



Universidad de Murcia

Laboratorio de Oftalmología Experimental

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

Doctorado en Ciencias de la Visión

**“EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN OCULAR EN LA
POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA
RETINA EN RATA Y RATÓN”**

Manuel Ángel Salinas Navarro

2011

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
LISTA DE ILUSTRACIONES (Figuras y Tablas)	xix
ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS.....	xxiv
HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO	xxvi
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS	xxvii
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. EL SISTEMA VISUAL	2
1.1.1. ESQUEMA GENERAL	3
1.1.1.1. Ojo.....	4
1.1.1.2. Retina.....	5
1.1.1.3. Nervio y quiasma óptico.....	8
1.1.1.4. Proyecciones visuales	8
1.1.2. EL SISTEMA VISUAL EN LA RATA ADULTA.....	9
1.1.2.2. Células ganglionares de la retina.....	11
1.2. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CGR EN ROEDORES	12
1.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CGR	13
1.2.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS CGR.....	15
1.2.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS CGR	16
1.3. NEUROPATÍA ÓPTICA GLAUCOMATOSA.....	17
1.3.1. FISIOLÓGÍA DEL HUMOR ACUOSO	17
1.3.2. CONCEPTO DE NEUROPATÍA ÓPTICA GLAUCOMATOSA	18
1.3.3. IMPORTANCIA DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES DE NOG	20
1.3.4. MODELOS EXPERIMENTALES DE NOG EN ROEDORES	20
1.3.4.1. Modelos de HTO en rata.....	21
1.3.4.1.1. Inyección de suero salino hipertónico en la vía de drenaje del humor acuoso	21
1.3.4.1.2. Tratamiento con láser del tejido limbar.....	21
1.3.4.1.3. Cauterización de las venas episclerales.....	22
1.3.4.2. Modelos de HTO en ratón.....	23
1.3.4.2.1. Glaucoma inducido experimentalmente en ratones	23
1.3.4.2.2. Glaucoma congénito o espontáneo	24
1.3.4.2.3. Glaucoma en ratones transgénicos	25
1.3.5. MEDIDA DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR	25
1.3.6. VALORACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR LA HTO EN LA POBLACIÓN DE CGR.....	27
1.4. CONSIDERACIONES GENERALES	28
1.4.1. MODELOS DE LESIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	28
1.4.2. MUERTE NEURONAL EN LA NOG	29

1.4.3. ESTRATEGIAS DE NEUROPROTECCIÓN EN LA NOG	29
2. OBJETIVOS	32
2.1. OBJETIVOS GENERALES	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1. INTRODUCCIÓN	35
3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA.....	35
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
3.4. MEDIDA DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR.....	39
3.5. INDUCCIÓN DE LA HTO.....	39
3.6. MARCAJE RETRÓGRADO	40
3.6.1. MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS CGR RETINOTECTALES.....	41
3.6.2. MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS CGR RETINOFUGALES.....	43
3.6.2.1. Marcaje retrógrado de las CGR retinofugales sin seccionar el nervio óptico.....	44
3.6.3. MARCAJE RETRÓGRADO DE CGR IPSILATERALES Y CONTRALATERALES.....	45
3.7. PROCESADO TISULAR	46
3.7.1. PERFUSIÓN-FIJACIÓN DEL ANIMAL	46
3.7.2. ENUCLEACIÓN DE LOS OJOS	46
3.7.3. EXTRACCIÓN DE LA RETINA.....	47
3.7.4. MONTAJE A PLANO DE LA RETINA.....	47
3.7.5. SECCIONES TRANSVERSALES DEL NERVIO ÓPTICO.....	47
3.8. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA	48
3.8.1. DETECCIÓN DE LOS NÚCLEOS DE LAS CGR: Brn3a.....	48
3.8.2. DETECCIÓN DE LOS AXONES DE LAS CGR: pNFH	49
3.8.3. DETECCIÓN DE LOS AXONES DE LAS CGR (PNFH) Y DE LA ASTROGLÍA (GFAP) EN LAS SECCIONES TRANSVERSALES DE LOS NERVIOS ÓPTICOS.....	50
3.9. TINCIÓN DE LOS NÚCLEOS DE LA CAPA DE CÉLULAS GANGLONARES: DAPI.....	50
3.10. ADQUISICIÓN DE IMAGENES DE LA RETINA.....	51
3.10.1. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA	51
3.10.2. CAPTURA DE IMÁGENES DIGITALES DE LA RETINA	52
3.10.2.1. Imágenes individuales	52
3.10.2.2. Fotomontajes	52
3.11. CONTAJE AUTOMÁTICO DE LAS CGR.....	52
3.11.1. PROCESADO AUTOMÁTICO DE LAS IMÁGENES INDIVIDUALES	53
3.11.1.1. Contaje automático de las CGR-FG ⁺ y las CGR-OHSt ⁺	53
3.11.1.2. Contaje automático de las CGR-Brn3a ⁺	54
3.12. CONTAJE MANUAL DE LAS CGR-DTMR ⁺	56
3.13. CONTAJE SEMIAUTOMÁTICO DE LOS SOMAS DE LAS CGR-pNFH ⁺	56
3.14. ÁREA DE LA RETINA Y DENSIDAD MEDIA DE LAS CGR.....	56
3.15. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA	57
3.15.1. MAPAS DE DENSIDAD	57
3.15.2. MAPAS DE ISODENSIDAD.....	57
3.16. VALIDACIÓN DEL CONTAJE AUTOMÁTICO.....	58

3.16.1. CGR-FG ⁺ Y CGR-OHSt ⁺	58
3.16.2. CGR-Bm3a ⁺	60
3.17. ESTADÍSTICA	60
4. RESULTADOS	62
4.1. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	62
4.1.1. VALIDACIÓN DEL CONTAJE AUTOMÁTICO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA	62
4.1.1.1. Cuantificación de las CGR trazadas retrógradamente con FG u OHSt	62
4.1.1.2. Cuantificación de las CGR inmuno-identificadas por su expresión de Bm3a	63
4.1.2. POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	63
4.1.2.1. Población retinofugal de CGR	63
4.1.2.2. Población retinotectal de CGR.....	64
4.1.2.3. Proporción de la población de CGR retinofugal que proyecta al tectum	65
4.1.2.4. Población retinotectal de CGR que proyectan ipsilateralmente y contralateralmente	65
4.2. DENSIDAD TOTAL DE CGR TRAZADAS RETRÓGRADAMENTE.....	67
4.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	67
4.3.1. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA TOTALIDAD DE LAS CGR RETINOTECTALES Y RETINOFUGALES.....	67
4.3.2. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CGR DE PROYECCIÓN RETINOTECTAL IPSILATERAL EN RATA	68
4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE HTO EN ROEDORES.....	73
4.2.1. PUESTA A PUNTO DEL MODELO DE HIPERTENSIÓN OCULAR POR FOTOCOAGULACIÓN POR LÁSER	73
4.2.2. DEGENERACIÓN AXONAL EN LA CABEZA DEL NERVIÓ ÓPTICO	74
4.2.3. EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR DESPUÉS DE LA FOTOCOAGULACIÓN POR LÁSER.....	76
4.2.4. EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA POBLACIÓN DE CGR TRAZADAS RETRÓGRADAMENTE DESPUÉS DE LA FOTOCOAGULACIÓN POR LÁSER.....	77
4.2.4.1. Evolución temporal del número total de células ganglionares trazadas retrógradamente después de la fotocoagulación por láser	77
4.2.4.2. Distribución espacial de las CGR trazadas retrógradamente después de la fotocoagulación por láser.....	79
4.2.5. ¿LA AUSENCIA DE CGR MARCADAS RETRÓGRADAMENTE SE DEBE A LA MUERTE DE CGR O A UNA ALTERACIÓN DEL TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO?	82
4.2.5.1. Determinación de las CGR supervivientes después de la FL mediante el marcaje retrógrado de las CGR antes de la FL ..	82
4.2.5.2. Determinación de las CGR supervivientes después de la FL mediante el marcador molecular Bm3a	83
4.2.6. ¿LA ALTERACIÓN DEL TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO ES FUNCIONAL O MECÁNICA?	91
4.2.7. ANÁLISIS TEMPORAL DE LOS CAMBIOS DEGENERATIVOS DE LA CAPA DE FIBRAS NERVIOSAS DE LA RETINA DESPUÉS DE LA FOTOCOAGULACIÓN CON LÁSER.....	93
4.2.8. DISTRIBUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CGR-pNFH ⁺	101
4.2.9. EFECTO DE LA HTO EN LAS CÉLULA DE LA CAPA DE CGR	104
5. DISCUSIÓN	107
5.1. POBLACIÓN DE LAS CGR EN ROEDORES.....	107
5.1.1. MÉTODO DE CONTAJE AUTOMÁTICO DE LAS CGR	107
5.1.2. POBLACIÓN DE LAS CGR RETINOTECTALES Y RETINOFUGALES	108
5.1.3. POBLACIÓN DE CGR QUE PROYECTAN IPSILATERALMENTE	110
5.1.4. ÁREA Y DENSIDAD TOTAL DE LAS CGR TRAZADAS RETRÓGRADAMENTE DE LAS RETINA DE ROEDORES	110
5.1.5. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	111
5.2. MODELO EXPERIMENTAL DE HTO EN RATA Y RATÓN.....	112
5.2.1. ELEVACIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR.....	112

5.2.2. ALTERACIÓN DEL TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO	113
5.2.3. LA AUSENCIA DE LAS CGR MARCADAS RETRÓGRADAMENTE EN LAS RETINAS LESIONADAS ¿SE DEBE A LA MUERTE DE LAS CGR O A UN TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO DAÑADO?	114
5.2.4. NATURALEZA DEL DAÑO DEL TAR.....	115
5.2.5. LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN INICIAL	116
5.2.6. EL DAÑO INDUCIDO POR LA HIPERTENSIÓN OCULAR ES SEMEJANTE A LA AXOTOMÍA	116
5.2.7. LA ISQUEMIA RETINIANA NO ES LA PRINCIPAL CAUSA DE LA MUERTE DE LAS CGR.....	117
5.3. RESUMEN.....	118
6. CONCLUSIONES.....	120
7. CONCLUSIONS	122
8. BIBLIOGRAFÍA.....	124
9. ANEXO I	141
10. ANEXO II	154
11. ANEXO III	166
12. ANEXO IV	188

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas a las que debo agradecer su ayuda en la consecución de este trabajo, por ello quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis.

Al director de esta tesis, Profesor D. Manuel Vidal-Sanz, infatigable trabajador y amante de su trabajo. Gracias por brindarme la oportunidad de trabajar en este laboratorio, por su constante ayuda, orientación y supervisión durante la realización de este trabajo. Su generosidad, calidad humana y profesional constituyen para mí un ejemplo.

A la Dra. Marta Agudo Barriuso, por su infinita paciencia y generosidad, tanto personal como científica. Por todas sus enseñanzas, consejos y por contribuir de forma directa en el desarrollo del mismo. Quisiera agradecerle profundamente todo lo que ha hecho por mí.

A la Dra. María Paz Villegas Pérez por su opinión siempre constructiva y simpatía. Al Dr. Marcelino Avilés Trigueros, por estar siempre dispuesto a solucionar los problemas. A la Dra. Paloma Sobrado Calvo, por su amabilidad y sinceridad.

A todos los miembros del Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia (que tanto tiempo hemos pasado juntos), sin los cuales esta tesis no habría podido realizarse, tanto por su trabajo técnico como sobre todo por sus aportaciones personales y amistad. A Antonio García Avilés y Sergio Mayor Torroglosa que me iniciaron en el trabajo de laboratorio. A María Elena Aguilera Meseguer, Isabel Cánovas Martínez, M^a Cruz Pérez Marín, Marco Antonio Gomariz, José Manuel Bernal Garro, Lidia Coll Alcaraz y María Dolores Soria Rodríguez por el tiempo dedicado, simpatía y trabajo.

A Leticia Nieto López, Caridad Galindo Romero, Miriam Sánchez-Migallón Carreras, Diego García Ayuso, Sergio Rodríguez Llaneras, Luis Montalbán Soler, y Luis Alarcón Martínez por su trabajo, ayuda y buenos momentos.

Quisiera agradecer la estrecha colaboración prestada por Manuel Jiménez López en la elaboración y diseño de herramientas informáticas que han posibilitado los contajes automáticos que hemos realizado en nuestros estudios. La contribución de Manuel al desarrollo y puesta a punto de estas técnicas informáticas ha sido de crucial importancia.

Especialmente agradezco a Francisco Nadal Nicolás, Arturo Ortín Martínez y a Javier Valiente Soriano, su dedicación, trabajo y apoyo incansable en los momentos más difíciles de la composición final del manuscrito.

A la profesora Ulla Näpänkangas por su acogimiento, amabilidad y buen trato recibido durante mis estancias en el Hospital Universitario de Oulu (Finlandia).

Finalmente, y con especial cariño, a mi familia por su constante apoyo y cariño, a mi padre, a mi madre, a mi hermano Jesús, ejemplos de valentía y admiración constantes, a mi prima Inma. A mi segunda familia, Casiana, Alfonso, Grego, Juani y Marcos, por todo el cariño recibido. A mi amor María por haber estado a mi lado en todo momento ofreciéndome su alegría, paciencia y ánimo.

Gracias a todos por vuestra amistad y por hacerme feliz, espero poder devolver todo lo que he recibido de vosotros.

RESUMEN

Esta tesis se compone de dos partes: El estudio completo de la población de las células ganglionares de la retina (CGR) en rata y ratón, y el desarrollo de un modelo experimental de hipertensión ocular (HTO) en rata y ratón para estudiar los mecanismos por los cuales la HTO causa daño en la población de CGR.

Introducción

La población de CGR en roedores se utiliza para investigar las respuestas degenerativas y regenerativas de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) a diferentes neuropatías, así como para ensayar las propiedades neuroprotectoras de distintas sustancias. En este trabajo hemos realizado el análisis detallado tanto cuantitativo como topográfico, de la población total de CGR en animales control. Estos datos serán la base para analizar el curso temporal de degeneración de estas neuronas después de un determinado insulto y la supervivencia de las mismas tras un tratamiento neuroprotector.

La neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) es una de las enfermedades oculares neurodegenerativas más frecuentes. Se caracteriza por la pérdida paulatina de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) que sin tratamiento puede evolucionar a la completa ceguera. El factor de riesgo más importante es el aumento de la presión intraocular (PIO). Las causas por las cuales la NOG causa daño en la población de CGR no son bien conocidas. Para intentar comprender estos mecanismos hemos utilizado un modelo experimental de NOG en rata y en ratón, inducido por el aumento de la PIO.

Objetivos

Identificar las CGR en roedores usando técnicas de trazado axonal retrógrado. Poner a punto un método automatizado de conteo de CGR trazadas. Analizar cualitativa y topográficamente la población de CGR retinotectales y retinofugales. Analizar cualitativa y topográficamente la población de CGR que proyectan ipsilateralmente y contralateralmente.

Desarrollar un modelo experimental de HTO en rata y ratón albinos. Caracterizar los efectos del aumento de la PIO en la población de CGR y en sus axones.

Materiales y métodos

En este trabajo se han utilizado ratas hembras adultas de 2 estirpes diferentes, una albina (Sprague-Dawley (SD)) y una pigmentada (Piebald Virol Glaxo (PVG) Brown Norway) y ratones machos adultos de dos estirpes, una albina (Swiss) y la otra pigmentada (C57BL/6N). Se realizaron distintos grupos experimentales organizados según las manipulaciones experimentales llevadas a cabo.

Para identificar la población total de CGR retinotectales de rata y ratón, una semana antes del procesamiento del animal se aplicó en la superficie de ambos colículos superiores (CS) el trazador neuronal fluorescente fluorogold (FG) o hidroxistilbamidina metanosulfonato (OHSt) respectivamente.

Para identificar la población total de CGR retinofugales se aplicó el trazador en la superficie del muñón del nervio óptico (MNO) intraorbitario proximal al globo ocular 3 días antes del procesado.

Para identificar la población total de CGR que proyectan su axón ipsilateralmente y contralateralmente, se realizó la coliculectomía de un CS, se aplicó FG en el CS contralateral una semana después de la coliculectomía y una antes del procesado del animal.

Para desarrollar el modelo experimental de HTO en rata y ratón, se realizó la fotocoagulación por láser diodo (FL) de la malla trabecular, las venas perilimbaires y episclerales en rata albina SD y ratón albino swiss, del ojo izquierdo experimental dejando el derecho como control. El tamaño del punto, duración, potencia y número de disparos fueron, respectivamente: 50-100 μ m, 0.5s, 0.4W y 90 disparos en rata y 50-100 μ m, 0.5s, 0.3W y 72 disparos en ratón.

Para determinar el número idóneo de disparos láser para aumentar la PIO en rata, se realizó un primer grupo que se dividió en dos subgrupos 1.1 y 1.2, que recibieron 65-70 u 85-90 disparos, respectivamente.

Para los experimentos de HTO se realizaron varios grupos experimentales organizados según el objetivo y la duración del periodo de estudio después del tratamiento con láser (8, 14, 21 días, 8 y 12 semanas en rata y 8, 17 días, 5 y 9 semanas, en ratón).

Para estudiar el efecto de la FL en la PIO y su evolución a lo largo del tiempo, se midió la PIO en rata con el tonómetro de contacto y en ratón con el tonómetro de rebote. En rata se realizaron registros antes de y a 6, 12, 24, 48, 72 horas y 1, 2, 3, 4 ó 12 semanas después de la FL. Y en ratón antes de y a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 21, 28, 42, ó 56 días después del tratamiento con láser.

Para estudiar el efecto de la HTO en el transporte axonal retrógrado (TAR) activo se aplicó FG u OHSt en ambos CS de rata o ratón respectivamente, 7 días antes del procesado del animal. Para estudiar el TAR por difusión se aplicó el trazador neuronal dextrano tetrametilrodamina (DTMR) en el MNO 5 días después de la aplicación del FG o el OHSt y 2 días antes del procesado del animal.

Para estudiar la población de CGR que sobreviven después de la HTO, se realizaron dos experimentos: Marcaje retrógrado de las CGR una semana antes de la FL y posterior marcaje en el MNO con DTMR. Inmunodetección del Brn3a, que es un factor de transcripción específico de las CGR, en las retinas previamente marcadas con FG u OHSt.

Para estudiar el efecto de la HTO en los axones intrarretinianos de las CGR que forman la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) y en los axones que forman la cabeza del NO, se inmunodetectó la subunidad pesada fosforilada de los neurofilamentos (pNFH) tanto en las retinas a plano como en las secciones transversales del NO.

Para estudiar el efecto de la HTO en la astroglia de la cabeza del NO se inmunodetectó la proteína acida fibrilar glial (GFAP) en las secciones transversales del NO.

Para estudiar el efecto de la HTO en todos los tipos de células que componen la capa de CGR, en retinas completas control y experimentales se tiñeron todos los núcleos con DAPI, y se inmunodetectó el Brn3a para identificar las CGR.

Todas las muestras fueron examinadas y fotografiadas bajo un microscopio de fluorescencia equipado con una platina motorizada controlada por un sistema de análisis de imagen: Image-Pro Plus® (IPP 5.1 para Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Para hacer

reconstrucciones de las retinas completas se capturaron imágenes individuales de forma secuencial y no solapada comprendiendo toda la superficie de la retina y posteriormente fueron unidas para formar el fotomontaje de la retina completa. Las imágenes digitales individuales, tanto de FG como de Brn3a, fueron procesadas por una serie de rutinas específicas para cada marcador y especie, desarrolladas con el programa de análisis de imagen IPP para realizar el conteo automático. Los datos cuantitativos obtenidos de cada retina, se usaron para generar los correspondientes mapas de isodensidad de las CGR.

Resultados

La media del número total de CGR retinofugales marcadas desde el NO en rata albina y pigmentada fue de 82.818 ± 3.949 ($n=27$) y 89.241 ± 3.576 ($n=6$), respectivamente. La media del número total de CGR retinotectales marcadas desde el CS en rata albina y pigmentada fue de 81.486 ± 4.340 ($n=37$) y 87.229 ± 3.199 ($n=59$), respectivamente.

La media del número total de CGR marcadas desde el NO sin seccionar en ratas SD fue de 85.063 ± 1.330 ($n=5$).

La media del número total de CGR retinofugales marcadas desde el NO en ratón albino fue de 49.493 ± 3.936 ($n=18$) y en pigmentado fue de 42.658 ± 1.540 ($n=10$). La media del número total de CGR retinotectales marcadas desde el CS en ratón albino fue de 48.733 ± 3.954 ($n=43$) y en pigmentado fue de 41.192 ± 3.395 ($n=42$).

Tanto en rata como en ratón, la población de CGR retinofugal fue mayor que la retinotectal, aunque esta diferencia no fue significativa.

La media del número total de CGR que proyecta su axón ipsilateralmente en rata albina fue de 2.103 ± 270 ($n=12$) y en pigmentada fue de 3.600 ± 371 ($n=9$). Constituye el 2,5% y el 4,2% de la población retinotectal de CGR trazadas retrógradamente (CGR-FG⁺) en ratas SD y PVG, respectivamente.

En los mapas de isodensidad se observó que la mayor densidad de CGR se encuentra en una región aproximadamente a 1mm por encima del disco óptico, extendiéndose horizontalmente a lo largo del eje naso-temporal adoptando la forma de una estría visual, dentro de la cual los valores más altos se localizan en la zona superotemporal de la retina. Desde esta región de alta densidad, las densidades de CGR decrecen rápidamente hacia la periferia de la retina dorsal y ventral. Esta disminución es más pronunciada en la retina dorsal. Esta distribución de las CGR se repite en rata y en ratón.

Las CGR ipsilaterales al CS trazadas retrógradamente con FG (CGRip-FG⁺) se distribuyen mayoritariamente en la periferia de la retina temporal adoptando la forma de luna creciente. La densidad de CGRip-FG⁺ aumenta desde la zona inferior hasta la superior, localizándose la región de más alta densidad superotemporalmente.

En el subgrupo 1.1, donde no hubo un aumento de la PIO, no se observó degeneración axonal en la cabeza del NO ni pérdida de CGR, mientras que en el subgrupo 1.2, donde aumentó la PIO, se observó en el nervio óptico una disminución en sectores de la expresión de pNFH y un

aumento en la expresión de la GFAP en estos sectores, que tuvo correspondencia con la pérdida de CGR.

Después de la FL, en rata hubo un aumento de la PIO con un máximo de aproximadamente dos veces los valores iniciales a las 12h. A partir de este momento, la PIO decreció lentamente hasta estabilizarse a las 3 semanas, permaneciendo por encima de los valores basales hasta el último punto temporal analizado (12 semanas). En ratón hubo un aumento de la PIO dos veces los valores basales a las 24h que persistió hasta el 4º día, momento en el que empezó a descender gradualmente alcanzando los valores basales a la semana.

En rata, la pérdida de marcaje retrógrado se observó a los 8 días después de la FL. La pérdida principal de CGR-FG⁺ ocurre entre 8 días (38.397 ± 12.306 (n=6)) y 2 semanas (15.251 ± 18.729 (n=8)) después de la FL y a partir de las 2 semanas no progresó con el tiempo (18.149 ± 20.383 (n=34, 3 semanas), 15.727 ± 16.468 (n=41, 8 semanas) y 18.686 ± 16.487 (n=14, 12 semanas)). Esto supone una población de CGR-FG⁺ respecto a la de su ojo no tratado del 46%, 19%, 23%, 21% y 24% a 8d, 2, 3, 8 y 12 semanas después de la FL, respectivamente.

En ratón la pérdida de marcaje retrógrado se observó a los 8 días después de la FL y no progresó con el tiempo (13.428 ± 6.295 (n=12, 8 días), 10.456 ± 14.301 (n=13, 17 días), 12.622 ± 14.174 (n=21, 5 semanas) y 10.451 ± 13.949 (n=13, 9 semanas)). Esto supone una población de CGR-OHSt⁺ respecto al ojo no tratado del 28%, 23%, 26% y 22% a 8, 17, 35, y 63 días después de la FL, respectivamente.

La ausencia de TAR durante las dos primeras semanas se debe a una alteración en el TAR activo que es seguido por un daño en el TAR pasivo, ya que se observó una correlación entre las áreas con CGR trazadas retrógradamente con FG ó con OHSt y las áreas con CGR-DTMR⁺, implicando una compresión de los axones cerca de la cabeza del NO.

La ausencia de CGR trazadas retrógradamente se presentó preferentemente (en el 95% de los casos) en la retina dorsal, adoptando la forma de sectores con el ápice dirigido hacia el disco óptico. Se observó dos tipos de pérdida, una localizada con ninguna o muy pocas CGR trazadas retrógradamente y otra difusa, donde había una disminución en la densidad de las CGR.

Se observó una clara discrepancia entre el número de CGR que sobreviven (CGR-FG⁺), marcadas antes de la FL y el menor número de CGR trazadas desde el MNO con DTMR. En otro experimento se observó a 8 días, que en las zonas desprovistas de CGR trazadas retrógradamente había muchas CGR supervivientes (CGR-Brn3a⁺), tanto en rata como en ratón (en rata: CGR-Brn3a⁺ 72.289 ± 5.431 ; (n=6) y CGR-FG⁺ 38.397 ± 12.306 ; (n=6) y en ratón CGR-Brn3a⁺ 24.343 ± 5.739 ; (n=12) y CGR-OHSt⁺ 13.428 ± 6.295 ; (n=12)). El 47% y 45% de las CGR que sobreviven a 8 días post-FL, en rata y ratón respectivamente, no tienen funcional su TAR activo. A tiempos más largos (a 21 d y 35 d en rata y ratón respectivamente) no hay diferencias significativas entre el número de CGR marcadas retrógradamente y las células que sobreviven (en rata CGR-Brn3a⁺ 30.942 ± 20.415 ; n=10) y CGR-FG⁺ 18.040 ± 21.197 ; n=10) a 21 días; en ratón CGR-Brn3a⁺ 10.219 ± 8.887 ; n=9) y CGR-OHSt⁺ 10.522 ± 9.426 ; n=9) a 35 días). El daño del TAR es anterior a la degeneración de las CGR. La ausencia de CGR marcadas retrógradamente se debe a un daño en el TAR activo y a una degeneración de las CGR.

En la CFNR se observaron, en las zonas desprovistas de CGR trazadas retrógradamente, signos de degeneración axonal retrógrada y somática de las CGR que consistieron en una expresión aberrante del pNFH en los axones y en los somas de las CGR, que fue más intensa a 17 y 21d post-FL. La disminución de la densidad axonal sólo fue obvia a las 12 semanas post-FL.

En las regiones lesionadas de retinas experimentales, había muy pocas CGR-Brn3a⁺ sin embargo, la proporción de células DAPI⁺/CGR-Brn3a⁺ era mayor que en las retinas controles, lo que indica que la HTO afecta específicamente a las CGR.

Conclusiones.

La población de CGR trazadas retrógradamente con FG u OHSt en rata o ratón respectivamente, puede ser contada automáticamente con un nivel de confianza comparable a los contajes manuales. El número total de CGR retinofugales es mayor que el de retinotectales, pero esta diferencia no es significativa, indicando la masiva proyección retinotectal del sistema retinofugal en ratas adultas. La población total de CGR retinofugales y retinotectales es mayor en ratas pigmentadas que en albinas y en ratones albinos que en pigmentados.

La inmensa mayoría de la población de CGR decusa su axón a nivel del quiasma óptico; esta proporción es mayor en rata pigmentada que en albina.

Las CGR se distribuyen dentro de la retina en un área orientada horizontalmente de alta densidad localizada en la retina dorsal parecida a una estría visual, dentro de la cual sus valores más altos se localizan en su zona superotemporal. La población de CGR ipsilaterales se distribuye mayoritariamente en la periferia de la retina temporal adoptando la forma de luna creciente, localizándose la región de más alta densidad superotemporalmente.

La fotocoagulación de la malla trabecular, vasos perilimbares y episclerales induce un aumento de la PIO que causa eventos degenerativos en la retina y en el NO similares a los descritos en pacientes con glaucoma.

Se produce un daño del TAR que se mantiene durante todo el periodo de estudio que afecta aproximadamente al 75-80% de la población de CGR. El daño en el TAR primero es funcional y posteriormente mecánico.

El daño en el TAR induce la degeneración y muerte progresiva de la población de CGR, por tanto la ausencia de CGR marcadas retrógradamente se debe a un daño en el TAR activo y a una verdadera muerte de las CGR.

La ausencia de CGR tiene forma de sectores con su ápice dirigido hacia el disco óptico y se presenta preferentemente en la retina dorsal. Se observan dos tipos de pérdida, una localizada y otra difusa.

La HTO induce una compresión de los axones de la cabeza del NO y conduce a la degeneración anterógrada y retrógrada de los axones de las CGR.

Hay una pérdida selectiva de CGR en la capa de CGR, que indica que la causa de la muerte de las CGR por HTO se sitúa en la cabeza del NO y no se debe a una isquemia generalizada de la retina.

SUMMARY

This doctoral thesis is divided in two parts. A complete study of the retinal ganglion cell (RGC) population in rat and mice and the implementation of an experimental model of ocular hypertension (OHT) in both species to analyze the mechanisms by which OHT damages the RGC population.

Introduction

Rodent RGCs are widely used to investigate the degenerative and regenerative responses of central nervous system (CNS) neurons to a variety of neuropathies, as well as to assess the potential neuroprotective properties of different substances. In this work we have carried out a detailed quantitative and topographic analysis of the whole RGC population in naïve animals. These data would serve as baseline for further experiments designed to assess the temporal course of RGC degeneration after a given insult and their survival after a neuroprotective treatment.

Glaucomatous optic neuropathy (GON) is, nowadays, one of the commonest ocular neurodegenerative diseases. It is characterized by the progressive loss of the retinal nerve fibre layer (NFL) that, if not treated, may end in complete blindness. The most important risk factor is an increase of the intraocular pressure (IOP). The reasons underlying GON damage to RGCs are not yet well known. In an attempt to understand these mechanisms we have used an experimental model of GON in rat and mice based on the increase of the IOP.

Objectives

To identify rodent RGCs using retrograde tracing techniques. To set up an automated routine to quantify traced RGC. To analyze, quantitatively and topographically, the population of retinotectal and retinofugal RGCs as well as the population of RGC that project ipsi and contralaterally.

To develop an experimental model of OHT in albino rats and mice.

To characterize the effects of an increased IOP on the RGC population and their axons.

Material and Methods

In this study we have used adult female rats from 2 strains, one albino (Sprague Dawley, SD) and one pigmented (Piebald Virol Glaxo (PVG) and Brown Norway) and adult male mice from 2 strains, one albino (Swiss) and one pigmented (C57BL/6N). The different animal groups were organized according to the experimental manipulations.

To identify the whole population of RGCs projecting to the tecta in rat and mice, one week before processing it was applied to their superior colliculi (SCi) the neuronal fluorescent tracer fluorogold or hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt), respectively.

To identify the whole population of RGCs (retinofugal RGCs), 3 days before processing the tracer was applied onto the proximal intraorbitally portion of optic nerve stump (ONS), close to the eye.

To identify the whole population of RGCs projecting ipsilaterally or contralaterally, one of the SCi was removed (colliclectomy) and one week later FG was applied to the remaining SC. Animals were processed a week after the application of the tracer.

To develop the experimental model of OHT albino mice and rat were used. The perilimbar and episcleral veins of the left eye were photocoagulated with a diode laser (LP), leaving the right eye as control. The dot size, duration, potency and number of laser shots was, 0-100 μ m, 0.5s, 0.4W and 90 in rat, and 50-100 μ m, 0.5s, 0.3W and 72 in mice, respectively.

To determine the number of laser shots needed to increase the IOP in rat, a pilot group divided into two subgroups 1.1 and 1.2 received 65-70 or 85-90 shots, respectively.

To study the OHT model, several experimental groups were prepared and organized according to the purpose and duration of the study (8, 14, 21 days or 8 and 12 weeks after laser, in rats, and 8, 17 days, 5 and 9 weeks after laser, in mice, respectively).

To study the effect of LP on the IOP and its temporal evolution, the IOP was measured with a contact tonometer in rat and a rebound tonometer in mice. In rat, the IOP values were registered before and at 6, 12, 24, 48, 72 hours, and 1, 2, 3, 4, and 12 weeks after LP. In mice the measurements were taken before and at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 21, 28, 42, and 56 days after LP.

To study the effect of OHT on the active retrograde axonal transport (RAT), one week before processing FG or OHSt was applied on the rat or mice SCi, respectively. To study the RAT that occurs by diffusion (passive) the neuronal tracer dextran tetra-methyl-rhodamine (DTMR) was applied on the ONS 5 days after FG or OHSt application and 2 days before processing.

To study the population of RGCs surviving the OHT, two experiments were carried out: retrograde tracing of the RGCs one week after LP and posterior tracing from the ONS with DTMR. Doubly detection of RGC by FG or OHSt tracing and immunodetection of Brn3a, a specific RGC transcription factor.

To study the effect of OHT on the intraretinal RGC axons that form the retinal nerve fibre layer (NFL) and on the axons that form the head of the optic nerve, these were identified by immunodetection of the phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNFH) in whole mounted retinas and ON transversal sections.

To study the effect of the OHT on the astrocytes present in the head of the ON, the glial fibrillary acidic protein (GFAP) was immunodetected in transversal sections.

To study the effect of the OHT on all the cells present in the RGC layer, on experimental and control flat mounted retinas all the nuclei were stained with DAPI and the RGCs were identified by Brn3a immunodetection.

All samples were examined and photographed under an epifluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with a computer-driven motorized stage (ProScan™ H128 Series; Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK), controlled by Image-Pro Plus (IPP 5.1 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). To make reconstructions of the retinal whole-mounts, retinal multiframe acquisitions were acquired. The individual FG or Brn3a fluorescent images taken in each retina were processed by a specific cell counting automated routine. Quantitative data were used afterwards to generate isodensity maps.

Results

The total mean number $\pm$ standard deviation of retinofugal RGCs traced from the ONS was 82,818 $\pm$ 3,949 (n=27) and 89,241 $\pm$ 3,576 (n=6) in the albino and pigmented strain, respectively. The total number of retinotectal RGC traced from the SCi was 81,486 $\pm$ 4,340 (n=37) in the albino rat while in the pigmented strain was 87,229 $\pm$ 3,199 (n=59).

The total number of RGC traced from the intact ON in albino rats was 85,063 $\pm$ 1,330 (n=5).

In mice, the total number of retinofugal RGCs traced from the ONS was 49,493 $\pm$ 3,936 (n=18) and 42,658 $\pm$ 1,540 (n=10) in the albino and pigmented strains, respectively. The total number of retinotectal RGCs traced from the SCi was 48,733 $\pm$ 3,954 (n=43) in the albino strain and 41,192 $\pm$ 3,395 (n=42) in the pigmented one.

In both species, the population of retinofugal RGCs was bigger than the population of retinotectal RGCs, although this difference was not significant.

The total number of RGCs that project ipsilaterally in the albino rats was 2,103 $\pm$ 270 (n=12) and in the pigmented strain was 3,600 $\pm$ 371 (n=9). This population represents the 2.5% and the 4.2% of the retinotectal population of RGCs in albino and pigmented rats, respectively.

Isodensity maps showed that the highest densities of RGCs are located in an horizontal region situated approximately 1mm above the optic disk along the naso temporal axis, shaped as a visual streak wherein the highest density values are observed in the superotemporal retina. From this region of high density, RGCs densities decrease towards the dorsal and ventral periphery. This decrease is more abrupt in the dorsal retinas. This distribution is observed both in rats and mice.

