; Schindler et al., 2023).

### 1.7.1.3 Iba 1

La proteína Iba 1 o proteína adaptadora de unión de calcio ionizada se codifica en el gen *Iba1* o *Aif1*. Esta molécula se expresa principalmente en CMi y células del sistema mononuclear fagocítico, como macrófagos y monocitos infiltrados (Ghosh, 2010). Se encuentra en el citoplasma e interactúa con el calcio y las fibras de actina, modulando su reorganización, permitiendo reestructurar la membrana y promover los procesos de migración y fagocitosis en las CMi activadas (Jonas et al., 2012; Ohsawa et al., 2004). Su uso como identificador de la microglía es incuestionable, pero no es útil para diferenciar su estado de activación (D. Ito et al., 1998; Zotova et al., 2011).

Tanto en la retina lesionada tras el ApNO como en la contralateral, las CMi invaden la capa de CGR a expensas de la retina externa y permanecen crónicamente activadas (González-Riquelme et al., 2021; Qu & Jakobs, 2013).

En el CS, el ApNO causa un incremento de la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS contralateral (CSc) a los 3 días de la lesión respecto al animal intacto y no se ven cambios en el CS ipsilateral (CSi) en un modelo de axotomía en rata (Smith et al., 2018). En un modelo de OHT unilateral, se demuestra aumento de densidad de CMi en ambos CS (Sapienza et al.,

2016). No existen datos de la respuesta glial en el hipocampo al ApNO, pero se ha descrito aumento de CMi Iba1<sup>+</sup> por axotomía de axones aferentes (Owens et al., 2005) o como respuesta a un estímulo sistémico (Miladinovic et al., 2019). Las CMi del BO y BOa presentan un patrón heterogéneo en la expresión de Iba1 (Okere & Kaba, 2000) y su densidad celular puede variar en función de diversos estímulos, pero no se conoce su relación con el ApNO (J. Kim et al., 2019; Tonchev et al., 2003).

#### 1.7.1.4 CD68

El Clúster de Diferenciación 68 (CD68) es una proteína altamente expresada por las células del sistema mononuclear fagocítico y por las CMi. La proteína CD68 humana está codificada por el gen *Cd68*, el equivalente en el ratón se le conoce como macrosialina. Los anticuerpos monoclonales anti-CD68 que reaccionan con tejidos en roedores incluyen FA-11, usado en esta tesis, o ED1, clon más utilizado en rata. Su función está en relación con la captación de lipoproteínas de baja densidad (Micklem et al., 1989; Ramprasad et al., 1995).

El CD68 se encuentra principalmente en la membrana lisosomal pero también en la superficie, por lo que se observa principalmente en el soma y no es útil para el estudio morfológico de la CMi. Cuando la CMi se encuentra ramificada en estado vigilante, su expresión es mínima o constitutiva, realmente se considera presente cuando la CMi está activada o ya con aspecto amebosoide y capacidad fagocítica (Lier et al., 2021; Zhou et al., 2017).

En la retina, el ApNO produce un aumento significativo y duradero de CMi CD68+, tanto en la retina del ApNO como en la contralateral (González-Riquelme et al., 2021; Rojas et al., 2014).

En el CS contralateral al ApNO en rata, presenta un incremento de las células ED1+ respecto al animal intacto (Smith et al., 2018). La inyección de TNF- $\alpha$  en un ojo, induce aumento de la expresión de *Cd68* tanto en el CS ipsilateral como en el contralateral respecto al CS de una rata intacta (Sapienza et al., 2016). No se ha caracterizado la expresión de CMi CD68 a nivel histológico o su expresión molecular en el hipocampo o en el bulbo olfatorio tras el ApNO. No obstante, se ha estudiado la expresión de CMi *Cd68* en estas regiones cerebrales tras otros estímulos (Hendrickx et al., 2017; Tonchev et al., 2003).

#### 1.7.1.5 MHC II

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (del inglés, “*Major Histocompatibility Complex*” o MHC II) pertenece a la familia de genes del MHC, en humanos también conocido como complejo HLA (del inglés, “*Human Leucocytic Antigen*”). El MHC es una

familia de genes cuya función es la codificación de glucoproteínas con el mismo nombre (MHC o HLA) que participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T, permitiendo su activación.

Según la función de las proteínas que traducen, se pueden distinguir el MHC I y el MHC II. El MHC I se encuentra en todas las células nucleadas y es capaz de activar al linfocito T CD8<sup>+</sup>. En cambio, el CMH II sólo se expresa en células presentadoras de antígenos (células dendríticas, fagocitos mononucleares, linfocitos B, algunas células endoteliales, epitelio del timo) y se relaciona con el linfocito TCD4<sup>+</sup>. Las moléculas del MHC I y II no se expresan de forma constitutiva ni en las neuronas ni en la glía del SNC (Hamo et al., 2007; Hickey & Kimura, 1987; Kolomeyer & Zarbin, 2014). De hecho, constituyen un órgano diana raro en la enfermedad injerto contra huesped (M. Li et al., 2021; Zeiser & Teshima, 2021). Pero los astrocitos y la CMi pueden expresarlos en situaciones patológicas, probablemente por el estímulo de mediadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$  o IL-6 (Belle et al., 2017; Mathew et al., 2020), favoreciendo la interacción con el sistema inmune y perdiendo el aislamiento inmunológico (Hendrickx et al., 2017; Padovan et al., 2001; Waisman & Johann, 2018; Wong et al., 1984).

En la retina, se ha comprobado sobreexpresión de *Mhc II* en el modelo de hipertensión ocular aguda en la CMi y CMA del lado lesionado y en el contralateral (Gallego et al., 2012) y se demuestra aumento de expresión en secciones del NO aplastado (Shaked et al., 2004).

No se ha estudiado a nivel histológico ni molecular la expresión de MHC II tras el ApNO en el colículo superior, el hipocampo o el bulbo olfatorio. En el hipocampo, se ha estudiado la expresión de *Mhc II* en relación con lesiones isquémicas (Finsen et al., 1993) o la edad (VanGuilder et al., 2011).

#### 1.7.1.6 TSPO

La proteína translocadora mitocondrial 18kDa (TSPO) está codificada en el gen *Tspo*. Se encuentra en la membrana mitocondrial externa. Aunque inicialmente se describió como receptor periférico de benzodiazepinas, hoy día se le atribuyen múltiples funciones, como son el transporte del colesterol a las mitocondrias para la síntesis de esteroides o su participación en la respuesta inmune (G.-J. Liu et al., 2014; Papadopoulos et al., 2006).

*Tspo* se expresa de forma constitutiva en todo el cuerpo y menos en cerebro. De forma particular, en cerebro se expresa en las células endoteliales, los epindemocitos y las células de Purkinje. Las regiones con mayor expresión son la capa glomerular del BO, los plexos coroideos, las zonas de neurogénesis (zona subventricular, el tracto migratorio rostral y la

zona subgranular del giro dentado) y la CCP del cerebelo. La CMi en estado vigilante no expresa *Tspo* pero cuando se activa lo hace de forma llamativa (Betlazar et al., 2018).

En la retina del ratón, *Tspo* se expresa tanto en la CMi como en la CMa (Klee et al., 2019) y se ha relacionado con la limitación de la respuesta inflamatoria (Karlstetter et al., 2014; Mages et al., 2019; M. Wang et al., 2014). En un modelo de ApNO en ratón pigmentado como el que se ha usado en esta tesis, el tratamiento con minociclina, un antibiótico que suprime la activación de la CMi, induce la sobreexpresión de *Tspo* en la retina lesionada y en la contralateral respecto a los lesionados sin tratamiento (Lucas-Ruiz et al., 2019). En un modelo de degeneración del epitelio pigmentario, el uso de ligandos de TSPO atenúan la respuesta inflamatoria (Rashid et al., 2020). No se ha descrito la expresión tisular o molecular de *Tspo* en relación a la axotomía del NO en el cerebro pero se ha estudiado en modelos de isquemia (H.-D. Li et al., 2017) o de encefalomielitis autoinmune experimental (Mattner et al., 2013).

## 1.7.2 MARCADORES INFLAMATORIOS

Las citoquinas son proteínas solubles de bajo peso molecular fundamentales para la comunicación intercelular. Participan en funciones como la diferenciación celular, la hematopoyesis, el control de la respuesta inmune, la reparación celular o la apoptosis. Se caracterizan por su redundancia, muchas citoquinas distintas comparten funciones similares, y por su pleiotropía, actúan sobre muchos tipos celulares y una célula puede expresar receptores para múltiples citocinas (C. Liu et al., 2021).

Son producidas por varios tipos celulares, principalmente por células del sistema inmune y, de forma particular, por las células de la glía en el SNC, sobre todo la CMi. De forma general, cada citoquina se une a un receptor de superficie y desencadena una cascada de señalización que lleva a la regulación positiva o negativa de diversos genes, que motivarán el cambio morfológico o funcional en la célula (C. Liu et al., 2021).

El estudio de la expresión de citoquinas, de sus receptores celulares o de otras proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria nos permite analizar de forma indirecta lo que ocurre en el tejido. En esta Tesis, nos centraremos en el estudio de varios marcadores pro-inflamatorios (*Caspasa-3*, *Cxcr1*, *IL-1 $\beta$* , *Lcn2*, *TNF- $\alpha$* ) y antiinflamatorios (*Cd206*, *Il-4*, *Il-6*, *Tgf-1 $\beta$* ).

### 1.7.2.1 CXCR1

CXCR1 es uno de los receptores de membrana de IL-8. IL-8 es una quimiocina pro-inflamatoria que actúa como activador y factor quimiotáctico de neutrófilos y otras células

del sistema inmune a través de los receptores CXCR1 y CXCR2. *Cxcr1* se expresa en la mayoría de los tejidos, pero principalmente en las células del sistema inmune y, en particular, en los neutrófilos (J. Lee et al., 1992).

*Cxcr1* se expresa de forma uniforme en el cerebro y en la retina, tanto en las neuronas como en CMi y CMA, e intervienen tanto en la modulación de la sinapsis como en la neuroinflamación (Danik et al., 2003; Flynn et al., 2003; Goczałik et al., 2008). IL-8/CXCR1 induce la activación de los astrocitos (Du et al., 2017) y el bloqueo de la expresión de *Cxcr1* reduce la muerte neuronal (Du et al., 2018).

IL-8/CXCR1 induce la muerte por apoptosis de CGR in vitro (J.-J. Wang et al., 2018). El bloqueo del receptor CXCR1/2 en un modelo de isquemia de ratón disminuye la infiltración de polimorfonucleares en el tejido (da Cunha Sousa et al., 2013).

### 1.7.2.2 IL-1 $\beta$

La interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) pertenece a la superfamilia de la IL-1. La IL-1 $\beta$  ejerce su acción a través de su unión con el receptor IL-1R1, que a su vez tiene también un antagonista. Se trata de una citoquina inducible expresada por el sistema inmune y por microglía y astrocitos tras detectar un daño, que a su vez favorece la activación de la microglía pro-inflamatoria. La IL-1 $\beta$  se ha relacionado con la neurodegeneración a través de la activación de la microglía (Rothwell, 2003).

En el modelo de OHT, se ha observado tanto un aumento como un descenso de expresión de *IL-1 $\beta$*  en la retina lesionada (Crish et al., 2010; Fernández-Albarral et al., 2021; Kaur et al., 2013). El CS presenta aumento de la expresión de *IL-1 $\beta$*  tanto en el lado ipsi- como contralateral a la retina lesionada respecto al CS de un animal intacto (Sapienza et al., 2016). Como se ha expuesto en el caso de *TNF- $\alpha$*  en el modelo animal de adrenalectomía, *IL-1 $\beta$*  aumentó su expresión en el hipocampo en ratas sometidas a adrenalectomía respecto a sus Sham.

### 1.7.2.3 Lcn2

Lipocalin-2 (*Lcn2*), también se conoce como oncogen *24p3* o *Ngal* (del inglés, “*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*”), forma parte de la familia de las proteínas lipocalinas, implicadas en el transporte de ligandos hidrófobos (Dekens et al., 2021). De hecho, Lcn2 fue descubierta en relación a su unión y secuestro de hierro ante bacterias sideróforas (Goetz et al., 2002). Lcn2 se une principalmente a los receptores multiligandos 24p3R y megalina, que median su internalización en las células, y modifican la expresión génica (Hvidberg et al., 2005).



En condiciones fisiológicas, la expresión constitutiva de *Lcn2* es baja y limitada sólo a algunos tipos celulares, como los neutrófilos, o algunos tejidos, como el riñón, la próstata o el epitelio del tracto respiratorio o gastrointestinal. Se relaciona con una gran variedad de procesos fisiológicos: respuesta contra infecciones bacterianas, regulación del metabolismo de hierro, y ser una proteína de fase aguda, en la respuesta anti- o proinflamatoria y pro- o antiapoptótica (Dekens et al., 2021).

De forma particular en el SNC, su estudio es reciente (Ferreira et al., 2015). En modelos murinos o en tejidos humanos post-mortem, la expresión o los niveles de ARNm de *Lcn2* son bajos en condiciones fisiológicas. *Lcn2* se suele encontrar en relación a los vasos sanguíneos y en la microglía en estado vigilante; aunque tanto los astrocitos, las neuronas, la microglía y las células endoteliales presentan receptores de *Lcn2* (J.-H. Kim et al., 2017; Llorens et al., 2020).

*Lcn2* induce la activación de astrocitos y CMi (Jang, Kim, et al., 2013; Jang, Lee, et al., 2013; S. Lee et al., 2015). Se ha demostrado que puede actuar como inductora de otras quimocinas, y favorecer la entrada de células del sistema inmune a través de la BHE, como a su vez ser promovida por otras moléculas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$  (S. Lee et al., 2011; Naudé et al., 2012).

Al igual que fuera del SNC, su expresión aumenta tanto por un estímulo agudo (ictus, sepsis inducida por lipopolisacárido, daño medular o cerebral traumático) como por un daño crónico (modelos de ELA, Parkinson, Alzheimer) (Dekens et al., 2021). No obstante, su propiedad anti o pro-inflamatoria per se, no queda bien establecida: por ejemplo, en encefalitis autoinmune experimental los resultados son contradictorios (Berard et al., 2012; Nam et al., 2014), y parece definirse más bien como un marcador de daño de tejido, como lo es en el daño renal (Marakala, 2022). En respuesta al ApNO, la expresión de *Lcn2* aumenta en la retina lesionada (Ueno et al., 2018).

#### 1.7.2.4 TNF- $\alpha$

El Factor de Necrosis Tumoral alpha, TNF- $\alpha$ , se codifica por el gen del mismo nombre. Se puede diferenciar una forma transmembrana (tmTNF- $\alpha$ ) y otra soluble  $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ), mediante la cual ejerce su papel biológico. Ambas isoformas pueden unirse a sus receptores: TNFR1, presente en todos los tejidos celulares, o TNFR2, que se expresa en las células del sistema inmune (Bradley, 2008).

En la retina y el cerebro, TNF- $\alpha$  liberado por la CMi con un fenotipo pro-inflamatorio se une a TNFR1 presente en la superficie de otras células (Goldmann & Prinz, 2013). La señal

TNF- $\alpha$ /TNFR1 no induce la apoptosis en células sanas, pero en ambientes inflamatorios, induce la muerte celular (Sedger & McDermott, 2014).

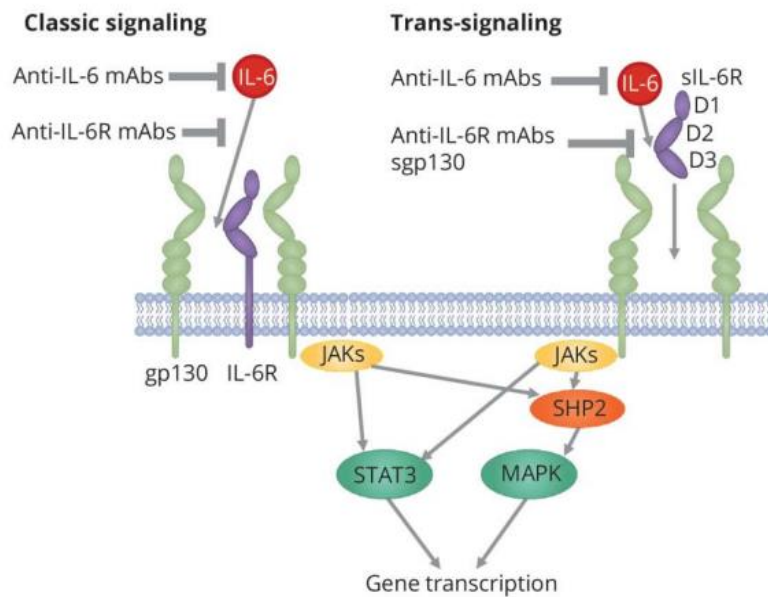
La citoquina TNF- $\alpha$  y su implicación en la muerte de CGR se ha estudiado en modelos de axotomía en ratón (Agudo et al., 2008; Tse et al., 2018) y de glaucoma en ratón y en humanos (Tezel et al., 2001; Wei et al., 2019).

En un modelo de SON parcial, el homogeneizado de cerebro presenta un incremento transitorio de expresión *Tnf- $\alpha$*  hasta los 3 días después de la lesión (Smith et al., 2018). El CS en particular, presenta aumento de la expresión de *Tnf- $\alpha$*  tanto en el lado ipsi- como contralateral a la retina lesionada respecto al CS de un animal intacto (Sapienza et al., 2016). En un modelo de adrenalectomía bilateral en rata, demuestran un aumento de la expresión de *Tnf- $\alpha$*  en el hipocampo respecto al animal Sham y que ese incremento precede la muerte de neuronas hipocampales (Hamadi et al., 2016), hallazgo que también está descrito en modelos de isquemia del hipocampo (Rothwell, 2003; Zhu et al., 2006) o de lesión traumática directa (Tchelingerian et al., 1993).

#### 1.7.2.5 IL-6

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina pequeña que, aunque genéticamente presenta bajo grado de homología entre el ratón y el hombre, estructuralmente es muy parecida, lo que explica que se hayan encontrado efectos biológicos similares (Veverka et al., 2012).

IL-6 es producida por diferentes tipos celulares: células B y T, monocitos, fibroblastos, endotelio o algunas células epiteliales. Para ejercer su efecto, la IL-6 se une a su receptor IL-6R (IL-6R  $\alpha$ ), que se encuentra en la membrana (mIL-6R) o en su forma soluble (sIL-6R), que a su vez debe unirse a la glicoproteína 130 (gp 130, también conocida como subunidad  $\beta$  del IL-6R, para iniciar la ruta de señalización e inducir la transcripción génica (**Figura 36**). Las células que no expresan IL-6R, que de forma basal no responderían a IL-6, pueden ser estimuladas por el complejo sIL-6R-IL-6 (proceso conocido como trans-señalización) (Garbers et al., 2018).



**Figura 36. Esquema de la señalización de IL-6.** IL-6 se une a su receptor de membrana mL-6R (señalización clásica) o a su forma soluble sIL-6R (trans-señalización) del receptor IL-6R  $\alpha$ . La señalización IL-6 está mediada por la homonimerización de gp130, que se expresa de forma ubicua, y activa la ruta JAK-STAT y SHP2-MAPK. D1-D3: subdominios de IL-6R  $\alpha$ ; Gp130= Glicoproteína 130; JAK/STAT = del inglés, “*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*”; SHP2/MAPK = del inglés, “*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2/mitogen-activated protein kinase*”; STAT3 = del inglés, “*signal transducers and activators of transcription 3*”. Imagen tomada y modificada de (Fujihara et al., 2020).

La IL-6 está implicada en numerosos procesos fisiológicos: estimula la producción de proteínas de la fase aguda, hematopoyesis, angiogénesis, diferenciación osteoclástica, etc. En el sistema inmune en particular, en una citoquina principalmente pro-inflamatoria, dado que favorece la producción de anticuerpos, la activación de linfocitos T y media el balance entre los linfocitos proinflamatorios T helper (Th) 17 y los linfocitos T reguladores (reg). La IL-6 también se considera una mioquina, una citocina producida por el músculo, ejerciendo en este caso un papel antiinflamatorio (Brandt & Pedersen, 2010).

En el SNC, IL-6R se expresa fundamentalmente en oligodendrocitos y CMi. Se conoce que las neuronas, la CMA, la CMi y las células endoteliales puede producir IL-6 tras un daño y que sus niveles en sangre y LCR se encuentran elevados en muchas enfermedades neuroinflamatorias (Erta et al., 2012). La disregulación de la expresión o la señalización de IL-6 se ha relacionado con numerosas enfermedades inflamatorias o linfoproliferativas (Garbers et al., 2018). Por ejemplo, en la neuromielitis óptica, el uso de tratamientos anti-IL-6 han demostrado claramente su eficacia (Fujihara et al., 2020).

Curiosamente, en el modelo de axotomía por ApNO, la administración intravítrea de IL-6 ha demostrado conseguir la regeneración de los axones de CGR (Fischer, 2017; Leibinger et al., 2016). En un modelo de isquemia cerebral en rata, la IL-6 consigue modular la integridad de la BHE y reduce la expresión de otras citoquinas pro-inflamatorias (como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) y la muerte neuronal (Feng et al., 2015).

#### 1.7.2.6 CD206

El receptor de manosa de macrófagos (CD206) es una glicoproteína transmembrana, miembro de la familia de las lectinas tipo C. Su función principal es la internalización de las proteínas manosiladas, presentes en algunos antígenos microbianos, para su procesamiento antigénico (Stahl & Ezekowitz, 1998); aunque también se ha relacionado con la pinocitosis y la fagocitosis (Régnier-Vigouroux, 2003).

Se encuentra principalmente en las células dendríticas inmaduras, en los macrófagos tisulares (Wollenberg et al., 2002) y en la CMa (Burudi et al., 1999) y en la CMi (Durafour et al., 2012). En la CMi en particular, es un marcador que se sobreexpresa cuando la célula adquiere un fenotipo más antiinflamatorio, e intenta aliviar el daño tisular fagocitando las células apoptóticas (Chhor et al., 2013; Durafour et al., 2012).

La expresión de CD206 en la CMi de la retina es escasa y se concentra fundamentalmente alrededor del NO. Tras el ApNO, las CMi CD206<sup>+</sup> se incrementan y, curiosamente, disminuyen en la retina contralateral (González-Riquelme et al., 2021). El uso de moléculas con efecto antiinflamatorio en este modelo, como  $\alpha$ -1 antitripsina (Zhou et al., 2018) o la progesterona (P. Yang et al., 2021), aumenta la expresión de *Cd206*.

De forma similar, la CMi en cerebro o ME, se activan ante un estímulo nocivo y la polarización al anteriormente conocido como fenotipo M2 CD206<sup>+</sup> contribuye a controlar el daño (Akhmetzyanova et al., 2019b; Bai et al., 2021; Ran et al., 2021).

#### 1.7.2.7 IL-4

La interleucina-4 (IL-4) es una citocina antiinflamatoria producida principalmente por los linfocitos Th2 (T helper o cooperadores 2), mastocitos y basófilos. Sus funciones principales son: ser un feedback positivo para la producción de IL-4 y otras citoquinas antiinflamatorias, como IL-13; feedback negativo para la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , interferón gamma (IFN $\gamma$ ) o IL-17; promover la proliferación de linfocitos B con sobreexpresión de MHC II y receptores de IL-4 (IL-4Rs). Hay 2 tipos de IL-4Rs: IL-4R tipo I, principalmente expresado en las células hematopoyéticas, e IL-4R tipo II, que también

funciona como receptor de IL-13, en células no hematopoyéticas (Gadani et al., 2012; Sequeira et al., 2020).

Tanto la CMi como CMa tienen IL-4Rs. Tanto IL-4, como IL-10 o IL-13, promueven la diferenciación de CMi a un perfil más antiinflamatorio (Michels et al., 2014; Quarta et al., 2020). Tanto en modelos de epilepsia genética como relacionada con gliomas, se ha observado que IL-4 puede modular la epileptogénesis regulando la polarización de las CMi (L. Chen et al., 2020; T. Li et al., 2017; Sun et al., 2017). En modelos de isquemia cerebral, IL-4 inhibe la activación de la CMi pro-inflamatoria y favorece la recuperación neurofuncional (Yang et al., 2016; Zhao et al., 2015). A nivel de la macroglía, IL-4 es capaz de inhibir la proliferación astrocitaria (Mashkaryan et al., 2020).

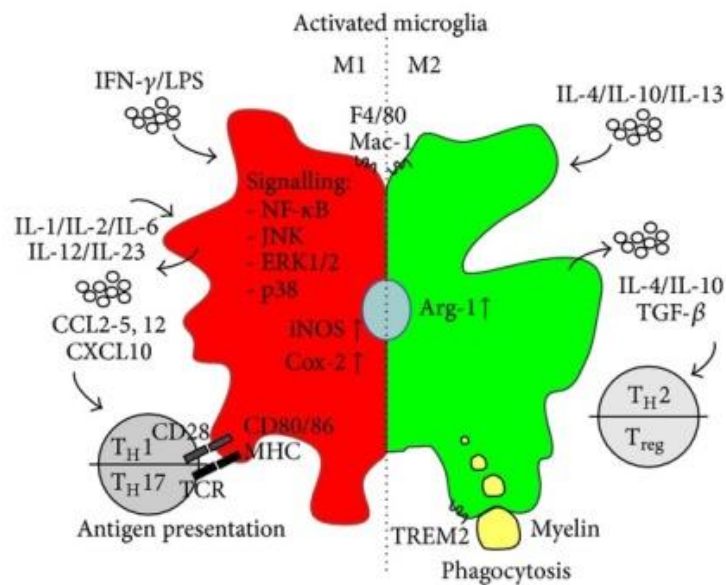
La administración de IL-4 favorece la polarización y duración de CMi a un fenotipo más antiinflamatorio, reduciendo la pérdida de CGR en un modelo de isquemia/reperfusión de glaucoma (D. Chen et al., 2022). Además, es capaz de inducir un fenotipo reparador en el epitelio pigmentario de la retina que podría contribuir a este efecto neuroprotector (Zhou et al., 2022). En un modelo de axotomía de ApNO en el que se ha probado la progesterona como neuroprotector, se objetiva aumento de expresión de *Il-4* a partir del tercer día tras la lesión (P. Yang et al., 2021).

#### 1.7.2.8 TGF- $\beta$ 1

El factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) es codificado por el gen del mismo nombre. Pertenece a la familia de los factores de crecimiento de las citocinas. Presenta una amplia expresión en todo el cuerpo, destacando el bazo y el timo (Yue et al., 2014). Es una citocina especialmente implicada en el control de la proliferación y la diferenciación (Azhar et al., 2009).

En el sistema inmune, la función es principalmente supresora. Se sintetiza por los linfocitos T reguladores, entre otras células. TGF- $\beta$ 1 inhibe la proliferación de los linfocitos T autorreactivos y favorece la supervivencia de los linfocitos T reguladores, los linfocitos B y actúa de forma bivalente en la serie monocito/macrófago (Gilbert et al., 1997; Lebman & Edmiston, 1999). Además, puede inhibir la secreción de otras citoquinas pro-inflamatorias, como el IFN- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$  (Sanjabi et al., 2009).

En la CMi, cuando está activada con un fenotipo más antiinflamatorio, se sintetizan citoquinas con este efecto, como TGF- $\beta$ 1, IL-4 o IL-10, que intervienen en el control de la respuesta inflamatoria y en la remodelación del tejido, su reparación y su recuperación (Goldmann & Prinz, 2013; Mathieu et al., 2010) (**Figura 37**).



**Figura 37. Polarización de la microglía en la inflamación en el SNC.** La microglía en estado vigilante puede ser activada por diversos estímulos que marcarán la polarización celular. IFN- $\gamma$  o el lipopolisacárido (LPS) promueven un pro-inflamatorio, que favorece liberación de ILs pro-inflamatorias y la atracción de linfocitos Th1 o Th17, que activarán a neutrófilos y macrófagos, favoreciendo la reacción inflamatoria local. IL-4, IL-10 o IL-13 inducen un estado antiinflamatorios, que favorece la liberación de citoquinas antiinflamatorias y la activación de linfocitos Treg, que contribuyen a suprimir la respuesta inmune; promueve la fagocitosis de residuos celulares y contribuye a la reparación tisular. Imagen tomada de (Goldmann & Prinz, 2013).

En el modelo del ApNO en ratón, de forma similar a lo expuesto con TSPO, el tratamiento con minociclina induce una sobrerregulación de *TGF- $\beta$ 1* en la retina lesionada y en la contralateral (Lucas-Ruiz et al., 2019). En el cerebro, conocemos que el modelo de ratón knockout para *TGF- $\beta$ 1* presenta una intensa activación de la CMI y pérdida neuronal (Brionne et al., 2003), demostrando ante diversos estímulos su papel neuroprotector mediante el control de la inflamación (Dhandapani & Brann, 2003; Martínez-Canabal, 2015).

### 1.7.3 MARCADORES DE APOPTOSIS

#### 1.7.3.1 Caspasa-3

La Caspasa-3 pertenece a la familia de las caspasas, un grupo de enzimas que poseen un residuo de cisteína que media la ruptura de proteínas.

El estudio de la Caspasa-3 se aborda dado que ejerce un papel fundamental en la apoptosis, uno de los dos mecanismos básicos de muerte celular (necrosis y apoptosis). La

necrosis ocasiona una dilatación del citoplasma de la célula que acaba en una lisis de la misma, con liberación del material al medio extracelular, con la consiguiente respuesta inflamatoria tisular (Wyllie et al., 1980).

En la apoptosis, la célula conserva la integridad de la membrana, se condensa la cromatina y se fragmenta el ADN, siendo posteriormente fagocitada sin liberar productos celulares al medio ni generar respuesta inflamatoria. La muerte por apoptosis es un mecanismo celular programado genéticamente que se activa tras determinados estímulos: la vía extrínseca es activada por el receptor de TNF (Schulze-Osthoff et al., 1998) y la vía intrínseca se inicia por una alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Green & Kroemer, 2004); ambas vías confluyen en la activación de la Caspasa-3, que ejecutará la apoptosis.

Una lesión en el SNC como el ApNO provoca un aumento de *Caspasa-3* en la retina lesionada y en la contralateral, y la administración de inhibidores de las caspasas previene la apoptosis de las CGR (Lucas-Ruiz et al., 2019; Sánchez-Migallón et al., 2016; Tawfik et al., 2021). Uno de los mecanismos subyacentes a este efecto está mediado por el incremento de expresión de *Tnfr1* tras el ApNO, que activa la ruta de las caspasas por la vía extrínseca y cuya inhibición también favorece la supervivencia de las CGR (Agudo et al., 2008; Lucas-Ruiz et al., 2019; Vidal-Sanz et al., 2000). Aunque existen numerosos trabajos que estudian la neurodegeneración en la vía visual anterior, el estudio de neurodegeneración en CS u otras regiones retino-recipientes es escaso y se ha centrado hasta ahora en la respuesta inflamatoria glial (Sapienza et al., 2016; Smith et al., 2018).



# 2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 2.1 HIPÓTESIS

Las hipótesis de este trabajo son:

1. La respuesta inflamatoria y degenerativa en la retina contralateral al ApNO se debe tanto a mecanismos desencadenados por el aplastamiento del nervio óptico (ApNO) como a la cirugía en sí misma.

2. La reacción inflamatoria tras el ApNO de ambas retinas se extiende al colículo superior, por ser el principal centro de proyección de las CGR, así como a otras regiones del SNC con un efecto distancia-dependiente respecto a la lesión.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de este estudio son tres:

1. Analizar la expresión génica en la respuesta inflamatoria tras el ApNO en la retina lesionada y en la contralateral.
2. Analizar la expresión génica en la respuesta inflamatoria tras el ApNO en regiones del SNC, ipsi- y contralaterales a la lesión: el colículo superior, principal centro de proyección de las CGR en el ratón, y en regiones remotas del SNC, fuera de la vía visual (RRSNC: hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y médula espinal), a diferentes distancias de la lesión.
3. Estudiar a nivel anatómico-patológico la respuesta glial al ApNO en tres áreas representativas del SNC, ipsi- y contralaterales a la lesión: colículo superior y algunas RRSNC (hipocampo y bulbo olfatorio).

### 2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para llevar a cabo estos objetivos generales, se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- A. Analizar la respuesta inflamatoria tras el ApNO en la retina lesionada y en la contralateral a la lesión.
  - a. Analizar la expresión génica de moléculas pro- y antiinflamatorias.
  - b. Analizar la expresión génica de marcadores de gliosis.
  - c. Comparar la respuesta a la cirugía Sham frente a retinas intactas.
  - d. Comparar el efecto del ApNO frente a la cirugía Sham.

**B. Analizar la respuesta inflamatoria en el CS ipsi- y contralateral al ApNO, como principal centro de proyección de las CGR en el ratón.**

- a. Analizar la expresión génica de moléculas pro- y antiinflamatorias.
- b. Analizar la expresión génica de marcadores de gliosis.
- c. Analizar la densidad, tamaño y morfología de las CMi Iba1<sup>+</sup>.
- d. Analizar el marcaje con CD68 en las CMi Iba1<sup>+</sup>.
- e. Analizar la evolución del área ocupada por GFAP.
- f. Analizar el marcaje con MHC II en los astrocitos.
- g. Demostrar el efecto del ApNO en el CS de un animal intacto.
- h. Comparar la respuesta a la cirugía Sham en el CS respecto al intacto.
- i. Comparar la respuesta al ApNO frente a la cirugía Sham.

**C. Analizar la respuesta inflamatoria tras el ApNO en diferentes regiones fuera de la vía visual y a diferentes distancias de la lesión (RRSNC: hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo y médula espinal).**

- a. Analizar la expresión génica de moléculas pro- y antiinflamatorias.
- b. Analizar la expresión génica de marcadores de gliosis.
- c. Analizar la densidad, tamaño y morfología de las CMi Iba1<sup>+</sup>.
- d. Analizar el marcaje con CD68 en las CMi Iba1<sup>+</sup>.
- e. Analizar la evolución del área ocupada por GFAP.
- f. Analizar el marcaje con MHC II en los astrocitos.
- g. Comparar la respuesta a la cirugía Sham en cada región respecto al intacto.
- h. Comparar la respuesta al ApNO frente a la cirugía Sham.

# 3.MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratones macho pigmentados (C57BL/6) con un peso de entre 25-35g y con edades adultas comprendidas entre las 8 y 12 semanas de edad. Los animales fueron criados y mantenidos en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Murcia. En éste, se alimentaron “*ad libitum*” y se mantenían en jaulas, en habitaciones aclimatadas con temperatura y ciclos de luz/oscuridad controlados.

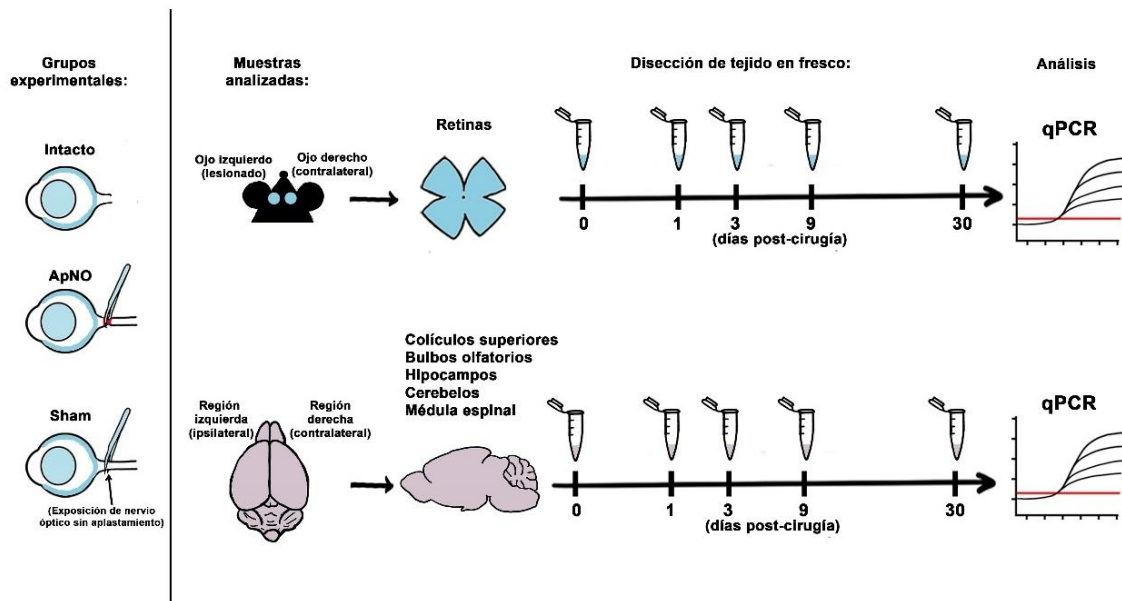
Los animales fueron tratados de acuerdo con la Normativa Europea (Directiva 2010/63/UE) y Española (RD 53/2013) vigente sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos y siguiendo las indicaciones de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (*The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, ARVO). Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética y estudios animales de la Universidad de Murcia (protocolos aprobados: A1320140704, A13170110 y A13170111).

### 3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este apartado se exponen animales utilizados para este proyecto por grupos temporales y según las técnicas usadas para el análisis. Expondremos el diseño experimental en función de nuestros objetivos principales. En todos ellos, nos referiremos como “animales intactos” a aquellos a los que no se les realizó ninguna lesión, y como “animales experimentales” a aquellos ratones a los que se les realizó una intervención quirúrgica, bien aplastamiento del ApNO o toda la cirugía salvo el aplastamiento (Sham).

**Objetivo 1. Analizar la expresión génica en la respuesta inflamatoria tras el ApNO en la retina lesionada y en la contralateral. Objetivo 2. Analizar la expresión génica en la respuesta inflamatoria tras el ApNO en regiones del SNC, ipsi- y contralaterales a la lesión: el CS, principal centro de proyección de las CGR en el ratón, y RRSNC (H, BO, CE y ME) a diferentes distancias de la lesión.**

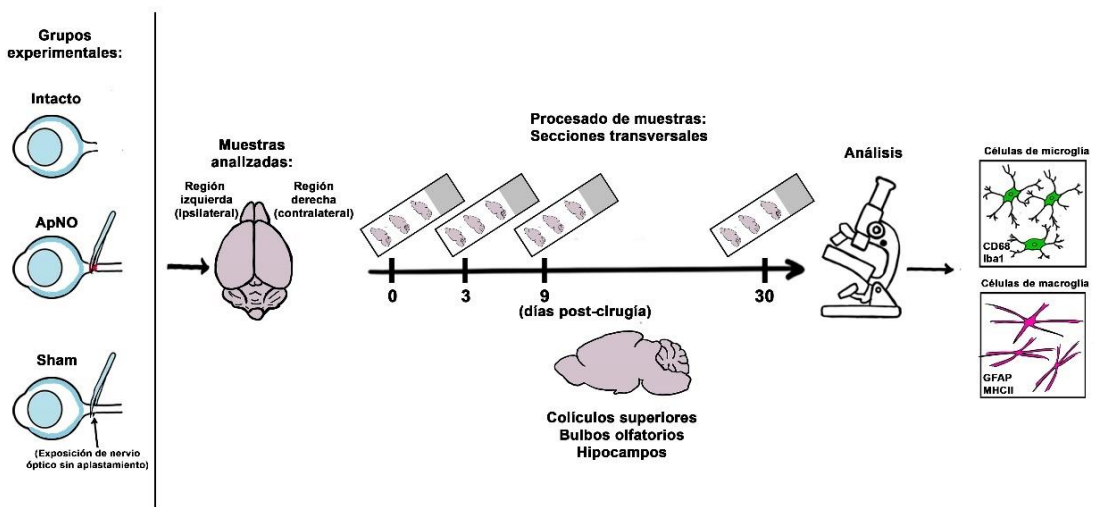
El diseño experimental para los dos primeros objetivos se esquematiza en la **Figura 38**. Se realizaron 3 grupos: animales intactos, ratones con ApNO y otros a los que se les realizó la cirugía completa salvo el aplastamiento del NO (Sham). Se estudiaron 3 animales por intervalo de supervivencia a 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. Las muestras estudiadas fueron las retina, el CS, el BO, CE, ME y el H, tanto ipsi- como contralaterales a la lesión.



**Figura 38.** Esquema del diseño experimental para el estudio molecular. Se analizaron marcadores de gliosis, pro- y antiinflamatorios y de apoptosis. En los animales Sham, la retina ipsilateral al NO expuesto, aunque potencialmente no sufre un daño directo, se denominó retina Sham.

**Objetivo 3.** Estudiar a nivel antomo-patológico la respuesta glial al ApNO en tres áreas representativas del SNC, ipsi- y contralaterales a la lesión: CS y algunas RRSNC (H y BO).

El diseño experimental se ilustra en la **Figura 39**: Se hicieron 3 grupos: animales intactos, ratones con ApNO y sus Sham. Se estudiaron 3 animales por tiempo de estudio, a 3, 9 ó 30 días tras la lesión. Las regiones analizadas fueron CS, H y BO, tanto ipsi- como contralaterales.



**Figura 39. Esquema del diseño experimental para el estudio anatómico-patológico.** Se analizó la respuesta inflamatoria macro y microglial.

Una vez que cada hemicéfalo fue cortado en secciones sagitales, se eligieron entre 3-4 portaobjetos que contuvieran secciones que por su aspecto macroscópico presentaran las regiones de estudio (3-4 portaobjetos por hemicéfalo y tiempo para cada inmunohistofluorescencia). De esta manera, se realizó la inmunodetección microglial de aproximadamente 6 secciones por animal y tiempo estudiado. De igual modo, se llevó a cabo el mismo método para la inmunohistofluorescencia macroglial (**Tabla 3**).

<b>Inmunohistofluorescencia para el estudio microglial:</b>  <b>Iba1, CD68, DAPI.</b>  <b>(n=54).</b>	Intacto (n=18, 9 por hemicéfalo)	
	3 días post-ApNO (n=18)	3 días Sham (n=18)
	9 días post-ApNO (n=18)	9 días Sham (n=18)
	30 días post-ApNO (n=18)	30 días Sham (n=18)
<b>Inmunohistofluorescencia para el estudio macroglial:</b>  <b>GFAP, MHC II, DAPI.</b>  <b>(n=54)</b>	Intacto (n=18, 9 por hemicéfalo)	
	3 días post-ApNO (n=18)	3 días Sham (n=18)
	9 días post-ApNO (n=18)	9 días Sham (n=18)
	30 días post-ApNO (n=18)	30 días Sham (n=18)

**Tabla 3. Secciones de hemicéfalo usadas para el estudio de la la reacción micro o macroglial tras el ApNO en las regiones cerebrales de interés.**

Posteriormente, se procedió a la adquisición de imágenes de las áreas de interés mencionadas (**ver Apartado 3.5.6. Adquisición de Imágenes**). Se fotografiaron entre 3-6 imágenes representativas por cada área cerebral de interés, animal y tiempo de estudio, que posteriormente se analizaron (**ver Apartado 3.5.7. Procesado de Imágenes**).



### 3.3 APLASTAMIENTO DEL NERVIÓ ÓPTICO O CIRUGÍA SHAM

Antes de la cirugía, todos los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina 5% (70mg/kg de peso corporal Ketolar®, Pfizer, Alcobendas, Madrid, España), Xilacina 2% (10 mg/kg de peso corporal, Rompun®, Bayer, Kiel, Alemania) y Buprenorfina 5% diluida 1:20 en suero salino (Buprex®, Schering-Plough SA, San Agustín de Guadalix, Madrid, España), dependiendo del peso del animal. 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 pertinente.

Inmediatamente después de la cirugía, se aplicó en ambas superficies oculares pomada ocular de tobramicina (Tobrex®, Alcon-Cusí, S.A., El Masnou, Barcelona, España) para prevenir la desecación corneal. Los animales fueron entonces devueltos a su jaula y colocados bajo una fuente de luz emisora de calor hasta su recuperación de la anestesia y, posteriormente, fueron depositados en el animalario, donde permanecieron hasta su sacrificio.

En todos los grupos experimentales se realizó la cirugía en el ojo izquierdo, ojo experimental, mientras que el ojo derecho, ojo contralateral, se mantuvo intacto.

#### 3.3.1 APLASTAMIENTO DEL NERVIÓ ÓPTICO

El aplastamiento del nervio óptico (ApNO) se realizó siguiendo la técnica descrita (Galindo-Romero et al., 2013a; Lucas-Ruiz et al., 2019; Nadal-Nicolás et al., 2009; Parrilla-Reverter et al., 2009; Sánchez-Migallón et al., 2016, 2018; Vidal-Sanz et al., 1987). Se procedió al rasurado de la cabeza del animal para hacer una incisión en dirección longitudinal a la línea media sagital. A continuación, se separan los bordes para visualizar el reborde superior de la órbita ocular izquierda, se desinserta el tendón de Zinn y se secciona con el bisturí la inserción del recto y oblicuo superiores. Esto permite la tracción del globo ocular para exponer la porción anterior del nervio óptico izquierdo, donde se practica el aplastamiento con un pequeño fórceps angulado a 2 mm distal al polo posterior del ojo durante 10 segundos. Para acabar, el globo ocular se reposiciona en la cuenca orbitaria tras la distracción mínima del procedimiento y se sutura la piel junto con el tejido celular subcutáneo con seda quirúrgica de grosor 4/0. Para comprobar que durante el ApNO no ha dañado la irrigación de la papila o de la retina, se realiza una funduscopia directa para constatar la normalidad de los vasos retinianos y la correcta coloración de la retina en ambos ojos. Finalmente, se aplica un ungüento corneal en ambos ojos para evitar la queratitis por desecación durante la anestesia del animal. En el caso del Sham, se realiza el mismo procedimiento expuesto anteriormente salvo el ApNO.

### 3.3.2 CIRUGÍA SHAM

Además de incluir un grupo de animales intactos, para descartar el efecto de la cirugía en la neuroinflamación, se realizó un grupo experimental "Sham", en el que los animales eran anestesiados y se realizaba la cirugía según se ha descrito en el apartado anterior pero, una vez expuesto el NO izquierdo, no se aplastaba (ver **Apartado 3.2. Diseño Experimental**). En los animales Sham, la retina ipsilateral al NO expuesto, aunque potencialmente no sufre un daño directo, se denominó retina Sham.

## 3.4 EXTRACCIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR

Los animales utilizados para el estudio molecular (**Figura 38**) (**Tabla 3**) fueron sacrificados con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico al 20% e inmediatamente se procedió a la disección en fresco de las áreas de interés: retinas, CSs, Hs y BOs.

### 3.4.1 DISECCIÓN DE TEJIDOS EN FRESCO

#### Retina

En primer lugar, se procede a la enucleación del ojo e inmersión en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, Reino Unido) con Anfotericina al 1%. A continuación, se procede a separar la córnea recortándola siguiendo todo su diámetro a 1-1,5 mm por delante del limbus y paralelo a este. Una vez excluida la córnea, se procede a retirar el cristalino y el humor vítreo evitando dañar la retina. Para separar la retina de la coroides y de la esclera, se utilizan dos pinzas: una sujeta la ora serrata mientras la otra se introduce entre la retina y la coroides. De esta manera, se consigue separar la retina hasta que el único punto de unión es el NO, que finalmente se corta con tijeras. Una vez separada la retina, se introduce en un eppendorf y se congela inmediatamente con nitrógeno líquido y se guardan a -80°C hasta la posterior extracción de ARN.

#### Encéfalo y médula espinal

Inicialmente, se corta la piel del ratón mediante un corte en dirección sagital para exponer el cráneo del animal. A continuación, usando tijeras y con sumo cuidado de evitar el daño del parénquima cerebral, se corta el cráneo desde la región media occipital hasta el hueso nasal, lo que permite desplazar a sendos lados las láminas óseas para exponer el cerebro, el cerebelo y la unión bulbomedular. Además, se secciona el segmento cervical de la columna vertebral para exponer el canal espinal y la ME espinal (**Figura 13**). Para extraer el cerebro, se corta la ME cervical a la altura de C1-C2 y se tracciona levemente hacia arriba del cerebro. Para separarlo definitivamente de la base del cráneo, se cortan los nervios craneales que la atraviesan evitando dañar la región quiasmática y la porción intracraneal

de ambos NO. Una vez que tenemos el encéfalo fuera del cráneo, se divide en dos mediante el uso de un bisturí siguiendo el eje sagital mayor; es decir, seccionando a través la cisura interhemisférica y la cara superior del vermis. En cuanto a la ME, se secciona una porción cervical espinal y se divide en ambas hemimédulas por el surco mediano dorsal.

Una vez que los tejidos son divididos por lateralidad, se puede identificar y diseccionar, de cada mitad, el CS, H, BO, hemicerebelos (hemiCE) y hemimédulas (hemiME). Cada muestra se guarda en un eppendorf correctamente identificado para su congelación inmediata con nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a -80°C hasta que se proceda a la extracción de ARN.

### 3.4.2 EXTRACCIÓN DE ARN

Antes de iniciar el proceso de extracción de ARN (ácido ribonucleico), se procedió a la atemperación de las muestras en hielo. En primer lugar, se añadió 500 µl de Nucleozol (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) a cada eppendorf y se trituró y mezcló de forma simultánea con un homogeneizador manual (San Luis, Misuri, Estados Unidos). A continuación, se añadió 200 µl de agua libre de ARNasas (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España) en cada microtubo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés “*room temperature*”). Acto seguido, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos RT para conseguir la diferenciación de fases en la solución. Se recogió el sobrenadante de cada muestra y se le añadió el volumen análogo de isopropanol (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España) y se mezcló con el vórtex. Se dejaron reposar durante 10 minutos y, a continuación, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm RT. Al finalizar, se retiró el sobrenadante y se podía observar a simple vista el pellet en el fondo del microtubo. Se añadió 200 µl de etanol 75% a cada tubo y se centrifugó de nuevo durante 3 minutos. Seguidamente, se eliminó con pipeta el etanol con precaución de no retirar el pellet y se dejó secar durante 1 hora. Para finalizar, se añadió 20 µl de agua libre de ARNasas a cada muestra, y se calentó durante 15 minutos a 55°C para disolver el ARN, se centrifugaron y se guardaron congeladas a -80°C hasta que se fuese a llevar a cabo la síntesis del ADN complementario (ADNc).

### 3.4.3 SÍNTESIS DE ADNc

Para la síntesis del ADNc, tras la descongelación a temperatura ambiente, se cuantificó la concentración de ARN (ng/ul) de cada muestra en un Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachussetts, Estados Unidos) y se aisló 1µg total de ARN de cada muestra. Se siguieron las instrucciones del kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” de Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachussetts, Estados Unidos).

Inicialmente, se destruyeron los restos de ADN, si los hubiera, con ADNasa (Z-DNase, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) a 37°C durante 2 minutos. A continuación, se añadieron cebadores que reconocerán las secuencias de ARN y nucleótidos mientras se incubaba durante 5 minutos a 55°. Posteriormente, se añadió la enzima retrotranscriptasa y agua libre de ARNasa en cada tubo y se introdujo en el termociclador que estaba configurado para que se sucedieran 3 fases (10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C y 5 minutos a 85°C). Una vez finaliza, las muestras se guardan a -20°.

#### 3.4.4 PCR CUANTITATIVA

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó por el Servicio de Genómica del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB-Pascual Parrilla) usando SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, TaKara; Thermo Fisher Scientific), 450 nM primers, en un volumen total de 5 µl. Se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación cuyas condiciones fueron: fusión durante 15 segundos a 95°C, alineación y elongación de la cadena durante 45 segundos a 60° y de extensión a 72°C. Se aplica una curva de disociación al final de cada carrera mediante el aumento gradual de temperatura de 60 a 95° mientras se recogen los datos de fluorescencia de forma continua. Los valores de Ct se convirtieron a “Cuantificación relativa” utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por (Livak & Schmittgen, 2001). Se evaluaron dos genes candidatos para control de carga (*Hprt* y *Gadph*) utilizando NormFinder. Todos eran igualmente termoestables y se utilizó la media de sus Ct.

##### 3.4.4.1 Genes de estudio

Los genes estudiados y los primers se adquirieron en la casa comercial Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos. Se exponen en la **Tabla 4**, a continuación.

Gen/Proteína	Forward	Reverse
<b>Aq4</b>	GTGTTCACTATTTTTGCCAG	CAATATATCCAGTGGTTTGCC
<b>Iba</b>	TTCATCCTCTCTCTCCATC	TCAGCTTTTGAAATCTCCTC
<b>Gfap</b>	GGAAGATCTATGAGGAGGAAG	CTGCAAACCTTAGACCGATAC
<b>Caspasa-3</b>	Prediseñado y validado por Sigma-Aldrich	
<b>Cd206</b>	Prediseñado y validado por Sigma-Aldrich	
<b>Cxcr1</b>	AACACCATGCTGTCATATTC	GTAAGCTACTATGCTTGCTG
<b>Mhc II</b>	Prediseñado y validado por Sigma-Aldrich	
<b>Tgf-β1</b>	GCATACCAACTATTGCTTCAG	TGTCCAGGCTCCAATATAG
<b>Il-1β</b>	GGATGATGATGATAACCTGC	CATGGAGAATATCACTTGTTGG
<b>Il-4</b>	Prediseñado y validado por Sigma-Aldrich	
<b>Il-6</b>	AAGAAATGATGGATGCTACC	GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
<b>Lcn2</b>	Prediseñado y validado por Sigma-Aldrich	
<b>Tnf-α</b>	CTATGTCTCAGCCTCTTCTC	CATTTGGGAACTTCTCATCC
<b>Tspo</b>	ACGTACAAAGTAGGCTCC	AACACCATGCTGTCATATTC
<b>Gapdh</b>	Prediseñado y validado por Sigma-Aldrich	
<b>Hprt</b>	AGGGATTTGAATCACGTTTG	TTTACTGGCAACATCAACAG

Tabla 4. Primers utilizados de los genes de interés para qPCR.

### 3.4.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de la expresión de cada gen estudiado se realizó por cada tejido a estudio (retina, CS, H, BO, CE, ME) al día 1, 3, 9 ó 30 tras la lesión y en animales intactos. La expresión génica de cada tejido se analizó en animales intactos, Sham y tras el ApNO. De esta manera, se pudo establecer si el gen a estudio estaba sobreexpresado/sobrerregulado o infraexpresado/infrarregulado en relación con el valor de referencia en cada comparación. Se llevaron a cabo 2 comparaciones:

- **Comparación de la respuesta inflamatoria Sham vs. intacto.** Por una parte, se estudió la expresión en el animal intacto, valor que se consideró como de referencia (valor 1) para ese tejido y para ambos lados. Luego se analizó la respuesta del tejido a estudio, ipsilateral o contralateral al ApNO, en los animales Sham y se expresó de forma relativa respecto al valor del intacto. Se buscaron diferencias estadísticamente significativas entre la expresión génica del Sham y la del intacto.

- **Comparación de la respuesta inflamatoria ApNO vs. Sham.** Para aislar la respuesta inflamatoria exclusivamente por el ApNO, se comparó el tejido de interés del animal ApNO con la expresión en su correspondiente Sham, considerado en este caso como valor de referencia (valor 1). Se examinó si había diferencias entre los animales ApNO respecto a su Sham; entre los otros grupos de otros tiempos de estudio; y entre ambos hemisferios.

En cada análisis comparativo realizado para cada tejido, se buscaron también diferencias entre ambos lados y a lo largo de los tiempos estudiados.

## 3.5 DISECCIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO

### 3.5.1 SACRIFICIO, PERFUSIÓN Y FIJACIÓN DEL ANIMAL

Para sacrificar a los animales, se les administró vía intraperitoneal una sobredosis de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal Vetoquinol®, Especialidades Veterinarias S.A.; Alcobendas; Madrid, España).

En aquellos animales utilizados para el estudio anatómico, tras la sobredosis, se realizó la perfusión para la fijación de los tejidos desde el ventrículo izquierdo. Para ello, se cortó la piel siguiendo la línea media desde la apófisis xifoides hasta la porción más rostral del tórax y se expuso la caja torácica. Se seccionó el diafragma y se retiró el peto costal dejando expuestos mediastino anterior y el corazón. A continuación, se cortó la aurícula derecha, comprobando la salida espontánea de sangre. Se procedió a la perfusión a través del ápex ventricular con una aguja de 20G 30-40ml de suero salino al 0,9% para sustituir la sangre del árbol vascular e infundir posteriormente por la misma aguja un volumen de entre 50-60 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en 0,1 Molar (M) de tampón fosfato salino (PBS, del inglés “Phosphate Buffer Saline”).

### 3.5.2 DISECCIÓN DEL ENCÉFALO

La extracción conjunta del encéfalo y la ME se realizó tras la fijación del animal siguiendo el mismo método explicado en el **Apartado 3.4.1. Disección de tejidos en fresco**, salvo la realización del corte sagital, dado que la fijación se hace en una única pieza.

### 3.5.3 PROCESADO HISTOLÓGICO DEL ENCÉFALO

Inmediatamente tras la extracción del encéfalo, se post-fija durante dos horas en PFA 4%. Posteriormente se lava con PBS 0,1M y se crioprotege mediante inmersión en soluciones secuencialmente crecientes de sacarosa (Panreac Química S.A., Barcelona, España): primero sacarosa al 15% en PBS 0,1M y, a continuación, en sacarosa al 30% durante 24

horas cada fase. A continuación, se divide en dos mitades siguiendo la cisura interhemisférica cerebral y la cara dorsal del vermis. Cada una de ellas, correctamente identificada, es congelada rápidamente en hielo seco y se almacenada a -80°C.



**Figura 40.** Encéfalo de ratón seccionado en dos mitades a través del eje sagital mayor. La pieza más cercana al extremo izquierdo de la imagen se corresponde con la mitad derecha y la otra, la hemisección encefálica izquierda. En esta última, se visualiza fácilmente, de rostral a caudal (de derecha a izquierda en la imagen), el bulbo olfatorio, la corteza prefrontal, el colículo superior y el cerebelo, acabando finalmente en la porción más alta de la médula espinal cervical.

### 3.5.4 SECCIONES DE CEREBRO

En el momento del corte del hemisferio en secciones, se procedía al montaje del mismo sobre la platina usando el medio óptimo de montaje para congelación (Tissue-Tek® O.C.T.™; Sakura, Finetek U.S.A, Inc., Torrance, CA, EE.UU). Las secciones se realizaron con una orientación sagital y con un grosor de 25 µm usando un criostato (Leica, Jung CM3000, Alemania). Las secciones se recogieron en portaobjetos pretratados para este fin (SuperFrost®Plus, VWR International, Eurolabs SL, Barcelona, España) y se guardaron a -20°C hasta su uso.

### 3.5.5 INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

El estudio histológico de las áreas de interés estudiadas en cerebro y de diferentes poblaciones celulares se realizó mediante técnicas de inmunohistofluorescencia.

El protocolo seguido para las secciones sagitales de cerebro fue el siguiente:

1. Permeabilización: En primer lugar, se procede al atemperado y retirada de Tissue-Tek® adherido a las secciones y al porta mediante dos lavados con PBS durante 5



minutos a temperatura ambiente (2x5 min RT). Posteriormente, el tejido se permeabiliza con tres lavados de PBS-Tritón® X-100 0,1% (3x10 min RT).

2. Incubación con los anticuerpos primarios: Se preparó la solución con los anticuerpos primarios, el tampón de bloqueo con NDS (Normal Donkey Serum, NDS, Jackson ImmunoResearch Inc., Cambridge, Reino Unido) o NGS (Normal Goat Serum NGS, Jackson ImmunoResearch Inc, Cambridge, Reino Unido) diluido al 2% en PBS-Tritón® X-100 al 2% en PBS 0,1M y se aplicó 300 µL a cada portaobjetos. Para evitar el escape del líquido o la evaporación, se cubrieron posteriormente con una capa de plástico elástico (Parafilm®, Bemis Company Inc., Neenah, Wisconsin, EE.UU.) y permanecieron durante 24 horas a 4°C. Al día siguiente, se retiró el plástico y las secciones se lavaron en PBS-Tritón® X-100 0,5% (3x10 min RT).
3. Incubación con los anticuerpos secundarios: La incubación de los cortes con los anticuerpos secundarios en PBS-Tritón® X-100 2% se realizó durante 2 horas RT, también cubiertos con Parafilm®. Tras la incubación, se lavaron las retinas con PBS-Tritón® X-100 0,5% (3x10min RT) y, por último, dos lavados con PBS 0,1M para retirar los restos de detergente (2x5min RT).

Los cortes histológicos se montaron con un medio de montaje comercial que contiene DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Vectashied®, Laboratorios Vector, Inc., Burlingame, CA, EE.UU.), se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron con esmalte de uñas.

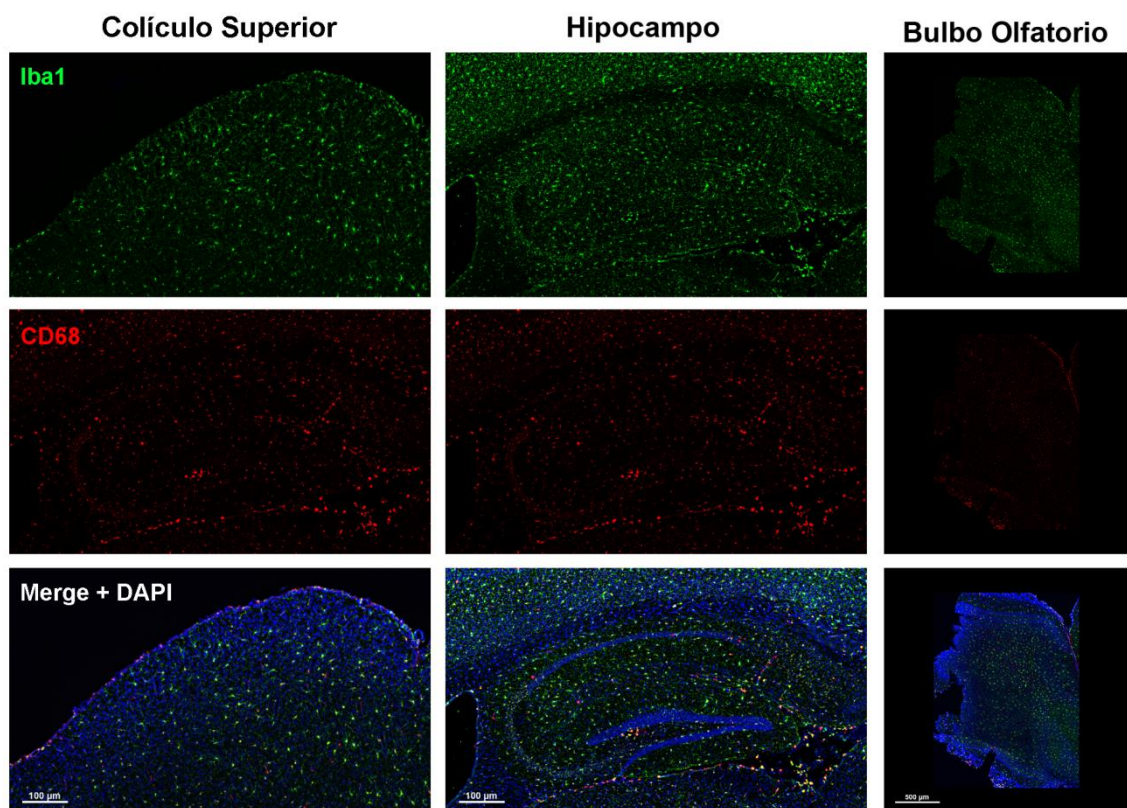
### 3.5.5.1 Anticuerpos primarios y poblaciones inmunodetectadas

Para la identificación de las distintas poblaciones celulares, se usaron varios anticuerpos primarios (**Tabla 5**) que reconocían de manera específica distintas proteínas de interés. Los anticuerpos primarios fueron reconocidos por anticuerpos secundarios conjugados a un fluoróforo que permitía su detección. Para el marcaje general de todas las células, se utilizó el marcaje con DAPI ya que se intercala en la doble cadena de ADN y tiñe todos los núcleos celulares, con un máximo de emisión a 461nm.

#### Immunodetección de las células de la microglía

La detección de la población total de las CMi se realizó mediante el uso de un anticuerpo que reconoce a Iba1. Esta molécula sólo se expresa en CMi y células del sistema mononuclear fagocítico (**ver Apartado 1.1.2.1. Microglía**).

Además, se inmunodetectó la glicoproteína CD68, expresada en la membrana lisosomal de la CMi y de los monocitos, que se sobreexpresa cuando la célula se activa y adquiere actividad fagocítica (**Figura 39**).

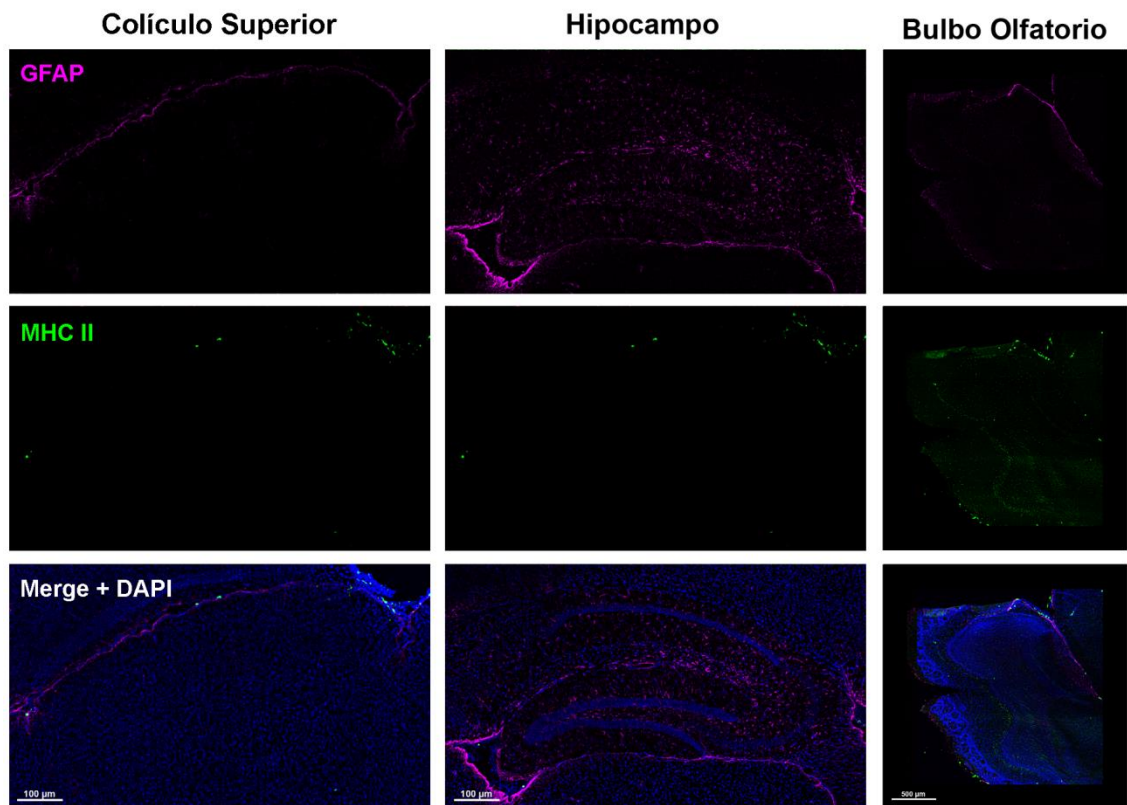


**Figura 41.** Imagen representativa del estudio de CMI por inmunohistoquímica. Se observa la expresión de CMI Iba1<sup>+</sup> (verde), CD68<sup>+</sup> (rojo) y la superposición de ambas con DAPI en secciones sagitales de las regiones cerebrales estudiadas de un ratón C57BL/6 intacto.

### Inmunodetección de la macroglía

El estudio de la CMA se hizo a través de la inmunodetección de la GFAP, una proteína del citoesqueleto que se expresa en los astrocitos en el SNC, aunque también se puede encontrar en las células de Müller de la retina (**ver Apartado 1.1.2.2. Macroglía**).

Además, se inmunodetectó la expresión de MHC II.



**Figura 42.** Imagen representativa del estudio de la macroglía por inmunohistofluorescencia. Se observa la expresión de CMa GFAP<sup>+</sup> (púrpura), MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI en secciones sagitales de las regiones cerebrales estudiadas de un ratón C57BL/6 intacto. El BO fue la única región del SNC donde se observó expresión constitutiva de MHC II.

### 3.5.5.2 Anticuerpos secundarios

Para detectar los anticuerpos primarios, se utilizaron anticuerpos secundarios de burro, cabra y coballa conjugados con fluoróforos Alexa Fluor 488® (verde), Alexa Fluor 555® (rojo) o Alexa Fluor 647® (rojo lejano) (**Tabla 5**).

Identificación	Antígeno	Anticuerpo primario	Casa Comercial	Dilución del Ac primario	Anticuerpo secundario	Cat number secundario	Casa comercial y Dilución del Ac secundario
<b>Células de la microglía</b>	Iba1	Conejo $\alpha$ Iba-1	ab178846, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:500	Burro $\alpha$ conejo Alexa Fluor 488	A32790	
	CD68	Rata $\alpha$ CD68	ab53444, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:750	Cabra $\alpha$ rata 555	A21247	Molecular Probes, Thermo Fisher, Madrid, España
<b>Células de la macroglía</b>	GFAP	Cobaya $\alpha$ GFAP	173 004 Synaptic Systems, Göttingen, Alemania	1:300	Cabra $\alpha$ coballa 647	A21450	1:500
	MHC II	Rata $\alpha$ MHC II de ratón	MHC Class II (I-A/I-E) Antibody (14-5321-82)	1:250	Cabra $\alpha$ rata 555	A21434	

**Tabla 5.** Listado de anticuerpos usados en la inmunohistofluorescencia. Anticuerpos primarios y secundarios, diluciones y casas comerciales que se usaron para la inmunodetección de determinadas poblaciones celulares o proteínas.

### 3.5.6 ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

Los cortes sagitales de cerebro se examinaron al microscopio para localizar las regiones a estudio, que se fotografiaron por separado. La adquisición de imágenes se realizó mediante un microscopio Leica DM6 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) que combina la microscopía de fluorescencia con la tecnología THUNDER, que permite obtener imágenes con una alta resolución eliminando el fondo irrelevante mediante aclaramiento computacional. El microscopio tiene acoplado a una cámara digital de alta resolución Leica DFC9000 GT (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), una platina y enfoque motorizados controlados por el programa informático de adquisición multidimensional de imágenes LAS-X Navigator (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). El microscopio estaba equipado con

filtros de fluorescencia UV (BP 340-380, LP 425) que permite la observación de la fluorescencia blanca; GFP (BP 470/40, BP 525/50) para Alexa Fluor 488®; Y3 (BP 535/50, BP 610/75) para Alexa Fluor 555®; y Y5 (BP 620/60, BP 700/75) para Alexa Fluor 647®.

Para la fotografía de una subregión, se delimitaba la localización de la misma y, a continuación, el microscopio permitía la adquisición automática y secuencial de campos contiguos usando el objetivo X20, lo que permitió obtener una imagen por cada filtro. Asimismo, las imágenes obtenidas en cada canal se podían superponer para obtener una foto única.

### 3.5.7 PROCESADO DE IMÁGENES

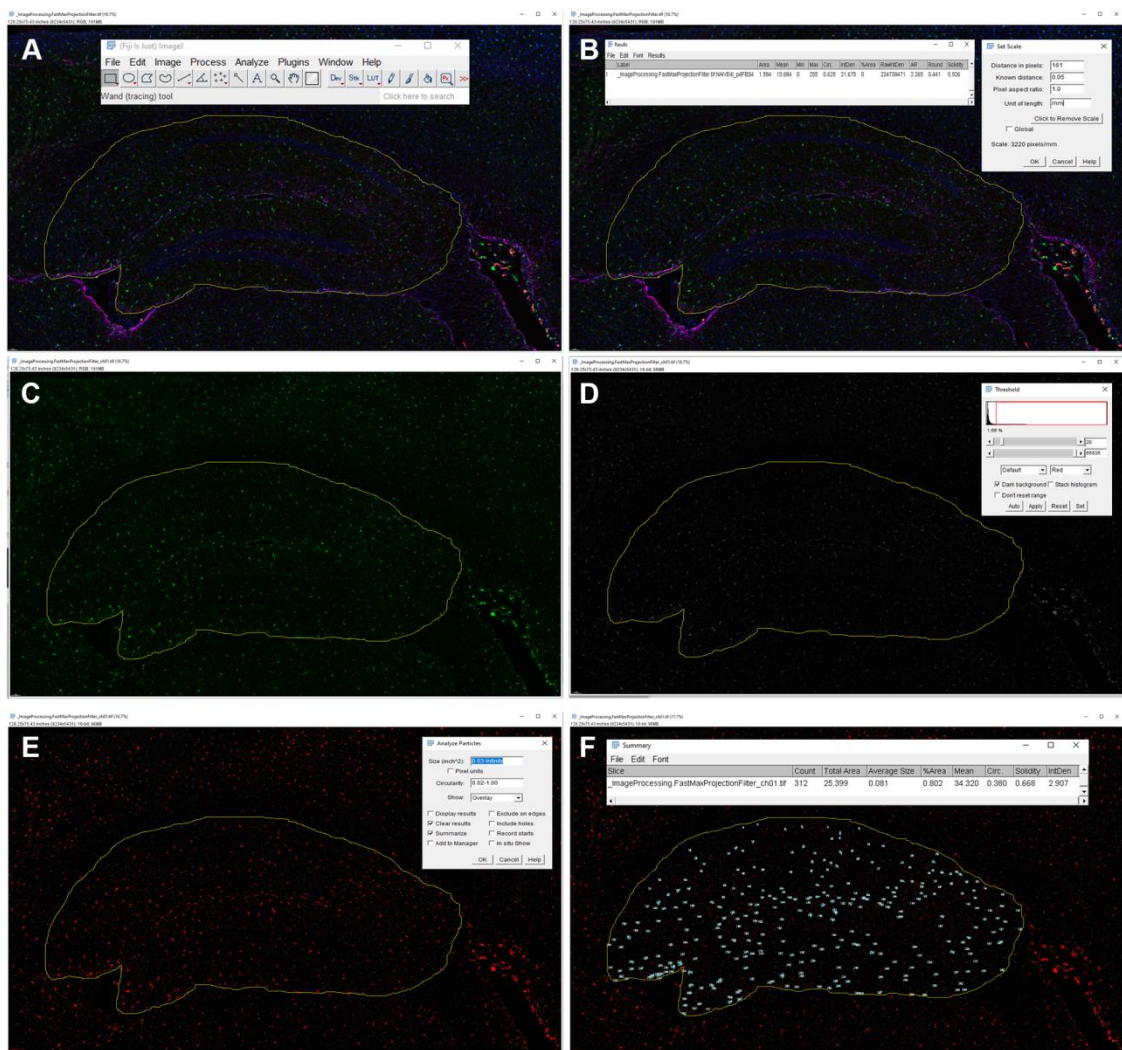
El estudio de imágenes se realizó en Fiji® (Fiji Is Just ImageJ), una distribución del software de código abierto ImageJ, centrado en la imagen biológica. ImageJ fue desarrollado en el National Institute of Health y es uno de los programas más populares por su acceso gratuito y por su arquitectura abierta que permite ampliar su funcionalidad a través de plugins Java u otras aplicaciones (Schneider et al., 2012).