FG-traced ipsilateral RGCs (FG⁺ipRGCs) are mainly found in the periphery of the temporal retina and are distributed in the shape of a crescent moon. FG⁺ipRGC density increases from the inferior to the superior zone, and it is in the superotemporal region where the highest density is found.

Subgroup 1.1 did not show an IOP increase and there was neither axonal degeneration at the head of the optic nerve nor RGC loss. In the optic nerve of subgroup 1.2, which showed an increase of the IOP, there were sectors with a lower pNFH expression and a higher GFAP expression. This sectorial damage corresponded in the retina with sectors of RGC loss.

In rat, 12 hours after LP, the IOP values reached their maximum which was approximately twofold the basal values. From here on the IOP decreased slowly till it stabilized at 3 weeks, afterwards remained above the basal values until the last time point analyzed (12 weeks). In mice, there was a twofold increment of the IOP 24 hours after LP that persisted till the 4th day, decreasing afterwards till reaching its basal levels by the 7th day.

In rat, the loss of retrograde tracing was observed 8 days after LP. The bulk of FG⁺RGC loss occurred between 8 days (38,397 $\pm$ 12,306 (n=6)) and two weeks (15,251 $\pm$ 18,729 (n=8)) after LP, not progressing thereafter (18,149 $\pm$ 20,383 (n=34, 3 weeks), 15,727 $\pm$ 16,468 (n=41, 8 weeks) and 18,686 $\pm$ 16,487 (n=14, 12 weeks)). This means that the percentage of surviving FG⁺RGCs in the experimental eyes accounts to 46%, 19%, 23%, 21% and 24% of the control values at 8 days, 2, 3, 8 and 12 weeks after LP, respectively.

In mice, the loss of retrograde tracing was observed 8 days after LP and did not progress with time (13,428 $\pm$ 6,295 (n=12, 8 days), 10,456 $\pm$ 14,301 (n=13, 17 days), 12,622 $\pm$ 14,174 (n=21, 5 weeks)

and $10,451 \pm 13,949$ ($n=13$, 9 weeks). This means that the percentage of surviving OHSt⁺RGCs in the experimental retinas accounts to 28%, 23%, 26% and 22% of the control values at 8, 17, 35, and 63 days after LP, respectively.

During the first 2 weeks after LP it was observed a parallelism between the areas with FG or OHSt traced-RGC and those with DMTR-traced RGC that indicated a compression of the RGC axons near the optic nerve. This means that the lack of RAT during these two first weeks is caused by a damage in the active RAT that is followed by a damage in the passive RAT.

In 95% of the analyzed retinas, the areas devoid of traced-RGCs were located in the dorsal retina, in sectors with their apex pointing to the optic disk. There were two types of RGC loss, one localized with few to none traced-RGCs and another diffuse wherein there was a decrease in RGC density.

There was a clear discrepancy among the number of surviving FG⁺RGCs traced before the LP and the smaller number of RGCs traced from the ONS with DTMR. In other experiment, 8 days after LP it was observed that in the areas devoid of FG⁺RGCs there were Brn3a⁺RGCs, both in rat and mice (in rat, Brn3a⁺RGCs $72,289 \pm 5,431$; ($n=6$) and FG⁺RGCs $38,397 \pm 12,306$; ($n=6$); in mice Brn3a⁺RGCs $24,343 \pm 5,739$; ($n=12$) and OHSt⁺RGCs $13,428 \pm 6,295$; ($n=12$). These data mean that at day 8 post LP the 47% and 45% of surviving RGCs in rat and mice, respectively, do not have a functional active RAT.

In the NFL there were areas devoid of traced-RGCs and signs of retrograde axonal and somatic degeneration observed by the aberrant expression of pNFH which was more intense at 17 and 21 days post LP. The decrease in the axonal density was obvious 12 weeks post-LP.

In the injured areas of the retinas there were few Brn3a⁺RGCs, however the ratio DAPI⁺nuclei/Brn3a⁺RGCs was higher than in control retinas. This indicates that OHT affects specifically the RGC population.

Conclusions

The population of traced RGCs in rat and mice can be automatically quantified with a confidence level similar to manual quantifications. The total number of retinofugal RGCs is bigger, but not significantly, than the number of retinotectal ones, indicating the massive retinotectal projection in adult rats. The population of retinofugal and retinotectal RGCs is bigger in pigmented rats than in albino ones, and in swiss mice than in pigmented mice (C57BL/6).

The vast majority of RGCs decussate their axons at the level of the optic chiasm, and this proportion is bigger in pigmented than in albino rat.

RGC distribution in the retina is not homogeneous, their highest densities are found in the dorsal retina along the naso-temporal axis similar to a visual streak, within this streak the highest densities are located superotemporally. Ipsilateral RGCs are found mainly in the periphery of the temporal retina adopting the shape of a crescent moon, wherein the highest densities are in the superotemporal area.

Laser photocoagulation of the trabecular mesh, perilimbar and episcleral vessels induces an increase of the IOP that triggers degenerative events in the retina and in the ON resembling those observed in glaucomatous patients.

OHT damages the RAT. This impairment is maintained during the whole period of study and affects approximately 75-80% of the RGC population. This damage is first functional and afterwards mechanic.

The damage inflicted to the RAT induces the degeneration and progressive death of RGCs.

The lack of RGCs occurs preferably in the dorsal retina and is sectorial. These sectors have their apex towards the optic disk. RGC loss can be localized or diffuse.

OHT compresses the axons in the head of the ON inducing the anterograde and retrograde degeneration of the RGC axons.

There is a selective loss of RGCs in the ganglion cell layer that indicates that OHT-induced damage is localized in the ON head and is not due to a generalized retinal ischemia.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADI:	Área de interés.
BDNF:	Brain derived neurotrophic factor (factor neurotrófico derivado del cerebro).
BSA:	Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino).
CFNR:	Capa de fibras nerviosas de la retina.
CGR:	Células ganglionares de la retina.
CGR-Brn3a+:	Células ganglionares de la retina inmunomarcadas con Brn3a.
CGRcn-FG⁺:	Células ganglionares de la retina retinotectales que proyectan contralateralmente trazadas retrógradamente con FG.
CGR-FG⁺:	Células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con Fluorgold.
CGRip-FG⁺:	Células ganglionares de la retina retinotectales que proyectan ipsilateralmente trazadas retrógradamente con FG.
CGR-OHSt⁺:	Células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con OHSt.
CGR-pNFH⁺:	Células ganglionares de la retina que expresaban en su soma pNFH.
CGR-RT97⁺:	Células ganglionares de la retina inmunodetectadas positivamente por la técnica inmunofluorescente de RT-97.
ColS.:	Colaboradores.
CS:	Colículo superior.
d:	Días.
DAPI:	4', 6 diamidino-2 fenil indol.
DMSO:	Dimetil sulfóxido.
DNA:	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxiribonucleico)
DTMR:	Dextrano tetrametil-rodamina.
ERG:	Electrorretinograma.
FG:	Fluorogold.
FL:	Fotocoagulación por láser.
FNR:	Fibras nerviosas de la retina.
GFAP:	Glial fibrillary acidic protein (proteína ácida fibrilar glial).
HRP:	Horse radish peroxidase (peroxidasa de rábano).
HTO:	Hipertensión ocular.
i.p.:	Intraperitoneal.
MET:	Microscopio electrónico de transmisión.
MNO:	Muñón del nervio óptico.
mRNA:	Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensajero)
NDS:	Normal donkey serum (suero normal de burro).
NGL:	Núcleo geniculado lateral.
NO:	Nervio óptico.
NOG:	Neuropatía óptica glaucomatosa.
OHSt:	Hidroxistilbamidina metano-sulfonato.

OMS:	Organización mundial de la salud.
PBS:	Tampón fosfato salino 0,1 M a 4°C.
PF:	Paraformaldehído.
PIO:	Presión intraocular.
pNFH:	Phosphorylated neurofilament high (cadena fosforilada pesada del triplete de neurofilamentos).
POU:	Pit-Oct-Unc.
PVG:	Piebald Virol Glaxo Brown Norway.
s:	Segundos.
SD:	Sprague-Dawley.
SNC:	Sistema Nervioso Central.
TA:	Temperatura ambiente.
TAR:	Transporte axonal retrógrado.
W:	Vatíos.

LISTA DE ILUSTRACIONES (Figuras y Tablas)

FIGURAS:

INTRODUCCIÓN

- Figura 1**, pág. 3: Ilustración de las partes de una neurona.
- Figura 2**, pág. 4: Esquema ilustrativo del sistema visual y del ojo en humanos.
- Figura 3**, pág. 6: Dibujo realizado por Santiago Ramón y Cajal de las neuronas en una sección radial de la retina.
- Figura 4**, pág. 7: Imagen y esquema ilustrativo de la estructura y de los tipos neuronales de la retina.
- Figura 5**, pág. 10: Esquema ilustrativo de la localización del CS en el cerebro de ratón, e imagen de los terminales axonales de las CGR marcados con la subunidad B de la toxina colérica en una sección coronal del CS de rata.
- Figura 6**, pág. 18: Esquema ilustrativo de la hidrodinámica del humor acuoso.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Figura 7**, pág. 40: Esquema ilustrativo y fotografía explicativa de la metodología de la fotocoagulación por láser.
- Figura 8**, pág. 42: Imágenes representativas de CGR trazadas retrógradamente en rata y ratón.
- Figura 9**, pág. 43: Esquema representativo de la aplicación del trazador neuronal en ambos CS y en el MNO.
- Figura 10**, pág. 44: Esquema de las arterias de la cabeza del nervio óptico de rata SD.
- Figura 11**, pág. 45: Esquema representativo de la estrategia experimental para la identificación y cuantificación de la población de CGR que proyectan ipsi o contralateralmente.
- Figura 12**, pág. 49: Esquema representativo de la técnica de inmunohistofluorescencia indirecta para la detección de la proteína nuclear Brn3a de las CGR.
- Figura 13**, pág. 53: Imagen de un fotomontaje de una retina representativa montada a plano de rata.

- Figura 14**, pág. 55: Imagen que ilustra los distintos pasos utilizados por las subrutinas automáticas para el conteo de las CGR marcadas retrógradamente con OHSt en ratón.
- Figura 15**, pág. 59: Imagen que ilustra el aumento de la resolución en la representación de la distribución de las CGR.

RESULTADOS

- Figura 16**, pág. 62: Gráficas de correlación entre el conteo automático y el manual de las CGR trazadas retrógradamente, en rata y ratón.
- Figura 17**, pág. 64: Histogramas que representan la población de CGR retinofugal y retinotectal en rata y ratón, pigmentado y albino.
- Figura 18**, pág. 66: Imagen representativa de CGRip-FG⁺ e histograma que representa la población de CGRip-FG⁺ en retinas de rata pigmentada y albina.
- Figura 19**, pág. 69: Mapas de isodensidad donde se representa la distribución de las CGR-FG⁺ retinotectales de retinas representativas de ratas albinas y pigmentadas.
- Figura 20**, pág. 70: Mapas de isodensidad de las CGR-FG⁺ retinofugales de la retina izquierda y derecha representativas de la misma rata SD.
- Figura 21**, pág. 70: Imagen y su correspondiente mapa de isodensidad de las CGR-OHSt⁺ retinotectales de una retina representativa de ratón albino Swiss.
- Figura 22**, pág. 71: Mapas de isodensidad de las CGR-OHSt⁺ retinotectales de retinas representativas de ratones albinos y pigmentados.
- Figura 23**, pág. 72: Imagen de las CGRip-FG⁺ de una retina representativa de rata albina y pigmentada, con sus correspondientes mapas de isodensidad.
- Figura 24**, pág. 73: Histogramas que muestran el efecto del número de disparos láser en el aumento de la PIO y en la población de CGR-FG⁺ en los subgrupos 1.1 y 1.2.
- Figura 25**, pág. 75: Imágenes de retinas con CGR-FG⁺ con sus correspondientes mapas de isodensidad, y de secciones de los NOs proximales al globo ocular donde se observa la expresión de pNFH y GFAP, de animales representativos de los grupos 1.1 y 1.2.
- Figura 26**, pág. 76: Histogramas que muestran la evolución temporal de la PIO después de la FL, en rata y ratón.

- Figura 27**, pág. 78: Histogramas que muestran la evolución temporal de las CGR trazadas retrógradamente después de la FL, en rata y ratón.
- Figura 28**, pág. 81: Imágenes de fotomontajes de retinas experimentales de ratas con su CGR-FG⁺ y sus correspondientes mapas de isodensidad, analizadas a 3, 8 ó 12 semanas después de la FL. Se muestra los dos tipos de pérdida de CGR: localizada y difusa.
- Figura 29**, pág. 84: Mapas de isodensidad de retinas experimentales de ratones trazadas retrógradamente con OHSt, analizadas a 8, 17, 35 ó 63 días después de la FL. Se muestra los dos tipos de pérdida de CGR: localizada y difusa.
- Figura 30**, pág. 85: Imagen en detalle de una región de una retina experimental con las CGR marcadas retrógradamente antes de la FL y posteriormente marcadas con DTMR. Se observa un mayor número de CGR-FG⁺ que DTMR⁺.
- Figura 31**, pág. 86: Imágenes en detalle de regiones representativas de retinas de rata, control y experimentales analizadas a 8 y 21 días después de la FL. Donde se muestra la población de CGR vivas (CGR-Brn3a⁺) y la población CGR que tienen intacto el transporte axonal retrógrado activo (CGR-FG⁺) después de la FL.
- Figura 32**, pág. 87: Retinas controles y experimentales representativas de rata, con sus correspondientes mapas de isodensidad, donde se muestra la población de CGR vivas (CGR-Brn3a⁺) y la población de CGR que tienen intacto el transporte axonal retrógrado activo (CGR-FG⁺) analizadas a 8 y 21 días después de la FL.
- Figura 33**, pág. 88: 33.A. Histograma que muestra la evolución temporal de la población de CGR-FG⁺ y CGR-Brn3a⁺ de rata, a 8 y 21 días después de la FL. 33.B. Histograma que muestra la evolución temporal de la población de CGR-OHSt⁺ y CGR-Brn3a⁺ de ratón, a 8 y 35 días después de la FL.
- Figura 34**, pág. 90: Retinas controles y experimentales representativas de ratón, con sus correspondientes mapas de isodensidad, donde se muestra la población de CGR vivas (CGR-Brn3a⁺) y la población CGR que tienen intacto el transporte axonal retrógrado activo (CGR-FG⁺) analizadas a 8 y 35 días después de la FL.
- Figura 35**, pág. 92: Fotomontaje de una retina experimental e imágenes en detalle de una retina experimental y control representativas de rata, con las CGR doblemente marcadas con FG y con DTMR, analizadas a 14 días después de la FL.

- Figura 36**, pág. 95: Fotomontaje de una retina control y experimentales representativas de rata, con las CGR doblemente marcadas con FG y con DTMR, analizadas a 8 semanas después de la FL.
- Figura 37**, pág. 97: Fotomontaje de una retina control y experimentales y sus correspondientes mapas de isodensidad representativas de ratón, con las CGR doblemente marcadas con FG y con DTMR, analizadas a 17, 35 ó 63 días después de la FL.
- Figura 38**, pág. 99: Fotomontaje e imágenes en detalle de regiones de retinas representativas controles y experimentales de rata, con las CGR marcadas retrógradamente con FG e inmunoidentificando los axones de la CFNR mediante el anticuerpo RT-97. Analizadas a 8, 21 y 4 semanas después de la FL.
- Figura 39**, pág. 102: Mapas de isodensidad de las CGR-FG⁺ de 2 retinas experimentales de rata, y su correspondientes mapas de distribución de las CGR-pNFH⁺, analizadas a 21 días después de la FL.
- Figura 40**, pág. 103: Mapas de isodensidad de las CGR-FG⁺ de 2 retinas experimentales de ratón, y su correspondientes mapas de distribución de las CGR-pNFH⁺, analizadas a 17 días después de la FL.
- Figura 41**, pág. 105: Imágenes de las células de la capa de CGR marcadas con Brn3a y DAPI de regiones de una retina representativa de rata control y experimental lesionada, analizada a 4 semanas después de la FL.

TABLAS:

RESULTADOS

- Tabla 1**, pág. 67: Tabla que presenta la máxima, mínima, y la media±desviacion estandard ($\bar{X} \pm DE$) del área y de la densidad de CGR de las retinas de las diferentes estirpes de ratas y ratones.
- Tabla 2**, pág. 78: Tabla que presenta la media y DE ($\bar{X} \pm DE$) del número total de CGR-FG⁺ de las retinas controles derechas y experimentales izquierdas de ratas albinas (SD), de los grupos experimentales analizados a 8 días, 2, 3, 8 ó 12 semanas después de la FL.
- Tabla 3**, pág. 79: Tabla que presenta la media y DE ($\bar{X} \pm DE$) del número total de CGR-OHSt⁺ de las retinas controles derechas y experimentales izquierdas de ratones albinos (Swiss), de los grupos experimentales analizados a 8, 17, 35 ó 63 días después de la FL.

Tabla 4, pág. 101:

Tabla que presenta la media y DE ($\bar{X} \pm \text{DE}$) del número total de CGR-pNFH⁺ de retinas controles derechas y experimentales izquierdas, de ratas (SD) y ratones (Swiss), analizadas a 21 y 17 días después de la FL.

ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

Diferentes estirpes de rata y ratón son empleadas comúnmente en el estudio de la etiología y patología de diferentes tipos de lesiones neuronales y para examinar la eficacia de distintas estrategias de prevención y de tratamiento experimental en el Sistema Nervioso Central (SNC). Fue interesante desarrollar un método automático que permitiera el estudio completo y detallado de la población de CGR en estas especies de roedores.

La neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) es una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes en el mundo, de la que se desconocen actualmente las bases biológicas pero de la que se sabe que el principal factor de riesgo es el aumento de la presión intraocular (PIO).

El primer objetivo de esta tesis doctoral es el estudio completo y detallado de la población total de CGR marcadas retrógradamente de las estirpes de ratas y ratones adultos albinos y pigmentados. Este estudio sirve como referencia para futuros estudios de diferentes neuropatías; el segundo objetivo es desarrollar un modelo experimental de HTO en rata y ratón albino para caracterizar los efectos de la HTO en la población de CGR y en los axones que forman el nervio óptico (NO) y la capa de fibras nerviosa de la retina (CFNR), para estudiar los mecanismos por los cuales la HTO causa daño en la población de CGR, de los cuales se desconocen muchos aspectos.

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

En la Introducción recordamos brevemente los diferentes componentes del sistema visual y su función en humanos, y posteriormente en roedores. Repasaremos las técnicas utilizadas en la identificación, cuantificación y estudio de la distribución de la población de CGR en roedores, y los modelos experimentales desarrollados de NOG inducidos por HTO en roedores. En la introducción distinguimos cuatro grandes apartados: En el primero de ellos se repasan los conceptos anatómicos y fisiológicos básicos del sistema visual y posteriormente nos centramos en las particularidades del sistema visual de ratas y ratones adultos, y en concreto en las características de las CGR de estos animales. En el segundo apartado se describen las técnicas empleadas históricamente para la identificación, cuantificación y estudio de la población de CGR en roedores. El tercer apartado de la introducción se describe la neuropatía óptica glaucomatosa (NOG), señalando la importancia de los modelos experimentales animales de HTO para el estudio de la NOG, sobre todo en roedores. Repasaremos los distintos tipos de modelos experimentales de HTO desarrollados en roedores. En el cuarto apartado se describen brevemente los diferentes modelos de lesión de las CGR, la muerte neuronal que se produce por la HTO y las diferentes estrategias de neuroprotección empleadas experimentalmente para prevenir la muerte de las CGR.

En la segunda parte de esta tesis se exponen de forma breve y concreta los Objetivos generales de nuestro trabajo de tesis doctoral, que se pueden resumir en el estudio detallado de la población de CGR y el efecto de la HTO en la población de CGR y sus axones. Para ello ponemos a punto un método automático de conteo de las CGR y desarrollamos un modelo experimental de

HTO. Utilizamos trazadores neuronales retrógrados, técnicas inmunohistoquímicas y marcadores celulares.

La tercera parte corresponde a la descripción del material y métodos utilizados para la realización de la tesis. Tras una breve introducción, se explican los métodos experimentales utilizados en las dos principales secciones en las que se dividen el conjunto de experimentos realizados en esta tesis. Un primer conjunto de experimentos tiene como finalidad el estudio automático cuantitativo y de la distribución de la población de CGR. Para este conjunto de experimentos hemos utilizado trazadores neuronales retrógrados y técnicas de análisis de imagen. Un segundo conjunto de experimentos tiene por finalidad desarrollar un modelo experimental de HTO en rata y ratón, realizar un estudio del efecto de la HTO en las CGR y en los axones que forman el NO y la CFNR, y estudiar el efecto de la HTO en las células que forman la capa de CGR. Para este segundo conjunto de experiencias hemos utilizado principalmente técnicas de trazado neuronal, inmunohistoquímica, marcadores celulares y de análisis de imagen.

En la cuarta parte se exponen los resultados de los experimentos realizados, siguiendo el mismo esquema organizativo mencionado en el apartado previo de métodos. En cada uno de estos apartados, tras la descripción analítica de los resultados, se incluyen las tablas, histogramas e imágenes que ilustran y documentan las observaciones realizadas.

La quinta parte corresponde a la discusión, y en ella se analizan de forma crítica los resultados obtenidos. El primer punto analizado son los resultados obtenidos de la cuantificación y distribución de la totalidad de la población de CGR, valorando sus ventajas e inconvenientes, su validación, y las diferencias con otros métodos de cuantificación realizados en experimentos previos. El segundo punto analizado es el método experimental empleado para inducir la HTO. Posteriormente se analiza el efecto de la HTO en el transporte axonal retrógrado, en la supervivencia de las CGR y en los axones que forman el NO y la CFNR. También se analiza el efecto de la HTO en las células de la capa de CGR. Estos resultados son analizados valorando sus ventajas e inconvenientes, sus semejanzas y diferencias respecto a los resultados obtenidos en estudios previos de HTO, para finalmente esbozar algunas de las posibles implicaciones que podrían tener los resultados en el diseño de futuras estrategias de neuroprotección.

En la sexta parte se enumeran las principales conclusiones del trabajo y los hallazgos originales más relevantes.

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

Por último hemos incluido como anexos (I, II, III, y IV) las cuatro publicaciones principales que recogen una gran parte de los trabajos experimentales presentados en esta tesis doctoral.

HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO

Las siguientes son observaciones originales recogidas de nuestros estudios sobre la población de células ganglionares de la retina (CGR) y el efecto de la hipertensión ocular (HTO) en la población de CGR.

Este trabajo constituye el primer estudio detallado de la cuantificación y distribución de la totalidad de la población de CGR en rata y ratón tanto albino como pigmentado y de los efectos de la HTO en la población de CGR y en sus axones.

Para poder llevar a cabo estos análisis hemos:

1. Desarrollado un método automático para el estudio de la población total de las CGR trazadas en rata y ratón, albinos y pigmentados que permite:
 - i. Cuantificar la población total de CGR retinofugal, retinotectal y la población retinotectal ipsilateral y contralateral.
 - ii. Representar mediante mapas de isodensidad la distribución de las distintas poblaciones de CGR en la retina.
2. Desarrollado un modelo experimental de HTO en rata y ratón albino, para el estudio de los mecanismos por los cuales la HTO causa daño en la población de CGR:
 - i. Utilizando distintos trazadores neuronales hemos identificado las células ganglionares de la retina que tienen un transporte axonal retrógrado funcional activo y pasivo después de la HTO, y hemos cuantificado tanto el efecto de la HTO en el transporte axonal retrógrado en las CGR como la distribución de las CGR supervivientes que mantienen el transporte axonal retrógrado funcional.
 - ii. Utilizando anticuerpos que reconocen el Brn3a, factor de transcripción específico de las CGR, hemos cuantificado el efecto de la HTO en la supervivencia de las CGR y estudiado la distribución de las CGR que sobreviven.
 - iii. Utilizando anticuerpos que reconocen la subunidad de alto peso molecular fosforilada del triplete de neurofilamentos (pNFH), hemos descrito el curso de la respuesta degenerativa de los axones que componen el NO y la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR).
 - iv. Utilizando la tinción nuclear de DAPI, hemos cuantificado el efecto de la HTO en todas las células de la capa de CGR.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

Durante mi estancia en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia los trabajos de investigación en los que he participado se han divulgado en las siguientes publicaciones, capítulos de libro o comunicaciones a congresos. Aquellas señaladas con asteriscos reflejan los trabajos en los que he participado como autor principal y han constituido la base experimental de esta Tesis Doctoral.

ARTÍCULOS

- Vidal-Sanz M, De la Villa P, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, **Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Villegas-Pérez MP (2007) Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye* 21: 42-45.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Lönngren 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. *Mol. Vis.* 14: 1050-63.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado-Calvo P, Lönngren U, **Salinas-Navarro M**, Cánovas I, Nadal-Nicolás FM, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M (2008) Immediate upregulation of proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50: 424-31.
- **Salinas-Navarro M**, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009) A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision. Res.* 49: 115-26.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, **Salinas-Navarro M**, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50: 3860-8.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, **Salinas-Navarro M**, Villegas-Pérez MP, 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. *Exp. Eye Res.* 89: 32-41.
- Schnebelen C, Pasquis B, **Salinas-Navarro M**, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Vidal-Sanz M, Bron AM, Bretillon L, Acar N (2009) A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of intraocular pressure in rats. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 119: 191-203.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, **Salinas-Navarro M**, Sobrado-Calvo P, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009) Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vision Res.* 49: 2808-25.
- **Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010) Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp. Eye Res.* 90:168-83.
- **Salinas-Navarro M**, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, 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 Res.* 49: 637-47.

****Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M (2009) Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol. Vis.* 15: 2578-98.

Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, **Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2010) Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 3171-83.

Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, **Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM (2010) Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 5690-6.

****Cuenca N**, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, **Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, de la Villa P, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010) Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp. Eye Res.* 91: 273-85.

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

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

García-Ayuso D, **Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Agudo M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2011) Retinal ganglion cell axonal compression and death by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. (Enviado para su publicación).

Renko O, Jokinen E, Lönngrén U, **Salinas-Navarro M**, Tuppurainen K, Turunen N, Lafuente M, Vidal-Sanz M, Finn H, Näpänkangas U (2011) I κ B and NF- κ B are involved in retinal ganglion cell death after axonal, ischemic and high intraocular pressure injuries. *Exp. Brain Res.* (Enviado para su publicación).

CAPÍTULOS DE LIBRO

****Vidal-Sanz M**, **Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Ortín-Martínez A, Sánchez-Llarena S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP (2010) Elevation of the intraocular pressure results in devastating damage to the retinal ganglion cell population in adult albino rats and mice. En: *Actualización en investigación de retina*, M^a Dolores Pinazo Durán et al., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 21-26.

Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, **Salinas-Navarro M**, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010) Ocular hypertension after laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins in adult pigmented mice: Effects on electroretinography and retino-tectal projection. En: *Actualización en investigación de retina*, M^a Dolores Pinazo Durán et al., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 178-181.

García-Ayuso D, Agudo M, **Salinas-Navarro M**, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2010) Retinal ganglion cell death after photoreceptor loss: Comparison between hereditary and

light-induced retinal degeneration. En: Actualización en investigación de retina, M^a Dolores Pinazo Durán et al., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 137-140.

Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, García-Ayuso D, **Salinas-Navarro M**, Sellés-Navarro I., Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Nieto-López L, Agudo-Barriuso, M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010) Spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult rat retina. En: Actualización en investigación de retina, M^a Dolores Pinazo Durán et al., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 129-132.

COMUNICACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

Salinas-Navarro M, S. Mayor-Torroglosa S, Holmes T, Ortiz A, Bernal JM, Cánovas I, Aguilera ME, Lund RD, M.P. Villegas-Pérez MP, M. Vidal-Sanz M (2005) Automatic quantitative analysis of retinal ganglion cells that project to the superior colliculi in adult Sprague–Dawley rats Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46: E-Abstract 271.

Ramírez JM, Salazar JJ, Ramírez AI, Rojas B, De Hoz R, Villegas-Pérez M, S. Mayor-Torroglosa S, **Salinas M**, Vidal-Sanz M, Triviño A (2005) Morphometric analysis of the retinal astroglia in an ocular hypertension model. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46: E-Abstract 1318.

Parrilla-Reverter G, Sobrado-Calvo P, Mayor-Torroglosa S, Bernal JM, **Salinas M**, Aguilera ME, Latour E, Lambrou GN, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2005) Intraorbital optic nerve crush induces retinal ganglion cell loss: transient protection with the neurotrophic factors BDNF, NT–4 or CNTF. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46: E-Abstract 1282.

Villegas-Pérez MP, Mayor-Torroglosa S, Salazar JJ, Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, **Salinas M**, J. Miralles J, Vidal-Sanz M (2005) Laser-induced ocular hypertension causes an alteration of the retrograde axoplasmic transport in adult rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 46: E-Abstract 1234.

Vidal-Sanz M, Parrilla-Reverter G, Sobrado P, Cánovas I, Bernal JM, **Salinas M**, Aguilera M.E (2005) Intraorbital optic nerve crush-induced retinal ganglion cell death. Degeneration and neuroprotection with BDNF, NT-4 OR CNTF. Ophthalmic Research 37 S1 31. Abstract.

Villegas-Pérez MP, **Salinas M**, Mayor S, Holmest T, Lund RD, Bernal JM, Cánovas I, Aguilera ME, Vidal-Sanz, M (2005) Quantitative analysis of retinal ganglion cells that project to the superior colliculi in adult rats and mice. Ophthalmic Research 37 S1 31. Abstract.

Vidal-Sanz M, Mayor S, Ramírez AI, Triviño A, Salazar JJ, Ramírez JM, **Salinas M**, Villegas-Pérez MP (2005) Laserirg the trabecular meshwork and limbal veins in adult rats results in ocular hipertensión and retrograde degeneration of retinal ganglion cells. Ophthalmic Research 37 S1 48. Abstract.

Ramírez AI, Salazar JJ, De Horz, Rojas B, Triviño A, Villegas Pérez MP, Mayor-Torroglosa S, **Salinas M**, Vidal Sanz M, Ramírez JM (2005) Behaviour of glia in a model of chronic ocular hypertension. Ophthalmic Research. 37 S1 32. Abstract.

Villegas-Pérez MP, Aguilera ME, **Salinas-Navarro M**, Mayor-Torroglosa S, Holmes T, Bernal JM, Cánovas I, Soro MI, Lund RD, Vidal-Sanz M (2006) Retinal ganglion cells in adult albino and pigmented rats: spatial distribution and quantitative analysis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: E-Abstract 3318.

Salinas-Navarro M, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, Ramírez JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2006) Long term effects of laser–induced ocular hypertension: retrograde degeneration of retinal ganglion cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: E-Abstract 1560.

Alarcón-Martínez L, De La Villa P, **Salinas-Navarro M**, García-Ayuso D, Cánovas I, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2007) Laser photocoagulation of the perilimbal and

episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Functional effects in the albino mice retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48: E-Abstract 4354.

Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Cánovas I, Bernal JM, Soro MI, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2007) Laser photocoagulation of perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Effects on the retinal ganglion cell population of the albino mouse. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48: E-Abstract 4353.

Schnebelen C, **Salinas-Navarro M**, Acar N, Pasquis B, Creuzot-Garcher CP, Villegas-Pérez MP, Bron AM, Vidal-Sanz M, Bretillon L (2007) Time course of IOP elevation, electroretinographic changes and retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma induced by laser. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48: E-Abstract 206.

Agudo M, Sobrado P, Pérez-Marín C, Lönnngren U, **Salinas M**, Cánovas I, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M (2007) BDNF-induced gene expression changes in axotomized adult rat retinas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48: E-Abstract 645.

Pérez-Marín C, Sobrado P, **Salinas M**, Cánovas I, Vidal-Sanz M, Agudo M (2007) Retinal localization and protein regulation of death related genes after optic nerve transection and crush. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48: E-Abstract 638.

Vidal-Sanz M, **Salinas-Navarro M**, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Cánovas I, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP (2007) Spatial distribution and quantitative analysis of retinal ganglion cells in adult albino rodents. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48: E-Abstract 134.

Schnebelen C, **Salinas-Navarro M**, Acar N, Pasquis B, Creuzot-Garcher CP, Villegas-Pérez MP, Bron AM, Vidal-Sanz M, Bretillon L (2008) Effect of dietary omega-3 and omega-6 fatty acids on IOP elevation, electroretinographic changes and retinal ganglion cell loss in a laser-induced rat model of glaucoma. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48: E-Abstract 5499.

Valiente-Soriano F, **Salinas-Navarro M**, Jiménez-López M, Ortín-Martínez A, Alarcón-Martínez L, Cánovas I, Bernal JM, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M (2008) Effects of elevated intraocular pressure on the retinal ganglion cell population in adult pigmented mice. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49: E-Abstract 5486.

Pinilla I, Cuenca N, **Salinas-Navarro M**, Fernández-Sánchez L, Alarcón-Martínez, Aviles-Trigueros M, Villegas-Pérez M, Vidal-Sanz M (2008) Changes in the outer retina after acute increase of the intraocular pressure in adult mice. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49: E-Abstract 5482.

Salinas-Navarro M, Napankangas U, Turunen N, Veijola J, Valiente-Soriano F, Villegas-Pérez MP, M. Vidal-Sanz (2008) Effects of acute increase of intraocular pressure in adult pigmented rats: assessment of the retinal nerve fiber layer (in vivo) and the retinal ganglion cell population. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49: E-Abstract 5480.

García-Ayuso, **Salinas-Navarro M**, Coll-Alcaraz L, Cánovas-Martínez I, Bernal-Garro JM, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP (2008) Characterization of the light-sensitive arciform region in the albino rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49: E-Abstract 4395.

García-Ayuso D, **Salinas-Navarro M**, Cánovas-Martínez I, Agudo-Barriuso, Lund RD, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2009) Long-term effects of light exposure on the albino rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: E-Abstract 3612.

Valiente-Soriano F, **Salinas-Navarro M**, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Ortín-Martínez A, Cánovas-Martínez I, Aviles-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009) Effects of elevated intraocular pressure on the retinotectal projection in adult pigmented mice. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: E-Abstract 2779.

- Nadal-Nicolás F, Jiménez-Lopez, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Cánovas-Martínez I, **Salinas-Navarro M**, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Qualitative and quantitative analysis of Brn3a expression in naive, optic nerve transected and optic nerve crushed adult rat retinas. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: E-Abstract 3193.
- Agudo M, Nadal-Nicolás F, Pérez-Marín M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, **Salinas-Navarro M**, Vidal-Sanz M (2009) Tnfr1 death-signalling pathway is regulated in the retina both after optic nerve transection and optic nerve crush. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: E-Abstract 3467.
- Ramírez I, Rojas B, Salazar JJ, de Hoz R, Gallego B, **Salinas-Navarro M**, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM (2010) Effects of laser induced ocular hypertension in astroglia and ganglion cells of adult mice retinas. A qualitative and quantitative Study. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51: E-Abstract 2120.
- García-Ayuso D, **Salinas-Navarro M**, Agudo M, Nieto-Lopez L, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2010) Retinal ganglion cell axonal constriction and death in the P23H-1 rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51: E-Abstract 3664.
- Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, De la Villa P, Valiente-Soriano J, **Salinas-Navarro M**, Sánchez-Migallón Carreras MC, Vidal-Sanz M (2010) Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented mice. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51: E-Abstract 5566.
- Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás F, **Salinas-Navarro M**, Alarcón Martínez L, Valiente Soriano FJ, Sauvé Y, Villégas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2010) Whole number and retinal topography of S, L and dual cones in retinas of albino and pigmented adult rats. FENS Abstr. Vol 5, 019.30, 2010 014.27.
- Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, García-Ayuso D, **Salinas-Navarro M**, Sellés-Navarro I, Vidal-Sanz M (2010) Response of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells to different lesions in the adult rat retina. Ophthalmic Res. 44: 61-62. Abstract.
- García-Ayuso D, Agudo M, **Salinas-Navarro M**, Cuenca N, Pinilla I, Villegas-Pérez MP (2010) Retinal ganglion cell fate after photoreceptor loss: comparison between hereditary and light-induced retinal degeneration. Ophthalmic Res. 44: 64. Abstract.
- Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, **Salinas-Navarro M**, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010) Alterations in electroretinography and retino-tectal innervation after the photocoagulation of the episcleral and perilimbal veins in adult pigmented mice. Ophthalmic Res. 44: 75-76. Abstract.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En esta tesis estudiamos la población de células ganglionares de la retina (CGR) que son neuronas especializadas de la retina que forma parte del sistema nervioso central (SNC), por tanto, este trabajo está englobado dentro de la neurociencia.

La población de CGR de las estirpes albinas y pigmentadas de ratas (Sprague-Dawley (SD) y Piebald Virol Glaxo Brown Norway (PVG)) y ratones adultos (Swiss y C57BL/6N) se ha usado frecuentemente para el estudio de la etiología y patología de diferentes tipos de lesiones neuronales (axotomía, isquemia, trauma, etc.) y para examinar la eficacia de distintas estrategias de prevención y de tratamiento experimental en el SNC. A pesar de la importancia de la población de CGR su distribución completa en la retina está poco caracterizada, por lo que hemos realizado un estudio completo y detallado de la población de CGR en estas estirpes de roedores, determinando por primera vez el número total de CGR de la población retinofugal, retinotectal e ipsilateral a los colículos superiores (CS), así como su distribución espacial detallada en la retina. Este estudio detallado sirve como referencia para futuros estudios de diferentes neuropatías.

La neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) es una de las enfermedades neurodegenerativas mas frecuentes en el mundo, de la que se desconocen actualmente las bases biológicas pero de la que se sabe que el principal factor de riesgo es el aumento de la presión intraocular (PIO). En este trabajo hemos desarrollado un modelo experimental de NOG inducida por aumento de la presión intraocular en dos especies de roedores, rata y ratón, para adquirir un mayor conocimiento de los mecanismos por los cuales la hipertensión ocular (HTO) causa daño en el nervio óptico (NO) y en la retina, como un primer paso para diseñar nuevas aproximaciones terapéuticas para llegar a su prevención y tratamiento. Para ello caracterizaremos los efectos de la HTO en la población de CGR y en sus axones, que en la retina se encuentran en la capa de fibras nerviosa de la retina (CFNR) y que al salir del ojo forman el NO. Estos estudios tienen amplias implicaciones ya que las enfermedades neurodegenerativas son cada vez más frecuentes y sus efectos muy devastadores en el mundo occidental.

En esta introducción recordaremos brevemente los diferentes componentes del sistema visual y su función en humanos, y posteriormente en roedores. Repasaremos las técnicas utilizadas en la identificación, cuantificación y estudio de la distribución de la población de CGR en roedores, y los modelos experimentales desarrollados de NOG inducidos por HTO en roedores.

1.1. EL SISTEMA VISUAL

Como hemos dicho anteriormente, el sistema visual es parte del SNC. Los principales componentes del sistema nervioso son las células nerviosas o neuronas (**Fig. 1**). Las partes de la neurona son el cuerpo o soma celular, que contiene el núcleo, mitocondrias y organelas. Del cuerpo celular salen varias fibras denominadas dendritas y el axón, que es la fibra nerviosa principal que

conduce las señales nerviosas. La función de una célula nerviosa es tomar la información de otras células por las dendritas y el cuerpo celular y sumar, integrar y transmitir esa información mediante el axón a otras células. La información es conducida habitualmente por los impulsos nerviosos y se transfiere de una neurona a otra a través de la sinapsis.

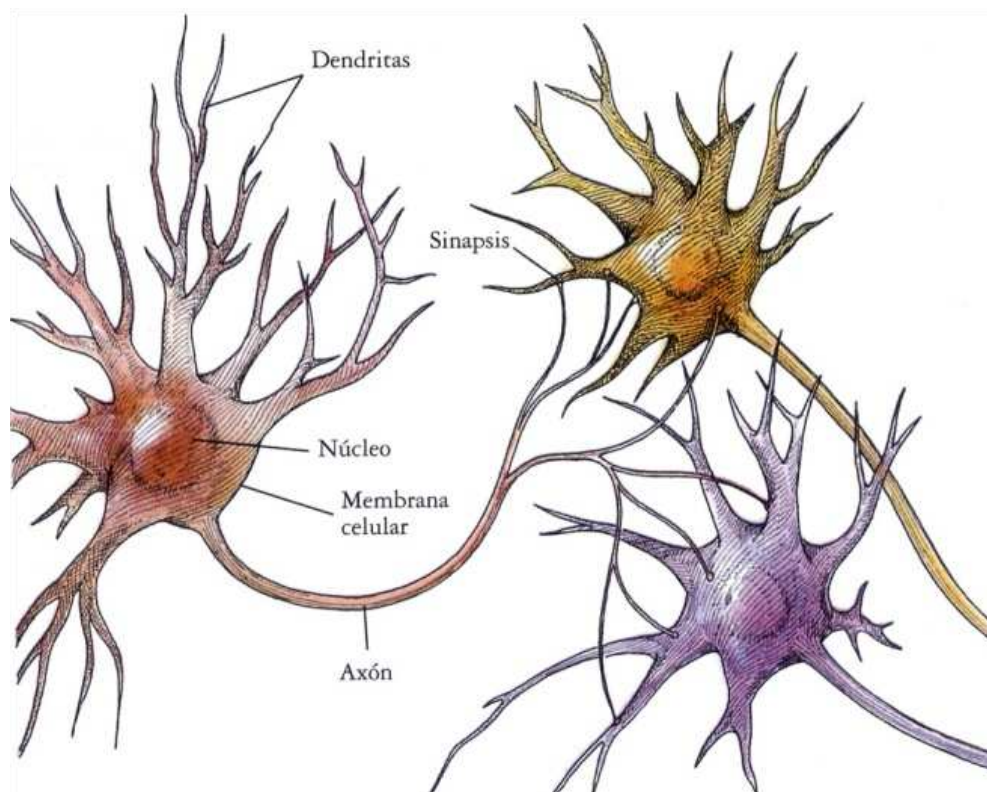


Figura 1. Principales partes de la célula nerviosa. El cuerpo o soma celular, contiene el núcleo y otras organelas; el axón, único que conduce los impulsos desde el soma celular; y las dendritas que reciben impulsos de otras células. Ilustración de "Ojo, cerebro y visión", D. Hubel, 1999.

1.1.1. ESQUEMA GENERAL

El sistema visual está compuesto por una serie de estructuras conectadas entre sí que permiten percibir, relacionar y procesar la información luminosa para obtener la percepción visual del mundo que nos rodea. Estas estructuras son los ojos, las retinas, los nervios ópticos, el quiasma óptico, los tractos ópticos y las diferentes zonas de proyección visual subcorticales y corticales (**Fig. 2A**). Este esquema básico se mantiene en la mayoría de mamíferos con ligeras variaciones, por lo que primero hablaré de forma general de los componentes y funcionamiento del sistema visual en humano, para luego señalar las particularidades básicas en la rata y ratón adulto, animales utilizados en nuestros estudios.

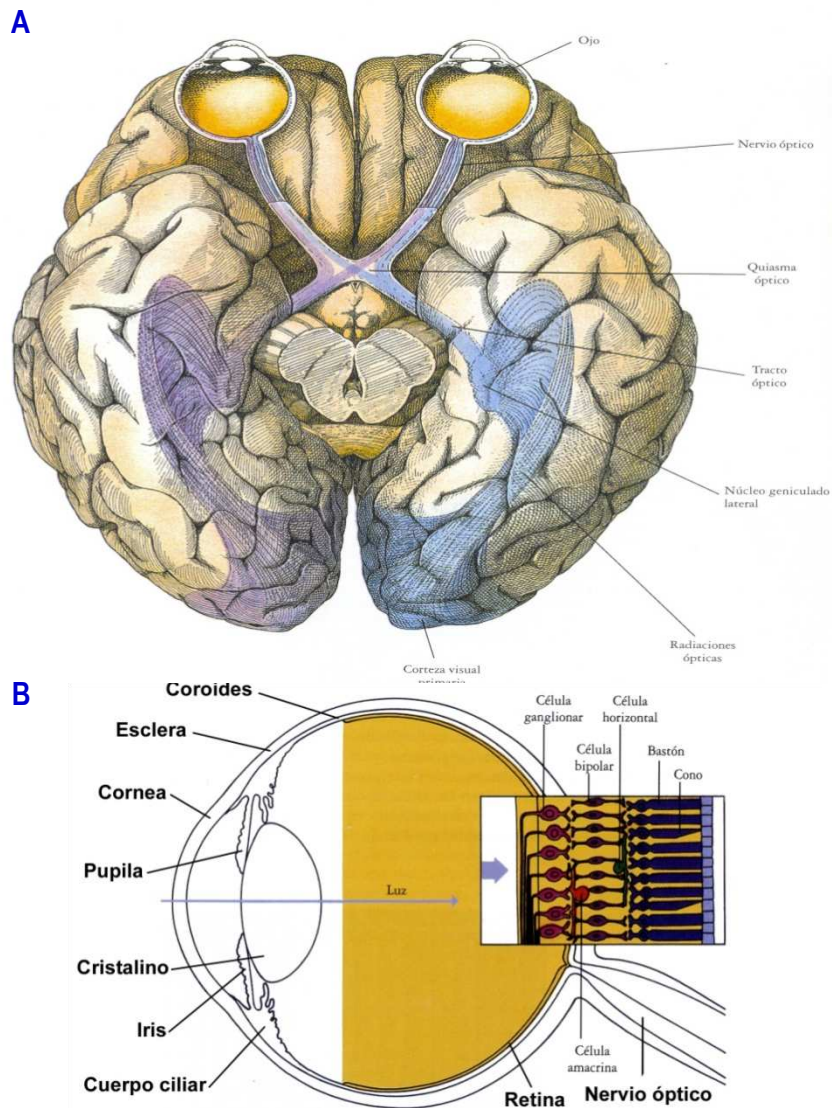


Figura 2. Esquema general del sistema visual (A) y del ojo humano (B). Sección sagital del ojo humano, donde se aprecian sus estructuras. La retina agrandada a la derecha muestra las posiciones relativas de las 3 capas nucleares de la retina. La luz tiene que pasar a través de las capas de las células ganglionares de la retina y de las células bipolares antes de alcanzar los bastones y los conos. Ilustraciones de "Ojo, cerebro y visión", D. Hubel, 1999.

1.1.1.1. Ojo

El globo ocular es una estructura esférica que está formado por tres capas. La más externa es la esclerótica con función protectora que se prolonga en la parte anterior con la córnea que es transparente y a través de la cual penetra la luz al interior del ojo. La intermedia es la úvea compuesta por tres partes: coroides muy vascularizada, el cuerpo ciliar y el iris. La retina es la capa mas interna de todas (**Fig. 2B**).

Siguiendo la trayectoria de la luz en el interior del ojo, nos encontramos con la cámara anterior que es el espacio comprendido entre la córnea y el iris y está relleno de humor acuoso. El iris se sitúa entre la córnea y el cristalino con una abertura circular en el centro la pupila, que dependiendo de su diametro controla la cantidad de luz que entra al interior del ojo.

El cristalino esta constituido por un gran número de fibras transparentes y está conectado mediante ligamentos al músculo ciliar. En el cuerpo ciliar se sitúa el musculo ciliar y los procesos ciliares que producen el humor acuoso. Por detrás de la lente se encuentra el humor vítreo, que es una sustancia transparente y gelatinosa.

La retina es una estructura compleja sensible a la luz compuesta sobre todo por neuronas y que cubre la superficie interior del ojo por encima del epitelio pigmentario. En la zona central de la retina se encuentra la mácula lútea que rodea a la fóvea, que es el área de mayor agudeza visual donde se concentran la mayor cantidad de conos y de CGR.

1.1.1.2. Retina

La retina en mamíferos es una estructura laminada (*Ramón y Cajal, 1972*) (**Fig. 3**), donde se inicia la percepción visual. La retina transforma la información lumínica que ha viajado a través de los distintos medios oculares transparentes (córnea, humor acuoso, cristalino y vítreo) en información eléctrica, que procesa y envía al cerebro. Es una estructura que forma parte del SNC, a diferencia de otras estructuras sensitivas como el caracol del oído o algunos receptores somáticos de la piel.

En la retina se distinguen seis tipos principales de neuronas (**Fig. 4**), que están organizadas anatómicamente en 3 capas donde se sitúan los cuerpos neuronales y unidas entre sí por dos capas formadas por un entramado de conexiones que contienen las sinapsis efectuadas por los axones y las dendritas de estas neuronas (*Kuffler, 1952; Ramón y Cajal, 1952*).

Capa nuclear externa

La luz, una vez que ha atravesado los medios oculares, llega a la retina y estimula a los fotorreceptores (conos y bastones), que se encuentran en la capa nuclear externa. Estos fotorreceptores aunque tienen una estructura similar, que consta de un segmento externo donde están los ftopigmentos, y uno interno donde se encuentra el núcleo y las organelas, presentan algunas diferencias funcionales (*Schnapf y Baylor, 1987; Stryer, 1987*). Los conos son los responsables de la visión diurna, intervienen en la visión del color, y la visión mediada por conos tiene mayor agudeza y proporciona una mejor resolución de los cambios rápidos de la imagen visual que la mediada por bastones. Estos últimos, por su parte, son muy sensibles a la luz, por lo que son básicos en la visión nocturna. Estas diferencias funcionales entre conos y bastones se deben a las propiedades intrínsecas de los propios fotorreceptores y a las conexiones que establecen con las demás neuronas de la retina (*Lagnado y Baylor, 1992; Hurley, 1994*).

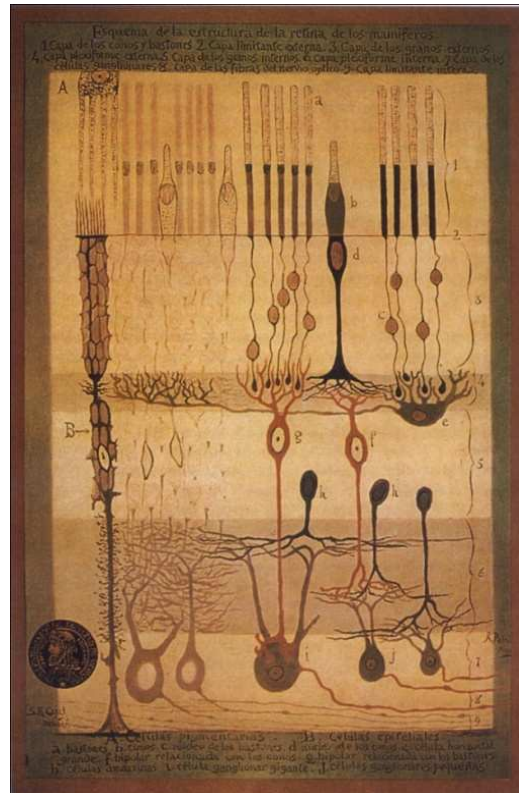


Figura 3. Dibujo realizado por Santiago Ramón y Cajal de las células nerviosas en una sección radial microscópica de la retina. Desde la parte superior, en la que se muestran los delgados bastones y los conos gruesos, hasta la parte inferior, en la que las fibras del nervio óptico se dirigen hacia la derecha, la retina mide un cuarto de milímetro. El estudio de la organización de la retina de los vertebrados ha interesado a muchos investigadores a lo largo de los últimos 100 años. Santiago Ramón y Cajal (1892) fue uno de los pioneros en este campo y la mayoría de sus descripciones y clasificaciones todavía continúan siendo válidas y se mantienen vigentes. (Dibujo realizado por Santiago Ramón y Cajal (1900). En el Instituto Cajal del CSIC, Madrid) "Eye, brain and vision ", D. Hubel, 1995.

Capa nuclear interna

En esta capa existen cuatro tipos de neuronas: las células bipolares, las células horizontales, las células amacrinas, y las células interplexiformes.

Las células bipolares reciben la información de los fotorreceptores y la envían a las células ganglionares. Las células horizontales unen los fotorreceptores y las células bipolares mediante conexiones relativamente largas que corren de forma paralela a las capas de la retina. De forma similar, las células amacrinas unen las células bipolares y las células ganglionares. La función de estas neuronas está probablemente relacionada con la transmisión de las señales de los fotorreceptores que alimentan la periferia de los campos receptores de las células bipolares.

De forma global, puede decirse que estos tipos de interneuronas no se limitan simplemente a transmitir las señales de los fotorreceptores a las células ganglionares, sino que también combinan las señales procedentes de varios fotorreceptores, de tal forma que las respuestas eléctricas

producidas en las células ganglionares dependen de los patrones espaciales y temporales de la luz que estimula la retina (Schiller, 1992; Nakanishi, 1995).

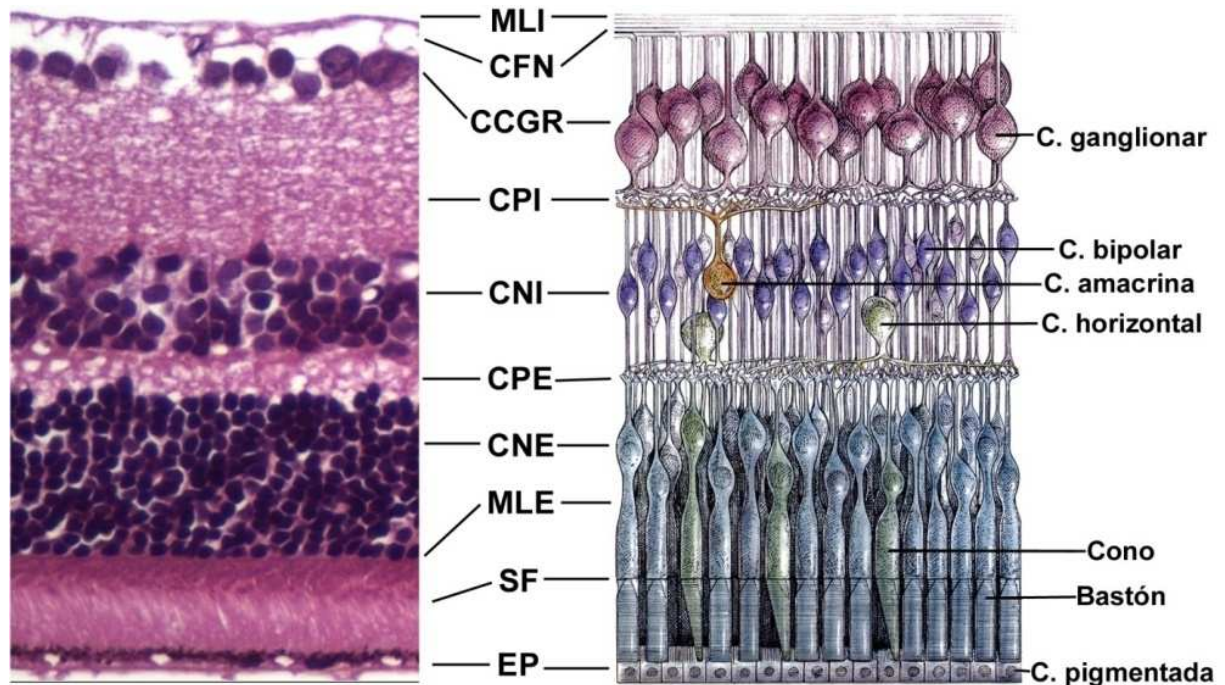


Figura 4. Organización laminar de la retina y los principales tipos de neuronas que la componen. Corte sagital de una retina de rata adulta teñida con hematoxilina-eosina (40x) donde se observan las diferentes capas (izquierda) y su correspondencia con el esquema representativo (derecha). MLI: membrana limitante interna; CFNR: capa de fibras nerviosas de la retina; CCGR: capa de las células ganglionares de la retina; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; MLE: membrana limitante externa; SF: segmentos externos de los fotorreceptores; EP: epitelio pigmentario. Esquema modificado de "Ojo, cerebro y visión", D. Hubel, 1999.

Capa de células ganglionares

En esta capa se localizan dos tipos neuronales en proporciones similares, las células ganglionares de la retina y las células amacrinas desplazadas (Hutchins y Hollyfield, 1987).

Las células ganglionares de la retina conducen la información procesada en la retina hacia las zonas de proyección visual subcorticales. Las señales eléctricas provocadas por la luz en los fotorreceptores y combinadas por las interneuronas de la capa nuclear interna llegan finalmente a las CGR, cuyos axones forman el NO. Las CGR están especializadas en determinadas funciones como la detección de contrastes o los cambios rápidos de iluminación. Además contribuyen al procesamiento de determinados aspectos de la imagen visual, como la forma o el movimiento, que se completará en la corteza visual (Shapley, 1986).

Las células amacrinas desplazadas se caracterizan por la ausencia de axón y su función no se conoce del todo aunque probablemente estén relacionadas con la integración de la información.

1.1.1.3. Nervio y quiasma óptico

El único axón de cada CGR se reúne con los axones restantes en la papila óptica, formando el NO que tras salir del globo ocular por el polo posterior se mieliniza y se dirige hacia el vértice de la órbita, que abandona por la hendidura esfenoidal para penetrar en el cráneo.

Ya intracranealmente, los NO de ambos ojos se reúnen en el quiasma óptico, situado en la región supraselar, donde las fibras de cada ojo destinadas al hemisferio contralateral decusan. En humanos y primates, el 50% de todos los axones decusan, las fibras de la hemirretina nasal se cruzan mientras que las fibras de la hemirretina temporal permanecen ipsilaterales. Las fibras de la retina temporal ipsilateral y la retina nasal contralateral de cada lado se reúnen para formar las cintillas o tractos ópticos, que por tanto conducen a cada hemisferio cerebral la visión del hemimundo visual contralateral.

1.1.1.4. Proyecciones visuales

En seres humanos y primates, las cintillas ópticas proyectan a tres localizaciones subcorticales principales: el tubérculo cuadrigémino o colículo superior (CS, también conocido como tectum), el pretectum mesencefálico, y el núcleo geniculado lateral del tálamo (*Bunt y cols., 1975; Gilbert y Wiesel, 1979; Ferster, 1992*). En esta última estructura terminan el 90% de los axones retinianos, por lo que se puede considerar el núcleo geniculado lateral (NGL) como la estación de relevo más importante, encargada de transportar la información visual a la corteza cerebral.

Una vez en el NGL, los axones de las CGR hacen sinapsis con las neuronas que forman este núcleo, que está organizado de forma retinotópica, de manera que los axones de las CGR se van proyectando de forma ordenada en las distintas zonas del NGL. Al final, cada NGL contiene una representación retinotópica de la mitad contralateral del campo visual. Los axones de las neuronas del NGL se proyectan hacia atrás para salir del tálamo y formar las radiaciones visuales, que se dirigen a la corteza visual primaria.

En el ser humano y primates, la corteza visual primaria se encuentra en la superficie medial de los polos posteriores de los hemisferios cerebrales, en diferentes áreas cada una de las cuales está dedicada a partes específicas del campo visual (*Hubel y Wiesel, 1959, 1962; Lund, 1988*). En esta corteza visual primaria las imágenes provenientes de la retina se procesan inicialmente. Posteriormente, esta información recogida en la corteza visual primaria alcanza múltiples centros superiores del procesamiento visual, que están situados fuera de la corteza primaria, y que son los encargados de la percepción del movimiento, la profundidad, la forma y el color. Además de estas

tres estructuras subcorticales, las cintillas ópticas proyectan también, como en todos los mamíferos, a los núcleos supraquiasmáticos, al pregeniculado y a los núcleos que componen el sistema visual accesorio.

1.1.2. EL SISTEMA VISUAL EN LA RATA ADULTA

El sistema visual en la mayoría de los mamíferos es muy parecido en estructura y función, por esta razón los roedores adultos son empleados frecuentemente en modelos experimentales, aunque presentan algunas diferencias respecto al del ser humano (descrito previamente) y al de otros mamíferos como el gato o el mono. A continuación repasaré las diferencias más relevantes para el objeto de esta tesis, y luego me centraré en algunas características de las CGR en roedores.

1.1.2.1. Sistema retino-colicular

Los axones de las CGR en roedores convergen radialmente hacia el disco óptico donde forman el NO mientras que en primates los cuerpos de las CGR están separadas en una zona superior e inferior mediante un rafe horizontal enviando sus axones al polo superior e inferior del NO respectivamente.

En roedores los axones de las CGR al salir del globo ocular en la cabeza del NO están agrupados en haces diferenciados muy organizados retinotópicamente respecto al cuadrante de la retina y a su posición centripeta (*Guillery y cols., 1995; Fitzgibbon y Reese, 1996; Jeffery, 2001; May y Lütjen-Drecoll, 2002; Schlamp y cols., 2006; Howell y cols., 2007a; Jeffery y cols., 2008*), esta organización se pierde a lo largo de la vía visual primaria volviendo a organizarse retinotópicamente en los CS (*Guillery y cols., 1995; Jeffery, 2001; Jeffery y cols., 2008*).

Los axones de las CGR proyectan a regiones subcorticales que son el núcleo supraquiasmático, núcleo óptico accesorio, núcleo pretectal, núcleo geniculado ventral lateral, núcleo geniculado lateral dorsal, y el colículo superior (*Rodiek, 1979*). La gran mayoría de CGR en roedores proyectan su axón al CS (*Lund y cols., 1965; Perry, 1981; Linden y Perry, 1983*) y más del 95% de estos axones decusan a nivel del quiasma óptico (*Lund, 1965; Perry, 1979; Drager y Olsen, 1981; Linden y Perry, 1983*) a diferencia de los humanos en los que decusa el 50%.

Los CS son el principal territorio subcortical donde proyectan de una manera topográfica muy precisa los axones de las CGR (*Linden y Perry, 1983; Sauvé y cols, 2001; 2002*), son dos protuberancias situadas en la parte dorsal del mesencéfalo, rostrales al colículo inferior (**Fig. 5A**). Están compuestos de varias capas o láminas, que de superficial a profunda reciben los siguientes nombres: Stratum Zonale, Stratum Griseum Superficiale, Stratum Opticum, Stratum Griseum Intermediale, Stratum Album Intermediale, Stratum Griseum Profundum, y Stratum Album Profundum (**Fig. 5B**). Las tres primeras capas, llamadas capas superficiales o visuales, reciben aferencias retinianas y se encargan de procesar los estímulos visuales (*Hofbauer y Dr  ger, 1985; Sefton y*

Dreher, 1985), mientras que las cuatro restantes procesan la información auditiva y somatosensorial (Stein, 1984).

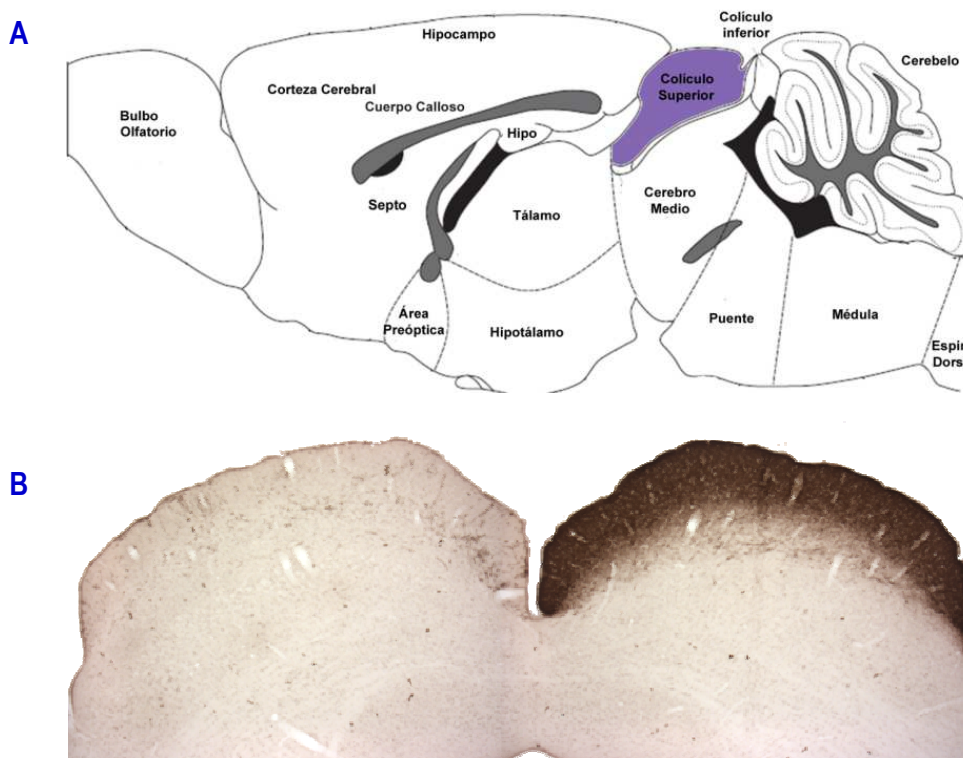


Figura 5. Localización de los colículos superiores (CS) en el cerebro del ratón (A) y sección coronal del CS en rata (B). A. Esquema sagital del cerebro de ratón donde se aprecia el CS como una protuberancia situada en la parte dorsal del mesencéfalo, rostral al colículo inferior (Esquema modificado de "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates", Paxinos y Franklin, 2001). B. Imagen de una sección frontal de 40 μ m de espesor del cerebro medio de rata albina SD que muestra las aferencias retinianas marcadas en las capas visuales de los CS 4 días después de inyectar la subunidad B de la toxina colérica en el ojo izquierdo (OI) de una rata control. Las capas visuales del CS están formadas por: Stratum Zonale, Stratum Griseum Superficiale y el Stratum Opticum. En el CS derecho (a la derecha de la imagen) contralateral al OI se aprecia una muy densa distribución de las aferencias retinianas intensamente marcadas que llenan por completo las capas visuales. Por el contrario, en el CS ipsilateral (izquierdo) se aprecia unas pocas aferencias retinianas en la región más profunda del Stratum Griseum superficial y el Stratum opticum (Williams y cols., 1996), como corresponde a la pequeña proporción de aferentes retinianos que proyectan ipsilateralmente en la rata albina (Linden y Perry, 1983).

Los axones de las CGR llegan al Stratum Opticum, arborizan, y forman terminales sinápticas que terminan sobre todo en el Stratum Griseum Superficiale (Beckstead y Frankfurter, 1983) y en el Stratum Zonale. Los axones de las CGR se distribuyen en el CS siguiendo una topografía determinada, de forma que los axones de la retina nasal proyectan a la mitad caudal del CS, los de la retina temporal a la mitad rostral, los de la retina superior a la parte lateral del CS, y los de la retina inferior a la parte medial del CS (Siminoff y cols., 1966; Linden y Perry, 1983; O'Leary y cols., 1986; Simon y O'Leary, 1990; Sauvé y cols., 2001, 2002).

1.1.2.2. Células ganglionares de la retina

Este trabajo se basa en un estudio preciso de la totalidad de la población de CGR tanto en condiciones normales como en condiciones experimentales de HTO, por lo que repasaré algunas de las características más relevantes de este tipo neuronal en roedores.

Localización

Las CGR en la rata se encuentran en la capa de CGR que es la capa más interna de la retina, el 50% de la población neuronal de esta capa está constituida por las células amacrinas desplazadas (Cowey y Perry, 1979; Perry, 1979, 1981; Perry y cols., 1983; Dräger y Olsen, 1981; Jeon y cols., 1998).

Clasificaciones morfológicas

La morfología de las CGR en mamíferos fue descrita por Ramón y Cajal en su "Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados" (1899). En sus estudios, Cajal hablaba de las CGR como "*una hilera de corpúsculos de talla variable y de forma de pera, ovoidea o semilunar*", basándose en el tamaño del soma y en la morfología y posición de sus dendritas, las clasificó en: monoestratificadas (con uno o varios tallos dendríticos que ascienden para hacerse horizontales en uno de los pisos de la plexiforme interna), bi o poliestratificadas (con tallos que acaban en dos o más estratos de la plexiforme interna), y CGR difusas (cuyas dendritas recorren oblicuamente todo o casi todo el espesor de la capa plexiforme interna, sin mostrar predilección por ningún tipo).

Desde entonces, las CGR en roedores se han seguido clasificando en función del tamaño de su soma y la morfología de sus dendritas (Fukuda, 1977; Perry, 1979; Perry y cols., 1983; Ni y Dreher, 1981; Dreher y cols., 1985; Dann y Buhl, 1987; Peichl, 1989; Tauchi y cols., 1992). Fukuda (1977) fue el primero en clasificar las CGR de rata en tres grandes grupos según el tamaño del soma. Las CGR grandes tienen diámetros mayores a 14,5µm, se distribuyen de forma regular por toda la retina, y constituyen el 5% del total de CGR. Las CGR medianas tienen diámetros entre 11,5 y 14,5µm, predominan en la zona central de la retina, y representan aproximadamente un 30 % del total de CGR. Y las CGR pequeñas tienen un diámetro entre 6 y 11,5µm, se distribuyen regularmente por la retina y constituyen aproximadamente un 65% del total de CGR. Estos tres tipos de tamaño se han correlacionado también con axones de diferente grosor y velocidad de conducción (Fig. 8).

Más tarde, siguiendo también criterios morfológicos y utilizando la tinción de Golgi, Perry (1979) dividió las CGR en tipos I, II, y III, aunque esta técnica presentaba el problema de que en ocasiones las células teñidas no podían distinguirse como CGR de forma inequívoca, porque los axones no se visualizaban siempre. Posteriormente, Ni y Dreher (1981) y Dreher y cols. (1985), marcando retrógradamente con peroxidasa las CGR, subdividieron los tipos II y III de Perry en dos subclases cada uno, con la dificultad de que esta técnica tampoco permitía en ocasiones el marcaje completo de los árboles dendríticos de las CGR. Utilizando técnicas de inyección intracelular (Tauchi y cols., 1992) identificaron nuevos tipos morfológicos de CGR no descritos hasta entonces y

subdividieron el tipo I de Perry en otras dos subclases que llamaron alfa y delta por su parecido a las células alfa y delta del gato (*Boycott y Wassle, 1974*).

Ante la gran cantidad de clasificaciones y la existencia de solapamientos entre muchas de ellas, en la última década se han producido nuevos intentos de clasificación de las CGR, en un afán por aclarar y simplificar las previas (*Sun y cols., 2002; Badea y Nathans, 2004*). Huxlin y Goodchild (1997), tiñendo las CGR con Dil o neurobiotina, las clasificaron en células A (somas y diámetro de campo dendrítico grandes), B (somas y diámetro de campo dendrítico pequeños), y C (somas y campo dendrítico de tamaño pequeño-mediano). Kong y cols. (2005) idearon un sistema informático que permitía la división de las CGR en 13 tipos utilizando 26 parámetros morfológicos del árbol dendrítico de las mismas (nivel de estratificación, extensión, densidad de las arborizaciones, etc.). En la práctica, sin embargo, muchas de estas clasificaciones son difíciles de utilizar y no tienen relevancia para el propósito del estudio, por lo que en la mayoría de los casos siguen empleándose las más sencillas de ellas, como las de Fukuda (1977) o Perry (1979).