#### 3.5.7.1 Cuantificación semiautomática de las células de la microglía

Como se representa en la **Figura 43**, inicialmente se calcula la superficie del área de interés a estudio. Para ello, se delimita la región, y según la escala de la imagen, obtenemos el dato en  $\text{mm}^2$ . El marcaje usado para delimitar el área de interés, también conocido como ROI (del inglés, “*Region Of Interest*”) se puede guardar como archivo para ser superpuesto posteriormente en la capa de células Iba1<sup>+</sup>. La introducción del ROI sobre la imagen permite delimitar que el conteo de células sea en su interior. La imagen debe ser convertida a 16 bits para pasar a escala de grises para visualizar mejor la coloración positiva, en rojo. A continuación, a través de un umbral que se ajusta a cada imagen, se estratifica en características de interés versus fondo. Dado que nuestro objetivo es analizar el número de células Iba1<sup>+</sup>, definimos como soma aquellas marcas con tamaño de 0,03 pulgadas cuadradas ( $19,35 \text{ mm}^2$ ) y circularidad de 0,02 a 1. Para acabar, se realizaba la cuantificación automática con el marcaje numerado de los somas considerados como células Iba1<sup>+</sup>.

De esta manera, dividiendo el número de células por el área estudiada, podemos obtener la densidad de las mismas en cada sección de cerebro y, contando entre 3 y 6 secciones por área (de hemisferio derecho o izquierdo), obtenemos la densidad media de células Iba1<sup>+</sup> por cada animal y región. La densidad de células Iba1<sup>+</sup> (densidad CMi Iba1<sup>+</sup>) de una región en un tiempo concreto será la media de los valores obtenidos de cada región en los 3 animales estudiados.





**Figura 43.** Proceso de cuantificación de células Iba1<sup>+</sup> en un hipocampo de un ratón intacto con Fiji®. **A.** Selección de la región a estudio (“region of interest”, ROI). **B.** Cambio de escala de pulgadas a mm<sup>2</sup>, sabiendo que las fotos tomadas a 20X con la barra de 50 µm se corresponde a 161 pulgadas, para el cálculo de la superficie de la región a estudio; en este caso, 1,584 mm<sup>2</sup>. **C.** Colocación del ROI sobre la imagen del canal en verde donde se muestran las células Iba1+. **D.** Transformación de la imagen a escala de grises. **E.** Definición de partículas a los puntos coloreados con un área mayor a 0,03 pulgadas y con una circularidad entre 0,02-1. **F.** Contaje automático de los somas de células Iba1<sup>+</sup>; en este caso, 312.

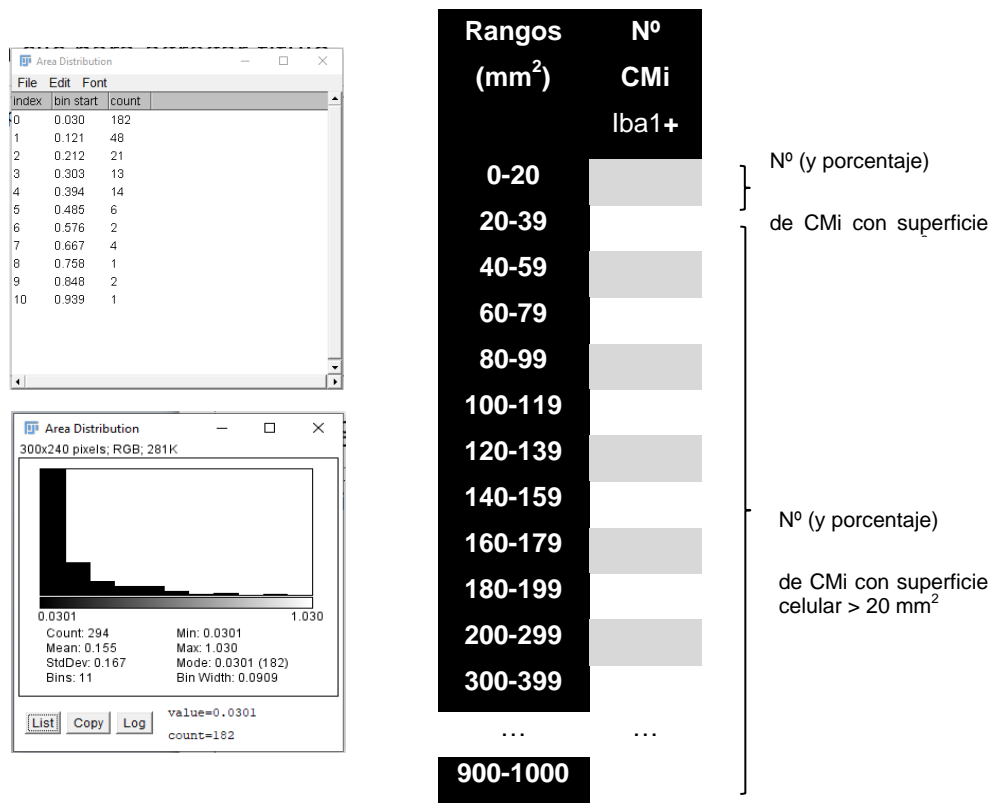
### 3.5.7.2 Estudio de la superficie celular de las células de la microglía

El estudio de la superficie celular de las CMI Iba1<sup>+</sup> se realizó siguiendo la metodología expuesta en el apartado anterior, **3.5.7.1. Cuantificación semiautomática de las células de la microglía.** Una vez que se obtenía el número de células (**Figura 43-F**), Fiji® las distribuye según el área celular (**Figura 44**). Para uniformizar la distribución, se pasó de

pulgadas cuadradas a  $\text{mm}^2$ . Teniendo en cuenta que el tamaño celular mínimo establecido era de 0,03 pulgadas cuadradas ( $19,35 \text{ mm}^2$ ), se reclasificaron en rangos de  $20 \text{ mm}^2$  desde 0 a 200, y luego cada  $100 \text{ mm}^2$ , excluyendo aquellas formaciones de más de  $1000 \text{ mm}^2$ .

Este proceso se realizó en las mismas secciones que se usaron para el conteo de CMi en las regiones cerebrales estudiadas. De esta manera, se pudo obtener un conteo promedio por rango para cada animal y luego un conteo promedio global para cada grupo y tiempo estudiado.

Para analizar si había diferencias en el tamaño de las células en una región, se simplificó la distribución por rangos en dos subdivisiones: células pequeñas o con área celular  $\leq 20 \text{ mm}^2$  y células grandes o con área celular  $> 20 \text{ mm}^2$ , obteniendo para cada grupo su porcentaje respecto del total. Se realizó un análisis estadístico con el número absoluto de CMi Iba1<sup>+</sup> así como con los porcentajes relativos, para evaluar diferencias en relación al intacto o al Sham, así como ipsi- o contralateral a la lesión, a lo largo de los 3 tiempos estudiados.



**Figura 44.** Ejemplo del proceso de cuantificación de la distribución por área celular de células Iba1<sup>+</sup> en una sección estudiada con Fiji®. En la primera tabla, se muestra la distribución en 10 rangos, enumerados del 1 al 10, en el que el primero siempre identifica el número de células  $\leq 20 \text{ mm}^2$  y luego las distribuye en rangos de forma



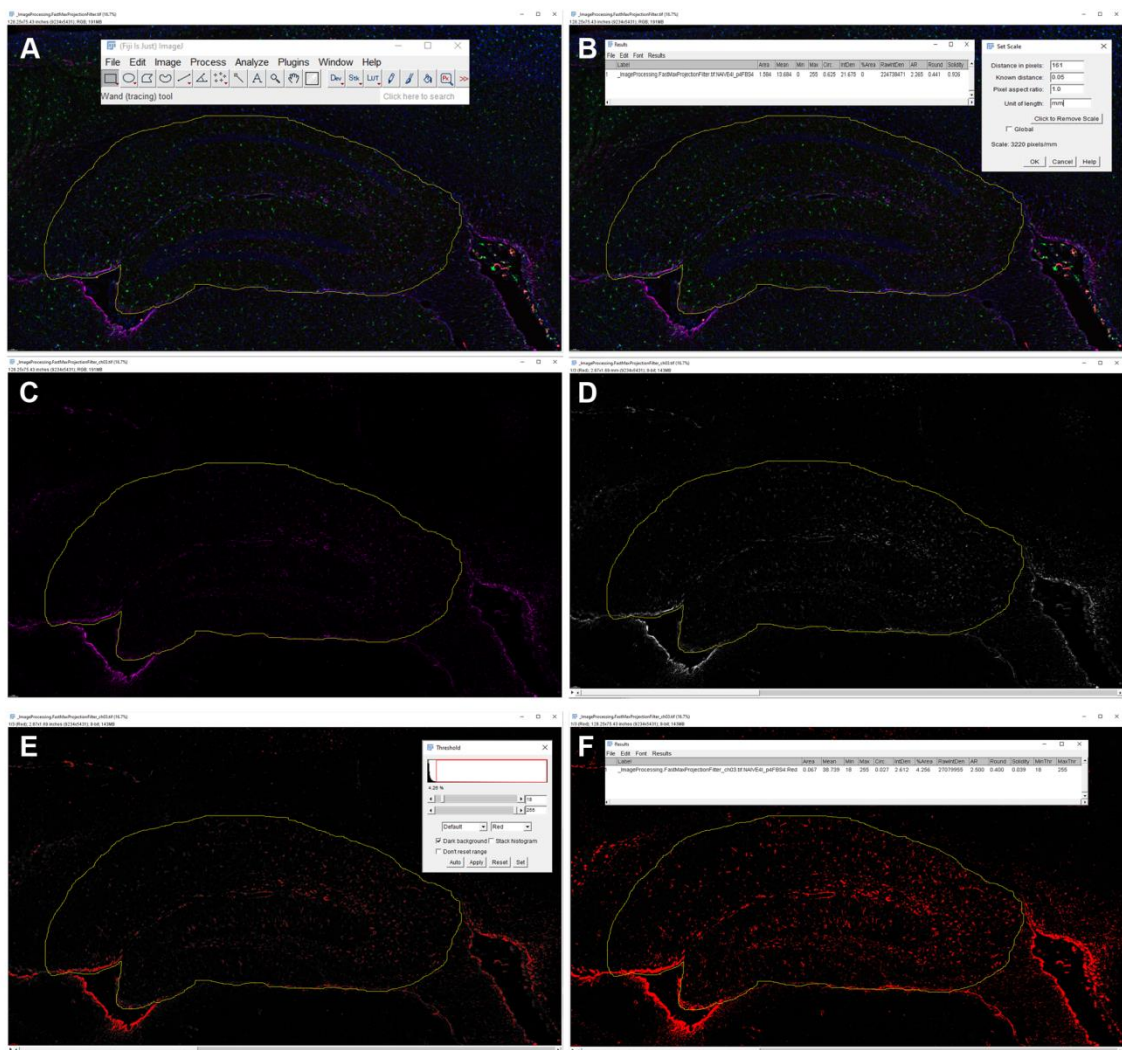
automática. En la imagen inferior, el programa representa gráficamente en un histograma estos resultados. En la tabla de la derecha, se ejemplifica la redistribución realizada en rangos uniformes de 20 mm<sup>2</sup> hasta 299 mm<sup>2</sup> y posteriormente cada 100 mm<sup>2</sup> hasta 1000 mm<sup>2</sup>. De esta manera, diferenciamos el número células pequeñas ( $\leq 20$  mm<sup>2</sup>) y su porcentaje respecto del total; así como el número absoluto y su porcentaje del resto ( $>20$  mm<sup>2</sup>).

Hay que tener en cuenta que la área celular a la que nos referimos es la señalada y coloreada para el conteo de CMi que, como se puede apreciar en la figura previa (**Figura 43-E**), corresponde generalmente al soma celular. Este método obviaría las variaciones en la área de la célula a expensas de sus ramificaciones.

### 3.5.7.3 Cuantificación automática del área ocupada por GFAP

Dada las características histológicas propias de los astrocitos, resulta difícil delimitar con la microscopía el aumento o descenso de la proliferación de los mismos, así como detectar variaciones de tamaño sin repercusión en el número. Por ello, optamos por analizar la respuesta estudiando el tanto por ciento de área marcada por GFAP respecto al total del área de interés. Para ello, las fotografías en el microscopio de fluorescencia se realizaron siempre con los mismos parámetros de ganancia y exposición.

En la **Figura 45**, se detalla el proceso. Partimos del cálculo de la superficie de la región de interés usando el ROI que previamente usamos para el conteo de CMi Iba1<sup>+</sup>. A continuación, se selecciona la imagen de GFAP y la convertimos a tipo RGB (*Red, Green, Blue*; modelo de color basado en la síntesis de un color basado en la adición de los tres colores de luz primarios). Esto permite elegir un umbral con el mismo nivel de brillo y contraste (18/155) para todas las imágenes, de forma que la única diferencia entre las mismas sería el área marcada. Para finalizar, se procede al cálculo automático de la superficie que el programa interpreta como coloreada con dicho filtro y se calcula un porcentaje de área ocupada por GFAP relativo al área total a estudio.



**Figura 45.** Proceso para la cuantificación del área ocupada por GFAP con Fiji®. **A y B.** Cálculo de la superficie del área de interés. **C.** Introducción del ROI sobre la imagen obtenida en el canal rojo lejano del anticuerpo Cabra  $\alpha$  coballa 647 para Coballa  $\alpha$  GFAP. **D.** Transformación de la imagen a tipo RGB. **E.** Ajuste uniforme de brillo y contraste definidos en 18/155 para todas las imágenes. **F.** Cálculo automático del área ocupada por GFAP.

### 3.5.8 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de la expresión la respuesta glial (micro o macroglía) se estudió en cerebro (colículo superior, hipocampo o bulbo olfatorio).

#### 3.5.8.1 Análisis del estudio histológico de la microglía

Para el análisis de la CMI de cada región cerebral, en primer lugar se caracterizó densidad media ( $\text{cel}/\text{mm}^2$ ) de Iba1<sup>+</sup> de dicha zona en animales intactos, en ambos hemisferios, y se

realizó la media entre ambos para tomar el valor promedio. De esta manera, se pudo mostrar la variación en la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> respecto al intacto de una región ipsi- y contralateral a la lesión en animales ApNO o Sham en los 3 tiempos estudiados en términos absolutos.

A continuación, se llevó a cabo el siguiente estudio por cada región de interés:

- **Comparación de la respuesta microglial Sham o ApNO vs. intacto:** Para el estudio comparativo, por un lado, se consideró la densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> de la región a estudio del animal intacto como el 100%. De esta manera, obtuvimos los porcentajes de CMi Iba1<sup>+</sup> en el grupo Sham o en el grupo ApNO relativos al intacto. Se analizaron si había diferencias entre los animales ApNO y Sham respecto al intacto; entre cada ApNO y su Sham, así como entre los grupos de otros tiempos de estudio; y entre ambos hemisferios.
- **Comparación de la respuesta microglial ApNO vs. Sham:** Por otro lado, consideramos la densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> del grupo Sham de cada tiempo como el 100%, lo que nos permitió obtener el porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> de su grupo ApNO correspondiente en relación al Sham. Se examinó si había diferencias entre los animales ApNO respecto a su Sham; entre los otros grupos de otros tiempos de estudio; y entre ambos hemisferios.

La expresión de CD68 se analizó de forma cualitativa.

#### **Análisis del estudio del área celular de CMi Iba1<sup>+</sup>**

En cada región de interés, estudiamos el área de las CMi Iba1<sup>+</sup> diferenciándolas en dos subpoblaciones: células grandes,  $\geq 20 \text{ mm}^2$  o pequeñas,  $< 20 \text{ mm}^2$ . Para cada subpoblación, se realizó:

- **Comparación de la respuesta microglial Sham o ApNO vs. intacto:** Se analizó tanto en términos absolutos (número de CMi Iba1<sup>+</sup>) como relativos (porcentaje respecto al total del grupo estudiado). El estudio se realizó en cada hemisferio por separado: entre los animales ApNO y Sham respecto al intacto; entre cada ApNO y su Sham, así como entre los grupos de otros tiempos de estudio.
- **Comparación de la respuesta microglial ApNO vs. Sham:** Se obtuvo el porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> del tamaño estudiado de cada grupo ApNO en relación a su Sham (considerado en este caso como el 100%). Se examinó si había diferencias entre los animales ApNO respecto a su Sham; entre los otros grupos de otros tiempos de estudio; y entre ambos hemisferios.

### 3.5.8.2 Análisis del estudio histológico de la macroglía

Dado que el área ocupada por la expresión de GFAP en cada inmunohistofluorescencia puede ser relativamente variable por las propias condiciones particulares de cada experimento, se decidió ponderar la superficie obtenida en cada sección por el valor medio obtenido en el animal intacto de la inmunodetección correspondiente, además de realizar siempre la captura con el microscopio de fluorescencia con los mismos parámetros de ganancia y exposición.

En el caso del animal intacto, de igual manera, los valores absolutos de área ocupada por GFAP se ponderaron por el promedio obtenido en su inmunodetección correspondiente. Por tanto, se obtuvo el valor de fluorescencia 1 para la región a estudio del animal intacto.

En la caracterización de la respuesta CMA de cada área de interés, se mostró la variación de área ocupada por GFAP respecto al intacto en animales ApNO o Sham en los 3 tiempos estudiados. Posteriormente, se realizó el siguiente análisis en cada zona de estudio:

- **Comparación de la respuesta macroglial Sham o ApNO vs. intacto:** De forma análoga al estudio de la microglía, en primer lugar se mostró el porcentaje de área ocupada por GFAP del animal ApNO o Sham respecto al área ocupada por GFAP en el animal intacto (considerado como 100%). Se analizaron si había diferencias entre los animales ApNO y Sham respecto al intacto; entre cada ApNO y su Sham, así como entre los grupos de otros tiempos de estudio; y entre ambos hemisferios.
- **Comparación de la respuesta macroglial ApNO vs. Sham:** Se consideró al animal Sham como el 100%, lo que permitió obtener los porcentajes en cada grupo de ApNO respecto a sus respectivos Sham. Se examinó si había diferencias entre los animales ApNO respecto a su Sham; entre los otros grupos de otros tiempos de estudio; y entre ambos hemisferios.

El análisis de la expresión de MHC II se realizó de forma cualitativa.

## 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico y de representación gráfica Graph Pad® Prism v6 (GraphPad, San Diego, CA, EE.UU.).

Para la comparación de dos grupos, se realiza la prueba t-test o Mann Whitney test. Para la comparación de más de dos grupos se realiza un análisis de comparación múltiple por parejas, generalmente el test ANOVA o Kruskal Wallis 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  $p < 0,05$ .

### 3.7 TABLAS RESUMEN DE METODOLOGÍA

Pregunta	Comparación	Tejido	Método
<b>Retina</b>			
¿El ApNO causa una respuesta glial, inflamatoria y/o apoptosis en la retina?	ApNO vs. Intacto	Retina	-EH: (González-Riquelme et al., 2021; Nadal-Nicolás et al., 2017; Rovere et al., 2016; Sánchez-Migallón et al., 2016).  -EM: (Agudo et al., 2009; Lucas-Ruiz et al., 2019); ampliado en esta tesis.
¿La cirugía Sham causa una respuesta inflamatoria y/o glial en la retina?	Sham vs. Intacto	Retina	EM realizado en esta tesis
¿Cuál es el impacto exclusivo del ApNO en la retina?	Sham vs. ApNO	Retina	-EH Sham no realizado.  -EM realizado en esta tesis
<b>Otras regiones del SNC</b>			
¿El ApNO causa una respuesta glial, inflamatoria y/o apoptosis en el CS o H o BO o Ce* o Me*?	ApNO vs. Intacto	CS o H o BO o CE* o ME*	EH y EM realizado en esta tesis
¿La cirugía Sham es capaz de generar una respuesta glial, inflamatoria y/o apoptosis en el CS o H o BO o Ce* o Me*?	Sham vs. Intacto	CS o H o BO o CE* o ME*	EH y EM realizado en esta tesis
¿Cuál es el impacto exclusivo del ApNO en CS o H o BO?	Sham vs. ApNO	CS o H o BO o CE* o ME*	EH y EM realizado en esta tesis

**Tabla 6. Preguntas a responder, revisión de la literatura y metodología usada.** EH: Estudio histológico o anatómo-patológico, EM: Estudio molecular. En todos los experimentos realizados, se ha comparado la respuesta ipsi- y contralateral a la lesión, además de entre los tiempos estudiados (para EH; 3,9 ó 30 días tras el ApNO, y para el EM; 1,3,9 ó 30 días tras el ApNO). \*En Cerebelo (CE) y Médula (ME) sólo se ha realizado EM.

	Estudio histológico	Estudio molecular	
		Propios	Globales
<b>Microglía</b>	Iba1 CD68	<i>Iba1</i> <i>Tspo</i> <i>Mhc II</i>	<b>Anti-inflamatorios:</b> <i>Cd206, Il-4, Tgf-β1</i>  <b>Pro-inflamatorios:</b> <i>Caspasa-3, Cxcr1, Il-1β, Lcn2, Tnf-α, Il-6</i>  <b>Apoptosis:</b> <i>Caspasa-3</i>
<b>Macroglía</b>	GFAP MHC II	<i>Gfap</i> <i>Aq4</i> <i>Mhc II</i>	
<b>Marcadores de gliosis</b>			<b>Marcadores inflamatorios y de apoptosis</b>

**Tabla 7. Marcadores estudiados para el estudio de neuroinflamación.** Las CMi se estudian a nivel histológico con la inmunodetección de Iba1 y CD68 y mediante la expresión génica de *Iba1* y *Tspo*. Las CMa se inmunodetectan con GFAP y MHC II y mediante la expresión de *Gfap*, *Aq4* y *Mhc II*. Además, se estudia la expresión de marcadores proinflamatorios (*Cxcr1, Il-1β, Lcn2, Tnf-α*), antiinflamatorios (*Cd206, Il-4, Il-6, Tgf-β1*) y de apoptosis (*Caspasa-3*).





# 4.RESULTADOS

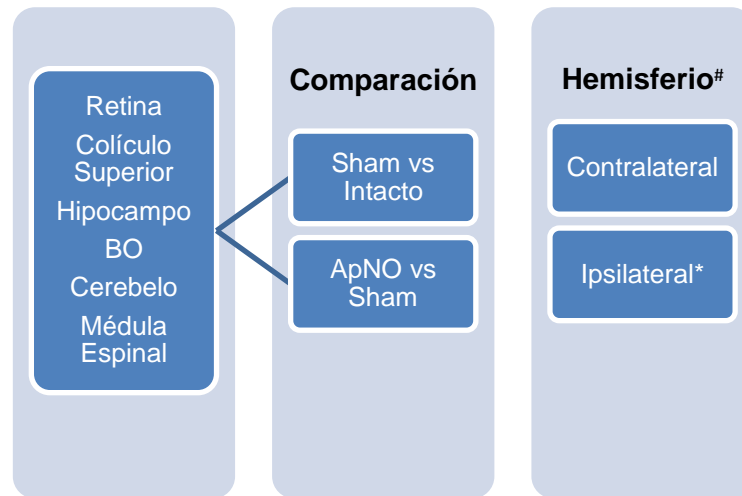
## 4.1 ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SNC

El ApNO supone una axotomía de todas las fibras que componen el NO lo que provoca muerte de la mayoría de las CGR y una respuesta inflamatoria y glial en la retina directamente lesionada. Además, se desencadena una respuesta de características similares pero con mucho menor intensidad en la retina contralateral. El estudio histológico de la respuesta glial en ambas retinas ha sido recientemente publicado por nuestro grupo (González-Riquelme et al., 2021) y el análisis de posibles mediadores moleculares ha sido sujeto de estudio en algunos trabajos (Agudo et al., 2009; Lucas-Ruiz et al., 2019). Sin embargo, el impacto de la respuesta inflamatoria y glial a lo largo de la vía visual o fuera de ella, adyacentes o alejadas anatómicamente de la retina, ha sido escasamente abordado.

Así, nos propusimos como primer objetivo de esta Tesis analizar los cambios en la expresión génica mediante qPCR en la retina lesionada y contralateral; ambos CS, como principal región retino-recipiente en la vía visual; y en otras regiones remotas del SNC fuera de la vía visual (RRSNC: H, BO, CE y ME). Evaluamos marcadores de gliosis (CMI, *Iba1*; CMa, *Gfap* y *Aq4*); marcadores de activación glial (*Mhc II* y *Tspo*); marcadores inflamatorios (con predominio de acción pro-inflamatoria –*Cxcr1*, *IL-1 $\beta$* , *Lcn2*, *Tnf- $\alpha$* , *Il-6*– o antiinflamatoria –*Cd206*, *Il-4*, *Tgf- $\beta$ 1*–) y *Caspasa-3* como marcador de apoptosis.

La expresión de cada gen en el animal intacto se ha utilizado como referencia y su valor se ha considerado como la unidad. Como se ha expuesto en el **Apartado 3.4. Extracción de muestras para el análisis molecular**, la expresión de cada gen se estudió de forma relativa a los genes *housekeeping*. En cada tejido estudiado, en primer lugar, se compara la expresión génica del animal Sham con el animal intacto (**Figura 46**). En segundo lugar, dado que como se verá a continuación, la cirugía Sham demostró alterar la expresión génica en alguna región, y con objeto de aislar el efecto exclusivamente del ApNO, se compararon los animales con el ApNO respecto a sus respectivos Sham.

En primer lugar, se expondrán los resultados del estudio de la retina lesionada y, a continuación, la retina contralateral. Posteriormente, se expondrán los resultados en el resto de tejidos: en estas áreas, se mostrarán primero los datos en la región contralateral al ApNO, dado que la mayor parte de CGR proyectan sus axones al hemisferio contralateral, y luego en la ipsilateral.



**Figura 46. Esquema de la estructura para el análisis de la expresión génica en cada tejido.**

Para cada región estudiada se hicieron 2 comparaciones: Sham vs. Intacto y ApNO vs. Intacto. En cada una de ellas, se compara la respuesta contralateral con la ipsilateral a la lesión. <sup>#</sup>Se refiere a hemisferio cerebral salvo en 3 casos: en el cerebelo, alude al hemisferio cerebeloso; en la médula espinal, que se corresponde a la hemimédula correspondiente y a las retinas. \*En el caso de la retina, dado que el ApNO es un daño directo al lado ipsilateral, lo denominaremos lesionado.

## 4.1.1 ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA RETINA TRAS EL ApNO.

### 4.1.1.1 Respuesta inflamatoria en la retina tras la cirugía Sham

Los resultados expuestos en la **Figura 47-A y 48-A** muestran que la cirugía Sham induce un cambio en la expresión de los marcadores inflamatorios y gliales estudiados que se resumen en la **Tabla 8**.

#### 4.1.1.1.1 Retina Sham

Si bien la cirugía Sham no parece implicar un daño directo al NO o a la retina, al exponer el nervio en su trayecto intraorbitario sin manipulación directa con cierre posterior, denominaremos retina Sham a la correspondiente al mismo lado en el que se expone el NO sin lesionarlo (**ver Apartado 3.2. Diseño experimental**).

Las moléculas pro-inflamatorias estudiadas, *Il-1β* y *Tnf-α*, aumentaron en el día 1 y 30 tras el ApNO. En particular, la expresión de *Tnf-α* el primer día fue significativamente mayor que en la retina contralateral.

Hubo un descenso de expresión de los marcadores de CMA (*Gfap/Aq4*) y CMi (*Iba1*), especialmente a los 9 días. En cuanto a los marcadores de reactivación glial, *Tspo* y *Mhc II*, sólo se elevó *Tspo* el día 1 tras el ApNO.

#### 4.1.1.1.2 Retina contralateral

La inducción de la respuesta pro-inflamatoria de la cirugía Sham no solo se limita a la retina del NO expuesto, sino que también se aprecia en la retina contralateral. No obstante, los cambios fueron menores y se apreciaron más tarde. *Il-1β* aumentó a los 9 días y *Tnf-α* sólo a los 30 días, sin que ninguno de estos incrementos fuera significativamente mayor al lado lesionado.

La expresión de *Aq4*, *Gfap* e *Iba1* no presentó cambios respecto al intacto pero *Tspo* también se sobreexpresó, aunque de forma más tardía a la retina Sham, a los 9 ó 30 días.

		RETINAS		Día 1	Día 3	Día 9	Día 30
Marcadores inflamatorios	<i>Tgf-β1</i>	Sham					
		Contralateral					
	<i>Il-1β</i>	Sham	↑				
		Contralateral			↑		
	<i>Tnf-α</i>	Sham	↑	↓	↓	↑	
		Contralateral		↓		↑	
Marcadores de gliosis	<i>Aq4</i>	Sham			↓		
		Contralateral		↓			
	<i>Gfap</i>	Sham			↓		
		Contralateral			↓		
	<i>Iba1</i>	Sham			↓		
		Contralateral					
	<i>Mhc II</i>	Sham					
		Contralateral					
	<i>Tspo</i>	Sham	↑				
		Contralateral			↑	↑	

**Tabla 8.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en la retina Sham y la contralateral al ApNO respecto a la retina intacta a los días 1, 3, 9 ó 30 del ApNO. Las flechas ↑ en verde indican aumento de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso de expresión.

#### 4.1.1.2 Respuesta inflamatoria en la retina tras el ApNO

La cirugía Sham resulta suficiente para provocar cambios inflamatorios. Para aislar el efecto del ApNO en la retina, se realizó la comparación entre animales con el ApNO y sus respectivos Sham (**Figuras 47-B y 48-B**, resumidas en la **Tabla 9**).

#### 4.1.1.2.1 Retina lesionada

En cuanto a las citoquinas pro-inflamatorias, *Tnf- $\alpha$*  se sobreexpresó a los 3 y 9 días, e *Il-1 $\beta$*  a los 30 días de forma significativa respecto a la retina contralateral. Asimismo, hubo un intento antiinflamatorio mediado por *Tgf- $\beta$ 1* a partir del día 9, no observado en la retina contralateral.

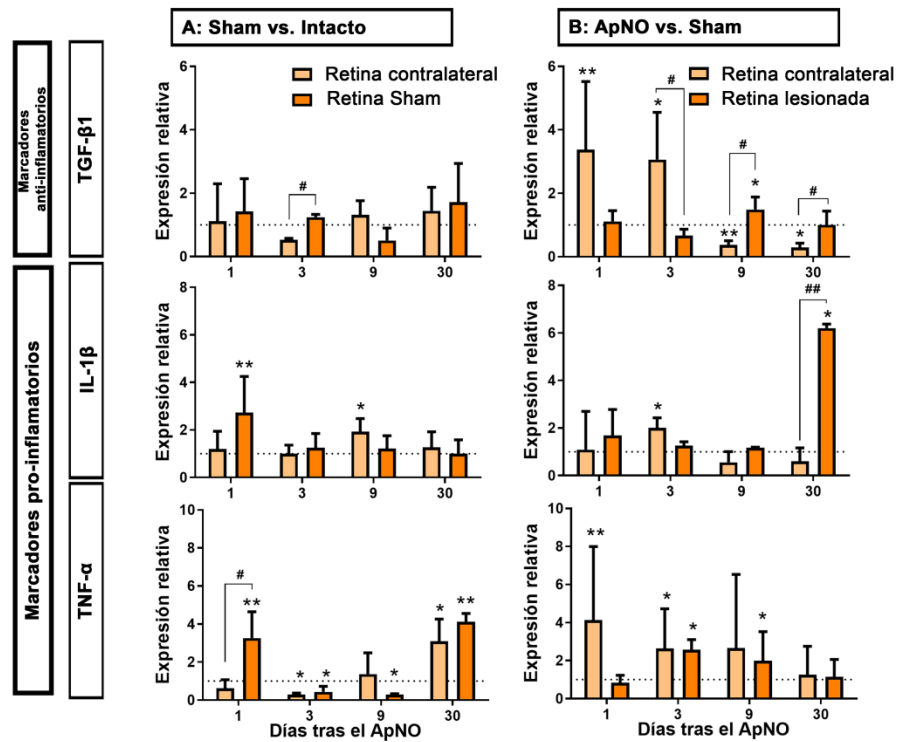
En cuanto a los marcadores de gliosis, hubo una respuesta más precoz de la CMA, por un aumento de expresión de *Gfap* ya el primer día tras el ApNO que se mantuvo hasta el día 9, suponiendo un incremento significativamente mayor que el producido en la retina contralateral. *Iba1* (CMi) comenzó a sobreexpresarse el día 3 y también alcanzó su máximo el día 9. Igualmente, 9 días tras el ApNO, *Aq4* se sobreexpresó en ambas retinas.

A diferencia del animal Sham respecto al intacto, la evidencia de activación glial fue evidente: *Mhc II* se sobreexpresó en los días 3 y 9 días tras el ApNO, en este caso de forma significativa respecto a la contralateral. *Tspo* se sobreexpresó en todos los tiempos de estudio excepto el día 3. Todos los marcadores de gliosis excepto *Tspo* volvieron a niveles similares al Sham.

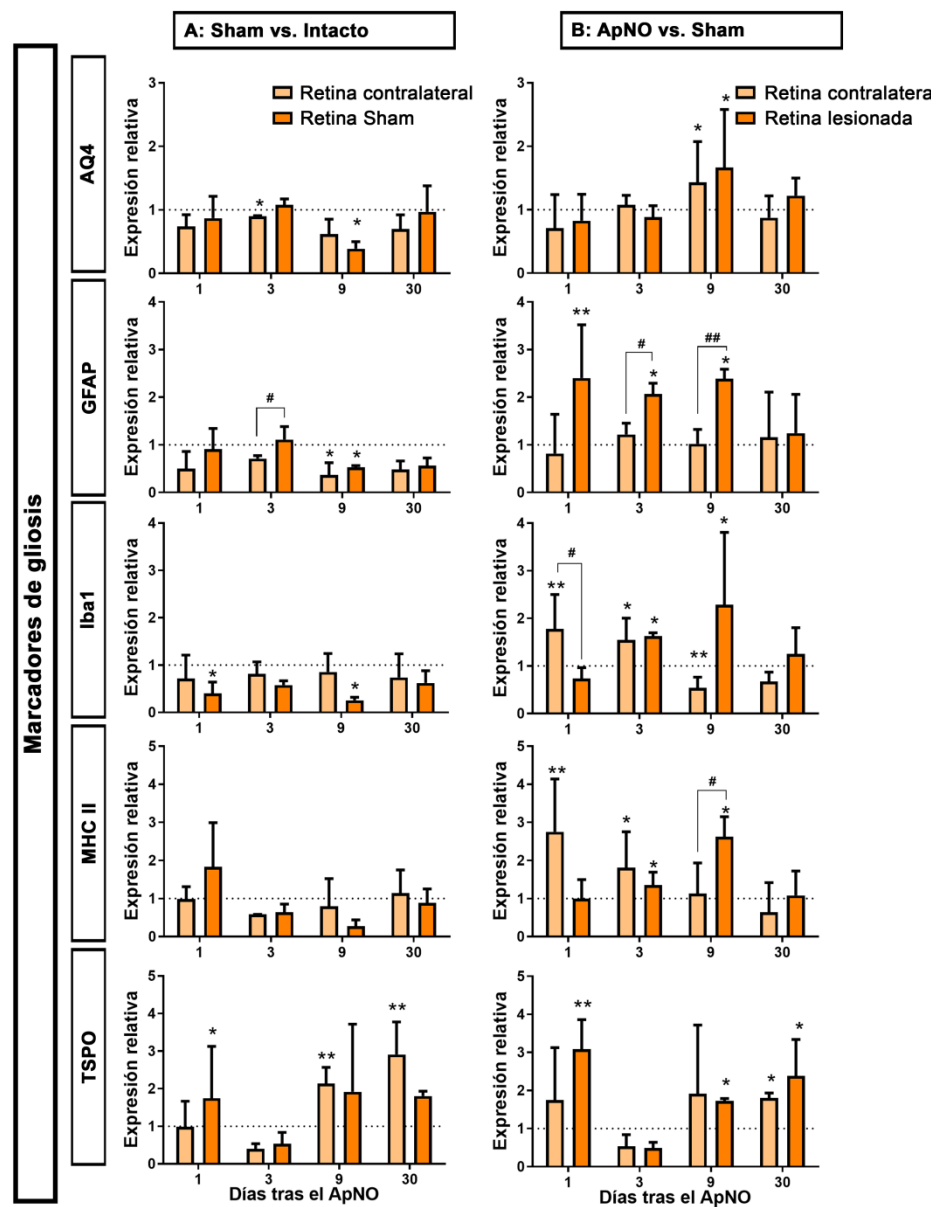
#### 4.1.1.2.2 Retina contralateral

La retina contralateral también presentó una respuesta rápida tras el ApNO. Las citoquinas pro-inflamatorias (*Il-1 $\beta$*  y *Tnf- $\alpha$* ) se expresaron en los días 1 y 3, sin diferencias significativas respecto a la retina contralateral. A diferencia de la sobrerregulación a partir del día 9 de *Tgf- $\beta$ 1* en la retina lesionada, la acción antiinflamatoria es evidente y significativa respecto a la retina lesionada en los primeros tres días.

La respuesta microglial (incremento de *Iba1*) también ocurrió en los 3 primeros días, más precoz que en la contralateral, donde la respuesta inicial fue a expensas de la CMA (*Gfap*), que en este caso permanece sin cambios respecto al Sham. La glía presentaba marcadores de activación: *Mhc II* en los días 1 y 3, y *Tspo* el día 30.



**Figura 47.** Expresión de los marcadores inflamatorios por qPCR en la retina lesionada y contralateral. Se estudió la expresión de marcadores antiinflamatorios (*Tgf-β1*) y pro-inflamatorios (*Il-1β* y *Tnf-α*) a los días 1, 3, 9 ó 30 tras la lesión. **A.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión ± DEM de los mediadores en la retina Sham (izquierda) o contralateral (derecha) tras la cirugía Sham comparado con retinas intactas (1). **B.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión de los mediadores ± DEM en la retina lesionada o contralateral respecto a sus Sham (1). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



**Figura 48.** Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en la retina lesionada y contralateral. Se estudió CMA (*Aq4* y *Gfap*), CMi (*Iba1*) y marcadores de activación glial (*Mhc II* y *Tspo*) a los días 1, 3, 9 ó 30. **A.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión de los mediadores en la retina Sham (izquierda) o contralateral (derecha) tras la cirugía Sham comparado con retinas intactas (1). **B.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión de los mediadores en la retina lesionada o contralateral respecto a sus Sham (1). Se examinó si había diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



		RETINAS	Día 1	Día 3	Día 9	Día 30
Marcadores inflamatorios	<i>Tgf-β1</i>	ApNO			↑	
		Contralateral	↑	↑	↓	↓
	<i>Il-1β</i>	ApNO				↑
		Contralateral		↑		
	<i>Tnf-α</i>	ApNO		↑	↑	
		Contralateral	↑	↑		
Marcadores de gliosis	<i>Aq4</i>	ApNO			↑	
		Contralateral			↑	
	<i>Gfap</i>	ApNO	↑	↑	↑	
		Contralateral				
	<i>Iba1</i>	ApNO		↑	↑	
		Contralateral	↑	↑	↓	
	<i>Mhc II</i>	ApNO		↑	↑	
		Contralateral	↑	↑		
	<i>Tspo</i>	ApNO	↑		↑	↑
		Contralateral				

**Tabla 9.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en la retina lesionada y la contralateral al ApNO respecto a sus correspondientes Sham a los días 1, 3, 9 ó 30 del ApNO. Las flechas ↑ en verde indican aumento de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso de expresión.

#### 4.1.1.2.3 Correlación entre degeneración de las CGR, activación microglial y respuesta inflamatoria.

Como se expone en el **Apartado 1.5.1. Aplastamiento del nervio óptico como modelo de degeneración en el SNC**, en el Laboratorio se ha documentado previamente que el ApNO en la retina lesionada causa una muerte del 85% de las CGR en los primeros 14 días, activación de la CMi con migración de las CMi Iba1<sup>+</sup> a las capas más internas e hipertrofia transitoria de las CMA GFAP<sup>+</sup> (astrocitos y células de Müller). En la retina contralateral, se ha documentado la muerte del 15% de las CGR en los primeros 45 días y una hipertrofia transitoria de las CMA GFAP<sup>+</sup> a los 3 días pero no se observaron cambios a nivel histológico en las CMi Iba1<sup>+</sup> (Barron et al., 1986; González-Riquelme et al., 2021; Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás., et al., 2015; Thanos, 1988; Villegas-Pérez et al., 1993). En ambas retinas, hubieron signos de activación por sobreexpresión de CD68 (González-Riquelme et al., 2021).

Dado que nuestro grupo ha estudiado el curso de muerte de las CGR tras el ApNO (Galindo-Romero et al., 2011b; Lucas-Ruiz., et al., 2019; Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás., et al., 2015) y la respuesta micro y macroglial en la retina (González-Riquelme et al., 2021; Nadal-Nicolás et al., 2017), nos propusimos relacionar estos datos anatómicos con la expresión de los genes estudiados en esta Tesis (**Figura 49**).

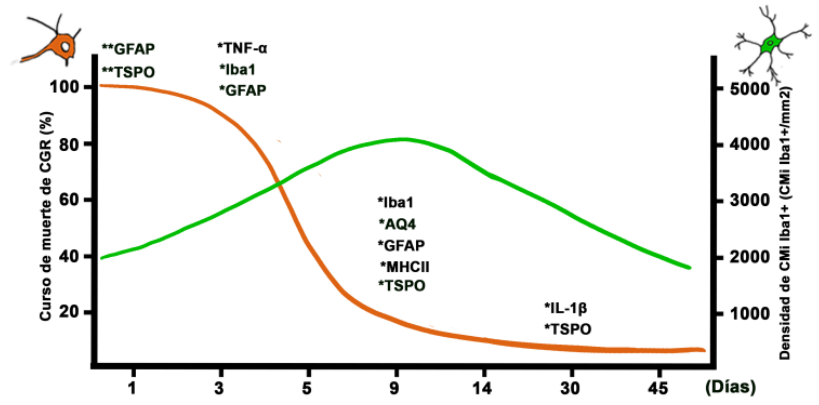
Para estudiar esta correlación, nos centraremos en la respuesta exclusivamente atribuible al ApNO; es decir, en la comparación de los animales con ApNO vs. Sham (**Figuras 47-B y**

**48-B; Tabla 9).** La reacción en la retina lesionada y la contralateral fue rápida, desde el día 1 tras el ApNO, tanto de marcadores pro- y antiinflamatorios como de gliosis. La respuesta fue más duradera en la retina lesionada que en la contralateral, en la que además observamos que algunos marcadores se infraregulaban.

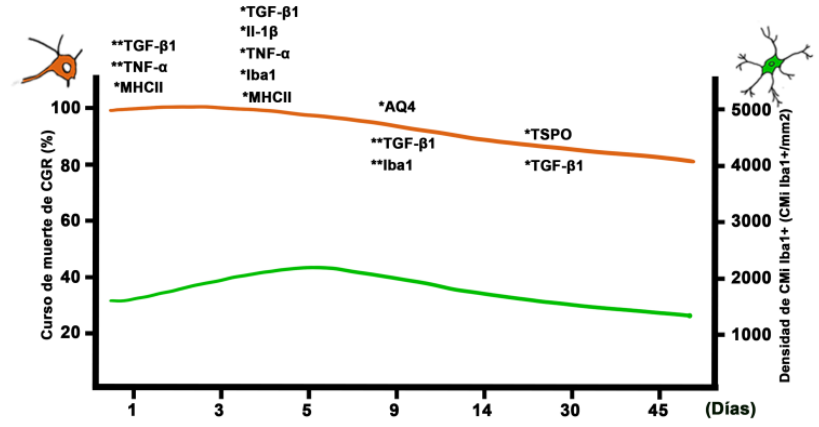
Tanto las citoquinas pro-inflamatorias (*Tnf- $\alpha$* , *Il-1 $\beta$* ) como la antiinflamatoria (*Tgf- $\beta$ 1*), aumentan de forma más precoz en la retina contralateral que en la retina lesionada. No obstante, mientras que las citoquinas pro-inflamatorias perduran elevadas en las retinas del ApNO, *Tgf- $\beta$ 1* se infraregula a partir del día 9 en la retina contralateral, sugiriendo menor necesidad de señal antiinflamatoria. De forma particular, en la retina lesionada hubo una sobreexpresión de *Tnf- $\alpha$*  a los 3 y 9 días tras el ApNO, cuando la muerte de la CGR es significativa por primera vez y comienza la segunda fase de muerte, respectivamente. La citoquina antiinflamatoria *Tgf- $\beta$ 1* sólo se sobreexpresó a los 9 días, cuando ya han muerto la mayoría de CGR.

En cuanto a los marcadores de gliosis, la respuesta macroglial (aumento de *Gfap*) fue exclusiva de la retina del ApNO mientras que la respuesta microglial (aumento de *Iba1*) se vió en ambas, siendo más precoz en la retina contralateral. Tanto en la retina del ApNO como la contralateral, aumentaron la expresión de marcadores de activación glial (*Mhc II* y *Tspo*), pero en la retina contralateral *Tspo* se infrareguló a los 9 días y en la lesionada permaneció sobreexpresado a los 30 días.

**A: Retina lesionada**



**B: Retina contralateral**



**Figura 49.** Resumen del curso de la expresión de los marcadores estudiados tras el ApNO en relación a la muerte de CGR y la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup>. Se muestra la retina lesionada (A) y contralateral (B) respecto a los animales Sham (considerados como valor 100%). En la figura, la línea naranja representa la disminución de la densidad de CGR inducida por la axotomía (Barron et al., 1986; González-Riquelme et al., 2021; Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás., et al., 2015; Thanos, 1988; Villegas-Pérez et al., 1993); y la línea verde, la variación de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> en las retinas. Los marcadores que expresaron un aumento o descenso de expresión están por encima de la línea naranja y, por debajo, los que se infrarregularon.

**4.1.2 ESTUDIO MOLECULAR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN OTRAS REGIONES DEL SNC**

**4.1.2.1 Colículo superior**

**4.1.2.1.1 Respuesta inflamatoria y apoptosis en el colículo superior tras la cirugía Sham**

La cirugía Sham fue suficiente para producir cambios en la expresión de los marcadores inflamatorios y gliales en ambos CS (**Figuras 50-A, 51-A, 52-A**), resumidos en la **Tabla 10**.

En el **CS contralateral (CSc)**, hubo evidencia de apoptosis (sobrexpresión de *Caspasa-3*) a partir del día 9 tras la cirugía. La sobrexpresión de los marcadores pro-inflamatorios *Cxcr1*, *Lcn2* e *Il-6* fue evidente el día 1. La expresión de citoquinas *Tnf- $\alpha$*  e *Il-1 $\beta$*  no se modificó a lo largo de los tiempos estudiados. En cuanto a los marcadores antiinflamatorios, *Cd206* e *Il-4* se sobreexpresaron en todos los tiempos estudiados y *Tgf- $\beta$ 1* a los 30 días tras la cirugía. Los marcadores de gliosis permanecieron sin cambios respecto al intacto en todos los tiempos estudiados salvo una infrarregulación de *Aq4* el primer día tras la cirugía.

En el **CS ipsilateral (CSi)**, el perfil de expresión de los genes pro- y antiinflamatorios fue muy similar al expuesto en el CSc salvo *Il-6*, que mostró más tendencia a sobre-expresarse en el CSi. A diferencia del CSc, en el CSi se observaron signos de respuesta glial el primer día tras la la intervención, tanto de la CMa (infrarregulación de *Gfap*) como microglial (sobrexpresión de *Iba1*).

A) COLÍCULO SUPERIOR Sham vs. Intacto		Día 1	Día 3	Día 9	Día 30	
Marcador de apoptosis	<b>Caspasa-3</b>	Ipsilateral		-	↑	↑
		Contralateral		-	↑	↑
Marcadores pro-inflamatorios	<b>Cxcr1</b>	Ipsilateral	↑	-		
		Contralateral	↑	-		
	<b>Il-1<math>\beta</math></b>	Ipsilateral				
		Contralateral		-		
	<b>Lcn2</b>	Ipsilateral	↑	↑		
		Contralateral	↑	-		
	<b>Tnf-<math>\alpha</math></b>	Ipsilateral				
		Contralateral		-		
	<b>Il-6</b>	Ipsilateral		↑	↑	↑
		Contralateral	↑	-		
Marcadores antiinflamatorios	<b>Cd206</b>	Ipsilateral	↑	-	↑	↑
		Contralateral	↑	-	↑	
	<b>Il-4</b>	Ipsilateral		↑	↑	↑
		Contralateral	↑	-	↑	↑
	<b>Tgf-<math>\beta</math>1</b>	Ipsilateral		↑		
		Contralateral		-		↑
Marcadores de gliosis	<b>Aq4</b>	Ipsilateral	↓			
		Contralateral	↓	-		
	<b>Gfap</b>	Ipsilateral	↓			
		Contralateral		-		
	<b>Iba1</b>	Ipsilateral	↑			
		Contralateral		-		
	<b>Mhc II</b>	Ipsilateral				
		Contralateral		-		
	<b>Tspo</b>	Ipsilateral				
		Contralateral		-		

**Tabla 10.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en el CS contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.

#### 4.1.2.1.2 Respuesta inflamatoria y apoptosis en el colículo superior tras el ApNO

Al igual que lo observado en la retina, la cirugía Sham también modificó la expresión génica en el CS. Por ello, realizamos la comparación entre animales con ApNO y sus respectivos Sham (**Figuras 50-B, 51-B, 52-B**) (**Tabla 11**).

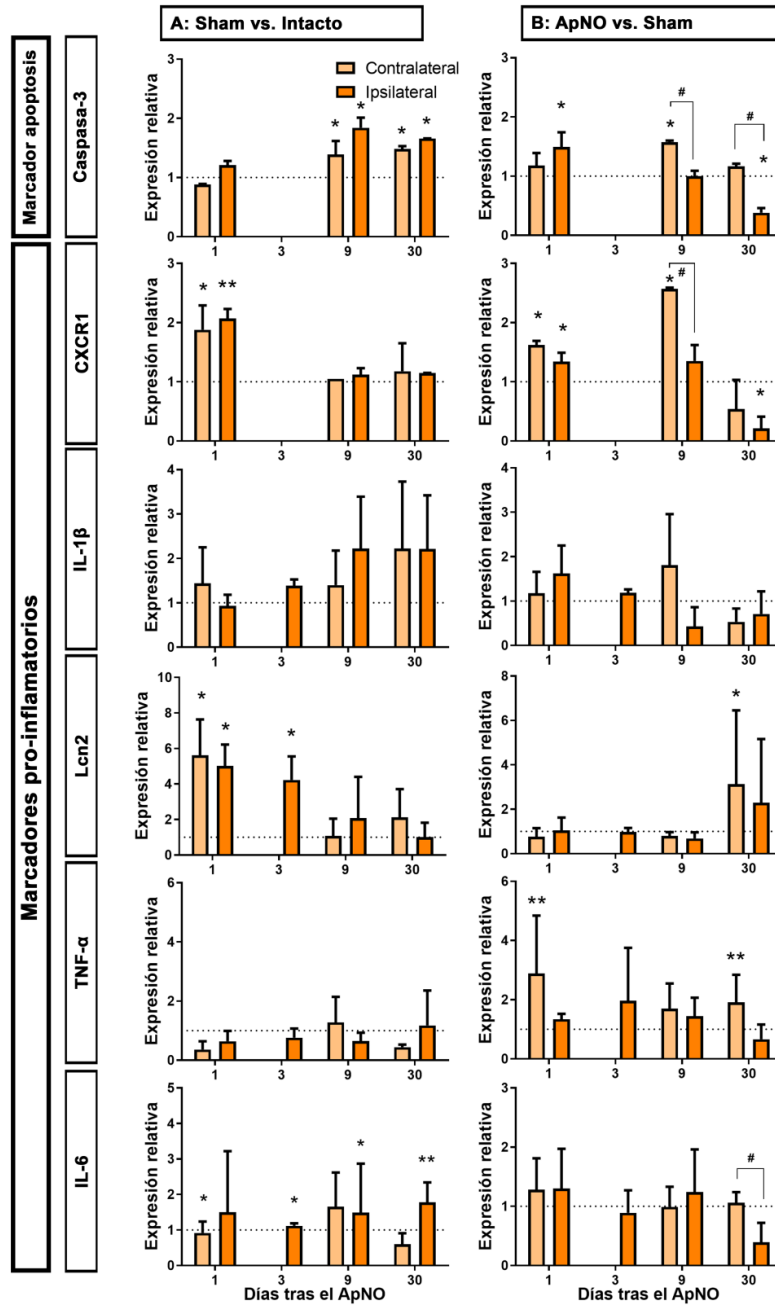
El **CSc** al ApNO mostró, en comparación con los animales Sham correspondientes, una respuesta inflamatoria evidente: *Tnf-α* y *Cxcr1* se elevaron el primer día tras el ApNO hasta los 9 días, momento en el que se aprecian signos de apoptosis (sobrexpresión de *Caspasa-3*) que resulta significativamente mayor en el CSc que en el CSi. A los 30 días del ApNO, persiste la sobrexpresión de *Tnf-α* y *Lcn2*.

La respuesta antiinflamatoria según los genes estudiados es muy escasa, sólo se observa sobrexpresión de *Tgf-β1* en el día 1 y 9 tras el ApNO. La respuesta de la CMI (sobrexpresión de *Iba1*) es evidente desde el día 1 tras el ApNO y se mantiene hasta el día 9, punto en el que se iniciaría la respuesta de la CMa (sobrexpresión de *Gfap* y *Aq4*) y se sobreexpresa *Mhc II*. *Tspo* se sobreexpresa el día 1 y 30 tras el ApNO.

En el **CSi** al ApNO, *Caspasa-3* y *Cxcr1* aumentaron su expresión de forma transitoria el día 1, y ambos se inarregularon a partir del día 30. Este incremento coincidió con un incremento de *Il-4*. El resto de marcadores antiinflamatorios permanecieron sin cambios respecto a sus respectivos Sham. En el CSi no hubo evidencia de gliosis salvo sobrexpresión de *Gfap* a los 3 días tras el ApNO.

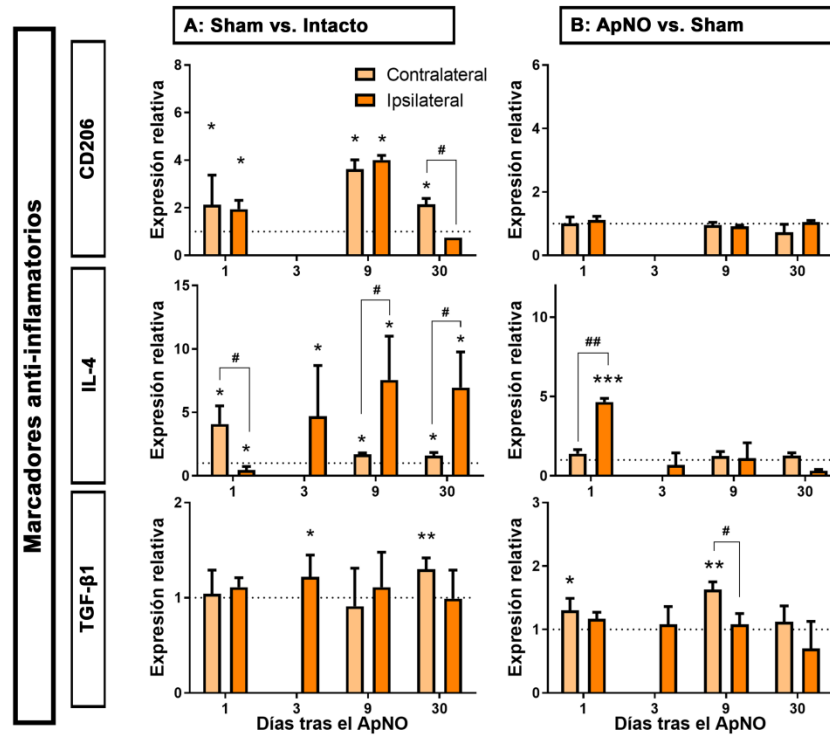
B) COLÍCULO SUPERIOR ApNO vs. Sham		Día 1	Día 3	Día 9	Día 30	
Marcador de apoptosis	<b>Caspasa-3</b>	Ipsilateral	↑	-		↓
		Contralateral		-	↑	
Marcadores pro-inflamatorios	<b>Cxcr1</b>	Ipsilateral	↑	-		↓
		Contralateral	↑	-	↑	
	<b>Il-1β</b>	Ipsilateral				
		Contralateral		-		
	<b>Lcn2</b>	Ipsilateral				
		Contralateral		-		↑
	<b>Tnf-α</b>	Ipsilateral				
		Contralateral	↑	-		↑
	<b>Il-6</b>	Ipsilateral				
		Contralateral		-		
Marcadores antiinflamatorios	<b>Cd206</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
	<b>Il-4</b>	Ipsilateral	↑			
		Contralateral		-		
	<b>Tgf-β1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral	↑	-	↑	
Marcadores de gliosis	<b>Aq4</b>	Ipsilateral				↓
		Contralateral		-	↑	
	<b>Gfap</b>	Ipsilateral		↑		
		Contralateral		-	↑	
	<b>Iba1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral	↑	-	↑	
	<b>Mhc II</b>	Ipsilateral				
		Contralateral		-	↑	
	<b>Tspo</b>	Ipsilateral				
		Contralateral	↑	-		↑

**Tabla 11.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en el CS contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.

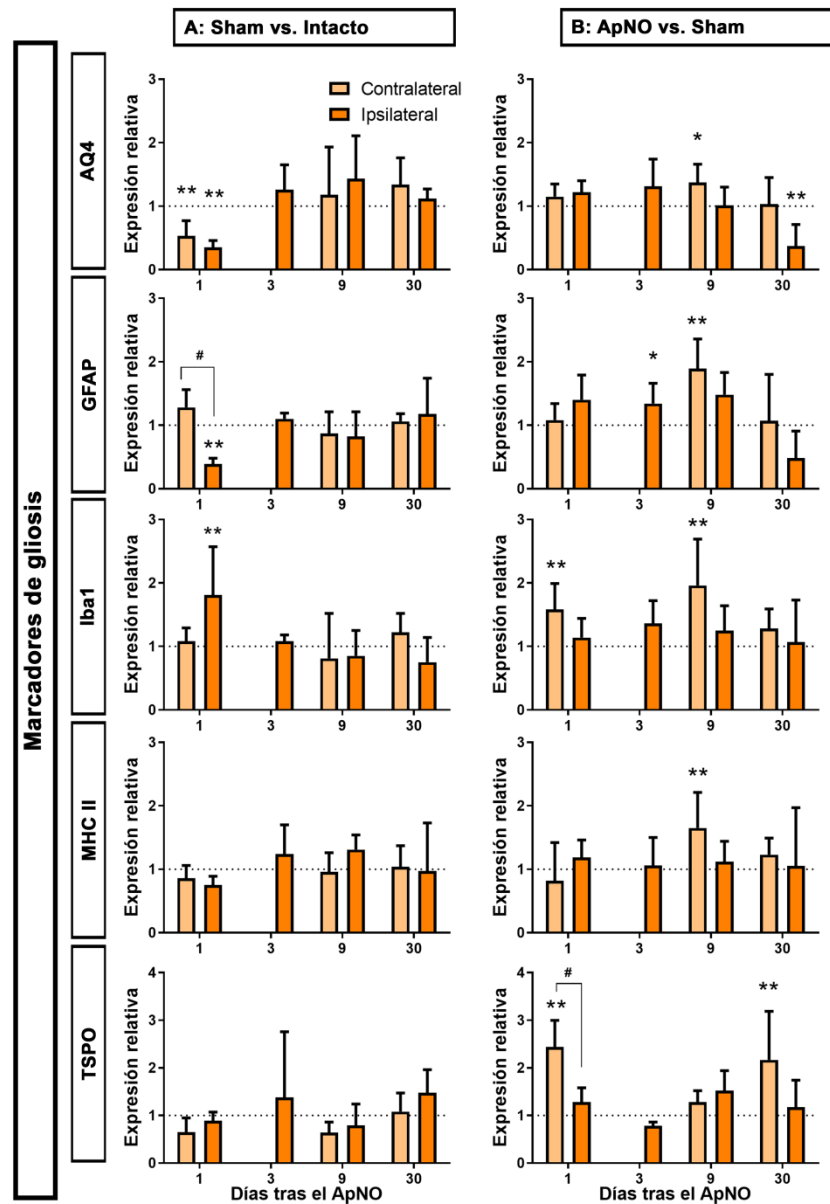


**Figura 50. Expresión de los marcadores pro-inflamatorios y de apoptosis por qPCR en el CS contra- e ipsilateral al ApNO.** Se estudió *Caspasa-3*, *Cxcr1*, *Lcn2*, *Il-1β*, *Tnf-α* e *Il-6* a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión ± DEM de los genes estudiados en el CS contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el CS intacto (1). **B.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión ± DEM de los genes estudiados en el CS contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (1). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).





**Figura 51.** Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en el CS contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió *Cd206*, *Il-4*, *Tgf-β1* a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el CS contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el CS intacto (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el CS contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



**Figura 52.** Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en el CS contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió CMa (*Aq4* y *Gfap*), CMi (*Iba1*) y marcadores de activación glial (*Mhc II* y *Tspo*) a los días 1, 3, 9 ó 30. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el CS contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el CS intacto (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el CS contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).

## 4.1.2.2 Hipocampo

### 4.1.2.2.1 Respuesta inflamatoria y apoptosis en el hipocampo tras la cirugía Sham

Además de en la vía visual (retina y CS), la cirugía Sham también modificó la expresión génica en el H de forma significativa (**Figuras 53-A, 54-A, 55-A; Tabla 12**).

En el **hipocampo contralateral (Hc)**, se observó un incremento de *Caspasa-3* y *Lcn2* junto con una infrarregulación de otros marcadores pro-inflamatorios (*Cxcr1* y *Tnf- $\alpha$* ) y de un incremento de las moléculas antiinflamatorias *Cd206* e *Il-4* el día 1. La reacción glial fue escasa, sólo una sobreexpresión precoz y transitoria de *Aq4*.

En el **hipocampo ipsilateral (Hi)**, además de la sobreexpresión el primer día de *Caspasa-3* y *Lcn2* como en el contralateral, aumentó *Tnf- $\alpha$*  el día 1, *Il-6* e *Il-1 $\beta$*  el día 3 y *Lcn2* a los 9 días. Se produjo también un incremento de la citoquina antiinflamatoria *Il-4* el día 1 y 9. Se observó una sobreexpresión de *Aq4* y *Gfap* en los 3 primeros días tras la lesión, significativamente mayor que en el contralateral.

A) HIPOCAMPO Sham vs. Intacto			Día 1	Día 3	Día 9	Día 30
Marcador de apoptosis	<b>Caspasa-3</b>	Ipsilateral	↑	-		
		Contralateral	↑	-		
Marcadores pro-inflamatorios	<b>Cxcr1</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral	↓	-		
	<b>Il-1<math>\beta</math></b>	Ipsilateral		↑		
		Contralateral				
	<b>Lcn2</b>	Ipsilateral	↑		↑	
		Contralateral	↑			
	<b>Tnf-<math>\alpha</math></b>	Ipsilateral	↑			
		Contralateral		↓		
<b>Il-6</b>	Ipsilateral		↑			
	Contralateral					
Marcadores antiinflamatorios	<b>Cd206</b>	Ipsilateral	-	-		
		Contralateral	↑	-		
	<b>Il-4</b>	Ipsilateral	↑		↑	
		Contralateral	↑		-	
	<b>Tgf-<math>\beta</math>1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
Marcadores de gliosis	<b>Aq4</b>	Ipsilateral		↑		
		Contralateral	↑			
	<b>Gfap</b>	Ipsilateral	↑			
		Contralateral				
	<b>Iba1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Mhc II</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Tspo</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				

**Tabla 12.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en el H contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.

#### 4.1.2.2.2 Respuesta inflamatoria y apoptosis en el hipocampo tras el ApNO

Los resultados se exponen en las Figuras 53-B, 54-B, 55-B y Tabla 13.

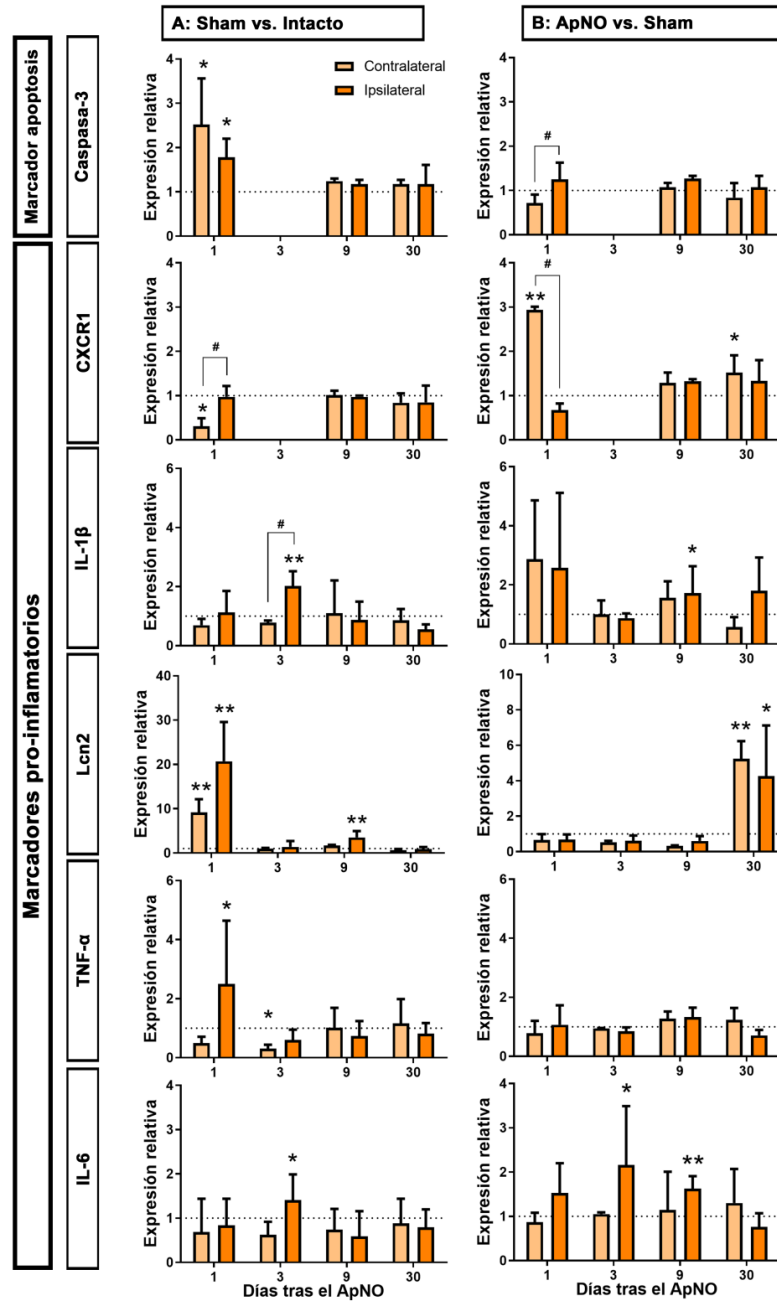
Respecto a los animales Sham, en el **Hc** se observó un incremento de *Cxcr1* significativo en el día 1 y día 30 tras el ApNO, que no se observó en el Hi. Por el contrario, el incremento de *Lcn2* a los 30 días se encontró en ambos lados. *Il-4* es la única citoquina antiinflamatoria que se sobreexpresa en ambos hipocampos. Se observó un incremento de la expresión de *Iba1* a los 3 y 9 días tras el ApNO.

El **Hi** mostró incremento de citoquinas pro-inflamatorias, particularmente *Il-6* a los 3 y 9 días e *Il-1β* a los 9 días, así como *Lcn2* a los 30 días; aunque en ningún caso fue un aumento significativo respecto al contralateral.

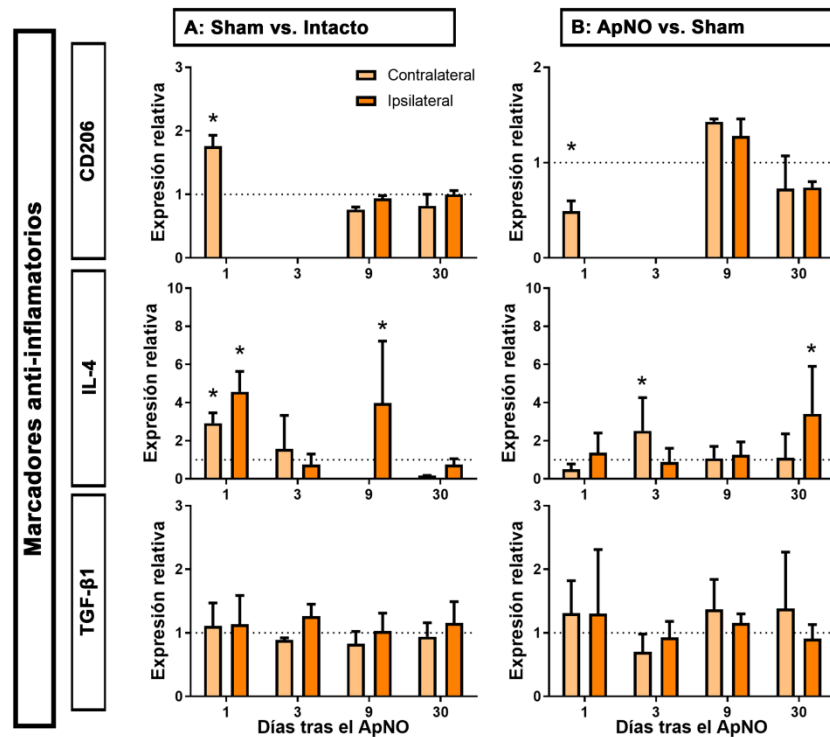
No se encontraron cambios en los marcadores de reactividad glial.

B) HIPOCAMPO ApNO vs. Sham			Día 1	Día 3	Día 9	Día 30
Marcador de apoptosis	<b>Caspasa-3</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
Marcadores pro-inflamatorios	<b>Cxcr1</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral	↑	-		↑
	<b>Il-1β</b>	Ipsilateral			↑	
		Contralateral				
	<b>Lcn2</b>	Ipsilateral				↑
		Contralateral				↑
	<b>Tnf-α</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Il-6</b>	Ipsilateral		↑	↑	
		Contralateral				
Marcadores antiinflamatorios	<b>Cd206</b>	Ipsilateral	-	-		
		Contralateral	↓	-		
	<b>Il-4</b>	Ipsilateral				↑
		Contralateral		↑		
	<b>Tgf-β1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
Marcadores de gliosis	<b>Aq4</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Gfap</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Iba1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral		↑	↑	
	<b>Mhc II</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Tspo</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				

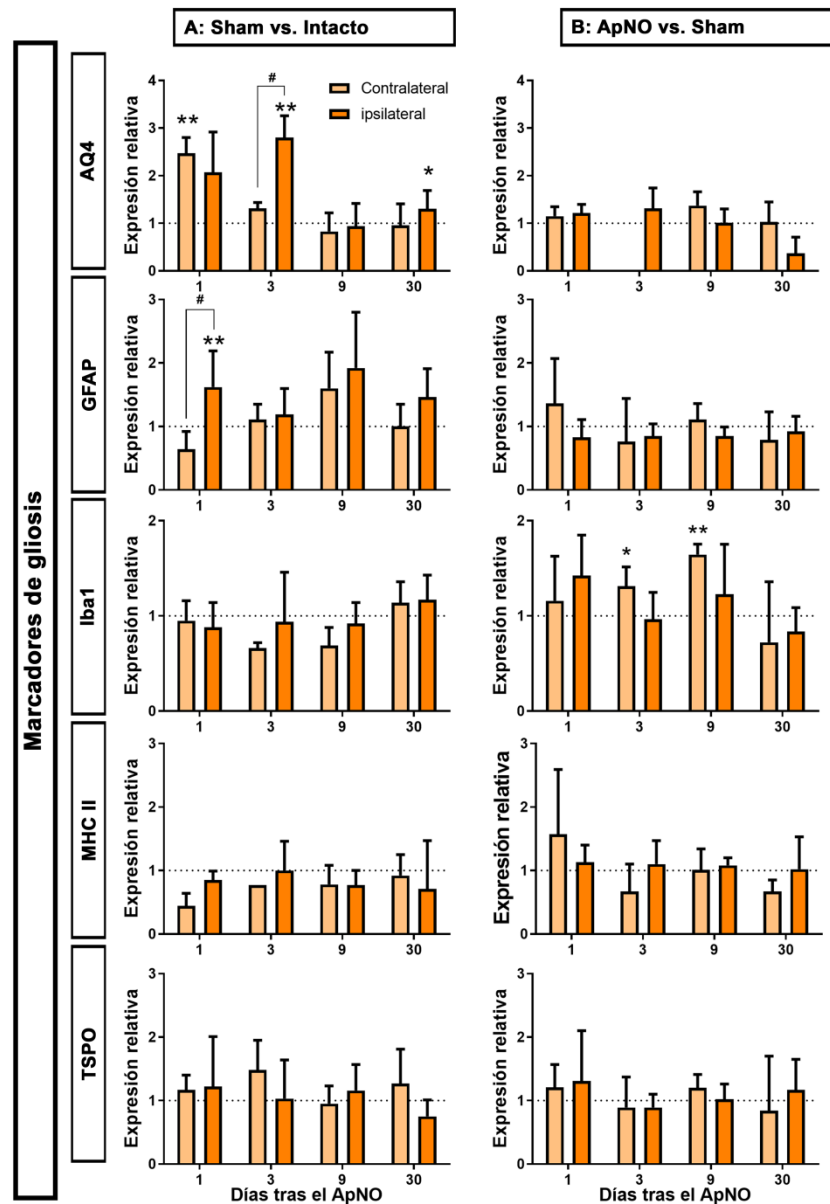
**Tabla 13.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en el H contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.