En nuestros experimentos, como se comentará posteriormente, no hemos empleado ninguna clasificación morfológica de las CGR, ya que para el propósito de nuestros estudios nos interesaba el número total de estas células, no los subtipos morfológicos.

Tipos especiales de CGR

Existen CGR “desplazadas”, que se localizan en la capa plexiforme y nuclear interna (*Dreher y cols., 1985, Linden, 1986*). Se les llama células de Dogiel (*Dogiel, 1888*) y suponen aproximadamente el 0,35% de la población total de CGR de la rata y el 1-2% en ratón (*Dräger y Olsen, 1981*). Tienen características morfológicas similares a las CGR no desplazadas, se localizan frecuentemente en la periferia del cuadrante temporal inferior, y proyectan contralateralmente. También existen CGR de asociación, cuyos axones no proyectan fuera de la retina, fueron descritas inicialmente en retinas humanas y de perro (*Gallego y Cruz, 1965*), y posteriormente se han observado en rata y ratón (*Dräger y Hofbauer, 1984*).

1.2. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CGR EN ROEDORES

La vía visual primaria en el roedor adulto ha sido ampliamente utilizada para el estudio de diferentes neuropatías por su fácil observación y accesibilidad a la manipulación experimental, y al gran conocimiento que se tiene de su organización estructural, funcional y molecular (*Dowling, 1979; 1987; DeVries y Baylor, 1993; Hubel, 1995*). Lo que ha permitido investigar aspectos anatómicos, funcionales y del comportamiento de la degeneración (*Villegas-Pérez y cols 1988a; 1993; 1996; 1998; Sellés-Navarro y cols., 1996; Wang y cols., 2000; Lafuente y cols., 2002a; Chidlow y cols., 2005; Marco-Gomariz y cols., 2006; Lund y cols., 2007; Agudo y cols., 2008, 2009; García-Ayuso y cols., 2010*), neuroprotección (*Vidal-Sanz y cols., 2000, 2007; Lafuente y cols., 2002b; Lafuente*

López-Herrera y cols., 2002; Avilés-Trigueros y cols., 2003; Mayor-Torroglosa y cols., 2005; Lund y cols., 2007; Schnebelen y cols., 2009) y de la regeneración en el SNC en mamíferos (Vidal-Sanz y cols., 1987, 1993, 2002; Villegas-Pérez y cols., 1988a; Sasaki y cols., 1996; Whiteley y cols., 1998; Avilés-Trigueros y cols., 2000).

Muchos de estos trabajos se han realizado mediante la identificación, cuantificación y distribución de la población de CGR en condiciones normales y después de la lesión, para estudiar los mecanismos neurodegenerativos subyacentes a la lesión axonal (Villegas-Pérez y cols., 1993, 1996; Beerkelar y cols., 1994; Vidal-Sanz y cols., 2000, 2001; Lafuente y cols., 2002a; Chidlow y cols., 2005; Parrilla-Reverter y cols., 2009a) así como para valorar posibles estrategias neuroprotectoras (Villegas-Pérez y cols., 1988a; Peinado-Ramón y cols., 1996; Lafuente y cols., 2002b; Vidal-Sanz y cols., 2007; Parrilla-Reverter y cols., 2009b).

1.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CGR

El primer paso para el estudio cuantitativo y de la distribución de la población de CGR es identificarlas para diferenciarlas de las células amacrinas desplazadas que están en igual proporción en la capa de CGR de roedores (Cowey y Perry, 1979; Perry, 1979, 1981; Dräger y Olsen, 1981; Perry y cols., 1983; Jeon y cols., 1998). Se han utilizado varios métodos para su identificación:

Identificación por criterios morfológicos clásicos (Fukuda y cols., 1977; Schober y Gruschka., 1977) mediante tinciones celulares inespecíficas y bajo microscopía óptica. Mediante este método no podemos diferenciar inequívocamente las CGR pequeñas de las células amacrinas desplazadas (Dräger y Olsen, 1981; Perry, 1981; Perry y cols., 1983; Jeon y cols., 1998) tanto en secciones histológicas como en retinas montadas a plano, ya que se superponen en tamaño (Villegas-Pérez y cols., 1988a, 1993), por lo que se utiliza poco en la actualidad.

Identificación por la aplicación de trazadores neuronales en el muñón del nervio óptico (MNO) o en las principales regiones dianas de proyección de los axones de las CGR en el cerebro (CS y NGL), que se transportan retrógradamente por los axones retinofugales de las CGR acumulándose en el soma celular y sus proyecciones (Vidal-Sanz y cols., 1988, 1993, 2001; Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 1996; Wang y cols., 2000; Lafuente López-Herrera y cols., 2002). Este método es el más utilizado y permite la identificación inequívoca de las CGR ya que son las únicas células de la retina que emiten un único axón retinofugal, para que sea fidedigno el neurotrazador debe aplicarse eficientemente para marcar uniformemente todos los terminales axonales.

Se han utilizado distintos tipos de trazadores con diferentes propiedades, como el HRP (peroxidasa de rábano) (Perry, 1981), Carbocianinas: Dil (carbocianina dye) (Vidal-Sanz y cols., 1988) y el 4Di-10ASP (Thanos y cols., 1993; Lafuente y cols., 2002a), Fast Blue (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988a), rodaminas (Thanos y cols., 1987) principalmente el dextrano tetrametil-rodamina (DTMR) (Woldemussie y cols., 2001), y el Fluorogold (FG). El FG es el

neurotrazador más utilizado en la mayoría de los laboratorios (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 1996; Wang y cols., 2000; Vidal-Sanz 2001; Danias y cols., 2002; Lafuente y cols., 2002a). En nuestro laboratorio se ha estudiado ampliamente el contaje y distribución de las CGR trazadas retrógradamente con FG aplicado en los CS o en el MNO, tanto en rata como en ratón. El trazador neuronal puede transportarse activamente por medio de vesículas como en el caso del FG (Schmued y cols., 1986, 1989; Wessendorf, 1991) o de la hidroxistilbamidina metano-sulfonato (OHSt) (Köbber y cols., 2000; Cheunsuang y Morris, 2005) marcándose únicamente el soma y las dendritas primarias, o por difusión pasiva a través de la membrana como ocurre con las rodaminas y carbocianinas, acumulándose en el soma celular, en las dendritas y en el axón.

Identificación de las CGR mediante la detección de marcadores moleculares: proteínas o mRNA. Estos marcadores han de cumplir ciertas condiciones: ser expresados específicamente por las CGR, y no por otros tipos neuronales de la retina, en una gran proporción de la población de las CGR y es necesario que no cambie su patrón de expresión después de la lesión retiniana. Se han inmunodetectado varias proteínas (Dräger y cols., 1984; McKerracher y cols., 1989; Canola y cols., 2007) como el Thy 1, que es un antígeno específico de las CGR (Barnstable y Drager, 1984; Perry y cols., 1984) localizado en la membrana plasmática, pero no reconoce a todos los subtipos de las CGR (Dabin y Barnstable, 1995; Schlamp y cols., 2001; Huang y cols., 2006) y cambia su patrón de expresión después de lesionar la retina (Dabin y Barnstable, 1995; Schlamp y cols., 2001; Chidlow y cols., 2005) sin que ocurra la muerte o desaparición de las CGR, esto invalida su uso en situaciones patológicas. El Bex1/2 reconoce los somas de las CGR y sus proyecciones (Bernstein y cols., 2006) pero al expresarse en el axón no es favorable para el análisis cuantitativo automático.

La familia de los factores de transcripción Brn3 con dominio POU (Pit-Oct-Unc) al que pertenecen el Brn3a, Brn3b y el Brn3c, se localizan exclusivamente en el núcleo de las CGR participando en la regulación genética (Eng y cols., 2004). Tiene un papel importante en la diferenciación, supervivencia y elongación axonal durante el desarrollo de las CGR en ratones (Wang y cols., 2002). El Brn3b se ha utilizado en la identificación de las CGR en ratones (Buckingham y cols., 2008); sin embargo, en ratas sólo se expresa en el 20% en la población de CGR (Leahy y cols., 2004; Bernstein y cols., 2006). El Brn3a comienza a expresarse en el desarrollo de la retina de ratón y se mantiene en el adulto. El Brn3a se expresa específicamente en las CGR que proyectan al CS contralateral y al NGL (aunque éstas últimas son una minoría) en ratones adultos (Quina y cols., 2005). En nuestro laboratorio observamos que el mRNA y el nivel de expresión del Brn3a disminuyen con el tiempo, tanto después de cortar como de aplastar el NO (Agudo y cols., 2008, 2009). La inmunodetección del Brn3a ha demostrado que es un marcador fidedigno para la identificación y cuantificación de las CGR en condiciones normales y después de la lesión por axotomía en rata y ratón albinos (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011).

La detección de mRNA mediante hibridación *in situ* usando sondas de genes que se expresan específicamente en CGR, es menos utilizada porque es una técnica más complicada e incompatible con el marcaje con anticuerpos, por ejemplo la hibridación *in situ* del mRNA de la γ -sinucleína

identifica casi toda la población de CGR de ratón (*Soto y cols., 2008, 2010; Sugurcheva y cols., 2008*).

También mediante manipulación genética se han identificado las CGR añadiendo un gen chivato bajo la expresión de un promotor de un gen específico de las CGR en ratones (*Feng y cols., 2000; Bernstein y cols., 2006, 2007; Murata y cols., 2008; Raymond y cols., 2008*). Esta tecnología no está disponible en rata.

La inmunodetección de las CGR tiene ciertas ventajas sobre la utilización de neurotrazadores ya que no hay que manipular el sistema antes de la disección de la retina evitando una posible alteración del sistema, además de reducir el tiempo experimental. Por otra parte, no se produce interferencia con las células de microglía que se activan en retinas lesionadas fagocitando a las CGR marcadas previamente con el trazador, acumulándolo en los fagolisosomas y, por tanto, marcándose transcelularmente (*Thanos y cols., 1992a; Köbbert y cols., 2000*). Aunque las CGR trazadas con FG se pueden contar manualmente en retinas lesionadas, ya que se distinguen morfológicamente de las células de la microglía marcadas transcelularmente (*Peinado-Ramón y cols., 1996; Salvador-Silva y cols., 2000; Sobrado-Calvo y cols., 2007; Nadal-Nicolás y cols., 2009*), la presencia de éstas últimas dificulta el conteo automático de las CGR, ya que la rutina automatizada es incapaz de diferenciar ambos tipos celulares.

1.2.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS CGR

Para la cuantificación de las CGR previamente identificadas se han utilizado conteos directos realizados en secciones transversales o en montajes a plano de la retina o conteos indirectos mediante secciones transversales del NO.

En los montajes a plano de la retina debido al gran número de CGR que hay es imposible el conteo manual de todas ellas, por lo que tradicionalmente se han contado manualmente las CGR presentes en áreas de muestra tomadas de forma estándar de regiones representativas (central, media y periférica) de la retina, obteniéndose el número total de CGR mediante la extrapolación de los valores muestreados al área total de la retina. Esto es más complicado y menos fidedigno en secciones transversales, aunque recientemente se han hecho aproximaciones estereológicas con buenos resultados (*Fileta y cols., 2008*).

Mediante el conteo automático obtenemos el valor exacto de la población total de CGR (*Danias y cols., 2002; Marco-Gomariz y cols., 2006; Vidal-sanz y cols., 2007; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a, b; García-Ayuso y cols., 2010*). El conteo automático es un procedimiento reproducible, rápido y objetivo que permite el análisis de un gran número de retinas. Sólo se ha realizado para contar CGR trazadas con FG o inmunodetectadas con Brn3a, porque los neurotrazadores transportados por difusión pasiva, como el DTMR, además de acumularse en el soma y dendritas también se acumula en los axones y como en la zona central de la retina se

agrupan los haces de axones éstos tapan los somas de las CGR que hay debajo, lo que impide el conteo automático.

El método indirecto de cuantificación de las CGR mediante el conteo de los axones en secciones transversales del NO parte de la premisa de que la CGR tiene un único axón retinofugal. Se puede realizar bajo el microscopio de luz mediante áreas de muestreo (*Forrester y Peters, 1967; De Juan y cols., 1978; Levkovitch-Verbin y cols., 2002a, 2003; Aihara y cols., 2003c*) o cuantificando el número total de axones por métodos semiautomáticos de análisis de imagen (*Quigley y cols., 1987*), o bajo el microscopio electrónico de transmisión (MET) donde se cuenta manualmente los axones de las áreas muestreadas (*Chauhan y cols., 2002*) (como máximo se cuenta el 20% de los axones), a este nivel los axones pueden ser identificados por las vainas de mielina y microtúbulos. El número total de axones se obtiene por extrapolación. Estudios realizados muestran que los valores obtenidos por la MET son mayores que los obtenidos por microscopía de luz; esto puede ser debido a que hay axones que están o son más pequeños que el límite de resolución del microscopio de luz, además de que los axones no mielinizados son difíciles de distinguir. Este método requiere una gran experiencia del investigador en la identificación de los axones recubiertos de la vaina de mielina y es tedioso, además de ser indirecto y de no suministrar información del tamaño de los somas, que pueden cambiar en condiciones patológicas.

También se ha realizado el conteo in vivo con el oftalmoscopio de escaneado láser (*Higashide y cols., 2006; Kawaguchi y cols., 2006*) pero las CGR deben estar previamente marcadas. Este método también es aproximativo.

El método automático permite la determinación del número total exacto de la población de las CGR evitando la pérdida de información y sesgo en la estimación que se genera por el método de muestreo ya que el área muestreada normalmente es una pequeña porción de la retina (como máximo el 15% del total). A este sesgo del muestreo hay que sumar el hecho de que las CGR se distribuyen heterogéneamente y que los efectos de alguna lesiones no son homogéneos en la retina, y por lo tanto el grado de supervivencia de las CGR va a depender de la región de la retina analizada (*Laquis y cols., 1998; Woldemussie y cols., 2001; Danias y cols. 2003b, Soto y cols. 2008, Salinas-Navarro y cols, 2009c, 2010*). Por lo tanto, la cuantificación automática permite conocer con exactitud tanto la proporción de CGR que mueren tras un insulto como la que sobrevive tras un tratamiento.

Otro dato de interés es la densidad de CGR o axones. Este valor se puede obtener con el conteo automático dividiendo el número total por el área de la retina o con el manual extrapolando la densidad del área muestreada al área total de la retina.

1.2.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS CGR

Es importante estudiar la distribución de las CGR en las retinas montadas a plano que se representa mediante mapas de densidad o de isodensidad.

Para la construcción de mapas de densidad a partir de contajes manuales, se calcula la densidad de las áreas de muestreo con posición conocida dentro de la retina, situadas en regiones centrales, medias y periféricas, ya que la distribución de las CGR no es homogénea en toda la retina sino que responde a un gradiente centro periferia, y estos valores se representan en un mapa de densidad. Pero este método es lento y aproximativo ya que sólo se muestrea una pequeña porción de la retina, además en muchas lesiones la pérdida de CGR no es uniforme por toda la retina, por lo que el muestreo genera una pérdida de información. Cuanto más número y más pequeñas son las áreas de muestreo más preciso es el mapa de densidad. Si tenemos un número suficiente de áreas muestreadas y unimos las de igual densidad, se obtiene un mapa de isodensidad que proporciona una información más completa.

El método automático genera una distribución detallada y precisa de todas las CGR, representada por mapas de isodensidad, ya que trabajamos con muchas áreas de pequeño tamaño que cubren toda la superficie de la retina calculando automáticamente su densidad, con este método podemos detectar pequeñas variaciones en la densidad. Es un método exacto y rápido, por lo que podemos analizar un número grande de retinas, lo cual es bueno para valorar la variabilidad entre individuos. Podemos estudiar detalladamente la distribución de las CGR que mueren en diferentes patologías, así como de las que sobreviven después de un tratamiento.

Hay que señalar que en los estudios de distribución de las CGR es muy importante la orientación correcta de la retina ya que, si no, obtendremos datos erróneos.

Una vez estudiada la población total de CGR, mediante la identificación, cuantificación y distribución automática de las CGR en circunstancias normales, tanto en rata como en ratón, estudiaremos la población de CGR después de la lesión inducida por la HTO, para intentar comprender los mecanismos por los cuales la HTO daña la retina y el NO.

1.3. NEUROPATÍA ÓPTICA GLAUCOMATOSA

Antes de empezar con el estudio de la neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) resumiremos brevemente la fisiología del humor acuoso.

1.3.1. FISIOLOGÍA DEL HUMOR ACUOSO

El humor acuoso es un líquido transparente que se encarga de la nutrición de las estructuras internas del polo anterior del ojo. Es producido mediante el ultrafiltrado del plasma en los procesos ciliares y circula desde la cámara posterior por la superficie posterior del iris atravesando la pupila hacia la cámara anterior donde se drena a través del ángulo iridocorneal (**Fig. 6**). Hay dos vías de drenaje: la trabecular y la uveoscleral, me centraré en la trabecular que es la más importante (*Bill, 1965; Bill y Phillips, 1971*). En esta vía, el humor acuoso del ángulo iridocorneal pasa a través de la malla trabecular, llegando al conducto de Schlemm y de aquí al conducto colector que drena a las

venas perilimbaires, episclerales que desembocan a la vena oftálmica entrando de nuevo a la circulación sistémica. El equilibrio entre la producción y el drenaje del humor acuoso mantiene constante la PIO. Una deficiencia en el drenaje del humor acuoso por obstrucción parcial o total conlleva al aumento de la PIO.

El flujo, producción y drenaje del humor acuoso y los valores de la PIO en el ojo de roedores tienen muchas similitudes estructurales y funcionales al de primates (*Morrison y cols., 1995a, b; Mermoud y cols., 1996*). Estas características apoyan la utilización de roedores como un buen modelo de experimentación del glaucoma humano (*Aihara y cols., 2003a*).

Tanto en humanos como en roedores hay fluctuaciones diarias en la PIO debido al ritmo circadiano, en roedores la PIO es más baja en la fase de luz y más alta en la fase de oscuridad (*Krishna y cols., 1995; Moore y cols., 1996; Aihara y cols., 2003b*), reflejando las fluctuaciones diarias en la producción del humor acuoso (*Gregory y cols., 1985; McLaren y cols., 1996*).

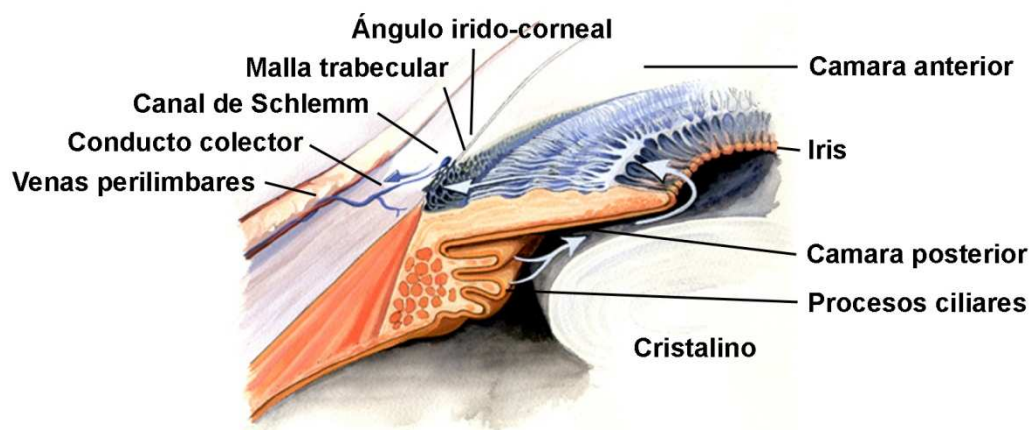


Figura 6. Flujo del humor acuoso. Sección sagital del ojo humano, donde se aprecian las estructuras que intervienen en el flujo del humor acuoso. El humor acuoso es producido en los procesos ciliares y circula desde la cámara posterior por la superficie posterior del iris atravesando la pupila hacia la cámara anterior donde se drena a través del ángulo iridocorneal atravesando la malla trabecular, llegando al conducto de Schlemm y desde allí se dirige a los conductos colectores que drenan a venas perilimbaires y episclerales que desembocan a la vena oftálmica. El equilibrio entre la producción y el drenaje del humor acuoso mantiene constante la presión intraocular (PIO). Una deficiencia en el drenaje del humor acuoso por obstrucción conlleva al aumento de la PIO.

1.3.2. CONCEPTO DE NEUROPATÍA ÓPTICA GLAUCOMATOSA

La neuropatía óptica glaucomatosa o glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que afecta a las CGR y sus axones, provocando cambios característicos en la CFNR y en el disco óptico (excavación), que conducen a la pérdida funcional del campo visual produciendo escotomas y visión en túnel que puede progresar hacia la ceguera completa.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el glaucoma es la segunda causa de ceguera en los países desarrollados y es la principal causa de ceguera prevenible en el mundo. Se

estima que aproximadamente 70 millones de personas en el mundo sufren la NOG (*Weinreb y Khaw, 2004; Quigley y Broman, 2006*). Su prevalencia aumenta con la edad.

La NOG normalmente es asintomática manifestándose en estadios muy tardíos y los daños producidos anatómicos y funcionales son irreversibles, por lo que es importante un diagnóstico precoz y un seguimiento continuo para alcanzar un mayor éxito en la prevención de la ceguera, ralentizando o deteniendo su evolución.

Aunque la progresión clínica de la NOG está bien definida, actualmente las bases biológicas de esta neuropatía son poco conocidas. Las estrategias terapéuticas actuales no son curativas, consisten en la disminución de la PIO, que es el principal factor de riesgo, mediante fármacos o procedimientos quirúrgicos. Actualmente, se está investigando en tratamientos para prevenir la degeneración de las CGR que son dañadas en el glaucoma (neuroprotección).

La hipertensión ocular y su tratamiento

No todos los casos de glaucoma están relacionados con el aumento de la PIO (*Schumer y Podos., 1994*) y viceversa, por eso la PIO no se utiliza en la definición de glaucoma, pero la HTO es el factor de riesgo más importante asociado al desarrollo o a la progresión de la enfermedad en humanos (*Leske, 1983; AGIS., 2000; Kass y cols., 2002; Nouri-Mahdavi y cols., 2004*). Los tratamientos farmacológicos o quirúrgicos del glaucoma consisten en la disminución de la PIO para intentar controlar o disminuir la progresión de la enfermedad y sus efectos dañinos (*Morrison y cols., 2005, 2008*), aunque en algunos casos la disminución de la PIO no detiene la progresión de la enfermedad completamente (*Van Buskirk y Cioffi, 1992*). Se utilizan clínicamente una gran cantidad de fármacos hipotensores que actúan reduciendo la producción del humor acuoso como los betabloqueantes, alfa-adrenérgicos e inhibidores de la anidrasa carbónica, o mejorando el drenaje del humor acuoso como los parasimpaticomiméticos (pilocarpina), derivados de las prostaglandinas o manitol. Los mecanismos por los cuales la HTO provoca daño en el NO no se conocen todavía.

Tipos de glaucoma

Se clasifican según su etiología en primarios, secundarios y congénito. Dentro de los primarios, está el de ángulo abierto y el de ángulo cerrado. Los glaucomas secundarios son consecuencia de una enfermedad preexistente que causa una interferencia en el flujo del humor acuoso. El glaucoma congénito es debido a un desarrollo embriológico incompleto de las estructuras del ángulo camerular.

1.3.3. IMPORTANCIA DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES DE NOG

Gracias a los modelos experimentales sobre todo en animales, se ha aumentado el conocimiento sobre la biología de las patologías humanas y se han examinado potenciales terapias que podrían ser utilizadas en humanos.

En la actualidad, no hay métodos no invasivos para el estudio directo de la NOG en humanos y los avances en el tratamiento del glaucoma han ido asociados al desarrollo de modelos animales. Aunque es una tarea compleja y costosa, es esencial desarrollar modelos experimentales animales lo más semejantes posibles a la NOG humana para mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos por los que la HTO induce lesión en el NO y la retina en humanos (*Morrison y cols., 2005, 2008; Howell y cols., 2008*), que hasta la fecha no están claros, y para desarrollar nuevas terapias, así como examinar nuevas estrategias y sustancias neuroprotectoras (*Vidal-Sanz y cols., 2001; Pang y Clark, 2007; Howell y cols., 2008*).

Los modelos experimentales *in vitro* tienen menos relevancia clínica que los *in vivo*. Se han utilizado varias especies de animales en la experimentación del glaucoma, los primates no humanos tienen una mayor relevancia clínica por su proximidad filogénica con los humanos, pero su limitada accesibilidad, coste alto y difícil manejo lo hacen impracticable para el estudio de la biología del glaucoma y los ensayos de drogas, ya que se requiere un gran número de animales. Por lo que es necesario el desarrollo de otros modelos que sean rápidos, baratos, accesibles y reproducibles (*Chew, 1996*), y los de roedores cumplen estas características, por eso son ampliamente empleados. Como hemos mencionado anteriormente, la vía visual en roedores es muy parecida a la de los primates presentando una gran homología entre las estructuras y función del ojo y del NO con el humano (*Morrison y cols., 1995a, b*), sobre todo la retina y la fisiología del humor acuoso, por lo que es probable que los procesos celulares del daño axonal en estos modelos sean relevantes al glaucoma en humanos, además el genoma de los roedores está muy bien caracterizado, lo que abre la posibilidad de realizar manipulaciones genéticas (*Peters y cols., 2007*).

1.3.4. MODELOS EXPERIMENTALES DE NOG EN ROEDORES

La mayoría de los modelos experimentales de NOG en roedores se basan en la inducción de la HTO, que es el principal factor de riesgo del glaucoma y se diferencian en la forma de dificultar el drenaje del humor acuoso.

Los modelos de HTO en rata han sido, y son, los más utilizados en el estudio de la etiología y patología de la NOG, ya que están muy bien caracterizados y son más fáciles de realizar que los de ratones. Los modelos de ratón son similares a los modelos de rata pero tienen la ventaja de que se pueden utilizar ratones con manipulaciones genéticas y así investigar mediante estirpes mutantes (knockout) y transgénicas (adición de genes o mutación de genes) la función de genes específicos y vías bioquímicas en la NOG (*John y cols., 1999; Libby y cols., 2005b; Howell y cols., 2007b; McKinnon y cols., 2009*). Por esta razón está aumentando la utilización de ratones modificados

genéticamente en el estudio de enfermedades neurodegenerativas (*Howell y cols., 2008*). Aunque los modelos de rata son útiles para estudiar específicamente el factor de la HTO.

Los modelos experimentales animales de HTO para que sean buenos tienen que ser fáciles de realizar, fidedignos y reproducibles.

Primero describiré los modelos más frecuentes de inducción de HTO en rata y posteriormente los de ratón.

1.3.4.1. Modelos de HTO en rata

Según los mecanismos por los cuales se produce la elevación de la PIO actualmente hay tres métodos experimentales de inducción de la HTO frecuentemente utilizados en rata, difieren en el nivel de PIO y la extensión del daño del NO y de la retina. Estos modelos son:

1. Inyección de suero salino hipertónico en la vía de drenaje del humor acuoso.
2. Tratamiento con láser del tejido limbar.
3. Cauterización de las venas episclerales.

1.3.4.1.1 Inyección de suero salino hipertónico en la vía de drenaje del humor acuoso

Morrison y colaboradores (*Moore y cols., 1995; Morrison y cols., 1997*) aumentaron la PIO microinyectando un volumen de 50µl de solución salina hiperosmolar filtrada (CINa, 2M) en una de las venas radiales episclerales de ratas Brown-Norway (*Morrison y cols., 1997*), previamente se aplicó un anillo de plástico en el ecuador del ojo para ocluir los vasos limbares y confinar el suero hipertónico en la zona perilimbar. La hipertonidad del salino daña las membranas de las células produciendo una cicatriz de la malla trabecular y del ángulo de la cámara anterior aumentando la resistencia del flujo del humor acuoso. El 50% de las ratas desarrollaron una elevación de la PIO a los 7-10 días después de la inyección pudiendo durar varios meses, y este aumento era de 2 o más veces los valores controles, normalmente era necesaria una segunda inyección (*Chauhan y cols., 2002; Hänninen y cols., 2002*). La desventaja de este modelo es que el nivel de la elevación de la PIO es inconsistente.

1.3.4.1.2. Tratamiento con láser del tejido limbar

Este método de fotocoagulación por láser (FL) fue descrito originalmente por Gaasterland y cols. (1974) en monos y posteriormente modificado por Quigley y Hohman (1983). Estos autores dirigieron el láser argón a la malla trabecular para reducir el drenaje del humor acuoso y causar la elevación de la PIO. Este método mimetizó bastante bien al glaucoma humano con los cambios característicos en el disco óptico y el patrón de pérdida de CGR en sectores.

Posteriormente se modificó y adaptó con éxito en ratas albinas (Ueda y cols., 1998; Woldemussie y cols., 2001, 2004; Levkovitch-Verbin y cols., 2002a, Schnebelen y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2010). La energía del láser argón o diodo (Wang y cols., 1998) se dirigió o bien directamente a la malla trabecular (Ueda y cols., 1998), a la malla trabecular y venas episclerales (Levkovitch-Verbin y cols., 2002b), o a los vasos perilimbaires y episclerales (WodeMussie y cols., 2001). El aumento de la PIO se debe a la fotocoagulación de la vasculatura limbal y a un daño colateral del ángulo de la cámara anterior (Woldemussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002b) obstruyéndose el drenaje del humor acuoso por el cierre de los espacios intertrabeculares y de la mayoría de los canales de drenaje. Se han realizado modificaciones, como la realización de un segundo tratamiento láser (Schori y cols., 2001; Baklash y cols., 2002; Ishii y cols., 2003; Pease y cols., 2006) o la inyección de tinta china en la cámara anterior antes de la FL (Ueda y cols., 1998), con resultados similares. Esta técnica se ha realizado poco en ratas pigmentadas (Grozdanic y cols., 2004, Salinas-Navarro y cols., 2008). El láser origina algunas complicaciones oculares como son edema corneal, opacidad y cataratas que normalmente se resuelven con el tiempo.

Esta técnica resulta en un rápido aumento de la PIO seguida por una reducción gradual a los valores normales, frecuentemente a las 3 semanas (Levkovitch-Verbin y cols., 2002a), y se observa una pérdida de CGR (WodeMussie y cols., 2001) y de axones (Levkovitch-Verbin y cols., 2002a) mayoritariamente en la retina superior (Woldemussie y cols., 2001).

En nuestro laboratorio realizamos la fotocoagulación por láser diodo, en una sola sesión y dirigido directamente, sin ninguna lente, hacia la malla trabecular, vasos perilimbaires y episclerales en los ojos de ratas albinas (Salinas-Navarro y cols., 2010).

1.3.4.1.3. Cauterización de las venas episclerales

Shareef y sus colaboradores (1995) cauterizaron dos venas episclerales grandes localizadas posteriormente a las inserciones del músculo recto (García-Valenzuela y cols., 1995; Shareef y cols., 1995; Sawada y Neufeld, 1999) bloqueando completamente el retorno venoso a través de cada vena, la cauterización de más venas inducía a un aumento mayor de la PIO. Este modelo se utiliza tanto en animales pigmentados como en albinos (Neufeld y cols., 2002; Grozdanic y cols., 2003b; Danias y cols., 2006). Con este método se produce un aumento de la PIO dos veces el nivel normal, en algunos grupos de investigación la PIO vuelve a valores normales después de 2-4 semanas (Shareef y cols., 1995; Ahmed y cols., 2001), en otros se mantiene por encima de 7 meses (Neufeld y cols., 2002). Mittag y cols. (2000) consiguieron aumentos de PIO de más de 3 semanas con inyecciones subconjuntivales del antimetabolito 5-fluorouracil (Mittag y cols., 2000; Danias y cols., 2006) y sugirieron que la normalización de la PIO se debe a la formación de vasos colaterales.

Hay varias evidencias que sugieren que este modelo no es equivalente a los dos anteriores, ya que en los modelos basados en la microinyección de suero salino hipertónico (Morrison y cols., 1997) y en la fotocoagulación por láser (Woldemussie y col., 2001) hay una mayor pérdida en la región superior de la retina tanto de axones en NO como de las CGR. Sin embargo, en el modelo de cauterización la pérdida ocurre en las regiones periféricas de la retina (Sawada y Neufeld, 1999; Ko y

cols., 2001) y la lesión que se produce es menor (Morrison y cols., 2005; Sawada y Neufeld, 1999; Danias y cols., 2006). También se ha observado que se produce el cierre del ángulo al inyectar suero salino hipertónico (Nissirios y cols., 2008) y al fotocoagular con el láser (Ueda y cols., 1998; Levkovitch-Verbin y cols., 2002a). Este cierre no se ha visto en el modelo de cauterización. Esto sugiere que los mecanismos de lesión inducidos por la cauterización son diferentes a los dos modelos de obstrucción del drenaje del humor. Se cree que en el caso de la cauterización, el aumento de la PIO se debe, probablemente, a la congestión de la vasculatura uveal (Goldblum y Mittag, 2002b; Grozdanic y cols., 2003b; Pang y Clark, 2007).

El modelo de fotocoagulación por láser es el más rápido, más fácil de realizar, reproducible y más fiable de los tres modelos de glaucoma experimental en ratas (Levkovitch-Verbin y cols., 2004), y por estas razones es el que más se utiliza.

Otros modelos de HTO en rata

Han sido menos utilizados. Son los métodos de inyección de material extraño en la cámara anterior, tales como células fantasmas de los glóbulos rojos (Quigley y Addicks, 1980a), microesferas de látex (Weber y Zelenak, 2001; Sappington y cols., 2010) o antígeno S (Mermoud y cols., 1994b) bloqueando la malla trabecular sin manipulación del sistema vácular. Se producen aumentos agudos de la PIO, ya que este material es lavado posteriormente por el drenaje del humor acuoso. Con frecuencia hay una reacción de inflamación masiva.

1.3.4.2. Modelos de HTO en ratón

Distinguimos tres tipos de modelos experimentales de HTO en ratón: los inducibles, el modelo congénito donde se desarrolla la NOG espontáneamente y los transgénicos que son ratones manipulados genéticamente para que desarrollen la NOG.

1.3.4.2.1 Glaucoma inducido experimentalmente en ratones

Los métodos utilizados en ratones para inducir la elevación de la PIO son adaptaciones de los utilizados en ratas, que se han explicado anteriormente, como son la inyección de suero salino hipertónico, la fotocoagulación con láser del tejido limbar (WodeMussie y cols., 2001) y la cauterización de las venas episclerales (García Valenzuela y cols., 1995).

Inyección de suero salino hipertónico en la vía de drenaje del humor acuoso

McKinnon y colaboradores (2003) describieron el aumento de la PIO mediante la inyección de salino hipertónico en la venas limbares en ratones (Kipfer-Kauer y cols., 2010). Esta elevación fue crónica e inducía pérdida de axones. Este método no se utiliza debido posiblemente a la dificultad de realizar esta técnica en el ojo de ratón.

Tratamiento con láser del tejido limbar

Aihara y colaboradores (2003c) en ratones C57BL/6 drenaron todo el humor acuoso de la cámara anterior acercando la malla trabecular a la zona limbar y aplicaron láser argón en el tejido limbar haciendo el cierre completo del ángulo camerular. Mabuchi y cols. (2003, 2004) realizaron la FL del limbo aumentando la PIO que duró de 2 a 12 semanas y fue 1,5 más alta que los valores controles e indujo daño glaucomatoso en el NO. Grozdanic y cols. (2003a) inyectaron verde de indocianina en la cámara anterior antes de la FL del tejido limbar. Hay otros estudios de fotocoagulación con láser argón de la venas episclerales y limbares en C57BL/6 (Gross y cols., 2003; Ji y cols., 2005). Este método FL es el más utilizado en los modelos inducibles de HTO en ratón.