**Figura 53.** Expresión de los de los marcadores pro-inflamatorios y de apoptosis por qPCR en el hipocampo contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió *Caspasa-3*, *Cxcr1*, *Lcn2*, *Il-1β*, *Tnf-α* e *Il-6* a los 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión  $\pm$  DEM de los genes estudiados en el hipocampo contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el hipocampo intacto (1). **B.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión  $\pm$  DEM de los genes estudiados en el hipocampo contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (1). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



**Figura 54.** Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en el hipocampo contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió *Cd206*, *Il-4*, *Tgf-β1* a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el hipocampo contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el hipocampo intacto (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el hipocampo contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



**Figura 55.** Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en el hipocampo contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió CMa (*Aq4* y *Gfap*), CMi (*Iba1*) y marcadores de activación glial (*Mhc II* y *Tspo*) a los 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el hipocampo contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el hipocampo intacto (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el hipocampo contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



### 4.1.2.3 Bulbo Olfatorio

#### 4.1.2.3.1 Respuesta inflamatoria en el BO tras la cirugía Sham

En el BO, la cirugía Sham modificó la expresión génica (**Figuras 56-A, 57-A, 58-A**), que se resumen en la **Tabla 14**.

El **BO contralateral (BOc)** presentó un aumento de la expresión de *Cxcr1* en el día 1 y *Lcn2* el día 3 pero predominó una infrarregulación de la mayoría de marcadores pro-inflamatorios a partir del día 9 tras la intervención (*Cxcr1*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf- $\alpha$*  e *Il-6*) y antiinflamatorios (*Cd206*). La expresión de *Gfap* fue significativamente mayor que en el BO ipsilateral el día 1 y volvió a valores comparables con el intacto a partir del día 3 en adelante.

En el **BO ipsilateral (BOi)**, se observó un pico de sobreexpresión de *Tnf- $\alpha$*  e *Il-6* el día 3 tras la lesión significativamente mayor que en el BOc. La respuesta antiinflamatoria mediada por la *Il-4* también fue mayor en el BOi y *Tgf- $\beta$ 1* aumentó su expresión a los 3 días. El BOi mostró mayor expresión de moléculas relacionadas con la reactivación glial (*Mhc II* y *Tspo*) que los animales intactos.

A) BULBO OLFATORIO Sham vs. Intacto		Día 1	Día 3	Día 9	Día 30	
Marcadores pro-inflamatorios	<i>Cxcr1</i>	Ipsilateral		-	↓	↓
		Contralateral	↑	-	↓	↓
	<i>Il-1<math>\beta</math></i>	Ipsilateral				
		Contralateral			↓	↓
	<i>Lcn2</i>	Ipsilateral	-			
		Contralateral	-	↑		
	<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	Ipsilateral		↑	↓	
		Contralateral			↓	↓
	<i>Il-6</i>	Ipsilateral		↑		
		Contralateral			↓	
Marcadores antiinflamatorios	<i>Cd206</i>	Ipsilateral	↑	-	↓	↓
		Contralateral		-	↓	↓
	<i>Il-4</i>	Ipsilateral	-		↑	↓
		Contralateral	-			
	<i>Tgf-<math>\beta</math>1</i>	Ipsilateral		↑		
		Contralateral				
Marcadores de gliosis	<i>Aq4</i>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<i>Gfap</i>	Ipsilateral				
		Contralateral	↑			
	<i>Iba1</i>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<i>Mhc II</i>	Ipsilateral		↑		
		Contralateral				
<i>Tspo</i>	Ipsilateral	↑				
	Contralateral					

**Tabla 14.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en el BO contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.

#### 4.1.2.3.2 Respuesta inflamatoria en el BO tras el ApNO

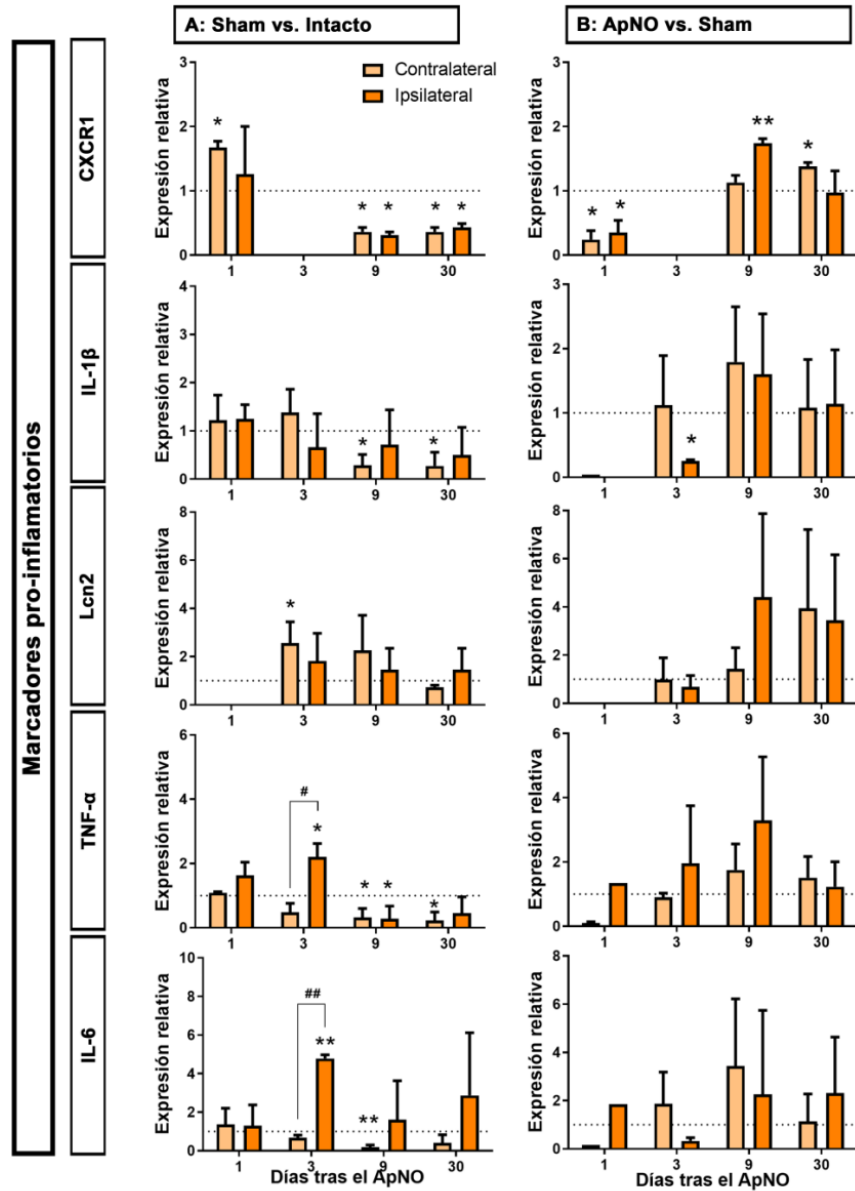
En comparación con los animales Sham, el BOi y BOc se comportan de forma similar (Figuras 56-B, 57-B, 58-B) (Tabla 15).

En el **BOc**, *Cxcr1* se infrarreguló el día 1 tras el ApNO y, posteriormente, se sobreexpresa a los 9 días. La expresión de los marcadores antiinflamatorios es similar entre ambos lados: infrarregulación de *Tgf-β1* el día 1 y sobrerregulación de *Cd206* a partir del día 9.

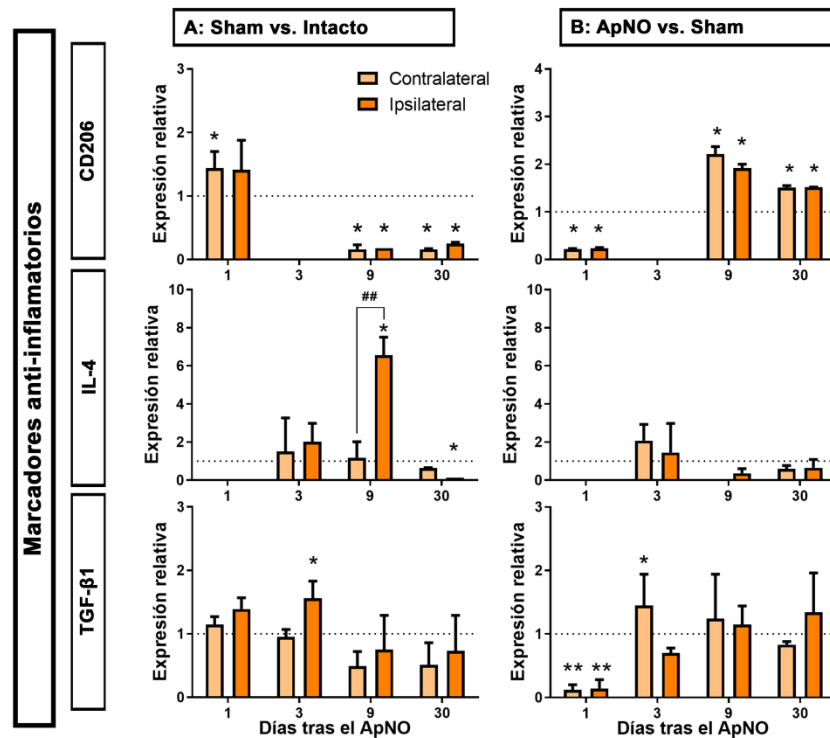
En el **BOi**, *Cxcr1* se infrarreguló el día 1 y, posteriormente, se sobreexpresa a los 30 días. La reactividad glial fue similar en ambos lados: la respuesta de la CMi (infrarregulación de *Iba1*) fue más precoz que la de CMa (sobrerregulación de *Gfap/Aq4*).

B) BULBO OLFATORIO ApNO vs. Sham		Día 1	Día 3	Día 9	Día 30	
Marcadores pro-inflamatorios	<i>Cxcr1</i>	Ipsilateral	↓	-	↑	
		Contralateral	↓	-		↑
	<i>Il-1β</i>	Ipsilateral	-	↓		
		Contralateral				
	<i>Lcn2</i>	Ipsilateral	-			
		Contralateral	-			
	<i>Tnf-α</i>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<i>Il-6</i>	Ipsilateral				
		Contralateral				
Marcadores antiinflamatorios	<i>Cd206</i>	Ipsilateral	↓	-	↑	↑
		Contralateral	↓	-	↑	↑
	<i>Il-4</i>	Ipsilateral	-			
		Contralateral	-	-		
	<i>Tgf-β1</i>	Ipsilateral	↓			
		Contralateral	↓	↑		
Marcadores de gliosis	<i>Aq4</i>	Ipsilateral		↑		
		Contralateral				
	<i>Gfap</i>	Ipsilateral				
		Contralateral		↑		
	<i>Iba1</i>	Ipsilateral	↓			
		Contralateral	↓			
	<i>Mhc II</i>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<i>Tspo</i>	Ipsilateral	-			
		Contralateral	-			

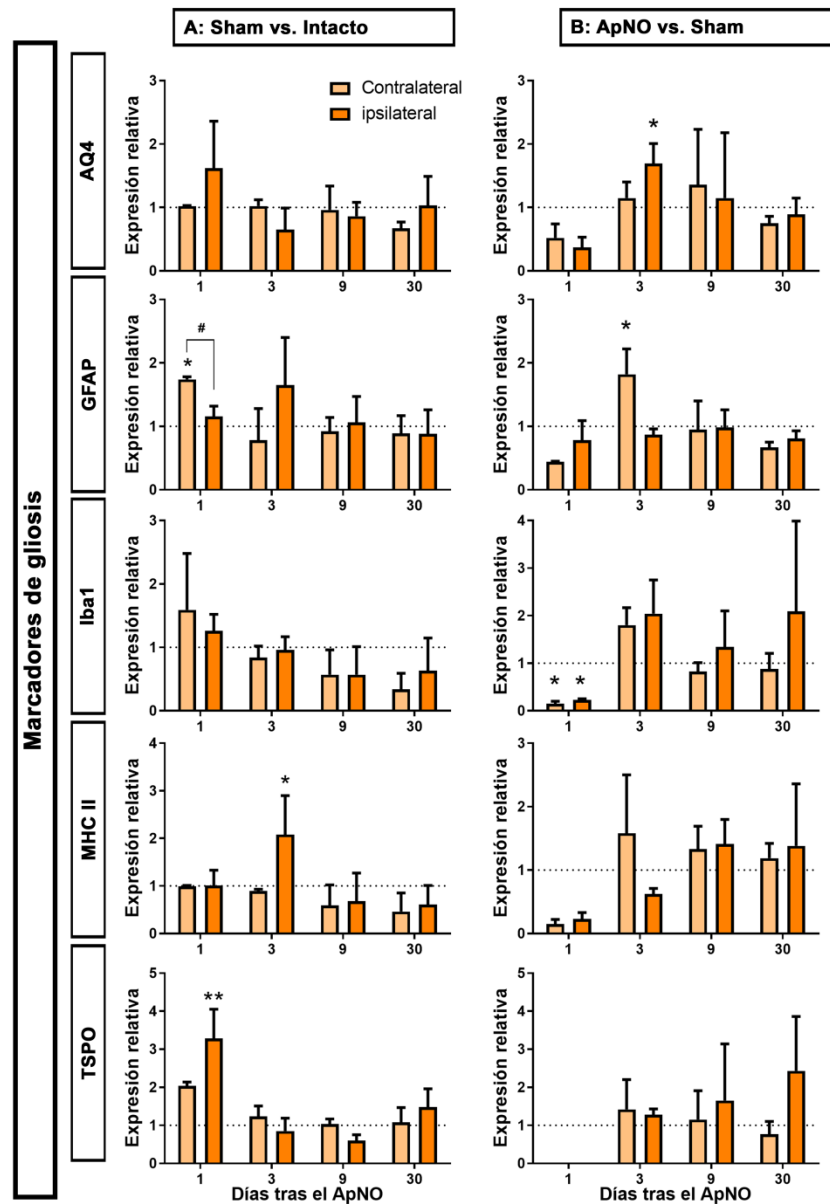
**Tabla 15.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en el BO contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.



**Figura 56. Expresión de los marcadores pro-inflamatorios por qPCR en el BO contra- e ipsilateral al ApNO.** Se estudió *Cxcr1*, *Lcn2*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf- $\alpha$*  e *Il-6* a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión  $\pm$  DEM de los genes estudiados en el BO contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el BO intacto (1). **B.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión  $\pm$  DEM de los genes estudiados en el BO contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (1). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01).



**Figura 57. Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en el BO contra- e ipsilateral al ApNO.** Se estudió *Cd206*, *Il-4*, *Tgf- $\beta$ 1* a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el BO contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el hipocampo intacto (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el BO contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01).



**Figura 58.** Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en el BO contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió CMA (*Aq4* y *Gfap*), CMi (*Iba1*) y marcadores de activación glial (*Mhc II* y *Tspo*) a los días 1, 3, 9 ó 30 tras la lesión. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el BO contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el hipocampo intacto (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el BO contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).

#### 4.1.2.4 Cerebelo

##### 4.1.2.4.1 Respuesta inflamatoria y apoptosis en el cerebelo tras la cirugía Sham

Como en el estudio de los tejidos previos, la cirugía Sham modificó la expresión génica (Figuras 59-A, 60-A, 61-A) que se exponen de forma resumida en la **Tabla 16**.

En el **hemiserebelo contralateral (hCc)** no se detectaron cambios en los marcadores inflamatorios estudiados respecto al animal intacto salvo un aumento de la expresión de *Lcn2* el día 1, que también se observó en el hemiserebelo ipsilateral. En cambio, la CMA presentó variaciones: *Aq4* se sobreexpresó a los 3 días y *Gfap* a los 9 días, presentando, en ambos casos, un incremento significativamente mayor en el hCc.

En el **hemiserebelo ipsilateral (hCi)**, se observó un incremento ligeramente mayor en la expresión de marcadores pro-inflamatorios: el primer día, además de *Lcn2*, *Cxcr1* se sobre-reguló de forma significativa respecto al contralateral, y *Caspasa-3* a los 30 días. La CMI (*Iba1*) se infrarreguló el día 9.

A) CEREBELO Sham vs. Intacto			Día 1	Día 3	Día 9	Día 30
Marcador de apoptosis	<b>Caspasa-3</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
Marcadores pro-inflamatorios	<b>Cxcr1</b>	Ipsilateral	↑	-		
		Contralateral		-		↓
	<b>Il-1β</b>	Ipsilateral				
		Contralateral			↓	
	<b>Lcn2</b>	Ipsilateral	↑			
		Contralateral	↑			
	<b>Tnf-α</b>	Ipsilateral				
		Contralateral			↓	
<b>Il-6</b>	Ipsilateral					
	Contralateral					
Marcadores antiinflamatorios	<b>Cd206</b>	Ipsilateral		-		↑
		Contralateral		-		
	<b>Il-4</b>	Ipsilateral				
		Contralateral			-	
	<b>Tgf-β1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
Marcadores de gliosis	<b>Aq4</b>	Ipsilateral	↓			
		Contralateral		↑		
	<b>Gfap</b>	Ipsilateral	↑			
		Contralateral			↑	
	<b>Iba1</b>	Ipsilateral			↓	
		Contralateral			-	
	<b>Mhc II</b>	Ipsilateral	↑			
		Contralateral		↓		
	<b>Tspo</b>	Ipsilateral			↓	
		Contralateral	↓		↓	

**Tabla 16.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en el hemicerebelo contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.

#### 4.1.2.4.2 Respuesta inflamatoria y apoptosis en el cerebelo tras el ApNO

Para aislar el efecto del ApNO de la cirugía, se realizó la comparación del ApNO con los animales Sham (**Figuras 59-B, 60-B, 61-B**) (**Tabla 17**).

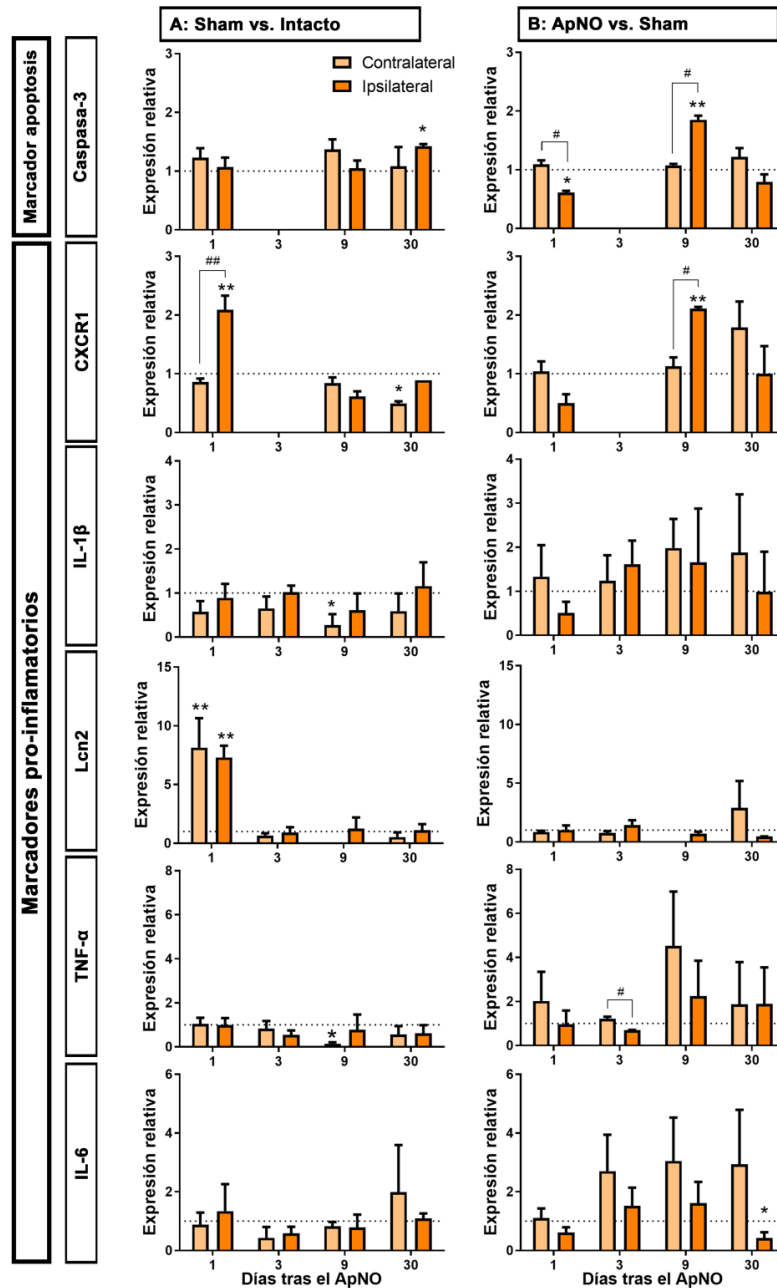
En el **hCc** tras el ApNO, no se modificó la expresión de los marcadores pro-inflamatorios estudiados. Tanto el hCi como el hCc, presentaron sobreexpresión de *Cd206* a los 9 ó 30 días, respectivamente. La glía no presentó cambios respecto al Sham salvo por una infrarregulación a los 9 días de *Tspo*, aunque sin diferencias significativas respecto al hemisferio ipsilateral.

En el **hCi** tras el ApNO, la respuesta pro-inflamatoria también fue escasa pero ligeramente mayor que en el contralateral: *Cxcr1* se sobre-expresó de forma significativa respecto al lado contrario e *Il-6* se infra-reguló a los 30 días. Curiosamente, presentó una infrarregulación inicial de *Caspasa-3* el día 1 pero a los 9 días, se incrementó de forma significativa respecto al hCc. No presentó cambios en la glía salvo una infrarregulación de *Tspo* a los 9 días en el hCc.

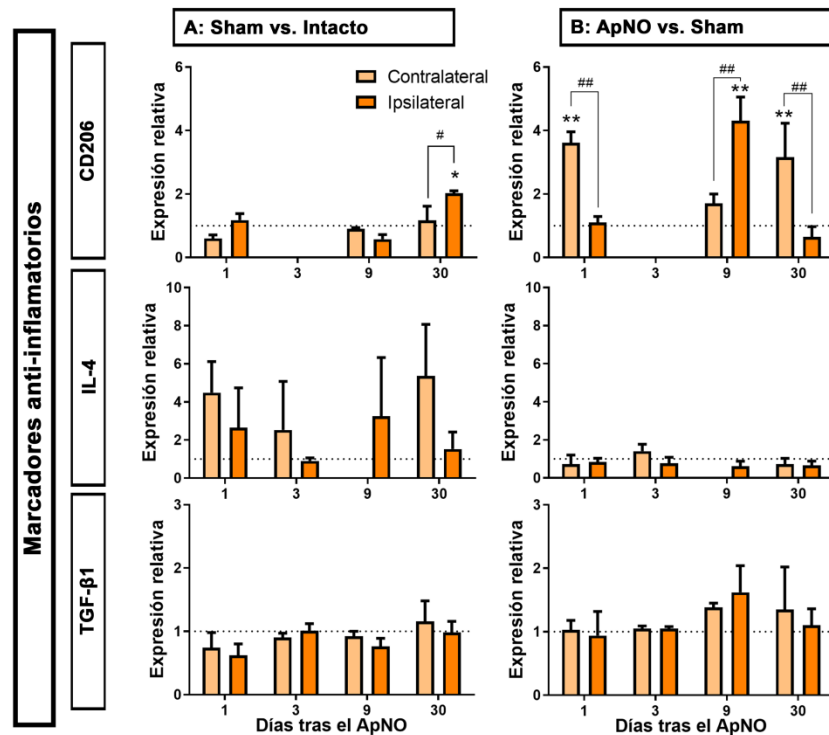
B) CEREBELO ApNO vs. Sham		Día 1	Día 3	Día 9	Día 30	
Marcador de apoptosis	<b>Caspasa-3</b>	Ipsilateral	↓	-	↑	
		Contralateral		-		
Marcadores pro-inflamatorios	<b>Cxcr1</b>	Ipsilateral		-	↑	
		Contralateral		-		
	<b>Il-1β</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Lcn2</b>	Ipsilateral				
		Contralateral			-	
	<b>Tnf-α</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Il-6</b>	Ipsilateral				↓
		Contralateral				
Marcadores antiinflamatorios	<b>Cd206</b>	Ipsilateral		-	↑	
		Contralateral	↑	-		↑
	<b>Il-4</b>	Ipsilateral				
		Contralateral			-	
	<b>Tgf-β1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
Marcadores de gliosis	<b>Aq4</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Gfap</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Iba1</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Mhc II</b>	Ipsilateral				
		Contralateral				
	<b>Tspo</b>	Ipsilateral				
		Contralateral			↓	

Tabla 17. Resumen de la expresión de los genes estudiados en el hemiserebello contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.

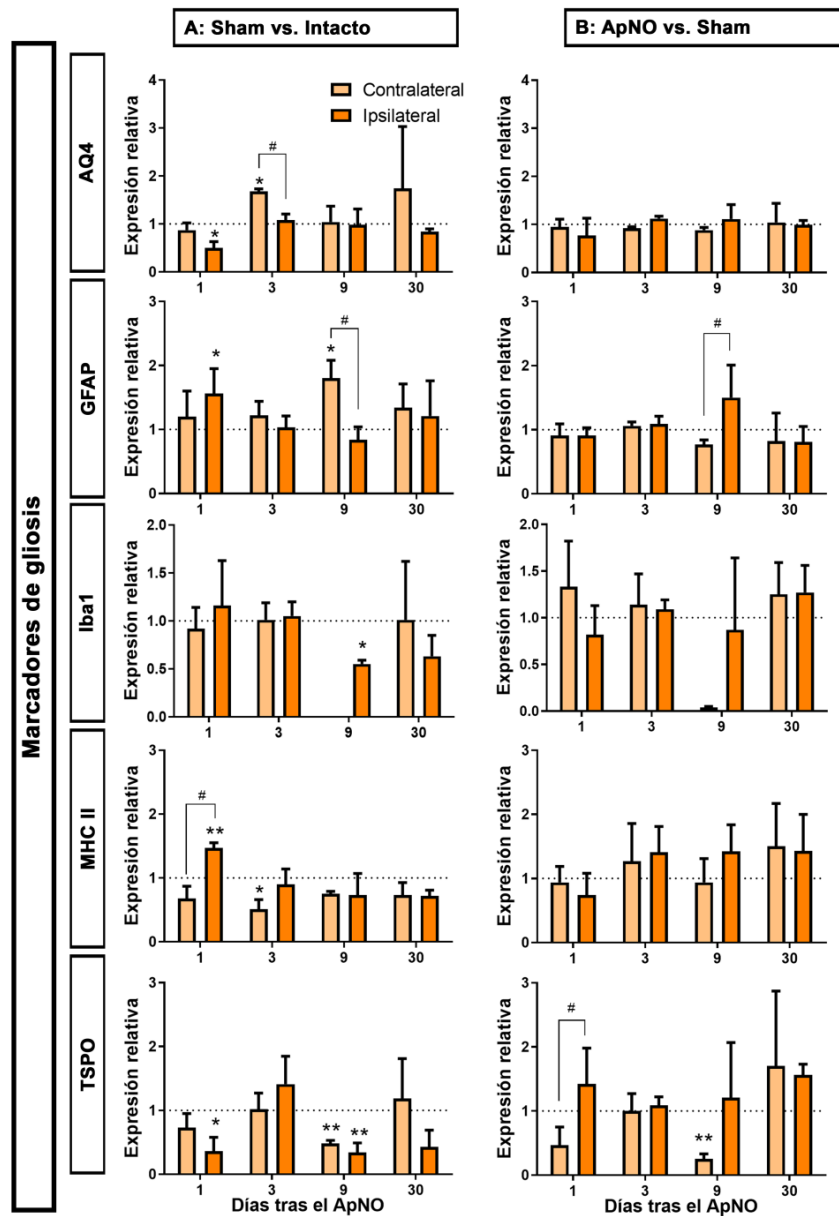




**Figura 59.** Expresión de los marcadores pro-inflamatorios y de apoptosis por qPCR en el hemicerebelo contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió *Caspasa-3*, *Cxcr1*, *Lcn2*, *Il-1β*, *Tnf-α* e *Il-6* a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión ± DEM de los genes estudiados en el hemicerebelo contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el hemicerebelo intacto (1). **B.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión ± DEM de los genes estudiados en el hemicerebelo contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (1). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



**Figura 60.** Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en el hemiserebelo contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió *Cd206*, *Il-4*, *Tgf-β1* a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el hemiserebelo contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el hipocampo intacto (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el hemiserebelo contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



**Figura 61.** Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en el hemiserebelo contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió CMA (*Aq4* y *Gfap*), CMi (*Iba1*) y marcadores de activación glial (*Mhc II* y *Tspo*) a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras el ApNO. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el hemiserebelo contralateral (derecho) o ipsilateral (izquierdo) tras la cirugía Sham comparado con el hipocampo intacto (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en el hemiserebelo contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).

#### 4.1.2.5 Médula espinal

##### 4.1.2.5.1 Respuesta inflamatoria y apoptosis en la médula espinal tras la cirugía Sham

Como en todos los tejidos anteriores, la cirugía Sham modificó la expresión génica (**Figura 62-A, 63-A, 64-A; Tabla18**).

En la **hemimédula contralateral (hMEc)**, los cambios inflamatorios se presentaron a los 30 días: hubo una sobreexpresión de *Il-6* e *Il-1 $\beta$* , en este último caso de forma significativa respecto a la hemimédula ipsilateral y del marcador antiinflamatorio *Cd206*. *Iba1* (CMi) se sobre-expresó a partir de los 9 días. En cambio, el incremento de los marcadores de CMA (*Aq4*, *Gfap*) fue más precoz.

En la **hemimédula ipsilateral (hMEi)**, *Caspasa-3* se sobreexpresó a los 9 días pero sin diferencias significativas respecto al lado contralateral. El resto de marcadores pro-inflamatorios se mantuvieron sin cambios. *Tgf- $\beta$ 1* se incrementó de forma significativa respecto a la hMEc a los 30 días. En este caso, *Iba1* se sobre-expresó de forma más precoz y *Aq4/Gfap* (CMA), de forma más tardía.

A) MÉDULA ESPINAL Sham vs. Intacto		Día 1	Día 3	Día 9	Día 30	
Marcador de apoptosis	<b>Caspasa-3</b>	Ipsilateral		-	↑	
		Contralateral		-		
Marcadores pro-inflamatorios	<b>Cxcr1</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
	<b>Il-1<math>\beta</math></b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-	↑	
	<b>Tnf-<math>\alpha</math></b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
<b>Il-6</b>	Ipsilateral		-			
	Contralateral		-	↑		
Marcadores antiinflamatorios	<b>Cd206</b>	Ipsilateral		-	↑	
		Contralateral		-		↑
	<b>Tgf-<math>\beta</math>1</b>	Ipsilateral	↑	-		↑
		Contralateral	↑	-		
Marcadores de gliosis	<b>Aq4</b>	Ipsilateral	↑	-		↑
		Contralateral	↑	-		↓
	<b>Gfap</b>	Ipsilateral		-		↑
		Contralateral	↑	-	↑	
	<b>Iba1</b>	Ipsilateral	↑	-		↑
		Contralateral		-	↑	↑
	<b>Mhc II</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		↑
	<b>Tspo</b>	Ipsilateral	↑	-		
		Contralateral		-		↑

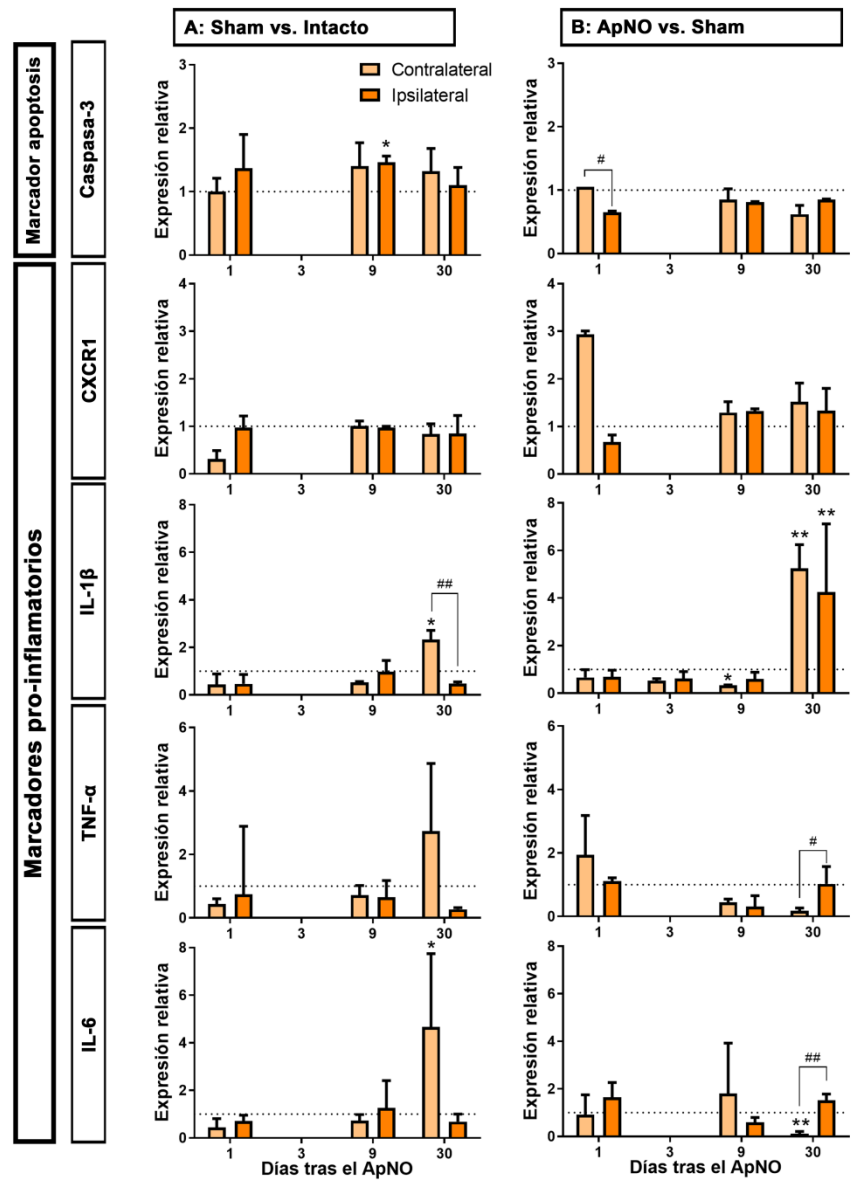
**Tabla 18.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en la hemimédula contra- e ipsilateral a la cirugía Sham respecto al intacto a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.

#### 4.1.2.5.2 Respuesta inflamatoria y apoptosis en la médula espinal tras el ApNO

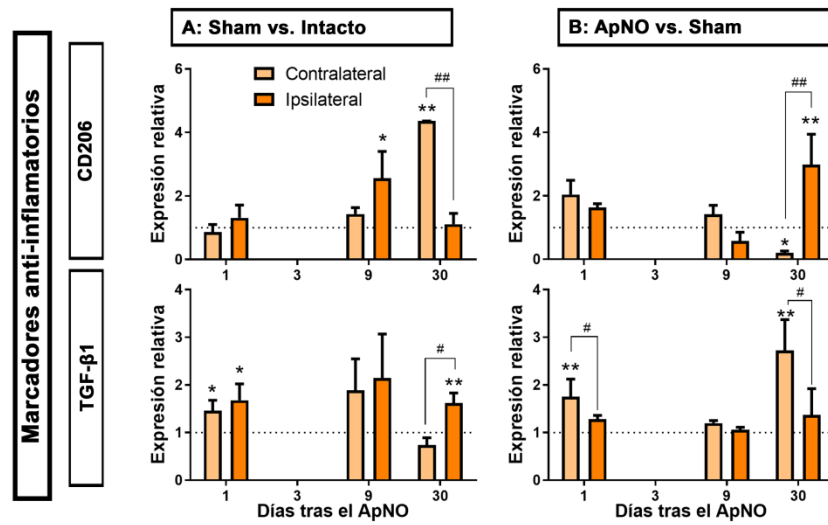
La respuesta en **ambas hemimédulas** es similar (**Figura 62-B, 63-B, 64-B**) (**Tabla 19**). No hubo cambios en la expresión de *Caspasa-3* y ambas presentaron una respuesta escasa y tardía de los marcadores pro-inflamatorios: *Il-1β* a los 30 días. La médula no presentó cambios en la expresión de *Iba1* pero hubo reactividad macroglial: *Aq4* y *Gfap* se sobre-expresaron a partir de los 9 días. *Cd206* se sobre-expresó a los 30 días en hMEi y *Tgf-β1* en hMEc en los días 1 y 30 tras el ApNO.

A) MÉDULA ESPINAL ApNO vs. Intacto		Día 1	Día 3	Día 9	Día 30	
Marcador de apoptosis	<b>Caspasa-3</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
Marcadores pro-inflamatorios	<b>Cxcr1</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
	<b>Il-1β</b>	Ipsilateral		-		↑
		Contralateral		-		↑
	<b>Tnf-α</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
<b>Il-6</b>	Ipsilateral		-			
	Contralateral		-		↓	
Marcadores antiinflamatorios	<b>Cd206</b>	Ipsilateral		-		↑
		Contralateral		-		
	<b>Tgf-β1</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral	↑	-		↑
Marcadores de gliosis	<b>Aq4</b>	Ipsilateral		-	↑	
		Contralateral		-		↑
	<b>Gfap</b>	Ipsilateral		-	↑	
		Contralateral		-		↑
	<b>Iba1</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		↓
	<b>Mhc II</b>	Ipsilateral		-		
		Contralateral		-		
	<b>Tspo</b>	Ipsilateral		-	↑	
		Contralateral		-		

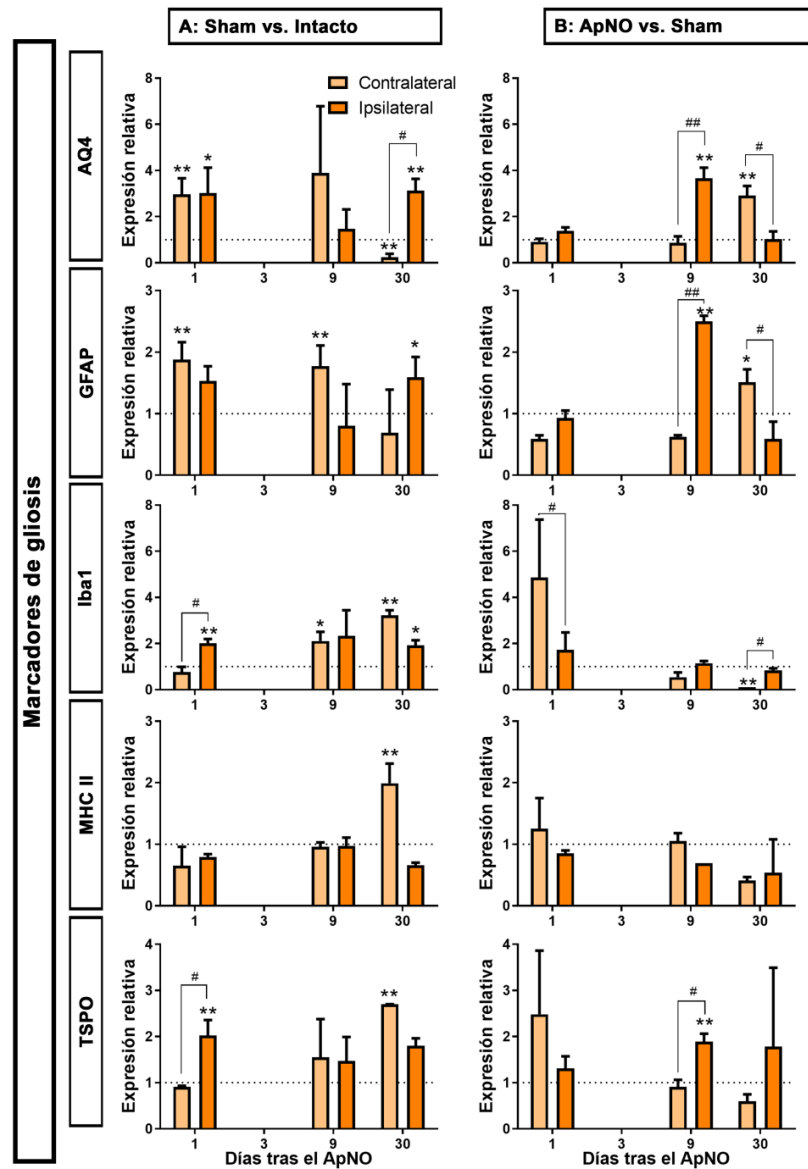
**Tabla 19.** Resumen de la expresión de los genes estudiados en la hemimédula contra- e ipsilateral al ApNO respecto a su Sham a los 1, 3, 9 ó 30 días. Las flechas ↑ en verde indican aumento significativo de expresión y las ↓ en rojo señalan descenso significativo de expresión respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \*p<0.05, \*\*p<0.01). - : muestra no disponible.



**Figura 62.** Expresión de los marcadores pro-inflamatorios y de apoptosis por qPCR en la hemimédula contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió *Caspasa-3*, *Cxcr1*, *Il-1β*, *Tnf-α* e *Il-6* a los días 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión ± DEM de los genes estudiados en la hemimédula contralateral (derecha) o ipsilateral (izquierda) tras la cirugía Sham comparado con la hemimédula intacta (1). **B.** Gráficos de barras que muestran el nivel de expresión ± DEM de los genes estudiados en la hemimédula contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (1). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



**Figura 63.** Expresión de los marcadores antiinflamatorios por qPCR en la hemimédula contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió *Cd206* y *Tgf-β1* a los 1, 3, 9 ó 30 días tras la lesión. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en la hemimédula contralateral (derecha) o ipsilateral (izquierda) tras la cirugía Sham comparado con la médula intacta (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en la hemimédula contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



**Figura 64.** Expresión de los marcadores de gliosis por qPCR en la hemimédula contra- e ipsilateral al ApNO. Se estudió CMA (*Aq4* y *Gfap*), CMi (*Iba1*) y marcadores de activación glial (*Mhc II* y *Tspo*) a los días 1, 3, 9 ó 30 días de la lesión. **A.** Niveles de expresión de los genes estudiados en la hemimédula contralateral (derecha) o ipsilateral (izquierda) tras la cirugía Sham comparado con la hemimédula intacta (considerado como 1, línea de puntos). **B.** Niveles de expresión de los genes estudiados en la hemimédula contra- e ipsilateral respecto a sus respectivos Sham (considerados como 1, línea de puntos). Se examinó si habían diferencias entre los animales Sham respecto a su Intacto o en los ApNO respecto a su Sham (One-way ANOVA Test, significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) y entre ambos hemisferios (One-way ANOVA Test, significación estadística: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).



## 4.2 ESTUDIO ANATOMO-PATOLÓGICO DE LA RESPUESTA GLIAL EN EL CEREBRO TRAS EL APNO

### 4.2.1 ACTIVACIÓN MICROGLIAL

En este apartado, analizaremos la respuesta de las CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS, ya que ésta es la región del cerebro a la que proyectan la mayor parte de los axones de las CGR, y en H y BO, como regiones representativas dentro de las RRSNC, áreas dentro del SNC sin conexión directa con las proyecciones retinianas.

Para ello, inicialmente, se ha estudiado la densidad de las CMi Iba1<sup>+</sup> en cada región en animales intactos, en los grupos Sham y con ApNO. A continuación, se expondrán los resultados de la respuesta en el hemisferio contralateral (derecho) e ipsilateral (izquierdo) en los grupos Sham y ApNO en relación al grupo intacto a los 3, 9 o 30 días tras la cirugía. Posteriormente, compararemos la respuesta en el área contralateral e ipsilateral observada en el grupo ApNO en relación al Sham (considerado entonces como el 100%) con el mismo esquema temporal.

Además, estudiaremos de forma cualitativa la expresión del Cluster of Differentiation 68 (CD68<sup>+</sup>) en las regiones mencionadas y en los distintos tiempos analizados.

Finalmente, analizaremos los cambios en el área celular de las CMi Iba1<sup>+</sup>, considerándolas diferenciadas en dos poblaciones por tamaño (células  $\geq 20 \text{ mm}^2$  o  $< 20 \text{ mm}^2$ ), entre los animales ApNO o Sham y el intacto; así como entre el ApNO y sus respectivos Sham, y entre ambos hemisferios.

#### 4.2.1.1 Colículo superior

##### 4.2.1.1.1 Caracterización de las CMi de colículo superior en animales intactos

La densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS derecho fue de  $350 \pm 22 \text{ cel/mm}^2$  y en el izquierdo de  $363 \pm 25 \text{ cel/mm}^2$ , obteniendo una media entre ambos de  $357 \pm 23 \text{ cel/mm}^2$ ; valor que se consideró como referencia del CS intacto para ambos lados (**Tabla 20**).

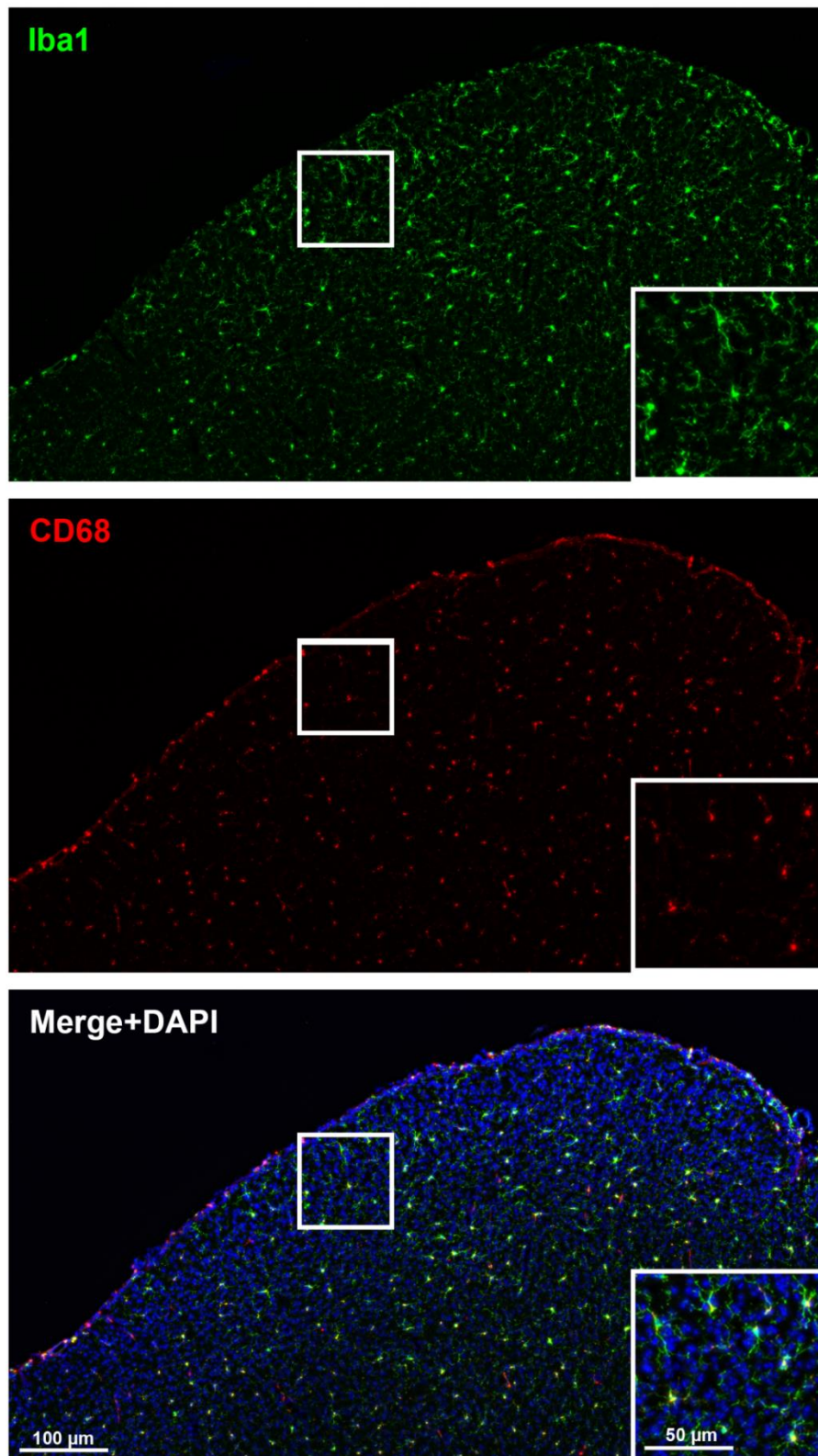
Como se aprecia en la **Figura 65**, las CMi Iba1<sup>+</sup> se disponen con una morfología quiescente: se aprecia un soma pequeño en relación al tamaño total de la célula, del que surgen varios procesos primarios que se ramifican sucesivamente. Las células se encuentran separadas entre sí aunque se pueden intuir el contacto entre ellas a través de sus ramificaciones secundarias y terciarias.

Prácticamente el total de CMi Iba1<sup>+</sup> expresa CD68, adquiriendo un marcaje tenue y puntiforme. La expresión de CD68 se sitúa principalmente en membrana del soma celular y en el inicio de las ramificaciones primarias, aunque también se puede seguir dibujando longitudinalmente los procesos primarios de algunas CMi.

	Colículo Intacto	
	Derecho	Izquierdo
Animal		
1	321	338
2	366	368
3	346	395
4	369	349

<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	350	363
<b>DEM</b>	22	25
<b>Media total (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	<b>357</b>	
<b>DEM</b>	<b>23</b>	

**Tabla 20.** Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>) ± DEM (desviación estándar de la media) de CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS de animales intactos en ambos hemisferios y la media ± DEM entre ambos.



**Figura 65.** Inmunodetección de CMi en una sección sagital de colículo superior de un ratón C57BL/6 intacto. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde), CD68 (rojo) y la superposición de ambas con DAPI (Merge +DAPI).

#### 4.2.1.1.2 Caracterización de la respuesta microglial en el CS contralateral tras ApNO

El análisis de la respuesta microglial en el CSc es el control positivo del modelo experimental, ya que la mayoría de las CGR proyectan sus axones contralateralmente.

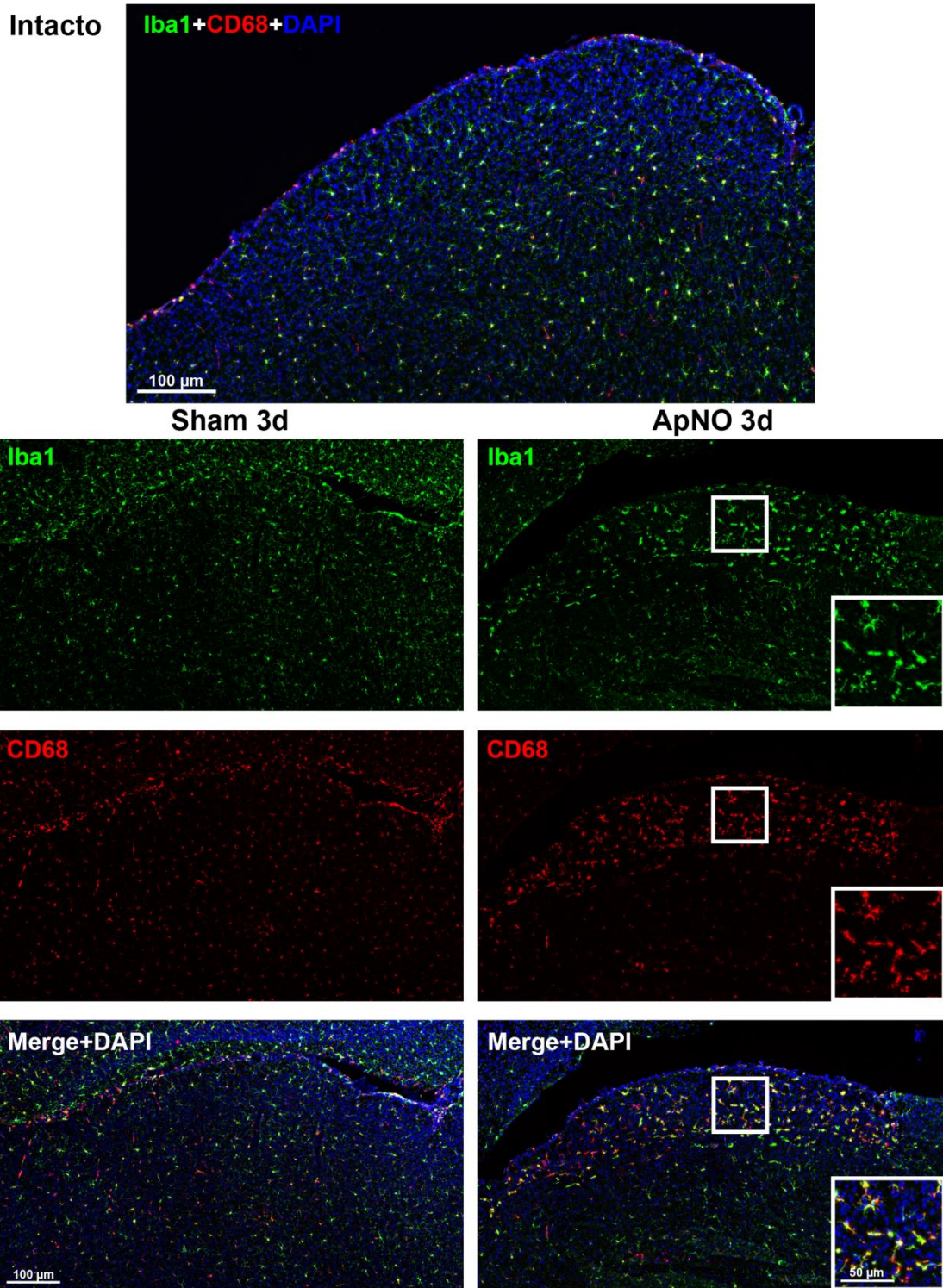
Como se muestra en la **Tabla 21**, en los CS contralaterales de animales Sham la densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> se mantuvo estable respecto al intacto. Asimismo, permanecieron morfológicamente en un estado similar al descrito en los animales intactos.

En cambio, en los CS contralaterales tras el ApNO se observó un aumento de la densidad de CMi mayor de 500 cel/mm<sup>2</sup> en todos los tiempos. Además, las CMi cambiaron su morfología a un estado de activación en el que el soma de la célula adquiere gran tamaño y las ramificaciones se acortan, tomando un aspecto ameboide a 3, 9 o 30 días tras el ApNO (**Figuras 66, 67 y 68, respectivamente**). Prácticamente el total de la superficie celular también se marcó con CD68, siendo más intenso en el soma que en las ramificaciones.

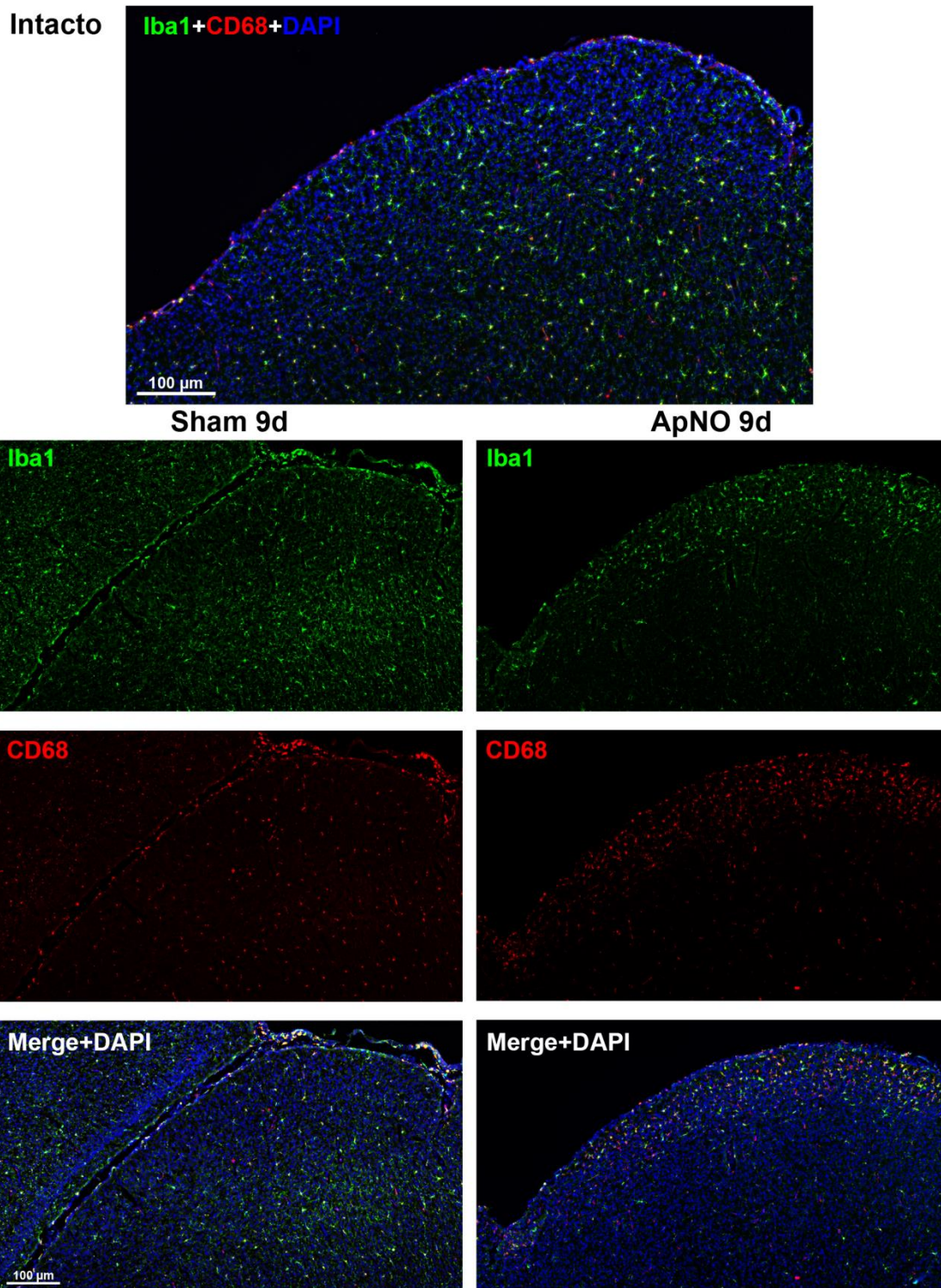
Animal	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
<b>1</b>	371	485	365	606	389	727
<b>2</b>	381	525	249	584	485	642
<b>3</b>	349	548	286	537	378	688
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	367	519	300	576	417	686
<b>DEM</b>	16	32	59	35	59	42

**Tabla 21.** Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>) ± DEM (desviación estándar de la media) de CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS contralateral al ApNO con sus respectivos Sham.



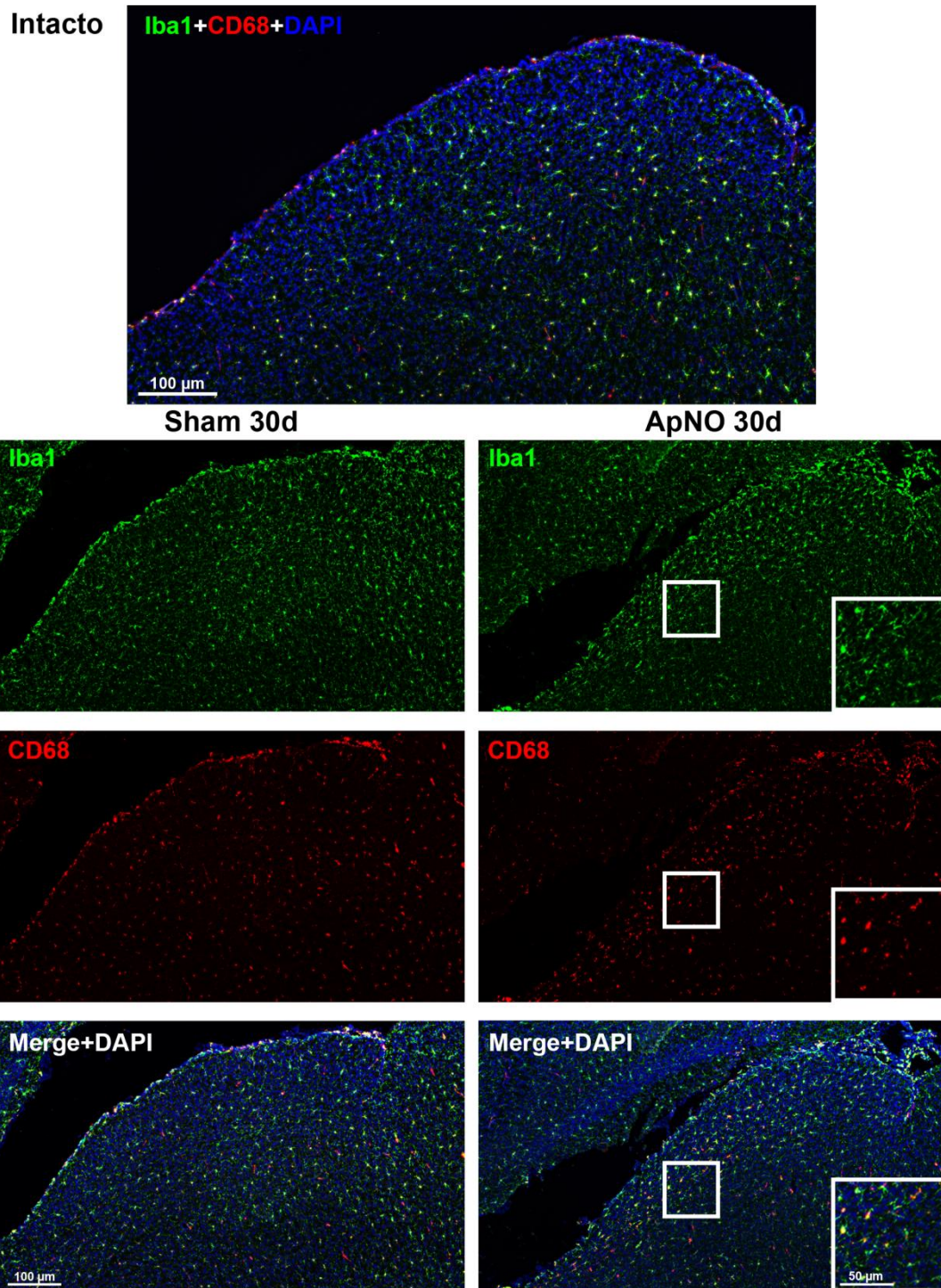


**Figura 66.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y del DAPI superpuestas .



**Figura 67.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.





**Figura 68.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.

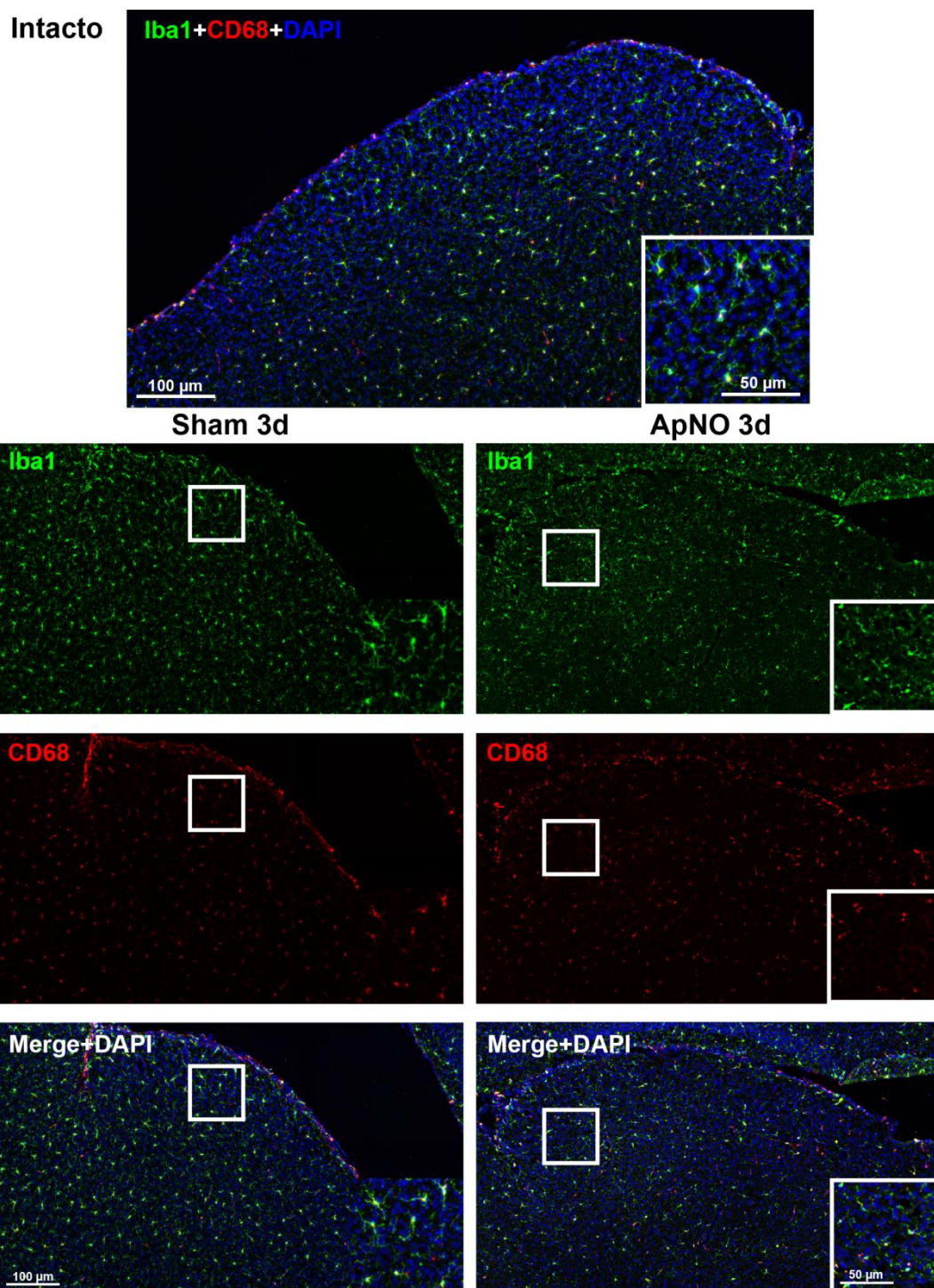
#### 4.2.1.1.3 Caracterización de la respuesta microglial en el CS ipsilateral tras ApNO

En el CSi, la densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> se mantuvo en número similar respecto al intacto, tanto en Sham como en ApNO a los 3 días (**Tabla 22**). A partir de los 9 días, mientras en Sham permaneció estable, se observó un aumento en el grupo del ApNO, con una densidad media de  $410 \pm 20$  cel/mm<sup>2</sup> a los 30 días. En cuanto a la morfología celular, las CMi Iba1<sup>+</sup> presentaron un estado quiescente con una expresión de CD68 similar a la presentada en el animal intacto en los 3 tiempos estudiados (**Figuras 69, 70 y 71**).

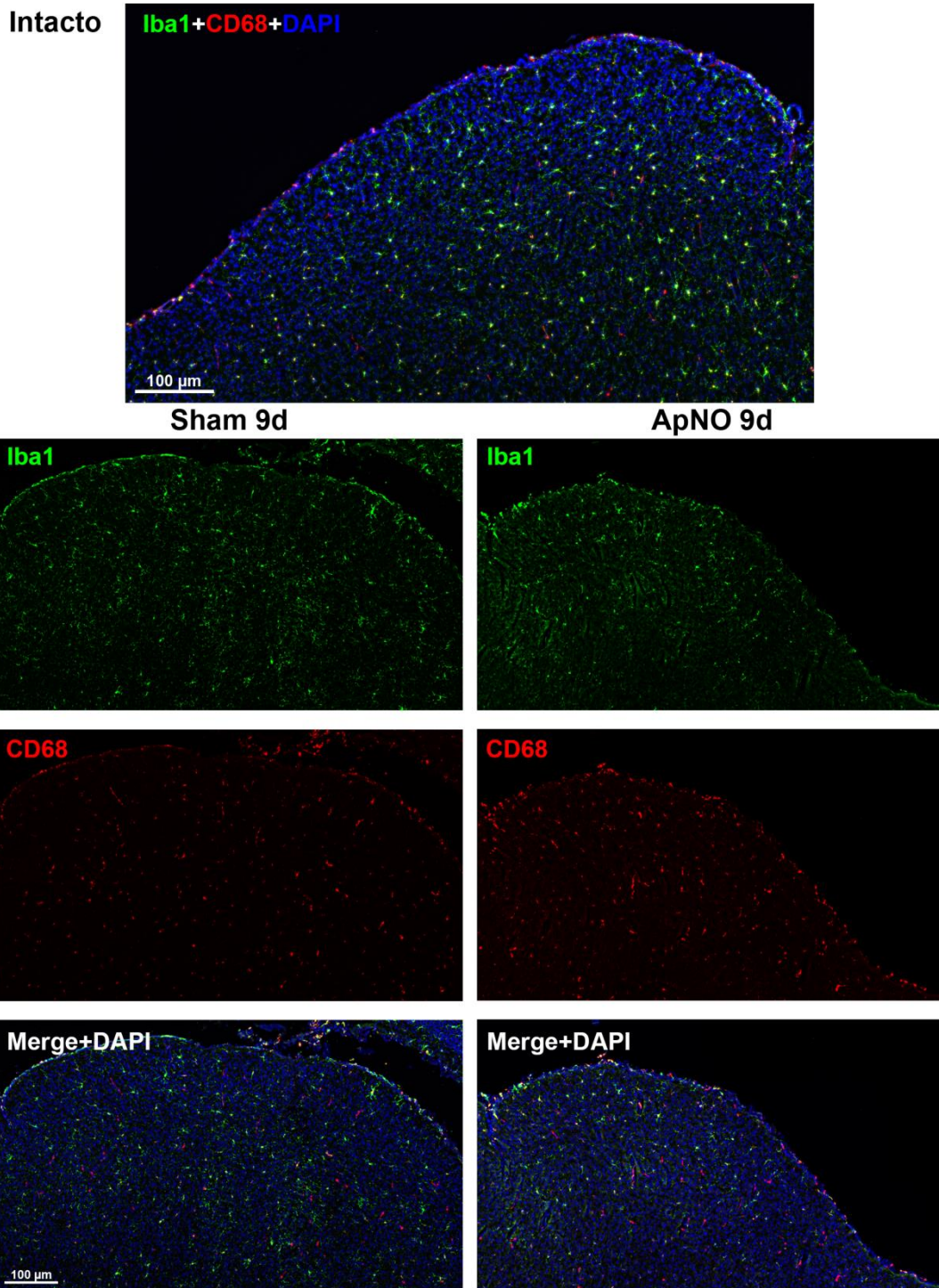
Animal	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	378	419	321	489	288	388
2	411	349	301	372	320	417
3	346	366	307	361	353	425
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	378	378	310	407	320	410
<b>DEM</b>	32	36	10	71	33	20

**Tabla 22.** Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>)  $\pm$  DEM (desviación estándar de la media) de CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS ipsilateral al ApNO con sus respectivos Sham.



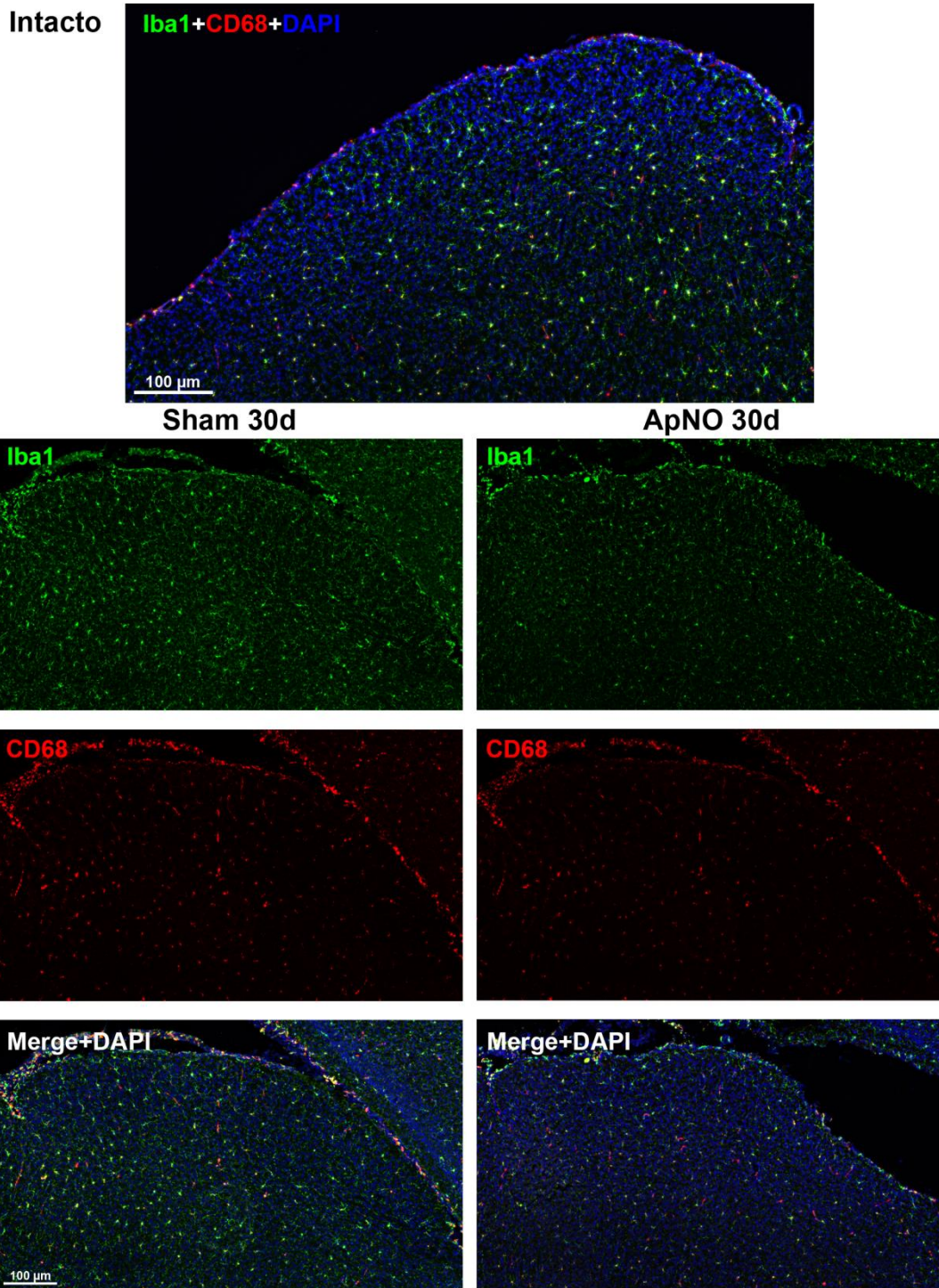


**Figura 69.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.



**Figura 70.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.





**Figura 71.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.

#### 4.2.1.1.4 Respuesta microglial relativa en el CS tras la cirugía Sham o ApNO en comparación con el CS intacto

Como se muestra en la **Figura 72-A**, en el **CSc** tras la cirugía Sham, se observó un aumento significativo a los 30 días. Como se muestra en la **Figura 72-B**, el porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> aumentó progresiva y significativamente en los CS contralaterales tras el ApNO a todos los tiempos analizados. Este aumento es gradual, y alcanza su pico a los 30 días tras la lesión (192% ± 12) (**Tabla 23**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	104	136	102	170	109	204
2	107	147	70	164	136	180
3	98	154	80	151	106	193
<b>Media (%)</b>	103	146*	84	161*	117*	192*
<b>DEM</b>	4,6	9	17	10	17	12

**Tabla 23.** Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS contralateral en relación al CS intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. \* diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney p< 0,05).

La densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> en **CSi** de los animales Sham presentó una disminución significativa del 13% a los 9 días y a los 30, el descenso fue del 10% pero no alcanzó la significación estadística (**Figura 72-A**). Tras el ApNO, el porcentaje de aumento de CMi Iba1<sup>+</sup> sólo alcanzó la significación estadística a los 30 días, con un ligero incremento del 115% ± 5,6 (**Figura 72-B**) (**Tabla 24**).

Ratón	Días tras la sección del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	106	118	90	137	81	109
2	115	98	84	104	90	117
3	97	103	86	101	99	119
<b>Media (%)</b>	106	106	87*	114	90	115*
<b>DEM</b>	9,1	10	2,9	20	9,1	5,6

**Tabla 24.** Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS ipsilateral en relación al CS intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. \* diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

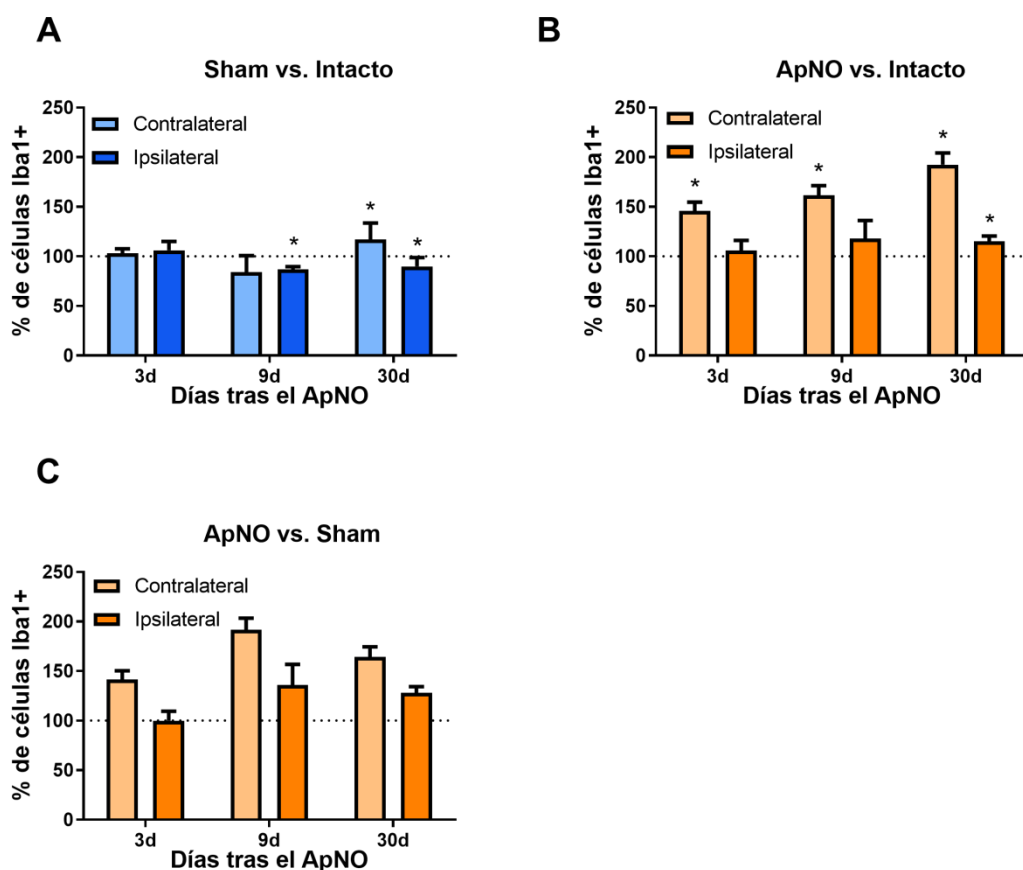
#### 4.2.1.1.5 Respuesta microglial en el CS tras el ApNO relativa al grupo Sham

Con el fin de excluir la respuesta microglial producida por la cirugía en sí, se calculó el porcentaje de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> relativa a sus correspondientes Sham (considerados como el 100%) en ambos hemisferios cerebrales.

Los resultados mostraron una gráfica similar a la comparación previa con los animales intactos (**Figura 72-C**). En ambas localizaciones, se observó la misma tendencia, aunque más pronunciada en el hemisferio contralateral: un aumento del porcentaje de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> relativo al Sham a los 9 días y descenso posterior a los 30 días del ApNO, aunque este aumento no fue significativo. A 3 días, el incremento relativo fue mayor en el hemisferio contralateral que en el ipsilateral. El incremento relativo de densidad de CMi fue mayor en el CSc a la lesión ApNO que en el ipsilateral en todos los tiempos estudiados. Sin embargo, en ningún tiempo se alcanza la significación estadística respecto al Sham, entre los tiempos estudiados ni entre ambos hemisferios (**Tabla 25**).

Ratón	Días tras la sección del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	132	111	202	158	174	121
2	143	92	194	120	154	130
3	149	97	179	117	165	133
<b>Media (%)</b>	142	100	192	132	164	128
<b>DEM</b>	8,7	9,6	12	23	10	6,2

**Tabla 25.** Variación relativa en porcentajes de la densidad de la microglía en el CS en relación al CS Sham ipsilateral o contralateral correspondiente (considerados como el 100 %). No hay diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 72.** Porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> en el colículo superior de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO. Gráficos de barras que muestran el porcentaje ± DEM de CMi Iba1<sup>+</sup> en el grupo Sham (barras azules) y en el grupo ApNO (barras naranjas), con respecto a los ratones intactos (A, B) o Sham (C), considerados como el 100%, a los distintos tiempos de análisis. Las barras en colores claros representan al CS contralateral y las oscuras al ipsilateral. El análisis estadístico ha estudiado las diferencias entre animales Sham o ApNO vs. Intactos y ApNO vs. Sham, así como entre los diferentes tiempos de estudio y entre ambos lados. \*:diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney p< 0,05).

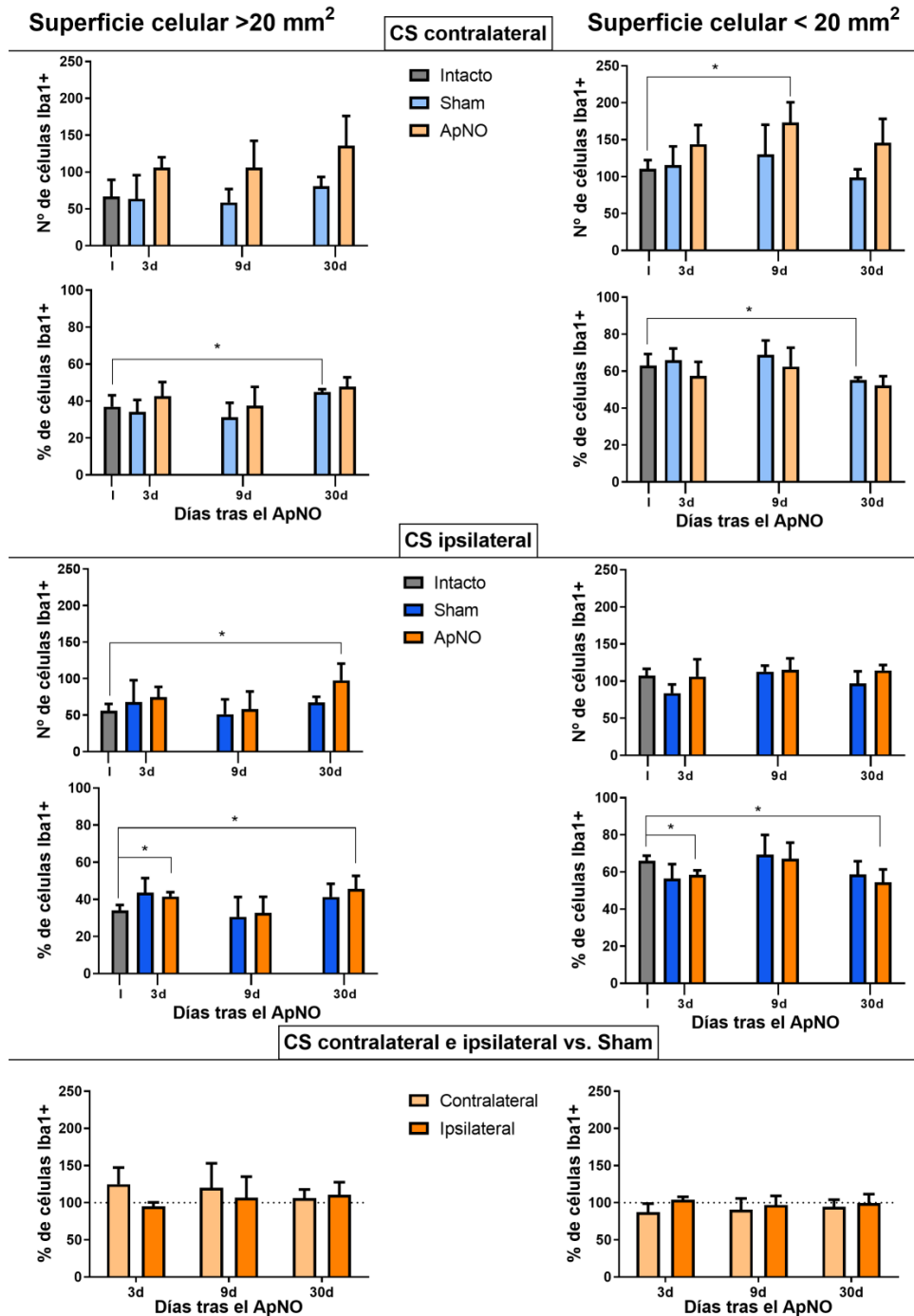
#### 4.2.1.1.6 Estudio del área celular de las células Iba1<sup>+</sup> en el colículo superior contralateral e ipsilateral

Además de calcular la densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup>, se analizó el área celular de las CMi Iba1<sup>+</sup> en los diferentes grupos experimentales mediante el software ImageJ, dividiendo las CMi Iba1<sup>+</sup> en menores y mayores de 20 mm<sup>2</sup> y representando número absoluto y porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> respecto al total en cada grupo (ver Apartado 3.5.7.2. Estudio de la superficie celular de las células de la microglía).

Los resultados se muestran en la **Figura 73**. En el CSc tras el ApNO, hubo un incremento del número de células con tamaño mayor a  $20 \text{ mm}^2$  progresivo en el tiempo que no se observó en sendos grupos Sham, superando en los 3 tiempos estudiados el porcentaje de células  $> 20 \text{ mm}^2$  presentes en el intacto. Aunque también se produjo un aumento gradual del número de células  $< 20 \text{ mm}^2$ , siendo significativamente mayor a 9 días, la variación respecto al Sham fue menor. En los grupos Sham, solo se observó un aumento significativo del porcentaje relativo al intacto en CMi Iba1<sup>+</sup> mayores de  $20 \text{ mm}^2$  a 30 días, que coincide con la disminución del porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> menores de  $20 \text{ mm}^2$ . En el CSi tras el ApNO, el número de CMi Iba1<sup>+</sup>  $> 20 \text{ mm}^2$  aumentó de forma significativa a los 30 días respecto al intacto. Respecto al total de población celular, tanto a los 3 como a los 30 días, el porcentaje de células grandes era mayor que en el intacto. En consecuencia, se apreció un descenso significativo en el porcentaje de células  $< 20 \text{ mm}^2$  respecto al porcentaje del intacto en dichos grupos, aunque el número absoluto permaneció estable.

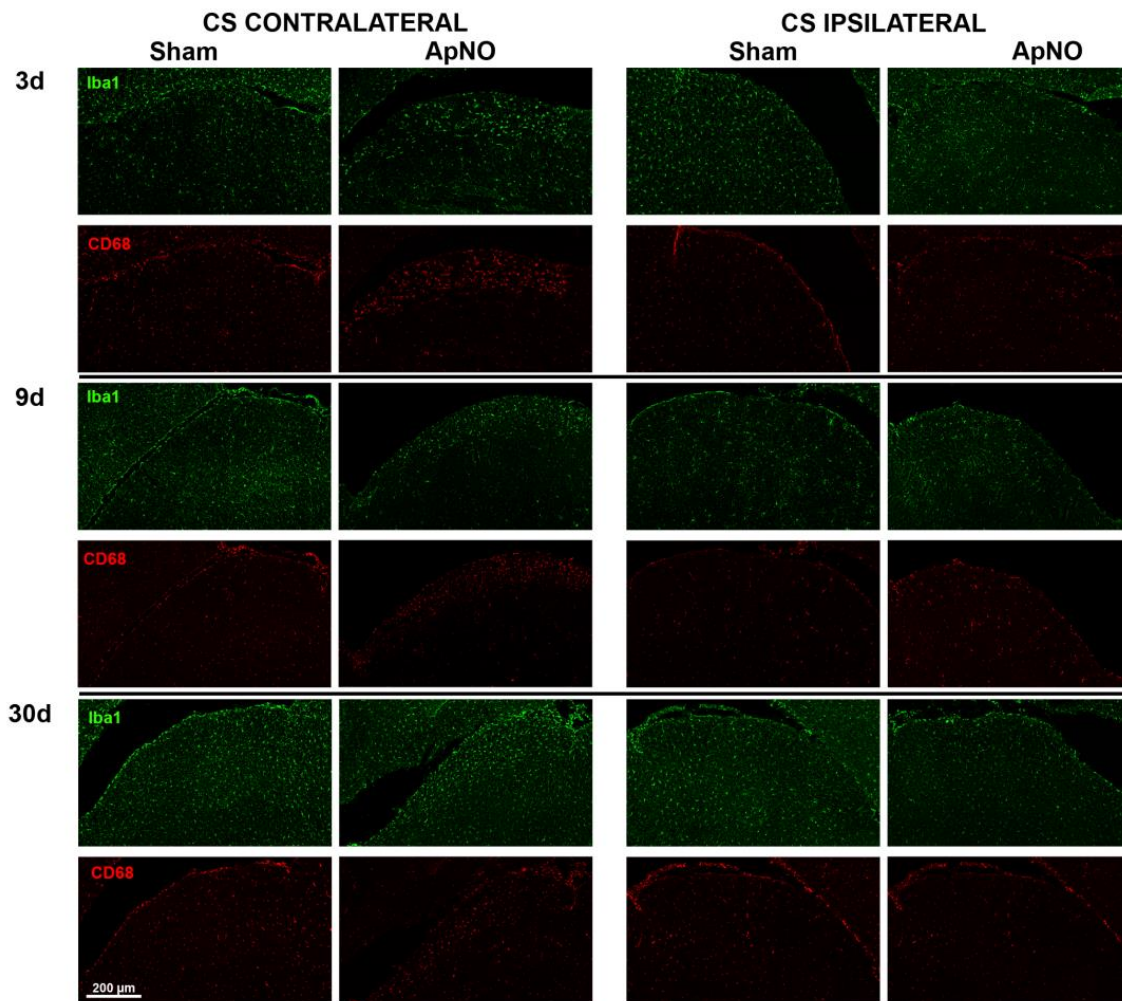
Finalmente, se comparó el área celular de las CMi Iba1<sup>+</sup> en los CS de ambos hemisferios de los animales ApNO respecto los animales Sham. Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas, se aprecia una tendencia a un mayor porcentaje células grandes en el CSc, mientras que el CSi permanece sin cambios relevantes respecto al Sham.

Como se observa en la **Figura 74**, los CS contralaterales de los animales sometidos a ApNO presentaron CMi Iba1<sup>+</sup> reactivas con morfología ameboide y aumento de la expresión de CD68, sobre todo en el día 3 y 9, mientras que en el día 30 impresionan de una tendencia regresiva a su situación basal; en cambio, en los Sham no se observan estos cambios. El CSi de animales ApNO o sus Sham no mostró hallazgos relevantes en la inmunohistofluorescencia.



**Figura 73. Estudio del área de las CMi Iba1<sup>+</sup> en el CS de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO o Sham.** Gráficos de barras que muestran el número o porcentaje  $\pm$  DEM de CMi Iba1<sup>+</sup> con un área mayor o menor 20 mm<sup>2</sup> en el grupo Sham (barras azules), en el grupo ApNO (barras naranjas) y en los ratones intactos (barra gris); en los CS contralateral o ipsilateral. Abajo, comparación del porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> respecto a su Sham correspondiente (considerado como el 100%). Las barras en colores claros representan al CS contralateral y las oscuras al ipsilateral. \*:diferencia estadísticamente significativa entre los grupos señalados (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).





**Figura 74.** Figura resumen de la respuesta de las CMi Iba1<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> en el CS contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.

## 4.2.1.2 Hipocampo

### 4.2.1.2.1 Caracterización de las CMi de hipocampo en animales intactos

Como se observa en la **Tabla 26**, la densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> en el H en el hemisferio derecho fue de  $312 \pm 21$  CMi/mm<sup>2</sup>, y en el hemisferio izquierdo de  $307 \pm 79$  CMi/mm<sup>2</sup>. No se encontraron diferencias significativas, con una densidad media total de  $310 \pm 54$  CMi/mm<sup>2</sup>. Este resultado se utilizó como valor medio normal para comparar con los grupos experimentales.

En la **Figura 75**, se muestra la población de CMi en una sección representativa de un hipocampo de un animal intacto, inmunodetectada con Iba1 y CD68. Las CMi Iba1<sup>+</sup> se distribuyen de una forma uniforme por el asta de Amón y el giro dentado. En cuanto a su

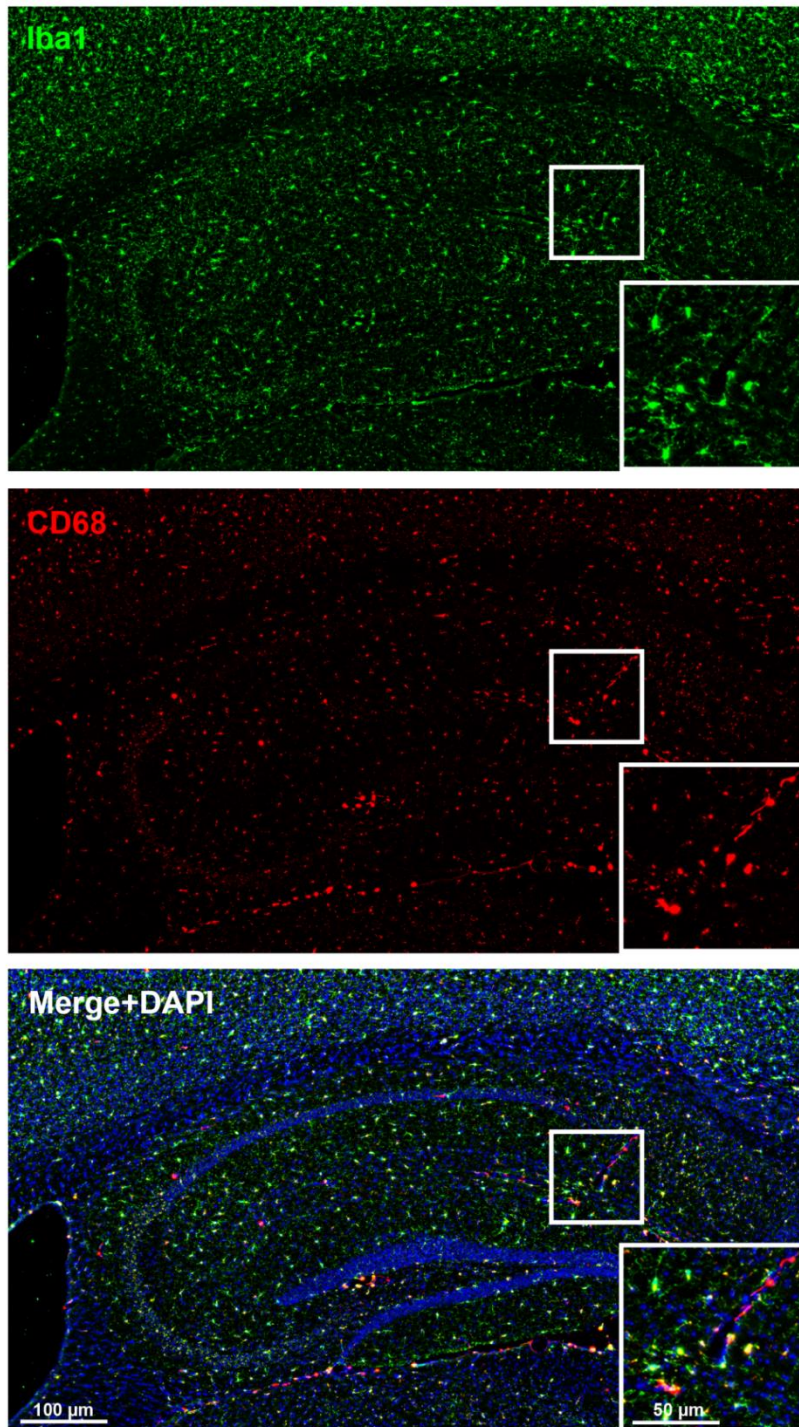
morfología, se trata de células de soma pequeño del que parten 2-3 ramificaciones principales que se arborizan, entrando en contacto unas con otras a través de sus terminaciones distales. Prácticamente la totalidad de las CMi Iba1<sup>+</sup> expresa ligeramente CD68, principalmente en el cuerpo celular de la misma, aunque también hay marcaje en las ramificaciones, que dan lugar a un piqueteado que se hace muy evidente en CA3.

Las CMi Iba1<sup>+</sup> con morfología ameboide e intenso marcaje Cd68<sup>+</sup>, es decir, activadas, se encuentran en la zona del plexo coroideo, en la piamadre o en zonas que parecen corresponder a vasos sanguíneos (**Figura 75-Magnificación**).

	Hipocampo Intacto	
	Derecho	Izquierdo
Ratón		
1	310	389
2	290	294
3	309	203
4	341	341

Media (cel/mm <sup>2</sup> )	312	307
DEM	21	79
Media total (cel/mm <sup>2</sup> )	<b>310</b>	
DEM	<b>54</b>	

**Tabla 26.** Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>) ± DEM (desviación estándar de la media) de células de microglía Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo de animales intactos en ambos hemisferios y la media ± DEM entre ambos.



**Figura 75.** Inmunodetección de CMi en una sección sagital de hipocampo de un ratón **C57BL/6** intacto. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde), CD68 (rojo) y la superposición de ambas con DAPI (Merge+DAPI). **Magnificación:** arriba de la imagen, CMi Iba1<sup>+</sup> con expresión puntiforme de CD68 correspondientes con CMi del hipocampo; abajo, células con morfología ameboide Iba1<sup>+</sup> con expresión en toda su superficie de CD68 en probable relación con un vaso sanguíneo.

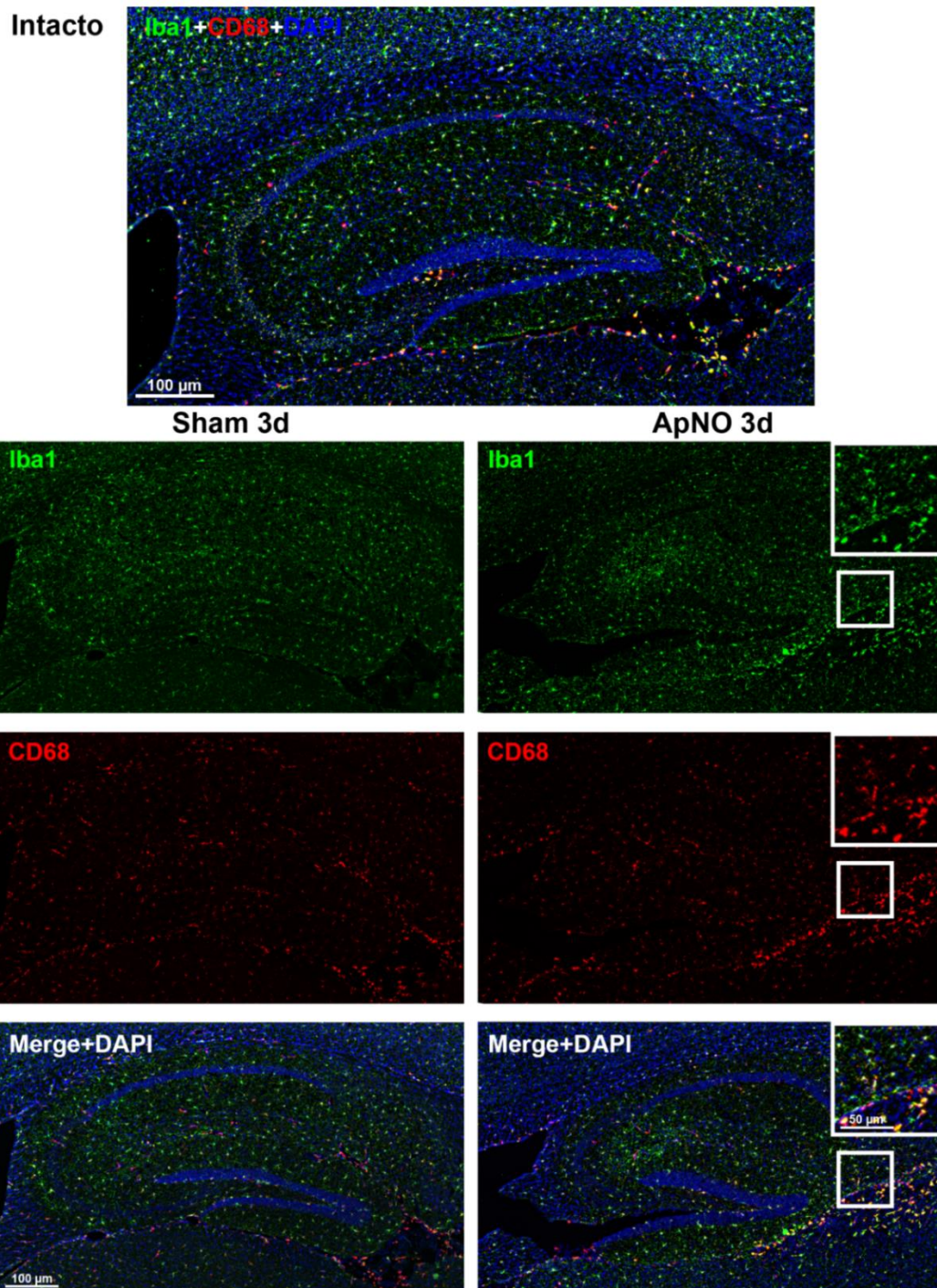
#### 4.2.1.2.2 Caracterización de la respuesta microglial en el hipocampo contralateral tras ApNO

Los resultados muestran que la densidad media de CMi en el hipocampo contralateral (Hc) de animales Sham o tras el ApNO, fue similar a la densidad media de los animales intactos a 3 y 9 días, y no hubo diferencia entre Sham y ApNO. A 30 días tras el ApNO, se observó un cierto incremento (**Tabla 27**). El aspecto de las CMi Iba1<sup>+</sup> persiste con una morfología similar, con un soma pequeño que expresa Iba1 y ligeramente CD68 del que parten varias proyecciones primarias en todos los tiempos estudiados tras la lesión (**Figuras 76, 77 y 78**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	261	329	355	320	443	366
2	329	303	206	216	425	319
3	322	329	226	285	443	437
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	355	320	262	274	437	374
<b>DEM</b>	37	15	81	53	10	60

**Tabla 27.** Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>) ± DEM (desviación estándar de la media) de CMi Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo contralateral al ApNO con sus respectivos Sham.

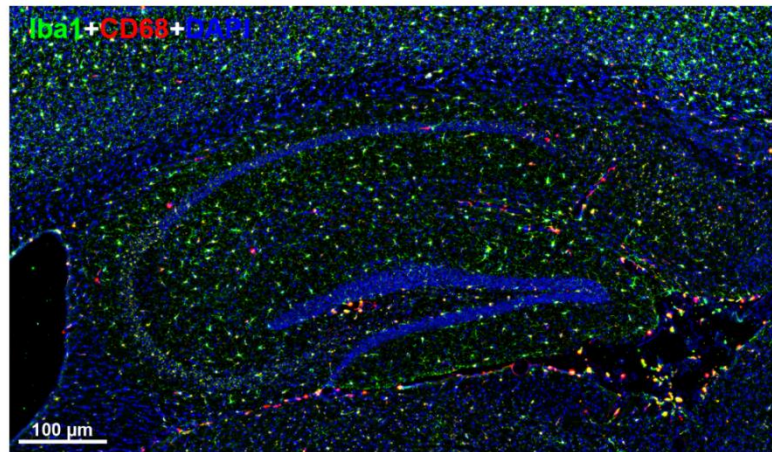




**Figura 76.** Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas. **Magnificación:** Se observa la CMi de H, en la parte superior del cuadrante, con morfología ramificada, mientras que la CMi de CS presenta aspecto amebode con intenso marcaje CD68<sup>+</sup>.

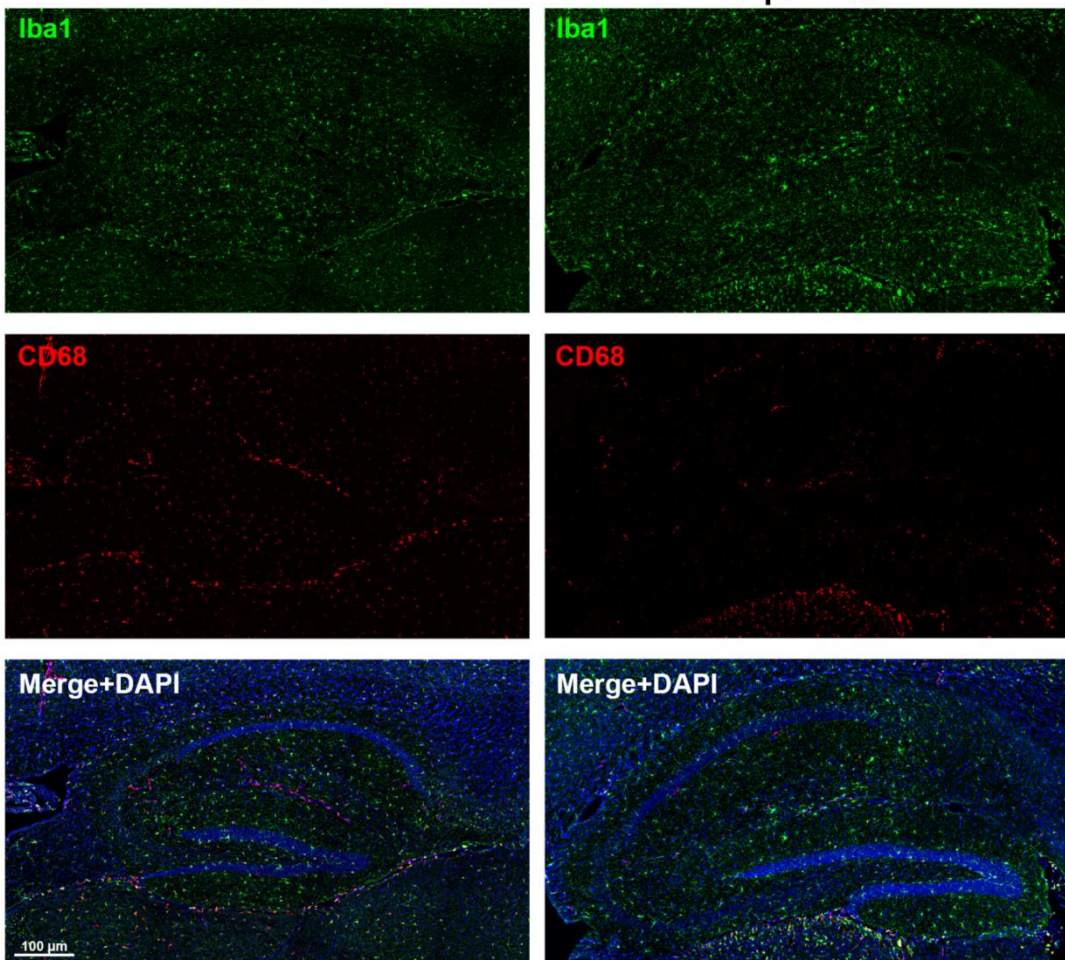


Intacto



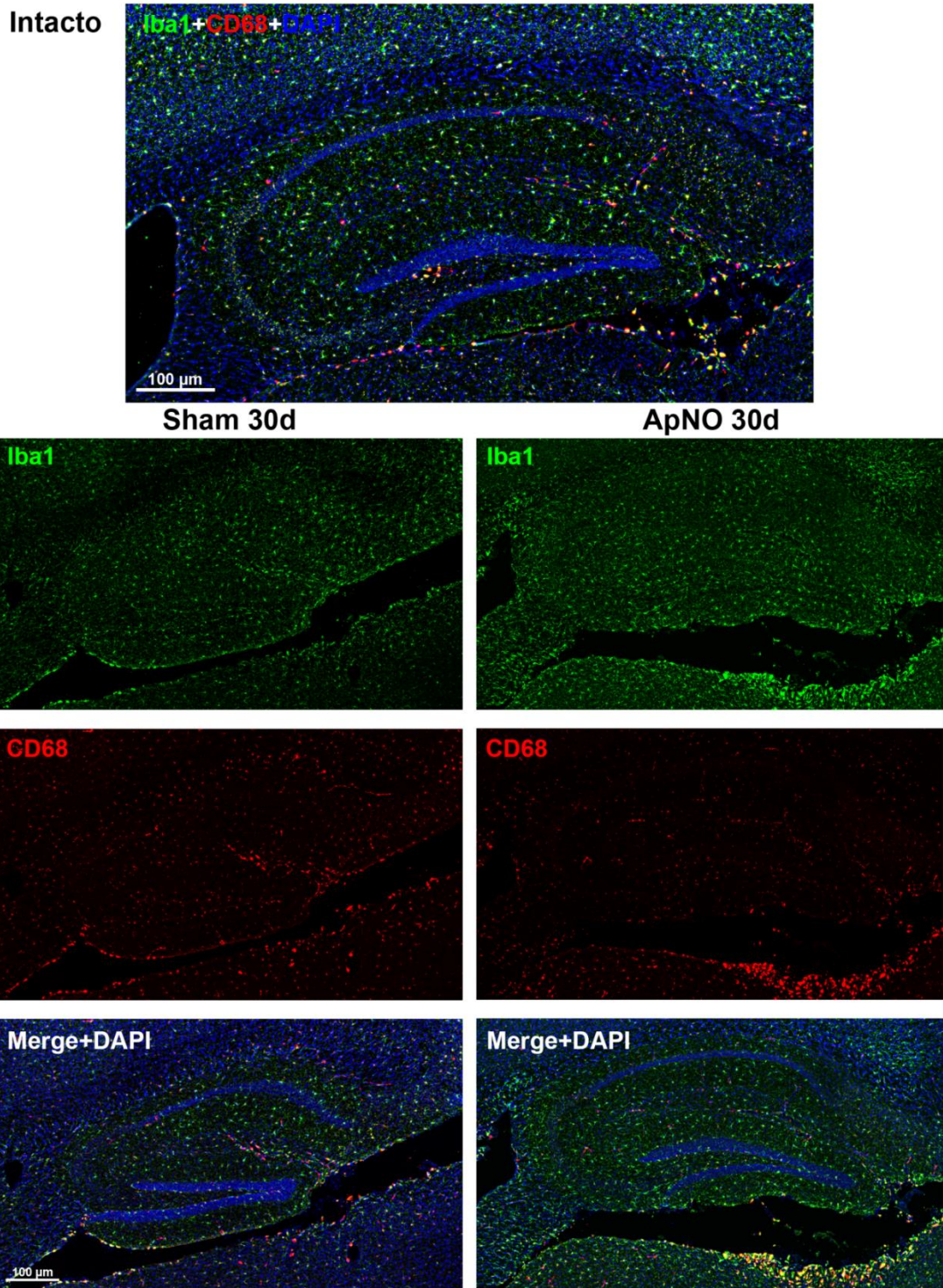
Sham 9d

ApNO 9d



**Figura 77.** Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.





**Figura 78.** Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas. En las imágenes del ApNO 30 días, se observan las CMi Iba1<sup>+</sup> con intenso marcaje CD68<sup>+</sup> en el tracto óptico, mientras que las CMi de H permanecen en su estado basal.

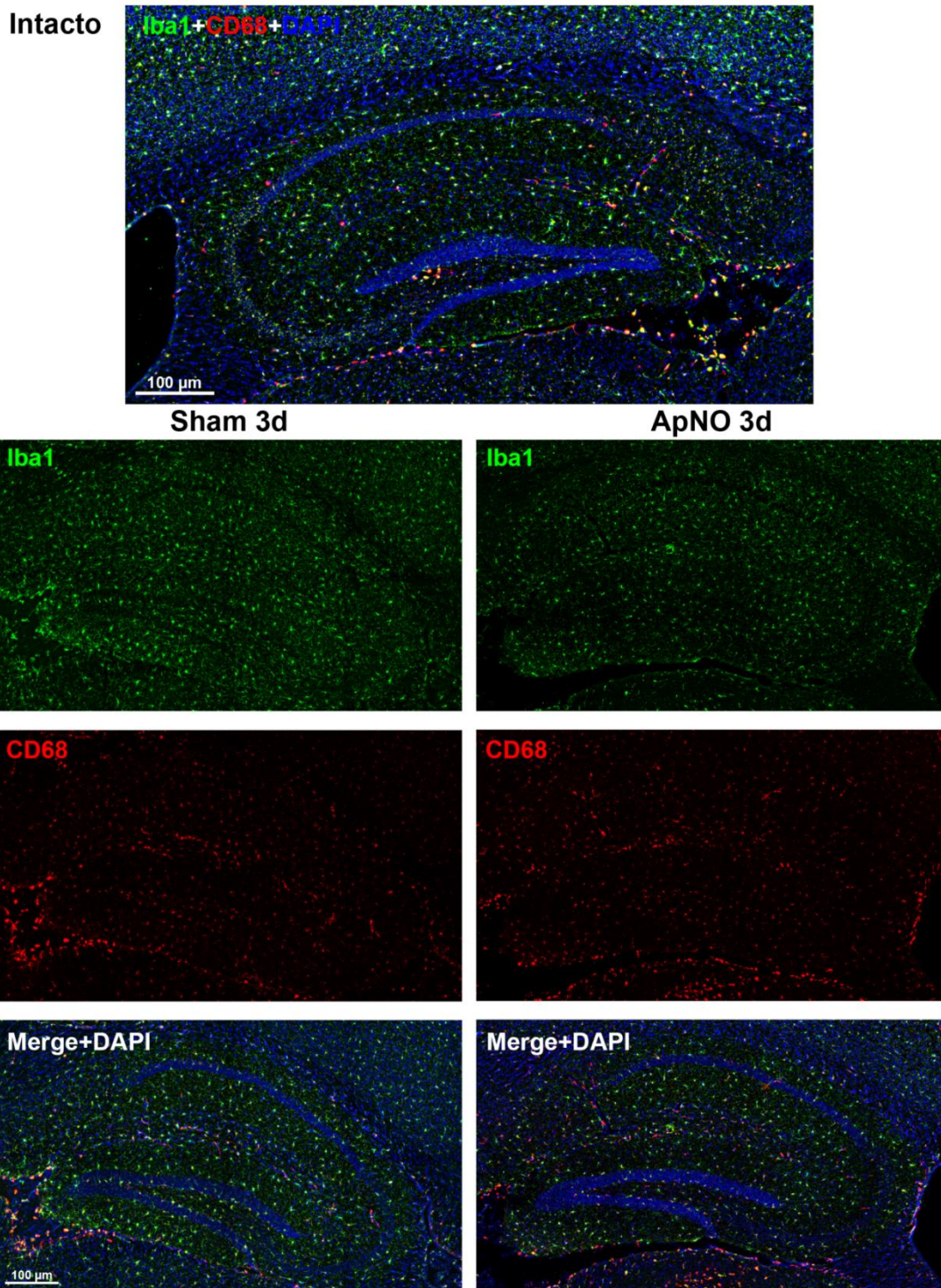


#### 4.2.1.2.3 Caracterización de la respuesta microglial en el hipocampo ipsilateral tras ApNO

En el hipocampo ipsilateral (Hi) tras la lesión, la densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> permanece en cifras similares a las del animal intacto salvo en el ApNO a los 30 días, donde se aprecia un incremento mayor (**Tabla 28**). No se observaron cambios relevantes en las imágenes de inmunohistofluorescencia (**Figuras 79, 80 y 81**).

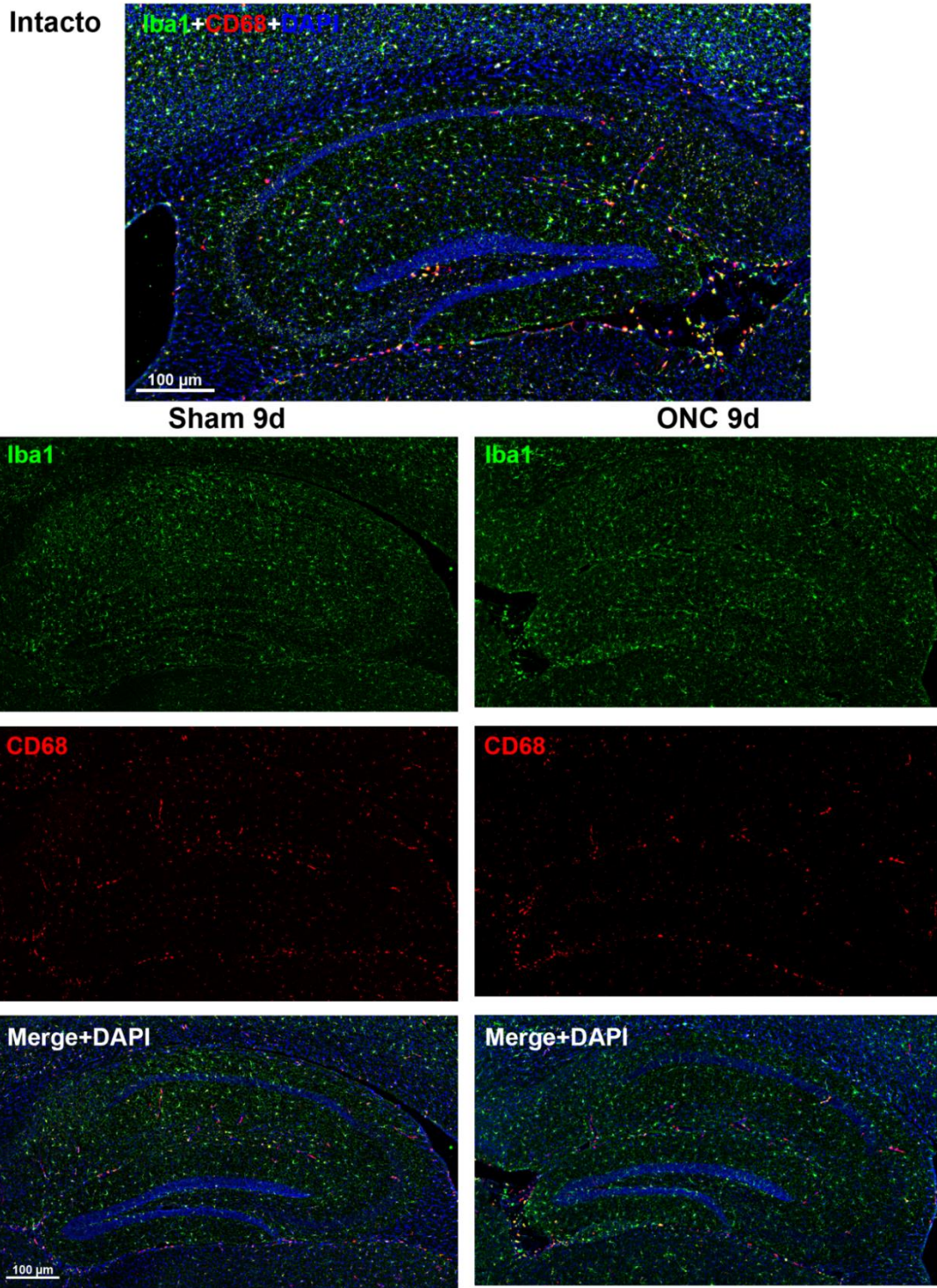
Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
<b>1</b>	271	349	269	297	331	411
<b>2</b>	260	331	233	239	306	464
<b>3</b>	340	282	161	285	357	461
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	290	321	221	274	331	446
<b>DEM</b>	44	35	55	31	26	30

**Tabla 28.** Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>) ± DEM (desviación estándar de la media) de CMi Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo ipsilateral al ApNO con sus respectivos Sham.



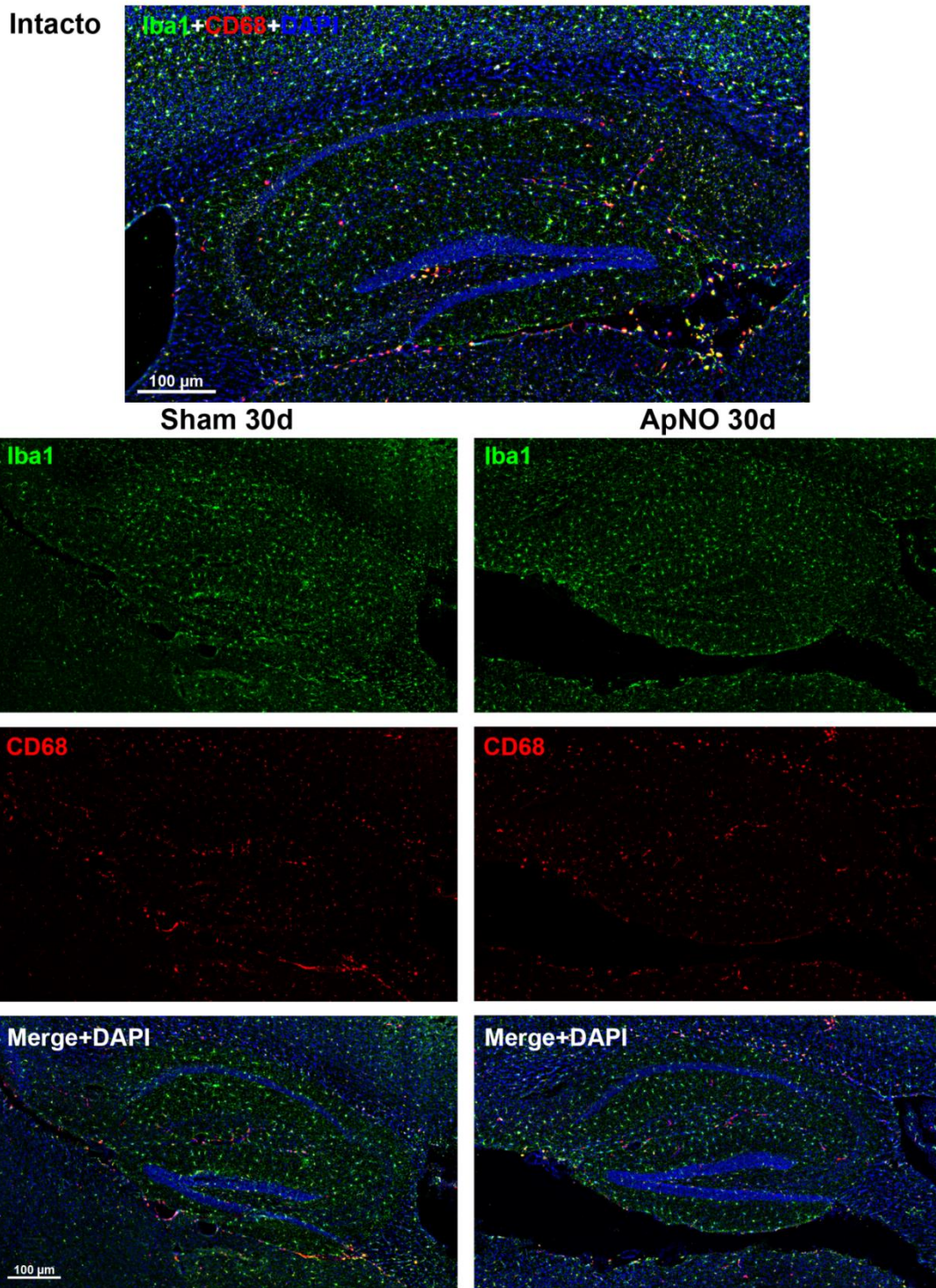
**Figura 79.** Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMI inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.





**Figura 80.** Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.





**Figura 81.** Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.

**4.2.1.2.4 Respuesta microglial relativa en el hipocampo tras la cirugía Sham o ApNO en comparación con el CS intacto**

El análisis de aumento o disminución de porcentaje de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> relativo a los animales intactos (considerados el 100%) muestra que en el **Hc** a la lesión tanto tras la cirugía Sham como ApNO no presentaron cambios significativos, excepto a 30 días tras la cirugía Sham, que fue significativamente mayor (**Figura 82-A y B**) (**Tabla 29**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
<b>1</b>	84	106	115	103	143	118
<b>2</b>	106	98	67	70	137	103
<b>3</b>	104	106	73	92	143	141
<b>Media (%)</b>	98	103	85	88	141*	121
<b>DEM</b>	12	5	26	17	3	19

**Tabla 29.** Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo contralateral en relación al hipocampo intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. \* diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney p< 0,05).

En el **Hi** a la lesión del grupo Sham, se observó una disminución del porcentaje de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> relativa a los animales intactos a los 9 días. A los 30 días, el porcentaje de densidad CMi Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo Sham es similar al intacto (**Figura 82-A**) (**Tabla 30**). Tras el ApNO, el porcentaje de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> es similar al grupo intacto a 3 y 9 días y significativamente mayor a 30 días, con un incremento del 144% ± 10% (**Figura 82-B**) (**Tabla 30**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
<b>1</b>	87	113	87	96	107	133
<b>2</b>	84	107	75	77	99	150
<b>3</b>	110	91	52	92	115	149
<b>Media (%)</b>	94	104	71*	88	107	144*
<b>DEM</b>	14	11	18	10	8	10

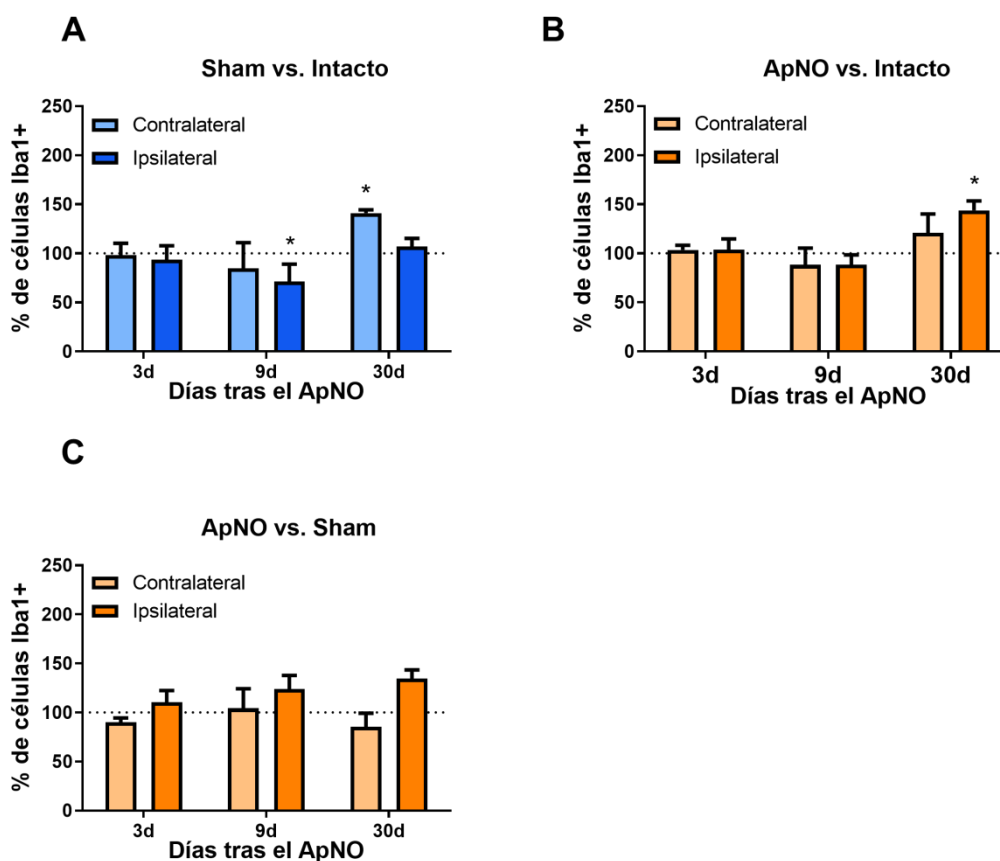
**Tabla 30.** Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo ipsilateral en relación al hipocampo intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. \* diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney p< 0,05).

#### 4.2.1.2.5 Respuesta microglial en el hipocampo tras el ApNO relativa al grupo Sham

Para analizar la respuesta de CMi debida al ApNO y no a la cirugía en sí, se calculó la variación relativa de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> en los hipocampos de los grupos con ApNO respecto a sus respectivos Sham (considerados como el 100%). Los resultados muestran que no se presentaron cambios significativos respecto al Sham, entre los tiempos estudiados ni en ninguno de los hemisferios. No obstante, en el Hi se aprecia una tendencia al incremento progresivo en el tiempo que no ocurre en el Hc (Tabla 31) (Figura 82-C).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
1	93	120	122	134	84	124
2	85	114	82	108	73	140
3	93	97	109	129	100	139
<b>Media (%)</b>	90	111	104	124	86	134
<b>DEM</b>	4	12	20	14	14	9

**Tabla 31.** Variación relativa en porcentajes de la densidad de la CMi Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo en relación al hipocampo Sham ipsilateral o contralateral (considerados como el 100 %). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 82.** Porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO. Gráficos de barras que muestran el porcentaje  $\pm$  DEM de CMi Iba1<sup>+</sup> en el grupo Sham (barras azules) y en el grupo ApNO (barras naranjas), con respecto a los ratones intactos (A, B) o Sham (C), considerados como el 100%, a los distintos tiempos de análisis. Las barras en colores claros representan al hipocampo contralateral y las oscuras al ipsilateral. El análisis estadístico ha estudiado las diferencias entre animales Sham o ApNO vs. Intactos y ApNO vs. Sham, así como entre los diferentes tiempos de estudio y entre ambos lados. \*:diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.2.6 Estudio del área celular de las células Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo ipsi- y contralateral

A continuación, se cuantificó el tamaño celular de las CMi Iba1<sup>+</sup> en el Hi e Hc tras ApNO o tras la cirugía Sham, dividiendo entre CMi Iba1<sup>+</sup> pequeñas ( $\leq 20 \text{ mm}^2$ ) o CMi Iba1<sup>+</sup> grandes ( $>20 \text{ mm}^2$ ) (Figura 83).

En el Hc en comparación con el animal intacto, los resultados mostraron que las células con tamaño mayor a  $20 \text{ mm}^2$  aumentan significativamente a los 3 y 30 días en los grupos Sham

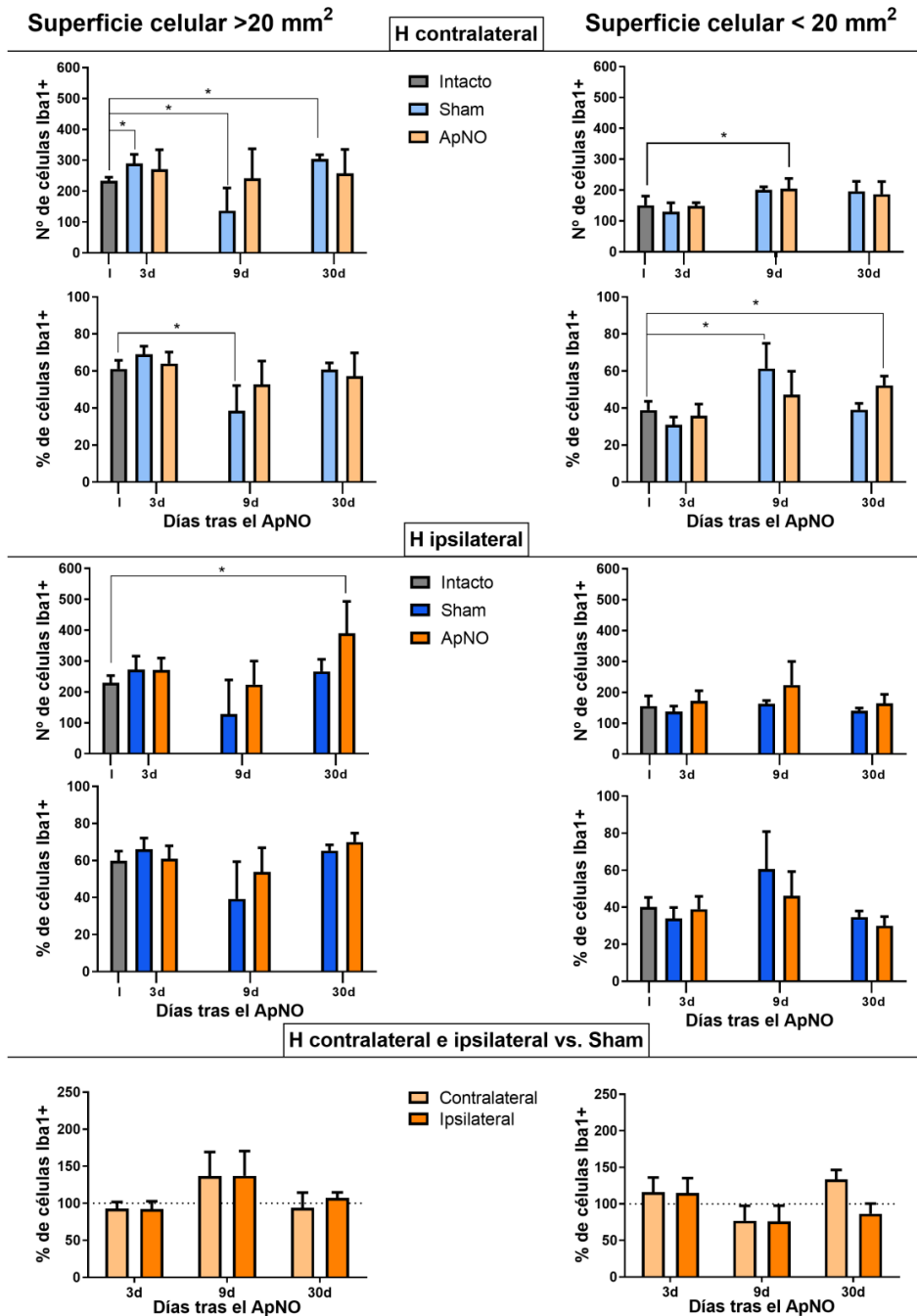


así como en todos los tiempos estudiados con ApNO, en este caso sin lograr significación estadística. En cambio, en el grupo Sham 9 días hubo una reducción del número y porcentaje de células con área mayor a  $20 \text{ mm}^2$  y un incremento absoluto y relativo de las de área menor a  $20 \text{ mm}^2$ , ambas variaciones significativas respecto al intacto. Asimismo, hubo un incremento del número de CMi Iba1<sup>+</sup> con superficie menor a  $20 \text{ mm}^2$  y de su porcentaje respecto al total a los 9 ó 30 días.

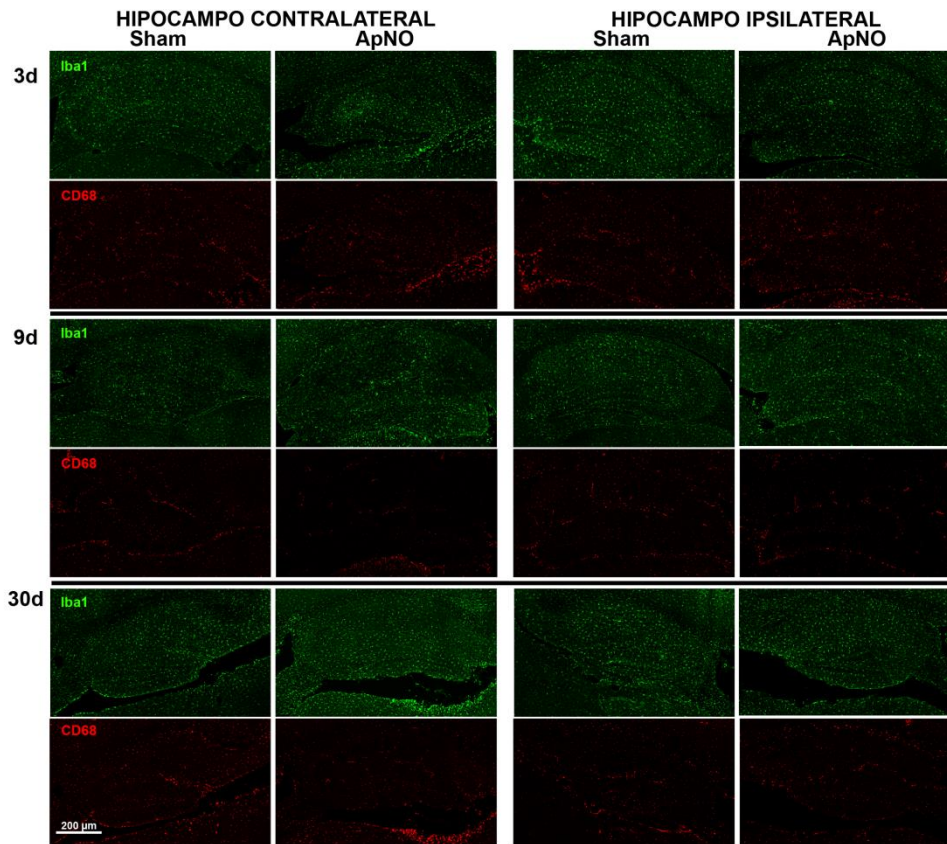
En el Hi, el número de células mayor a  $20 \text{ mm}^2$  se mantuvo similar al intacto salvo un incremento significativo en el grupo ApNO a los 30 días. Los grupos de ApNO tuvieron mayor número de células pequeñas respecto al intacto en todos los tiempos estudiados, sin que estos cambios fueran estadísticamente significativos.

Finalmente, se comparó la proporción de CMi Iba1<sup>+</sup> en función de su área celular entre los hipocampos de ambos hemisferios de los animales ApNO respecto los animales Sham y no se encontraron diferencias respecto a sus Sham.

La **Figura 84** permite visualizar la respuesta en el Hi e Hc a la lesión, permitiendo comprobar que, en comparación con las porciones de CS observados en las imágenes de ApNO a los 3 y 30 días, las CMi no adquieren morfología ameboide ni un marcaje intenso CD68<sup>+</sup>.



**Figura 83.** Estudio del área de las CMi Iba1<sup>+</sup> en el hipocampo de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO o Sham. Gráficos de barras que muestran el número o porcentaje ± DEM de CMi Iba1<sup>+</sup> con un área mayor o menor de 20 mm<sup>2</sup> en el grupo Sham (barras azules), en el grupo ApNO (barras naranjas) y en los ratones intactos (barra gris), en los hipocampos (H) contralateral o ipsilateral. Abajo, comparación del porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> respecto a su Sham correspondiente (considerado como el 100%). Las barras en colores claros representan al H contralateral y las oscuras al ipsilateral. \*:diferencia estadísticamente significativa entre los grupos señalados (Test de Mann Whitney p< 0,05).



**Figura 84.** Figura resumen de la respuesta de las CMi Iba1<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> en el hipocampo contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.

### 4.2.1.3 Bulbo Olfatorio

#### 4.2.1.3.1 Caracterización de las CMi del BO en animales intactos

Para el estudio de la CMi del BO, nos centraremos en el estudio de la misma en la capa granular dado que es la capa de mayor extensión y fácilmente distinguible en los cortes sagitales (**Ver Apartado 1.2.3. Bulbo Olfatorio**). Como se observa en la **Tabla 32**, la densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> del BO derecho e izquierdo fue  $351 \pm 83$  y  $347 \pm 95$ , CMi/mm<sup>2</sup>, respectivamente; similar entre ambos. Se calculó el promedio de varios animales analizados, el valor que se utilizará de referencia para compararlo con los grupos experimentales, y fue de  $351 \pm 83$  CMi/mm<sup>2</sup>.

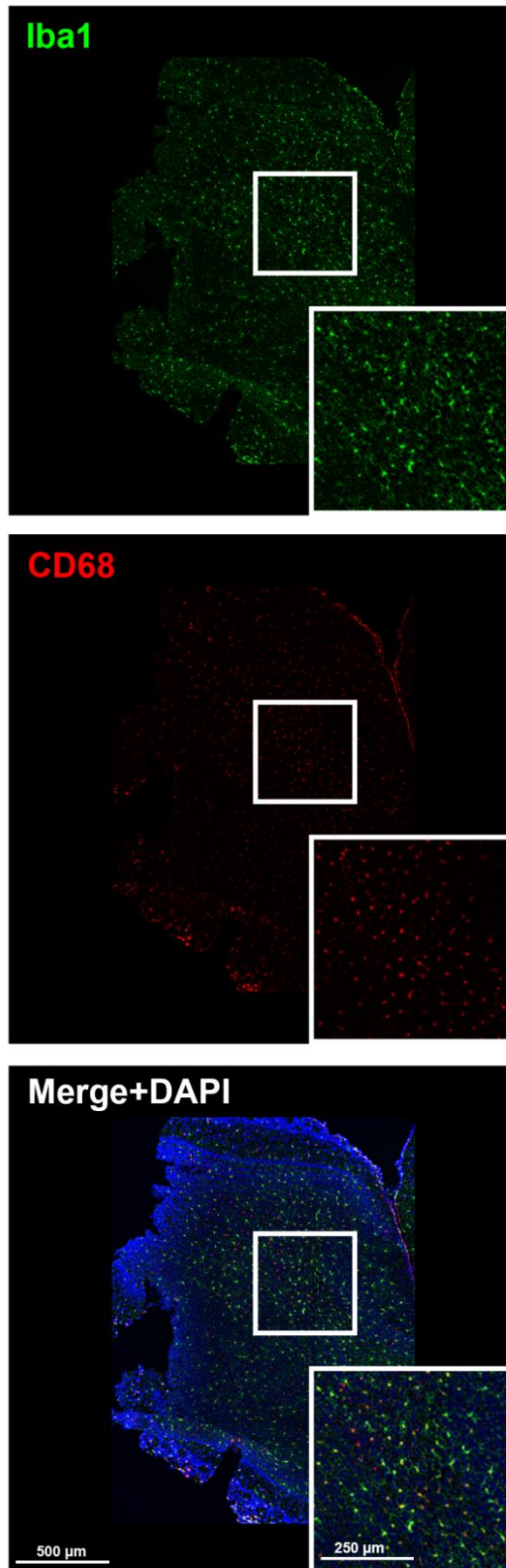
Como se muestra en la **Figura 85**, las CMi Iba1<sup>+</sup> se disponen con un soma de pequeño del que se originan numerosas ramificaciones, morfología típica del estado de reposo de las

CMI. Las CMI Iba1<sup>+</sup> de la capa granular muestran en la región del soma celular una expresión baja de CD68 pero presente prácticamente en la totalidad de las mismas.

	<b>Bulbo Olfatorio Intacto</b>	
	<b>Derecho</b>	<b>Izquierdo</b>
<b>Animal</b>		
<b>1</b>	338	316
<b>2</b>	268	244
<b>3</b>	346	355
<b>4</b>	469	472

<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	355	347
<b>DEM</b>	83	95
<b>Media total (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	<b>351</b>	
<b>DEM</b>	<b>83</b>	

**Tabla 32.** Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>) ± DEM (desviación estándar de la media) de células de microglía Iba1<sup>+</sup> en el BO de animales intactos en ambos hemisferios y la media ± DEM entre ambos.



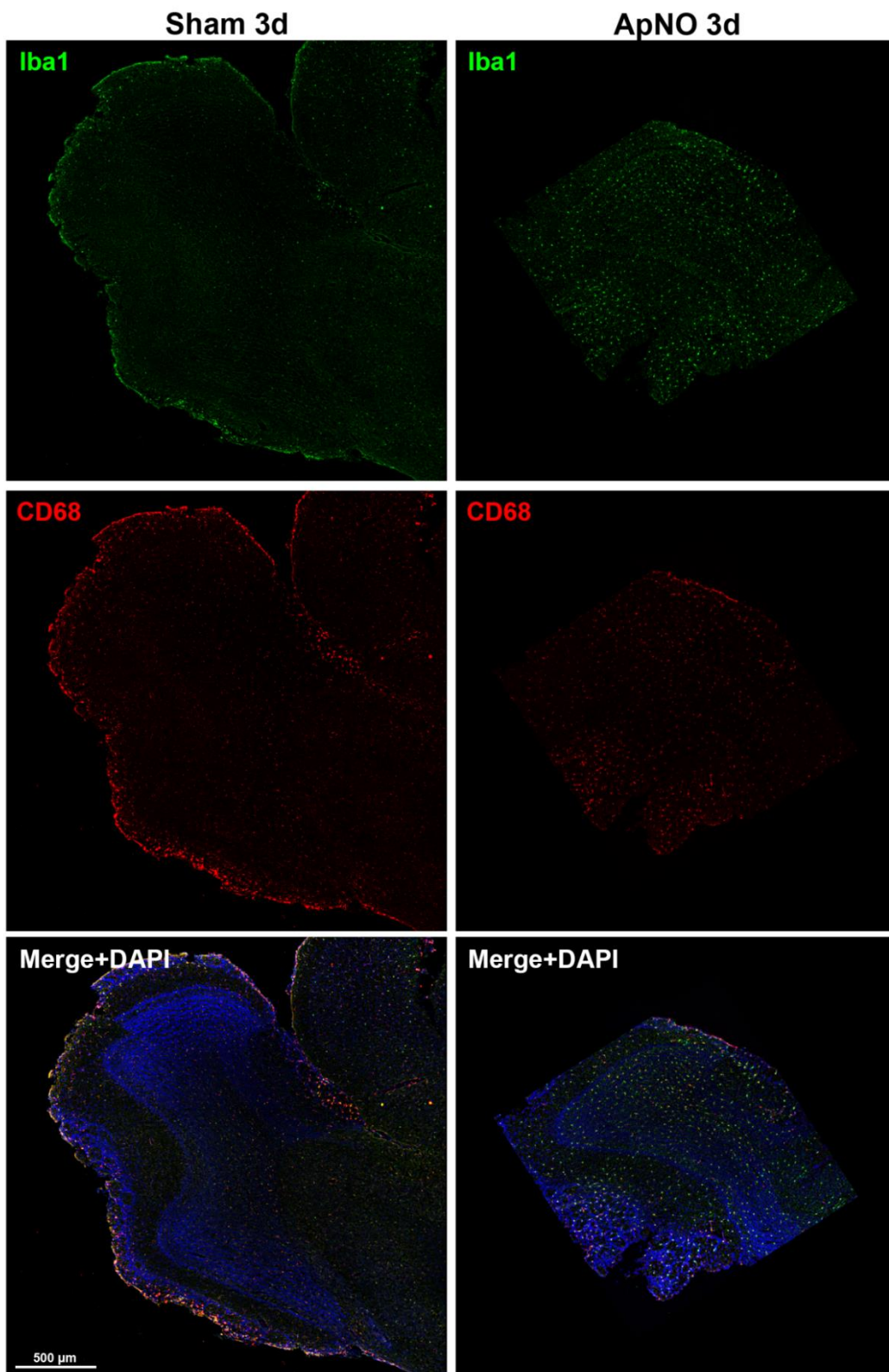
**Figura 85.** Inmunodetección de CMi en una sección sagital de bulbo olfatorio de un ratón **C57BL/6** intacto. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde), CD68 (rojo) y la superposición de ambas con DAPI (Merge+DAPI).