En nuestro laboratorio realizamos la fotocoagulación por láser diodo, en una sola sesión y dirigido directamente sin ninguna lente hacia los vasos perilimbaires y episclerales en los ojos de ratones albinos (Salinas-Navarro y cols., 2009c).

Cauterización de las venas episclerales

Ruiz-Ederra y Verkman (2006) realizaron la oclusión de 3 venas episclerales utilizando el cauterio de mano. Este método tiene complicaciones como son el daño térmico de la esclera, la inflamación intraocular y el daño en la superficie ocular, por lo que ha sido poco empleado.

1.3.4.2.2. Glaucoma congénito o espontáneo

Algunas estirpes de ratones tienen mutaciones que dan lugar al desarrollo espontáneo de un glaucoma congénito pigmentario bilateral relacionado con la edad (John y cols., 1998; Libby y cols., 2005b). Es el más utilizado de todos los modelos de HTO en ratón. Proporcionan una importante información respecto a los efectos de la HTO en la retina y en el NO. El modelo mejor caracterizado es la línea de DBA/2J y la subestirpe DBA/2NNia (Chang y cols., 1999; John y cols., 1998,1999; Bayer y cols., 2001; Danias y cols., 2003b; Jakobs y cols., 2005; Filippopoulos y cols., 2006; Schlamp y cols., 2006; Howell y cols 2007a; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008). Estos ratones desarrollan una dispersión de pigmento y atrofia del iris acumulándose el pigmento en la malla trabecular formándose sinequias, bloqueándose las estructuras de drenaje y elevándose la PIO con la edad (McKinnon y cols., 2009).

En estos ratones se observó que había un daño del transporte axonal retrógrado (TAR) (Jakobs y cols., 2005; Buckingham y cols., 2008) seguida de una degeneración retrógrada de los axones (Schlamp y cols., 2006) que precede a la degeneración del soma de las CGR. La prevalencia y severidad aumenta con la edad, manifestándose el aumento de la PIO a 6-8 meses que, a partir de este momento, se mantiene elevada crónicamente hasta la muerte del animal. Esta HTO produce un daño del NO con pérdida de axones e induce una activación de la glía (gliosis) alrededor de los 8

meses (Libby y cols., 2005b; Schlamp y cols., 2006; Son y cols., 2010). Finalmente, la retina presenta lesión aproximadamente a los 10-11 meses de edad (Schlamp y cols., 2006).

Esta NOG espontánea en ratones tiene la ventaja que comparte muchas similitudes con la enfermedad humana (McKinnon y cols., 2009). Sin embargo, existe un alto grado de variabilidad y asimetría en el desarrollo de la enfermedad (Schlamp y cols., 2006) pudiendo complicar la colección e interpretación de los datos, por lo que se necesitan muchos animales para la realización de los experimentos.

1.3.4.2.3. Glaucoma en ratones transgénicos

Hay modelos de ratones transgénicos con mutaciones diana en la subunidad $\alpha 1$ del colágeno tipo 1 (*Col1a1^{fl}*) que induce un aumento espontáneo y gradual de la PIO (Aihara y cols., 2003d) por la acumulación de colágeno tipo 1 en las vías de drenaje del humor acuoso. Otro modelo transgénico tiene mutaciones en la miocilina que se expresa y secreta en la malla trabecular (Zhou y cols., 2008), esta mutación produce una elevación moderada de la PIO que a su vez provoca degeneración axonal y pérdida de CGR.

Se han utilizado otros modelos de HTO en ratón, son los métodos de inyección de material extraño en la cámara anterior, tales como inyección de microesferas de poliestireno (Cone y cols., 2010; Pease y cols., 2010; Sappington y cols., 2010) y material viscoelástico (Pease y cols., 2010).

Comparados con la cepa DBA, los modelos inducibles y transgénicos de ratones de glaucoma están pobremente caracterizados, por lo que son menos relevantes para el estudio de la patogénesis y de la neuroprotección de la NOG. Sin embargo, los modelos inducibles tienen ciertas ventajas sobre los modelos espontáneos y transgénicos, como son: i) en los modelos inducibles el daño glaucomatoso se induce en un tiempo más corto que en los modelos espontáneos o transgénicos en los que hay que esperar a que el animal desarrolle la enfermedad, por lo que en los primeros se acortan los periodos de estudio; ii) mientras que en los espontáneos y transgénicos la HTO es bilateral, en los modelos inducibles la elevación de la PIO es unilateral dejando el ojo contralateral disponible como control, pudiéndose valorar la variabilidad interanimal; iii) finalmente, en los modelos inducibles la elevación de la PIO es predecible lo que hace posible determinar mejor la secuencia de eventos del daño del NO y de la retina.

1.3.5. MEDIDA DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR

La medida de la PIO es necesaria en los modelos experimentales de glaucoma en roedores ya que estos modelos se basan en el aumento de la PIO, que es el principal factor de riesgo en esta enfermedad. Es importante conseguir un método de medida de la PIO exacto, reproducible y fácil de realizar.

Hay laboratorios que miden la PIO en animales despiertos (Morrison y cols., 2008) ya que cuando las medidas fueron realizadas frecuentemente los animales empezaron a perder peso decreciendo su PIO, por los efectos acumulativos de la anestesia general (Erickson-Lamy y cols., 1984; Jia y cols., 2000a; Wang y cols., 2005; Johnson y cols., 2007), pero nosotros y otros

laboratorios medimos la PIO inmediatamente después de la anestesia cada día y no hemos observado una disminución significativa del peso del animal ni de la PIO (Moore y cols., 1993). Otra consideración importante a tener en cuenta es que hay que medir la PIO a la misma hora del día para evitar las fluctuaciones circadianas (Moore y cols., 1996).

Se han empleado métodos invasivos y no invasivos en la medida de la PIO, tanto en rata como en ratón. Los métodos invasivos consisten en la canulación de la cámara anterior conectada a un transductor de presión (John y cols., 1997; Avila y cols., 2001; Aihara y cols., 2002). Las medidas del manómetro son fiables y exactas, considerándose que es la verdadera PIO, por lo que las medidas de los métodos no invasivos de la PIO se validan con las medidas manométricas.

Vamos a describir los métodos no invasivos que son adaptaciones de la tecnología clínica aplicada a roedores. El Tono-Pen (Tono-Pen® XL, Reichert Ophthalmic Instruments, Depew, NY, USA) y el Tonolab (Tonolab®, Tiolat, OY, Helsinki, Finland) son actualmente los tonómetros más utilizados en los modelos de HTO en rata y ratón por su fácil aplicación y precisión. El tonómetro de contacto Tono-Pen fue el primer instrumento utilizado exitosamente para medir la PIO en ratas (Moore y cols., 1993, 1995; Mermoud y cols., 1994a), diseñado para su utilización en humanos, consiste en un émbolo que se presiona contra la córnea. Presenta una buena correlación con las medidas manométricas (Moore y cols., 1993). También se ha utilizado en ratón (McKinnon y cols., 2003; Reitsamer y cols., 2004).

El tonómetro de rebote Tonolab (Kontiola, 2000; Kontiola y cols., 2001; Danias y cols., 2003a; Wang y cols., 2005; Kim y cols., 2007; Morris y cols., 2006) fue diseñado especialmente para roedores, consiste en un solenoide magnético que propulsa una sonda magnetizada y calcula la PIO por la velocidad de desaceleración después de contactar con la córnea. Ha sido utilizado en ratas (Kontiola y cols., 2001; Goldblum y cols., 2002a; Pease y cols., 2006) y en ratón (Wang y cols., 2005; Morris y cols., 2006; Nissirios y cols., 2007; Pease y cols., 2010). Presenta una buena correlación con las medidas manométricas tanto en ojos de rata y como de ratón (Wang y cols., 2005; Pease y cols., 2006, Morrison y cols., 2009).

Otros investigadores han utilizado otros métodos menos frecuentes para la medición de la PIO en rata, como la adaptación del tonómetro de Goldmann (Grozdanic y cols., 2003a) o del pneumotonómetro (Shareff y cols., 1995; Sawada y Neufeld, 1999). Para la medición de la PIO en ratón se han utilizado también adaptaciones del pneumotonómetro (Avila y cols., 2005) y del tonómetro de Goldman (Cohan y Bohr, 2001).

Las medidas manométricas son fiables y exactas, considerándose que es la verdadera PIO, pero es invasiva y produce cambios anatómicos en la córnea siendo difícil de repetir en el mismo ojo experimental, limitando el número de medidas que pueden ser tomadas en un ratón. Esto es una desventaja ya que en los experimentos de HTO debemos tomar muchas medidas durante el periodo experimental. Los métodos no invasivos, son rápidos y reproducibles, y no causan daño en la superficie de la córnea, permitiendo varias medidas sobre extensos periodos de tiempo en modelos crónicos. Los métodos no invasivos presentan más variabilidad en sus medidas que los invasivos

(Morrison y cols., 2005). Es importante la correcta utilización de estos instrumentos para que no se produzcan errores en las mediciones de la PIO.

1.3.6. VALORACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO POR LA HTO EN LA POBLACIÓN DE CGR

Los modelos experimentales han permitido estudiar las respuestas del NO y de la retina a la elevación de la PIO, usando diferentes acercamientos experimentales: se han analizado los efectos funcionales fisiológicos mediante el electroretinograma (ERG) (Bayer y cols., 2001; Grozdanic y cols., 2003b; Fortune y cols., 2004; Schlamp y cols., 2006; Salinas-Navarro y cols., 2009c) se ha estudiado el flujo axoplásmico (Quigley y Anderson, 1976, 1977, 1980a, b; Mckerracher y cols., 1990a, b; Lafuente López-herrera y cols., 2002) a nivel molecular se ha analizando la expresión genética de un gran número de genes y su correlación con la expresión protéica mediante técnicas de biología molecular (Ahmed y cols., 2004; Johnson y cols., 2007; Yang y cols., 2007; Agudo y cols., 2008, 2009; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Guo y cols., 2010), incluyendo al Brn3a que disminuye su expresión poco antes de la muerte de las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2009), las funciones metabólicas de la retina (Nash y Osborne, 1999; Schlamp y cols., 2001; Chidlow y cols., 2005; Parrilla-reverter y cols., 2009b) o la inducción de la actividad fagocítica de la microglía (Salvador-Silva y cols., 2000; Sobrado-Calvo y cols., 2007).

La valoración más frecuente de los efectos de la HTO es mediante el daño que ocurre en el NO con la pérdida de axones y el que ocurre en la retina con la pérdida de CGR. El patrón de muerte de las CGR se determina por el estudio de la población de CGR mediante métodos cuantitativos del número de axones o de CGR y el estudio de la distribución de las CGR en la retina, vistos anteriormente. La pérdida de axones se determina como el número de axones que permanecen en las secciones transversales del NO comparados con los que aparecen en un NO normal tanto en el microscopio de luz (Aihara y cols., 2003c) como en el microscopio electrónico de transmisión (MET) (Chauhan y cols., 2002), los axones degenerados se identifican por estar hinchados, desprovistos de su apariencia axoplásmica, por ser oscuros debido al colapso de la vaina de mielina y por la ausencia de neurofilamentos o por los restos de mielina.

A pesar de la mayor exactitud del método del MET, éste es demasiado laborioso para utilizarlo en un número grande de ojos, por eso se desarrolló un método cualitativo que determina un grado de lesión por las características de la degeneración axonal (Levkovitch-Verbin y cols., 2002a, b; Morrison y cols., 2008) utilizando el microscopio de luz (Jia y cols., 2000b).

El conteo de las CGR montadas a plano es otro método común para valorar el daño. La ventaja de esta técnica es que valoramos a las CGR que tienen intacto el TAR, la distribución de las CGR puede no ser uniforme en los ojos dañados y por el muestreo en regiones específicas se pierde información sobre la extensión de la pérdida de las CGR. Esto como se ha dicho antes, se soluciona usando rutinas de conteo automático y generando mapas de distribución detallados.

1.4. CONSIDERACIONES GENERALES

1.4.1. MODELOS DE LESIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

El principal rasgo característico del glaucoma es la progresiva muerte de las CGR; ésta es también una característica de un número de neuropatías ópticas y retinopatías que se asemejan en algunos aspectos al glaucoma. Se sospecha que el daño glaucomatoso se localiza en la cabeza del NO (Anderson y Hendrickson, 1974; Quigley y Anderson, 1976; Quigley y cols., 1981, 2000; Morrison y cols., 1999; Howell y cols., 2007a; Johnson y cols., 2007; Schlamp y cols., 2006). Tradicionalmente se han desarrollado varios modelos de lesión del NO, repasaré brevemente los modelos más frecuentemente utilizados y caracterizados de muerte de CGR inducida por la lesión del NO.

Modelos experimentales de la neuropatía óptica traumática

Tanto la sección como el aplastamiento del NO (Beerkelaar y cols., 1994) producen una interrupción de los axones de las CGR, es decir una axotomía, provocando una degeneración retrógrada axonal e induciendo la muerte de las CGR que es homogénea en toda la retina (Villegas-Pérez y cols., 1993; Berkelaar y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994; Manssur-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla y cols., 2009a; Galindo y cols., 2011, en revisión). Este proceso degenerativo es más lento en el aplastamiento (Parrilla-Reverter 2009a, b) y depende de la distancia del sitio de lesión al ojo (Villegas-Pérez y cols., 1988b). El aplastamiento del NO parece inducir muchos de los eventos degenerativos que se producen en las CGR cuando se eleva la PIO (Schlamp y cols., 2001; McKinnon y cols., 2002; Huang y cols., 2005a, b, 2006; Libby y cols., 2005a; Yang y cols., 2007).

La isquemia retiniana

La isquemia de la retina también produce la degeneración y muerte de las CGR. Dos de los modelos de isquemia retiniana más utilizados son: la isquemia retiniana por aumento de la PIO (Sellés-Navarro y cols., 1996) y la isquemia por ligadura selectiva de los vasos oftálmicos (Lafuente y cols., 2002a). La muerte neuronal en la axotomía es progresiva y en su patrón de muerte se distinguen las mismas fases, en la isquemia varía según el periodo de reperusión y se induce una muerte de CGR más temprana (tercer día) que en la sección del NO (quinto día) y mayor a corto plazo.

Lesión parcial del nervio óptico

En este modelo aparte de la muerte neuronal primaria, ocasionada por la acción directa del agente lesionante, se ha sugerido una muerte de neuronas que no están afectadas directamente por

la lesión, denominada muerte neuronal secundaria (Yoles y Schwartz, 1998; Levkovitch-Verbin y cols., 2001, 2003; Blair y cols., 2005).

1.4.2. MUERTE NEURONAL EN LA NOG

La elevación de la PIO produce la muerte de las CGR causando la pérdida irreversible de la visión, se desconocen los mecanismos exactos de la muerte de las CGR.

La apoptosis (o muerte celular programada) es el mecanismo más probable de muerte de CGR de la NOG en humanos (Kerrigan y cols., 1997) y experimentalmente (García-Valenzuela y cols., 1995; Quigley y cols., 1995; Nickells, 1996; Johnson y cols., 2000; Hänninen y cols., 2002; McKinnon y cols., 2002; Schuettauf y cols., 2004; Libby y cols., 2005a; Ji y cols., 2005; Reichstein y cols., 2007), igual que en otros modelos de lesión del NO (Berkelaar y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994; Quigley y cols., 1995; Joo y cols., 1999; Levkovitch-Verbin y cols., 2006; Agudo y cols., 2009). La apoptosis ocurre por una secuencia de eventos que están genéticamente controlados, una parte intrínseca de este proceso es la activación de las caspasas, lo cual abre varias vías potenciales para futuras terapias de neuroprotección. La sobreexposición a aminoácidos excitadores como el glutamato (Lipton y Rosenberg, 1994), y la pérdida de soporte neurotrófico (Oppenheim, 1991) parece que son los estímulos mas importantes en la activación de la apoptosis en la NOG.

Algunos investigadores han sugerido que la obstrucción del transporte axonal retrógrado impediría el transporte de neurotrofinas desde el CS al soma de las CGR, vitales para su supervivencia (Quigley and cols, 1999, 2000; Johnson y cols., 2000; Pease y cols., 2000), desencadenándose por tanto la muerte de estas neuronas.

Se ha visto que en el humor vítreo de pacientes glaucomatosos y primates con glaucoma experimental existen niveles altos de glutamato (Dreyer y cols., 1996). Esto es importante porque se ha demostrado que inyecciones de glutamato en el vítreo producen un daño excitotóxico y selectivo de las CGR (Vorwerk y cols., 1996), aunque hay aportaciones controvertidas (Levkocitch-Verbin y cols., 2002b; Martín y cols., 2002).

Finalmente, los astrocitos están también implicados en el remodelado estructural que ocurre en la cabeza del NO de los ojos glaucomatosos, esta activación glial puede tener un papel importante en la NOG (Morrison y cols., 2005; Howell y cols., 2007a; Johnson y cols., 2007; Hernández y cols., 2008; Son y cols., 2010; Nugyen y cols., 2011).

1.4.3. ESTRATEGIAS DE NEUROPROTECCIÓN EN LA NOG

Los modelos experimentales de HTO también han permitido la evaluación de potenciales estrategias de neuroprotección para prevenir, disminuir o ralentizar la muerte de las CGR en el glaucoma. Se han probado un amplio rango de ellas como: administración de sustancias neuroprotectoras (Morrison y cols., 1998; Vidal-Sanz y cols, 2001; WoldeMussie y cols., 2001; Martín

y cols., 2003; Pang y cols., 2005; Pang y Clark, 2007; Zhou y cols., 2005; Howell y cols, 2008; Parrilla-Reverter y cols., 2009a) la transferencia génica mediante vectores adenoasociados (*Martin y cols., 2003*), células madre e injertos periféricos (*Vidal-Sanz y cols., 1987, 1993*).

Dos de las estrategias de neuroprotección más empleadas consisten en la administración de factores neurotróficos (*Osborne y cols 2004, 2008; Johnson y cols., 2009*) y el empleo de sustancias o estrategias inhibitoras de la vía de la apoptosis como son los inhibidores de las caspasas (*Hänninen y cols., 2002; McKinnon y cols., 2002; Ahmed y cols., 2004*) o la sobreexpresión de genes antiapoptóticos (*Cenni y cols., 1996; Chierzi y cols., 1998,1999*), ya que como hemos visto anteriormente se ha demostrado que el proceso de apoptosis es importante en la muerte de las CGR en el glaucoma y en otros tipos de lesiones del NO.

La administración de neurotrofinas a las CGR representa una terapia potencial. Por ejemplo, la sobreexpresión de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) en la retina usando vectores víricos adenoasociados aumenta la supervivencia de las CGR (*Martin y cols., 2003*). En algunos casos la aportación de factores tróficos no ha sido eficaz en la neuroprotección de las CGR.

Por último, aumentar o revertir la respuesta de las células gliales a la elevación de la PIO podría resultar en tratamientos neuroprotectores.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de esta tesis son dos:

Cuantificar y estudiar la distribución de la población total de CGR marcadas retrógradamente en dos estirpes de ratas (SD, albina y PVG, pigmentada) y ratones adultos (Swiss, albina, y C57BL/6J, pigmentada). Estos estudios sirven de base para el segundo objetivo.

Desarrollar un modelo experimental de HTO en rata y ratón albino y caracterizar los efectos de la HTO en la población de CGR y en los axones que forman el nervio óptico (NO) y la capa de fibras nerviosa de la retina (CFNR).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

POBLACIÓN DE CGR

- Desarrollar un método automático fiable para la cuantificación de la población de CGR marcadas retrógradamente.
- Realizar un estudio cuantitativo de la totalidad de la población de CGR retinofugal en rata albina y pigmentada.
- Realizar un estudio cuantitativo de la totalidad de la población de CGR retinotectal en rata albina y pigmentada, así como de la población retinotectal, ipsilateral y contralateral.
- Estudiar la distribución espacial de la población de CGR retinofugal, retinotectal y retinotectal ipsilateral en rata albina y pigmentada.
- Marcarje retrógrado de la población de CGR retinofugal sin seccionar el NO.
- Realizar un estudio cuantitativo de la totalidad de la población de CGR retinotectal y retinofugal en ratón albino y pigmentado.
- Estudiar la distribución de la población de CGR retinofugal y retinotectal en ratón albino y pigmentado.

MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN OCULAR

- Desarrollar un modelo experimental de hipertensión ocular en rata y ratón albino.
- Caracterizar el aumento de la PIO a lo largo del tiempo.
- Analizar el efecto de la HTO en el transporte axonal retrógrado activo y pasivo, y su evolución con el tiempo.
- Analizar cuantitativa y topográficamente el efecto de la HTO en la supervivencia de las CGR y su evolución con el tiempo.
- Estudiar el efecto de la HTO y su evolución con el tiempo en los axones que forman el NO y la CFNR.
- Investigar si la causa de la muerte de las CGR inducida por HTO se debe a la compresión axonal o a una isquemia retiniana.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. INTRODUCCIÓN

Los objetivos generales de esta tesis se dividen en dos: El estudio completo de la población de las CGR en rata y ratón y el desarrollo de un modelo experimental de HTO en rata y ratón para estudiar los mecanismos por los que la HTO causa daño en la población de CGR.

3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA

Para la realización de los experimentos se utilizaron: Ratas hembras adultas albinas Sprague-Dawley (SD) y pigmentadas Piebald Virol Glaxo (PVG) Brown Norway, con un peso que oscilaba entre 180-200 grs. Ratones machos adultos albinos Swiss y pigmentados C57BL/6N con un peso que oscilaba entre 30-45 grs.

Los animales procedieron de la colonia de cría de la Universidad de Murcia (Murcia, España). Se alojaron en habitaciones con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con una intensidad de luz de 24 lux y una temperatura constante de 25°C. La comida y el agua se proporcionaron *ad libitum*.

Las manipulaciones de los animales se realizaron siguiendo las regulaciones de la Unión europea y de España para el manejo de animales en investigación, así como los estatutos de ARVO (The association for Research in Vision and Ophthalmology) para la utilización de animales en investigación oftalmológica y visión. Además se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor y el malestar después de la cirugía.

Todas las manipulaciones quirúrgicas y la medida de la PIO se efectuaron bajo anestesia general inducida por una inyección intraperitoneal (i.p.) de la mezcla de Ketamina (70mg/Kg, Ketolar[®], Parke-Davies, S.L., Barcelona, España) y Xilacina (10mg/Kg, Rompún[®], Bayer, S.A., Barcelona, España).

Antes de la medida de la PIO con el tonómetro de contacto, se instiló una gota de anestésico tópico (Colircusí anestésico doble[®], Alcón Cusí, S.A., Barcelona, España) en los ojos de las ratas.

Durante la recuperación de la anestesia se aplicó a los ojos una pomada que contiene Neomicina y Prednisona (Oftalmolosa Cusí Prednisona-Neomicina[®]; Alcon S.A., Barcelona, España) para prevenir la desecación de la cornea, en los estudios de la población de CGR. En los estudios de HTO se aplicó una pomada con antibiótico, tobramicina (Tobrex[®]; Alcon cusí S.A., Barcelona, España) pero sin corticoides, para evitar el efecto de estos últimos sobre la PIO (Zhan y cols., 1992; Whitlock y cols. 2010). Posteriormente, los roedores se situaron en sus cajas y se devolvieron al animalario.

Para el sacrificio de los animales se inyectó i.p. una sobredosis de Pentobarbital sódico (Dolethal Vetoquinol[®], especialidades Veterinarias, S.A. Alcobendas, Madrid, España). Es conveniente procesar los animales aproximadamente a la misma edad porque el ojo y, por tanto la

retina, crecen durante la vida del animal sin que aumente el número de neuronas, por lo que el valor de la densidad neuronal varía a lo largo de la vida (Jeon y cols., 1998).

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se muestra un resumen de las diferentes manipulaciones experimentales, intervalos de supervivencia y el número de animales (tamaño muestral (n)) utilizados para abordar las principales cuestiones de este estudio.

Para el estudio de la población total y la distribución de las CGR, organizamos los grupos experimentales según las manipulaciones experimentales realizadas:

Población de CGR retinotectales (marcaje retrógrado desde el CS):

	ESTIRPE	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	n = 31
	PVG	n = 30
RATONES	SWISS	n = 22
	C57	n = 21

Población de CGR retinofugales (marcaje retrógrado desde el MNO intraorbitario proximal al globo ocular):

	ESTIRPE	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	n = 14
	PVG	n = 3
RATONES	SWISS	n = 9
	C57	n = 5

Población de CGR que decusa su axón en el quiasma óptico:

	ESTIRPE	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	n = 12
	PVG	n = 9

Población de CGR retinofugales sin sección del NO:

	ESTIRPE	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	n = 3

Para el estudio del efecto de la HTO en la población de CGR, organizamos los grupos experimentales según el objetivo y la duración de periodo de estudio después del tratamiento con láser:

Para establecer los parámetros de la fotocoagulación por láser (FL):

	ESTIRPE	DISPAROS	PERIODO DE ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	65-70	3 semanas	n = 10
		85-90	3 semanas	n = 10

Para estudiar el efecto de la HTO en la población de CGR a lo largo del tiempo:

	ESTIRPE	PERIODO DE ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	8 DÍAS	n = 6
		14 DÍAS	n = 8
		21 DÍAS	n = 34
		8 SEMANAS	n = 41
		12 SEMANAS	n = 41
RATÓN	SWISS	8 DÍAS	n = 12
		17 DÍAS	n = 13
		35 DÍAS (5 SEMANAS)	n = 21
		63 DÍAS (9 SEMANAS)	n = 13

Para estudiar si la HTO induce una degeneración y muerte, y/o un daño en el transporte axonal retrógrado (TAR), diseñamos dos tipos de experimentos:

Aplicación del FG antes del tratamiento con láser:

	ESTIRPE	PERIODO DE ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	17 DÍAS	n = 8

Aplicación del FG después del tratamiento con láser y la inmunodetección del Brn3a para identificar las CGR supervivientes:

	ESTIRPE	PERIODO DE ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	8 DÍAS	n = 6
		3 SEMANAS	n = 10
RATÓN	SWISS	8 DÍAS	n = 12
		35 DÍAS (5 SEMANAS)	n = 9

Para estudiar el efecto de la HTO en la cabeza del NO, realizamos la inmunodetección de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y de la subunidad pesada fosforilada del neurofilamento (pNF-H) mediante el anticuerpo monoclonal RT-97 en secciones transversales del NO:

	ESTIRPE	PERIODO DE ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	3 SEMANAS	n = 9

Para estudiar el efecto de la HTO en todos los tipos celulares que componen la capa de CGR, marcamos todos sus núcleos con DAPI:

	ESTIRPE	PERIODO DE ESTUDIO	TAMAÑO MUESTRAL (n)
RATA	SD	4 SEMANAS	n = 9

A todos los grupos experimentales de HTO se les aplicó FG en el CS después del tratamiento con láser (menos en el grupo donde se aplicó antes de la fotocoagulación (FL)) y DTMR en el MNO para estudiar si el déficit del transporte axonal retrógrado se debe a un déficit funcional. Por último, para examinar los eventos degenerativos de los axones de las CGR inducidos por la HTO inmunodetectamos la pNF-H con el anticuerpo monoclonal RT-97. Todas estas técnicas experimentales se explican más adelante.

3.4. MEDIDA DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR

Para estudiar el efecto de la fotocoagulación por láser (FL) en la PIO y su evolución a lo largo del tiempo, medimos la PIO en rata con el tonómetro de contacto (Tono-Pen® XL, Reichert Ophthalmic Instruments, Depew, NY, USA) (Moore y cols., 1993, 1996) y en ratón con el tonómetro de rebote (Tonolab®, Tiolat, OY, Helsinki, Finland) (Danas y cols., 2003a; Wang y cols., 2005, Morrison y cols., 2009).

En ratas, para cada registro de la PIO, se realizaron 8 y 12 medidas consecutivas (para el OD y el OI respectivamente) cada medida es resultado del promedio de 6 medidas que hace el aparato automáticamente. Las 8-12 medidas tomadas, fueron posteriormente promediadas. En ratones, utilizando el Tonolab®, se tomaron 6 medidas consecutivas en cada ojo. Cada medida, igual que con el TonoPen® usado en rata, proviene del promedio de 6 medidas que hace el aparato automáticamente. Las 6 medidas por ojo tomadas en cada punto temporal, se promediaron posteriormente.

La PIO tanto en rata como en ratón fue medida a la misma hora, siempre por la mañana para evitar las fluctuaciones debidas al ritmo circadiano (Krishna y cols., 1995; Moore y cols., 1996; Jia y cols., 2000a; Aihara y cols., 2003b) o a la HTO en sí misma (Drouyer y cols., 2008), e inmediatamente después de la anestesia general para evitar la disminución de la PIO (Jia y cols., 2000a, Morrison y cols., 1997).

En rata se realizaron registros antes de y a 6, 12, 24, 48, 72 h, y 1, 2, 3, 4 ó 12 semanas después de la FL. Y en ratón antes de y a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 21, 28, 42 ó 56 días después del tratamiento con láser.

3.5. INDUCCIÓN DE LA HTO

La fotocoagulación por láser (FL) se realizó mediante el láser diodo (Viridis Ophthalmic Photocoagulator-532 nm laser, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, Francia). El rayo láser se dirigió directamente, sin ninguna lente y en una sola sesión hacia la malla trabecular, vasos perilimbares y episclerales en rata (Fig. 7), y sobre las vasos perilimbares y episclerales en ratón, de los ojos izquierdos experimentales actuando los contralaterales derechos de controles. Este método es una modificación de métodos previamente descritos (WoldeMussie y cols., 2001, 2004; Levkovitch-Verbin y cols., 2002a).

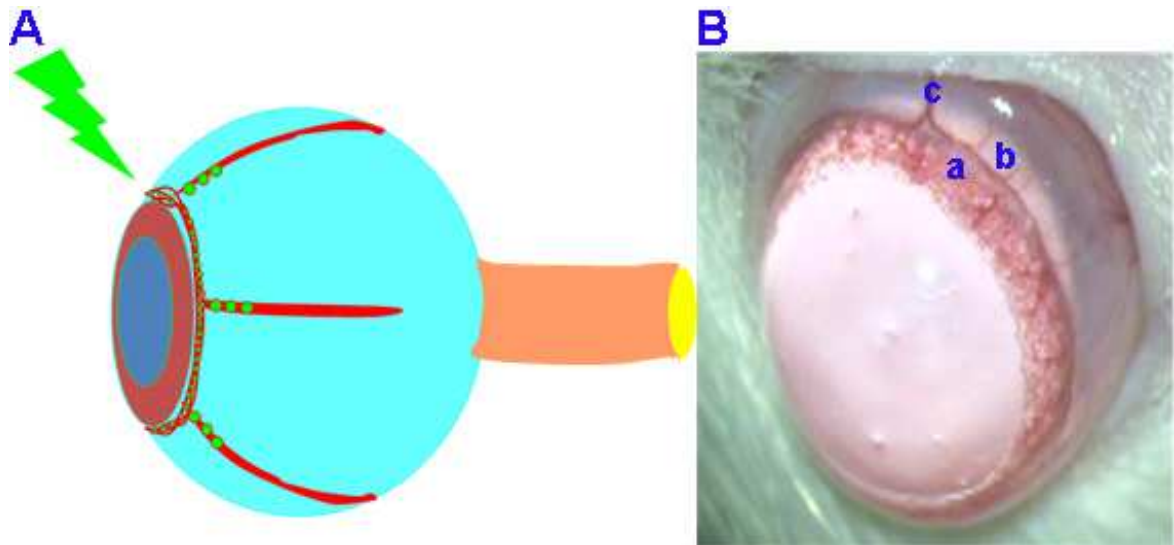


Figura 7. Método de inducción de la hipertensión ocular mediante la fotocoagulación por láser. A. Esquema representativo que ilustra la localización de los vasos perilimbales y episclerales de un ojo de roedor. B. Fotografía de un ojo de rata SD en la que se muestra la malla trabecular (a), vasos perilimbales (b) y episclerales (c), estructuras a las que se dirige el láser para realizar su fotocoagulación e impedir el drenaje del humor acuoso aumentando así la presión intraocular.

Para determinar el número idóneo de disparos de láser necesarios para aumentar la PIO en rata, a un grupo experimental preliminar (n=10) se le dió una media de 65-70 disparos, mientras que a otro grupo (n=10) recibió una media de 85-90 disparos en el ojo experimental izquierdo.

El tamaño del punto, duración, potencia fue respectivamente: 50-100 μ m, 0,5s, 0,4W en rata y 50-100 μ m, 0,5s, 0,3W en ratón. A las ratas se les dio 90 disparos (excepto al grupo al que se dio 70 disparos) y a los ratones 72 disparos.

En un pequeño número de animales se observó rápidamente después de la FL un número de complicaciones oculares tales como hipema y opacidad corneal, complicaciones que ya se habían descrito previamente (*Levkovitch-Verbin y cols., 2002a*). En la mayoría de los casos estos efectos adversos se resolvieron en pocos días, de lo contrario estos animales fueron descartados del estudio.

3.6. MARCAJE RETRÓGRADO

Vamos a describir las técnicas de aplicación de un trazador neuronal en el CS o en el MNO, para el marcaje retrógrado de las CGR retinotectales y retinofugales respectivamente. De esta forma identificamos exclusivamente a las CGR que son las únicas neuronas de la retina que proyectan fuera del ojo a través de su único axón retinofugal.

3.6.1. MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS CGR RETINOTECTALES

Para identificar, cuantificar y estudiar la distribución de la población total de CGR en roedores que proyectan sus axones retinotectalmente a los CS, que es la principal zona de proyección axonal en el cerebro de roedores (*Lund, 1965; Perry, 1981*) y de la población de las CGR que mantienen su transporte axoplásmico retrógrado activo después de la FL, aplicamos un trazador fluorescente en ambos CS.

Utilizamos dos trazadores fluorescentes con propiedades muy similares: En rata utilizamos el Fluoro-Gold® (FG) (Fluorochrome Inc., Engelwood, CO, USA), y en ratón la hidroxistilbamidina metanosulfonato (OHSt) (Molecular Probes, Leiden, Holanda), que es una pequeña molécula (472,53 KDa) con propiedades fluorescentes y trazadoras similares al FG (*Wessendorf, 1991; Köbbert y cols., 2000; Cheunsuang y Morris, 2005*). Ambos trazadores producen marcajes fiables y reproducibles, y son muy eficaces para su utilización en el sistema visual (*Salinas-Navarro y cols., 2009a, b*). Se transportan activamente (ya que requieren ATP) (*Schmued y cols., 1986, 1989; Wessendorf, 1991*) y retrógradamente desde los terminales axonales hacia el soma de las CGR y dendritas primarias donde se acumulan (**Fig. 8**), no difundiendo transcelularmente (*Schmued y cols., 1986*).

El FG y el OHSt se diluyen al 3% y al 10% respectivamente en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% disuelto en suero salino (0.9% NaCl).