#### 4.2.1.3.2 Caracterización de la respuesta microglial en el BO contralateral tras ApNO

La densidad media de CMi Iba1<sup>+</sup> en el BO contralateral (BOc) a la lesión fue similar al grupo intacto, tanto en el grupo con cirugía Sham como con ApNO y a todos los tiempos tras la lesión (**Tabla 33**). En cuanto a la morfología y la expresión de CD68, tampoco se observan cambios en las imágenes de inmunofluorescencia a 3, 9 ó 30 días (**Figuras 86, 87 y 88**, respectivamente).

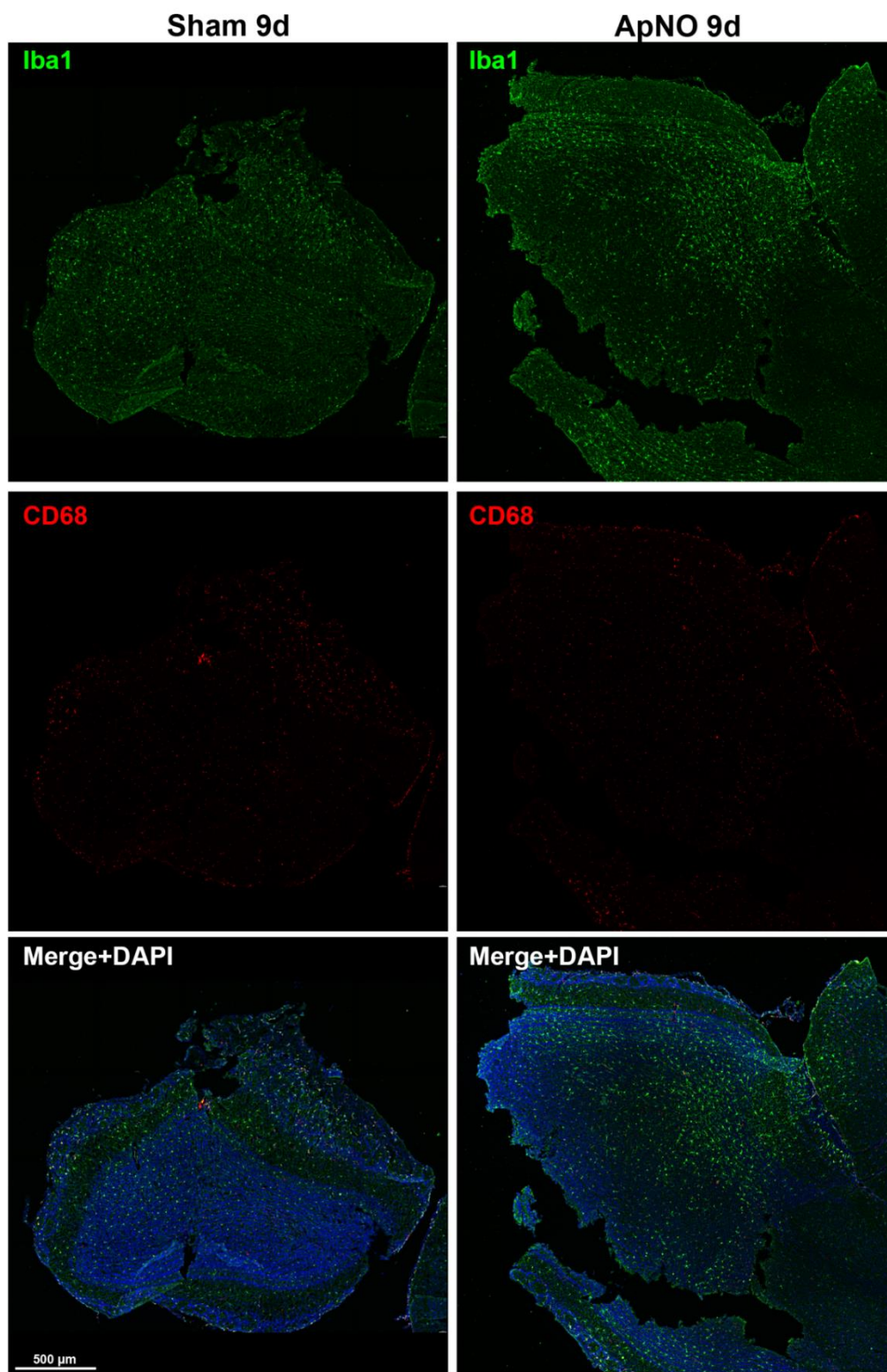
Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	284	334	318	376	379	446
2	301	365	350	338	338	393
3	323	368	338	364	388	344
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	303	356	335	359	368	395
<b>DEM</b>	19	19	16	19	26	51

**Tabla 33.** Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>) ± DEM (desviación estándar de la media) de CMi Iba1<sup>+</sup> en el BO contralateral al ApNO con sus respectivos Sham.

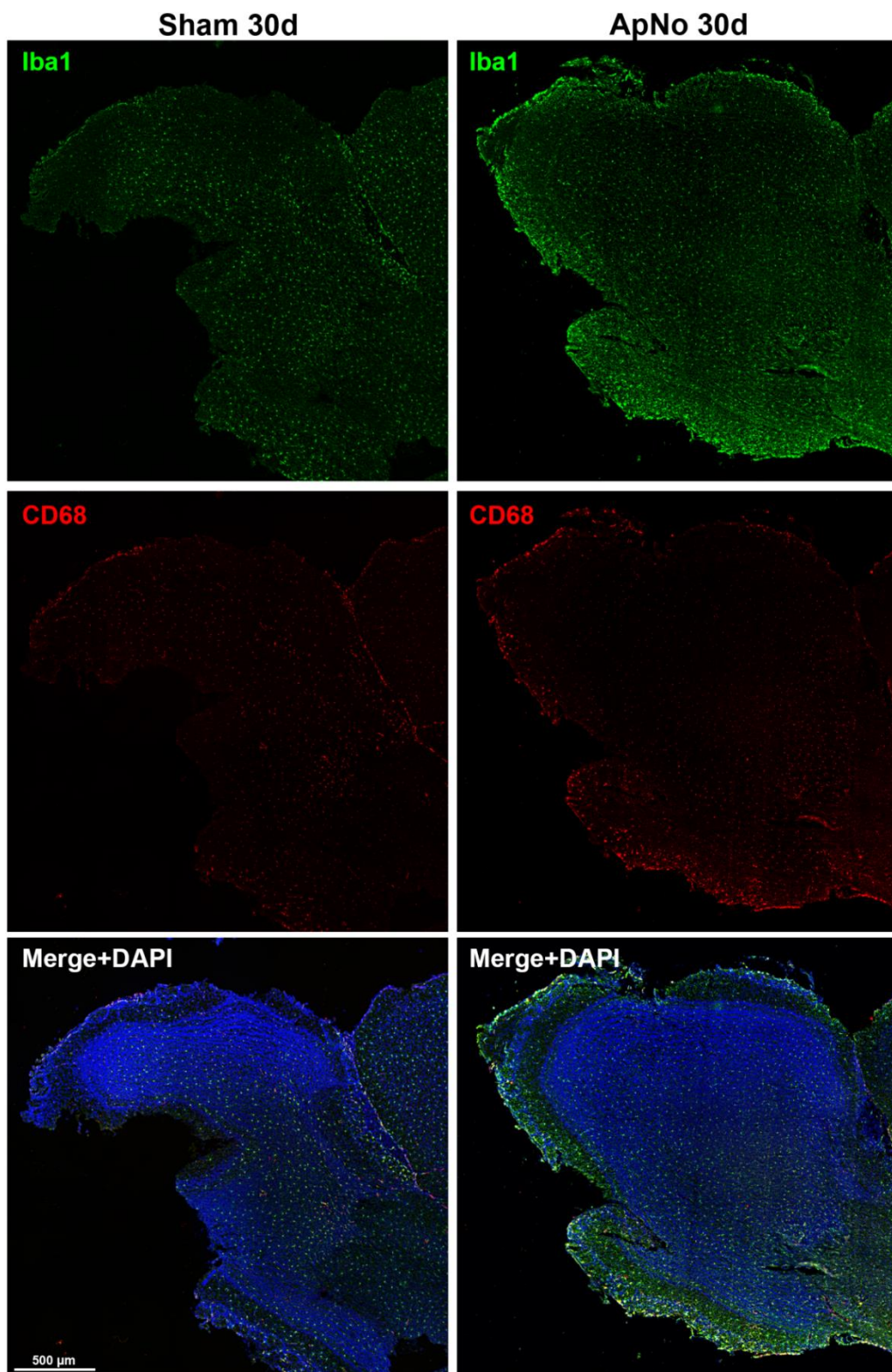


**Figura 86.** Secciones sagitales de un BO intacto y de BO contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). Las imágenes inferiores muestra ambas señales y DAPI superpuestas (Merge + DAPI).





**Figura 87.** Secciones sagitales de un BO intacto y de BO contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). Las imágenes inferiores muestra ambas señales y DAPI superpuestas (Merge + DAPI).



**Figura 88.** Secciones sagitales de un BO intacto y de BO contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). Las imágenes inferiores muestra ambas señales y DAPI superpuestas (Merge + DAPI).

#### 4.2.1.3.3 Caracterización de la respuesta microglial en el BO ipsilateral tras ApNO

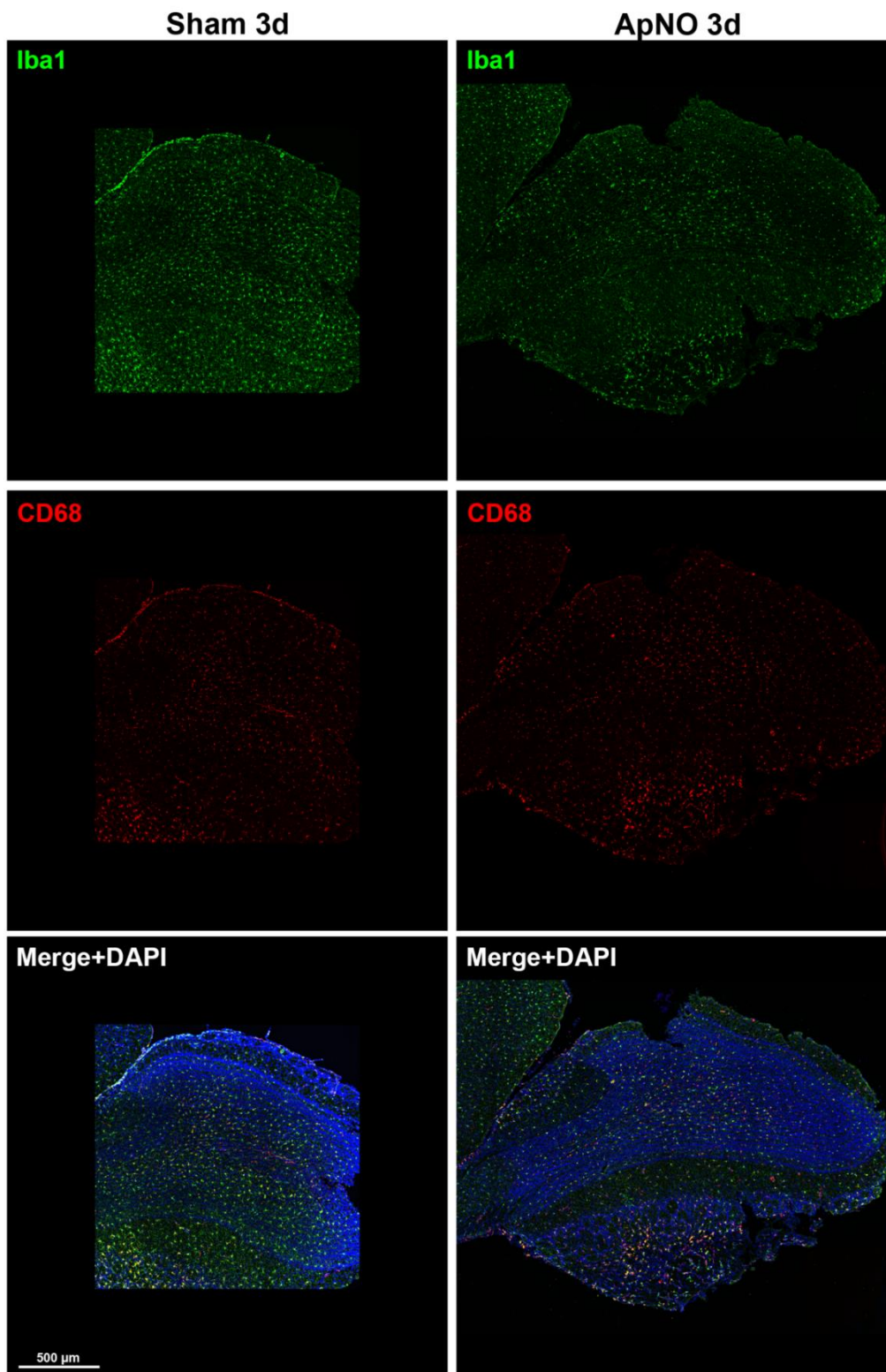
En el BOi se produce un aumento de la densidad de las CMi Iba1<sup>+</sup> a los 30 días tras la lesión, similar entre animales Sham y ApNO. El resto de tiempos estudiados se mantuvo en valores similares a la densidad media del BO intacto de referencia ( $351 \pm 83$  CMi/mm<sup>2</sup>) (Tabla 34).

No se observaron cambios en el estudio del tejido en los 3 tiempos estudiados respecto al animal intacto o a lo largo de los tiempos estudiados, como se muestra en las Figuras 89, 90 y 91.

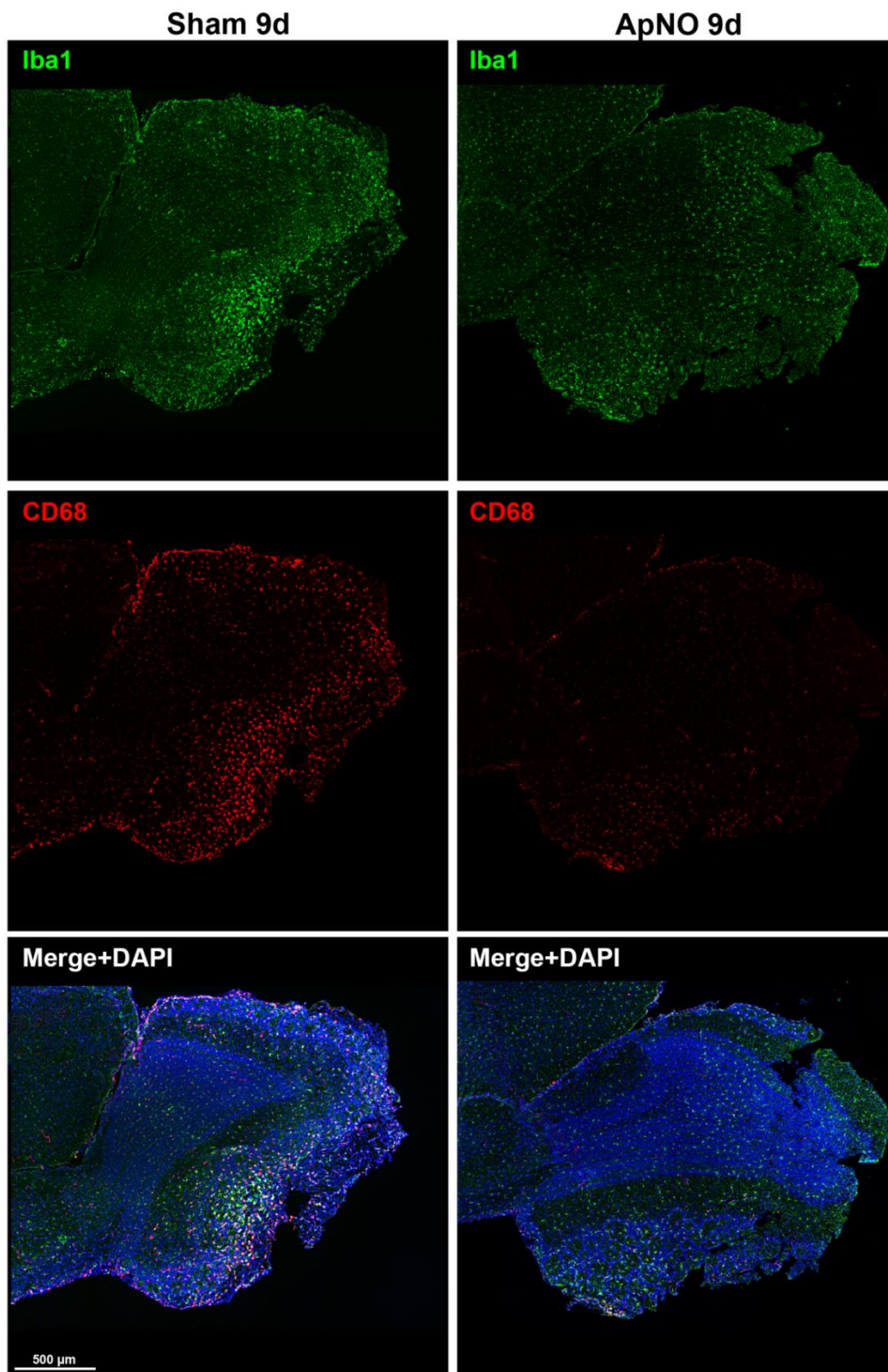
Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	315	398		335	458	481
2	309	376	301	317	434	421
3	367	353	355	332	469	504
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	330	375	328	328	454	469
<b>DEM</b>	32	23	39	10	18	43

Tabla 34. Densidad media (cel/mm<sup>2</sup>)  $\pm$  DEM (desviación estándar de la media) de CMi Iba1<sup>+</sup> en el BO ipsilateral al ApNO con sus respectivos Sham.



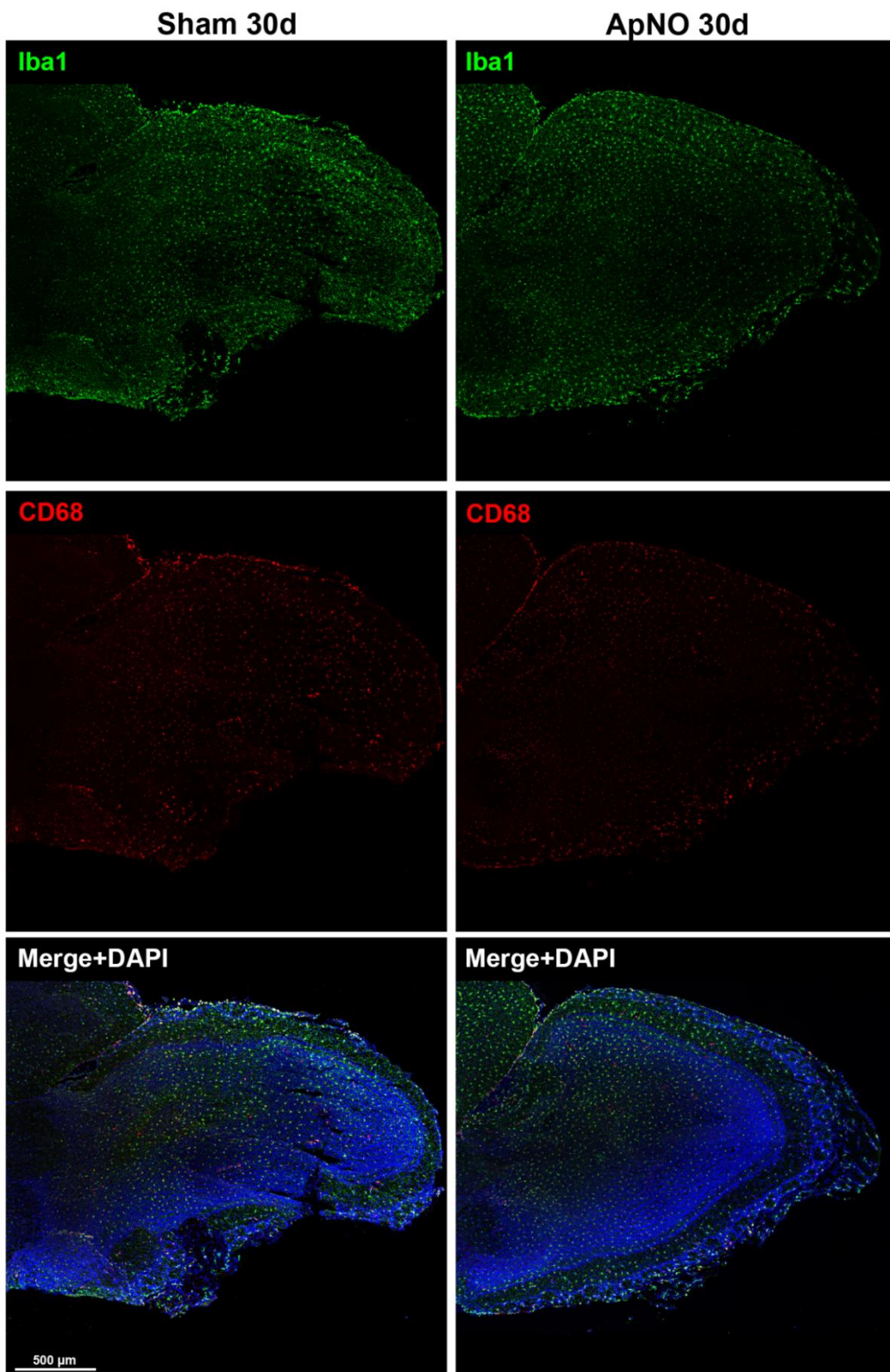


**Figura 89.** Secciones sagitales de un BO intacto y de BO ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). Las imágenes inferiores muestra ambas señales y DAPI superpuestas (Merge + DAPI).



**Figura 90.** Secciones sagitales de un BO intacto y de BO ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). Las imágenes inferiores muestra ambas señales y DAPI superpuestas (Merge + DAPI).





**Figura 91.** Secciones sagitales de un BO intacto y de BO ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMi inmunodetectadas con Iba1 (verde) y CD68 (rojo). Las imágenes inferiores muestra ambas señales y DAPI superpuestas (Merge + DAPI).

**4.2.1.3.4 Respuesta microglial relativa en el BO tras la cirugía Sham o ApNO en comparación con el BO intacto**

El **BOc** a la lesión no presentó cambios en relación a la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> respecto al animal intacto con la cirugía Sham (**Figura 92-A**) o tras el ApNO (**Figura 92-B**) (**Tabla 35**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	81	95	91	107	108	127
2	86	104	100	96	96	112
3	92	105	96	104	110	98
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	86	101	96	102	105	112
<b>DEM</b>	5,5	5,4	4,7	5,6	7,5	14,5

**Tabla 35.** Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1<sup>+</sup> en el BO contralateral en relación al BO intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Sin embargo, el **BOi** de los animales estudiados a los 30 días tras el ApNO presentaron un aumento significativo de la densidad relativa de CMi del  $134 \pm 12$  % (**Figura 92-B**), mientras que en su grupo Sham fue del  $129 \pm 5,1$  % (**Figura 92-A**) (**Tabla 36**). El porcentaje de densidad relativa de microglia permaneció estable a los 3 y 9 días, en Sham y ApNO.

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	90	113	-	96	130	137
2	88	107	86	90	124	120
3	105	100	101	95	134	143
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	94	107	93	94	129	134*
<b>DEM</b>	9,2	6,4	11	2,7	5,1	12



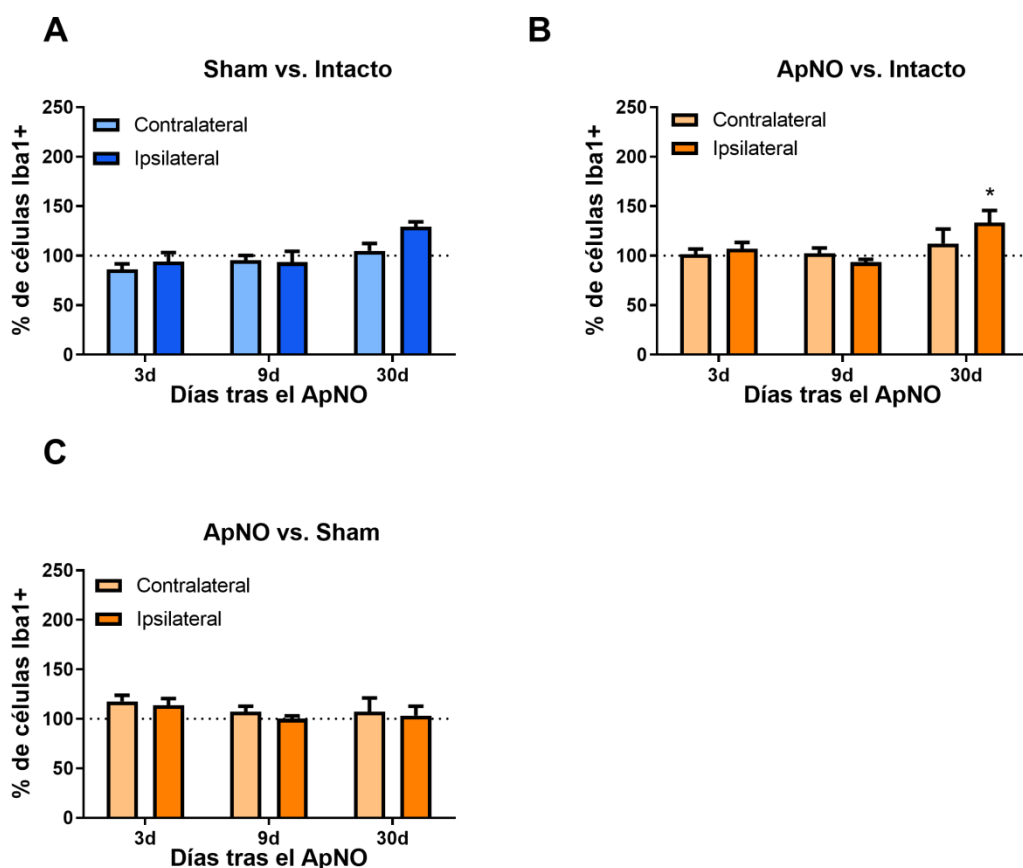
**Tabla 36.** Porcentajes de densidad relativa de la CMi Iba1<sup>+</sup> en el BO contralateral en relación al BO intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. Muestra del BO ipsilateral del ratón 1 del grupo Sham 9 días no disponible. \*:diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.3.5 Respuesta microglial en el BO tras el ApNO relativa al grupo Sham

El BO tras el ApNO no presentó cambios significativos respecto a sus correspondientes Sham (considerados en este caso como el 100%), entre los tiempos estudiados o entre ambos lados (Tabla 37) (Figura 92-C).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
1	110	120	112	102	121	106
2	121	114	101	97	107	93
3	122	107	108	101	94	111
<b>Media (cel/mm<sup>2</sup>)</b>	118	114	107	100	107	103
<b>DEM</b>	6,3	6,8	5,8	2,9	14	9,4

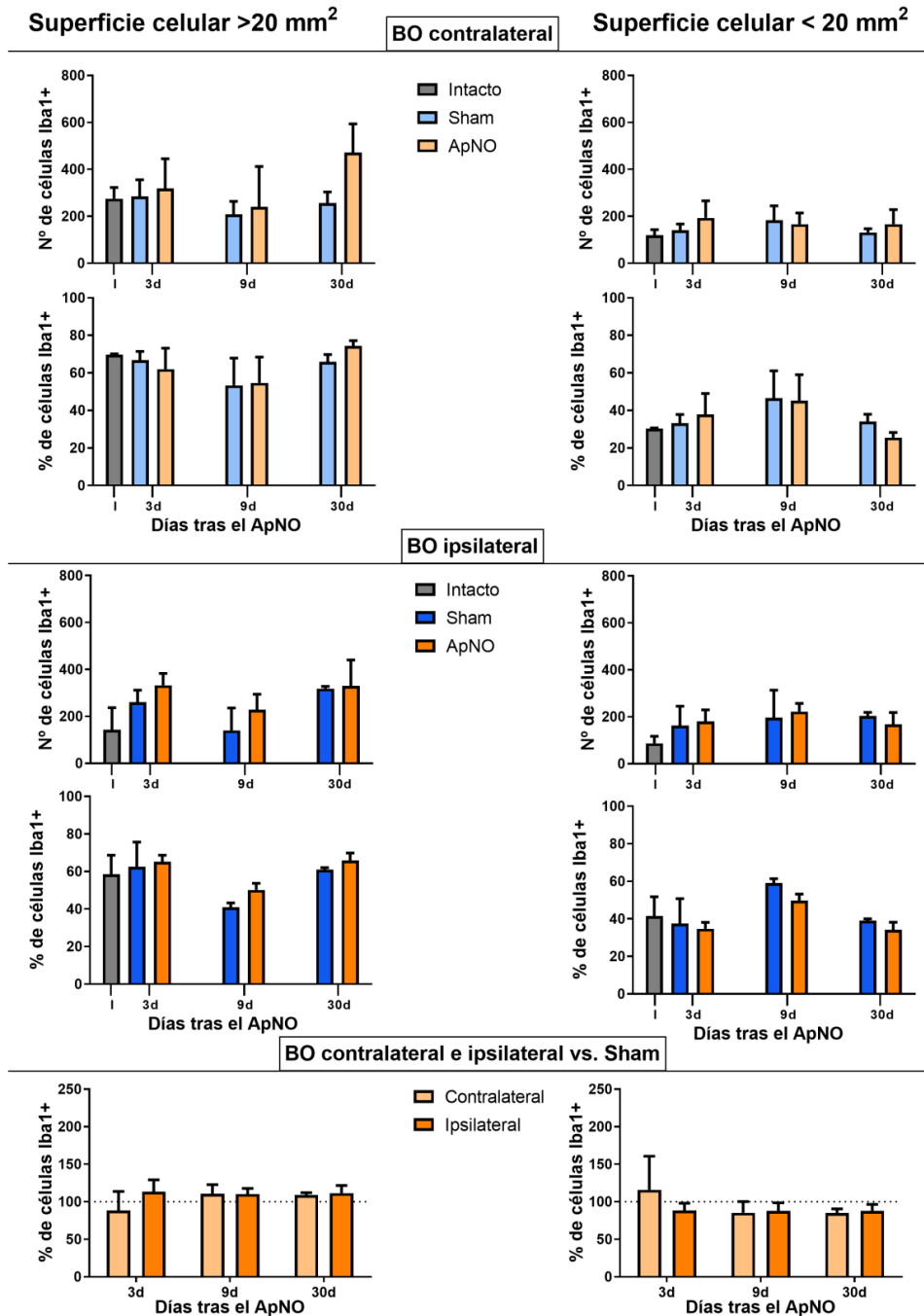
**Tabla 37.** Variación relativa de la densidad de la CMi Iba1<sup>+</sup> en porcentaje en el BO en relación al BO Sham ipsilateral o contralateral (considerados como el 100%). No hay diferencias estadísticamente significativas.



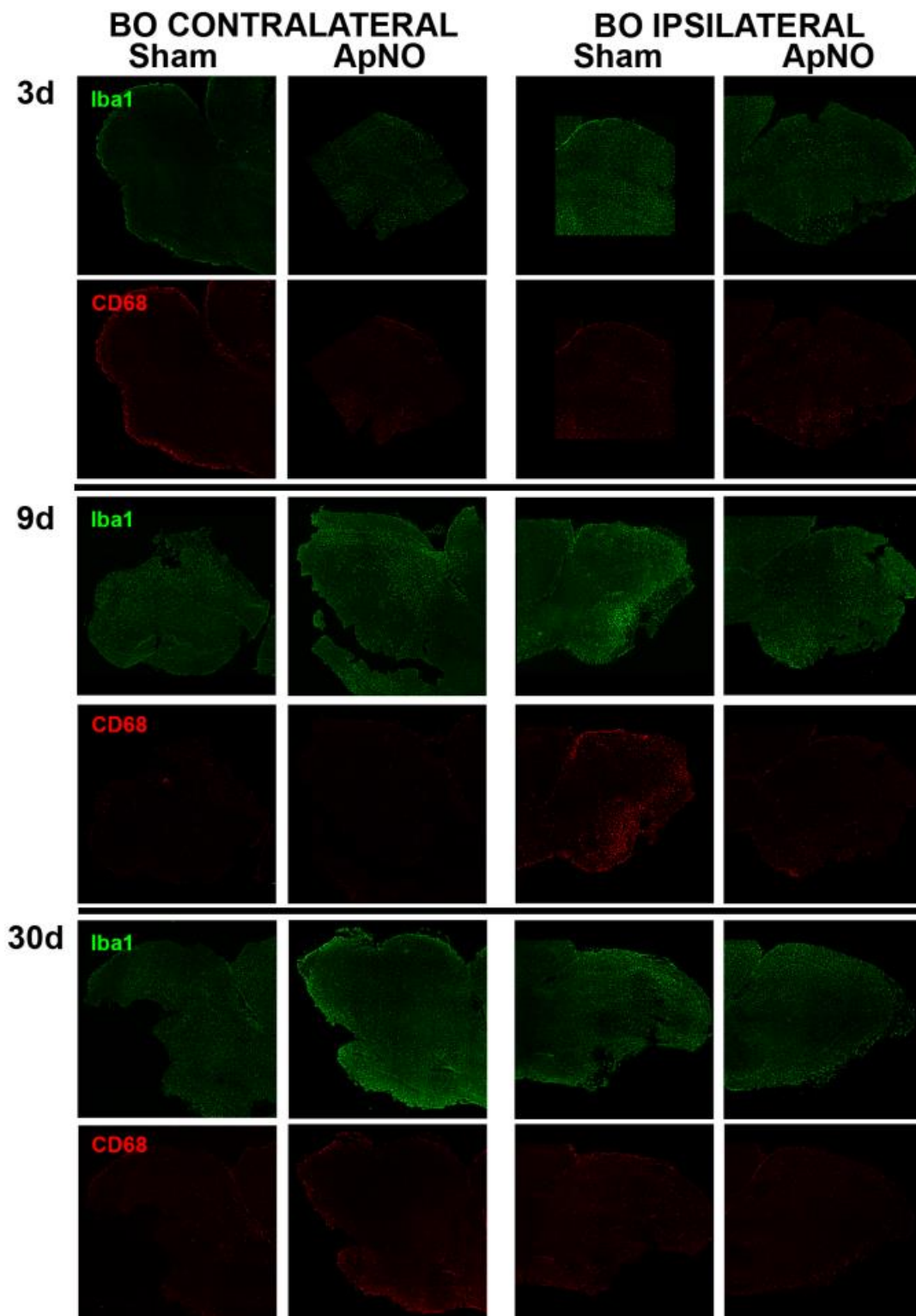
**Figura 92.** Porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> en el BO de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO. Gráficos de barras que muestran el porcentaje  $\pm$  DEM de CMi Iba1<sup>+</sup> en el grupo Sham (barras azules) y en el grupo ApNO (barras naranjas), con respecto a los ratones intactos (A, B) o Sham (C), considerados como el 100%, a los distintos tiempos de análisis. Las barras en colores claros representan al BO contralateral y las oscuras al ipsilateral. El análisis estadístico ha estudiado las diferencias entre animales Sham o ApNO vs. Intactos y ApNO vs. Sham, así como entre los diferentes tiempos de estudio y entre ambos lados. \*:diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.3.6 Estudio del área celular de las células Iba1<sup>+</sup> en el BO

El área celular de las CMi en el BOc o BOi al ApNO o a cirugía Sham no mostró diferencias respecto a los animales intactos. Lógicamente, tampoco se encontraron diferencias entre los animales con ApNO y sus respectivos Sham (**Figura 93**). Las imágenes expuestas en este apartado se resumen en la **Figura 94**.



**Figura 93. Estudio del área de las CMi Iba1<sup>+</sup> en el bulbo olfatorio de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO o Sham.** Gráficos de barras que muestran el número o porcentaje  $\pm$  DEM de CMi Iba1<sup>+</sup> con un área mayor o menor de 20 mm<sup>2</sup> en el grupo Sham (barras azules), en el grupo ApNO (barras naranjas) y en los ratones intactos (barra gris), en el bulbo olfatorio (BO) contralateral o ipsilateral. Abajo, comparación del porcentaje de CMi Iba<sup>+</sup> respecto a su Sham correspondiente (considerado como el 100%). Las barras en colores claros representan al BO contralateral y las oscuras al ipsilateral. \*:diferencia estadísticamente significativa entre los grupos señalados (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).



**Figura 94.** Figura resumen de la respuesta de las CMi Iba1<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup> en el bulbo olfatorio contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.

## 4.2.2 ACTIVACIÓN MACROGLIAL

A continuación, se expondrá el estudio de la respuesta macroglial en las mismas regiones referidas anteriormente (CS, H y BO) de un grupo intacto y a los 3, 9 ó 30 días tras el ApNO o la cirugía Sham. Para ello, se analizaron secciones sagitales de los mismos tejidos inmunodetectando los astrocitos dada su expresión de GFAP.

La cuantificación del área ocupada por inmunofluorescencia GFAP se realizó mediante el software ImageJ (**ver Apartado 3.5.7.3. Cuantificación automática de la superficie ocupada por GFAP**). De forma resumida: dado que el área ocupada por la expresión de GFAP en cada inmunohistofluorescencia puede ser relativamente variable por las propias condiciones particulares de cada experimento, se decidió ponderar la superficie obtenida en cada sección por el valor obtenido en el animal intacto de la inmunodetección correspondiente, además de realizar la captura con el microscopio de fluorescencia con los mismos parámetros de ganancia y exposición. En el caso del animal intacto, de igual manera, los valores absolutos de área ocupada por GFAP se ponderaron por el promedio obtenido en su inmunodetección correspondiente. Por tanto, se obtuvo el valor de fluorescencia 1 para la región a estudio del animal intacto.

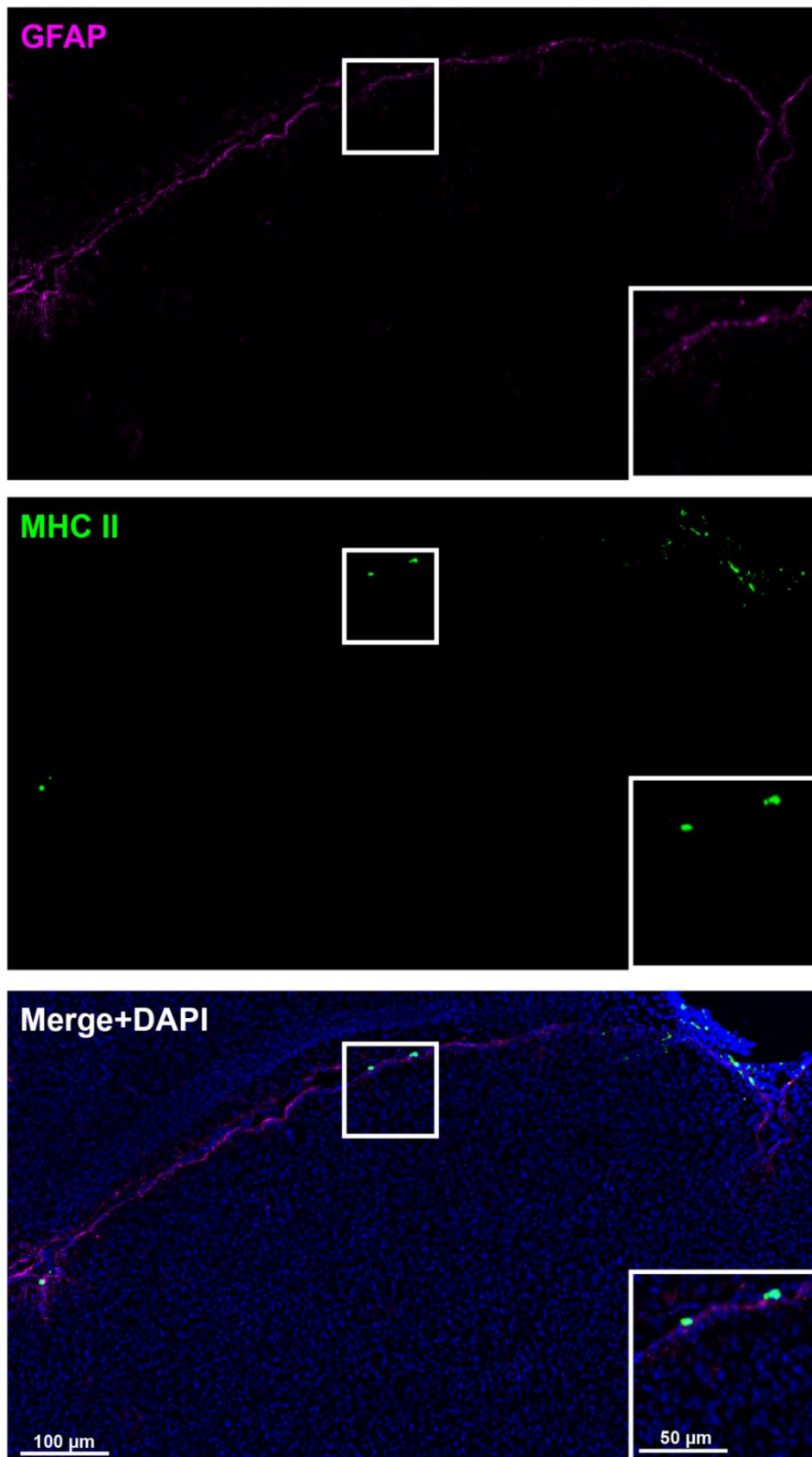
Para ello, inicialmente, se ha estudiado el área ocupada por GFAP en cada región en animales intactos y en los grupos Sham y con ApNO. A continuación, se expondrán los resultados de la respuesta en el hemisferio contralateral (derecho) e ipsilateral (izquierdo). Finalmente, compararemos la respuesta en el área ipsilateral y contralateral observada en el grupo ApNO en relación al Sham (considerado entonces como el 100%).

El estudio de la expresión de MHC II se realizó de forma cualitativa a través de la visualización de las secciones de los distintos tiempos desde la lesión.

### 4.2.2.1 Colículo superior

#### 4.2.2.1.1 Caracterización de la activación macroglial de colículo superior en animales intactos

Como se ha expuesto anteriormente, el valor del área ocupada por inmunofluorescencia GFAP del CS intacto fue 1 (**ver Apartado 3.5.8.2. Análisis del estudio histológico de la macroglía**). Como se puede ver en la **Figura 95**, la mayor expresión de GFAP en astrocitos tuvo lugar en la superficie externa del CS, sin ser posible diferenciar en esta imagen unidades celulares independientes. No se observó una expresión constitutiva generalizada de MHC II en los astrocitos. En esta imagen, se muestran dos células de aspecto ameboides GFAP<sup>-</sup>/MHC II<sup>+</sup>, insertadas en la superficie del CS en probable íntima relación con la piamadre (**Figura 95-Magnificación**).



**Figura 95.** Inmunodetección de CMa en una sección sagital de colículo superior de un ratón C57BL/6 intacto. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura), MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge+DAPI).



#### 4.2.2.1.2 Caracterización de la respuesta macroglial en el CS contralateral tras ApNO

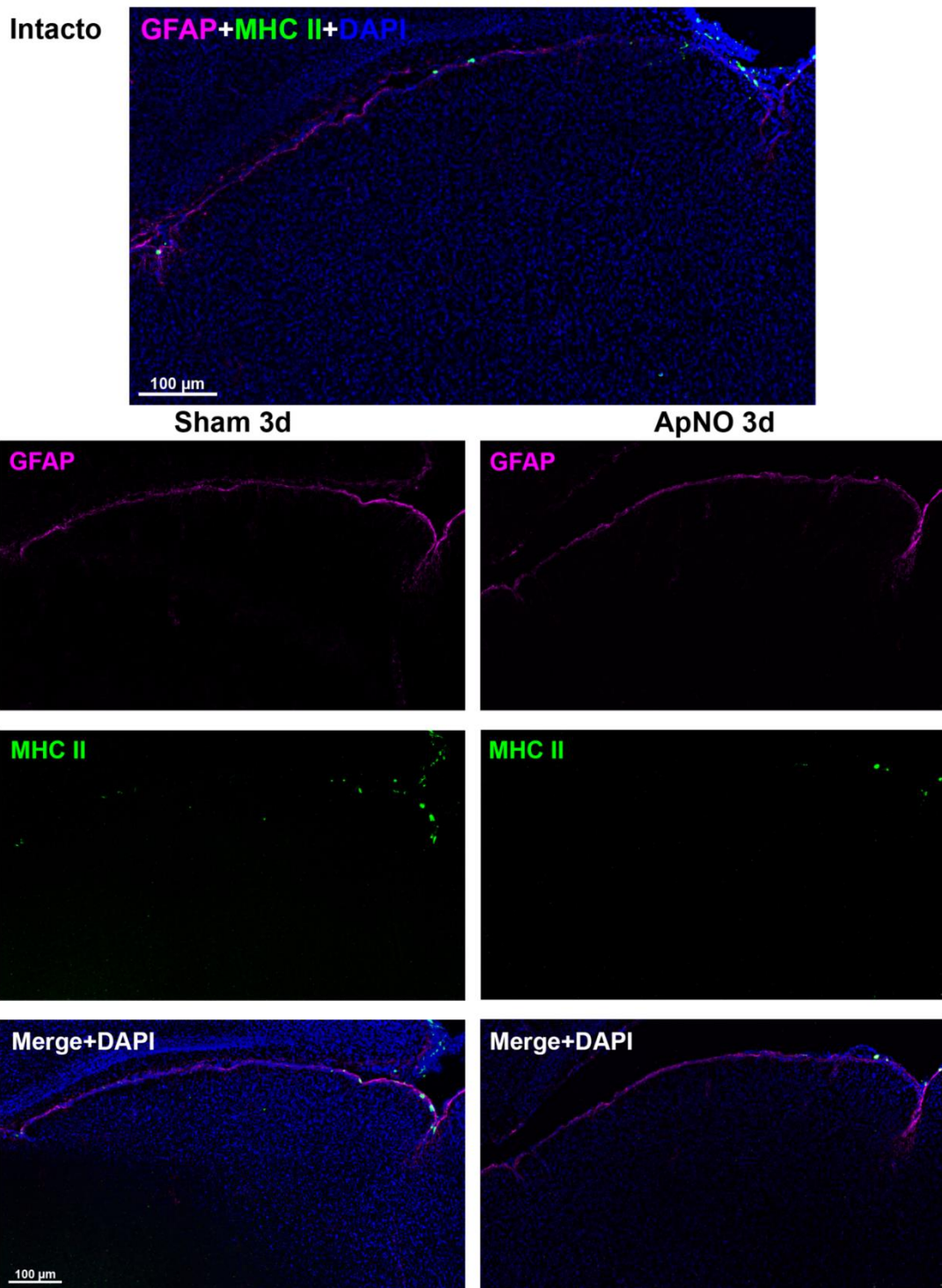
Se ha demostrado que la OHT en rata provoca una reacción micro (Iba1) y macroglial (GFAP) en el CSc y CSi respecto al animal intacto pero no se ha cuantificado (Sapienza et al., 2016). En el modelo de SNO, se ha demostrado un incremento la densidad de CMI Iba1<sup>+</sup> en el CSc respecto al animal intacto (Smith et al., 2018), como también confirman nuestros resultados anteriormente expuestos. Sin embargo, la respuesta de CMa en ambos CS tras el ApNO ha sido escasamente estudiada.

Como se muestra en la **Tabla 38**, el área ocupada por CMa GFAP<sup>+</sup> en el CSc tras el ApNO o la cirugía Sham se incrementó progresivamente en todos tiempos estudiados respecto al CS intacto. En los CSc de los animales Sham, se produjo un incremento progresivo similar pero de menor cuantía. De esta manera, a los 30 días de la lesión, el área ocupada por GFAP alcanzó un aumento relativo de  $3 \pm 0,3$  a los 30 días en los animales con el ApNO y  $2,1 \pm 0,7$  en el grupo con cirugía Sham.

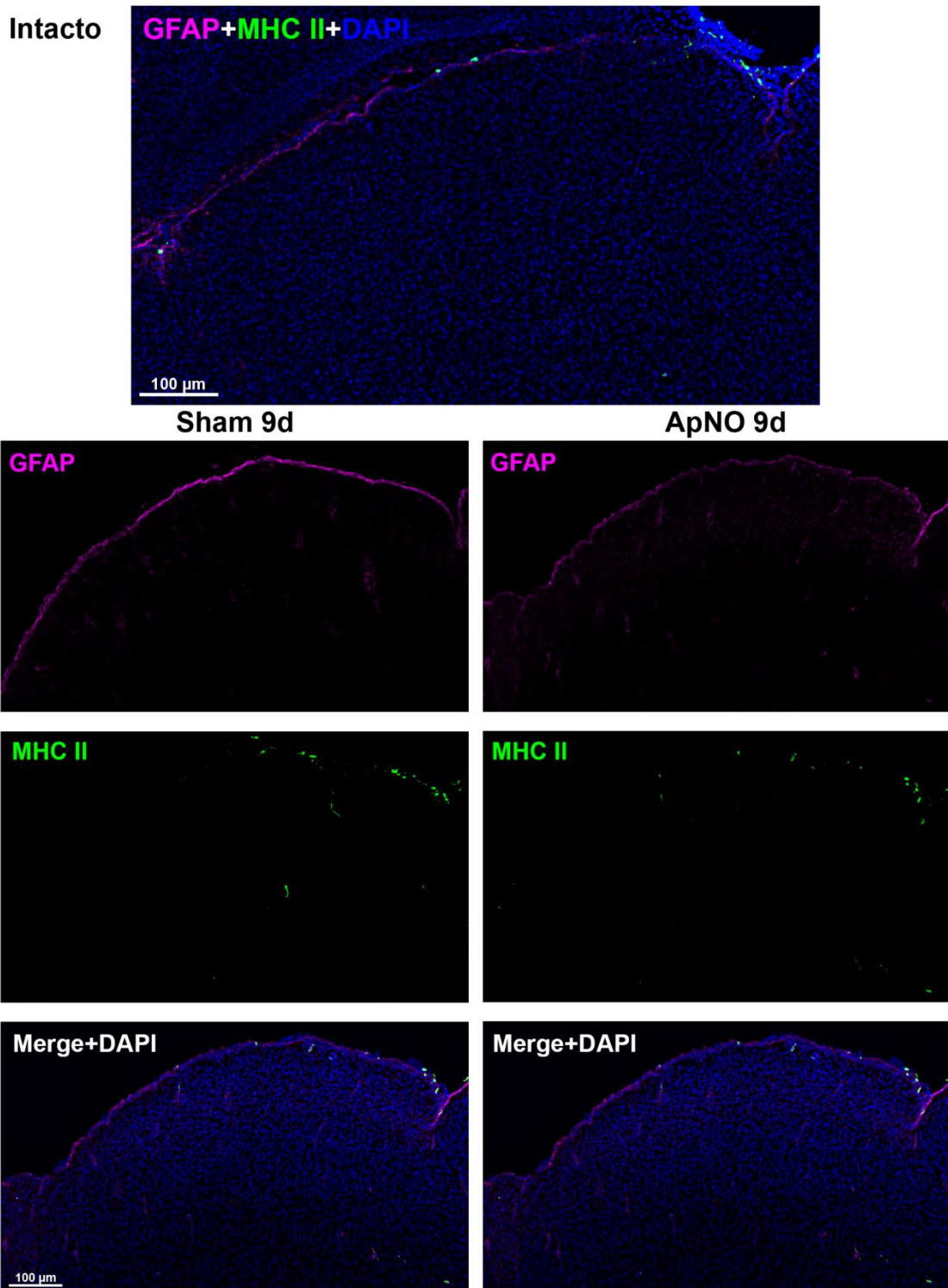
Estos resultados de incremento de área ocupada por GFAP se pueden observar a 9 ó 30 días en las **Figuras 97 y 98**, respectivamente. Además de este aumento del área ocupada por GFAP en la superficie del CSc, se observó un mayor marcaje de las prolongaciones y ramificaciones astrocitarias hacia su interior. A diferencia del grupo experimental a los 3 días (**Figura 96**), a 9 ó 30 días aparecieron células MHC II<sup>+</sup> dentro del parénquima del CSc, además de un mayor número de éstas insertas en la superficie del tejido.

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	1.5	1.6	1.2	1.4	1.7	2.9
2	1.0	1.2	1.1	1.2	2.9	2.9
3	0.6	1.2	1.4	1.8	1.8	3.4
<b>Media</b>	1.1	1.3	1.2	1.5	2.1	3.0
<b>DEM</b>	0.5	0.2	0.2	0.3	0.7	0.3

**Tabla 38.** Área  $\pm$  DEM (desviación estándar de la media) ocupada por GFAP en el CS contralateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto (considerado como 1).

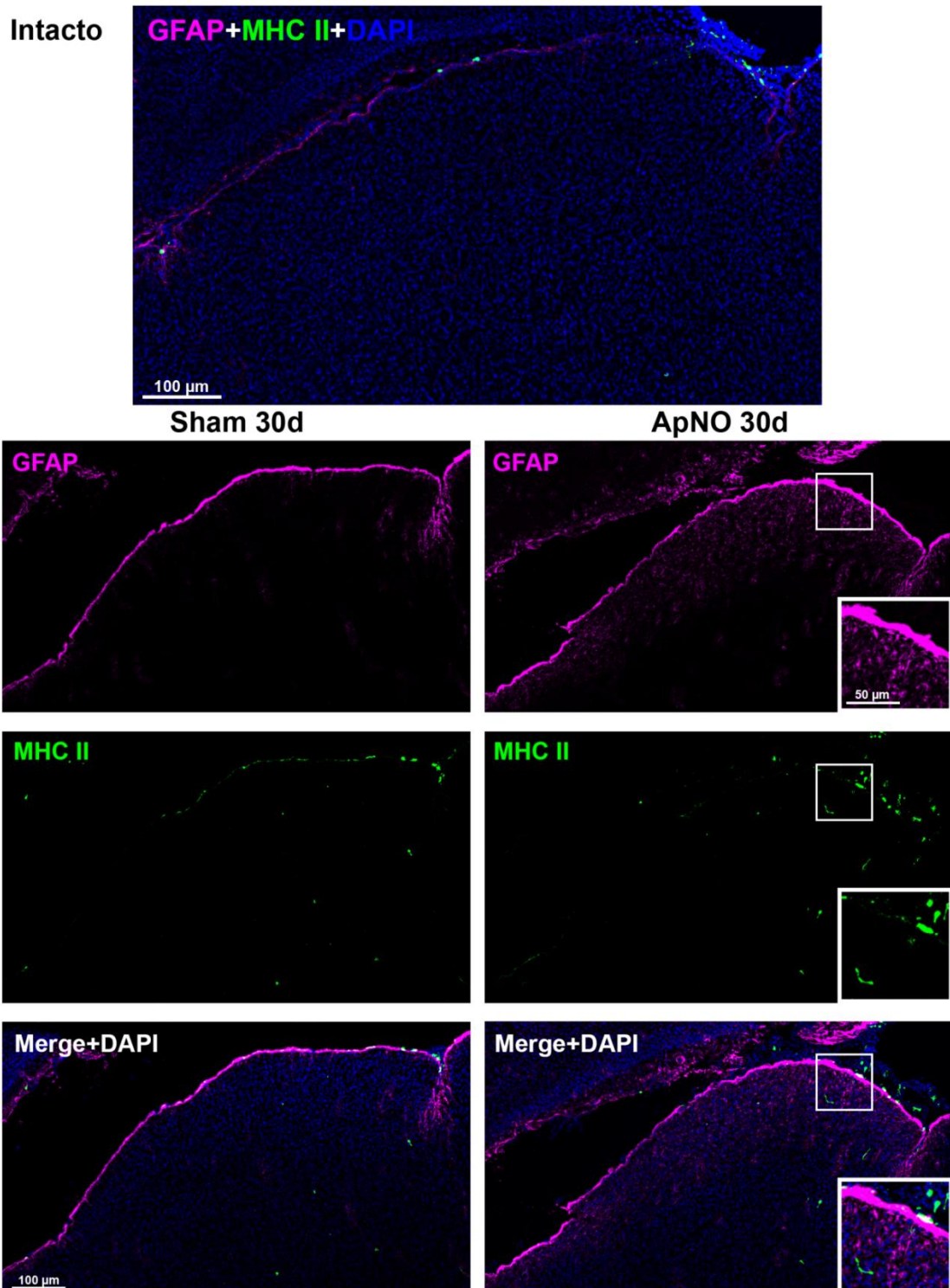


**Figura 96.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMA inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.



**Figura 97.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.





**Figura 98.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMA inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.

#### 4.2.2.1.3 Caracterización de la respuesta macroglial en el CS ipsilateral tras ApNO

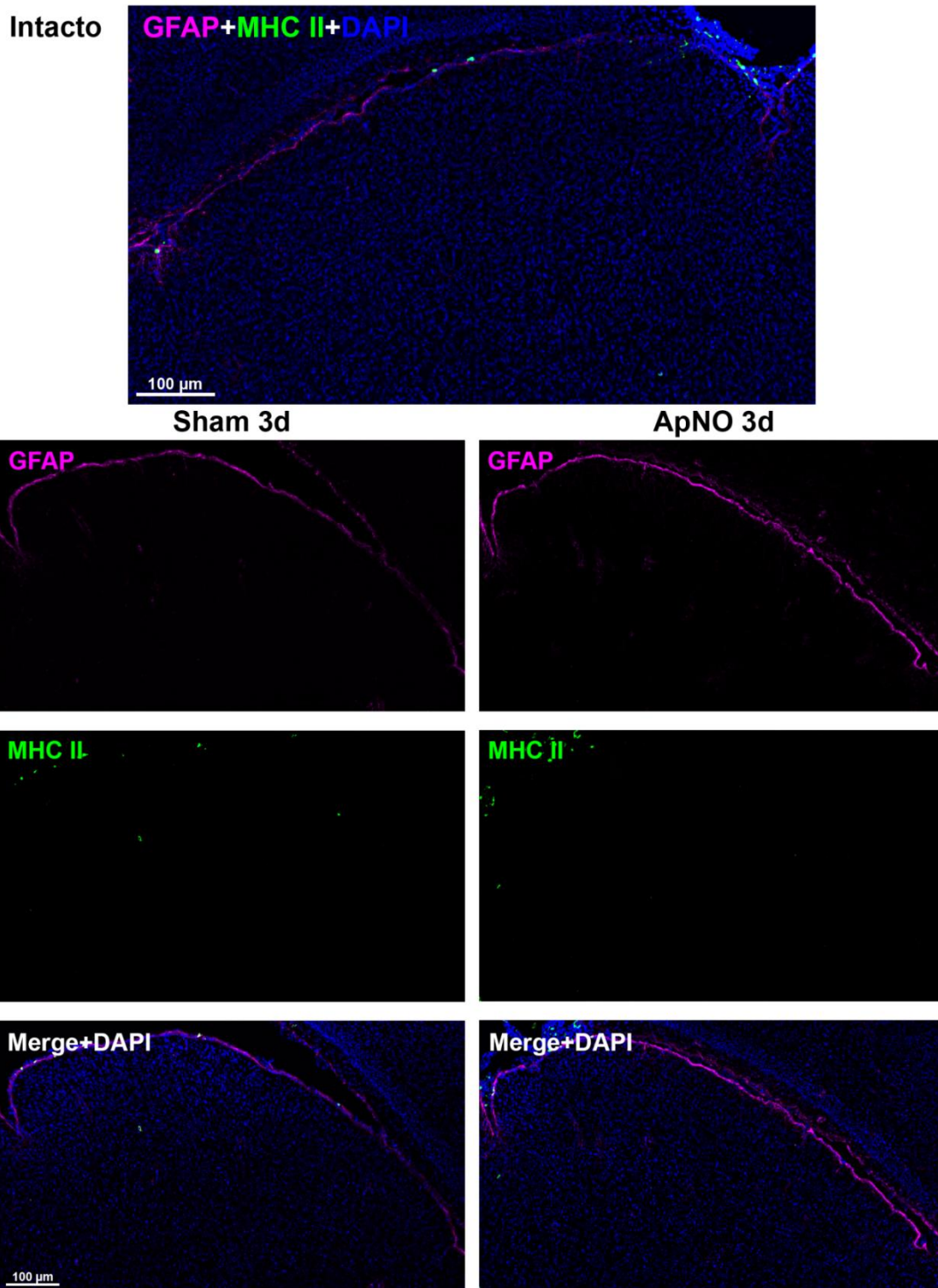
En el CSi, los resultados mostraron que el área ocupada por GFAP también se incrementó en todos los tiempos estudiados tanto en el grupo tras ApNO como en el grupo con cirugía Sham. Como se muestra en la **Tabla 39**, al aumento de área ocupada por GFAP fue siempre mayor en los grupos de ApNO que en los Sham, destacando a los 9 ó 30 días del ApNO.

Estos resultados se confirman en las **Figuras 99, 100 y 101**, en las que se ilustran los cambios observados en el CSi. A diferencia de lo que ocurría en el lado opuesto a la lesión, en esta serie los cambios no son evidentes hasta los 30 días (**Figura 101**), con un engrosamiento en la capa más externa del CSi a expensas de un aumento en la proliferación o en las proyecciones astrocitarias que motivan el aumento del área GFAP<sup>+</sup>.

De forma similar a lo que ocurre en el CSc, en el CSi comienzan a aparecer células de aspecto ameboide MHC II<sup>+</sup> en el parénquima del CS a los 9 ó 30 días (**Figuras 96 y 97**).

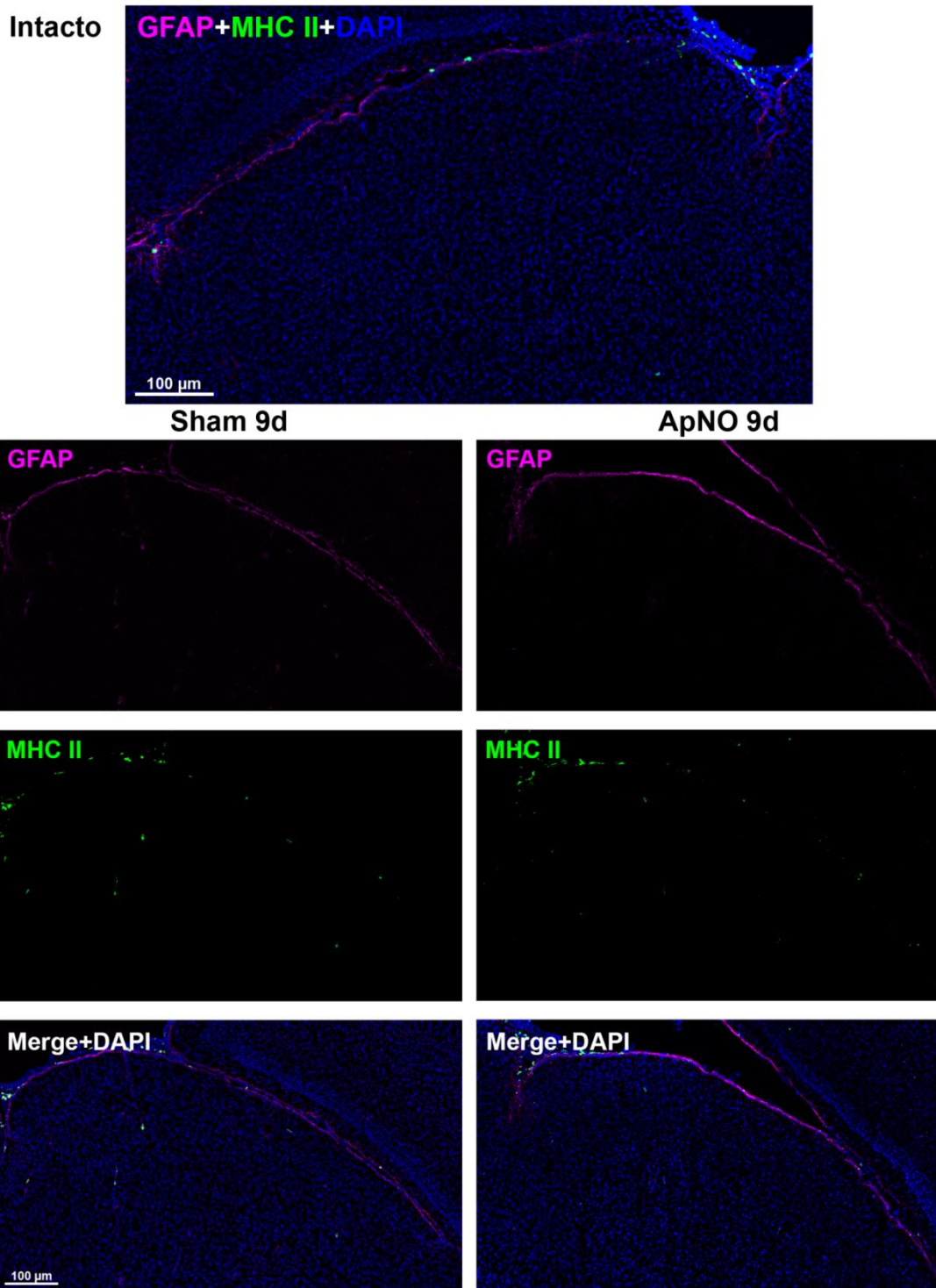
Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
<b>1</b>	1.3	1.6	1.1	1.3	1.3	2.2
<b>2</b>	1.3	1.1	1.1	1.4	1.5	2.2
<b>3</b>	1.1	1.2	0.8	2.0	1.2	3.3
<b>Media</b>	1.2	1.3	1.0	1.6	1.3	2.6
<b>DEM</b>	0.1	0.3	0.2	0.4	0.1	0.6

**Tabla 39.** Área ± DEM (desviación estándar de la media) ocupada por GFAP en el CS ipsilateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto (considerado como 1).

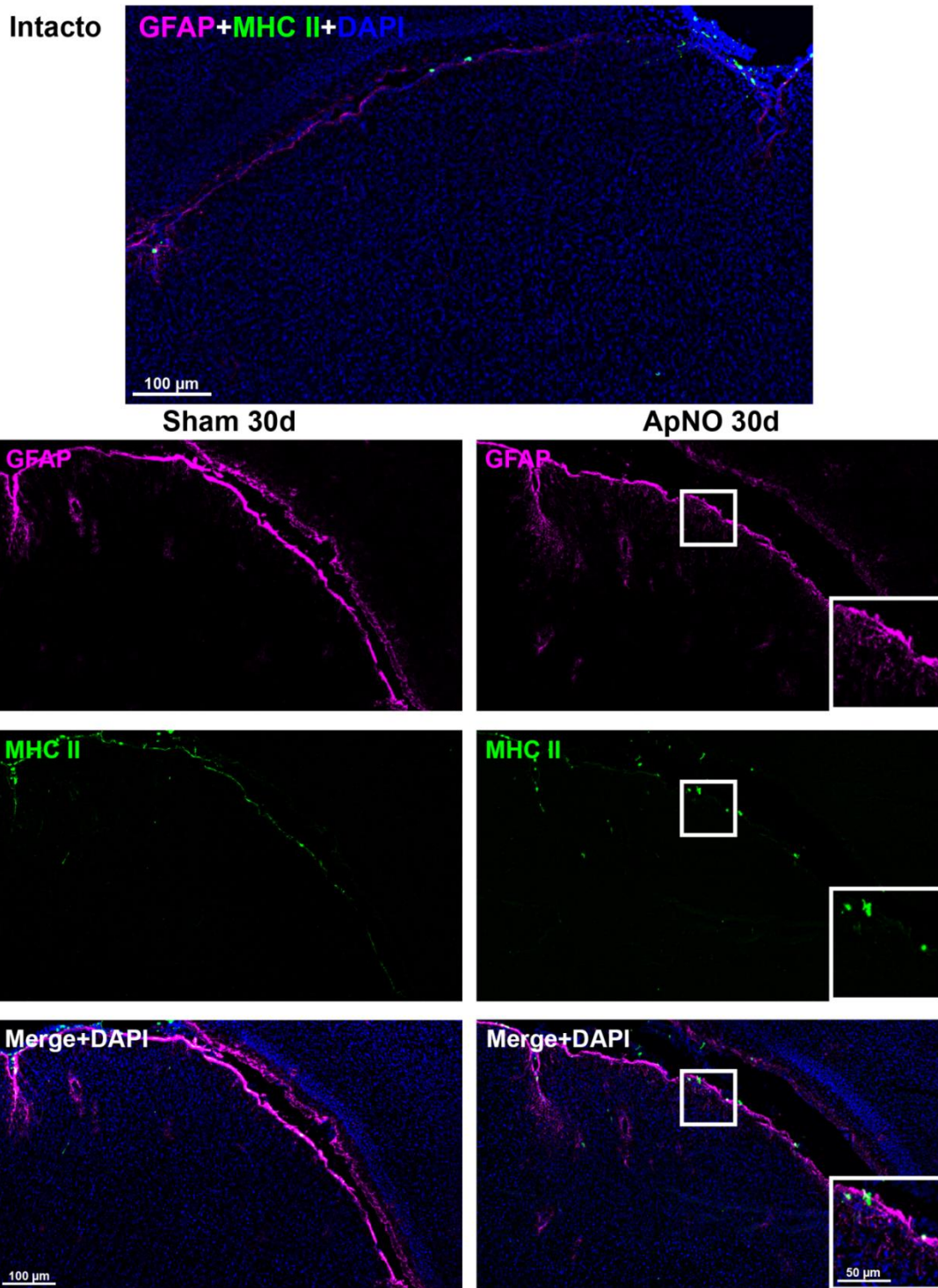


**Figura 99.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.





**Figura 100.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMA inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.



**Figura 101.** Secciones sagitales de un CS intacto y de CS ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el CS intacto y en la parte inferior de los CS experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas. **Magnificación:** Células con aspecto ameboide MHC II<sup>+</sup> insertas en la piamadre de la superficie del CS.

**4.2.2.1.4 Respuesta macroglial relativa en el CS tras la cirugía Sham o ApNO en comparación con el CS intacto**

En el **CSc** al ApNO, se encontró un aumento estadísticamente significativo del porcentaje del área ocupada por GFAP relativo al intacto en todos los tiempos estudiados tanto en los animales Sham (excepto en el grupo de 3 días) (**Figura 102-A**) como en el ApNO (**Figuras 102-B**) (**Tabla 40**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
<b>1</b>	160	164	128	143	173	297
<b>2</b>	101	126	109	122	299	297
<b>3</b>	65	125	146	190	191	349
<b>Media</b>	109	138*	127*	152*	221*	314*
<b>DEM</b>	48	22	18	35	68	30

**Tabla 40.** Porcentaje de área ocupada por GFAP en el CS contralateral en relación al colículo superior intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.

\* diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

De forma similar, en el **CSi** se produjo un incremento significativo del porcentaje de área ocupada por GFAP en todos los tiempos estudiados, tanto en los animales Sham (excepto en el grupo de 9 días) (**Figura 102-A**) como en los sometidos a ApNO (**Figura 102-B**). A los 30 días, los CSi y CSc al ApNO llegaron a un aumento del  $264 \pm 65 \%$  y  $314 \pm 30\%$ , respectivamente (**Tabla 40 y 41**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
<b>1</b>	134	170	117	136	137	226
<b>2</b>	137	118	111	144	152	226
<b>3</b>	112	125	84	207	127	339
<b>Media</b>	128*	138*	104	162*	139*	264*
<b>DEM</b>	14	29	17	39	13	65

**Tabla 41. Porcentaje de área ocupada por GFAP en el CS ipsilateral en relación al colículo superior intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión.**

\* diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

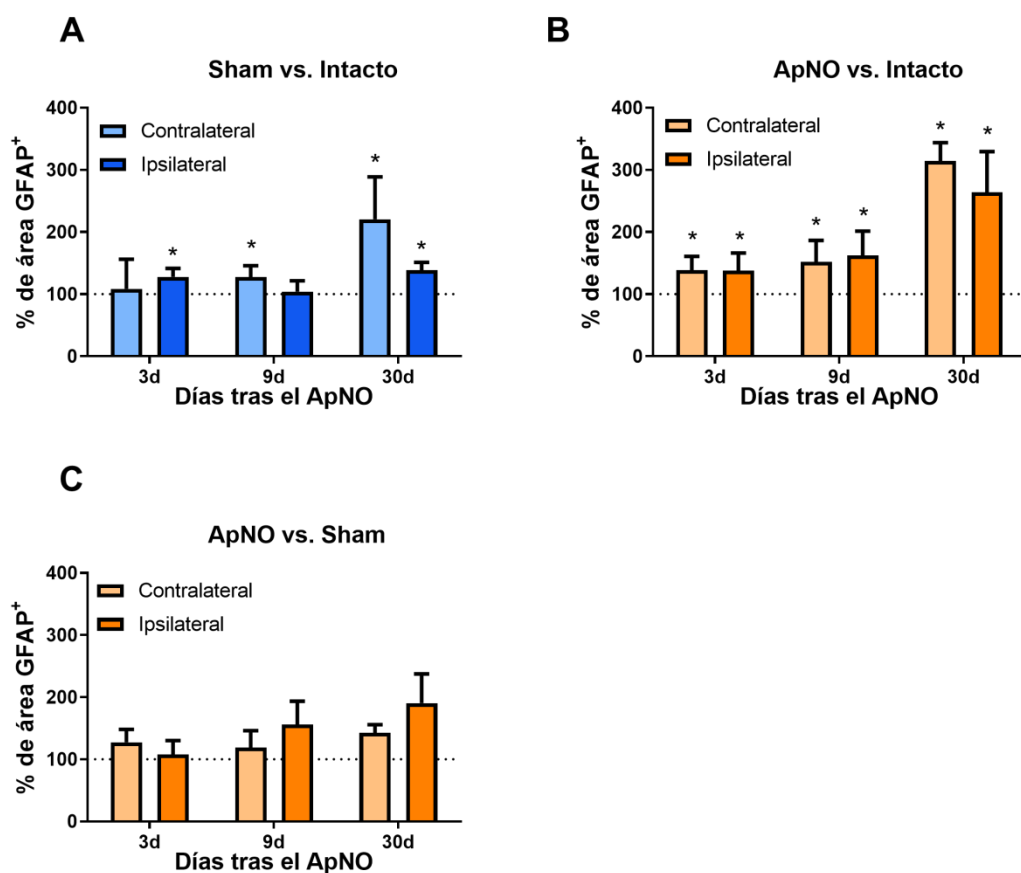
#### 4.2.2.1.5 Respuesta macroglial en el CS tras el ApNO relativa al grupo Sham.

Con la reactividad macroglial demostrada en la cirugía Sham y con el objetivo de aislar exclusivamente la respuesta de CMa GFAP<sup>+</sup>, se analizó la variación del porcentaje de área ocupada por GFAP en relación a sus respectivos animales Sham (considerados como el 100%) en ambos hemisferios cerebrales.

Tanto en el CSc como CSi, se observa una tendencia de aumento gradual y progresivo de área ocupada por GFAP, que se aprecia fundamentalmente en los animales con ApNO (Figura 103). Este aumento es mayor en el CSi que en el contralateral. No obstante, en ningún tiempo se alcanza la significación estadística respecto al Sham, entre los tiempos estudiados ni entre ambos hemisferios (Tabla 42) (Figura 102-C).

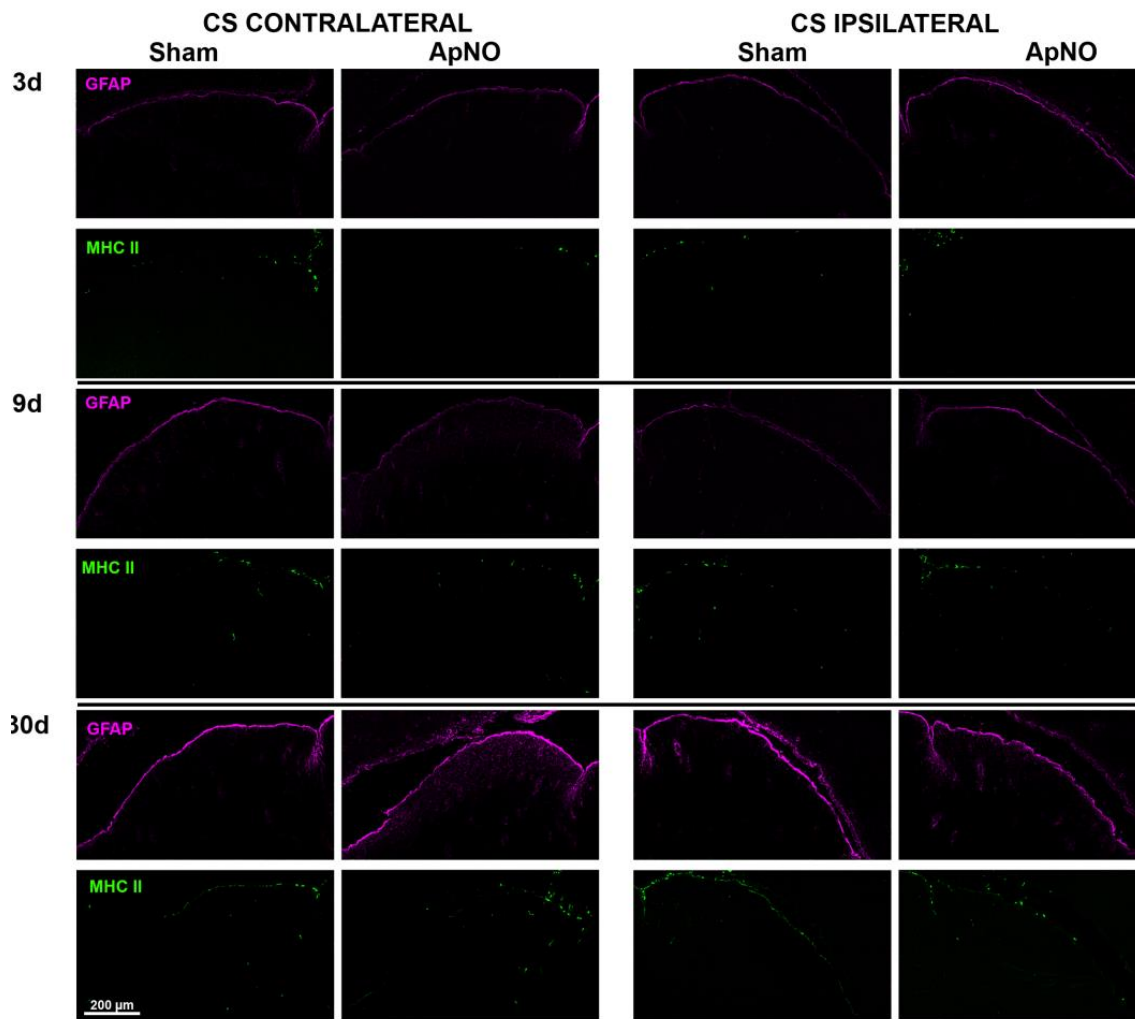
	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
Ratón	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
1	151	133	112	130	135	163
2	116	92	96	138	135	163
3	115	98	149	199	158	245
<b>Media</b>	127	108	119	156	142	190
<b>DEM</b>	21	22	27	38	14	47

**Tabla 42. Variación relativa del área ocupada por GFAP del CS en relación al CS Sham ipsilateral o contralateral (considerados como el 100 %). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.**



**Figura 102.** Porcentaje de área ocupada por GFAP en el CS de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO. Gráficos de barras que muestran el porcentaje  $\pm$  DEM de área ocupada por en el grupo Sham (barras azules) y en el grupo ApNO (barras naranjas), con respecto a los ratones intactos (A, B) o Sham (C), considerados como el 100%, a los distintos tiempos de análisis. Las barras en colores claros representan al CS contralateral y las oscuras al ipsilateral. El análisis estadístico ha estudiado las diferencias entre animales Sham o ApNO vs. Intactos y ApNO vs. Sham, así como entre los diferentes tiempos de estudio y entre ambos lados. \*:diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).





**Figura 103.** Figura resumen de la respuesta de las CMa GFAP<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> en el CS contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.

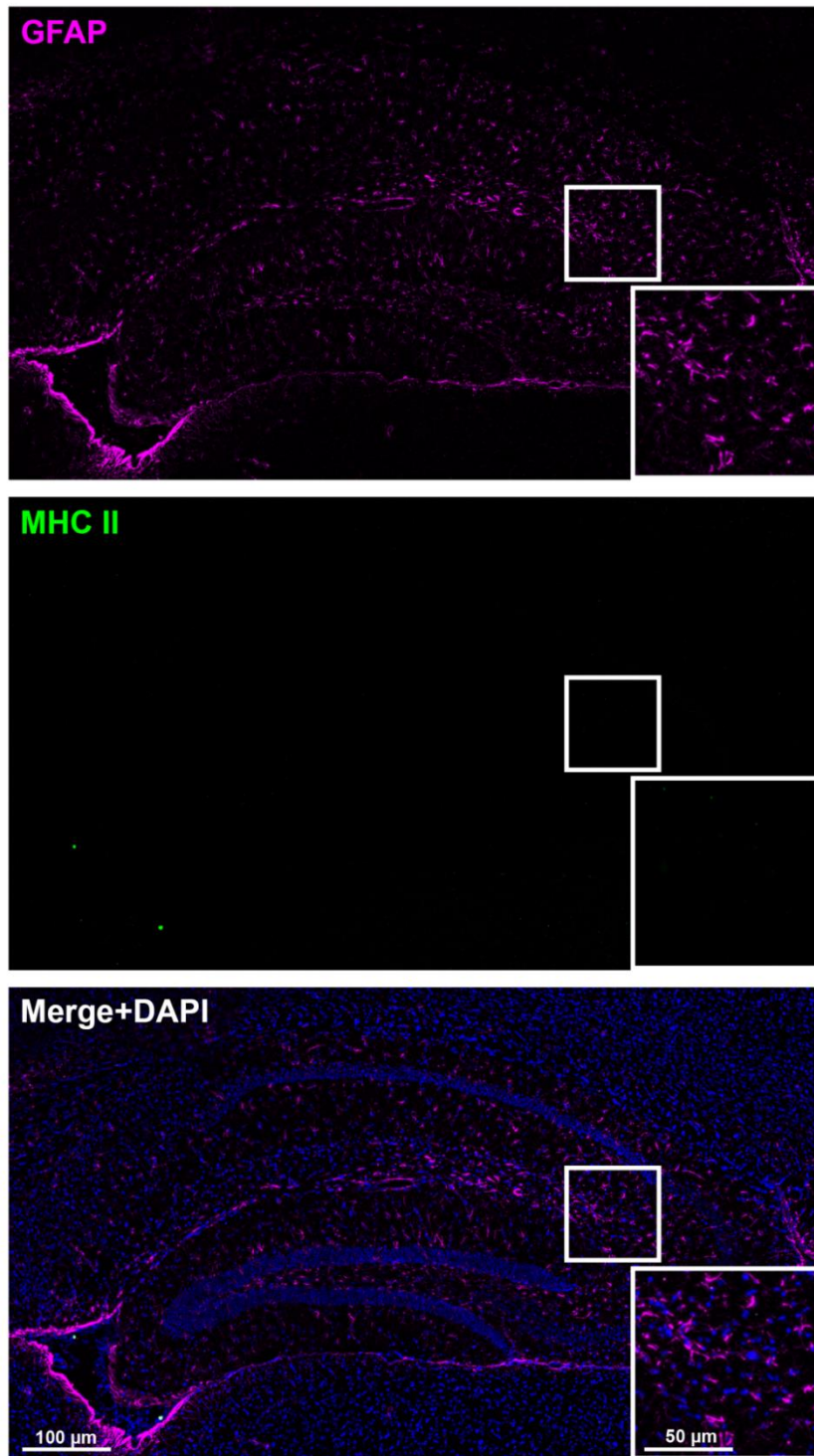
#### 4.2.2.2 Hipocampo

##### 4.2.2.2.1 Caracterización de la activación macroglial en hipocampo en animales intactos

Siguiendo el método expuesto anteriormente, se hizo una media del área ocupada por GFAP en el H derecho e izquierdo y éste valor se consideró como 1.

Como se puede apreciar en la **Figura 104**, los astrocitos se distribuían de forma homogénea por el H. Sin embargo, se puede distinguir la sombra no ocupada por GFAP del giro dentado, constituida por células granulares y, de la misma manera, la huella de las células piramidales en el asta de Amón. Además, la imagen permite mostrar la mayor densidad de células GFAP<sup>+</sup> en la superficie del parénquima en contacto con el líquido cefalorraquídeo de los ventrículos laterales. No se observan astrocitos GFAP<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup>.





**Figura 104.** Inmunodetección de CMa en una sección sagital de hipocampo de un ratón **C57BL/6** intacto. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura), MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge+DAPI). Abajo, a la izquierda, astrocitos GFAP<sup>+</sup> en la superficie de las astas de los ventrículos laterales. **Magnificación:** astrocitos con su aspecto típico estrellado, con intenso marcaje GFAP, sin expresión de MHC II.

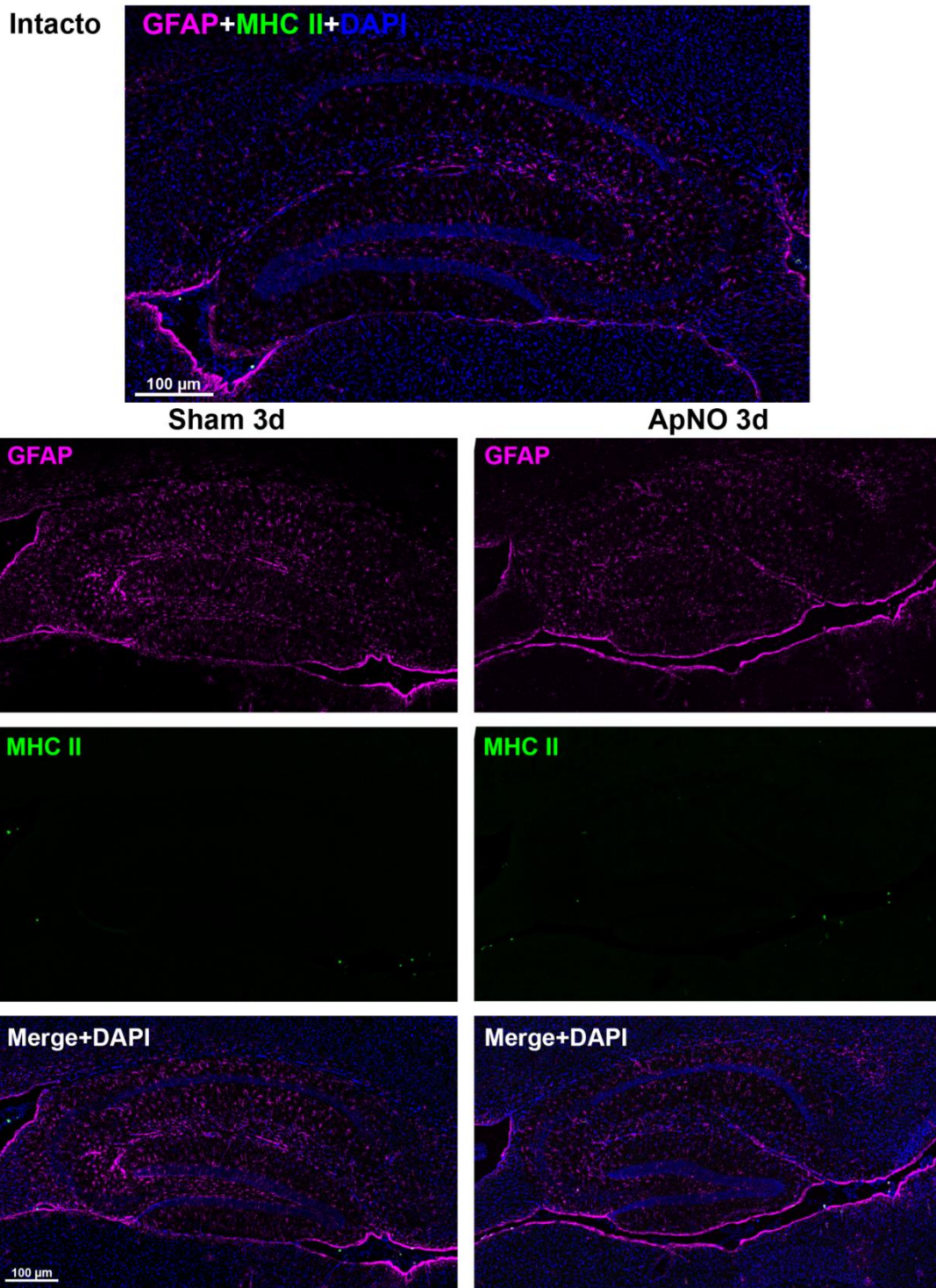
#### 4.2.2.2.2 Caracterización de la respuesta macroglial en el hipocampo contralateral tras ApNO

Como se muestra en la **Tabla 43**, en el Hc, el área ocupada por GFAP se mantiene en valores cercanos a la unidad en todos los tiempos estudiados salvo en el ApNO a los 30 días, donde se puede observar un incremento de  $1,4 \pm 0,4$  veces el área del intacto. Este hallazgo se puede apreciar comparando las **Figuras 105, 106 y 107**; en esta última destaca un aumento del área ocupada por GFAP. En la imagen representativa del grupo ApNO a los 30 días, se pueden visualizar ramificaciones astrocitarias engrosadas en toda la región hipocampal, con menor espacio entre ellas que en los tiempos estudiados previamente, así como un engrosamiento de la señal GFAP<sup>+</sup> en la superficie que contacta con los ventrículos laterales; en cambio, el H de los animales Sham 30 días, permaneció con un aspecto más similar al del animal intacto.

En cuanto a la expresión o número de células MHC II<sup>+</sup> en la cirugía Sham o ApNO, sólo se visualizaron esporádicamente en relación con los plexos coroideos o bajo el epéndimo de los ventrículos laterales, sin colocalización con GFAP. No se observaron células MHC II<sup>+</sup> dentro del parénquima cerebral.

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	1.2	1.2	1.3	0.4	1.1	0.9
2	1.1	1.0	0.5	0.4	1.4	1.5
3	0.9	1.4	0.4	1.9	0.9	1.6
<b>Media</b>	1.1	1.2	0.8	0.9	1.1	1.4
<b>DEM</b>	0.1	0.2	0.5	0.9	0.2	0.4

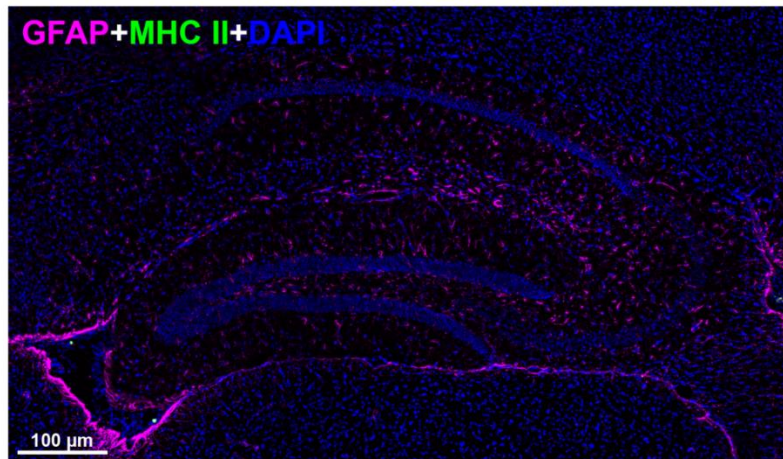
**Tabla 43.** Área  $\pm$  DEM (desviación estándar de la media) ocupada por GFAP<sup>+</sup> en el hipocampo contralateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto (considerado como 1).



**Figura 105.** Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.

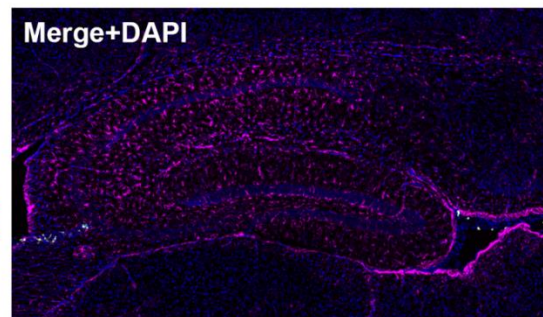
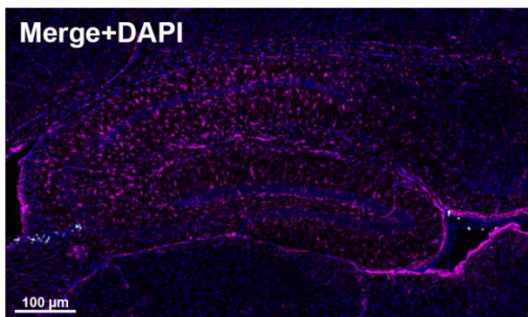
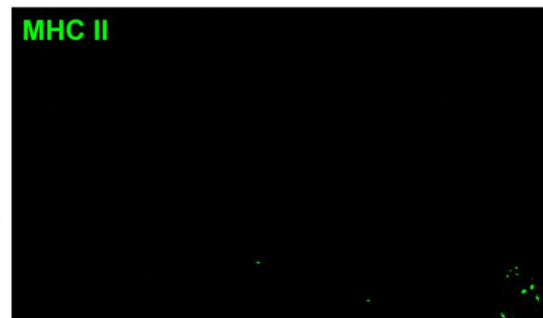
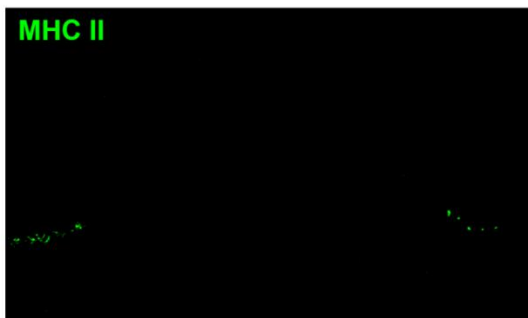
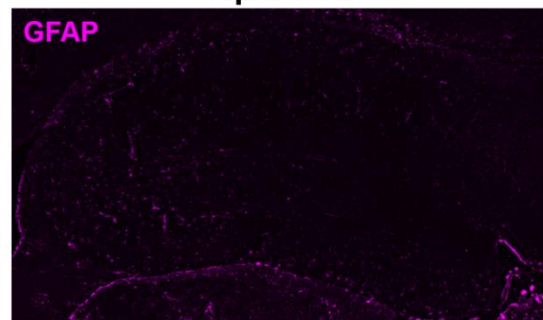
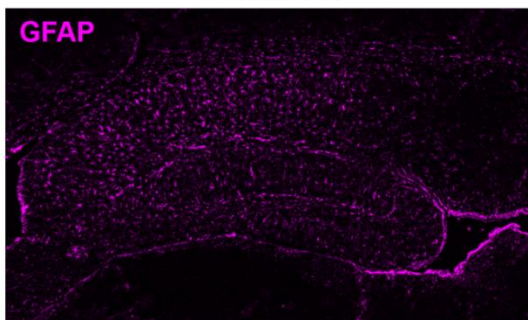


Intacto

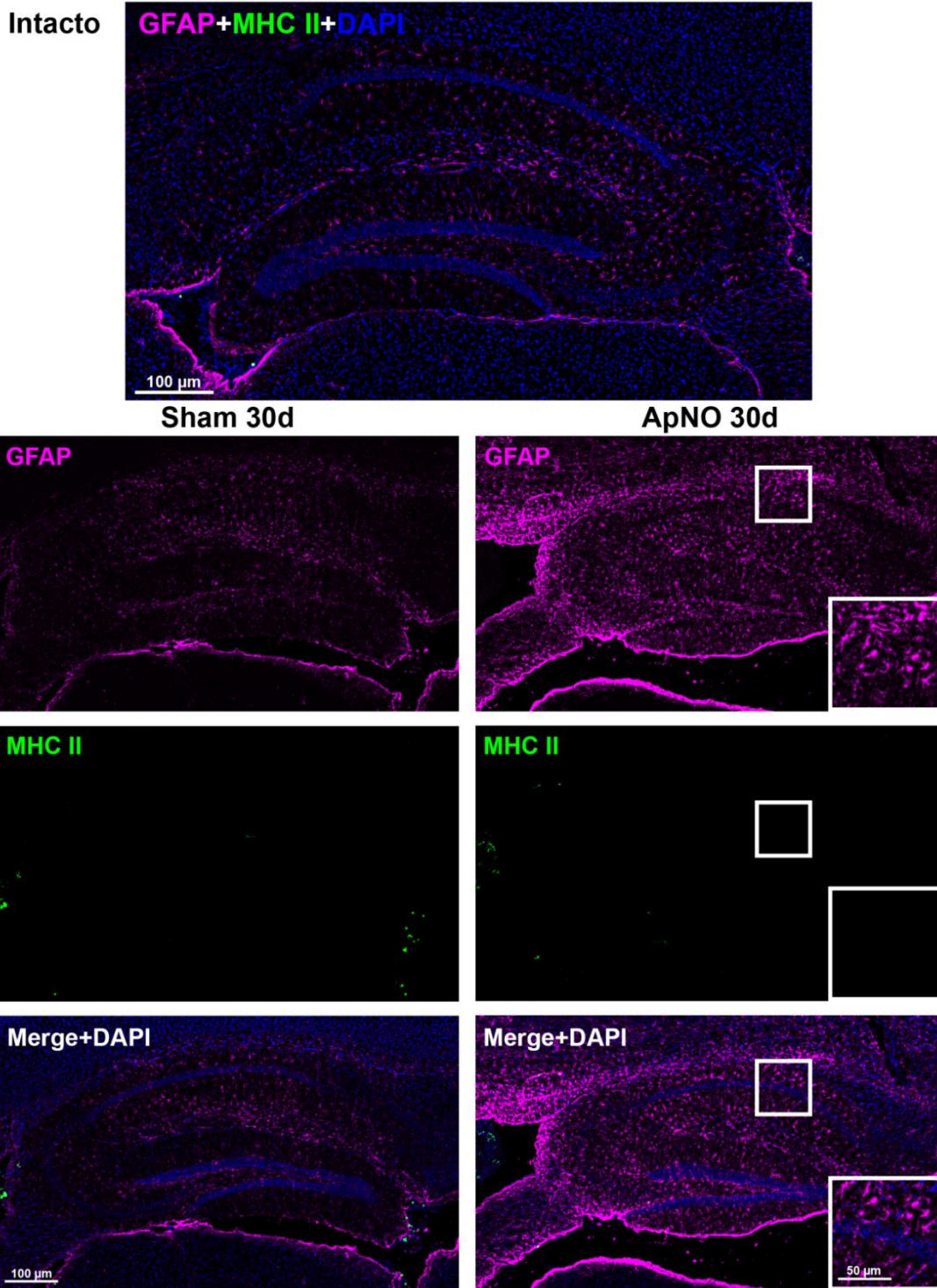


Sham 9d

ApNO 9d



**Figura 106.** Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.



**Figura 107.** Secciones sagitales de un H intacto y de H contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMA inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas. **Magnificación:** Área CA1 en la que se muestran astrocitos GFAP<sup>+</sup>/MHC II<sup>-</sup> con somas hipertróficos y aspecto estrellado.

#### 4.2.2.2.3 Caracterización de la respuesta macroglial en el hipocampo ipsilateral tras ApNO

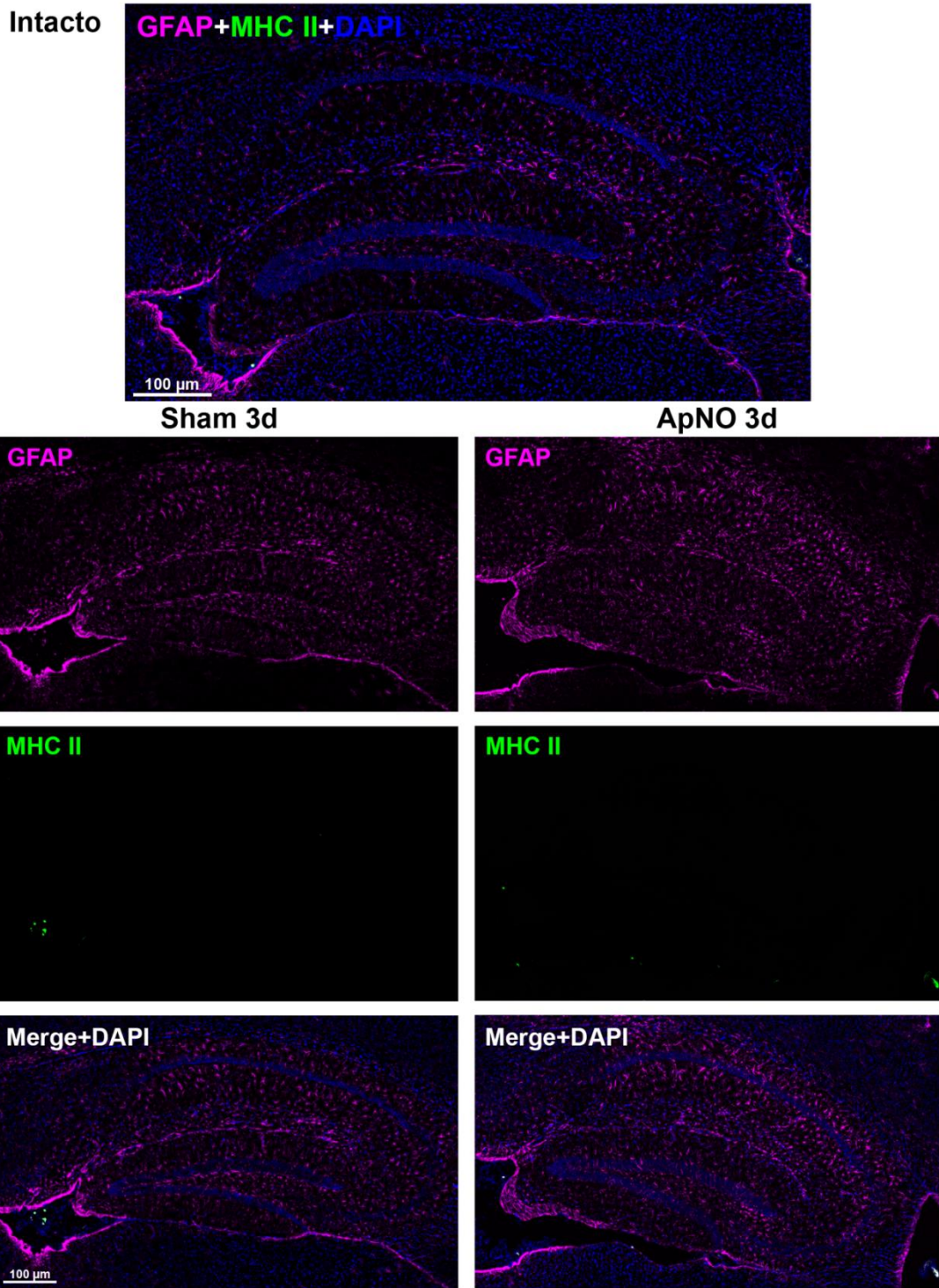
Como se muestra en la **Tabla 44**, en el Hi, de forma similar a lo expuesto en el lado opuesto a la lesión, el área ocupada por GFAP en el ApNO a los 30 días experimenta un incremento importante, llegando a un valor más alto que en el Hc ( $1,7 \pm 0,4$  veces el área ocupada por GFAP del intacto). Curiosamente, en el grupo del ApNO a los 9 días, se observó una reducción del área ocupada por GFAP a  $0,6 \pm 0,3$ . En el resto de tiempos y condiciones estudiadas, el área ocupada por GFAP se mantuvo en valores similares al valor de referencia del intacto.

En las **Figuras 108, 109 y 110** se ilustran los cambios observados en el Hi. Tampoco se observa un incremento de células ameboides MHC II<sup>+</sup> en la superficie endimaria o dentro del área hipocampal a los tiempos estudiados en cirugías Sham o ApNO.

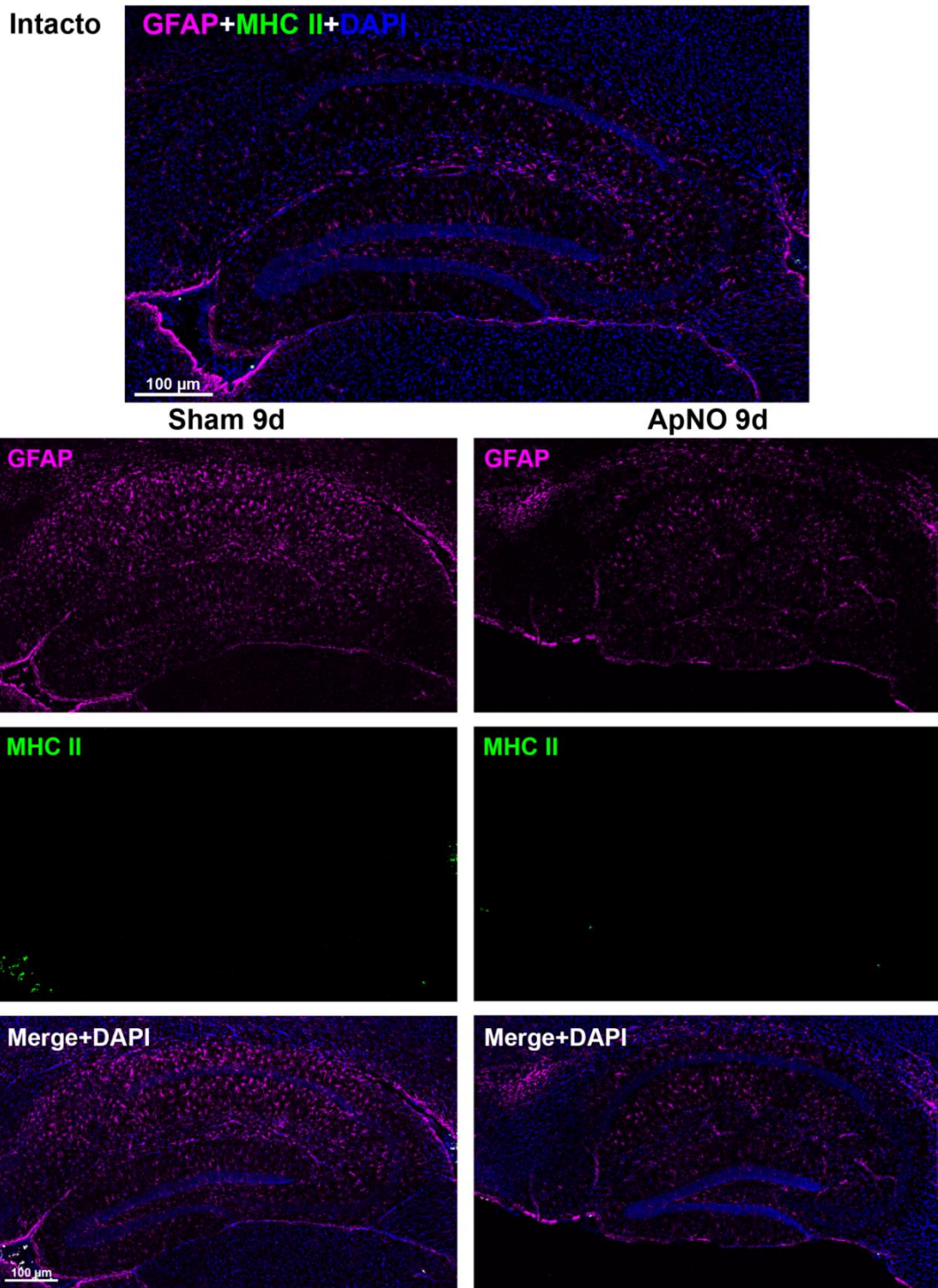
Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	0.7	0.7	1.9	0.3	0.5	1.7
2	1.0	1.0	0.8	0.7	0.9	1.1
3	0.8	1.4	0.7	0.9	1.2	2.2
<b>Media</b>	0.9	1.0	1.2	0.6	0.9	1.7
<b>DEM</b>	0.1	0.4	0.7	0.3	0.3	0.6

**Tabla 44.** Área  $\pm$  DEM (desviación estándar de la media) ocupada por GFAP en el hipocampo ipsilateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto (considerado como 1).



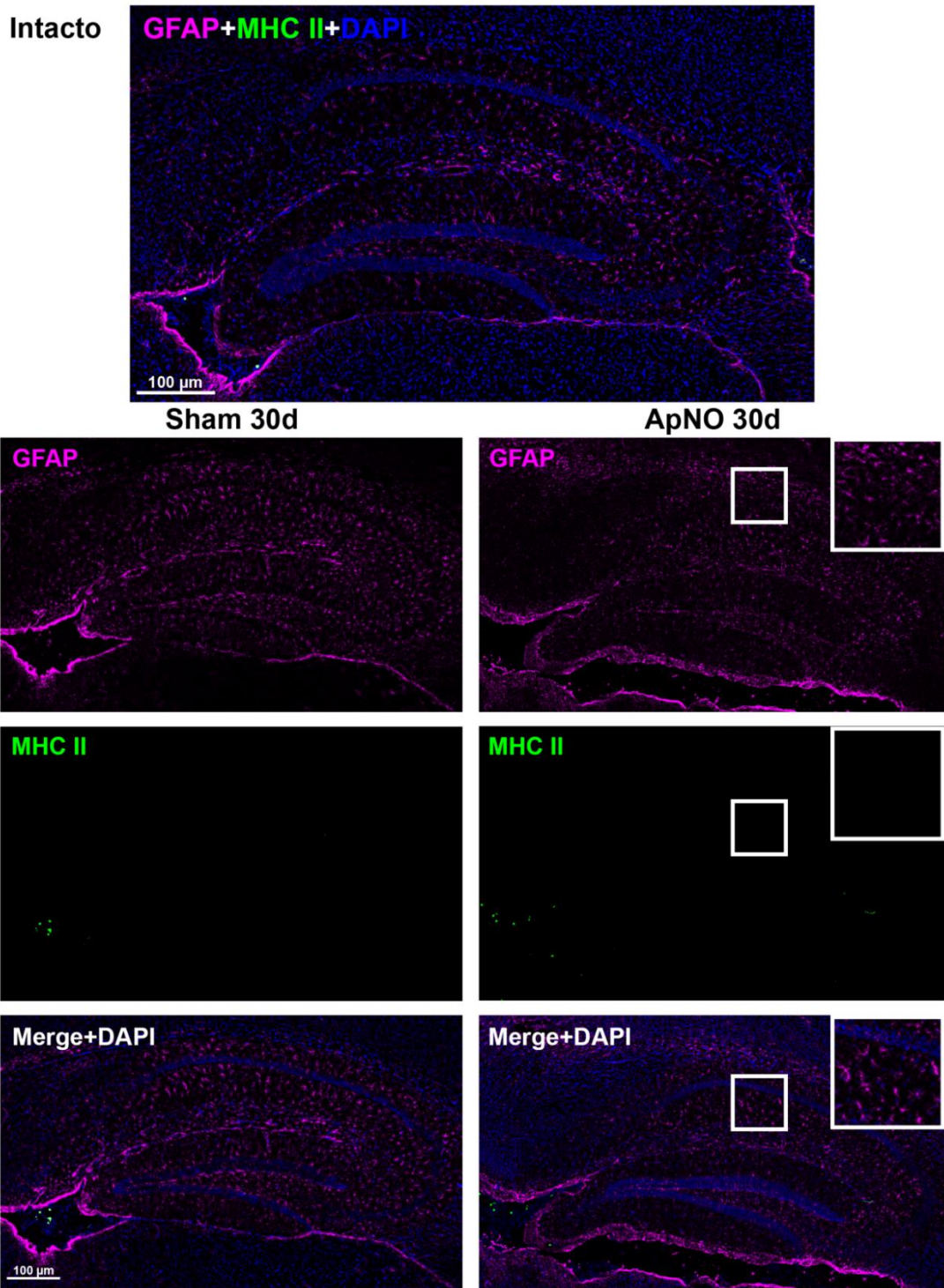


**Figura 108.** Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.



**Figura 109.** Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas.





**Figura 110.** Secciones sagitales de un H intacto y de H ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMA inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde). En el H intacto y en la parte inferior de los H experimentales se expone la imagen de ambas señales y DAPI superpuestas. **Magnificación:** Área CA1 en la que se muestran astrocitos GFAP<sup>+</sup>/MHC II<sup>-</sup> con somas hipertróficos y aspecto estrellado.

**4.2.2.2.4 Respuesta macroglial relativa en el hipocampo tras la cirugía Sham o ApNO en comparación con el hipocampo intacto**

El **Hc** a la cirugía no presentó cambios estadísticamente significativos en el área ocupada por GFAP en los animales Sham (**Figura 111-A**) ni ApNO (**Figura 111-B**), aunque el grupo 30 días con ApNO mostraron un incremento del  $131\% \pm 36$  respecto al intacto (**Tabla 45**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	116	114	125	34	111	90
2	108	93	52	40	132	145
3	90	135	43	184	87	159
<b>Media</b>	105	114	73	86	110	131
<b>DEM</b>	13	21	45	85	23	36

**Tabla 45.** Porcentaje de área ocupada por GFAP en el hipocampo contralateral en relación al hipocampo intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En el análisis para comparar la respuesta relativa de las CMA GFAP<sup>+</sup> en el **Hi** en relación al hipocampo intacto, se comprobó que los animales Sham tampoco presentaron un cambio en relación al intacto (**Figura 111-A**) (**Tabla 46**). En cambio, los animales sometidos a ApNO a los 30 días, presentaron un incremento estadísticamente significativo del área ocupada por GFAP (**Figura 111-B**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	72	65	187	30	48	166
2	97	100	81	66	90	102
3	80	139	67	89	112	215
<b>Media</b>	83	101	112	62*	83	161*
<b>DEM</b>	13	37	65	30	32	56

**Tabla 46.** Porcentaje de área ocupada por GFAP en el hipocampo ipsilateral en relación al hipocampo intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. \* diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).

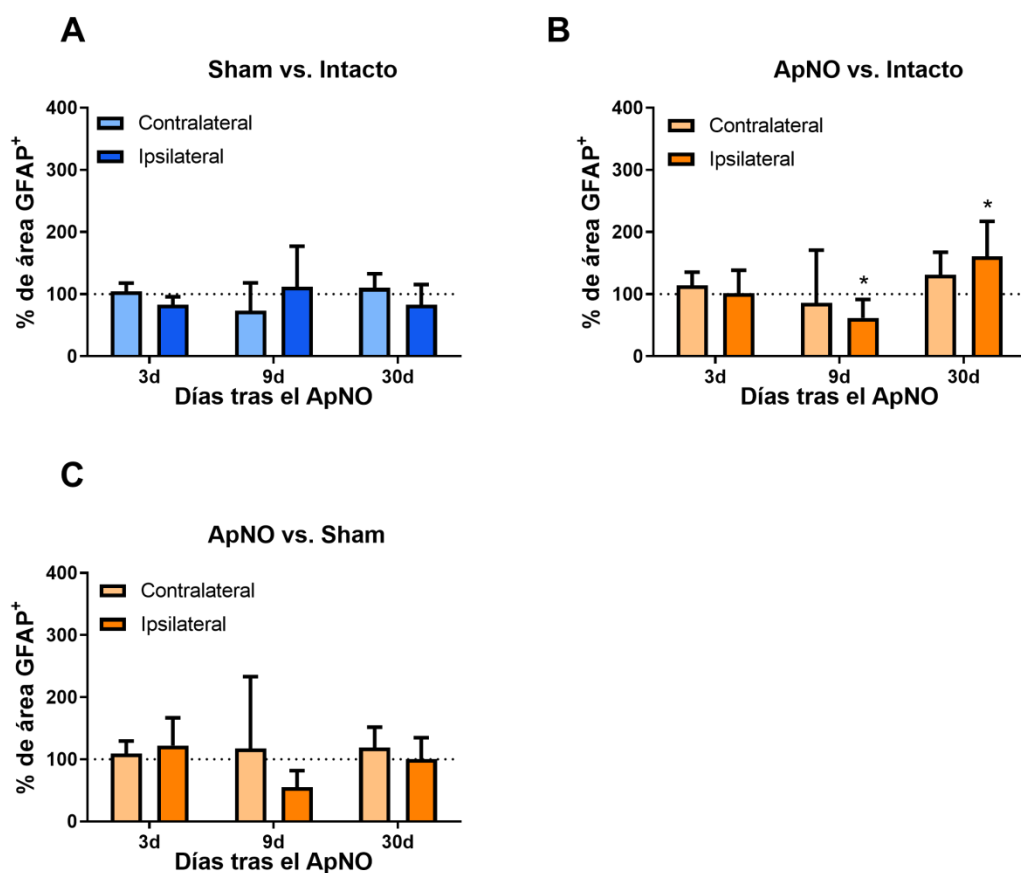
#### 4.2.2.2.5 Respuesta macroglial en el hipocampo tras el ApNO relativa al grupo Sham

Comparando los animales de cada grupo de ApNO con sus respectivos Sham (considerados en este caso como el 100%), no se encontraron diferencias significativas respecto a su correspondiente Sham, entre los tiempos estudiados ni entre ambos hemisferios (**Tabla 47**) (**Figura 111-C**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
1	109	78	46	27	82	103
2	89	121	55	59	131	64
3	129	168	251	80	144	133
<b>Media</b>	109	122	117	55	119	100
<b>DEM</b>	20	45	116	27	33	35

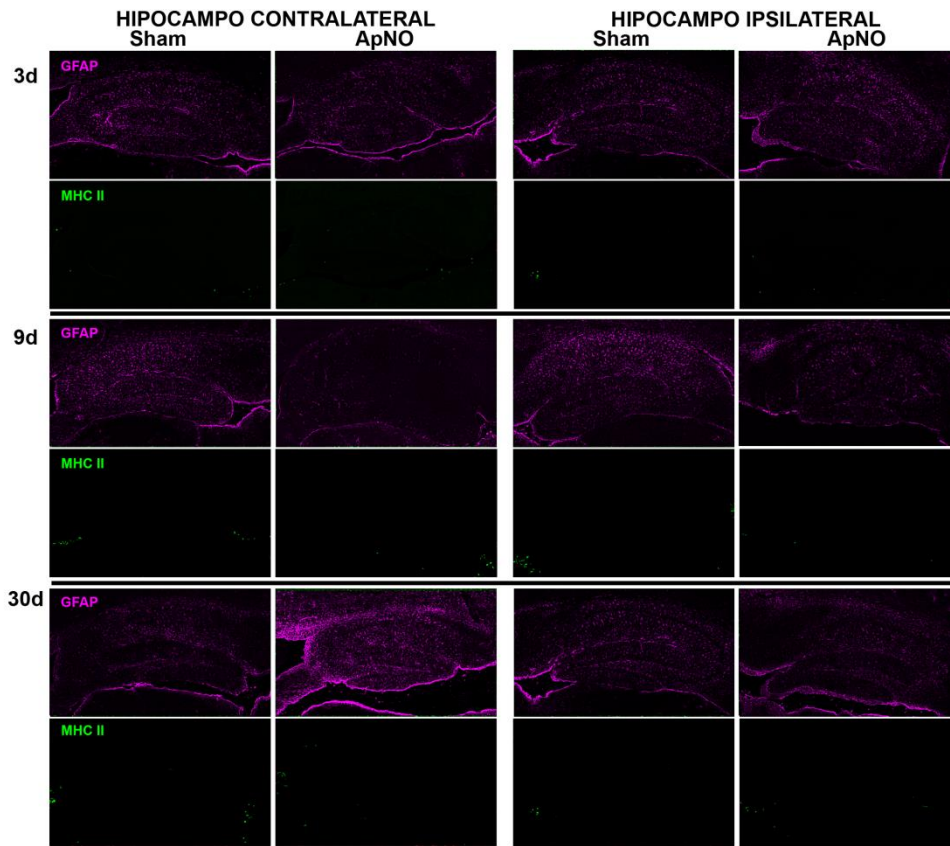
**Tabla 47.** Variación relativa del área ocupada por GFAP del hipocampo en relación al hipocampo Sham ipsilateral o contralateral (considerados como el 100%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La **Figura 112** permite visualizar a lo largo de los 3 tiempos estudiados que el aspecto de los hipocampos ipsi- y contralaterales al ApNO no presentaron diferencias muy notables respecto a sus Sham. A tener en cuenta, que las imágenes pertenecen a diferentes tandas de inmunohistofluorescencia, por lo que las condiciones experimentales pueden influir en la tinción. Por ello, para el análisis, siempre se tuvo en cuenta el área ocupada por GFAP en un hipocampo intacto de cada tinción como se expuso en el **Apartado 3.5.8.2. Análisis del estudio histológico de la macroglía**.



**Figura 111. Porcentaje de área ocupada por GFAP en el hipocampo de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO.** Gráficos de barras que muestran el porcentaje  $\pm$  DEM de área ocupada por GFAP en el grupo Sham (barras azules) y en el grupo ApNO (barras naranjas), con respecto a los ratones intactos (A,B) o Sham (C), considerados como el 100%, a los distintos tiempos de análisis. Las barras en colores claros representan al hipocampo contralateral y las oscuras al ipsilateral. El análisis estadístico ha estudiado las diferencias entre animales Sham o ApNO vs. Intactos y ApNO vs. Sham, así como entre los diferentes tiempos de estudio y entre ambos lados. \*:diferencia estadísticamente significativa en comparación con animales intactos (Test de Mann Whitney  $p < 0,05$ ).



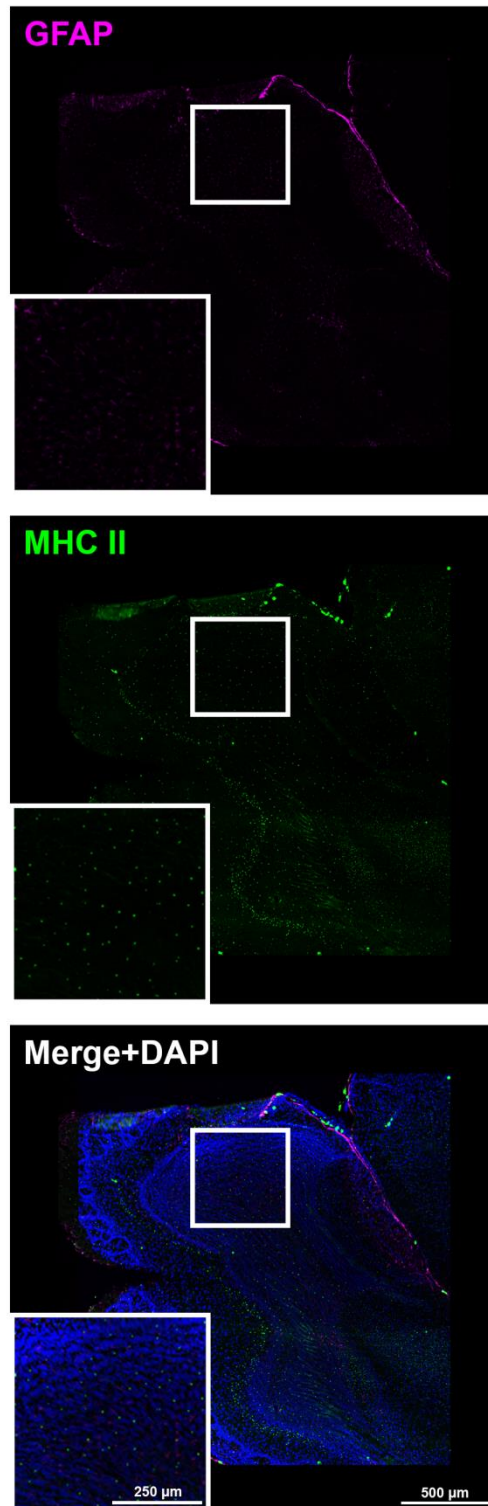


**Figura 112.** Figura resumen de la respuesta de las CMa GFAP<sup>+</sup> MHC II<sup>-</sup> en el hipocampo contra- e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.

### 4.2.2.3 Bulbo olfatorio

#### 4.2.2.3.1 Caracterización de la activación macroglial del BO en animales intactos

En la **Figura 113**, se muestra un corte sagital representativo del BO de un animal intacto. El área ocupada por GFAP en el BO del animal intacto se consideró como 1. Como se puede observar, los astrocitos que ocupan toda la capa granular presentan pequeño tamaño, morfología típica y una expresión tenue de GFAP. Al contrario de lo que hemos expuesto hasta ahora en el CS y en H, hay un marcaje puntiforme de MHC<sup>+</sup> en la capa granular.



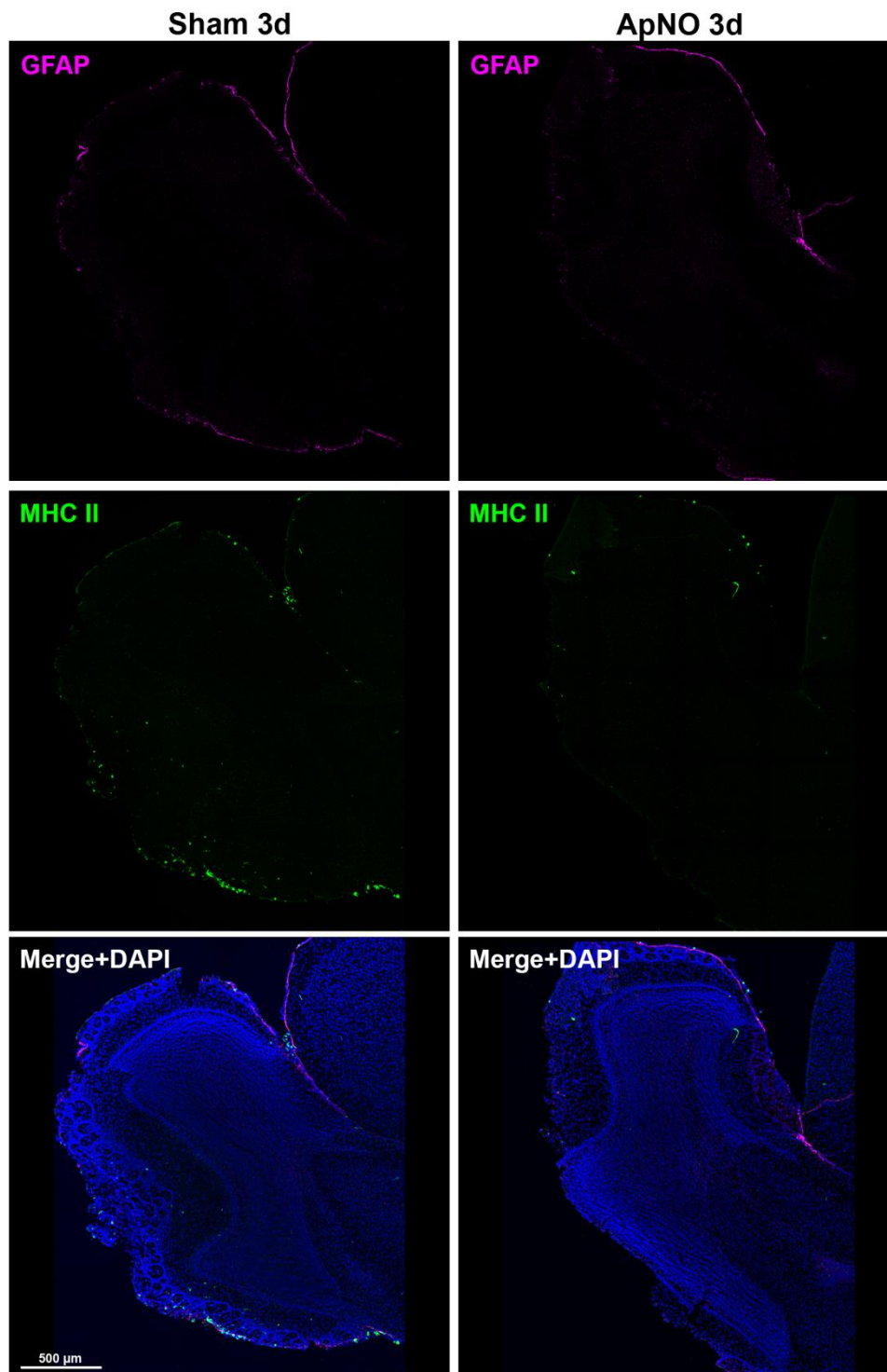
**Figura 113.** Inmunodetección de CMA en una sección sagital de bulbo olfatorio de un ratón C57BL/6 intacto. Se muestran las CMA inmunodetectadas con GFAP (púrpura), MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge + DAPI). **Magnificación:** capa de células granulares, células pequeñas sin axón, que actúan como interneuronas; astrocitos pequeños GFAP<sup>+</sup>, y expresión débil de MHC II.

#### 4.2.2.3.2 Caracterización de la respuesta macroglial en el BO contralateral tras ApNO

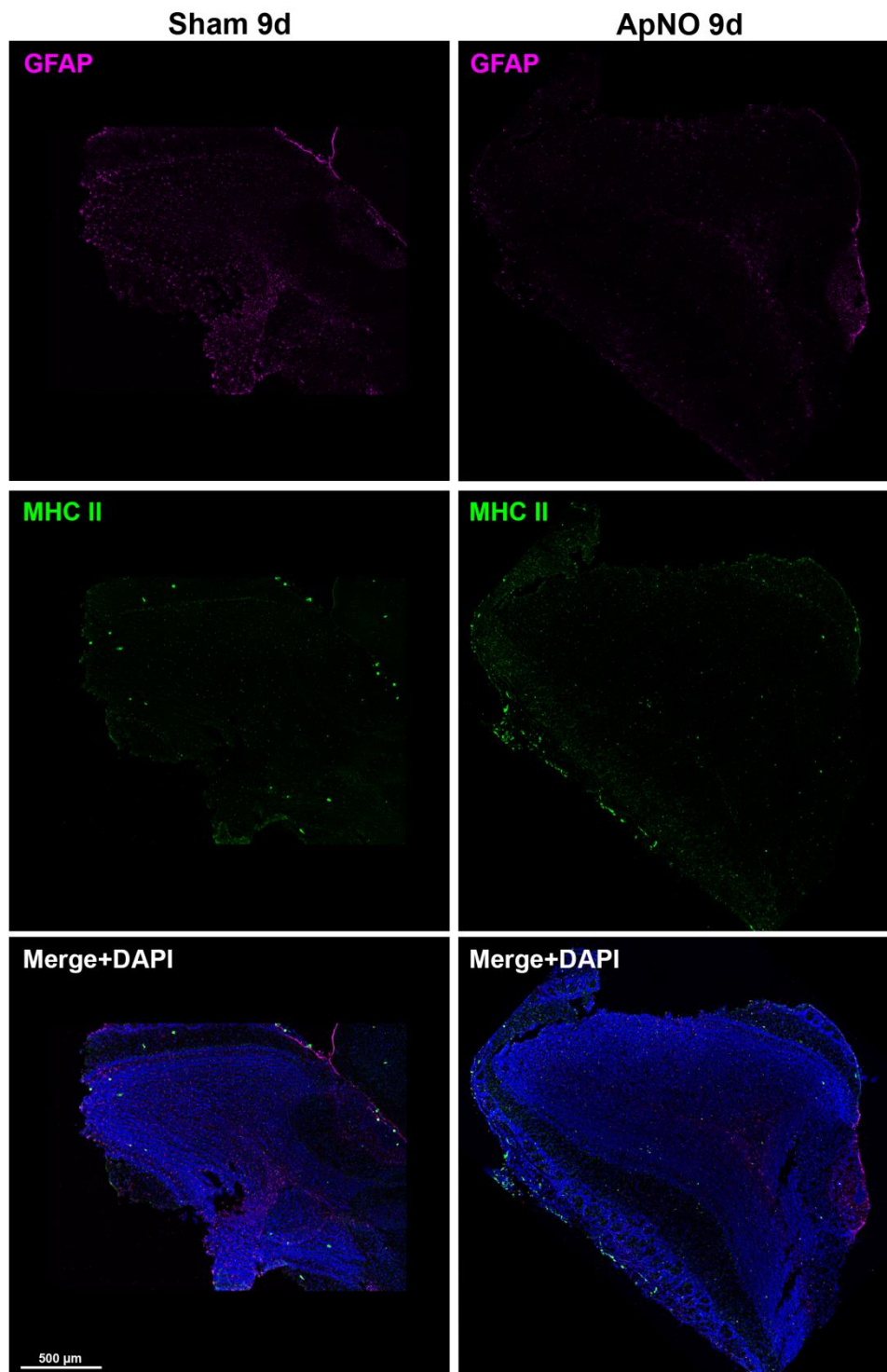
Como se muestra en la **Tabla 48**, el área ocupada por GFAP en la capa de células granulares del BOc se mantuvo estable en todos los tiempos estudiados en los grupos experimentales, Sham y ApNO, excepto el grupo Sham a los 9 días donde se produjo un incremento cuantitativo de hasta  $2,8 \pm 0,1$ . No obstante, en análisis cualitativo de imagen no se observaron cambios reseñables en la expresión de GFAP<sup>+</sup> (**Figuras 114, 115, 116**). En cambio, en el estudio de la expresión de MHC II, a los 9 ó 30 días (**Figuras 115 y 116**), fueron más frecuentes las células con morfología ameboide GFAP<sup>+</sup>/MHC II<sup>+</sup> insertas en las capas más externas del BO.

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	0.6	0.5	0.87	0.3	1.3	1.3
2	0.6	1.7	0.9	0.3	0.9	0.5
3	1.0	0.9	0.71	2.0	0.8	1.7
<b>Media</b>	0.7	1.0	0.83	0.8	1.0	1.1
<b>DEM</b>	0.2	0.6	0.1	1.0	0.2	0.6

**Tabla 48.** Área  $\pm$  DEM (desviación estándar de la media) ocupada por GFAP<sup>+</sup> en el BO contralateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto (considerado como 1).

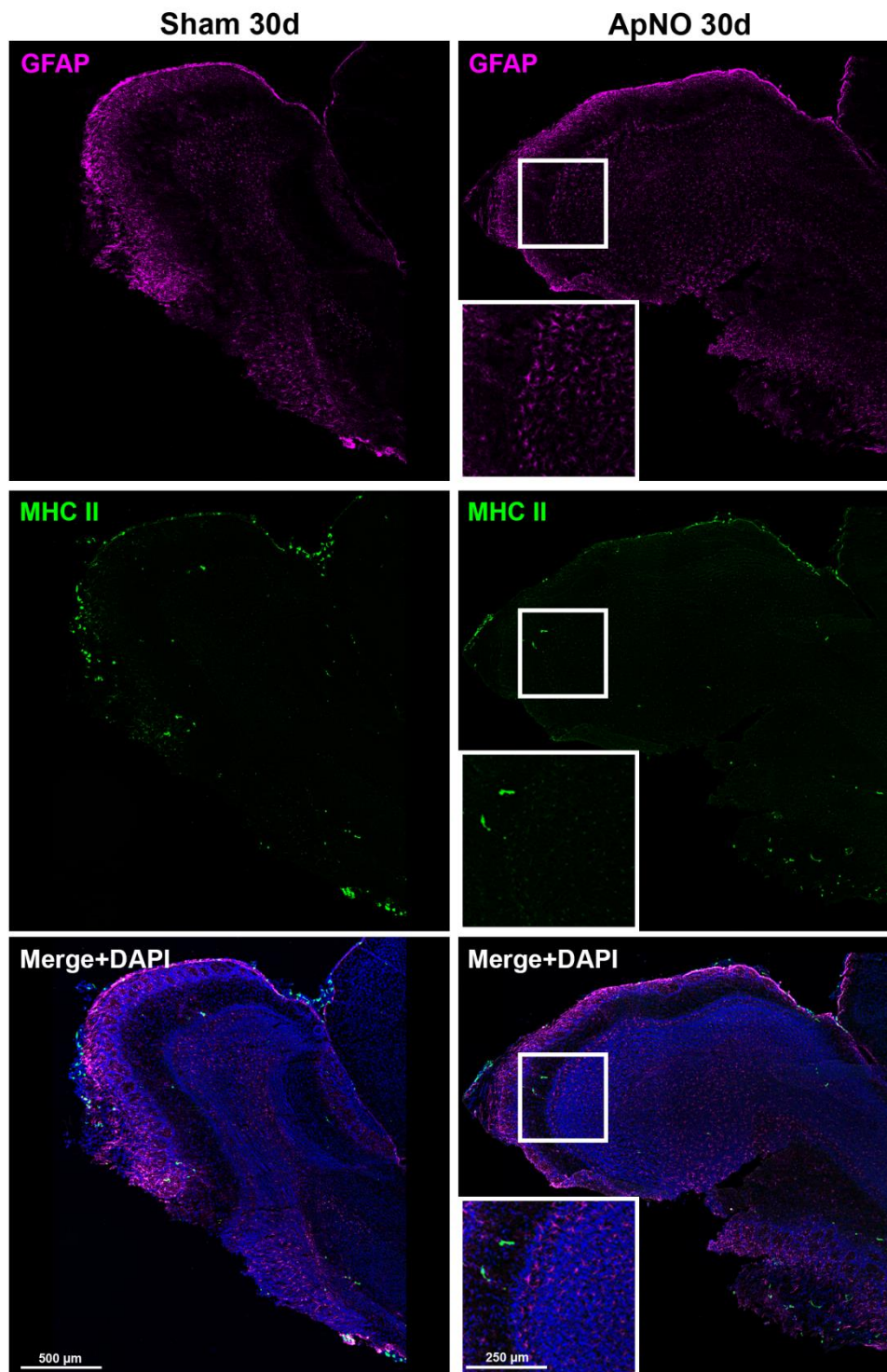


**Figura 114.** Secciones sagitales de BO contralaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge + DAPI).



**Figura 115.** Secciones sagitales de BO contralaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge + DAPI).





**Figura 116.** Secciones sagitales de BO contralaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge + DAPI).



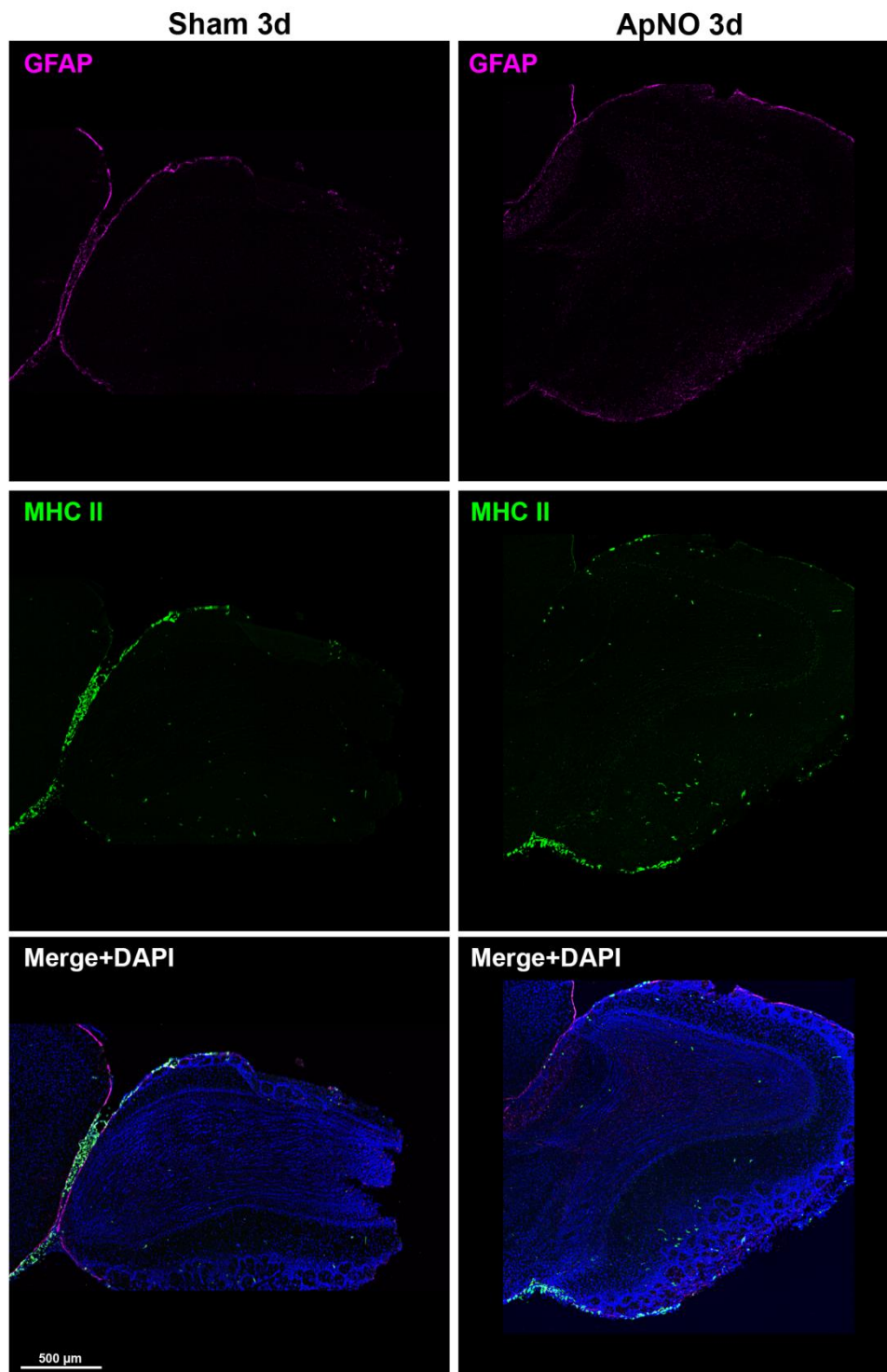
#### 4.2.2.3.3 Caracterización de la respuesta macroglial en el BO ipsilateral tras ApNO

En la **Tabla 49** se muestran los datos sobre la respuesta macroglial en el BOi al ApNO. A los 3 días de la lesión, la respuesta fue idéntica en el grupo del ApNO y su Sham. Curiosamente, similar a lo que ocurría en el BOc, el mayor incremento se observó en el grupo Sham 9 días. No obstante, a diferencia del apartado anterior, donde no se apreciaron cambios a los 30 días, en este caso, se produjo un descenso del área ocupada por GFAP, tanto en el grupo Sham como en el control.

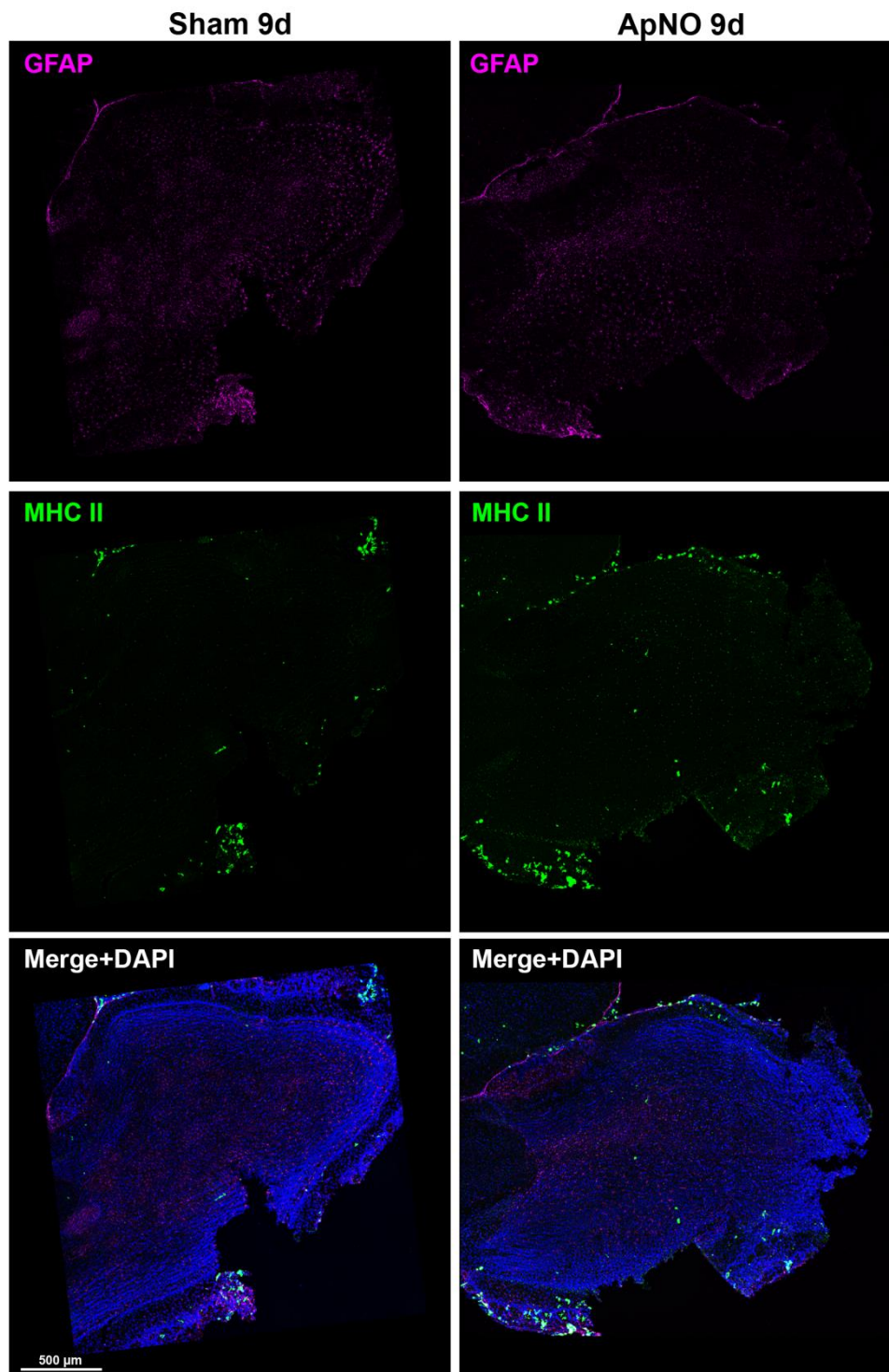
En las **Figuras 117 y 118** (3 y 9 días, respectivamente), se observa un patrón de inmunofluorescencia de GFAP<sup>+</sup> similar al animal intacto. Por el contrario, el área ocupada por GFAP fue menor en el grupo ApNO y Sham a los 30 días (**Figura 119**). Como ocurría en el BOc, las células MHC II<sup>+</sup> se hacen más frecuentes insertas en el parénquima del BO a tiempos más tardíos, y se encuentran tanto en animales Sham como ApNO (**Figuras 117 y 118**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
<b>1</b>	1.5	0.7	-	0.1	0.5	0.3
<b>2</b>	1.8	2.2	0.8	0.5	0.5	0.8
<b>3</b>	0.3	0.8	1.2	0.6	0.4	0.2
<b>Media</b>	1.2	1.2	1	0.4	0.5	0.4
<b>DEM</b>	0.8	0.8	0.28	0.2	0.1	0.3

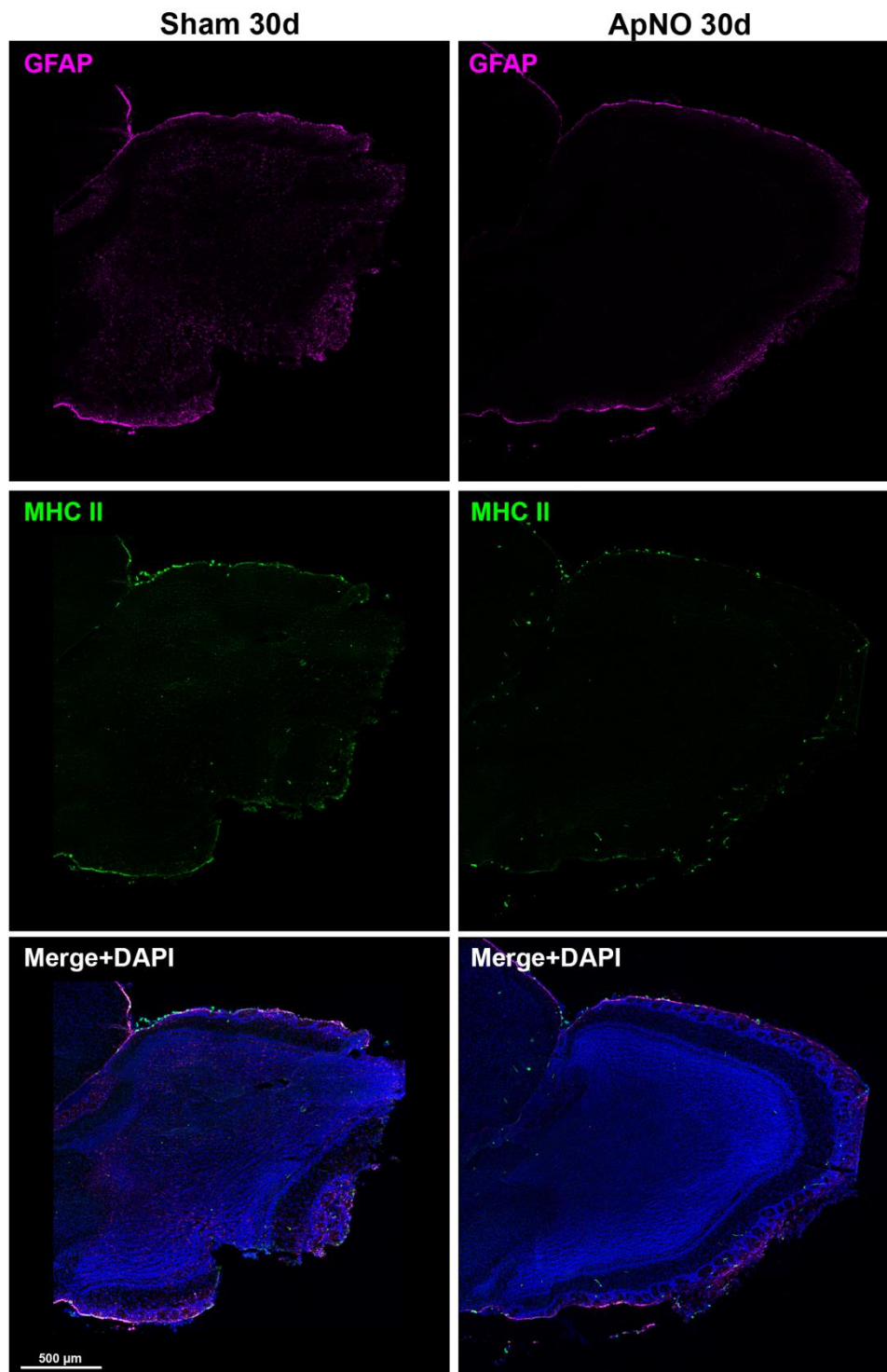
**Tabla 49.** Área  $\pm$  DEM (desviación estándar de la media) ocupada por GFAP<sup>+</sup> en el BO ipsilateral al ApNO o Sham relativa a la superficie en el animal intacto (considerado como 1). Dato del área ocupada por GFAP del ratón 1 del grupo Sham 9 días no disponible.