Para la aplicación del trazador en la superficie completa de ambos CS se siguió el método estándar descrito anteriormente en nuestro laboratorio (*Vidal-Sanz y cols., 1988, 1993, 2000, 2001, 2007; Lafuente López-Herrera y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009a, b; Nadal-Nicolás y cols., 2009*). Primero se rasura la parte dorsal de la cabeza, se hace una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo, se retira el periostio para exponer el cráneo y se realiza una craneotomía bilateral rectangular parietal por medio de la fresadora (Free-Eheeler, Cordless Moto-tol, Model 850; Dremel, Breda, Holanda) sin tocar las suturas craneales frontal, sagital y transversa. Se quitan las meninges que recubren el cerebro y con una micropipeta conectada a un sistema de aspirado acoplado a una bomba de vacío (Ordisi S.A., L'Hospitalet, Barcelona, España) se succiona la porción del encéfalo e hipocampo necesaria para exponer bilateralmente la parte posterior del tálamo y ambos CS. En rata se retira la piamadre dejando al descubierto la superficie de ambos CS (**Fig. 9A**).

En la superficie expuesta de ambos CS se aplica una pequeña porción de esponja de gelatina (Spongostan® Film, Ferrosan A/S, Dinamarca) previamente empapada con el trazador correspondiente. Finalmente, se cubre la craneotomía con Spongostan® y se sutura la piel del animal con seda de 4/0 (Lorca Marín, Murcia, España).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se estimó que 7 días era el tiempo óptimo que debía transcurrir desde la aplicación del neurotrazador en el CS hasta su llegada al soma de la totalidad de la población de CGR (*Peinado-Ramón y cols., 1996; Selles-Navarro y cols. 1996*).

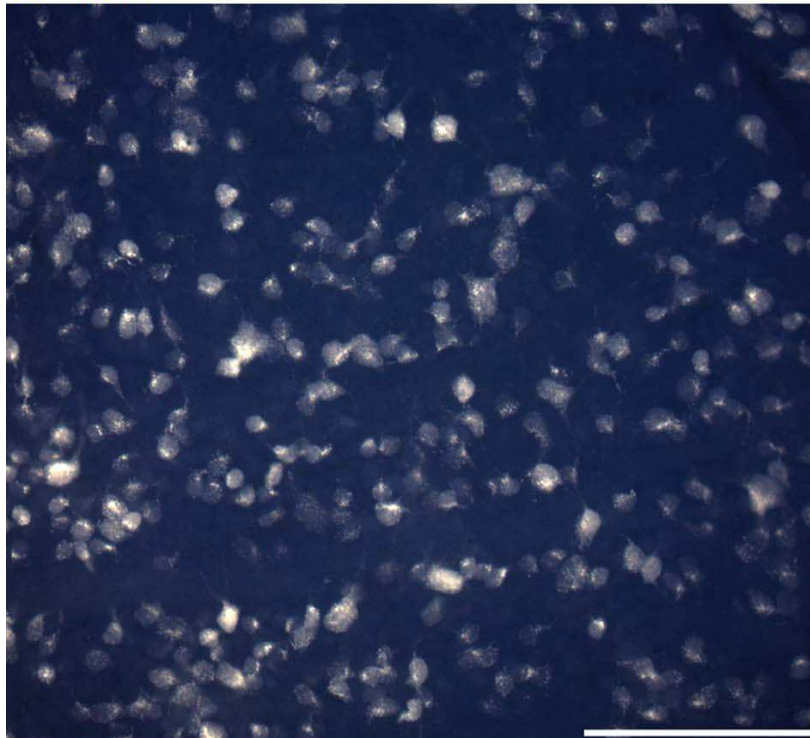
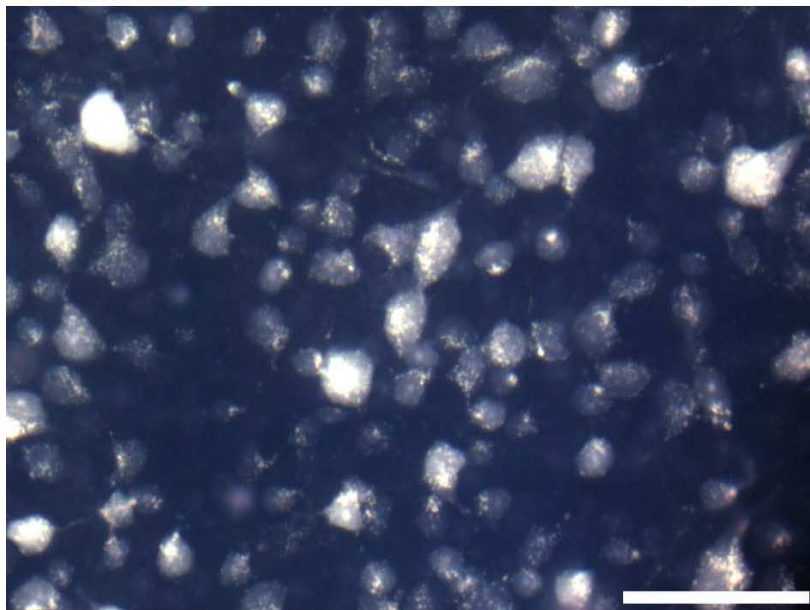
A: RATA**B: RATÓN**

Figura 8. Células ganglionares de la retina (CGR) trazadas con FG (A, rata) o con OHSt (B, ratón). Imágenes tomadas de la periferia de una retina control montada a plano representativa de rata SD (A), y de ratón Swiss (B), mostrando las CGR trazadas retrógradamente con FG (A) o con OHSt (B) aplicados en ambos CS 7 días antes del procesamiento del animal. Ambos trazadores se transportan desde los terminales axonales localizados en los CS hasta el soma, que está en la retina, por transporte axonal retrógrado activo. Las fotografías ilustran el típico marcaje difuso y granular del neurotrazador que delinea el soma y en ocasiones las dendritas primarias de la célula. Se pueden apreciar los diferentes tipos morfológicos de CGR: pequeñas, medianas y grandes, descritos inicialmente por Fukuda (1977). Barra de escala: (A=100µm, B=50µm).

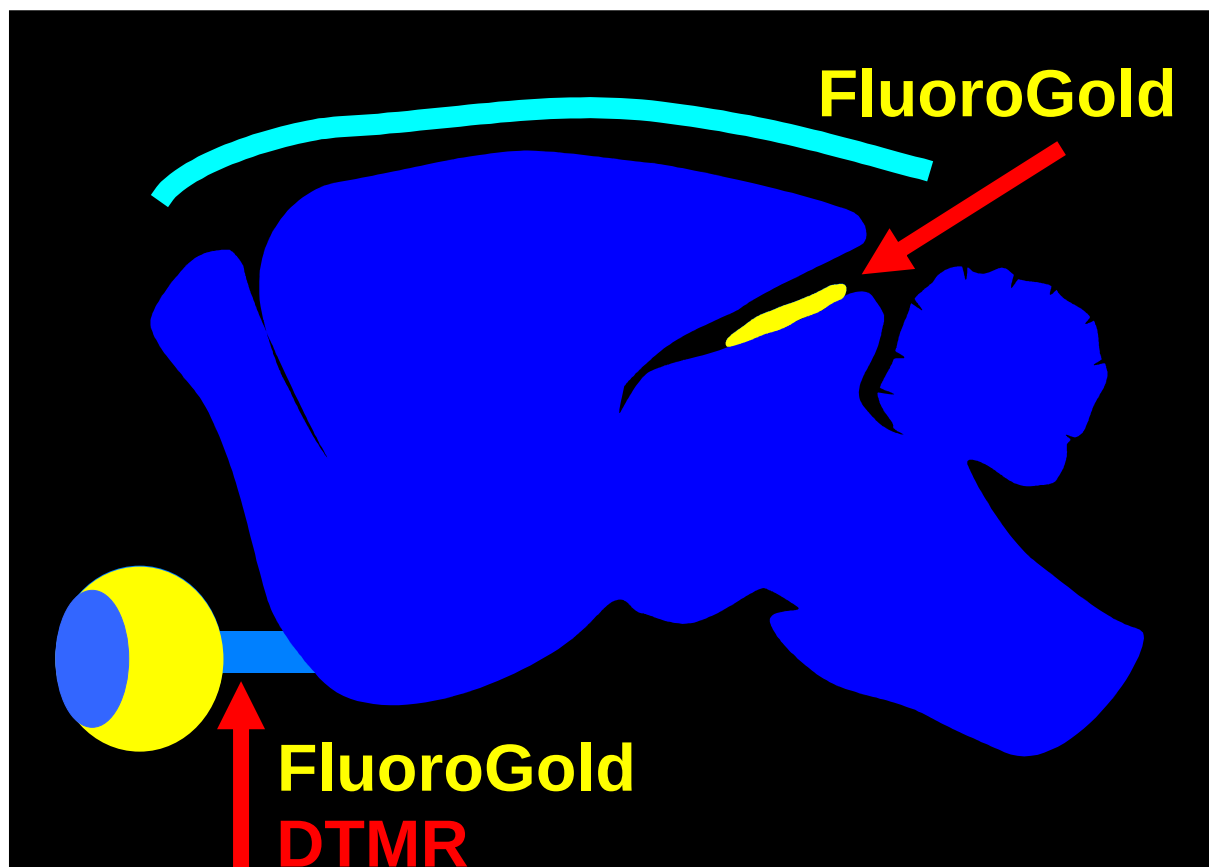


Figura 9. Esquema representativo de una sección sagital del cerebro de roedor. A. Aplicación del trazador neuronal retrógrado Fluoro-Gold (FG) o hidroxistilbamidina metanosulfonato (OHSt) en ambos CS una semana antes del procesamiento del animal, para la identificación por transporte axonal retrógrado activo de las CGR de rata y ratón respectivamente. B. Aplicación del trazador neuronal dextrano-tetrametil-rodamina (DTMR), FG u OHSt en el muñón del nervio óptico (MNO) intraorbitario proximal al globo ocular, 2 ó 3 días, respectivamente, antes del procesamiento para identificar por difusión pasiva (DTMR) o transporte axonal retrógrado activo (FG, OHSt) las CGR de roedores.

3.6.2. MARCAJE RETRÓGRADO DE LAS CGR RETINOFUGALES

Para identificar, cuantificar y estudiar la distribución de la población total de CGR en roedores, ya que todas las CGR emiten un axón retinofugal que se juntan formando el NO, y estudiar si la pérdida del marcaje retrógrado después de la FL es debido a un déficit funcional manteniendo la estructura de su axón y/o a una compresión en la cabeza del NO, aplicamos el trazador neuronal FG, OHSt o dextrano tetrametilrodamina (DTMR; 3000 PM; Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA) respectivamente, en el MNO intraorbitario proximal al globo ocular.

El DTMR es un trazador fiable y eficaz para su utilización en el sistema visual (WoldeMussie y cols., 2001; Salinas-Navarro y cols., 2009a; c; 2010) que, a diferencia del FG o del OHSt, difunde pasivamente a través del axón a una velocidad de 2mm/h (Fritzsche, 1993; WoldeMussie y cols., 2001), produciendo un intenso marcaje (WoldeMussie y cols., 2001; Salinas-Navarro y cols., 2009a, c; 2010) del soma de la neurona, sus dendritas y su axón intrarretiniano (WoldeMussie y cols., 2001).

Para la aplicación del trazador en el MNO proximal al globo ocular, se siguió el método estándar descrito anteriormente en nuestro laboratorio (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993; Sellés-Navarro y cols., 1996; Lafuente López-Herrera, y cols., 2002; Parrilla-Reverter y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2009a). Primero rasuramos la parte dorsal de la cabeza del animal, se hace una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo y se realiza una cantotomía alrededor de la ceja orbitaria. Se retira el tejido que recubre el NO exponiendo el NO intraorbitario proximal al globo ocular. Para no provocar la isquemia de los vasos retinianos se secciona superior y longitudinalmente la vaina dural, donde en posición ínfero-nasal están situados los vasos oftálmicos (Morrison y cols., 1999; Sugiyama y cols., 1999) (Fig. 10). Una vez retirada la vaina dural y expuesto el NO, lo seccionamos aproximadamente a 3mm o a 1mm del globo ocular, según se trate de rata o de ratón (Fig. 9B).

Aplicamos una pequeña porción de Spongostan® previamente empapada con el FG al 6% u OHSt al 10%, o cristales de DTMR (preparados mediante la evaporación de su disolución en agua destilada), en la superficie del MNO. Se sutura la piel del animal con seda de 4/0.

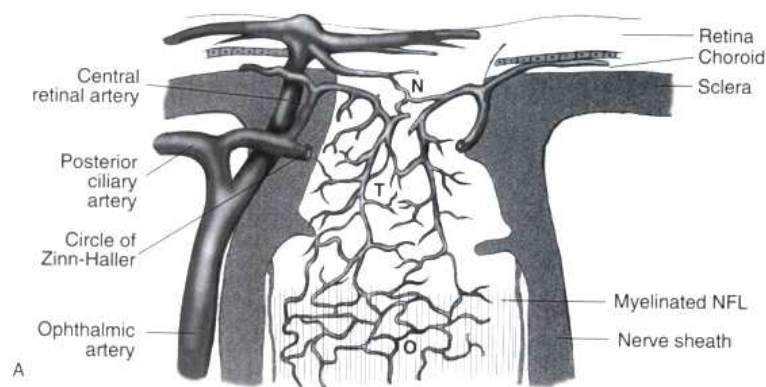


Figura 10. Representación esquemática de las arterias de la cabeza del nervio óptico de rata SD. Tomado de Morrison y cols. (1999). Se aprecia como la arteria oftálmica circula ínfero-nasal por la vaina dural que recubre el nervio óptico.

En una serie de experimentos preliminares se estimó que 3 días para el FG y el OHSt y 2 días para el DTMR, era el tiempo óptimo que debía transcurrir desde la aplicación del trazador en el MNO hasta su llegada al soma de la totalidad de la población de CGR. Hemos considerado que analizando las retinas a los 2 ó 3 días de la aplicación del trazador, como no se ha producido todavía la muerte de CGR, el conteo de CGR marcadas refleja su población.

3.6.2.1. Marcaje retrógrado de las CGR retinofugales sin seccionar el nervio óptico

Este método nos permite un marcaje de la población de las CGR retinofugales sin la degeneración retrógrada que se produce post-axotomía del NO, y es un marcaje más rápido que el realizado desde el CS.

Para la aplicación del trazador en el NO intraorbitario sin seccionarlo, se siguió el método descrito anteriormente hasta exponer el NO intraorbitario proximal al globo ocular y le aplicamos rodeando al NO una porción de Spongostan® previamente empapado con el FG al 6%. Siete días después de la aplicación del FG se procesaron los animales, tiempo suficiente para que el FG se acumule abundantemente en el soma de todas las CGR de la retina.

3.6.3. MARCAJE RETRÓGRADO DE CGR IPSILATERALES Y CONTRALATERALES

Para identificar, cuantificar y estudiar la población de CGR de la retina en rata pigmentada y albina que no decusa (ipsilateral) o decusa (contralateral) su axón en el quiasma óptico para alcanzar los CS aplicamos el FG sólo en el CS derecho.

La aplicación del FG en la superficie del cerebro medio resulta en el marcaje no buscado del cerebro medio contralateral, porque el FG es altamente soluble. Para evitar este marcaje no deseado extirpamos quirúrgicamente el CS izquierdo y una semana después de la coliculectomía aplicamos el FG en el CS derecho (**Fig. 11**).

Para la aplicación del FG en un sólo CS se siguió el método descrito anteriormente, expusimos la superficie completa del CS izquierdo y lo succionamos completamente. Transcurridos 7 días de la coliculectomía, tiempo suficiente para la cicatrización, expusimos la superficie del CS contralateral derecho, y aplicamos una pequeña porción de Spongostan® empapada en 3% de FG. Cubrimos la craneotomía con Spongostan® y suturamos la piel del animal. Siete días después de la aplicación del FG, se procesaron los animales.

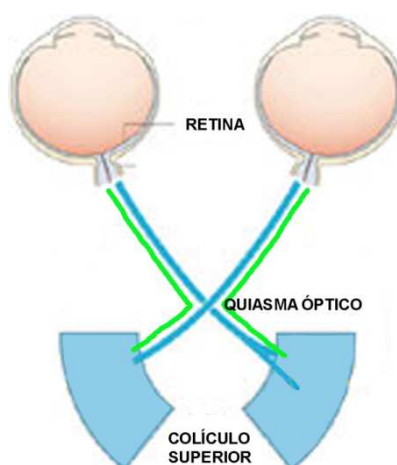


Figura 11. Representación esquemática de la estrategia experimental utilizada para identificar y cuantificar la población de CGR que proyecta ipsi o contralateralmente. Para el marcaje retrógrado de las CGR retinotectales de la retina derecha que no decusan (ipsilaterales) y de la retina izquierda que decusan (contralaterales) su axón en el quiasma óptico para alcanzar el CS derecho en rata, realizamos la ablación del CS izquierdo, transcurrida una semana aplicamos el FG en el CS contralateral derecho, evitando de este modo la difusión del FG al CS izquierdo. Siete días después de la aplicación del FG se procesaron los animales, y se analizaron las retinas para identificar en la retina izquierda las CGR que proyectan contralateralmente al CS derecho, y en la retina derecha las CGR que proyectan ipsilateralmente al CS derecho.

Después del marcaje retrógrado, los animales se procesan para la enucleación de los ojos, la extracción del NO, disección de las retinas a plano y la realización de las distintas técnicas de inmunofluorescencia y finalmente, su montaje a plano, fotografiado y análisis.

3.7. PROCESADO TISULAR

3.7.1. PERFUSIÓN-FIJACIÓN DEL ANIMAL

Los animales se sacrificaron con una sobredosis inyectada i.p. de Pentobarbital sódico (Dolethal®; Vetoquinol; Especialidades Veterinarias SA; Alcobendas; Madrid).

Tras la administración del eutanásico, se procedió a la perfusión intracardiaca de los animales: se corta la piel desde el apéndice xifoides hacia los hombros. Se secciona el diafragma y posteriormente el músculo y las costillas desde la de línea esternal media hacia las clavículas, con cuidado de no cortar los pulmones. Se levanta y clampa el peto costal dejando al descubierto el tórax. Posteriormente, se clampa la aorta abdominal y se secciona la aurícula derecha dejando que la sangre salga durante unos segundos. Se realiza una pequeña incisión en el ventrículo izquierdo, donde se introduce una cánula hasta la aorta ascendente. La cánula se conecta por un sistema de tubos a una bomba peristáltica (ISM827, Ismatec S.A., Zurich, Suiza) y ésta a un reservorio de fluidos. Primero, el animal se perfundió con 50ml de suero salino (NaCl al 0,9%) para limpiar la sangre de los vasos y órganos, y seguidamente, con 150ml de paraformaldehído (PF) al 4% en 0,1 M tampón fosfato salino (PBS, fosfato de sodio dibásico heptahidrato, fosfato de sodio dihidrógeno dihidrato y cloruro sódico a pH 7,2-7,4) a 4°C.

3.7.2. ENUCLEACIÓN DE LOS OJOS

Para el estudio inequívoco de la distribución de las CGR dentro de la retina tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, es crucial una correcta orientación de la retina y por tanto del ojo, por lo que inmediatamente después de la anestesia profunda y antes de la perfusión-fijación se situó una sutura en el polo superior del ojo. Además, se utilizaron como puntos de referencia adicionales la inserción del músculo recto en la parte dorsal de cada ojo, así como, la carúncula nasal.

Para la enucleación de los ojos se realizó una incisión en la zona nasal y temporal de la ceja para posteriormente seccionar el tejido que rodea y sujeta el globo ocular a la órbita ósea, se traccionó el globo ocular hacia adelante y se hizo un corte profundo del NO para su posterior análisis.

El globo ocular se postfija durante una hora y media, o una hora (en rata o ratón, respectivamente) en PF al 4%. Posteriormente, se introduce en tampón fosfato salino 0,1M a 4°C, hasta la posterior extracción de la retina.

3.7.3. EXTRACCIÓN DE LA RETINA

Para la disección del globo ocular, primero se quita el tejido que lo rodea, a continuación se realiza una incisión en el limbo esclero-corneal y se retira la córnea. Se extraen las estructuras del polo anterior del ojo: iris y cristalino, obteniéndose la copa óptica donde se aprecia la retina. Para disecar la retina a plano hacemos 4 cortes: superior, inferior, nasal y temporal, el corte más largo indica el polo superior. Se diseca la retina separándola con una pinza de la ora serrata y posteriormente cortando el nervio óptico. Se extiende con la cara vítrea hacia arriba en un porta y se adhiere al papel de filtro (Whatman[®], Whatman international Ltd Maidstone, Inglaterra). Se realizan lavados durante la disección del ojo con PBS 0,1M. Se post-fija en PF al 4% al menos una hora, se quita el papel de filtro y se hacen 3 lavados en PBS. Se ponen la retina en un porta y se limpia el vítreo con un pincel.

La retina a plano ya está preparada para realizar las técnicas inmunofluorescentes y para su montaje a plano y posterior análisis.

3.7.4. MONTAJE A PLANO DE LA RETINA

Las retinas listas para analizar se ponen a plano sobre un portaobjetos con su cara vítrea hacia arriba, se eliminan los restos de vítreo y suciedad adherida a la retina, y se cubren con medio de montaje antifading (glicerol al 50% y p-fenilendiamina al 0,04% en tampón carbonato sódico 0,1M pH 9) para evitar la pérdida de fluorescencia. Finalmente, se cubren con un cubreobjetos y éste se sella con esmalte de uñas.

3.7.5. SECCIONES TRANSVERSALES DEL NERVIO ÓPTICO

Este análisis se realizó para estudiar el efecto de la HTO en los axones de las CGR que forman el NO en su zona proximal al globo ocular. Las ratas se procesaron con la mezcla fijadora de PF al 4% y glutaraldehído al 0,25% en PBS 0,1M (pH 7,2-7,4), previamente a la disección del globo ocular se extrajeron las porciones intraorbitales de los NO proximales a los globos oculares derechos e izquierdos y se marcó el polo anterior con tinta china (Royal Talens, Apeldoorn, Holanda).

Los NO se postfijaron durante 2 horas a 4°C con la mezcla fijadora, y se almacenaron en PBS. Después se deshidrataron, para su posterior inclusión en bloques de parafina en los que se mantuvo la orientación del nervio óptico. Se obtuvieron secciones histológicas transversales seriadas de 3µm de espesor en el microtomo de rotación (Microm HM-340-E; Microm Laborgerate GmbH, Walldorf, Alemania) que fueron recogidas en portaobjetos tratados con poly-L-lisina (Sisma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 0,01% en agua bidestilada.

3.8. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

3.8.1. DETECCIÓN DE LOS NÚCLEOS DE LAS CGR: Brn3a

El Brn3a es, como hemos visto anteriormente, un miembro de la familia de los factores de transcripción Brn3, que se localiza en el núcleo y tiene un dominio POU de unión al DNA. Se ha demostrado que es un marcador molecular específico y fiable de las CGR en retina de rata y ratón para su cuantificación bajo condiciones normales y después de axotomía (*Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011*). El estudio de su expresión es una forma indirecta de conocer el estado fisiológico de las CGR ya que las CGR axotomizadas disminuyen paulatinamente la expresión del transcrito del Brn3a (*Agudo y cols., 2008, 2009*) que se correlaciona con un descenso gradual de la cantidad de proteína (western blotting e inmunohistofluorescencia) 3 días después de la lesión del NO (*Nadal-Nicolás y cols., 2009*). Es importante resaltar que la disminución de la expresión de Brn3a se correlaciona con las CGR que están degenerando, ya que estudios de nuestro grupo han demostrado que esta expresión se mantiene en las CGR que, a pesar de estar lesionadas, están vivas (*Sánchez-Migallón y cols., 2011*).

Para identificar, cuantificar y estudiar la distribución de la población total de CGR que sobreviven en roedores después de la inducción de la HTO, detectamos mediante inmunohistofluorescencia la proteína Brn3a.

Para realizar la inmunodetección del Brn3a se siguió el método descrito anteriormente en nuestro laboratorio (*Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011*). Primero se permeabilizaron las membranas citoplasmáticas de las CGR mediante lavados de las retinas en PBS Tritón[®] X-100 0.5% (2x10 min a temperatura ambiente (TA)) y posteriormente se congelaron a -70°C durante 15 minutos en este mismo tampón. Después se hace un lavado en PBS 0,1M y se incuban con el anticuerpo primario de cabra anti-Brn3a (goat anti-Brn3a C-20, Santa Cruz Biotechnologies Heidelberg, Alemania) diluido 1:100 en solución bloqueante de suero de normal burro (NDS) diluido en Tritón[®] X-100 al 2% en PBS para el bloqueo de las uniones inespecíficas. Tras la incubación a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario, se lavan las retinas en PBS-Tritón[®] X-100 0,5% (3x10 min a TA). Una vez lavadas, se realiza la detección del anticuerpo primario incubando las retinas con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 568 que emite fluorescencia roja, burro anti-cabra Alexa Fluor-568 (donkey anti-goat, Alexa Fluor 568, Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, España) diluido 1:500 en tampón bloqueante (**Fig. 12**) a TA durante 2 horas. Tras la incubación se lavan en PBS (3x10 min a TA) y finalmente se guardan en PBS hasta su montaje.

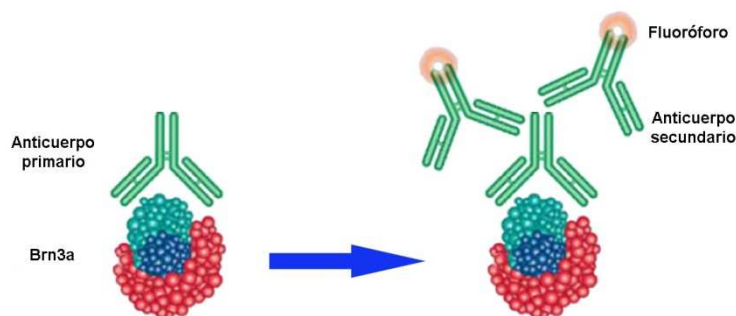


Figura 12. Esquema representativo de la técnica de inmunohistofluorescencia indirecta para la detección de la proteína Brn3a en el núcleo de las CGR. Para estudiar la expresión de la proteína Brn3a en las CGR, las retinas se incuban con el anticuerpo primario de cabra anti-Brn3a que reconoce y se une específicamente a su antígeno que es el Brn3a. Esta unión es detectada en el tejido retiniano por el anticuerpo secundario de burro que reconoce la región constante Fc del anticuerpo primario de cabra, y está conjugado con una molécula fluorescente (el fluoróforo, en este caso la Alexa-568) que, al excitarse, emite luz roja.

3.8.2. DETECCIÓN DE LOS AXONES DE LAS CGR: pNFH

El RT-97 es un anticuerpo monoclonal que reconoce en western blot la cadena pesada fosforilada (pNFH, 200KDa) del triplete de neurofilamentos (*Wood and Anderton, 1981; Anderton y cols., 1982; Drager y Hofbauer, 1984*). Fue desarrollado por John Wood (*Wood and Anderton, 1981*) en ratón contra los neurofilamentos de ratas Wistar. Los neurofilamentos son componentes del citoesqueleto axonal y están compuestos por tres subunidades distinguibles por sus pesos moleculares: NF-L (68KDa), NF-M (160KDa), y NF-H (200KDa), por tanto el uso del anticuerpo RT-97 permite la identificación de los axones de las CGR.

En nuestra experiencia, el RT-97 marca intensamente los axones de las CGR y débilmente el plexo de las células horizontales (*Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Pérez y cols., 1988b, 1996; Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006; Parrila-Reverter y cols., 2009b*). Además, es un buen marcador de las CGR y sus axones axotomizados (*Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Pérez y cols., 1988b, 1996; Wang y cols., 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006; Parrila-Reverter y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2009c, 2010*).

Para estudiar el efecto de la HTO a lo largo del tiempo en los axones intrarretinianos de las CGR que forman la CFNR y en los axones que forman el NO intraorbitario proximal al globo ocular, detectamos por tanto los pNFH usando la técnica de inmunohistofluorescencia del RT-97.

Para la inmunodetección de la pNFH se siguieron los protocolos estándar de nuestro laboratorio (*Villegas-Pérez y cols., 1988, 1996, 1998; Wang y cols., 2000, 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006; Parrila-Reverter y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2009c, 2010*). Una vez diseccionadas, las retinas se permeabilizan y lavan como se ha explicado anteriormente. Después, para bloquear las uniones inespecíficas se incuban una hora a TA con solución bloqueante (BSA (albúmina de suero bovino) al 2,5% + Tritón® X-100 al 2% en PBS). Una vez bloqueadas, se incuban con el anticuerpo primario RT-97 (ratón anti-pNFH, Universidad de IOWA, Iowa, USA), diluido 1:1.000

en la solución bloqueante durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las retinas se lavaron en PBS (3x15min a TA), para la detección del anticuerpo primario se incuban con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón (goat anti-mouse-FITC F-4018, Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA), acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), fluoróforo que emite fluorescencia verde, diluido 1:50 en tampón bloqueante a TA durante dos horas. Después, se lavan las retinas en PBS.

3.8.3. DETECCIÓN DE LOS AXONES DE LAS CGR (PNFH) Y DE LA ASTROGLÍA (GFAP) EN LAS SECCIONES TRANSVERSALES DE LOS NERVIOS ÓPTICOS

La proteína acida fibrilar glial (GFAP) es un tipo de neurofilamento intermedio que se encuentra en astrocitos del SNC y su sobreexpresión está relacionada en procesos de gliosis reactiva, indicativa de lesión en el SNC.

Las secciones del microtomo se preparan para las técnicas inmunofluorescentes mediante la desparafinación en baños sucesivos de xileno y alcoholes de mayor a menor gradación para hidratar el tejido. Después se procedió al desenmascaramiento antigénico incubando las secciones en una disolución de tripsina 1:4, durante 10min al baño maría.

Las secciones transversales de los NO experimentales y controles, se lavaron con PBS durante 5 min, y se bloquearon durante 15min a TA en presencia de la solución bloqueante (BSA al 2,5% + Tritón al 2% en PBS). A continuación, fueron incubadas toda la noche a 4°C con una mezcla de ambos anticuerpos primarios: conejo anti-GFAP (Dako Z-0334, Glostrup, Dinamarca) y ratón anti-PNFH (RT-97), ambos diluidos 1:1.000 en la misma solución bloqueante. La detección de los anticuerpos primarios se realizó mediante la incubación durante 2h con una mezcla de los siguientes anticuerpos secundarios: cabra anti-conejo acoplado a isocianato de tetrametilrodamina, que emite fluorescencia roja (goat anti-rabbit-TRITC T-6778, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) y con cabra-anti-ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína de fluorescencia verde (goat anti-mouse FITC, F-4018, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) diluidos 1:40 o 1:50, respectivamente en solución bloqueante. Tras la incubación, las secciones se lavaron 3x10 minutos en PBS 0,1M y finalmente se montaron en medio antifading y sellaron con cubreobjetos.

3.9. TINCIÓN DE LOS NÚCLEOS DE LA CAPA DE CÉLULAS GANGLONARES: DAPI

Para determinar si la muerte de las CGR después de la HTO era debido a la isquemia retiniana. Se identificó la totalidad de las células de la capa de CGR con la tinción nuclear con DAPI, ya que no se puede inmunodetectar la totalidad de la población de las células amacrinas desplazadas, debido a que no existe un marcador específico para ellas. La capa de CGR en roedores está constituida en su mayoría por CGR, que las podemos inmunodetectar con Brn3a y por células amacrinas desplazadas, en igual proporción (*Dräger y Olsen, 1981; Perry y cols., 1981, 1983; Jeon y cols., 1998*) y en mucha menor proporción, núcleos de las células endoteliales y de la microglía, que son alargados y distinguibles morfológicamente.

El 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) emite una fuerte fluorescencia cuando se intercala en la doble cadena del DNA tiñendo, por tanto los núcleos de todas las células. Su máximo de absorción es a una longitud de onda de 360nm (ultravioleta) y con su máximo de emisión a 460nm (azul).

Las retinas después de la inmunodetección del Brn3a se limpiaron de la suciedad y se montaron con medio de montaje antifading con DAPI (Vectashield with DAPI[®], laboratorios Vector, Inc., Burlingame, CA, USA). En estas retinas, se analizaron los núcleos Brn3a positivos, correspondientes a las CGR y los núcleos DAPI positivos que en la capa de células ganglionares de la retina corresponden mayoritariamente a las CGR y las células amacrinas desplazadas. Como el DAPI tiñe los núcleos de todas las células, también se detectan los núcleos de células de glía y células del endotelio vascular que se encuentran en la misma capa, aunque su población es mucho menor que las dos anteriores.

En el estudio de la inmunofluorescencia se realizaron varios controles negativos que consistieron en la incubación de las retinas con el anticuerpo secundario sin el primario, y no obtuvimos señales específicas.

3.10. ADQUISICIÓN DE IMAGENES DE LA RETINA

3.10.1. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Las retinas después de su montaje a plano, se examinaron y se adquirieron imágenes individuales de cada área de captura individual de la retina (área de la retina de donde se adquiere una imagen individual). Utilizamos un microscopio de fluorescencia (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con tres filtros: el ultravioleta (BP 365/12, LP 397) que permite la observación de la fluorescencia blanca dorada del FG y del DAPI, el de rodamina (BP 546/12, LP 590) para observar la fluorescencia naranja roja del DTMR, y de los anticuerpos conjugados con Alexa Fluor-568 (usado para detectar Brn3a) y con TRITC (usado para detectar GFAP), y el de fluoresceína (BP 450/490, LP 515565) que permite la observación de los anticuerpos conjugados con FITC (usado para detectar pNFH).

El microscopio también estaba equipado con una cámara digital de alta resolución (ProgResTM C10, Jenoptik, Jena, Alemania), una platina motorizada movida por ordenador (ProScanTM H128 Series, Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK) conectada al programa de análisis de imagen Image Pro Plus (IPP 5.1 para Windows[®]; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) y un módulo controlador del microscopio (Scope-Pro[®] 5.0 para Windows[®], Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

3.10.2. CAPTURA DE IMÁGENES DIGITALES DE LA RETINA

3.10.2.1. Imágenes individuales

Las imágenes individuales fueron adquiridas siguiendo los métodos descritos anteriormente en el laboratorio (Marco-Gomariz y cols., 2006; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla-reverte y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2009a, b).

Se captura digitalmente la imagen de cada área de captura. El área total de captura que cubre la retina entera está formada por una matriz de "m" por "n" áreas de capturas individuales, columnas y filas, respectivamente. Normalmente se adquieren 154 ó 140 imágenes individuales por retina de rata o ratón respectivamente. Cada área de captura individual tiene una superficie de $0,627\text{mm}^2$ o $0,2161\text{mm}^2$ en rata o ratón, respectivamente. Antes de la captura de las imágenes digitales individuales se enfoca manualmente con el objetivo de 10x (Plan-Neofluar, 10x/0.30; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) o de 20x (Plan-Neofluar, 20x/0.50; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) según se analicen retinas de rata o ratón. Las imágenes individuales son capturadas contiguamente sin huecos y sin superposición entre ellas, siguiendo un patrón de escaneo regular. Todas las imágenes individuales de cada retina se guardan en imágenes de color de 24 bit.

3.10.2.2. Fotomontajes

Para obtener el fotomontaje de la retina completa, cada imagen individual digital fue combinada automáticamente reconstruyendo una imagen de alta resolución de la retina completa utilizando el Image Pro Plus[®] para Windows[®] (Fig. 13).

3.11. CONTAJE AUTOMÁTICO DE LAS CGR

Para obtener rápidamente el número total exacto de CGR trazadas retrógradamente con FG (CGR-FG⁺), con OHSt (CGR-OHSt⁺) o marcadas con Brn3a (CGR-Brn3a⁺), se desarrolló en colaboración con D. Manuel Jiménez López una subrutina de conteo automático para cada tipo de marcaje utilizando el lenguaje de macros del programa de análisis de imagen IPP. Todas las imágenes individuales con CGR marcadas retrógradamente con su trazador neuronal o el marcador molecular capturadas en cada retina fueron procesadas automáticamente por su correspondiente subrutina de conteo que cuenta automáticamente todas las CGR marcadas que hay en una retina (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a, b).