**Figura 117.** Secciones sagitales de BO ipsilaterales analizados 3 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMA inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge + DAPI).



**Figura 118.** Secciones sagitales de BO ipsilaterales analizados 9 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMA inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge + DAPI).



**Figura 119.** Secciones sagitales de BO ipsilaterales analizados 30 días después de la cirugía Sham o ApNO. Se muestran las CMa inmunodetectadas con GFAP (púrpura) y MHC II (verde) y la superposición de ambas con DAPI (Merge + DAPI).

**4.2.2.3.4 Respuesta macroglial relativa en el BO tras la cirugía Sham o ApNO en comparación con el BO intacto**

En el **BOc** al ApNO, el área ocupada por GFAP no presentó cambios estadísticamente significativos en los animales Sham (**Figura 120-A**) o ApNO respecto al intacto (**Figura 120-B**) (**Tabla 50**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	64.2	45.6	86.4	27.7	127.7	126.2
2	58.7	169.6	89.4	29.5	90.8	46.0
3	97.8	91.0	70.5	195.3	83.7	170.4
<b>Media</b>	73.6	102.0	82.1	84.1	100.7	114.2
<b>DEM</b>	21.2	62.7	10.1	96.2	23.6	63.1

**Tabla 50.** Porcentaje de área ocupada por GFAP en el BO contralateral en relación al BO intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La respuesta fue similar en el **BOi** (**Figuras 120-A y 120-B**). Se observa una tendencia al descenso del área ocupada por GFAP a partir de los 9 días en el grupo del ApNO que no alcanza valores significativos (**Tabla 51**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Sham	ApNO	Sham	ApNO	Sham	ApNO
1	151.8	68.6	-	10.8	52.5	29.1
2	176.7	217.9	79.5	45.6	54.0	76.1
3	31.9	76.8	119.2	57.7	37.0	20.1
<b>Media</b>	120.1	121.1	99.3	38.0	47.8	41.7
<b>DEM</b>	77.4	83.9	28.1	24.4	9.4	30.1

**Tabla 51.** Porcentaje de área ocupada por GFAP en el BO ipsilateral en relación al BO intacto (considerado como el 100%) a los distintos tiempos tras la lesión. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.2.2.3.5 Respuesta macroglial en el BO tras el ApNO relativa al grupo Sham

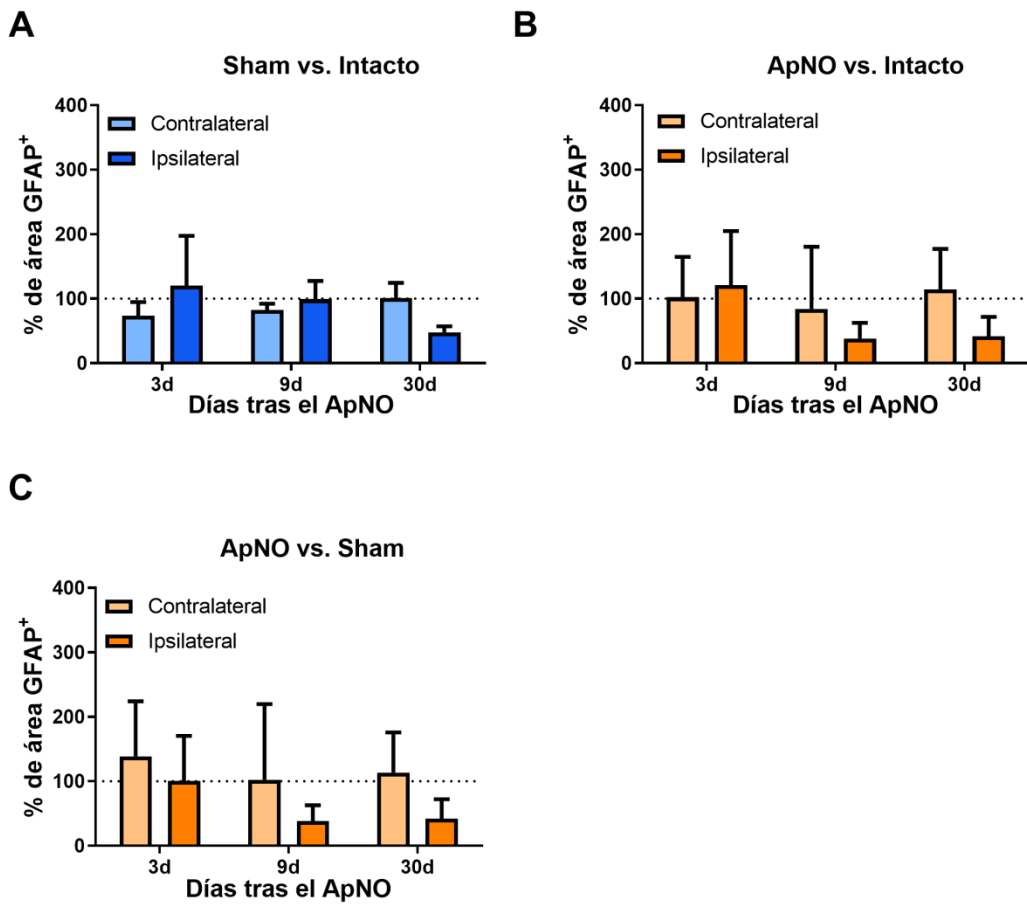
Finalmente, estudiamos el incremento del porcentaje de área ocupada por GFAP relativo a los animales con cirugía Sham a los 3, 9 o 30 días. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos hemisferios, entre los tiempos estudiados ni respecto a sus Sham (**Figura 120-C**) (**Tabla 52**).

Ratón	Días tras el aplastamiento del nervio óptico					
	3 días		9 días		30 días	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
<b>1</b>	62	57	34	11	125	29
<b>2</b>	231	181	36	46	46	77
<b>3</b>	124	64	238	58	169	20
<b>Media</b>	139	101	103	38	113	42
<b>DEM</b>	85	70	117	24	63	30

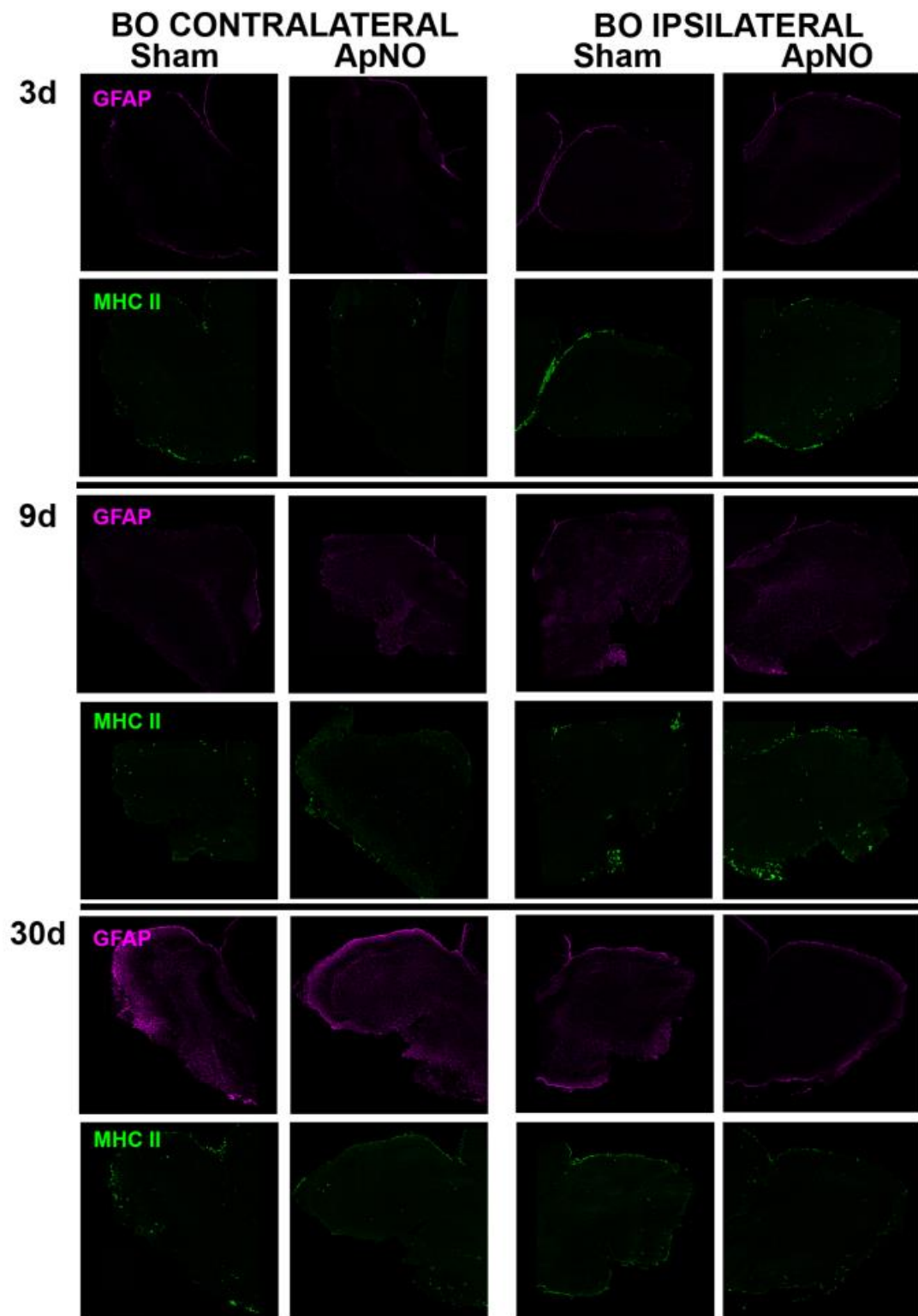
**Tabla 52.** Variación relativa del área ocupada por GFAP del BO en relación al BO Sham ipsilateral o contralateral (considerados como el 100%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La **Figura 121** muestra, de forma global, la similitud entre el BO contra- e ipsilateral al ApNO y sus respectivos Sham, así como la expresión de MHC II en animales Sham y ApNO, que no varía de forma marcada respecto al intacto (**Figura 113**).





**Figura 120.** Porcentaje de área ocupada por GFAP en el BO de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras el ApNO. Gráficos de barras que muestran el porcentaje  $\pm$  DEM de área ocupada por GFAP en el grupo Sham (barras azules) y en el grupo ApNO (barras naranjas), con respecto a los ratones intactos (A, B) o Sham (C), considerados como el 100%, a los distintos tiempos de análisis. Las barras en colores claros representan al BO contralateral y las oscuras al ipsilateral. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 121.** Figura resumen de la respuesta de las CMA GFAP<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> en el bulbo olfatorio contra e ipsilateral tras el ApNO o Sham a los 3, 9 ó 30 días.

# 5.DISCUSIÓN

La discusión de esta tesis se desarrollará en base a los objetivos específicos planteados.

## 5.1 RESPUESTA EN LA RETINA LESIONADA Y EN LA CONTRALATERAL AL ApNO.

### **La cirugía Sham es suficiente para modificar la expresión de marcadores inflamatorios y gliales en ambas retinas**

En los experimentos llevados a cabo en esta tesis, se confirma que la cirugía Sham es suficiente para producir en ambas retinas una sobreexpresión de los marcadores pro-inflamatorios y cambios en los marcadores gliales estudiados: a destacar, sobreexpresión de *Il-1*, *Tnf- $\alpha$*  y *Tspo* inicialmente en el lado de la cirugía y posteriormente en el contralateral, e infrarregulación generalizada de *Gfap*, *Iba1* y *Aq4*.

Estos cambios podrían estar motivados por dos causas principalmente. Por un lado, la manipulación animal o la cirugía en sí supone una lesión que puede modificar el perfil inflamatorio del individuo y reactivar la CMi (Fan et al., 2020; Lönnngren et al., 2006). Por otro, aunque en la cirugía Sham no se produzca un daño tan severo como un aplastamiento en el nervio, la manipulación quirúrgica de la cavidad orbitaria para exponer el nervio, puede justificar que se observe una respuesta mayor en la retina del lado del procedimiento quirúrgico que en la contralateral.

Por ello, en los estudios que aborden el efecto de la axotomía per se, de forma aislada al resto del proceso quirúrgico, es importante utilizar como control el animal Sham (Lucas-Ruiz et al., 2021; Lucas-Ruiz et al., 2019; Tribble et al., 2021). Sin embargo, a diferencia de numerosos estudios de retina tras ApNO, por ahora no se han realizado análisis histológicos de la glía retiniana en animales Sham. De cara a evitar una posible magnificación del efecto del ApNO, sería de interés su estudio experimental.

### **La respuesta inflamatoria y glial al ApNO fue ya evidente desde el primer día tras el ApNO en ambas retinas, aunque fue más duradera en la retina lesionada.**

El análisis molecular realizado en esta Tesis apoya los hallazgos histológicos publicados en la literatura sobre el efecto en la retina del ApNO.

La sobreexpresión de *Iba1* en la retina lesionada correspondería a la migración de la retina externa a la retina interna y a la proliferación de CMi *Iba1*<sup>+</sup> observada en las primeras 3 semanas tras el ApNO, en las que ocurre la muerte del 85% de la población de CGR (Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás et al., 2015). Aunque en la retina contralateral hay controversia en cuanto a la proliferación de las CMi (González-Riquelme et al., 2021; S. Liu et al., 2012), a nivel molecular hemos podido demostrar incremento precoz y significativo de

la proteína *Iba1*, que sería congruente con una degeneración más discreta de CGR, un 15% entre los 9 y 45 días tras la lesión (Lucas-Ruiz, Galindo-Romero, Rodríguez-Ramírez, et al., 2019).

La sobreexpresión de *Gfap* fue exclusiva de la retina del ApNO y significativamente mayor que en la retina contralateral en los primeros 9 días, momento en el que se señala la hipertrofia transitoria de CMa GFAP<sup>+</sup> en el estudio histológico tras el ApNO (González-Riquelme et al., 2021). La respuesta macroglial se ha relacionado como causa del aumento de grosor de la CFNR en los primeros 12 días tras el ApNO (Rovere et al., 2015) y con la muerte de las CGR, al demostrar que la reducción de la astrogliosis en animales expuesto a bromfenac minimiza la pérdida de CGR tras el ApNO (Rovere et al., 2016, 2019). En la retina contralateral, no se observaron cambios en la expresión de *Gfap* en los 30 días de estudio, lo que coincide con los cambios mínimos observados a los 3 días en el tejido (González-Riquelme et al., 2021). En cambio, la respuesta de CMa observada tras la axotomía por OHT aguda inducida por láser es diferente: se observa desde el inicio una astrogliosis en ambas retinas en los primeros 15 días (Fernández-Albarral et al., 2022) y, a partir de las 3 semanas, un descenso del área ocupada por GFAP, mayor en la retina lesionada que en la contralateral (Ramírez et al., 2010).

Nuestros resultados muestran que en ambas retinas hay sobreexpresión de marcadores de reactividad glial respecto a los animales Sham (*Mhc II*, *Tspo*). Como en el modelo de OHT, *Mhc II* se sobreexpresa en ambas retinas (Fernández-Albarral et al., 2022; Gallego et al., 2012). No obstante, la retina lesionada permanece con una respuesta pro-inflamatoria mayor a los 30 días (*Tspo*, *Il-1β*), a pesar del intento antiinflamatorio mediado por moléculas como *Tgf-β1*, y de que los marcadores gliales vuelven a valores comparables al Sham.

Tanto en el animal Sham como en el ApNO, se observa una sobreexpresión de los marcadores pro-inflamatorios. Las principales diferencias entre ellos son la reactividad glial, la expresión antiinflamatoria y de *Aq4*: (1) a diferencia de la infrarregulación de todos los marcadores gliales en los animales Sham, los animales axotomizados presentaron una sobreexpresión de *Gfap* en la retina lesionada y de *Iba1* y *Mhc II* en ambas retinas; (2) mientras *Tgf-β1* no se modificó en el Sham, el ApNO provocó una sobreexpresión precoz en la retina contralateral, y tardía en la lesionada; (3) de manera opuesta a la infrarregulación observada en el Sham o descrita en los primeros 14 días tras el ApNO en trabajos previos (Dibas et al., 2010; Qu & Jakobs, 2013), se encontró una sobreexpresión de *Aq4* a los 9 días en ambas retinas. Teniendo en cuenta que el efecto sistémico por el procedimiento se ha suprimido al usar como comparador al Sham, estos hallazgos se justificarían probablemente por el daño directo del tejido nervioso y el cambio disruptivo en la BHE (Smith et al., 2016; Varatharaj & Galea, 2017).

*Tgf-β1* regula la activación de la CMI tras un daño evitando una reactivación excesiva (Spittau et al., 2020). En la retina, *Tgf-β1* es expresada por las neuronas y la glía, y polariza la respuesta a un fenotipo antiinflamatorio (Paolicelli et al., 2022; Walshe et al., 2011). De hecho, se ha demostrado su efecto neuroprotector al comprobar que la inhibición de *Tgf-β1* favorece la apoptosis de las CGR tras el ApNO (Iwata et al., 2021; Lucas-Ruiz et al., 2019). Nuestros resultados demuestran que el patrón de expresión de *Tgf-β1* va en consonancia con la muerte de las CGR: en la retina lesionada, *Tgf-β1* se sobreexpresa a los 30 días, momento en el que ya han muerto la mayoría de las CGR; en la retina contralateral, *TGF-β1* se sobreexpresa inmediatamente tras el ApNO, lo que sugiere un intento de proteger la pérdida de CGR, y una infrarregulación a partir de los 9 días, punto en el que se inicia la muerte de las CGR en el ojo contralateral (Galindo-Romero et al., 2011b; Lucas-Ruiz et al., 2019; Sánchez-Migallón et al., 2016).

Tanto *Tnf-α* como *Tspo* se sobreexpresan en los animales Sham y con ApNO, ejemplificando el efecto dual de la CMI. Como también se ha visto en otros trabajos de axotomía por ApNO (Agudo et al., 2008; Lucas-Ruiz et al., 2019) o por OHC (Fernández-Albarral et al., 2021; Tezel et al., 2001), la activación de la CMI se acompaña de incremento de *Tnf-α*. La unión a su receptor TNFR1 en un ambiente proinflamatorio como el descrito contribuye a la muerte de las CGR en el ApNO (Sedger & McDermott, 2014). El tratamiento con antagonistas de la vía TNF-α/TNFR1 reduce la expresión de TNF-α/TNFR1 y la muerte de CGR (Lucas-Ruiz et al., 2019). Por otro lado, la CMI activada expresa TSPO (Klee et al., 2019). TSPO se ha relacionado con la capacidad endógena de controlar una respuesta inflamatoria y la fagocitosis induciendo el viraje de la CMI a fenotipo antiinflamatorio (Karlstetter et al., 2014; Mages et al., 2019; M. Wang et al., 2014), favoreciendo la liberación de citoquinas de este perfil (Lucas-Ruiz et al., 2019).

**Teniendo en cuenta la respuesta al ApNO en la retina contralateral, el uso de la retina no lesionada como control experimental debe hacerse con cautela.**

La respuesta en la retina ipsilateral se puede considerar una consecuencia biológica esperable. El ApNO, que supone un daño traumático de las capas meníngeas y una ruptura de la BHE, provoca la muerte de prácticamente la totalidad de las CGR axotomizadas, liberando señales de estrés y la consecuente reacción glial (Barron et al., 1986; Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás et al., 2015; Parrilla-Reverter et al., 2009; Sánchez-Migallón et al., 2016; Thanos, 1988; Villegas-Pérez et al., 1993, 1993). Sin embargo, los mecanismos implicados en los cambios observados en la retina contralateral están sujetos a debate (Lucas-Ruiz et al., 2021).

La escasa proporción de CGR retino-retinianas en el ratón pigmentado, el 0,03% de la población total de CGR (Nadal-Nicolás et al., 2015), hace poco probable que su



degeneración walleriana, con la consiguiente liberación de señales de estrés en la retina contralateral (Bodeutsch et al., 1999; González-Riquelme et al., 2021; Lucas-Ruiz et al., 2019; Macharadze et al., 2009), pudiera ser el desencadenante de la respuesta en el lado opuesto. Sin embargo, Nadal-Nicolás y colaboradores (Nadal-Nicolás et al., 2016) demostraron que el déficit de ATP extracelular, marcador de daño tisular inflamatorio, conseguía retrasar la muerte de las CGR contralaterales.

De forma similar, teniendo en cuenta que sólo el 5% de las CGR proyectan al CS ipsilateral (Lund, 1965; Nadal-Nicolás et al., 2012; Salinas-Navarro, Jiménez-López, et al., 2009), es poco probable que sean suficientes para transmitir de forma retrógrada a la retina el impacto del CS desaferentizado. No obstante, Sapienza y colaboradores (Sapienza et al., 2016) demuestran que la inyección de TNF- $\alpha$  en el CS causa reacción de CMi y CMa en ambos CS y en ambas retinas, además de la muerte del 20% de CGR de cada ojo. De esta manera, proponen que el daño en la retina o el NO de un ojo puede inflamarse ambos CS, que a su vez pueden actuar como retransmisores del daño de forma retrógrada a ambas retinas.

La propagación de la reacción glial desde el NO dañado a la retina contralateral a través del quiasma podría ser uno de los mecanismos más plausibles en el ApNO. Existe evidencia de que el daño astrocitario por OHT unilateral puede provocar la liberación de metabolitos derivados del astrocito en la retina contralateral (Cooper et al., 2020), aunque según nuestros datos la reacción macroglial contralateral tras el ApNO es menor. La activación de CMi ocurre en ambas y podría presentar un gradiente longitud-dependiente, pues aparece antes en la retina lesionada que en la contralateral, efecto que disminuye si la axotomía se realiza más cerca del ojo contralateral (Lucas-Ruiz et al., 2019; Ramírez et al., 2020). Además, la rotura de la BHE en el NO podría favorecer la entrada de células inflamatorias y su extensión a lo largo de la vía visual (Smith et al., 2018).

Según nuestros datos y los publicados hasta la fecha, dado que la sobreexpresión de *Gfap* sólo se observa en la retina lesionada y la hipertrofia de CMa GFAP<sup>+</sup> es mucho mayor en la retina del ApNO, es probable que la reacción esté mediada por la CMi. Aunque a nivel histológico la activación de CMi aparece antes en la retina lesionada, nuestros datos muestran una sobreexpresión desde el día 1 de *Iba1* en la retina contralateral, lo que sugiere que la reactividad microglial se produce realmente en ambas de forma precoz, pero con mayor intensidad en la retina más cercana al ApNO. Además, el curso de expresión de *Iba1* concuerda con la gráfica de *Tgf- $\beta$ 1*, factor de crecimiento liberado por la CMi antiinflamatoria (Goldmann & Prinz, 2013; Mathieu et al., 2010), que no se modifica en los animales Sham.

En conclusión, los resultados expuestos contribuyen a sentar las bases moleculares de la respuesta retiniana al ApNO en la retina lesionada y contralateral, y confirma que el control

de la inflamación mediada por la glía puede ser una diana terapéutica para la neuroprotección (Boia et al., 2020; Madeira et al., 2015).

## 5.2 RESPUESTA EN EL COLÍCULO SUPERIOR IPSI- Y CONTRALATERAL AL ApNO.

**El ApNO provoca reactivación microglial en el CS contralateral y una astrogliosis en en ambos CS.**

Conociendo que el 95% de las CGR se decusan en el quiasma y que el CS es la principal región retino-recipiente en el ratón (Linden & Perry, 1983; Lund, 1965; Nadal-Nicolás et al., 2012; Rodieck, 1979; Salinas-Navarro, Jiménez-López, et al., 2009), la respuesta en el CSc al ApNO supone el control experimental positivo de la lesión. La muerte por axotomía de las CGR causa un incremento de la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup>/CD68<sup>+</sup> en el CSc en todos los tiempos estudiados y en el CSi a los 30 días. Smith y colaboradores (Smith et al., 2018) demostraron en un modelo de axotomía por SNO en rata el incremento de CMi Iba1<sup>+</sup>/ED1<sup>+</sup> (clon del anticuerpo monoclonal anti-CD68) en el CSc, sin apreciar cambios en el CSi, pero este estudio se limitó a la primera semana y no evaluó las CMA.

En modelos de daño del NO causado por OHT unilateral, también se observa una respuesta glial en ambos CS. En modelos de OHT crónica en ratón, se ha puesto de manifiesto un aumento de densidad de CMi en ambos CS (Tribble et al., 2021) o sólo en el CSc (Sapienza et al., 2016) junto con astrogliosis en ambos. La OHT transitoria produce un aumento de la inmunorreactividad GFAP<sup>+</sup> pero sólo en el CSc (S. Zhang et al., 2009). En concordancia con estos artículos, en nuestro modelo, que produce un daño del NO permanente, hemos visto que el área ocupada por GFAP aumenta de forma progresiva desde el primer día hasta el día 30 en ambos CS.

**La cirugía Sham es suficiente para modificar la expresión de marcadores inflamatorios y gliales así como para aumentar el área ocupada por GFAP en ambos CS.**

La cirugía Sham fue un estímulo capaz de incrementar de forma precoz la expresión de *Iba1* en el CSi y ocasionar variaciones significativas en la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> en ambos CS, aunque a nivel histológico no se observaron variaciones en comparación con el CS intacto. De forma similar, la cirugía Sham consiguió incrementar el área ocupada por GFAP respecto al animal intacto en ambos CS, sobre todo a partir de los 9 días, siendo en este caso evidente en el tejido. Aunque el CSc presenta una tendencia a mayor respuesta micro

y macroglial, el porcentaje de CMi Iba1<sup>+</sup> o el área ocupada por GFAP no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ambos hemisferios.

Aunque los cambios en la glía a nivel histológico se detectaron a partir de los 9 días, la variación de la expresión en muchos de los marcadores pro- (*Cxcr1*, *Lcn2*, *Il-6*) y antiinflamatorios estudiados (*Cd206*, *Il-4*), que probablemente sean el sustrato de estos cambios, fueron evidentes desde el día 1 tras el ApNO y similares en ambos CS. Curiosamente, sólo con la cirugía Sham ya hay evidencia de sobreexpresión tardía de *Caspasa-3* en ambos CS.

Nuestros datos apoyan otros trabajos de la literatura que demuestran que la manipulación animal o el procedimiento quirúrgico (Lönngren et al., 2006), al igual que otros estímulos sistémicos (Hamadi et al., 2016; Michels et al., 2014; Zrzavy et al., 2019), son suficientes para provocar cambios en glía o en la expresión génica inflamatoria. Por ello, si se pretende aislar el impacto del ApNO de los cambios asociados al procedimiento, metodológicamente resulta importante que el comparador sea el animal Sham.

### **El ApNO respecto al Sham genera una respuesta mayor en el CS contralateral.**

Siguiendo el razonamiento anterior, se comprobó que el ApNO respecto al Sham causó un incremento relativo de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> y de la expresión de *Iba1* desde el día 1, mayor en el CSc que en el CSi en todos los tiempos estudiados. Aunque no se consiguen diferencias estadísticamente significativas entre ambos CS, la histología es clara: se observan células Iba1<sup>+</sup> con morfología ameboide sólo en el CSc al ApNO con una inmunohistofluorescencia intensa CD68<sup>+</sup> desde el día 3 y una sobreexpresión significativa de *Tspo* en el día 1. Con este aspecto morfológico, se podría plantear si se trata de CMi residente o macrófagos que infiltran el SNC tras una ruptura de la BHE por el ApNO (Smith et al., 2016), dado que ambos tipos celulares expresan Iba1 y CD68 (Carson, 2002; Carson et al., 1999; Lier et al., 2021; Micklem et al., 1989). Sin embargo, es conocido que las CMi residentes raramente son desplazadas y, a diferencia de las células nucleadas de estirpe hematopoyética, expresan escasamente CD45 (Hickey & Kimura, 1988; Sedgwick et al., 1991).

En cambio, la respuesta de CMa en el CS, medida por el área ocupada por GFAP y por la expresión de *Gfap*, fue más tardía (día 9) y más simétrica entre ambos lados. Teniendo en cuenta que ya era visible en el Sham, es probable que la respuesta macroglial tenga más relación con la cirugía que con la axotomía en sí.

En general, a nivel molecular, el pico de expresión de los marcadores gliales (*Iba1*, *Gfap*, *Aq4*, *Mhc II*) se produjo a los 9 días tras el ApNO y los marcadores de reactividad glial estudiados (*Tspo* y *Mhc II*) sólo se sobreexpresaron en el CSc. Este punto temporal entra

dentro del margen de los primeros 14 días en los que se produce la muerte del 85% de las CGR tras el ApNO (Nadal-Nicolás et al., 2009; Nadal-Nicolás et al., 2015; Sánchez-Migallón et al., 2016; Villegas-Pérez et al., 1993), lo que sugiere que la reacción glial se pueda relacionar con la desaferentización del CS por pérdida de su principal región aferente.

A diferencia de *Tspo*, *Mhc II* no se expresa de forma constitutiva en el SNC del animal sano (Betlazar et al., 2018; Hamo et al., 2007; Hickey & Kimura, 1987; Kolomeyer & Zarbin, 2014), como se ha podido observar en las imágenes de tejido cerebral del ratón intacto, excepto en el BO. Aunque desconocemos el tipo celular exacto en el BO que expresa *Mhc II*, se podría considerar a la glía envolvente olfativa. Se trata de un tipo de CMA radial que rodea a los axones amielínicos de las neuronas olfativas, con un importante papel en la inmunoprotección de la mucosa y con capacidad fagocítica (Denaro et al., 2022).

No obstante, como se ha espuesto en esta Tesis, MHC II tampoco se ha detectado en tejido en animales Sham o ApNO en los que su ARNm estaba elevado, sólo de forma muy escasa en células mononucleadas en parénquima o en la superficie meníngea. El *Mhc II* se sobreexpresa como respuesta a un daño mediante la inducción de moléculas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  (Mathew et al., 2020). Como describen Chidlow y colaboradores (Chidlow et al., 2012) para intentar explicar la sobreexpresión de citoquinas inflamatorias y su ausencia de detección en tejido en un modelo de OHT, se podrían dar 3 posibles razones que, de forma similar, expliquen la sobreexpresión de *Mhc II* sin incremento de su señal: el ARMm no se ha traducido, la proteína sólo se expresa de forma transitoria o el nivel de proteína expresada está por debajo del límite detectable con técnicas de inmunohistofluorescencia.

Por los resultados expuestos en esta tesis, ambos CS presentan una respuesta inflamatoria, como también se ha observado tras la SNO (Smith et al., 2018) y en algunos modelos de OHT aguda (Sapienza et al., 2016; Tribble et al., 2021; S. Zhang et al., 2009), en todos los casos usando animales intactos como controles. El CSc presenta una respuesta pro-inflamatoria mayor y más persistente que el CSi. Aunque haya evidencia de apoptosis (sobreexpresión de *Caspasa-3*) en ambos CS, en el CSi es precoz y transitoria (día 1), y en el CSc, es más tardía (día 9) pero persistente y significativamente mayor. Dado que *Cxcr1*, capaz de inducir la apoptosis y potente inductor de activación de CMi y CMA (Flynn et al., 2003; Goczalik et al., 2008; J.-J. Wang et al., 2018), presenta un patrón temporal similar a la *Caspasa-3*, es tentador asociar la intensa reactividad glial e inflamatoria con la apoptosis.

La sobreexpresión de *Caspasa-3* tras el ApNO en el CSc coincidiría con el punto temporal de 9 días donde se hace significativo el inicio de la pérdida del 15% de CGR observado en la retina contralateral al ApNO. Sin embargo, a diferencia de la sobreexpresión de *Caspasa-3* en las CGR (Agudo et al., 2008, 2009; Lucas-Ruiz et al., 2019; Sánchez-Migallón et al.,

2016); en este trabajo no hemos determinado en qué tipo celular se produce esta sobreexpresión. Podríamos suponer un origen neuronal, por degeneración anterógrada y/o activación glial, o de células de la glía. En un modelo de OHT transitoria, se observó atrofia de las neuronas en el CSc pero sin evidencia de apoptosis por tinción de TUNEL (S. Zhang et al., 2009). En modelos de OHT unilateral crónica, por cauterización o fotocoagulación de venas epiesclerales, se ha demostrado la activación de vías apoptóticas (c-fos, p-p38) en ambos CS (contralateral más que ipsilateral) en comparación con animales intactos (Sapienza et al., 2016) y se ha podido demostrar pérdida de densidad de hasta un 50% los terminales axones de las CGR marcados con CTB en el CSc a los 10 días de la lesión (Valiente-Soriano et al., 2015).

Aunque la OHT unilateral suponga un daño relativamente comparable al ApNO en la retina (50% de muerte de CGR en 2 semanas vs. 85%), la comparación de la respuesta a la axotomía por ApNO y OHT en el CS debería hacerse con cautela: McGrady y colaboradores (McGrady et al., 2022) establece que la neurodegeneración retrógrada causada por el ApNO en el CS en una semana equivaldría a la obtenida a los dos meses tras la elevación de la OHT unilateral. Además, se ha sugerido que la muerte neuronal que se produce en el CS, genera a su vez una degeneración retrógrada en la retina por la interrupción de liberación de factores tróficos que contribuye a perpetuar un circuito de inflamación y neurodegeneración (Claes et al., 2022; Sapienza et al., 2016).

### 5.3 RESPUESTA EN REGIONES DEL SNC FUERA DE LA VÍA VISUAL Y A DIFERENTES DISTANCIAS DEL ApNO.

**A diferencia de lo expuesto en CS, el ApNO no modifica de forma relevante la respuesta glial o inflamatoria ya obtenida por la cirugía Sham en las RRSNC (H, BO, CE, ME), las regiones cerebrales estudiadas fuera de la vía visual.**

Aunque la repercusión de la cirugía Sham en CS podría atribuirse a la respuesta de la manipulación quirúrgica cercana al NO, principal vía aferente al CS, en este trabajo se ha demostrado una respuesta glial e inflamatoria en animales Sham del resto de las áreas estudiadas del SNC que no forman parte de la vía visual. Además, y a diferencia de lo expuesto en CS, fuera de la vía visual, el ApNO no modifica de forma relevante la respuesta glial o inflamatoria ya obtenida por la cirugía Sham (**Tabla 53**).

La CMi se considera el primer respondedor a un daño en el SNC (Davalos et al., 2005; Paolicelli et al., 2022). Además, se conoce que la distribución de las CMi en el animal intacto en diferentes áreas del SNC es heterogénea en función de su morfología, densidad celular, transcriptoma y expresión de mediadores inflamatorios (De Biase et al., 2017; de Haas

et al., 2008; Grabert et al., 2016; Lawson et al., 1990; Masuda et al., 2020; Tan et al., 2020). La densidad media de CMi en CS ( $357\pm 23$  cel/mm<sup>2</sup>), H ( $310\pm 54$  cel/mm<sup>2</sup>) y BO ( $351\pm 31$  cel/mm<sup>2</sup>) fue similar. Brandi y colaboradores (Brandi et al., 2022) estudiaron la distribución cerebral de CMi en ratón pigmentado C57BL/6 y encontraron la Sustancia Nigra (SN) pars reticulata como la zona de mayor densidad de CMi. El CE y la ME serían las zonas de más baja densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> (Amatya et al., 2018; Brandi et al., 2022; Lawson et al., 1990; Z. Li et al., 2016; Tan et al., 2020) y, curiosamente, el CE es la región cerebral que más expresa CD68 de forma constitutiva (Brandi et al., 2022).

Según nuestros datos, la cirugía Sham produce una sobreexpresión de *Iba1* y/o un incremento significativo de la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> en todas las regiones estudiadas salvo en el CE, aunque a la observación del tejido de CS, H y BO no se observan cambios relevantes. Liu y colaboradores (Q. Liu et al., 2021) demuestran que el estímulo de la cirugía de una fractura tibial en ratón es suficiente para la activación de CMi en hipocampo. Brandi y colaboradores (Brandi et al., 2022) demuestran que la inyección intraperitoneal de lipopolisacárido bacteriano (LPS) consigue un incremento de la densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> en las 16 áreas cerebrales que estudian, destacando la SN pars reticulata y la corteza entorrinal como las regiones con mayor aumento.

En cuanto al estudio de la CMa, el área ocupada por GFAP no presentó diferencias respecto al intacto fuera de la vía visual, ya fuese la región a estudio ipsi- o contralateral a la lesión. Sin embargo, el análisis molecular puso de manifiesto una respuesta de CMa precoz, por sobreexpresión de *Gfap*, a veces acompañada de *Aq4*. La respuesta macroglial no cambió tras el ApNO salvo en BO o tardíamente en la ME. Los astrocitos cooperan con la CMi como respuesta inflamatoria (Linnerbauer et al., 2020; Miller, 2018). Brandi y colaboradores (Brandi et al., 2022) demostraron un incremento del área ocupada por GFAP tras la inyección intraperitoneal de LPS en SN, hipocampo y cuerpo caloso. Sin embargo, las comparaciones entre regiones sobre la respuesta astrocitaria están más limitadas porque la expresión de la proteína GFAP es muy variable, a diferencia de CMi-Iba1 (Z. Yang & Wang, 2015).

**La respuesta tras la cirugía Sham o el ApNO fuera de la vía visual se podría explicar por un efecto local en las regiones cerebrales ipsilaterales.**

Cuando aparece sobreexpresión de *Mhc II* y/o *Tspo* (BO, CE y ME) ocurre siempre en el tejido ipsilateral a la cirugía. De forma similar, la sobreexpresión de la mayoría de los marcadores pro-inflamatorios es precoz y en la región ipsilateral a la cirugía en H, BO y CE. En el CS, esta asimetría se minimiza probablemente porque la cirugía Sham, en la que no se aplasta pero se expone el NO, contribuye igualmente a la respuesta en el CS contralateral.



De forma similar, Smith y colaboradores (Smith et al., 2018) comprobaron un aumento de *Il-2*, *Tnf- $\alpha$*  e *Il-1* el día 1 tras la SNO pero no describieron lateralidad porque el estudio se hizo en homogeneizado de cerebro completo. En la ME, que constituye el segmento del SNC estudiado de localización más caudal, la reacción pro-inflamatoria es escasa y tardía.

Por todo ello, podríamos plantearnos que la respuesta fuera de la vía visual en los animales Sham podría estar más relacionada con el efecto inflamatorio cercano de la cirugía que mediada por aferencias o conexiones nerviosas, como ocurre en la retina contralateral o en el CS. Por ejemplo, en la esclerosis múltiple, en la que la inflamación meníngea ejerce un papel importante en la desmielinización cortical, se describe un gradiente inflamatorio decreciente desde la corteza cerebral hacia la sustancia blanca (Lucchinetti et al., 2011). Por otro lado, en el daño cerebral traumático, se ha descrito un efecto inflamatorio inicial más local, aunque posteriormente se llega a producir activación micro/macroglial e incluso neurodegeneración contralateral y remota (Niesman et al., 2014; Shi et al., 2019; Taib et al., 2017; J. Zhao et al., 2019).

**En la vía visual (retina y CS), la respuesta glial e inflamatoria se produce en relación a la conexión entre las CGR axotomizadas y ambas retinas o los CS retino-recipientes. En las RRSNC (H, BO, CE, ME), la respuesta es más global y podría seguir un gradiente en relación a su situación anatómica y la lesión.**

En resumen, los mecanismos propuestos para la respuesta contralateral o remota en el cerebro, serían los mismos que los 5 expuestos en la respuesta contralateral de la retina (de Hoz et al., 2013; Gallego et al., 2012; Lucas-Ruiz et al., 2021; Ramírez et al., 2010, 2015). De esta manera, el daño neuronal focal, desencadenaría la respuesta en la región diana de esas proyecciones. Este proceso intentaría ser controlado por una respuesta inflamatoria mediada por las células de la glía para volver a la homeostasis de la zona del daño primario y en la de proyección, pero en caso de que la respuesta no se controle, la inflamación podría cronificarse y actuar en sentido opuesto al objetivo primario, pasando a contribuir a la neurodegeneración.

Esto lleva, en primer lugar, a la duda de la conveniencia del uso de la región contralateral como control en experimentos en los que se provoque un daño unilateral (Lucas-Ruiz et al., 2019; Tribble et al., 2021) y, además, plantea el estudio fisiológico de este efecto y su importancia en el organismo.

**El hipocampo presentó mayor susceptibilidad inflamatoria a la cirugía Sham o al ApNO que otras regiones cerebrales.**

De todas las áreas estudiadas en el SNC fuera de la vía visual, el hipocampo responde de forma particularmente sensible al estímulo.

En el caso de la cirugía Sham, además del incremento de densidad de CMi Iba1<sup>+</sup> tardío que se también se observa en el BO; el análisis del área celular de la CMi hipocampal objetivó un incremento significativo de las CMi con área mayor a 20 mm<sup>2</sup> del Hc respecto al intacto a los 3 y 30 días. Igualmente, Lai y colaboradores (Lai et al., 2020) demuestran un incremento en el tamaño celular de las CMi Iba1<sup>+</sup> de H a las 24h tras una cirugía de fractura tibial en un ratón, sin apreciar tampoco cambios en el número de CMi Iba1<sup>+</sup> o en el aspecto morfológico. Ezaki y colaboradores (Ezaki et al., 2016) proponen que la neurodegeneración que encuentran en el H en un modelo de daño cerebral traumático, va más asociado a la incisión en el cuero cabelludo para exponer el cráneo que al traumatismo craneal en sí.

Según los marcadores moleculares estudiados, el H tras el ApNO vs. Sham presenta un patrón de reacción inflamatoria similar a la del CS (**Tabla 53**): ambos Hs presentan incremento de moléculas pro-inflamatorias de forma precoz que permanece a los 30 días en el Hc. No obstante, es probable que sea de menor intensidad por los siguientes motivos: 1) La reacción antiinflamatoria es más escasa que la observa en CS, sólo mediada por *Il-4* y similar en ambos hemisferios; 2) Aunque parece que hay una reactividad de CMi (por el incremento en la densidad de CMi en el Hi, o por sobreexpresión de *Iba1* en el Hc), es más leve, no progresa en los tiempos estudiados y la morfología celular observada en inmunohistofluorescencia no cambia de forma significativa; 3) El área ocupada por GFAP no se modifica; 4) Por último, la expresión de *Caspasa-3* no cambia respecto al Sham, por lo que es probable que el ambiente no sea tan hostil como para inducir apoptosis celular.

Varios factores podrían explicar este fenómeno: 1) La corteza entorrinal, principal zona aferente de la región hipocampal presenta gran reactividad microglial ante estímulos sistémicos, como el LPS (Brandi et al., 2022; Watson et al., 2011); 2) el H puede responder al daño axonal a distancia, como el que ocurre en el modelo de daño medular espinal, con una reacción glial e inflamatoria (Jure et al., 2022); 3) el H responde a la axotomía de aferencias propias: la lesión de la corteza entorrinal genera una reacción de CMi y luego macroglial e inflamatoria (Jensen et al., 1999; Owens et al., 2005); 4) la CMi hipocampal presenta una transcriptómica sugestiva de mayor vigilancia inmune (Grabert et al., 2016); 5) la existencia de la comisura hipocampal, que permite la conexión entre ambos hipocampos, así como proyecciones heterotópicas entre el hipocampo y la corteza entorrinal (Wyss et al., 1980; Yorke & Caviness, 1975).

La mayor susceptibilidad hipocampal a presentar una reacción inflamatoria frente a estímulos a distancia sin una conexión directa, podría explicar en clínica su implicación en enfermedades neuroinflamatorias, como la encefalitis límbica u otras encefalitis autoinmunes (Bien et al., 2007; Conde-Blanco et al., 2021; Dalmau et al., 2008; Navarro et al., 2016; Nwaubani et al., 2022); o el desarrollo de esclerosis hipocampal con crisis

epilépticas refractarias tras un daño cerebral en la infancia temprana (como las crisis febriles o los traumatismos craneoencefálicos) (Berg, 2008).

### **La respuesta inflamatoria se mantiene a los 30 días del ApNO**

Como se ha expuesto previamente, el ApNO no modifica de forma general la respuesta de la cirugía fuera del CS. No obstante, respecto al Sham se puede observar una tendencia a mantener una reacción tardía en todas las regiones estudiadas, tanto pro-inflamatoria (principalmente mediada por *Cxcr1*) como antiinflamatoria (a destacar, la sobreexpresión de *Cd206*), sin predilección por ninguna lateralidad. En el CSc al ApNO a los 30 días de la lesión, se continúa observando una reacción microglial pero las células comienzan a adquirir de nuevo un aspecto ramificado, aún manteniendo intenso marcaje CD68<sup>+</sup>. En la retina, tanto la del ApNO como la contralateral, las CMi persistieron con evidencia de activación (sobreexpresión de CD68<sup>+</sup>) hasta los 45 días, aunque los cambios morfológicos fueron más significativos en la lesionada (González-Riquelme et al., 2021); probablemente, en ambos casos con estrecha relación con la fase tardía de muerte de las CGR (Lucas-Ruiz, Galindo-Romero, Rodríguez-Ramírez, et al., 2019).

La sobreexpresión de *Cxcr1*, por parte de neuronas o glía (Danik et al., 2003; Flynn et al., 2003; Goczałik et al., 2008), se ha relacionado con peor pronóstico en el modelo de daño cerebral traumático (Hvingelby et al., 2022), lo que sugiere que el ApNO podría favorecer un incremento mayor de la reacción inflamatorias sobre lo que ya hace la cirugía.

La sobreexpresión de *Cd206*, aunque pueda corresponder con los astrocitos (Burudi et al., 1999), se ha relacionado tradicionalmente con un fenotipo de CMi antiinflamatorio en el que intentan aliviar el daño tisular fagocitando las células apoptóticas (Akhmetzyanova et al., 2019a; Bai et al., 2021; Chhor et al., 2013; Durafourt et al., 2012; Ran et al., 2021). Es tentador sugerir que la sobreexpresión de este marcador indique un intento de controlar el daño por parte de la CMi tras el estímulo inicial, como ocurre en la retina (González-Riquelme et al., 2021).



		COLÍCULO SUPERIOR	HIPOCAMPO	BULBO OLFATORIO	CEREBELO	MÉDULA ESPINAL
<b>SHAM vs. INTACTO</b>						
CMI	Densidad de CMI Iba1*	Incremento tardío en el CSc* y descenso en el CSi*..	Incremento a los 30 días en el Hc* y descenso a los 9 días en el Hi*.	Incremento a los 30 días en el BOi*.	-	-
	Expresión de Iba1	Sobreexpresión precoz en el CSi*.	Sin cambios.	Sin cambios.	Infraexpresión tardía en hCEi.	Sobreexpresión precoz en la hMEi, y posteriormente en hMEc.
CMA	Área ocupada por GFAP	Incremento en ambos, CSc>CSi.	Sin cambios	Sin cambios.	-	-
	Expresión de Gfap/Aq4	Aumento precoz Gfap*# en el CSc.	Sobreexpresión precoz de Aq4 y Gfap en Hi*#.	Sobreexpresión precoz de Gfap en BOc*#.	Sobreexpresión precoz (Aq4*#) y tardía (Gfap*#) en hCEi.	Sobreexpresión generalizada de Aq4 y Gfap.
Marcadores de activación glial (Tspo/Mhc II)		Sin cambios.	Sin cambios.	Incremento precoz (Mhc II y Tspo*) en BOi*.	Incremento precoz (Mhc II*#) en hCEi e infrarregulación. (Tspo*) en ambos	Sobreexpresión precoz de Tspo en hMEi*# y tardía de Mhc II*.
Marcador de apoptosis		Sobreexpresión tardía de Caspasa-3 en ambos CS*.	Sobreexpresión precoz de Caspasa-3 en ambos H*.	-	Sobreexpresión precoz de Caspasa-3 en hCi*.	Sobreexpresión tardía de Caspasa-3* en hMEi.
Marcadores pro-inflamatorios		Sobreexpresión precoz (Cxcr1*, Lcn2*, Il-6) en ambos CS.	Sobreexpresión precoz (Cxcr1*#, Il-1β*#, Tnf-α*#, Il-6*) en Hi.	Sobreexpresión precoz (Tnf-α*# e Il-6*#) en BOi.	Escasa: Sobreexpresión precoz (Cxcr1*#, Lcn2*) en hCEi.	Escasa: sobreexpresión tardía de Il-1β*# e Il-6*# en hMEc.
Marcadores antiinflamatorios		Alta: Il-4*# aumenta de forma precoz en el CSc y tardía en el CSi; Cd206* y Tgf-β1* en ambos CS.	Escasa: sobreexpresión de Il-4* en ambos H.	Predominio de sobreexpresión en BOi (Il-4*# e Tgf-β1*#).	Muy escasa: sobreexpresión de Il-4*# en hCEi.	Sobreexpresión de Cd206 en hMEc*# y de Tgf-β1*# en hMEi.
<b>ApNO vs. SHAM</b>						
CMI	Densidad de CMI Iba1*	Incremento progresivo en ambos CS, CSc>CSi.	Incremento progresivo en Hi.	Sin cambios.	-	-
	Expresión de Iba1	Incremento generalizado en CSc*.	Incremento precoz en Hc*.	Descenso precoz en ambos BO*.	Sin cambios.	Sin cambios.
CMA	Área ocupada por GFAP	Incremento en ambos, CSi>CSc.	Sin cambios.	Sin cambios.	-	-
	Expresión de Gfap/Aq4	Incremento progresivo en ambos CS*.	Sin cambios.	Incremento precoz en BOc (Gfap*) y en BOi (Aq4*).	Sin cambios.	Sobreexpresión tardía de Aq4* y Gfap* en ambas hemimédulas.
Marcadores de activación glial (Tspo/Mhc II)		Incremento en el CSc: Tspo*# generalizado y Mhc II* tardío.	Sin cambios.	Sin cambios.	Descenso tardío de Tspo* en hCEc*.	Sobreexpresión tardía de Tspo*# en hMEi.
Marcador de apoptosis		Sobreexpresión de Caspasa-3* precoz en CSi y Caspasa-3*# en el CSc.	La expresión de Caspasa-3 no se modifica.	-	Sobreexpresión de Caspasa-3*# tardía en hCEi.	La expresión de Caspasa-3 no se modifica.
Expresión de marcadores pro-inflamatorios		Sobreexpresión precoz en ambos CS (Cxcr1*), y tardía en CSc>CSi (Cxcr1*#, Lcn2*#).	Ambos H presentan incremento de marcadores pro-inflamatorios: el Hc más precoz (Cxcr1*#) y mantenido, que el Hi (Il-6*, Lcn2*#).	Escasa respuesta pro-inflamatoria en ambos BO: incremento de expresión (Cxcr1*) tardía.	Escasa; incremento tardío de Cxcr1 en hCEi*#.	Escasa; incremento tardío de Il-1β* en ambas hemimédulas.
Expresión de marcadores antiinflamatorios		Elevada: sobreexpresión precoz de Il-4*# en el CSi y tardía de Tgf-β1*# en el CSc.	Escasa: sobreexpresión de Il-4* en ambos H.	A ambos lados, infrarregulación precoz (Cd206* y Tgf-β1) y sobreexpresión mantenida (Cd206*) tardía.	Escasa; sobreexpresión tardía de Cd206*# en ambos hemisferios cerebelosos.	Incremento de Cd206*# tardío en hMEi y Tgf-β1*# generalizado en hMEc.

**Tabla 53.** Tabla resumen de los resultados del estudio anatómico-patológico y molecular de las regiones estudiadas en el SNC. No se incluye la retina. **Abreviaturas:** hME: hemimédula espinal; hCE: hemicerebelo. -: dato no disponible. \*: diferencia estadísticamente significativa respecto a su comparador (Intacto o Sham, según corresponda). #Diferencia significativa respecto al lado opuesto. Se considera respuesta precoz (de 1 a 3 días tras la lesión) o tardía (de 9 a 30 días tras la lesión).

# 6.CONCLUSIONES



### Respuesta en Sham:

1. La cirugía Sham es suficiente para modificar la expresión génica de los marcadores inflamatorios y gliales en ambas retinas. La retina cuyo nervio óptico ha sido expuesto pero sin aplastamiento presenta una reacción pro-inflamatoria mayor y más precoz que la retina contralateral.
2. La cirugía Sham causa una respuesta inflamatoria y glial en las regiones remotas del SNC estudiadas (RRSNC), fuera de la vía visual; así como en ambos colículos superiores (CS), donde también se observa un incremento del área ocupada por GFAP.
3. El aplastamiento del nervio óptico (ApNO), en comparación con los animales Sham, genera una reacción mayor en ambos CS. Sin embargo, el ApNO no modifica de forma sustancial la respuesta apoptótica, glial o inflamatoria ya inducida por la cirugía Sham en las RRSNC.

### Respuesta en ApNO:

4. La respuesta inflamatoria y glial está presente desde el primer día tras el ApNO en ambas retinas, aunque es más larga y duradera en la retina lesionada. La reacción macroglial ocurre solamente en la retina lesionada mientras que la respuesta microglial se encuentra en ambas.
5. El ApNO genera una respuesta mayor en el CS contralateral: se observa una intensa activación microglial junto con una respuesta pro-inflamatoria que conduce a la apoptosis.
6. La respuesta glial e inflamatoria en la vía visual (retina y CS) ocurre en relación a la conexión entre las CGR axotomizadas y ambas retinas o los CS. Fuera de la vía visual (RRSNC), la reacción es más global y podría seguir un gradiente en relación a su disposición anatómica y la lesión.
7. El hipocampo muestra una mayor susceptibilidad inflamatoria a la cirugía Sham y al ApNO que otras RRSNC.

### General:

8. Para el análisis experimental de cualquier tejido del SNC donde sea de interés aislar la respuesta del ApNO, o cualquier otra lesión, del efecto de la cirugía en sí, se debería usar un animal Sham como control.

### Response in Sham:

1. Sham surgery alone is sufficient to modify the gene expression of inflammatory and glial markers in both retinas. The retina of the exposed optic nerve without crushing shows an earlier and more pronounced pro-inflammatory reaction compared to the contralateral fellow retina.
2. Sham surgery generates a molecular inflammatory and glial response not only in superior colliculi (SCi) but also in all remote regions of CNS (RRCNS), outside the visual pathway. Furthermore, an increase of area occupied by GFAP is observed in both SCi.
3. Optic Nerve Crush (ONC) generates a greater response in both SCi when compared to Sham surgery. However, ONC does not markedly alter the apoptosis, glial or inflammatory reaction that were already induced by Sham surgery in the RRCNS.

### Response in ONC:

4. The inflammatory and glial response becomes evident from the first day after ONC in both retinas, although it persists for a longer duration in the injured retina. The macroglial reaction is exclusive to the injured retina while the microglial response is observed in both.
5. ONC elicits a more pronounced response in the contralateral SCi, characterized by microglial reactivation and an pro-inflammatory response that ultimately leads to apoptosis.
6. The glial and inflammatory response in visual pathway (retina and SCi) occurs in correlation with the connection between axotomized retinal ganglion cells and both retinas or retino-recipient SCi. Outside the visual pathway (RRCNS), the reaction is more widespread and may follow a gradient depending on the anatomical distance to the lesion.
7. The hippocampus exhibits greater susceptibility to inflammatory responses induced by both Sham surgery and ONC compared to other RRCNS.

### General:

8. In the experimental analysis of any CNS tissue where isolating the response of ApNO or any other lesion from the effect of the surgery itself is of interest, a Sham control should be used.

# 7.BIBLIOGRAFÍA

## A

- Abbott, C. J., Choe, T. E., Burgoyne, C. F., Cull, G., Wang, L., & Fortune, B. (2014). Comparison of retinal nerve fiber layer thickness in vivo and axonal transport after chronic intraocular pressure elevation in young versus older rats. *PLoS One*, *9*(12), e114546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114546>
- Abbott, C. J., Choe, T. E., Lusardi, T. A., Burgoyne, C. F., Wang, L., & Fortune, B. (2014). Evaluation of retinal nerve fiber layer thickness and axonal transport 1 and 2 weeks after 8 hours of acute intraocular pressure elevation in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(2), 674-687. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12811>
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, *37*(1), 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Agudo, M., Pérez-Marín, M. C., Lönnngren, U., Sobrado, P., Conesa, A., Cánovas, I., Salinas-Navarro, M., Miralles-Imperial, J., Hallböök, F., & Vidal-Sanz, M. (2008). Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Molecular Vision*, *14*, 1050-1063.
- Agudo, M., Pérez-Marín, M. C., Sobrado-Calvo, P., Lönnngren, U., Salinas-Navarro, M., Cánovas, I., Nadal-Nicolás, F. M., Miralles-Imperial, J., Hallböök, F., & Vidal-Sanz, M. (2009). Immediate upregulation of proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *50*(1), 424-431. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2404>
- Agudo-Barriso, M., Lahoz, A., Nadal-Nicolás, F. M., Sobrado-Calvo, P., Piquer-Gil, M., Díaz-Llopis, M., Vidal-Sanz, M., & Mullor, J. L. (2013). Metabolomic changes in the rat retina after optic nerve crush. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *54*(6), 4249-4259. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11451>
- Akhmetzyanova, E., Kletenkov, K., Mukhamedshina, Y., & Rizvanov, A. (2019a). 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>
- Akhmetzyanova, E., Kletenkov, K., Mukhamedshina, Y., & Rizvanov, A. (2019b). Different Approaches to Modulation of Microglia Phenotypes After Spinal Cord Injury. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsys.2019.00037>
- Almasieh, M., Wilson, A. M., Morquette, B., Cueva Vargas, J. L., & Di Polo, A. (2012). The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, *31*(2), 152-181. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.002>
- Alves de Lima, K., Rustenhoven, J., & Kipnis, J. (2020). Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*, *38*, 597-620. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102319-103410>
- Amatya, B., Young, J., & Khan, F. (2018). Non-pharmacological interventions for chronic pain in multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *12*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012622.pub2>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (Eds.). (2006). *The Hippocampus Book*.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, *468*(7323), 557-561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Avellaneda-Chevrier, V. K., Wang, X., Hooper, M. L., & Chauhan, B. C. (2015). The retino-retinal projection: Tracing retinal ganglion cells projecting to the contralateral retina. *Neuroscience Letters*, *591*, 105-109. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.033>
- Azhar, M., Yin, M., Bommireddy, R., Duffy, J. J., Yang, J., Pawlowski, S. A., Boivin, G. P., Engle, S. J., Sanford, L. P., Grisham, C., Singh, R. R., Babcock, G. F., & Doetschman, T. (2009). Generation of Mice With a Conditional Allele for Transforming Growth Factor beta 1 Gene. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *47*(6), 423-431. <https://doi.org/10.1002/dvg.20516>

## B

- Badea, T. C., & Nathans, J. (2011). Morphologies of mouse retinal ganglion cells expressing transcription factors Brn3a, Brn3b, and Brn3c: Analysis of wild type and mutant cells using genetically-directed sparse labeling. *Vision Research*, *51*(2), 269-279. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2010.08.039>
- Bai, X.-J., Hao, L., Guo, Y.-E., Shi, X.-B., & Wu, W.-P. (2021). Bone marrow stromal cells reverse the microglia type from pro-inflammatory tumour necrosis factor a microglia to anti-inflammatory Cd206 microglia of middle cerebral artery occlusion rats through triggering secretion of CX3CL1. *Folia Neuropathologica*, *59*(1), 20-31. <https://doi.org/10.5114/fn.2021.105129>
- Banasr, M., Soumier, A., Hery, M., Mocaër, E., & Daszuta, A. (2006). Agomelatine, a New Antidepressant, Induces Regional Changes in Hippocampal Neurogenesis. *Biological Psychiatry*, *59*(11), 1087-1096. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.11.025>
- Barron, K. D., Dentinger, M. P., Krohel, G., Easton, S. K., & Mankes, R. (1986). Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital

- optic nerve crush. *Journal of Neurocytology*, 15(3), 345-362. <https://doi.org/10.1007/BF01611437>
- Belle, L., Zhou, V., Stuhr, K. L., Beatka, M., Siebers, E. M., Knight, J. M., Lawlor, M. W., Weaver, C., Hashizume, M., Hillard, C. J., & Drobyski, W. R. (2017). Host interleukin 6 production regulates inflammation but not tryptophan metabolism in the brain during murine GVHD. *JCI Insight*, 2(14), e93726, 93726. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93726>
- Berard, J. L., Zarruk, J. G., Arbour, N., Prat, A., Yong, V. W., Jacques, F. H., Akira, S., & David, S. (2012). Lipocalin 2 is a novel immune mediator of experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis and is modulated in multiple sclerosis. *Glia*, 60(7), 1145-1159. <https://doi.org/10.1002/glia.22342>
- Berg, A. T. (2008). The natural history of mesial temporal lobe epilepsy. *Current Opinion in Neurology*, 21(2), 173-178. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3282f36ccd>
- Bergles, D. E., Roberts, J. D., Somogyi, P., & Jahr, C. E. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*, 405(6783), 187-191. <https://doi.org/10.1038/35012083>
- Betlazar, C., Harrison-Brown, M., Middleton, R., Banati, R., & Liu, G.-J. (2018). Cellular Sources and Regional Variations in the Expression of the Neuroinflammatory Marker Translocator Protein (Tspo) in the Normal Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2707. <https://doi.org/10.3390/ijms19092707>
- Bien, C. G., Urbach, H., Schramm, J., Soeder, B. M., Becker, A. J., Voltz, R., Vincent, A., & Elger, C. E. (2007). Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology*, 69(12), 1236-1244. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000276946.08412.ef>
- Block, F., Dihné, M., & Loos, M. (2005). Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Progress in Neurobiology*, 75(5), 342-365. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.03.004>
- Bodeutsch, N., Siebert, H., Dermon, C., & Thanos, S. (1999). Unilateral injury to the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. *Journal of Neurobiology*, 38(1), 116-128. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(199901\)38:1<116::aid-neu9>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199901)38:1<116::aid-neu9>3.0.co;2-f)
- Bodnar, C. N., Watson, J. B., Higgins, E. K., Quan, N., & Bachstetter, A. D. (2021). Inflammatory Regulation of CNS Barriers After Traumatic Brain Injury: A Tale Directed by Interleukin-1. *Frontiers in Immunology*, 12, 688254. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.688254>
- Boia, R., Ruzafa, N., Aires, I. D., Pereiro, X., Ambrósio, A. F., Vecino, E., & Santiago, A. R. (2020). Neuroprotective Strategies for Retinal Ganglion Cell Degeneration: Current Status and Challenges Ahead. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2262. <https://doi.org/10.3390/ijms21072262>
- Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*, 214(2), 149-160. <https://doi.org/10.1002/path.2287>
- Brandi, E., Torres-Garcia, L., Svanbergsson, A., Haikal, C., Liu, D., Li, W., & Li, J.-Y. (2022). Brain region-specific microglial and astrocytic activation in response to systemic lipopolysaccharides exposure. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 910988. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.910988>
- Brandt, C., & Pedersen, B. K. (2010). The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 520258. <https://doi.org/10.1155/2010/520258>
- Brionne, T. C., Tesseur, I., Masliah, E., & Wyss-Coray, T. (2003). Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron*, 40(6), 1133-1145. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00766-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00766-9)
- Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J.-M., King, N. E., Howells, D. W., & Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 282. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282>
- Bunt, S. M., Lund, R. D., & Land, P. W. (1983). Prenatal development of the optic projection in albino and hooded rats. *Brain Research*, 282(2), 149-168. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(83\)90093-7](https://doi.org/10.1016/0165-3806(83)90093-7)
- Burudi, E. M., Riese, S., Stahl, P. D., & Régnier-Vigouroux, A. (1999). Identification and functional characterization of the mannose receptor in astrocytes. *Glia*, 25(1), 44-55. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(19990101\)25:1<44::aid-glia5>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(19990101)25:1<44::aid-glia5>3.0.co;2-c)
- Butt, A. M., Duncan, A., Hornby, M. F., Kirvell, S. L., Hunter, A., Levine, J. M., & Berry, M. (1999). Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. *Glia*, 26(1), 84-91.
- Butt, A. M., Hamilton, N., Hubbard, P., Pugh, M., & Ibrahim, M. (2005). Synantocytes: The fifth element. *Journal of Anatomy*, 207(6), 695-706. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00458.x>
- Butt, A. M., Jones, H. C., & Abbott, N. J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: A developmental study. *The Journal of Physiology*, 429, 47-62.

### C

Cajal, S. R. y. (1889). *Manual de Histología normal y técnica micrográfica*.

- Cajal, S. R. y, Cuenca, N., & Polo, P. de la V. (2021). *La retina de los vertebrados*.
- Cang, J., Savier, E., Barchini, J., & Liu, X. (2018). Visual Function, Organization, and Development of the Mouse Superior Colliculus. *Annual Review of Vision Science*, 4(1), 239-262. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034142>
- Carson, M. J. (2002). Microglia as Liaisons Between the Immune and Central Nervous Systems: Functional Implications for Multiple Sclerosis. *Glia*, 40(2), 218-231. <https://doi.org/10.1002/glia.10145>
- Carson, M. J., Reilly, C. R., Sutcliffe, J. G., & Lo, D. (1999). Disproportionate Recruitment of CD8+ T Cells into the Central Nervous System by Professional Antigen-Presenting Cells. *The American Journal of Pathology*, 154(2), 481-494.
- Casson, R. J., Chidlow, G., Wood, J. P. M., Vidal-Sanz, M., & Osborne, N. N. (2004). The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(2), 685-693. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0674>
- Caston, J., Lalonde, R., Delhaye-Bouchaud, N., & Mariani, J. (1998). The cerebellum and postural sensorimotor learning in mice and rats. *Behavioural Brain Research*, 95(1), 17-22. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)00205-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)00205-2)
- Castro Dias, M., Mapunda, J. A., Vladymyrov, M., & Engelhardt, B. (2019). Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5372. <https://doi.org/10.3390/ijms20215372>
- Chandrasekaran, A. R., Shah, R. D., & Crair, M. C. (2007). Developmental homeostasis of mouse retinocollicular synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(7), 1746-1755. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4383-06.2007>
- Chauhan, B. C., Stevens, K. T., Levesque, J. M., Nuschke, A. C., Sharpe, G. P., O'Leary, N., Archibald, M. L., & Wang, X. (2012). Longitudinal in vivo imaging of retinal ganglion cells and retinal thickness changes following optic nerve injury in mice. *PloS One*, 7(6), e40352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040352>
- Chen, D., Peng, C., Ding, X.-M., Wu, Y., Zeng, C.-J., Xu, L., & Guo, W.-Y. (2022). Interleukin-4 promotes microglial polarization toward a neuroprotective phenotype after retinal ischemia/reperfusion injury. *Neural Regeneration Research*, 17(12), 2755-2760. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.339500>
- Chen, H., & Weber, A. J. (2002). Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Müller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor. *Glia*, 38(2), 115-125. <https://doi.org/10.1002/glia.10061>
- Chen, L., Yang, P., & Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocular Immunology and Inflammation*, 10(1), 27-39. <https://doi.org/10.1076/ocii.10.1.27.10328>
- Chen, L., Zhao, Y., & Zhang, H. (2016). Comparative Anatomy of the Trabecular Meshwork, the Optic Nerve Head and the Inner Retina in Rodent and Primate Models Used for Glaucoma Research. *Vision (Basel, Switzerland)*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.3390/vision1010004>
- Chen, L., Zhu, L., Lu, D., Wu, Z., Han, Y., Xu, P., Chang, L., & Wu, Q. (2020). Interleukin 4 Affects Epilepsy by Regulating Glial Cells: Potential and Possible Mechanism. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 554547. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.554547>
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.-V., Celador, I. L., 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>
- Chidlow, G., Wood, J. P. M., Ebner, A., & Casson, R. J. (2012). Interleukin-6 is an efficacious marker of axonal transport disruption during experimental glaucoma and stimulates neuritogenesis in cultured retinal ganglion cells. *Neurobiology of Disease*, 48(3), 568-581. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.07.026>
- Choe, T. E., Abbott, C. J., Piper, C., Wang, L., & Fortune, B. (2014). Comparison of longitudinal in vivo measurements of retinal nerve fiber layer thickness and retinal ganglion cell density after optic nerve transection in rat. *PloS One*, 9(11), e113011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113011>
- Claes, M., Geeraerts, E., Plaisance, S., Mentens, S., Van den Haute, C., De Groef, L., Arckens, L., & Moons, L. (2022). Chronic Chemogenetic Activation of the Superior Colliculus in Glaucomatous Mice: Local and Retrograde Molecular Signature. *Cells*, 11(11), 1784. <https://doi.org/10.3390/cells11111784>
- Conde-Blanco, E., Pascual-Diaz, S., Carreño, M., Muñoz-Moreno, E., Pariente, J. C., Boget, T., Manzanares, I., Donaire, A., Centeno, M., Graus, F., & Bargalló, N. (2021). Volumetric and shape analysis of the hippocampus in temporal lobe epilepsy with GAD65 antibodies compared with non-immune epilepsy. *Scientific Reports*, 11(1), 10199. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89010-z>
- Cooper, M. L., Pasini, S., Lambert, W. S., D'Alessandro, K. B., Yao, V., Risner, M. L., & Calkins, D. J. (2020). Redistribution of metabolic resources through astrocyte networks mitigates neurodegenerative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(31), 18810-18821. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009425117>



- Crish, S. D., Sappington, R. M., Inman, D. M., Horner, P. J., & Calkins, D. J. (2010). Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(11), 5196-5201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913141107>
- Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., & Lobo, C. (2011). Blood-retinal barrier. *European Journal of Ophthalmology*, *21 Suppl 6*, S3-9. <https://doi.org/10.5301/EJO.2010.6049>
- Cunningham, E. T., Kilmartin, D., Agarwal, M., & Zierhut, M. (2017). Sympathetic Ophthalmia. *Ocular Immunology and Inflammation*, *25*(2), 149-151. <https://doi.org/10.1080/09273948.2017.1305727>

## D

- da Cunha Sousa, L. F., Coelho, F. M., Rodrigues, D. H., Campos, A. C., da Silva Barcelos, L., Teixeira, M. M., Alvarenga Rachid, M., & Teixeira, A. L. (2013). Blockade of *Cxcr1/2* chemokine receptors protects against brain damage in ischemic stroke in mice. *Clinics*. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(03\)OA17](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(03)OA17)
- Dalmau, J., Gleichman, A. J., Hughes, E. G., Rossi, J. E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S. K., Rosenfeld, M. R., Balice-Gordon, R., & Lynch, D. R. (2008). Anti-NMDA-receptor encephalitis: Case series and analysis of the effects of antibodies. *The Lancet. Neurology*, *7*(12), 1091-1098. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70224-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70224-2)
- Danik, M., Puma, C., Quirion, R., & Williams, S. (2003). Widely expressed transcripts for chemokine receptor *Cxcr1* in identified glutamatergic, gamma-aminobutyric acidergic, and cholinergic neurons and astrocytes of the rat brain: A single-cell reverse transcription-multiplex polymerase chain reaction study. *Journal of Neuroscience Research*, *74*(2), 286-295. <https://doi.org/10.1002/jnr.10744>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, *8*(6), 752-758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- De Biase, L. M., Schuebel, K. E., Fusfeld, Z. H., Jair, K., Hawes, I. A., Cimbrotto, R., Zhang, H.-Y., Liu, Q.-R., Shen, H., Xi, Z.-X., Goldman, D., & Bonci, A. (2017). Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. *Neuron*, *95*(2), 341-356.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.020>
- de Haas, A. H., Boddeke, H. W. G. M., & Biber, K. (2008). Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia*, *56*(8), 888-894. <https://doi.org/10.1002/glia.20663>
- de Hoz, R., Gallego, B. I., Ramírez, A. I., Rojas, B., Salazar, J. J., Valiente-Soriano, F. J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083733>
- Dekens, D. W., Eisel, U. L. M., Gouweleeuw, L., Schoemaker, R. G., De Deyn, P. P., & Naudé, P. J. W. (2021). Lipocalin 2 as a link between ageing, risk factor conditions and age-related brain diseases. *Ageing Research Reviews*, *70*, 101414. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101414>
- Demeurisse, G., Capon, A., Verhas, M., & Attig, E. (1990). Pathogenesis of aphasia in deep-seated lesions: Likely role of cortical diaschisis. *European Neurology*, *30*(2), 67-74. <https://doi.org/10.1159/000117313>
- Denaro, S., D'Aprile, S., Alberghina, C., Pavone, A. M., Torrisi, F., Giallongo, S., Longhitano, L., Mannino, G., Lo Furno, D., Zappalà, A., Giuffrida, R., Tibullo, D., Li Volti, G., Vicario, N., & Parenti, R. (2022). Neurotrophic and immunomodulatory effects of olfactory ensheathing cells as a strategy for neuroprotection and regeneration. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1098212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1098212>
- Dhandapani, K. M., & Brann, D. W. (2003). Transforming growth factor-beta: A neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *39*(1), 13-22. <https://doi.org/10.1385/CBB:39:1:13>
- Dibas, A., Oku, H., Fukuhara, M., Kurimoto, T., Ikeda, T., Patil, R. V., Sharif, N. A., & Yorio, T. (2010). Changes in ocular aquaporin expression following optic nerve crush. *Molecular Vision*, *16*, 330-340.
- Domenici, L., Gravina, A., Berardi, N., & Maffei, L. (1991). Different effects of intracranial and intraorbital section of the optic nerve on the functional responses of rat retinal ganglion cells. *Experimental Brain Research*, *86*(3), 579-584. <https://doi.org/10.1007/BF00230531>
- Dong, Y., Lozinski, B. M., Silva, C., & Yong, V. W. (2021). Studying the microglia response to oxidized phosphatidylcholine in primary mouse neuron culture and mouse spinal cord. *STAR Protocols*, *2*(4), 100853. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100853>
- Dos Santos, S. E., Medeiros, M., Porfirio, J., Tavares, W., Pessôa, L., Grinberg, L., Leite, R. E. P., Ferretti-Rebustini, R. E. L., Suemoto, C. K., Filho, W. J., Noctor, S. C., Sherwood, C. C., Kaas, J. H., Manger, P. R., & Herculano-Houzel, S. (2020). Similar Microglial Cell Densities across Brain Structures and Mammalian Species: Implications for Brain Tissue Function. *The*

*Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 40(24), 4622-4643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2339-19.2020>

- Dowling, J. E. (2012). *The Retina: An Approachable Part of the Brain, Revised Edition*.
- Du, S.-H., Qiao, D.-F., Chen, C.-X., Chen, S., Liu, C., Lin, Z., Wang, H., & Xie, W.-B. (2017). Toll-Like Receptor 4 Mediates Methamphetamine-Induced Neuroinflammation through Caspase-11 Signaling Pathway in Astrocytes. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 409. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00409>
- Du, S.-H., Zhang, W., Yue, X., Luo, X.-Q., Tan, X.-H., Liu, C., Qiao, D.-F., & Wang, H. (2018). Role of *Cxcr1* and Interleukin-8 in Methamphetamine-Induced Neuronal Apoptosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 230. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00230>
- Durafourt, B. A., Moore, C. S., Zammit, D. A., Johnson, T. A., Zaguia, F., Guiot, M.-C., Bar-Or, A., & Antel, J. P. (2012). Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, 60(5), 717-727. <https://doi.org/10.1002/glia.22298>

## E

- Echeverry, S., Shi, X. Q., Rivest, S., & Zhang, J. (2011). Peripheral nerve injury alters blood-spinal cord barrier functional and molecular integrity through a selective inflammatory pathway. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(30), 10819-10828. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1642-11.2011>
- Ellis, E. M., Gauvain, G., Sivyer, B., & Murphy, G. J. (2016). Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. *Journal of Neurophysiology*, 116(2), 602-610. <https://doi.org/10.1152/jn.00227.2016>
- Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 31(4), 497-511. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0>
- Engelhardt, B., Wolburg-Buchholz, K., & Wolburg, H. (2001). Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *Microscopy Research and Technique*, 52(1), 112-129. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010101\)52:1<112::AID-JEMT13>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010101)52:1<112::AID-JEMT13>3.0.CO;2-5)
- Erickson, M. A., & Banks, W. A. (2018). Neuroimmune Axes of the Blood-Brain Barriers and Blood-Brain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions. *Pharmacological Reviews*, 70(2), 278-314. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014647>
- Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1254-1266. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>
- Ezaki, J., Shimada, R., Shibuya, M., & Kibayashi, K. (2016). Hippocampal neuronal degeneration in the traumatic brain injury mouse: Non-trivial effect of scalp incision. *Neurological Research*, 38(11), 994-1002. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1228746>

## F

- Fan, W., Mai, L., Zhu, X., Huang, F., & He, H. (2020). The Role of Microglia in Perioperative Neurocognitive Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 261. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00261>
- Feng, Q., Wang, Y. I., & Yang, Y. (2015). Neuroprotective effect of interleukin-6 in a rat model of cerebral ischemia. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(5), 1695-1701. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2363>
- Fernández-Albarral, J. A., de Hoz, R., Matamoros, J. A., Chen, L., López-Cuenca, I., Salobar-García, E., Sánchez-Puebla, L., Ramírez, J. M., Triviño, A., Salazar, J. J., & Ramírez, A. I. (2022). Retinal Changes in Astrocytes and Müller Glia in a Mouse Model of Laser-Induced Glaucoma: A Time-Course Study. *Biomedicines*, 10(5), 939. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050939>
- Fernández-Albarral, J. A., Salazar, J. J., de Hoz, R., Marco, E. M., Martín-Sánchez, B., Flores-Salguero, E., Salobar-García, E., López-Cuenca, I., Barrios-Sabador, V., Avilés-Trigueros, M., Valiente-Soriano, F. J., Miralles de Imperial-Ollero, J. A., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., Ramírez, J. M., López-Gallardo, M., & Ramírez, A. I. (2021). Retinal Molecular Changes Are Associated with Neuroinflammation and Loss of RGCs in an Experimental Model of Glaucoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2066. <https://doi.org/10.3390/ijms22042066>
- Ferreira, A. C., Dá Mesquita, S., Sousa, J. C., Correia-Neves, M., Sousa, N., Palha, J. A., & Marques, F. (2015). From the periphery to the brain: Lipocalin-2, a friend or foe? *Progress in Neurobiology*, 131, 120-136. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.06.005>
- Finger, S., Koehler, P. J., & Jagella, C. (2004). The Monakow concept of diaschisis: Origins and perspectives. *Archives of Neurology*, 61(2), 283-288. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.2.283>
- Finsen, B. R., Jørgensen, M. B., Diemer, N. H., & Zimmer, J. (1993). Microglial MHC antigen expression after ischemic and kainic acid lesions of the adult rat hippocampus. *Glia*, 7(1), 41-49. <https://doi.org/10.1002/glia.440070109>

- Fischer, D. (2017). Hyper-IL-6: A potent and efficacious stimulator of RGC regeneration. *Eye (London, England)*, 31(2), 173-178. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.234>
- Flynn, G., Maru, S., Loughlin, J., Romero, I. A., & Male, D. (2003). Regulation of chemokine receptor expression in human microglia and astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 136(1-2), 84-93. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(03\)00009-2](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(03)00009-2)
- Fujihara, K., Bennett, J. L., de Seze, J., Haramura, M., Kleiter, I., Weinschenker, B. G., Kang, D., Mughal, T., & Yamamura, T. (2020). Interleukin-6 in neuromyelitis optica spectrum disorder pathophysiology. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 7(5), e841. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000841>

## G

- Gadani, S. P., Cronk, J. C., Norris, G. T., & Kipnis, J. (2012). Interleukin-4: A Cytokine to Remember. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(9), 4213-4219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202246>
- Gale, S. D., & Murphy, G. J. (2014). Distinct representation and distribution of visual information by specific cell types in mouse superficial superior colliculus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(40), 13458-13471. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2768-14.2014>
- Galea, I. (2021). The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(11), 2489-2501. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00757-x>
- Galindo-Romero, C., Avilés-Trigueros, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2011a). Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: Quantitative and topographic time course analyses. *Experimental Eye Research*, 92(5), 377-387. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.02.008>
- Galindo-Romero, C., Avilés-Trigueros, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2011b). Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: Quantitative and topographic time course analyses. *Experimental Eye Research*, 92(5), 377-387. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.02.008>
- Galindo-Romero, C., Valiente-Soriano, F. J., Jiménez-López, M., García-Ayuso, D., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2013a). Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(2), 974-985. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11207>
- Galindo-Romero, C., Valiente-Soriano, F. J., Jiménez-López, M., García-Ayuso, D., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2013b). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(2), 974-985. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11207>
- 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>
- Gallego-Ortega, A., Norte-Muñoz, M., Miralles de Imperial-Ollero, J. A., Bernal-Garro, J. M., Valiente-Soriano, F. J., de la Villa Polo, P., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2020). Functional and morphological alterations in a glaucoma model of acute ocular hypertension. *Progress in Brain Research*, 256(1), 1-29. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2020.07.003>
- Garbers, C., Heink, S., Korn, T., & Rose-John, S. (2018). Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 17(6), 395-412. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.45>
- García, M., & Vecino, E. (2003). Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histology and Histopathology*, 18(4), 1205-1218. <https://doi.org/10.14670/HH-18.1205>
- García-Marín, V., García-López, P., & Freire, M. (2007). Cajal's contributions to glia research. *Trends in Neurosciences*, 30(9), 479-487. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.008>
- Gardner, T. W., Lieth, E., Khin, S. A., Barber, A. J., Bonsall, D. J., Leshner, T., Rice, K., & Brennan, W. A. (1997). Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38(11), 2423-2427.
- Geng, X., & Yang, B. (2017). Transport Characteristics of Aquaporins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 969, 51-62. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_3)
- Gherzi-Egea, J.-F., Strazielle, N., Catala, M., Silva-Vargas, V., Doetsch, F., & Engelhardt, B. (2018). Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 135(3), 337-361. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1807-1>
- Ghosh, A. (2010). Brain APCs including microglia are only differential and positional polymorphs. *Annals of Neurosciences*, 17(4), 191-199. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.1017410>

- Gilbert, K. M., Thoman, M., Bauche, K., Pham, T., & Weigle, W. O. (1997). Transforming growth factor-beta 1 induces antigen-specific unresponsiveness in naive T cells. *Immunological Investigations*, 26(4), 459-472. <https://doi.org/10.3109/08820139709022702>
- Gleiser, C., Wagner, A., Fallier-Becker, P., Wolburg, H., Hirt, B., & Mack, A. F. (2016). Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory Organs-A Comparative Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1411. <https://doi.org/10.3390/ijms17091411>
- Goczalik, I., Ulbricht, E., Hollborn, M., Raap, M., Uhlmann, S., Weick, M., Pannicke, T., Wiedemann, P., Bringmann, A., Reichenbach, A., & Francke, M. (2008). Expression of CXCL8, *Cxcr1*, and CXCR2 in Neurons and Glial Cells of the Human and Rabbit Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(10), 4578-4589. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-1887>
- Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N., & Strong, R. K. (2002). The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell*, 10(5), 1033-1043. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00708-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00708-6)
- Goldmann, T., & Prinz, M. (2013). Role of Microglia in CNS Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 208093. <https://doi.org/10.1155/2013/208093>
- Goldstein, G. W., & Betz, A. L. (1986). The blood-brain barrier. *Scientific American*, 255(3), 74-83. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0986-74>
- González-Aguado, E., Martí-Fábregas, J., & Martí-Vilalta, J. L. (2000). [The phenomenon of diaschisis in cerebral vascular disease]. *Revista De Neurología*, 30(10), 941-945.
- González-Riquelme, M. J., Galindo-Romero, C., Lucas-Ruiz, F., Martínez-Carmona, M., Rodríguez-Ramírez, K. T., Cabrera-Maqueda, J. M., Norte-Muñoz, M., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barrisuso, M. (2021). Axonal Injuries Cast Long Shadows: Long Term Glial Activation in Injured and Contralateral Retinas after Unilateral Axotomy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8517. <https://doi.org/10.3390/ijms22168517>
- González-Riquelme, M. J., Lucas-Ruiz, F., Galindo-Romero, C., Boia, R., Ambrósio, A. F., Vidal-Sanz, M., Raquel Santiago, A., & Agudo-Barrisuso, M. (2023). Comparative Analysis of Retinal Organotypic Cultures and In Vivo Axotomized Retinas. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3481. <https://doi.org/10.3390/ijms24043481>
- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E., & Saper, C. B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nature Neuroscience*, 4(12), 1165. <https://doi.org/10.1038/nn768>
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Baillie, J. K., Stevens, M. P., Freeman, T. C., Summers, K. M., & McColl, B. W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience*, 19(3), 504-516. <https://doi.org/10.1038/nn.4222>
- Graw, J. (2010). Eye development. *Current Topics in Developmental Biology*, 90, 343-386. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)90010-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)90010-0)
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5684), 626-629. <https://doi.org/10.1126/science.1099320>
- Greene, C., & Campbell, M. (2016). Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue Barriers*, 4(1), e1138017. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1138017>
- Gust, J., Hay, K. A., Hanafi, L.-A., Li, D., Myerson, D., Gonzalez-Cuyar, L. F., Yeung, C., Liles, W. C., Wurfel, M., Lopez, J. A., Chen, J., Chung, D., Harju-Baker, S., Özpölat, T., Fink, K. R., Riddell, S. R., Maloney, D. G., & Turtle, C. J. (2017). Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discovery*, 7(12), 1404-1419. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0698>

## H

- Haddad-Tóvolli, R., Dragano, N. R. V., Ramalho, A. F. S., & Velloso, L. A. (2017). Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 224. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00224>
- Hamadi, N., Sheikh, A., Madjid, N., Lubbad, L., Amir, N., Shehab, S. A.-D. S., Khelifi-Touhami, F., & Adem, A. (2016). Increased pro-inflammatory cytokines, glial activation and oxidative stress in the hippocampus after short-term bilateral adrenalectomy. *BMC Neuroscience*, 17(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0296-1>
- Hamo, L., Stohlmán, S. A., Otto-Duessel, M., & Bergmann, C. C. (2007). Distinct regulation of MHC molecule expression on astrocytes and microglia during viral encephalomyelitis. *Glia*, 55(11), 1169-1177. <https://doi.org/10.1002/glia.20538>
- Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), RC191. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-j0002.2002>

- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1065-1070. <https://doi.org/10.1126/science.1069609>
- Hausmann, O. N. (2003). Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, 41(7), 369-378. <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101483>
- Hendrickx, D. A. E., van Eden, C. G., Schuurman, K. G., Hamann, J., & Huitinga, I. (2017). Staining of HLA-DR, Iba1 and Cd68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *Journal of Neuroimmunology*, 309, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.04.007>
- Hendry, I. A. (1975). The effects of axotomy on the development of the rat superior cervical ganglion. *Brain Research*, 90(2), 235-244. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90304-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90304-2)
- Hickey, W. F., & Kimura, H. (1987). Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(7), 2082-2086. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.2082>
- Hickey, W. F., & Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4837), 290-292. <https://doi.org/10.1126/science.3276004>
- Hill, C. S., Coleman, M. P., & Menon, D. K. (2016). Traumatic Axonal Injury: Mechanisms and Translational Opportunities. *Trends in Neurosciences*, 39(5), 311-324. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.03.002>
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Honrubia, F. M., & Elliott, J. H. (1968). Efferent Innervation of the Retina: I. Morphologic Study of the Human Retina. *Archives of Ophthalmology*, 80(1), 98-103. <https://doi.org/10.1001/archophth.1968.00980050100017>
- Horie, S., Robbie, S. J., Liu, J., Wu, W.-K., Ali, R. R., Bainbridge, J. W., Nicholson, L. B., Mochizuki, M., Dick, A. D., & 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>
- Huang, Y., Xu, Z., Xiong, S., Qin, G., Sun, F., Yang, J., Yuan, T.-F., Zhao, L., Wang, K., Liang, Y.-X., Fu, L., Wu, T., So, K.-F., Rao, Y., & Peng, B. (2018). Dual extra-retinal origins of microglia in the model of retinal microglia repopulation. *Cell Discovery*, 4, 9. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0011-8>
- Hubbard, J. A., Szu, J. I., & Binder, D. K. (2018). The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Research Bulletin*, 136, 118-129. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.011>
- Hubel, D. H. (2000). *Ojo, cerebro y visión*.
- Huber, J. D., Egleton, R. D., & Davis, T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 24(12), 719-725. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)02004-x](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)02004-x)
- Hvidberg, V., Jacobsen, C., Strong, R. K., Cowland, J. B., Moestrup, S. K., & Borregaard, N. (2005). The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Letters*, 579(3), 773-777. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.031>
- Hvingelby, V. S., Bjarkam, C. R., Mathiesen, T. I., Poulsen, F. R., Bøtker, M. T., Husted, A., & Korshøj, A. R. (2022). The prognostic significance of biomarkers in cerebrospinal fluid following severe traumatic brain injury: A systematic review and meta-analysis. *Neurosurgical Review*, 45(4), 2547-2564. <https://doi.org/10.1007/s10143-022-01786-4>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 57(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0)
- Ito, M. (2006). Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Progress in Neurobiology*, 78(3-5), 272-303. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.02.006>
- Ito, M. (2008). Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(4), 304-313. <https://doi.org/10.1038/nrn2332>
- Ito, S., & Feldheim, D. A. (2018). The Mouse Superior Colliculus: An Emerging Model for Studying Circuit Formation and Function. *Frontiers in Neural Circuits*, 12, 10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00010>
- Iwata, Y., Inagaki, S., Morozumi, W., Nakamura, S., Hara, H., & Shimazawa, M. (2021). Treatment with GDF15, a TGFβ superfamily protein, induces protective effect on retinal ganglion cells. *Experimental Eye Research*, 202, 108338. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108338>

J

- Jang, E., Kim, J.-H., Lee, S., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Jin, M., Lee, M.-G., Jang, I.-S., Lee, W.-H., & Suk, K. (2013). Phenotypic polarization of activated astrocytes: The critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(10), 5204-5219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301637>
- Jang, E., Lee, S., Kim, J.-H., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Lee, W.-H., Mori, K., Nakao, K., & Suk, K. (2013). Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *27*(3), 1176-1190. <https://doi.org/10.1096/fj.12-222257>
- Jensen, M. B., Hegelund, I. V., Poulsen, F. R., Owens, T., Zimmer, J., & Finsen, B. (1999). Microglial reactivity correlates to the density and the myelination of the anterogradely degenerating axons and terminals following perforant path denervation of the mouse fascia dentata. *Neuroscience*, *93*(2), 507-518. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00139-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00139-6)
- 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), e30763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030763>
- Jure, I., De Nicola, A. F., Encinas, J. M., & Labombarda, F. (2022). Spinal Cord Injury Leads to Hippocampal Glial Alterations and Neural Stem Cell Inactivation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *42*(1), 197-215. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00900-8>

## K

- Kanamori, A., Nakamura, M., Nakanishi, Y., Yamada, Y., & Negi, A. (2005). Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Experimental Eye Research*, *81*(1), 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.01.012>
- Kaplan, M. R., Cho, M. H., Ullian, E. M., Isom, L. L., Levinson, S. R., & Barres, B. A. (2001). Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron*, *30*(1), 105-119. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00266-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00266-5)
- Karlstetter, M., Nothdurfter, C., Aslanidis, A., Moeller, K., Horn, F., Scholz, R., Neumann, H., Weber, B. H. F., Rupprecht, R., & Langmann, T. (2014). Translocator protein (18 kDa) (*Tspo*) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis. *Journal of Neuroinflammation*, *11*, 3. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-3>
- Kasi, A., Faiq, M. A., & Chan, K. C. (2019). In vivo imaging of structural, metabolic and functional brain changes in glaucoma. *Neural Regeneration Research*, *14*(3), 446-449. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.243712>
- Kaur, C., Rathnasamy, G., & Ling, E.-A. (2013). Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, *8*(1), 66-78. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9347-2>
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2011). [Neuroglia—Living nerve glue]. *Fortschritte Der Neurologie-Psychiatrie*, *79*(10), 588-597. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1281704>
- Kim, H., Lee, E.-J., Lim, Y.-M., & Kim, K.-K. (2022). Glial Fibrillary Acidic Protein in Blood as a Disease Biomarker of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Frontiers in Neurology*, *13*, 865730. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.865730>
- Kim, J., Choi, Y., Ahn, M., Ekanayake, P., Tanaka, A., Matsuda, H., & Shin, T. (2019). Microglial and astroglial reaction in the olfactory bulb of mice after Triton X-100 application. *Acta Histochemica*, *121*(5), 546-552. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.04.003>
- Kim, J.-H., Ko, P.-W., Lee, H.-W., Jeong, J.-Y., Lee, M.-G., Kim, J.-H., Lee, W.-H., Yu, R., Oh, W.-J., & Suk, K. (2017). Astrocyte-derived lipocalin-2 mediates hippocampal damage and cognitive deficits in experimental models of vascular dementia. *Glia*, *65*(9), 1471-1490. <https://doi.org/10.1002/glia.23174>
- Klee, K., Storti, F., Barben, M., Samardzija, M., Langmann, T., Dunaief, J., & Grimm, C. (2019). Systemic knockout of *Tspo* in mice does not affect retinal morphology, function and susceptibility to degeneration. *Experimental Eye Research*, *188*, 107816. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107816>
- Kolomeyer, A. M., & Zarbin, M. A. (2014). Trophic factors in the pathogenesis and therapy for retinal degenerative diseases. *Survey of Ophthalmology*, *59*(2), 134-165. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.09.004>
- Konishi, H., Koizumi, S., & Kiyama, H. (2022). Phagocytic astrocytes: Emerging from the shadows of microglia. *Glia*, *70*(6), 1009-1026. <https://doi.org/10.1002/glia.24145>
- Kugler, P., & Beyer, A. (2003). Expression of glutamate transporters in human and rat retina and rat optic nerve. *Histochemistry and Cell Biology*, *120*(3), 199-212. <https://doi.org/10.1007/s00418-003-0555-y>

## L

- Lafuente, M. P., Villegas-Pérez, M. P., 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 & Visual Science*, *42*(9), 2074-2084.



- Lai, I. K., Valdearcos, M., Morioka, K., Saxena, S., Feng, X., Li, R., Uchida, Y., Lijun, A., Li, W., Pan, J., Koliwad, S., Marcucio, R., Wulff, H., & Maze, M. (2020). Blocking Kv1.3 potassium channels prevents postoperative neuroinflammation and cognitive decline without impairing wound healing in mice. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 125(3), 298-307. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2020.05.018>
- Lam, D. M.-K., & Bray, G. M. (1992). *Regeneration and Plasticity in the Mammalian Visual System*. MIT Press.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151-170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w)
- Lebman, D. A., & Edmiston, J. S. (1999). The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes and Infection*, 1(15), 1297-1304. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(99\)00254-3](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(99)00254-3)
- Lee, J., Horuk, R., Rice, G. C., Bennett, G. L., Camerato, T., & Wood, W. I. (1992). Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(23), 16283-16287.
- Lee, S., Jha, M. K., & Suk, K. (2015). Lipocalin-2 in the Inflammatory Activation of Brain Astrocytes. *Critical Reviews in Immunology*, 35(1), 77-84. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2015012127>
- Lee, S., Kim, J.-H., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Han, H.-S., Lee, W.-H., Mori, K., Nakao, K., Barasch, J., & Suk, K. (2011). Lipocalin-2 Is a chemokine inducer in the central nervous system: Role of chemokine ligand 10 (CXCL10) in lipocalin-2-induced cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(51), 43855-43870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299248>
- Leibinger, M., Andreadaki, A., Gobrecht, P., Levin, E., Diekmann, H., & Fischer, D. (2016). Boosting Central Nervous System Axon Regeneration by Circumventing Limitations of Natural Cytokine Signaling. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(10), 1712-1725. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.102>
- Lennon, V. A., Wingerchuk, D. M., Kryzer, T. J., Pittock, S. J., Lucchinetti, C. F., Fujihara, K., Nakashima, I., & Weinshenker, B. G. (2004). A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, 364(9451), 2106-2112. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17551-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17551-X)
- Li, D., Liu, X., Liu, T., Liu, H., Tong, L., Jia, S., & Wang, Y.-F. (2020). Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *Glia*, 68(5), 878-897. <https://doi.org/10.1002/glia.23734>
- Li, H.-D., Li, M., Shi, E., Jin, W.-N., Wood, K., Gonzales, R., & Liu, Q. (2017). A translocator protein 18 kDa agonist protects against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0921-7>
- 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>
- Li, M., Zhang, Y., Guan, Y., Zhang, Z., Dong, H., Zhao, Y., & Deng, H. (2021). A Case Report of Central Nervous System Graft-Versus-Host Disease and Literature Review. *Frontiers in Neurology*, 12, 621392. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.621392>
- Li, T., Zhai, X., Jiang, J., Song, X., Han, W., Ma, J., Xie, L., Cheng, L., Chen, H., & Jiang, L. (2017). Intraperitoneal injection of *IL-4*/IFN- $\gamma$  modulates the proportions of microglial phenotypes and improves epilepsy outcomes in a pilocarpine model of acquired epilepsy. *Brain Research*, 1657, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.006>
- Li, Z., Wei, H., Piirainen, S., Chen, Z., Kalso, E., Pertovaara, A., & Tian, L. (2016). Spinal versus brain microglial and macrophage activation traits determine the differential neuroinflammatory responses and analgesic effect of minocycline in chronic neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 58, 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.021>
- Liddelow, S. A. (2015). Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 32. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00032>
- Lier, J., Streit, W. J., & Bechmann, I. (2021). Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells*, 10(9), 2236. <https://doi.org/10.3390/cells10092236>
- Linden, R., & Perry, V. H. (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Research*, 272(1), 145-149. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90371-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90371-2)
- Lindqvist, N., Peinado-Ramón, P., Vidal-Sanz, M., & Hallböök, F. (2004). GDNF, Ret, GFR $\alpha$ 1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection. *Experimental Neurology*, 187(2), 487-499. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.02.002>
- Lindqvist, N., Vidal-Sanz, M., & Hallböök, F. (2002). Single cell RT-PCR analysis of tyrosine kinase receptor expression in adult rat retinal ganglion cells isolated by retinal sandwiching. *Brain Research. Brain Research Protocols*, 10(2), 75-83. [https://doi.org/10.1016/s1385-299x\(02\)00184-8](https://doi.org/10.1016/s1385-299x(02)00184-8)

- Ling, E. A., Kaur, C., & Lu, J. (1998). Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microscopy Research and Technique*, 41(1), 43-56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19980401\)41:1<43::AID-JEMT5>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<43::AID-JEMT5>3.0.CO;2-V)
- Linnerbauer, M., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2020). Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*, 108(4), 608-622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012>
- Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H. A., & Liu, G. (2021). Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science*, 8(15), 2004433. <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>
- Liu, G.-J., Middleton, R. J., Hatty, C. R., Kam, W. W.-Y., Chan, R., Pham, T., Harrison-Brown, M., Dodson, E., Veale, K., & Banati, R. B. (2014). The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 24(6), 631-653. <https://doi.org/10.1111/bpa.12196>
- Liu, Q., Sun, Y.-M., Huang, H., Chen, C., Wan, J., Ma, L.-H., Sun, Y.-Y., Miao, H.-H., & Wu, Y.-Q. (2021). Sirtuin 3 protects against anesthesia/surgery-induced cognitive decline in aged mice by suppressing hippocampal neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02089-z>
- Liu, S., Li, Z., Weinreb, R. N., Xu, G., Lindsey, J. D., Ye, C., Yung, W., Pang, C.-P., Lam, D. S. C., & Leung, C. K. (2012). Tracking retinal microgliosis in models of retinal ganglion cell damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(10), 6254-6262. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9450>
- Liu, Y., McDowell, C. M., Zhang, Z., Tebow, H. E., Wordinger, R. J., & Clark, A. F. (2014). Monitoring retinal morphologic and functional changes in mice following optic nerve crush. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(6), 3766-3774. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-13895>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Llorens, F., Hermann, P., Villar-Piqué, A., Diaz-Lucena, D., Nägga, K., Hansson, O., Santana, I., Schmitz, M., Schmidt, C., Varges, D., Goebel, S., Dumurgier, J., Zetterberg, H., Blennow, K., Paquet, C., Baldeiras, I., Ferrer, I., & Zerr, I. (2020). Cerebrospinal fluid lipocalin 2 as a novel biomarker for the differential diagnosis of vascular dementia. *Nature Communications*, 11(1), 619. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14373-2>
- Lönngren, U., Näpänkangas, U., Lafuente, M., Mayor, S., Lindqvist, N., Vidal-Sanz, M., & Hallböök, F. (2006). The growth factor response in ischemic rat retina and superior colliculus after brimonidine pre-treatment. *Brain Research Bulletin*, 71(1-3), 208-218. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.09.005>
- Lucas-Ruiz, F. (2019). *Estudio de la Degeneración de las Células Ganglionares de la Retina tras Axotomía del Nervio Óptico. Ensayo de Nuevas Terapias Celulares y Farmacológicas*. Universidad de Murcia.
- 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 Regeneration Research*, 16(11), 2125-2131. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.310670>
- Lucas-Ruiz, F., Galindo-Romero, C., Rodríguez-Ramírez, K. T., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2019). Neuronal Death in the Contralateral Un-Injured Retina after Unilateral Axotomy: Role of Microglial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5733. <https://doi.org/10.3390/ijms20225733>
- Lucas-Ruiz, F., Galindo-Romero, C., Salinas-Navarro, M., González-Riquelme, M. J., Vidal-Sanz, M., & Agudo Barriuso, M. (2019). Systemic and Intravitreal Antagonism of the TNFR1 Signaling Pathway Delays Axotomy-Induced Retinal Ganglion Cell Loss. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1096. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01096>
- Lucchinetti, C. F., Popescu, B. F. G., Bunyan, R. F., Moll, N. M., Roemer, S. F., Lassmann, H., Brück, W., Parisi, J. E., Scheithauer, B. W., Giannini, C., Weigand, S. D., Mandrekar, J., & Ransohoff, R. M. (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 365(23), 2188-2197. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100648>
- Lund, R. D. (1965). Uncrossed Visual Pathways of Hooded and Albino Rats. *Science (New York, N.Y.)*, 149(3691), 1506-1507. <https://doi.org/10.1126/science.149.3691.1506>
- Lypka, K. R., Carmy-Bennun, T., Garces, K. N., Venanzi, A. W., & Hackam, A. S. (2022). Assessment of outer retinal thickness and function in mice after experimental optic nerve trauma. *BMC Ophthalmology*, 22(1), 502. <https://doi.org/10.1186/s12886-022-02737-9>
- M**
- Macharadze, T., Goldschmidt, J., Marunde, M., Wanger, T., Scheich, H., Zuschratter, W., Gundelfinger, E. D., & Kreutz, M. R. (2009). Interretinal transduction of injury signals after unilateral optic nerve crush. *Neuroreport*, 20(3), 301-305. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832027e6>

- Madeira, M. H., Boia, R., Santos, P. F., Ambrósio, A. F., & Santiago, A. R. (2015). Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators of Inflammation*, 2015, 673090. <https://doi.org/10.1155/2015/673090>
- Mages, K., Grassmann, F., Jäggle, H., Rupprecht, R., Weber, B. H. F., Hauck, S. M., & Grosche, A. (2019). The agonistic *Tspo* ligand XBD173 attenuates the glial response thereby protecting inner retinal neurons in a murine model of retinal ischemia. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1424-5>
- Marakala, V. (2022). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in kidney injury—A systematic review. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 536, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.08.029>
- Martínez-Canabal, A. (2015). Potential neuroprotective role of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) in the brain. *The International Journal of Neuroscience*, 125(1), 1-9. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.903947>
- Mashkaryan, V., Siddiqui, T., Popova, S., Cosacak, M. I., Bhattarai, P., Brandt, K., Govindarajan, N., Petzold, A., Reinhardt, S., Dahl, A., Lefort, R., & Kizil, C. (2020). Type 1 Interleukin-4 Signaling Obliterates Mouse Astroglia in vivo but Not in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 114. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00114>
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., & Prinz, M. (2020). Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Reports*, 30(5), 1271-1281. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>
- Mathew, N. R., Vinnakota, J. M., Apostolova, P., Erny, D., Hamarsheh, S., Andrieux, G., Kim, J.-S., Hanke, K., Goldmann, T., Chappell-Maor, L., El-Khawanky, N., Ihorst, G., Schmidt, D., Duyster, J., Finke, J., Blank, T., Boerries, M., Blazar, B. R., Jung, S., ... Zeiser, R. (2020). Graft-versus-host disease of the CNS is mediated by TNF upregulation in microglia. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(3), 1315-1329. <https://doi.org/10.1172/JCI130272>
- Mathieu, P., Battista, D., Depino, A., Roca, V., Graciarena, M., & Pitossi, F. (2010). The more you have, the less you get: The functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *Journal of Neurochemistry*, 112(6), 1368-1385. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06548.x>
- Mattner, F., Staykova, M., Berghofer, P., Wong, H. J., Fordham, S., Callaghan, P., Jackson, T., Pham, T., Gregoire, M.-C., Zahra, D., Rahardjo, G., Linares, D., & Katsifis, A. (2013). Central nervous system expression and PET imaging of the translocator protein in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 54(2), 291-298. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.108894>
- McGrady, N. R., Holden, J. M., Ribeiro, M., Boal, A. M., Risner, M. L., & Calkins, D. J. (2022). Axon hyperexcitability in the contralateral projection following unilateral optic nerve crush in mice. *Brain Communications*, 4(5), fcac251. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac251>
- McKerracher, L., Vidal-Sanz, M., Essagian, C., & Aguayo, A. J. (1990). Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(8), 2834-2841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-08-02834.1990>
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2023, febrero 5). *Atlas de histología vegetal y animal*. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- Michels, M., Danielski, L. G., Dal-Pizzol, F., & Petronilho, F. (2014). Neuroinflammation: Microglial activation during sepsis. *Current Neurovascular Research*, 11(3), 262-270. <https://doi.org/10.2174/1567202611666140520122744>
- Micklem, K., Rigney, E., Cordell, J., Simmons, D., Stross, P., Turley, H., Seed, B., & Mason, D. (1989). A human macrophage-associated antigen (*Cd68*) detected by six different monoclonal antibodies. *British Journal of Haematology*, 73(1), 6-11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1989.tb00210.x>
- Miladinovic, T., Sharma, M., Phan, A., Geres, H., Ungard, R. G., Linher-Melville, K., & Singh, G. (2019). Activation of hippocampal microglia in a murine model of cancer-induced pain. *Journal of Pain Research*, 12, 1003-1016. <https://doi.org/10.2147/JPR.S191860>
- Miller, S. J. (2018). Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 401. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00401>
- Mizuno, H., Hirano, T., & Tagawa, Y. (2010). Pre-synaptic and post-synaptic neuronal activity supports the axon development of callosal projection neurons during different post-natal periods in the mouse cerebral cortex. *The European Journal of Neuroscience*, 31(3), 410-424. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07070.x>
- Møllgård, K., Beinlich, F. R. M., Kusk, P., Miyakoshi, L. M., Delle, C., Plá, V., Hauglund, N. L., Esmail, T., Rasmussen, M. K., Gomolka, R. S., Mori, Y., & Nedergaard, M. (2023). A mesothelium divides the subarachnoid space into functional compartments. *Science (New York, N.Y.)*, 379(6627), 84-88. <https://doi.org/10.1126/science.adc8810>
- Mori, T., Buffo, A., & Götz, M. (2005). The novel roles of glial cells revisited: The contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 69, 67-99. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)69004-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)69004-7)

- Mufson, E. J., Mahady, L., Waters, D., Counts, S. E., Perez, S. E., DeKosky, S. T., Ginsberg, S. D., Ikonomic, M. D., Scheff, S. W., & Binder, L. I. (2015). Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *309*, 51-67. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.006>
- Müller, M., & Holländer, H. (1988). A small population of retinal ganglion cells projecting to the retina of the other eye. An experimental study in the rat and the rabbit. *Experimental Brain Research*, *71*(3), 611-617. <https://doi.org/10.1007/BF00248754>
- Munguba, G. C., Galeb, S., Liu, Y., Landy, D. C., Lam, D., Camp, A., Samad, S., Tapia, M. L., & Lee, R. K. (2014). Nerve fiber layer thinning lags retinal ganglion cell density following crush axonopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(10), 6505-6513. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14525>

## N

- Nadal-Nicolás, F. M., Galindo-Romero, C., Lucas-Ruiz, F., Marsh-Amstrong, N., Li, W., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2023). Pan-retinal ganglion cell markers in mice, rats, and rhesus macaques. *Zoological Research*, *44*(1), 226-248. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2022.308>
- Nadal-Nicolás, F. M., Galindo-Romero, C., Valiente-Soriano, F. J., Barberà-Cremades, M., deTorre-Minguela, C., Salinas-Navarro, M., Pelegrín, P., & Agudo-Barriuso, M. (2016). Involvement of P2X7 receptor in neuronal degeneration triggered by traumatic injury. *Scientific Reports*, *6*, 38499. <https://doi.org/10.1038/srep38499>
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Albuquerque-Béjar, J. J., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049830>
- Nadal-Nicolás, F. M., 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. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0982-7>
- Nadal-Nicolás, F. M., 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. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *50*(8), 3860-3868. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3267>
- Nadal-Nicolás, F. M., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2014). Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*, 99. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00099>
- Nadal-Nicolás, F. M., Sobrado-Calvo, P., Jiménez-López, M., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2015). Long-Term Effect of Optic Nerve Axotomy on the Retinal Ganglion Cell Layer. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(10), 6095-6112. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17195>
- Nadal-Nicolás, F. M., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2015). Retino-retinal projection in juvenile and young adult rats and mice. *Experimental Eye Research*, *134*, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.03.015>
- Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M., & Ottersen, O. P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, *129*(4), 905-913. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.053>
- Nakano, M., Tamura, Y., Yamato, M., Kume, S., Eguchi, A., Takata, K., Watanabe, Y., & Kataoka, Y. (2017). NG2 glial cells regulate neuroimmunological responses to maintain neuronal function and survival. *Scientific Reports*, *7*, 42041. <https://doi.org/10.1038/srep42041>
- Nam, Y., Kim, J.-H., Seo, M., Kim, J.-H., Jin, M., Jeon, S., Seo, J., Lee, W.-H., Bing, S. J., Jee, Y., Lee, W. K., Park, D. H., Kook, H., & Suk, K. (2014). Lipocalin-2 protein deficiency ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis: The pathogenic role of lipocalin-2 in the central nervous system and peripheral lymphoid tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(24), 16773-16789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542282>
- Naudé, P. J. W., Nyakas, C., Eiden, L. E., Ait-Ali, D., van der Heide, R., Engelborghs, S., Luiten, P. G. M., De Deyn, P. P., den Boer, J. A., & Eisel, U. L. M. (2012). Lipocalin 2: Novel component of proinflammatory signaling in Alzheimer's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(7), 2811-2823. <https://doi.org/10.1096/fj.11-202457>
- Navarro, V., Kas, A., Apartis, E., Chami, L., Rogemond, V., Levy, P., Psimaras, D., Habert, M.-O., Baulac, M., Delattre, J.-Y., Honnorat, J., & collaborators. (2016). Motor cortex and hippocampus are the two main cortical targets in LGI1-antibody encephalitis. *Brain: A Journal of Neurology*, *139*(Pt 4), 1079-1093. <https://doi.org/10.1093/brain/aww012>
- Neuwelt, E. A., Bauer, B., Fahlke, C., Fricker, G., Iadecola, C., Janigro, D., Leybaert, L., Molnár, Z., O'Donnell, M. E., Povlishock, J. T., Saunders, N. R., Sharp, F., Stanimirovic, D., Watts, R. J., & Drewes, L. R. (2011). Engaging neuroscience to advance translational research in brain

- barrier biology. *Nature Reviews. Neuroscience*, 12(3), 169-182. <https://doi.org/10.1038/nrn2995>
- Nguyen, J. V., Soto, I., Kim, K.-Y., Bushong, E. A., Oglesby, E., Valiente-Soriano, F. J., Yang, Z., Davis, C. O., Bedont, J. L., Son, J. L., Wei, J. O., Buchman, V. L., Zack, D. J., Vidal-Sanz, M., Ellisman, M. H., & Marsh-Armstrong, N. (2011). Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3), 1176-1181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013965108>
- Niesman, I. R., Schilling, J. M., Shapiro, L. A., Kellerhals, S. E., Bonds, J. A., Kleschevnikov, A. M., Cui, W., Voong, A., Krajewski, S., Ali, S. S., Roth, D. M., Patel, H. H., Patel, P. M., & Head, B. P. (2014). Traumatic brain injury enhances neuroinflammation and lesion volume in caveolin deficient mice. *Journal of Neuroinflammation*, 11, 39. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-39>
- Nudo, R. J., & Masterton, R. B. (1988). Descending pathways to the spinal cord: A comparative study of 22 mammals. *The Journal of Comparative Neurology*, 277(1), 53-79. <https://doi.org/10.1002/cne.902770105>
- Nwaubani, P., Cercignani, M., & Colasanti, A. (2022). In vivo quantitative imaging of hippocampal inflammation in autoimmune neuroinflammatory conditions: A systematic review. *Clinical and Experimental Immunology*, 210(1), 24-38. <https://doi.org/10.1093/cei/uxac058>
- O**
- Oertel, F. C., Sotirchos, E. S., Zimmermann, H. G., Motamedi, S., Specovius, S., Asseyer, E. S., Chien, C., Cook, L., Vasileiou, E., Filippatou, A., Calabresi, P. A., Saidha, S., Pandit, L., D'Cunha, A., Outteryck, O., Zéphir, H., Pittock, S., Flanagan, E. P., Bhatti, M. T., ... with the GJCF International Clinical Consortium for NMOSD and the CROCTINO study group. (2022). Longitudinal Retinal Changes in MOGAD. *Annals of Neurology*, 92(3), 476-485. <https://doi.org/10.1002/ana.26440>
- Oertel, F. C., Specovius, S., Zimmermann, H. G., Chien, C., Motamedi, S., Bereuter, C., Cook, L., Lana Peixoto, M. A., Fontanelle, M. A., Kim, H. J., Hyun, J.-W., Palace, J., Roca-Fernandez, A., Leite, M. I., Sharma, S., Ashtari, F., Kafieh, R., Dehghani, A., Pourazizi, M., ... Paul, F. (2021). Retinal Optical Coherence Tomography in Neuromyelitis Optica. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 8(6), e1068. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001068>
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), 844-856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>
- Okere, C. O., & Kaba, H. (2000). Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionizing calcium binding adaptor protein (Iba1) in the mouse olfactory bulb. *Brain Research*, 877(1), 85-90. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02656-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02656-1)
- Olabarria, M., & Goldman, J. E. (2017). Disorders of Astrocytes: Alexander Disease as a Model. *Annual Review of Pathology*, 12, 131-152. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100218>
- Owens, T., Babcock, A. A., Millward, J. M., & Toft-Hansen, H. (2005). Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 48(2), 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.007>
- P**
- Padovan, C. S., Gerbitz, A., Sostak, P., Holler, E., Ferrara, J. L., Bise, K., & Straube, A. (2001). Cerebral involvement in graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *Neurology*, 56(8), 1106-1108. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.8.1106>
- Panagis, L., Thanos, S., Fischer, D., & Dermon, C. R. (2005). Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation. *The European Journal of Neuroscience*, 21(8), 2305-2309. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04046.x>
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M.-E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458-3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapère, J.-J., Lindemann, P., Norenberg, M. D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.-R., & Gavish, M. (2006). Translocator protein (18kDa): New nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.005>
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R., & Gan, W.-B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155(7), 1596-1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>

- Parrilla-Reverter, G., Agudo, M., Sobrado-Calvo, P., Salinas-Navarro, M., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2009). Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: A quantitative in vivo study. *Experimental Eye Research*, 89(1), 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.02.015>
- Paxinos, D. G. (2014). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact Second Edition*.
- Paxinos, G. (2004). *The Rat Nervous System*.
- Pease, M. E., McKinnon, S. J., Quigley, H. A., Kerrigan-Baumrind, L. A., & Zack, D. J. (2000). Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(3), 764-774.
- Pease, M. E., Zack, D. J., Berlinicke, C., Bloom, K., Cone, F., Wang, Y., Klein, R. L., Hauswirth, W. W., & Quigley, H. A. (2009). Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(5), 2194-2200. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3013>
- Peinado-Ramón, P., Salvador, M., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (1996). Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 37(4), 489-500.
- Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K., & Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging*, 29(11), 1754-1762. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013>
- Perea, G., & Araque, A. (2010). GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Research Reviews*, 63(1-2), 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.10.005>
- Perry, V. H., & Cowey, A. (1984). Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience*, 12(4), 1125-1137. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90007-1)
- Petzold, A., Balcer, L. J., Calabresi, P. A., Costello, F., Frohman, T. C., Frohman, E. M., Martinez-Lapiscina, E. H., Green, A. J., Kardon, R., Outteryck, O., Paul, F., Schippling, S., Vermersch, P., Villoslada, P., Balk, L. J., Aktas, O., Albrecht, P., Ashworth, J., Asgari, N., ... Zimmermann, H. (2017). Retinal layer segmentation in multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 16(10), 797-812. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30278-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30278-8)
- Poo, M.-M., Pignatelli, M., Ryan, T. J., Tonegawa, S., Bonhoeffer, T., Martin, K. C., Rudenko, A., Tsai, L.-H., Tsien, R. W., Fishell, G., Mullins, C., Gonçalves, J. T., Shtrahman, M., Johnston, S. T., Gage, F. H., Dan, Y., Long, J., Buzsáki, G., & Stevens, C. (2016). What is memory? The present state of the engram. *BMC Biology*, 14, 40. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0261-6>
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(2), 600-605. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00600.2000>

## Q

- Qu, J., & Jakobs, T. C. (2013). The Time Course of Gene Expression during Reactive Gliosis in the Optic Nerve. *PloS One*, 8(6), e67094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067094>
- Quarta, A., Berneman, Z., & Ponsaerts, P. (2020). Neuroprotective modulation of microglia effector functions following priming with interleukin 4 and 13: Current limitations in understanding their mode-of-action. *Brain, Behavior, and Immunity*, 88, 856-866. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.03.023>

## R

- 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>
- Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Gallego, B. I., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Ortín-Martínez, A., Avilés-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (2010). Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(11), 5690-5696. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5248>
- Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Gallego, B. I., Salobar-García, E., Valiente-Soriano, F. J., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (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>
- Ramon y Cajal, S. (1892). *The Structure of the Retina*.
- Ramon y Cajal, S. (1909). *Histologie Du Systeme Nerveux de L'Homme Et Des Vertebres*.
- Ramprasad, M. P., Fischer, W., Witzum, J. L., Sambrano, G. R., Quehenberger, O., & Steinberg, D. (1995). The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized



- low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human *Cd68*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9580-9584. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9580>
- Ramsey, D. J., Ramsey, K. M., & Vavvas, D. G. (2013). Genetic advances in ophthalmology: The role of melanopsin-expressing, intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the circadian organization of the visual system. *Seminars in Ophthalmology*, 28(5-6), 406-421. <https://doi.org/10.3109/08820538.2013.825294>
- Ran, Y., Qie, S., Gao, F., Ding, Z., Yang, S., Tian, G., Liu, Z., & Xi, J. (2021). Baicalein ameliorates ischemic brain damage through suppressing proinflammatory microglia polarization via inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B and STAT1 pathway. *Brain Research*, 1770, 147626. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147626>
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987-991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Rao, Y. L., Ganaraja, B., Murlimanju, B. V., Joy, T., Krishnamurthy, A., & Agrawal, A. (2022). Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: A review. *3 Biotech*, 12(2), 55. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03123-4>
- Rashid, K., Verhoyen, M., Taiwo, M., & Langmann, T. (2020). Translocator protein (18 kDa) (*Tspo*) ligands activate Nrf2 signaling and attenuate inflammatory responses and oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 528(2), 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.114>
- Redler, Y., & Levy, M. (2020). Rodent Models of Optic Neuritis. *Frontiers in Neurology*, 11, 580951. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.580951>
- Régnier-Vigouroux, A. (2003). The mannose receptor in the brain. *International Review of Cytology*, 226, 321-342. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(03\)01006-4](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(03)01006-4)
- Rodieck, R. W. (1979). Visual pathways. *Annual Review of Neuroscience*, 2, 193-225. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.02.030179.001205>
- Rojas, B., Gallego, B. I., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Valiente-Soriano, F. J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (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>
- Rothwell, N. (2003). Interleukin-1 and neuronal injury: Mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17(3), 152-157. [https://doi.org/10.1016/s0889-1591\(02\)00098-3](https://doi.org/10.1016/s0889-1591(02)00098-3)
- Rovere, G., Nadal-Nicolás, F. M., Agudo-Barriuso, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Nucci, C., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2015). Comparison of Retinal Nerve Fiber Layer Thinning and Retinal Ganglion Cell Loss After Optic Nerve Transection in Adult Albino Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(8), 4487-4498. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17145>
- Rovere, G., Nadal-Nicolás, F. M., Sobrado-Calvo, P., García-Bernal, D., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2016). Topical Treatment With Bromfenac Reduces Retinal Gliosis and Inflammation After Optic Nerve Crush. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(14), 6098-6106. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20425>
- Rovere, G., Nadal-Nicolás, F. M., Sobrado-Calvo, P., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2019). Topical bromfenac transiently delays axotomy-induced retinal ganglion cell loss. *Experimental Eye Research*, 182, 156-159. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.03.023>
- S**
- Saadoun, S., & Papadopoulos, M. C. (2010). Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience*, 168(4), 1036-1046. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.019>
- Saijo, K., & Glass, C. K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 775-787. <https://doi.org/10.1038/nri3086>
- Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., Mayor, S., Holmes, T., Lund, R. D., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2009). Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: A computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Research*, 49(6), 637-647. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2009.01.010>
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T. M., Lund, R. D., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2009). A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Research*, 49(1), 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.09.029>
- Sánchez-Migallón, M. C., Nadal-Nicolás, F. M., 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. *Experimental Eye Research*, 92(4), 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.02.001>

- Sánchez-Migallón, M. C., Valiente-Soriano, F. J., Nadal-Nicolás, F. M., 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. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *57*(1), 81-93. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17841>
- Sánchez-Migallón, M. C., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Vidal-Sanz, 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. *Experimental Eye Research*, *170*, 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.02.010>
- Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M., & Flavell, R. A. (2009). Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. *Current opinion in pharmacology*, *9*(4), 447-453. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.04.008>
- Sapienza, A., Raveu, A.-L., Reboussin, E., Roubéix, C., Boucher, C., Dégardin, J., Godefroy, D., Rostène, W., Reaux-Le Goazigo, A., Baudouin, C., & Melik Parsadaniantz, S. (2016). Bilateral neuroinflammatory processes in visual pathways induced by unilateral ocular hypertension in the rat. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0509-7>
- Scalia, F., & Winans, S. S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *The Journal of Comparative Neurology*, *161*(1), 31-55. <https://doi.org/10.1002/cne.901610105>
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, *74*(4), 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Scharfman, H. E., Witter, M. P., & Schwarcz, R. (2000). The parahippocampal region. Implications for neurological and psychiatric diseases. Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *911*, ix-xiii.
- Schindler, P., Aktas, O., Ringelstein, M., Wildemann, B., Jarius, S., Paul, F., & Ruprecht, K. (2023). Glial fibrillary acidic protein as a biomarker in neuromyelitis optica spectrum disorder: A current review. *Expert Review of Clinical Immunology*, *19*(1), 71-91. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2023.2148657>
- Schmitt, C., Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F. (2012). Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain. *Journal of Neuroinflammation*, *9*, 187. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-187>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry*, *254*(3), 439-459. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540439.x>
- Seabrook, T. A., Burbridge, T. J., Crair, M. C., & Huberman, A. D. (2017). Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System. *Annual Review of Neuroscience*, *40*(1), 499-538. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033842>
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *25*(4), 453-472. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
- Sedgwick, J. D., Schwender, S., Imrich, H., Dörries, R., Butcher, G. W., & ter Meulen, V. (1991). Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(16), 7438-7442. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7438>
- Sellés-Navarro, I., Villegas-Pérez, M. P., Salvador-Silva, M., Ruiz-Gómez, J. M., & Vidal-Sanz, M. (1996). Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *37*(10), 2002-2014.
- Sepúlveda, M., Armangué, T., Sola-Valls, N., Arrambide, G., Meca-Lallana, J. E., Oreja-Guevara, C., Mendibe, M., Alvarez de Arcaya, A., Aladro, Y., Casanova, B., Olascoaga, J., Jiménez-Huete, A., Fernández-Fournier, M., Ramió-Torrentà, L., Cobo-Calvo, A., Viñals, M., de Andrés, C., Meca-Lallana, V., Cervelló, A., ... Saiz, A. (2016). Neuromyelitis optica spectrum disorders: Comparison according to the phenotype and serostatus. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *3*(3), e225. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000225>
- Sequeira, A., Castillo, A., Cordero, N., Wong, V., Montero, R., Vergara, C., Valenzuela, B., Vargas, D., Valdés, N., Morales, J., Tello, M., Sandino, A. M., Maisey, K., & Imarai, M. (2020). The Atlantic salmon interleukin 4/13 receptor family: Structure, tissue distribution and modulation of gene expression. *Fish & Shellfish Immunology*, *98*, 773-787. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.030>
- Shaked, I., Porat, Z., Gersner, R., Kipnis, J., & Schwartz, M. (2004). Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured

- central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, 146(1-2), 84-93. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.10.049>
- Shi, K., Zhang, J., Dong, J., & Shi, F.-D. (2019). Dissemination of brain inflammation in traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Immunology*, 16(6), 523-530. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0213-5>
- Sillitoe, R. V., & Joyner, A. L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 549-577. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123237>
- Sims, J. R., Chen, A. M., Sun, Z., Deng, W., Colwell, N. A., Colbert, M. K., Zhu, J., Sainulabdeen, A., Faiq, M. A., Bang, J. W., & Chan, K. C. (2021). Role of Structural, Metabolic, and Functional MRI in Monitoring Visual System Impairment and Recovery. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 54(6), 1706-1729. <https://doi.org/10.1002/jmri.27367>
- Smith, N. M., Gachulincova, I., Ho, D., Bailey, C., Bartlett, C. A., Norret, M., Murphy, J., Buckley, A., Rigby, P. J., House, M. J., St Pierre, T., Fitzgerald, M., Iyer, K. S., & Dunlop, S. A. (2016). An Unexpected Transient Breakdown of the Blood Brain Barrier Triggers Passage of Large Intravenously Administered Nanoparticles. *Scientific Reports*, 6, 22595. <https://doi.org/10.1038/srep22595>
- Smith, N. M., Giacci, M. K., Gough, A., Bailey, C., McGonigle, T., Black, A. M. B., Clarke, T. O., Bartlett, C. A., Swaminathan Iyer, K., Dunlop, S. A., & Fitzgerald, M. (2018). Inflammation and blood-brain barrier breach remote from the primary injury following neurotrauma. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1227-0>
- 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>
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(5), 249-263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>
- Sotelo, C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in Neurobiology*, 72(5), 295-339. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.03.004>
- Spittau, B., Dokalis, N., & Prinz, M. (2020). The Role of TGFβ Signaling in Microglia Maturation and Activation. *Trends in Immunology*, 41(9), 836-848. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.003>
- Stahl, P. D., & Ezekowitz, R. A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 50-55. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(98\)80031-9](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(98)80031-9)
- Suárez, R., Gobius, I., & Richards, L. J. (2014). Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00497>
- Sun, Z., Yan, X., Liu, Y., Huang, L., Kong, C., Qu, X., Wang, M., Gao, R., & Qin, H. (2017). Application of dual targeting drug delivery system for the improvement of anti-glioma efficacy of doxorubicin. *Oncotarget*, 8(35), 58823-58834. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19221>
- T**
- Taib, T., Leconte, C., Van Steenwinckel, J., Cho, A. H., Palmier, B., Torsello, E., Lai Kuen, R., Onyeomah, S., Ecomard, K., Benedetto, C., Coqueran, B., Novak, A.-C., Deou, E., Plotkine, M., Gressens, P., Marchand-Leroux, C., & Besson, V. C. (2017). Neuroinflammation, myelin and behavior: Temporal patterns following mild traumatic brain injury in mice. *PLOS ONE*, 12(9), e0184811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184811>
- Tan, Y.-L., Yuan, Y., & Tian, L. (2020). Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Molecular Psychiatry*, 25(2), 351-367. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>
- Tang, X., Tzekov, R., & Passaglia, C. L. (2016). Retinal cross talk in the mammalian visual system. *Journal of Neurophysiology*, 115(6), 3018-3029. <https://doi.org/10.1152/jn.01137.2015>
- Tawfik, M., Zhang, X., Grigartzik, L., Heiduschka, P., Hintz, W., Henrich-Noack, P., van Wachem, B., & Sabel, B. A. (2021). Gene therapy with caspase-3 small interfering RNA-nanoparticles is neuroprotective after optic nerve damage. *Neural Regeneration Research*, 16(12), 2534-2541. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.313068>
- Tchelingierian, J. L., Quinonero, J., Booss, J., & Jacque, C. (1993). Localization of TNF alpha and IL-1 alpha immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to the hippocampus. *Neuron*, 10(2), 213-224. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90312-f](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90312-f)
- Tennant, M., Bruce, S. R., & Beazley, L. D. (1993). Survival of ganglion cells which form the retino-retinal projection during optic nerve regeneration in the frog. *Visual Neuroscience*, 10(4), 681-686. <https://doi.org/10.1017/s095252380000537x>
- Tezel, G., Li, L. Y., Patil, R. V., & Wax, M. B. (2001). TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(8), 1787-1794.
- Tezel, G., & Yang, X. (2004). Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(11), 4049-4059. <https://doi.org/10.1167/iov.04-0490>

- Thanos, S. (1988). Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites in the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments. *Cell and Tissue Research*, 254(3), 599-609. <https://doi.org/10.1007/BF00226510>
- Thanos, S. (1999). Genesis, Neurotrophin Responsiveness, and Apoptosis of a Pronounced Direct Connection between the Two Eyes of the Chick Embryo: A Natural Error or a Meaningful Developmental Event? *The Journal of Neuroscience*, 19(10), 3900-3917. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-10-03900.1999>
- Thanos, S., Moore, S., & Hong, Y. (1996). Retinal microglia. *Progress in Retinal and Eye Research*, 15(2), 331-361. [https://doi.org/10.1016/1350-9462\(96\)00006-7](https://doi.org/10.1016/1350-9462(96)00006-7)
- Tietz, S., & Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *The Journal of Cell Biology*, 209(4), 493-506. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147>
- Tonari, M., Kurimoto, T., Horie, T., Sugiyama, T., Ikeda, T., & Oku, H. (2012). Blocking endothelin-B receptors rescues retinal ganglion cells from optic nerve injury through suppression of neuroinflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(7), 3490-3500. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9415>
- Tonchev, A. B., Yamashima, T., Zhao, L., & Okano, H. (2003). Differential proliferative response in the postschismic hippocampus, temporal cortex, and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. *Glia*, 42(3), 209-224. <https://doi.org/10.1002/glia.10209>
- Tribble, J. R., Kokkali, E., Otmani, A., Plastino, F., Lardner, E., Vohra, R., Kolko, M., André, H., Morgan, J. E., & Williams, P. A. (2021). When Is a Control Not a Control? Reactive Microglia Occur Throughout the Control Contralateral Pathway of Retinal Ganglion Cell Projections in Experimental Glaucoma. *Translational Vision Science & Technology*, 10(1), 22. <https://doi.org/10.1167/tvs.t.10.1.22>
- Trost, A., Lange, S., Schroedl, F., Bruckner, D., Motloch, K. A., Bogner, B., Kaser-Eichberger, A., Strohmaier, C., Runge, C., Aigner, L., Rivera, F. J., & Reitsamer, H. A. (2016). Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 20. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00020>
- Tse, B. C., Dvorianchikova, G., Tao, W., Gallo, R. A., Lee, J. Y., Pappas, S., Brambilla, R., Ivanov, D., Tse, D. T., & Pelaez, D. (2018). Tumor Necrosis Factor Inhibition in the Acute Management of Traumatic Optic Neuropathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(7), 2905-2912. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24431>
- U**
- Ueno, S., Yoneshige, A., Koriyama, Y., Hagiwara, M., Shimomura, Y., & Ito, A. (2018). Early Gene Expression Profile in Retinal Ganglion Cell Layer After Optic Nerve Crush in Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(1), 370-380. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22438>
- V**
- Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Alarcón-Martínez, L., Ortín-Martínez, A., Bernal-Garro, J. M., Avilés-Trigueros, M., Agudo-Barriuso, M., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2015). Effects of ocular hypertension in the visual system of pigmented mice. *PLoS One*, 10(3), e0121134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121134>
- Van Hove, H., Martens, L., Scheyltjens, I., De Vlaminck, K., Pombo Antunes, A. R., De Prijck, S., Vandamme, N., De Schepper, S., Van Isterdael, G., Scott, C. L., Aerts, J., Berx, G., Boeckxstaens, G. E., Vandembroucke, R. E., Vereecke, L., Moechars, D., Guillems, M., Van Ginderachter, J. A., Saeys, Y., & Movahedi, K. (2019). A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nature Neuroscience*, 22(6), 1021-1035. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0393-4>
- VanGuilder, H. D., Bixler, G. V., Brucklacher, R. M., Farley, J. A., Yan, H., Warrington, J. P., Sonntag, W. E., & Freeman, W. M. (2011). Concurrent hippocampal induction of *Mhc II* pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 138. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-138>
- Varatharaj, A., & Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Varela, H. J., & Hernandez, M. R. (1997). Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 6(5), 303-313.
- Varga, Z., Flammer, A. J., Steiger, P., Haberecker, M., Andermatt, R., Zinkernagel, A. S., Mehra, M. R., Schuepbach, R. A., Ruschitzka, F., & Moch, H. (2020). Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet (London, England)*, 395(10234), 1417-1418. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5)
- Verkhatsky, A., & Butt, A. (2007). *Glial neurobiology: A Textbook*.
- Veverka, V., Baker, T., Redpath, N. T., Carrington, B., Muskett, F. W., Taylor, R. J., Lawson, A. D. G., Henry, A. J., & Carr, M. D. (2012). Conservation of functional sites on interleukin-6 and implications for evolution of signaling complex assembly and therapeutic intervention. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 40043-40050.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405597>
- Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., Villegas-Pérez, M. P., Thanos, S., & Aguayo, A. J. (1987). Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 7(9), 2894-2909. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-09-02894.1987>
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., Sobrado-Calvo, P., Selles-Navarro, I., Rodriguez, E., Mayor-Torroglosa, S., & Villegas-Perez, M. P. (2000). Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotoxicity Research*, 2(2-3), 215-227. <https://doi.org/10.1007/BF03033795>
- Vidal-Villegas, B., Gallego-Ortega, A., Miralles de Imperial-Ollero, J. A., Martínez de la Casa, J. M., García Feijoo, J., & Vidal-Sanz, M. (2021). Photosensitive ganglion cells: A diminutive, yet essential population. *Archivos De La Sociedad Espanola De Oftalmologia*, 96(6), 299-315. <https://doi.org/10.1016/j.oftale.2020.06.020>
- Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1988). Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 8(1), 265-280. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-01-00265.1988>
- Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1993). Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *Journal of Neurobiology*, 24(1), 23-36. <https://doi.org/10.1002/neu.480240103>
- Virchow. (1846). *Über das granulirte ansehn der Wandungen der Gehirnventrikel*. 3, 242-250.
- Viscomi, M. T., & Molinari, M. (2014). Remote neurodegeneration: Multiple actors for one play. *Molecular Neurobiology*, 50(2), 368-389. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8629-x>
- W**
- Wahlsten, D., & Anderson, M. (1991). Patterns of cerebellar foliation in recombinant inbred mice. *Brain Research*, 557(1-2), 184-189. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90133-g](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90133-g)
- Waisman, A., & Johann, L. (2018). Antigen-presenting cell diversity for T cell reactivation in central nervous system autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 96(12), 1279-1292. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1709-7>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., & Nabekura, J. (2013). Microglia: Actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends in Neurosciences*, 36(4), 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.007>
- Walshe, T. E., Leach, L. L., & D'Amore, P. A. (2011). TGF- $\beta$  signaling is required for maintenance of retinal ganglion cell differentiation and survival. *Neuroscience*, 189, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.020>
- Wang, C.-L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X.-J., Duan, S., Xiong, Z.-Q., & Ding, Y.-Q. (2007). Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(42), 11334-11342. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3380-07.2007>
- Wang, J.-J., Williams, W., Wang, B., Wei, J., Lu, X., Cheng, J.-W., Gordon, J. R., Li, J.-M., & Li, F. (2018). Cytotoxic effect of interleukin-8 in retinal ganglion cells and its possible mechanisms. *International Journal of Ophthalmology*, 11(8), 1277-1283. <https://doi.org/10.18240/ijo.2018.08.05>
- Wang, M., Wang, X., Zhao, L., Ma, W., Rodriguez, I. R., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2014). Macrogliia-Microglia Interactions via Tspo Signaling Regulates Microglial Activation in the Mouse Retina. *The Journal of Neuroscience*, 34(10), 3793-3806. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3153-13.2014>
- Watson, C., Paxinos, G., & Kayalioglu, G. (2009). *The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas*.
- Watson, C., Paxinos, G., & Puelles, L. (Eds.). (2011). *The Mouse Nervous System*.
- Wei, X., Cho, K.-S., Thee, E. F., Jager, M. J., & Chen, D. F. (2019). Neuroinflammation and microglia in glaucoma: Time for a paradigm shift. *Journal of Neuroscience Research*, 97(1), 70-76. <https://doi.org/10.1002/jnr.24256>
- Weininger, J., Roman, E., Tierney, P., Barry, D., Gallagher, H., Murphy, P., Levins, K. J., O'Keane, V., O'Hanlon, E., & Roddy, D. W. (2019). Papez's Forgotten Tract: 80 Years of Unreconciled Findings Concerning the Thalamocingulate Tract. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13, 14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00014>
- Weishaupt, N., Zhang, A., Deziel, R. A., Tasker, R. A., & Whitehead, S. N. (2016). Prefrontal Ischemia in the Rat Leads to Secondary Damage and Inflammation in Remote Gray and White Matter Regions. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 81. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00081>
- Weng, S., Sun, W., & He, S. (2005). Identification of ON-OFF direction-selective ganglion cells in the mouse retina. *The Journal of Physiology*, 562(Pt 3), 915-923. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.076695>

- Witter, M. P., Groenewegen, H. J., Lopes da Silva, F. H., & Lohman, A. H. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33(3), 161-253. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(89\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90009-9)
- Wollenberg, A., Mommaas, M., Oppel, T., Schottdorf, E.-M., Günther, S., & Moderer, M. (2002). Expression and function of the mannose receptor *Cd206* on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *The Journal of Investigative Dermatology*, 118(2), 327-334. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x>
- Wong, G. H., Bartlett, P. F., Clark-Lewis, I., Battye, F., & Schrader, J. W. (1984). Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature*, 310(5979), 688-691. <https://doi.org/10.1038/310688a0>
- Wybar, K. (1977). Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit. *The British Journal of Ophthalmology*, 61(4), 302.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251-306. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62312-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62312-8)
- Wyss, J. M., Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1980). The organization of the fimbria, dorsal fornix and ventral hippocampal commissure in the rat. *Anatomy and Embryology*, 158(3), 303-316. <https://doi.org/10.1007/BF00301819>

## Y

- Yang, J., Ding, S., Huang, W., Hu, J., Huang, S., Zhang, Y., & Zhuge, Q. (2016). Interleukin-4 Ameliorates the Functional Recovery of Intracerebral Hemorrhage Through the Alternative Activation of Microglia/Macrophage. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 61. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00061>
- Yang, P., Chen, L., Shi, Y., Zhou, F., Tian, H., Li, J., & Gao, L. (2021). Progesterone alters the activation and typing of the microglia in the optic nerve crush model. *Experimental Eye Research*, 212, 108805. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108805>
- Yang, S., Gu, C., Mandeville, E. T., Dong, Y., Esposito, E., Zhang, Y., Yang, G., Shen, Y., Fu, X., Lo, E. H., & Xie, Z. (2017). Anesthesia and Surgery Impair Blood-Brain Barrier and Cognitive Function in Mice. *Frontiers in Immunology*, 8, 902. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00902>
- Yang, T., Velagapudi, R., & Terrando, N. (2020). Neuroinflammation after surgery: From mechanisms to therapeutic targets. *Nature Immunology*, 21(11), 1319-1326. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00812-1>
- Yang, Z., & Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
- Yorke, C. H., & Caviness, V. S. (1975). Interhemispheric neocortical connections of the corpus callosum in the normal mouse: A study based on anterograde and retrograde methods. *The Journal of Comparative Neurology*, 164(2), 233-245. <https://doi.org/10.1002/cne.901640206>
- You, Y., Gupta, V. K., Graham, S. L., & Klistorner, A. (2012). Anterograde degeneration along the visual pathway after optic nerve injury. *PloS One*, 7(12), e52061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052061>
- Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., Wu, W., Ryba, T., Sandstrom, R., Ma, Z., Davis, C., Pope, B. D., Shen, Y., Pervouchine, D. D., Djebali, S., Thurman, R. E., Kaul, R., Rynes, E., Kirilusha, A., Marinov, G. K., Williams, B. A., ... Mouse ENCODE Consortium. (2014). A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*, 515(7527), 355-364. <https://doi.org/10.1038/nature13992>

## Z

- Zeiser, R., & Teshima, T. (2021). Nonclassical manifestations of acute GVHD. *Blood*, 138(22), 2165-2172. <https://doi.org/10.1182/blood.2021012431>
- Zhang, S., Wang, H., Lu, Q., Qing, G., Wang, N., Wang, Y., Li, S., Yang, D., & Yan, F. (2009). Detection of early neuron degeneration and accompanying glial responses in the visual pathway in a rat model of acute intraocular hypertension. *Brain Research*, 1303, 131-143. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.029>
- Zhang, Y., & Cui, D. (2021). Evolving Models and Tools for Microglial Studies in the Central Nervous System. *Neuroscience Bulletin*, 37(8), 1218-1233. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00706-8>
- Zhao, J., Wang, B., Huang, T., Guo, X., Yang, Z., Song, J., & Zhang, M. (2019). Glial response in early stages of traumatic brain injury. *Neuroscience Letters*, 708, 134335. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134335>
- Zhao, X., Wang, H., Sun, G., Zhang, J., Edwards, N. J., & Aronowski, J. (2015). Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. *The Journal of Neuroscience*, 35(32), 11281-11291. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1685-15.2015>
- 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. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 77. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00077>



- Zhou, T., Huang, Z., Zhu, X., Sun, X., Liu, Y., Cheng, B., Li, M., Liu, Y., He, C., & Liu, X. (2018). Alpha-1 Antitrypsin Attenuates M1 Microglia-Mediated Neuroinflammation in Retinal Degeneration. *Frontiers in Immunology*, 9, 1202. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01202>
- Zhou, T., Yang, Z., Ni, B., Zhou, H., Xu, H., Lin, X., Li, Y., Liu, C., Ju, R., Ge, J., He, C., & Liu, X. (2022). *Il-4* induces reparative phenotype of RPE cells and protects against retinal neurodegeneration via Nrf2 activation. *Cell Death & Disease*, 13(12), 1056. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05433-0>
- Zhu, Y., Saito, K., Murakami, Y., Asano, M., Iwakura, Y., & Seishima, M. (2006). Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience Letters*, 393(2-3), 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.072>
- Zotova, E., Holmes, C., Johnston, D., Neal, J. W., Nicoll, J. a. R., & Boche, D. (2011). Microglial alterations in human Alzheimer's disease following A $\beta$ 42 immunization. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 37(5), 513-524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01156.x>
- Zrzavy, T., Höftberger, R., Berger, T., Rauschka, H., Butovsky, O., Weiner, H., & Lassmann, H. (2019). Pro-inflammatory activation of microglia in the brain of patients with sepsis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 45(3), 278-290. <https://doi.org/10.1111/nan.12502>