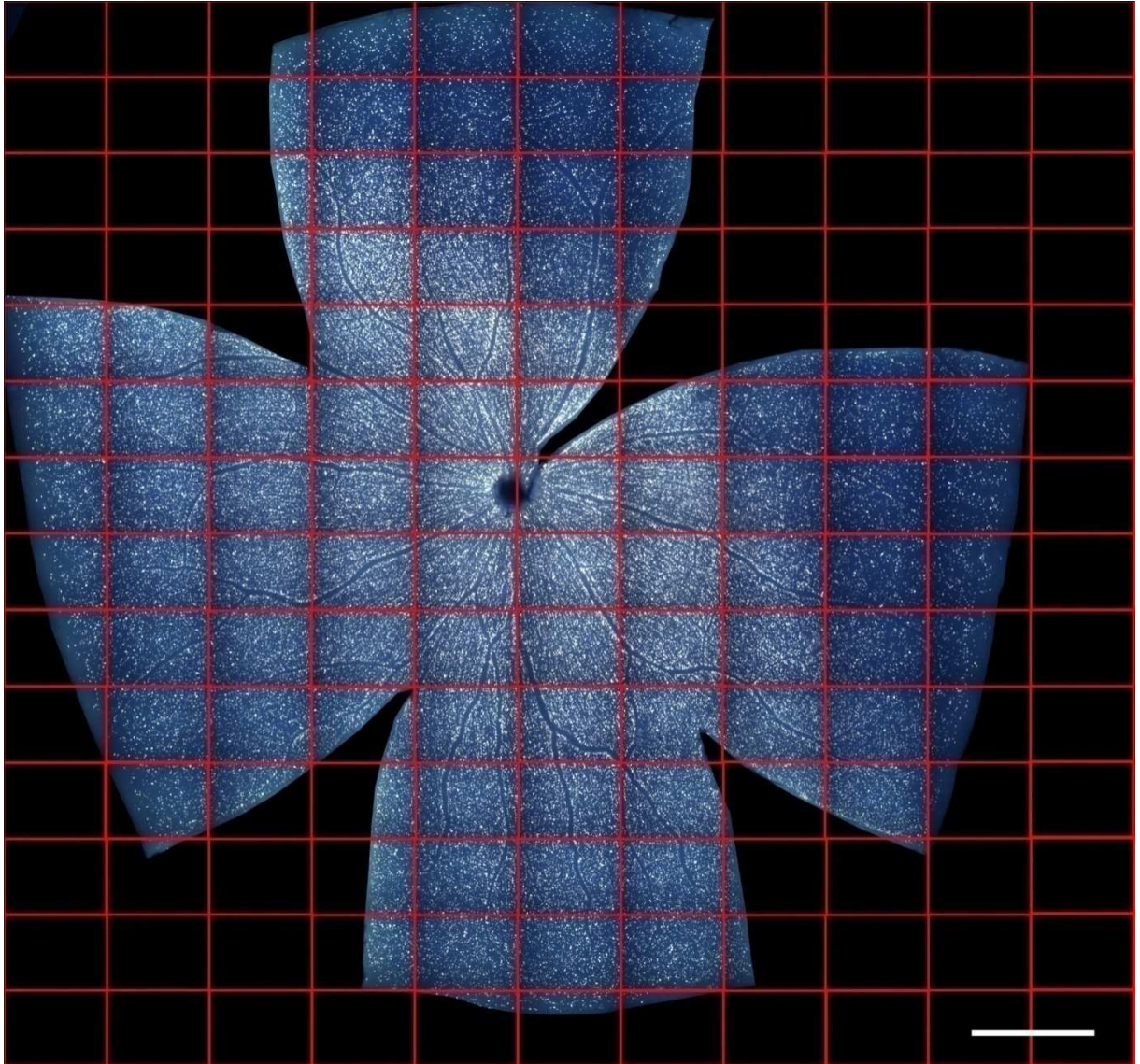


Figura 13. Imagen de un fotomontaje de una retina representativa montada a plano de rata. Creada por la combinación automática por el programa de análisis de imagen (IPP), de cada imagen digital individual obtenida de cada área de captura individual de la retina. Hay 154 imágenes individuales, organizadas en 14 imágenes en columnas y 11 imágenes en filas. Antes de la captura de cada imagen individual se enfoca manualmente con el objetivo de 10x. Las imágenes individuales son capturadas contiguamente sin huecos y sin superposición, siguiendo un patrón de escaneo. Esta retina esta horientada de modo que el polo superior se encuentra entre la 1 y las 2 horarias. Barra de escala: 1mm.

3.11.1. PROCESADO AUTOMÁTICO DE LAS IMÁGENES INDIVIDUALES

3.11.1.1. Contaje automático de las CGR-FG⁺ y las CGR-OHSt⁺

El conteo automático se hizo utilizando el lenguaje de macros del programa de análisis de IPP, que mediante las subrutinas informáticas específicas lanza ordenadamente una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada imagen individual digital que permiten la cuantificación de las CGR trazadas que hay en cada una de las 154 o 140 imágenes individuales que forman una retina. Los datos de todas las imágenes correspondientes a una retina se transfieren después a una hoja de

cálculo (Microsoft® Office Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) para su posterior análisis. Se desarrollaron subrutinas específicas para las CGR-FG⁺ y las CGR-OHSt⁺ en rata y ratón respectivamente (Salinas-Navarro y cols., 2009a, b), y ambas están compuestas básicamente por los mismos pasos, que son los siguientes:

Inicialmente, las imágenes individuales en color fueron transformadas a una escala de grises de 8-bit para descartar la información de color. Las aberraciones de iluminación causadas por la óptica del microscopio fueron corregidas por el filtro de mejora del aplanado. Seguidamente se aumentó los bordes de las células utilizando el filtro espectro grande, el cual resalta las células teñidas de fluorescencia brillantes del fondo oscuro. Los pequeños artefactos y el ruido se quitaron mediante tres pasos del filtro de mejora de la mediana. Los grupos de células cuyos bordes se tocan fueron separados por el filtro de separación, que primero erosiona los bordes de las células que se están tocando hasta que se separan y luego los vuelve a dilatar pero sin llegar a tocarse.

Finalmente, las células de cada imagen fueron contadas usando unos parámetros predeterminados para excluir los objetos que sean más grandes que 300µm² o más pequeños que 7µm². Estos parámetros corresponden al objeto individual más grande y más pequeño marcado retrógradamente identificado como CGR. Finalmente, cada conteo fue exportado a una hoja de cálculo (Fig. 14).

3.11.1.2. Contaje automático de las CGR-Brn3a⁺

Al igual que el contaje automático de las CGR trazadas retrógradamente, a cada imagen individual digital en la que se había inmunodetectado los núcleos de las CGR, se le aplicó una secuencia de filtros y transformaciones utilizando el lenguaje macro del programa de análisis de imagen IPP. En las imágenes transformadas se contaron las CGR-Brn3a⁺ y se transfirieron los datos a una hoja de cálculo, para su posterior análisis. Se desarrollaron subrutinas específicas para el contaje de los núcleos de las CGR-Brn3a⁺ en rata y ratón respectivamente (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011), pero básicamente están compuestas de los mismos pasos.

Inicialmente la imagen individual se procesa usando el filtro HiGauss que resalta los núcleos positivos, posteriormente se aplica el filtro LoPass que normaliza las variaciones de fondo y luego de nuevo el filtro HiPass. Los grupos de núcleos fueron separados por el filtro de separación para poder diferenciarlos como objetos independientes. Los núcleos de cada imagen fueron contados utilizando unos parámetros predeterminados para excluir los objetos que en función de su tamaño no pueden ser núcleos-Brn3a⁺. Finalmente, cada contaje automático fue exportado a una hoja de cálculo.

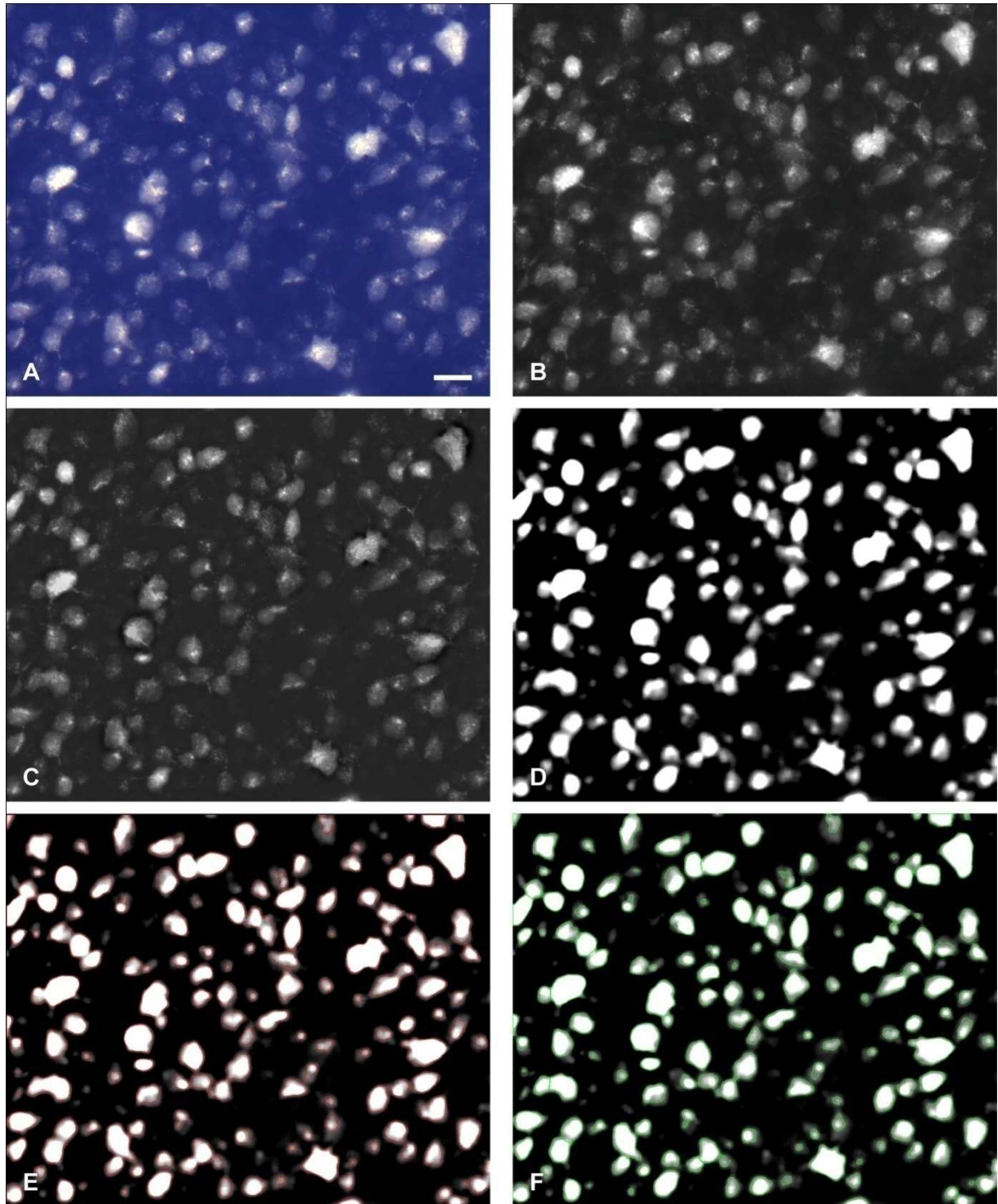


Figura 14. Esquema de los diferentes pasos de las subrutinas para el conteo automático de las células ganglionares de la retina marcadas retrógradamente con OHSt (CGR-OHSt⁺) en ratón. A: imagen digital de la región media de una retina representativa montada a plano de ratón. Se observa en alta magnificación las CGR trazadas con OHSt aplicado en ambos CS una semana antes del procesado del animal. Tiene 154 CGR-OHSt⁺ contadas manualmente. Para el conteo automático primero se convierte la imagen en color en una imagen de escala de grises de 8 bit (**B**). Por el filtro de mejora del aplanado se corrigen las aberraciones de iluminación (**C**). Por el filtro del espectro grande se resaltan las células brillantes del fondo oscuro y mediante tres pasos del filtro de mejora de la mediana se quitan los pequeños artefactos y el ruido (**D**). Contaje de las células mediante la función de contar (**E**). Los grupos de células que se tocan fueron separados por dos pasos del filtro morfológico de separación (**F**) y las células fueron recontadas. Barra de escala: 20µm.

3.12. CONTAJE MANUAL DE LAS CGR-DTMR⁺

Para investigar si después de la FL las CGR desprovistas de TAR aún mantienen su axón competente a nivel de la cabeza del NO, se realizó un trazado doble de las CGR controles y experimentales, aplicando FG en los CS (transporte activo) y, 2-3 días antes del sacrificio, DMTR (transporte pasivo) en la cabeza del NO. En estas retinas se realizó una cuantificación manual de CGR-FG⁺ y/o DMTR positivas. Se adquirieron al azar 20 imágenes individuales de 4 retinas controles y 63 imágenes digitales de regiones afectadas por la HTO de 4 retinas experimentales examinadas a 14d después de la FL, momento en el que habíamos observado un descenso significativo de CGR-FG⁺. Se contaron manualmente de forma enmascarada las CGR-DTMR⁺ y CGR-FG⁺ de cada imagen digital.

3.13. CONTAJE SEMIAUTOMÁTICO DE LOS SOMAS DE LAS CGR-pNFH⁺

La expresión aberrante de la pNFH en los somas de CGR inmunodetectadas por el anticuerpo monoclonal RT97 (CGR-RT97⁺) es indicativo de degeneración axonal (*Parrilla-Reverter y cols., 2009b*), por lo que se identificó, cuantificó y estudió la distribución de la población de CGR-pNFH⁺ después de la FL.

Los fotomontajes de las retinas fueron examinados con alta magnificación y las CGR-pNFH⁺ fueron identificadas con un punto de diferente color según la intensidad de la inmunorreactividad del RT-97 utilizando el programa para editar imágenes Adobe® Photoshop® CS ver. 8.0.1 (Adobe System Inc., San Jose, CA, USA).

Mediante una subrutina creada por el IPP contamos el número de CGR-pNFH⁺ y su distribución dentro de cada retina (*Parrilla-Reverter y cols., 2009b*).

En rata, contamos las CGR-pNFH⁺ en retinas experimental (n=10) así como en sus retinas controles (n=10) del subgrupo de retinas analizadas a 21 días después de la FL. En ratón fueron contadas las CGR-pNFH⁺ en 5 retinas experimentales y en 5 retinas control analizadas a los 17 días después de la FL. Estos intervalos de supervivencia fueron elegidos para el estudio de las CGR-pNFH⁺ porque se ha mostrado en ratas que el número mayor de CGR-pNFH⁺ se da entre dos y tres semanas después de la axotomía (*Parrilla-Reverter y cols., 2009b*).

Finalmente se comparó la distribución de las CGR-pNFH⁺ con las CGR-FG⁺ o CGR-OHSt⁺ dentro de las mismas retinas mediante sus mapas de isodensidad (*Parrilla-Reverter y cols., 2009b*).

3.14. ÁREA DE LA RETINA Y DENSIDAD MEDIA DE LAS CGR

Las áreas totales de las retinas fueron medidas en los fotomontajes de las retinas de alta resolución por medio del programa IPP, se aplicó la correspondiente calibración espacial de 10x o de 20x si se trata de rata o ratón respectivamente.

La densidad media de las CGR en las retinas se obtuvo dividiendo el número total de CGR por el área total de cada retina.

3.15. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

La distribución detallada de la totalidad de las CGR en la retina fue analizada inicialmente por los mapas de densidad que fueron mejorando su resolución hasta la construcción de los mapas de isodensidad.

3.15.1. MAPAS DE DENSIDAD

El primer mapa de densidad se basa en la densidad de CGR-FG⁺ que hay en cada imagen individual digital capturada desde el área de captura individual, según su valor se le asignó un color dentro de una escala de colores de 16 pasos que comprende un rango de valores que va desde 0 (azul oscuro) hasta 3.000 o más CGR/mm² (rojo).

Para calcular la densidad de CGR-FG⁺ en cada imagen individual, se calculó el número de CGR-FG⁺ mediante la subrutina para el conteo automático de células del IPP descrita y se midió el área de la retina que hay en la imagen individual. Según el valor de la densidad se le asignó un color dentro de la escala de colores y utilizando el programa para editar imágenes se colorearon manualmente. Posteriormente, se construyó el fotomontaje de la retina con las imágenes individuales coloreadas. Con esta primera aproximación se observó un área de alta densidad de CGR en la retina dorsal (**Fig. 15C**).

A este mapa de densidad inicial se le aumentó la resolución por la división de cada imagen individual en cuatro áreas de interés (ADI: las áreas en las que se divide cada imagen individual) rectangulares de igual tamaño y se calculó manualmente la densidad de cada una de las ADI y se les asignó un color como se describe previamente (**Fig. 15D**). Se aprecia mejor la distribución del área de alta densidad de CGR en la retina dorsal.

3.15.2. MAPAS DE ISODENSIDAD

Para poder estudiar con más detalle la distribución de las CGR en la retina se realizaron mapas de isodensidad.

Desarrollamos una subrutina utilizando el lenguaje macro del IPP para realizar los mapas de isodensidad, primero se divide cada imagen individual en áreas de interés (ADI) de igual tamaño (64 o 36 ADI en rata o ratón respectivamente). En cada ADI, mediante la subrutina para el conteo automático de células descrita previamente se obtiene el número de CGR-FG⁺ o CGR-OHSt⁺ y automáticamente se calcula la densidad de CGR-FG⁺ o CGR-OHSt⁺ para cada ADI. Los valores de las densidades de todas las ADI de la retina se exportaron a una hoja de cálculo y utilizando la opción gráfico trazado de contornos rellenos del programa para hacer gráficos Sigmaplot® (SigmaPlot 9.0

para Windows®, Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA) se construyeron mapas de isodensidad coloreados (**Fig. 15E**), en una escala de colores con 45 pasos diferentes con un rango de valores que va desde 0 hasta 3.500 o más CGR/mm² o desde 0 a 5.625 o más CGR/mm², en rata y ratón respectivamente. El límite superior se calculó de la media de las densidades más altas de los animales analizados en estudios preliminares. Para los mapas de isodensidad de las CGR ipsilaterales marcadas retrógradamente con FG (CGRip-FG⁺) estudiadas en rata, se utiliza una escala de colores de 7 pasos diferentes con un rango de valores que va desde 0 a 900 o más CGRip/mm².

Los mapas de isodensidad para las CGR-Brn3a⁺ se realizaron de la misma forma que para las CGR trazadas retrógradamente, pero se utilizó la subrutina de contajes de núcleos marcados con Brn3a para cada ADI y se dividió cada imagen individual en 64 y 25 ADI en rata y ratón, respectivamente.

En las imágenes individuales del contorno de la retina no están completamente ocupados por tejido retiniano por lo que se comete un pequeño error en el cálculo de las densidades de las ADI que es mínimo debido al alto número y pequeño tamaño del ADI y por la ausencia de CGR en la retina periférica.

Para validar los mapas de isodensidad, invertimos los cálculos realizados para cada ADI en la construcción de los mapas de isodensidad (la densidad del ADI = número de CGR/ADI), obteniendo tan sólo un error del 4% respecto al número total de CGR contado automáticamente, por lo que los mapas de isodensidad son válidos para la representación fidedigna de la distribución de las CGR.

3.16. VALIDACIÓN DEL CONTAJE AUTOMÁTICO

3.16.1. CGR-FG⁺ Y CGR-OHSt⁺

Para validar el método del conteo automático, cuatro investigadores experimentados diferentes contaron manualmente y de forma ciega imágenes aleatorias y tomadas a distintas excentricidades de retinas control, contándose un total de 35.070 CGR-FG⁺ (40 imágenes individuales) y 26.606 CGR-OHSt⁺ (41 imágenes individuales) de rata y ratón, respectivamente (n=4 retinas por especie). Después, estas mismas imágenes se contaron automáticamente.

Se representó gráficamente en el eje de ordenadas los contajes automáticos y en el eje de abscisas los contajes manuales y se calculó la relación lineal entre ambos métodos de conteo mediante el coeficiente de correlación de Pearson (R²) que dio un resultado de R²=0,997 y R²=0,995 en rata y ratón respectivamente, validando por tanto el conteo automático.

El criterio utilizado para identificar y contar manualmente las CGR-FG⁺ o con CGR-OHSt⁺ ha sido descrito en detalle anteriormente (*Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 1996; Vidal-Sanz y cols., 2001; Lafuente y cols., 2002a, Lafuente López-Herrera y cols., 2002*).

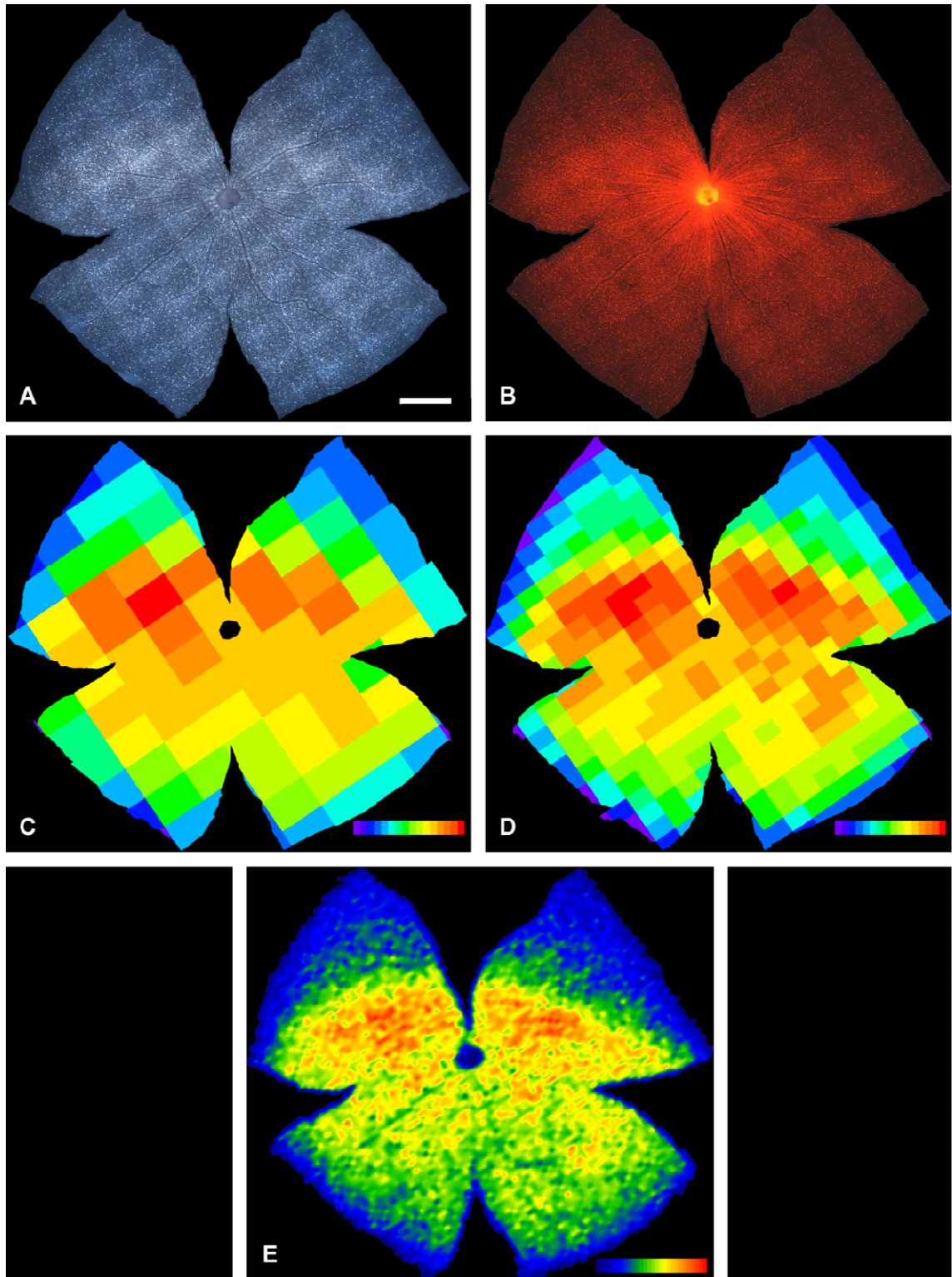


Figura 15. Distribución de la totalidad de la población de CGR-FG⁺ en rata. Fotomontaje de una retina representativa derecha de rata SD mostrando las CGR doblemente marcadas con FG (A) aplicado en ambos CS 7 días antes del procesado y con DTMR (B) aplicado en el MNO 5 días después, la zona con más alta densidad se distribuye a lo largo de una estría naso-temporal, en la retina dorsal. Veremos la evolución en la representación de la distribución de las CGR por aumento de la resolución teniendo representaciones cada vez más detalladas. Mapa de densidad de esta misma retina, generado por la asignación a cada imagen individual (C) o a cada una de las cuatro subdivisiones de cada imagen individual (D) de un color según su valor de densidad en una escala de colores con 16 pasos, con un rango de valores que va desde

0 (violeta) a 3.000 o más CGR/mm² (rojo), en estos mapas de densidad se vislumbra esta región de alta densidad celular. Mapa de isodensidad (E) representado por un gráfico trazado de contornos rellenos donde asignamos a cada una de las 64 áreas de interés (ADI) en las que se divide cada imagen individual un color según el valor de la densidad de CGR, en una escala de colores de 28 pasos diferentes, con un rango de valores que va desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm² (rojo), donde se aprecia detalladamente esta región de alta densidad. En todas las retinas el polo dorsal está orientado a las 12 horarias. Esta retina tiene 76.390 CGR-FG⁺. Barra de escala: 1mm.

3.16.2. CGR-Brn3a⁺

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se valoró el conteo automático respecto al conteo manual de las CGR-Brn3a⁺, tanto en rata como en ratón, de igual manera a la descrita para las CGR trazadas. Se contaron manualmente 26.625 CGR-Brn3a⁺ en 21 imágenes individuales diferentes de 6 retinas control intactas en rata y 13.162 CGR-Brn3a⁺ de 20 imágenes diferentes de 5 retinas control intactas en ratón. Se obtuvo una correlación positiva entre ambos métodos de conteo cercana al 1 ($R^2 = 0,98$, en rata y ratón) (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011) que valida la cuantificación automática de las CGR-Brn3a⁺.

3.17. ESTADÍSTICA

Los datos se presentan como la media±desviación estándar (MEDIA±DE).

Para el análisis estadístico se utilizaron los test no paramétricos de ANOVA (Statistix[®] V1.0 para Windows[®] 95, Analytical Software, Tallahassee, FL, USA), el test de Mann-Whitney y el test de Kruskal-Wallis para comparar dos o más grupos, respectivamente. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando la $p < 0,05$.

Para la validación del conteo automático se utilizó el test de correlación de Pearson (SigmaStat[®] para Windows[®] Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA).

Algunas retinas izquierdas o derechas se perdieron o se dañaron en el procesamiento del tejido, lo que explica la disparidad entre el número de retinas derechas e izquierdas en algunos subgrupos de animales.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

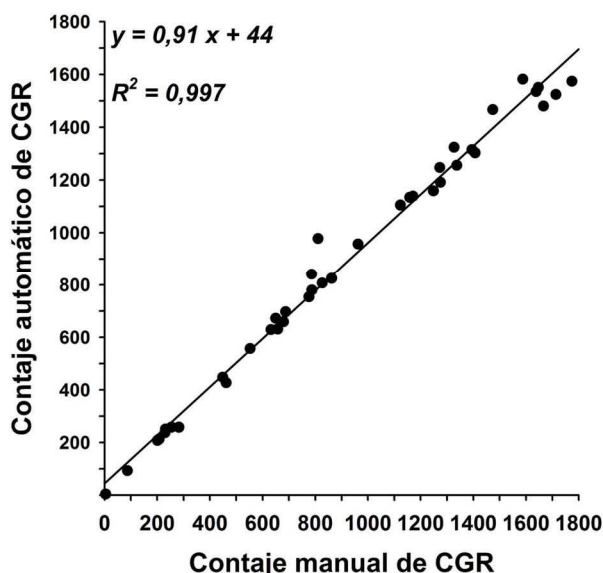
4.1.1. VALIDACIÓN DEL CONTAJE AUTOMÁTICO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

4.1.1.1. Cuantificación de las CGR trazadas retrógradamente con FG u OHSt

La precisión del contejo automático de las CGR-FG⁺ en rata y las CGR-OHSt⁺ en ratón se valoró comparando los resultados del contejo automático de diferentes imágenes individuales seleccionadas al azar, con los resultados del contejo manual de las mismas imágenes realizados por cuatro investigadores expertos de manera ciega.

En la **figura 16** se representa gráficamente esta comparación, en el eje de ordenadas los valores obtenidos de los contejos automáticos y en el eje de abscisas los de los contejos manuales. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (R^2) entre ambos métodos de contejo y se obtuvo una correlación lineal positiva casi perfecta entre los contejos obtenidos por ambos métodos, tanto en rata ($R^2=0,997$) (**Fig. 16A**) como en ratón ($R^2=0,995$) (**Fig. 16B**). Este valor de correlación valida la cuantificación automática de las CGR trazadas retrógradamente, por lo que disponemos de una herramienta reproducible, rápida y precisa para contar la totalidad de las CGR tanto en rata o en ratón.

A: RATA



B: RATÓN

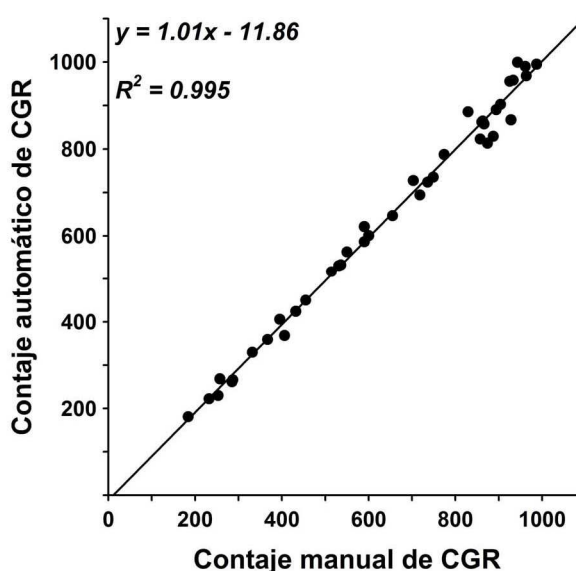


Figura. 16. Correlación entre el contejo automático y el contejo manual de las CGR trazadas retrógradamente, tanto en rata (A) como en ratón (B). Para la validación del contejo automático respecto al manual, se representó gráficamente en el eje de ordenadas los resultados obtenidos en el contejo automático y en el eje de abscisas los resultados obtenidos en el contejo manual, para cada imagen individual. En este gráfico se representa la línea de correlación (que es la línea que mejor se ajusta a los datos), la ecuación y el coeficiente de correlación.

4.1.1.2. Cuantificación de las CGR inmuno-identificadas por su expresión de Brn3a

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se valoró el conteo automático respecto al conteo manual de las CGR-Brn3a⁺, tanto en rata como en ratón, comparando los resultados obtenidos por el método automático con los obtenidos manualmente por 3 investigadores expertos de manera ciega. Obteniéndose una correlación positiva muy fuerte entre ambos métodos de conteo tanto en rata ($R^2=0,98$) (Nadal-Nicolás y cols., 2009) como en ratón ($R^2=0,98$) (Galindo-Romero y cols., 2011), que valida la cuantificación automática de las CGR-Brn3a⁺.

4.1.2. POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

Según el sitio de aplicación del trazador neuronal en la vía visual primaria podemos estudiar la población de CGR retinotectal o retinofugal, cuando se aplica el neurotrazador en el MNO proximal intraorbitario se identifica la población de CGR que constituye la proyección retinofugal y cuando se aplica en ambos CS, la población de CGR que constituye la proyección retinotectal.

Mediante la aplicación del trazador neuronal (FG u OHSt) en el MNO proximal intraorbitario o en ambos CS, se observan las CGR de la retina marcadas con la típica fluorescencia blanca, granular y difusa que delinea el soma y ocasionalmente las dendritas primarias (Fig. 8) (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 1996; Vidal-Sanz y cols., 2001; Lafuente López-Herrera, y cols., 2002).

Cuando se enfoca la capa nuclear interna de la retina, se observa un pequeño número de CGR desplazadas marcadas con el trazador fluorescente (FG u OHSt) llamadas células de Dogiel (Dogiel, 1988), que suponen aproximadamente el 0,35% de la población de CGR de rata y que no han sido tenidas en cuenta en el presente estudio.

4.1.2.1. Población retinofugal de CGR

Aplicación del trazador neuronal en el NO seccionado

La media±desviación estándar (DE) del número total de CGR retinofugales identificadas desde el MNO fue de 82.818±3.949 (n=27) y 89.241±3.576 (n=6) para las retinas de ratas albinas SD o pigmentadas PVG respectivamente (Fig. 17A). El número total de CGR retinofugales en rata pigmentada PVG es un 7,2% mayor que en rata albina SD (Mann-Whitney test, p=0,0035). No hubo diferencias significativas entre el número total de CGR retinofugales obtenidas en las retinas derechas cuando las comparamos con sus contralaterales izquierdas ni en la cepa albina SD (Mann-Whitney test, p=0,396) ni en la cepa pigmentada PVG (Mann-Whitney test, p=0,7).

La media±DE del número total de CGR retinofugales identificadas desde el MNO fue de 49.493±3.936 (n =18) o 42.658±1.540 (n=10) para las retinas de ratón albino Swiss o pigmentado C57, respectivamente (Fig. 17B). El número total de CGR retinofugales en ratón albino Swiss es 13,8% mayor que el obtenido en pigmentado C57 (Mann-Whitney test, p≤0,001). No hubo diferencias significativas entre el número de CGR marcadas con OHSt obtenidas en las retinas derechas cuando

las comparamos con sus contralaterales izquierdas en ninguna de las cepas de ratones analizadas (*Mann-Whitney test*, $p=0,5962$ o $p=0,5309$, cepa albina y pigmentada, respectivamente).

En conclusión, las dos retinas de un animal individual tienen un número total de CGR retinofugales comparable. Sin embargo, en ratas, la estirpe pigmentada tiene un número significativamente mayor de CGR retinofugales que la albina, mientras en ratones ocurre al contrario.

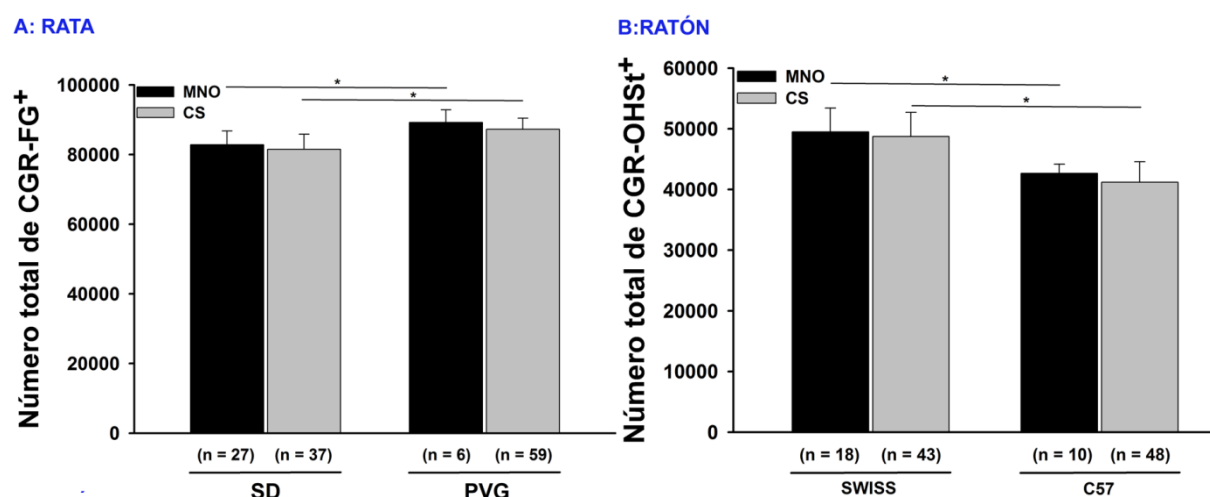


Figura 17. Población de CGR retinofugal y retinotectal trazadas retrógradamente desde el muñón del nervio óptico y desde el tectum en rata (A) y en ratón (B). Histogramas donde se representa el número total de CGR trazadas retrógradamente desde el muñón del nervio óptico (MNO) o desde los colículos superiores (CS) en dos estirpes de rata, albina (SD) y pigmentada (PVG) (A), y en dos estirpes de ratón, albino (Swiss) y pigmentado (C57) (B). Se observa que dentro de la misma estirpe tanto en rata como en ratón, es mayor la población de CGR-FG⁺ retinofugal que retinotectal, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. Sin embargo, si son estadísticamente diferentes las poblaciones de CGR, tanto retinofugales como retinotectales, entre ambas cepas de cada especie. (*Mann-Whitney test*, * ($p < 0,05$))

Aplicación del trazador en el NO sin seccionar

La media $\pm$ DE del número total de CGR retinofugales identificadas desde el NO intraorbitario sin seccionar en las retinas de ratas SD fue de 85.063 ± 1.330 ($n=5$). Al igual que cuando el trazador se aplicaba en el muñón del nervio óptico (MNO), no hubo diferencias significativas entre el número de CGR contadas en ambos ojos (*Mann-Whitney test*, $p=0,8$).

Cuando se compararon estos resultados con los obtenidos al aplicar el FG en el MNO, se observó que con ambos métodos el número de CGR trazadas era comparable (*Mann-Whitney test*, $p=0,132$).

4.1.2.2. Población retinotectal de CGR

En ratas, la media $\pm$ DE del número total de CGR-FG⁺ retinotectales identificadas desde ambos CS fue 81.486 ± 4.340 ($n=37$) y 87.229 ± 3.199 ($n=59$) para las retinas de la estirpe albina SD y pigmentada PVG respectivamente (Fig. 17A). Ni en la estirpe albina ni en la pigmentada hubo

diferencias significativas entre el número total de CGR-FG⁺ contadas en las retinas derechas e izquierdas (*Mann-Whitney test*, $p=0,338$ y $p=0,897$, SD y PVG respectivamente). Sin embargo, en la estirpe de rata pigmentada el número total de CGR retinotectales es un 6,6% mayor que en la albina (*Mann-Whitney test*, $p=0,0000$).

En ratón, la media $\pm$ DE del número total de CGR-OHSt⁺ retinotectales identificadas desde ambos CS fue 48.733 ± 3.957 ($n=43$) y 41.192 ± 3.395 ($n=42$), para las retinas de la estirpe albina Swiss o pigmentada C57, respectivamente (**Fig. 17B**). Al igual que se observó en rata, ni en los ratones albinos ni pigmentados hubo diferencias significativas entre el número de CGR-OHSt⁺ retinotectales contadas en las retinas derechas e izquierdas (*Mann-Whitney test*, $p=0,9129$ y $p=0,1249$, Swiss y C57, respectivamente). Sin embargo, el número total de CGR retinotectales en ratones albinos Swiss es 15,5% mayor que en ratones pigmentados C57 (*Mann-Whitney test*, $p\leq0,001$).

En conclusión, las dos retinas de un animal individual tienen un número total de CGR retinotectales comparable. Sin embargo, en rata, la estirpe pigmentada tiene un número significativamente mayor de CGR retinotectales que la albina, mientras en ratones ocurre al contrario.

4.1.2.3. Proporción de la población de CGR retinofugal que proyecta al tectum

En ratas SD, aproximadamente el 1,6% de la población de CGR identificada desde el MNO no proyectó a los CS, una diferencia que no fue estadísticamente significativa (*Mann-Whitney test*, $p=0,3588$). De modo parecido, en ratas PVG, aproximadamente el 2,2% de la población de CGR retinofugal no proyectó a los CS, una diferencia que tampoco fue estadísticamente significativa (*Mann-Whitney test*, $p=0,1438$) (**Fig. 17A**).

En ratones Swiss, aproximadamente el 1,5% de la población de CGR identificada desde el MNO no proyectó a los CS, una diferencia que no fue estadísticamente significativa (*Mann-Whitney test*, $p=0,5426$). De modo parecido, en los ratones C57, aproximadamente el 3,4% de la población de CGR retinofugal no proyectó a los CS, una diferencia que no fue estadísticamente significativa (*Mann-Whitney test*, $p=0,1066$) (**Fig. 17B**).

Estos hallazgos evidencian que, en el sistema retinofugal de roedores adultos, la proyección retinotectal es masiva.

4.1.2.4. Población retinotectal de CGR que proyectan ipsilateralmente y contralateralmente

En las retinas de rata se observaron CGR retinotectales que proyectan ipsilateralmente trazadas retrógradamente con FG (CGRip-FG⁺) de varios tamaños (**Fig. 18A**).

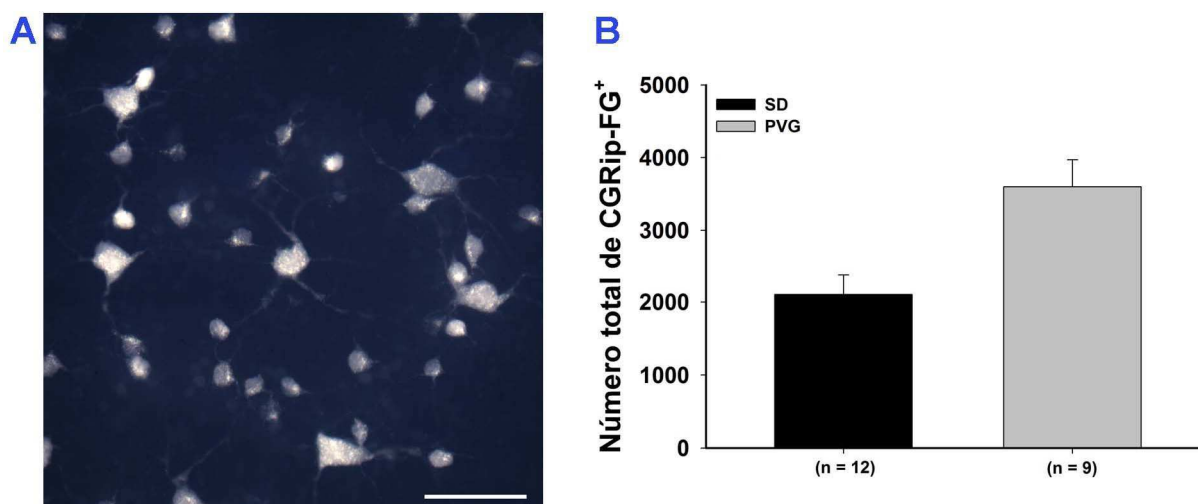


Figura 18. Población de CGR ipsilaterales marcadas retrógradamente con FG (CGRip-FG⁺) en rata albina (SD) y pigmentada (PVG). **A:** Imagen a alta magnificación que muestra las CGRip-FG⁺ en rata PVG, se observan CGRip-FG⁺ de varios tamaños. El animal fue procesado dos semanas después de la ablación del CS izquierdo y una semana después de la aplicación del FG en el CS derecho. **B:** Histograma que muestra el número total de CGRip-FG⁺ que hay en rata SD y en PVG. El número total de CGRip-FG⁺ en las ratas PVG es significativamente mayor que en las ratas SD (*Mann-Whitney test*, $p \leq 0,001$). Las CGRip-FG⁺ constituyen el 2,5% y el 4,2% de la población de CGR-FG⁺ retinotectales en ratas SD y PVG, respectivamente. Barra de escala: 50 μ m.

La media $\pm$ DE del número total de CGRip-FG⁺ contadas en las retinas derechas trazadas desde el CS derecho fue de 2.103 $\pm$ 270 (n=12) y de 3.600 $\pm$ 371 (n=9) en ratas SD y PVG respectivamente (**Fig. 18B**), siendo la diferencia entre ambas estirpes estadísticamente significativa (*Mann-Whitney test*, $p \leq 0,001$). Así, la población de CGRip-FG⁺ constituye el 2,5% y el 4,2% de la población de CGR-FG⁺ retinotectal en ratas SD y PVG, respectivamente.

En este mismo experimento, al contar las CGR retinotectales que proyectan contralateralmente trazadas retrógradamente con FG (CGRcn-FG⁺) en las retinas izquierdas (contralaterales), no se observó diferencia significativa entre ambas cepas, ya que su población total (media $\pm$ DE) fue de 81.805 $\pm$ 3.777 (n=12) y de 80.462 $\pm$ 3.915 (n=9) en ratas SD y PVG, respectivamente.

En conclusión, en ambas estirpes de rata el número total de CGRcn-FG⁺ es similar, mientras que la estirpe pigmentada tiene un número significativamente mayor de CGR retinotectales que proyectan ipsilateralmente.

Cabe destacar que los valores obtenidos fueron bastante consistentes entre las retinas de los grupos analizados.

4.2. DENSIDAD TOTAL DE CGR TRAZADAS RETRÓGRADAMENTE

Usando el programa IPP se midió el área de las retinas analizadas y con este dato se calculó la densidad media en las retinas de CGR retinotectales (trazado desde el CS) o retinofugales (trazado desde el MNO), en las dos estirpes de ratón y rata. En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos: áreas y densidades de CGR máximas y mínimas así como su media y DE.

Tabla 1. Tabla que presenta la máxima, mínima así como la media y desviación estándar ($\bar{X} \pm DE$) del área y la densidad de CGR de las retinas de las diferentes estirpes de ratas y ratones.

Especie	Estirpe	Trazado y n	Área (mm ²)			Densidad CGR (CGR/mm ²)		
			Máxima	Mínima	$\bar{X} \pm DE$	Máxima	Mínima	$\bar{X} \pm DE$
Rata	SD	CS (n=37)	57	45,6	51,3±3,1	1.927	1.304	1.594±118
		MNO (n=27)	55,2	44,2	49,3±2,3	1.911	1.489	1.681±97
	PVG	CS (n=59)	61,5	46,8	53,9±3,9	1.799	1.439	1.623±90
		MNO (n=6)	61,9	57,4	59,5±1,6	1.548	1.431	1.501±43
Ratón	Swiss	CS (n=43)	22,7	12,5	16±2,3	3.898	2.280	3.083±378
		MNO (n=18)	20,8	12,4	16±2,3	3.771	2.616	3.122±277
	C57	CS (n=42)	17	12,8	14,6±0,8	3.549	2.044	2.821±281
		MNO (n=10)	16,2	12,8	14,5±1	3.155	2.693	2.949±143

4.3. DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

4.3.1. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA TOTALIDAD DE LAS CGR RETINOTECTALES Y RETINOFUGALES

Al examinar las retinas en el microscopio de fluorescencia se observó que ni en rata ni en ratón, las CGR trazadas retrógradamente desde el CS se distribuían uniformemente dentro de la retina, habiendo en las zonas centrales densidades más altas que en las zonas periféricas (**Fig. 15A**). Además se observaba la presencia de una región con las densidades de las CGR más altas, que en la inmensa mayoría de los casos se localizaba en la retina superior, aproximadamente a 1mm del disco óptico extendiéndose a lo largo del eje naso-temporal.

Para descartar la posibilidad de que la región de alta densidad fuera resultado de un artefacto debido al marcaje retrógrado desde el CS, se realizó un grupo adicional de animales (n=12, ratas SD) que fueron doblemente marcadas con FG (aplicado en ambos CS, 7 días antes del procesado) y DTMR (aplicado en el MNO proximal derecho, 2 días antes del procesado). Al estudiar estas retinas observamos, con ambos trazadores, la región característica de alta densidad en la retina dorsal (**Fig. 15A, B**). Esta distribución sólo se aprecia cuando la práctica totalidad de las CGR está trazada. Este experimento demuestra que esta distribución espacial no es resultado de un artefacto del marcaje en el CS. El número medio±DE de CGR-FG⁺ en estas retinas derechas fue de 79.667±4.917 (n=12), comparable al del grupo de animales (ver 4.1.2.2) en el que las CGR de ambos ojos fueron marcadas desde el CS para el estudio de la población de CGR retinotectal (*Mann-Whitney test*, p=0,2498).

En los primeros mapas de densidad contruidos no se observaba claramente la distribución de las CGR (**Fig. 15C, D**). Sin embargo, al aumentar su resolución hasta crear mapas de isodensidad,

se confirmó la existencia de esta región de alta densidad que se observa aproximadamente a 1mm del disco óptico, extendiéndose horizontalmente a lo largo del eje naso temporal (**Fig. 15E**, colores cálidos naranjas-rojos), adoptando la forma de una estría visual, dentro de la cual los valores más altos se localizan en la zona superotemporal de la retina. Desde esta región de alta densidad, las densidades de CGR decrecen rápidamente hacia la periferia de la retina dorsal y ventral. Esta disminución es más pronunciada en la retina dorsal (**Fig. 15E**). Esta distribución se repite en rata y en ratón (**Fig. 19, 21, 22**), en la población de CGR retinofugales (**Fig. 20**) y es independiente de la herramienta utilizada para identificar las CGR (**Fig. 32A-D**).

En ratas, cuando el FG se aplica en ambos CS, la media $\pm$ DE de las densidades más altas en las áreas de interés (ADI) fue 3.579 $\pm$ 169 CGR/mm² (n=12) o 3.334 $\pm$ 167 CGR/mm² (n=29), en la estirpe albina o pigmentada, respectivamente. Si el FG se aplica en el MNO las densidades más altas son 3.809 $\pm$ 249 CGR/mm² (n=27) en ratas SD o 3.504 $\pm$ 245 CGR/mm² (n=6) en ratas PVG.

En ratones, al trazar con OHSt desde los CS, la media $\pm$ DE de las densidades más altas de las ADI fue 5.959 $\pm$ 495 CGR/mm² (n=43) o 5.851 $\pm$ 430 CGR/mm² (n=42) en ratones Swiss o C57, respectivamente. Si el OHSt se aplica en el MNO, esta media aumenta a 6.290 $\pm$ 605 CGR/mm² (n=18) o 6.352 $\pm$ 319 CGR/mm² (n=9) en la cepa albina o pigmentada, respectivamente.

La diferencia de los valores de densidad de las ADI obtenidos entre la retina central y periférica varía, pero en general hay un factor de 35-38 para ratones y de 33-34 para ratas.

4.3.2. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CGR DE PROYECCIÓN RETINOTECTAL IPSILATERAL EN RATA

Las células ganglionares de la retina retinotectales que proyectan ipsilateralmente trazadas retrógradamente con FG (CGRip-FG⁺) se distribuyen mayoritariamente en la periferia de la retina temporal adoptando la forma descrita anteriormente de luna creciente (*Drager y Olsen, 1980; Reese y Cowey, 1983; Dreher y cols., 1985*), aunque también hay CGRip-FG⁺ diseminadas por toda la retina. La densidad de CGRip-FG⁺ aumenta desde la zona inferior hasta la superior, localizándose superotemporalmente la región de más alta densidad de la luna creciente (**Fig. 23**).

La media de los valores más altos de densidad en las áreas de interés (ADI) es de 797 $\pm$ 91 (n=12) y 1.012 $\pm$ 151 (M $\pm$ DE, n=9), en ratas SD y PVG, respectivamente.

Las células ganglionares de la retina retinotectales que proyectan contralateralmente trazadas retrógradamente con FG (CGRcn-FG⁺) se distribuyen igual que la población de CGR retinotectales y retinofugales.

Una vez establecida la normalidad en cuanto al número y la distribución total de las CGR en dos estirpes de rata y de ratón, procedimos a poner a punto, en ambas especies, un modelo de hipertensión ocular con el fin de estudiar la respuesta de estas neuronas a este insulto y ahondar así en el conocimiento de la etiología de la neuropatía óptica glaucomatosa.

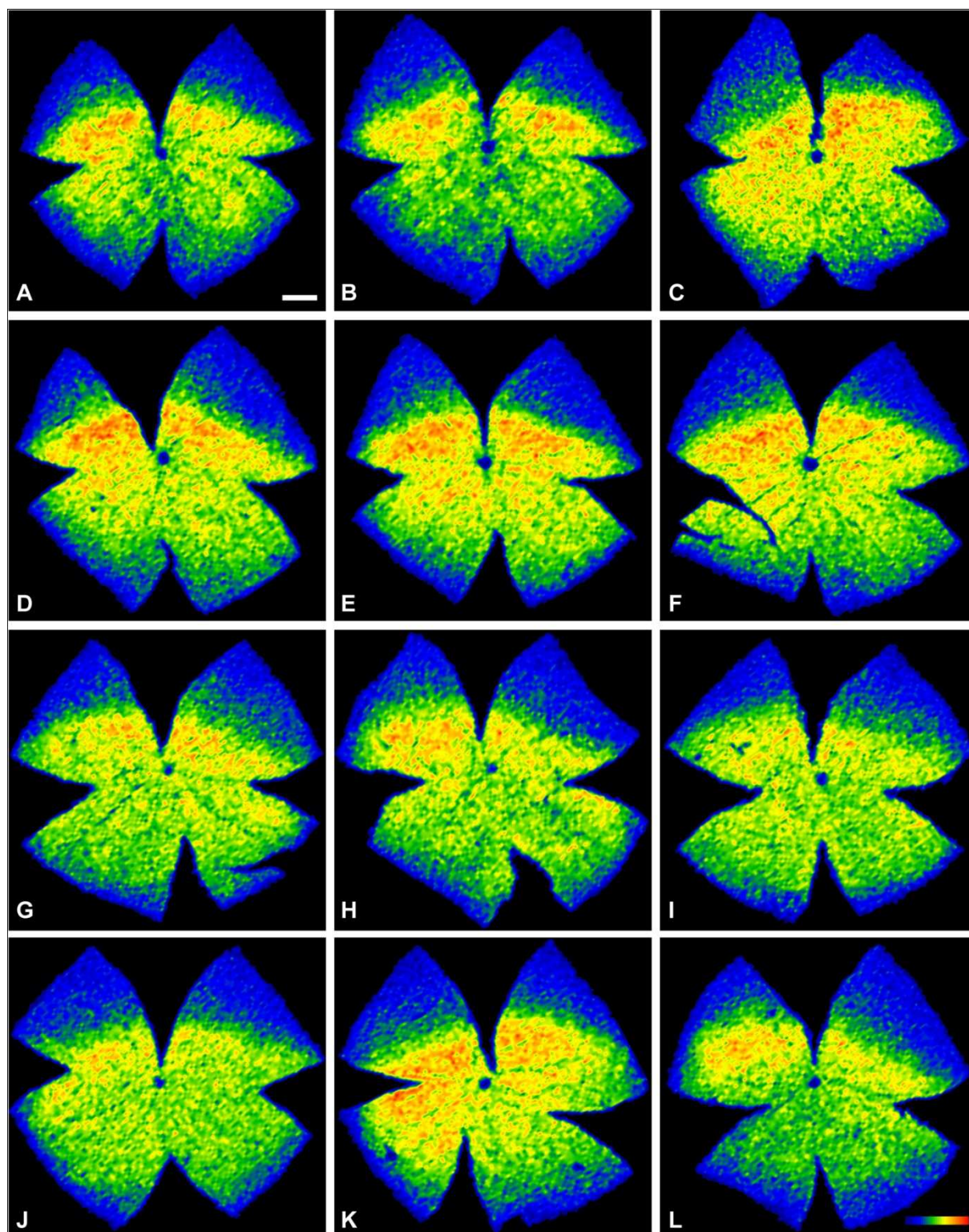


Figura 19. Mapas de isodensidad de las CGR-FG⁺ retinotectales en rata. Mapas de isodensidad de seis retinas derechas representativas de ratas SD (**A-F**) y de ratas PVG (**G** izquierdas y **H-L** derechas). El FG fue aplicado en ambos CS siete días antes del procesamiento del animal. La región con las densidades más altas está distribuida a lo largo de la una estría naso-temporal en la retina dorsal y, dentro de la estría, las áreas con más altas densidades se sitúan en la zona supero-temporal. Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Barra de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm² (rojo) (en **L**, inferior derecha). OD: ojo derecho, OI: ojo izquierdo.

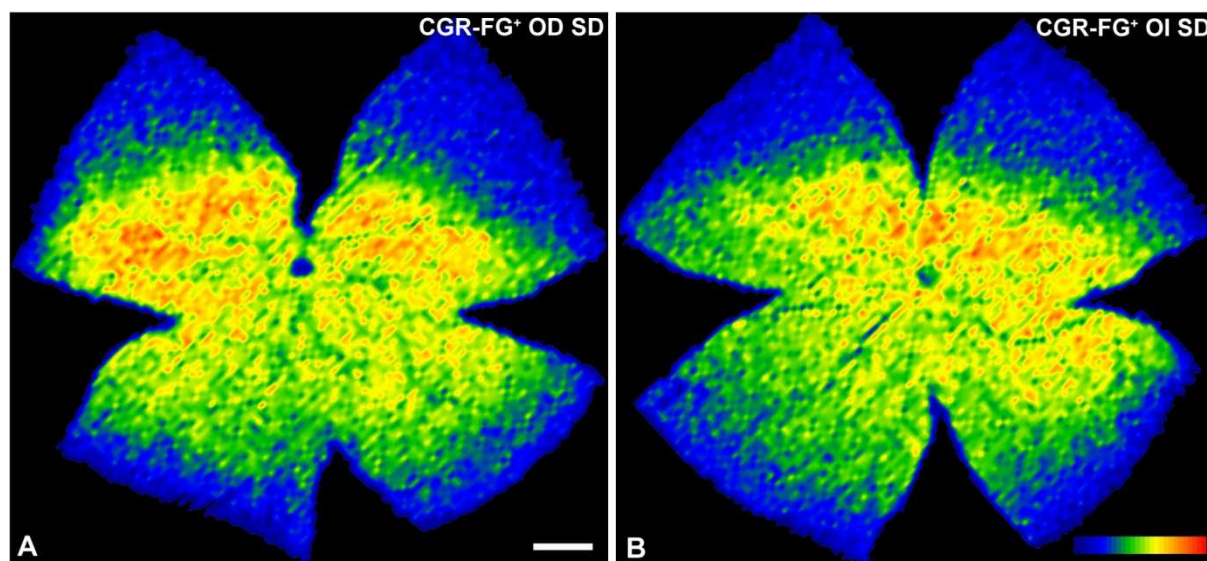


Figura 20. Mapas de isodensidad de las CGR-FG⁺ retinofugales en rata Mapas de isodensidad de la retina derecha (A) e izquierda (B) representativa de rata SD marcadas con FG aplicado en el MNO proximal intraorbitario seccionado 3 días antes del procesamiento del animal, mostrando la región con las densidades más altas distribuida a lo largo de la una estría naso-temporal en la retina dorsal, y dentro de la estría el área con más altas densidad se sitúan en la zona supero-temporal. Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Barra de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm² (rojo) (en B, inferior derecha). OD: ojo derecho, OI: ojo izquierdo.

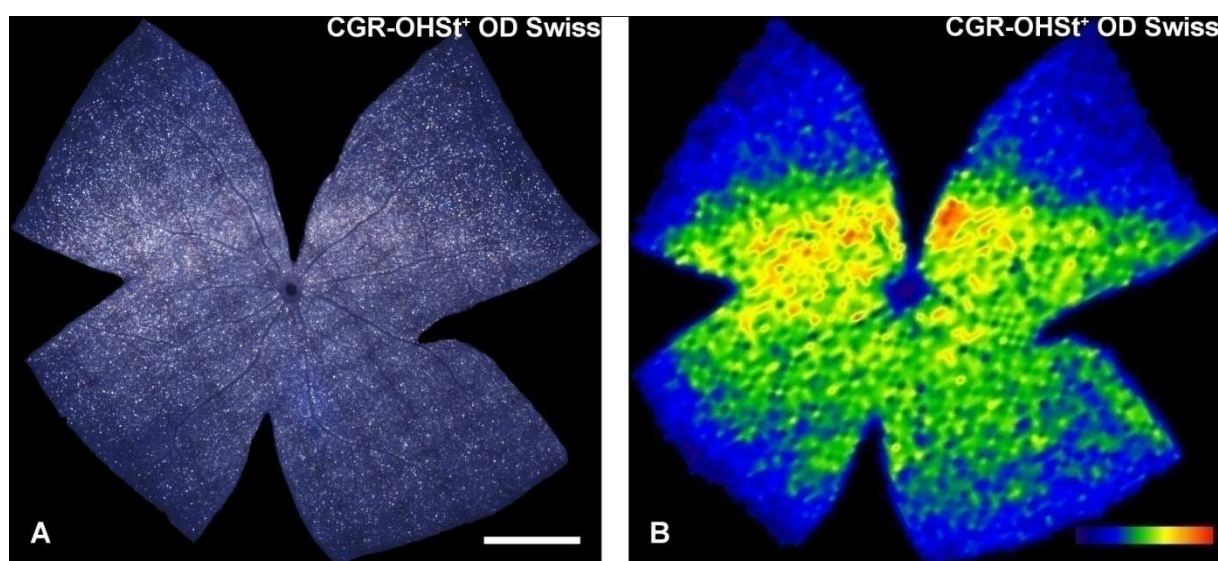


Figura 21. Distribución de la población de CGR-OHSt⁺ retinotectal en ratón. Fotomontaje a plano de una retina derecha representativa de ratón Swiss mostrando las CGR marcadas retrógradamente con OHSt aplicado en ambos CS una semana antes del procesamiento del animal (A) y su correspondiente mapa de isodensidad. (B). A: Las CGR están intensamente marcadas y distribuidas por toda la retina (A). Sin embargo en la zona dorsal, hay una región de alta densidad de CGR orientada a lo largo del eje naso-temporal. Esta estría se observa claramente en el mapa de isodensidad (B) que está construido asignando a cada una de las 36 ADI (que dividimos cada imagen individual) un color según el valor de su densidad dentro de un código de colores de 45 pasos diferentes que va desde 0 (azul oscuro) a 5.625 o más CGR/mm² (rojo) (en B, inferior derecha). Esta retina tiene 47.823 CGR-OHSt⁺. La retina está orientada con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Barra de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 5.625 o más CGR/mm² (rojo) (en B, inferior derecha). OD: ojo derecho.

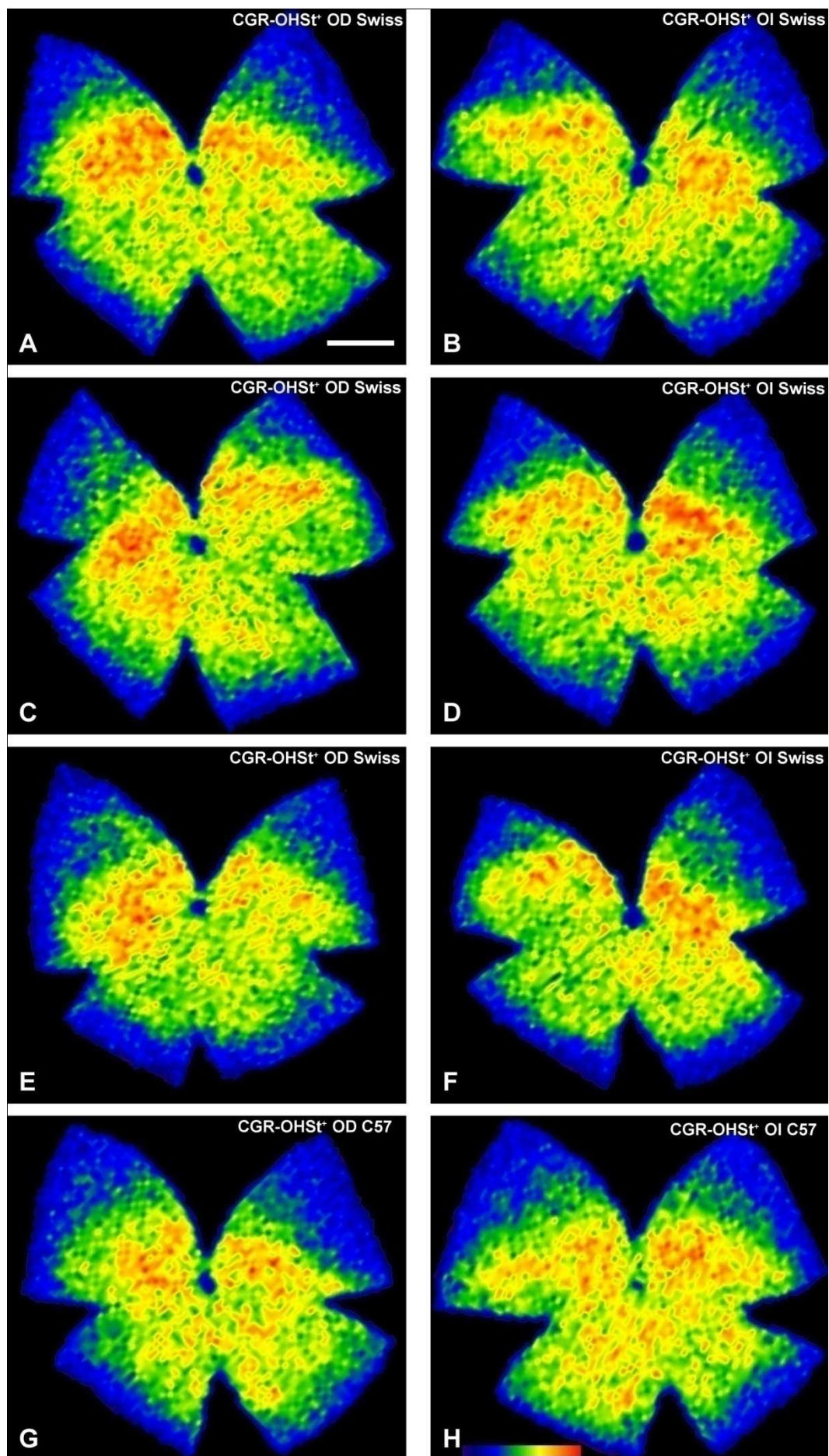


Figura 22. Mapas de isodensidad de las CGR-OHSt⁺ retinotectales en ratón. Mapas de isodensidad de retinas representativas derechas (columna de la izquierda, **A, C, E, G**) e izquierdas (columna derecha, **B, D, F, H**), de ratones Swiss (**A-B, C-D, E-F**) y C57 (**G-H**), en los que el OHSt fue aplicado en ambos CS una semana antes del procesamiento del animal. La región con las densidades más altas, se distribuye a lo largo de la una estría naso-temporal en la retina dorsal, y dentro de la estría las áreas con mas alta densidad se sitúan en la zona supero-temporal. Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Barra de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 5.625 o más CGR/mm² (rojo) (en **H**, inferior derecha). OD: ojo derecho, OL: ojo izquierdo.

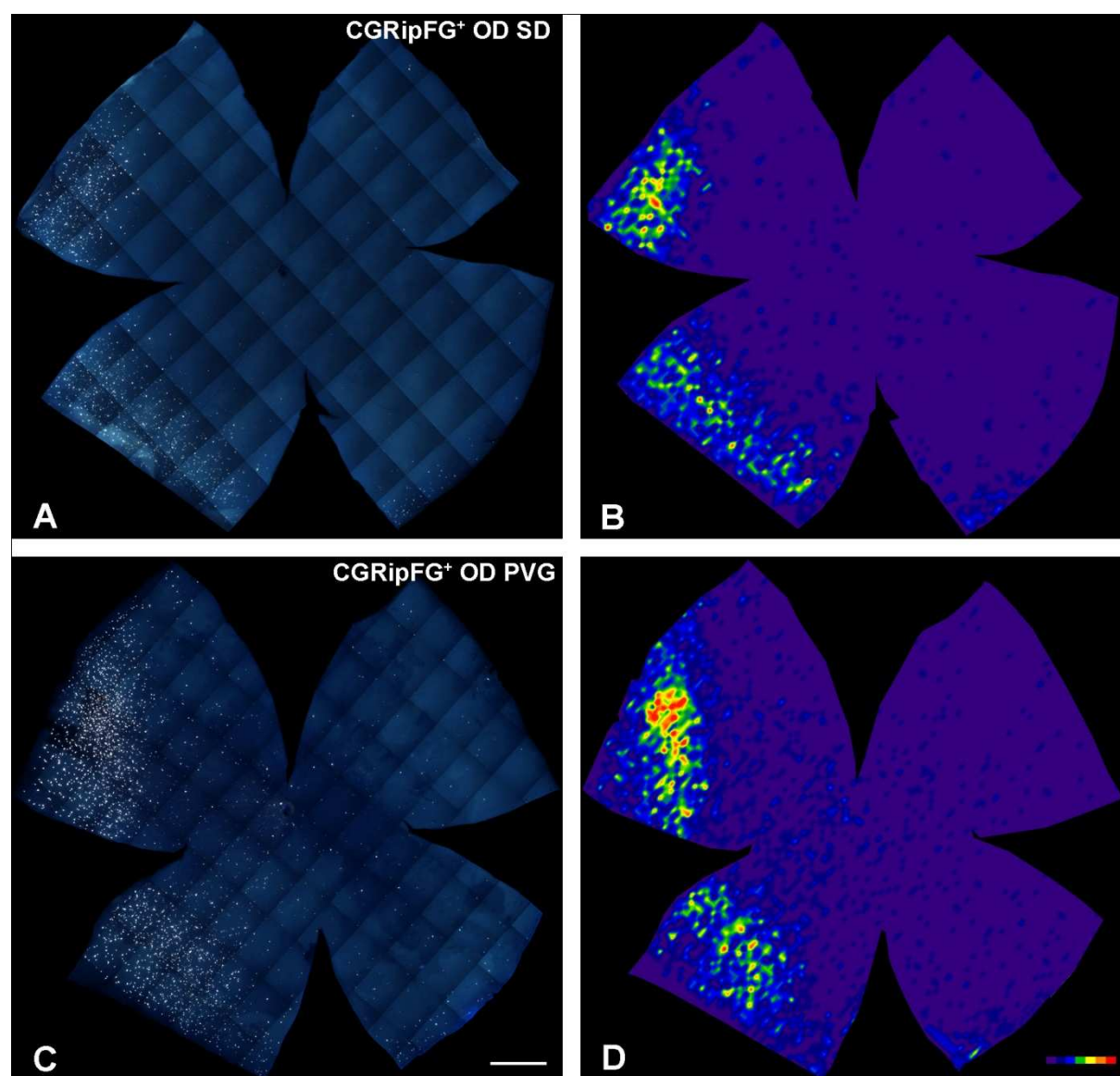


Figura 23. Distribución de la totalidad de las células ganglionares de la retina retinotectales que proyectan ipsilateralmente trazadas retrógradamente con FG (CGRip-FG⁺) en rata albina SD (A,B) y en pigmentada PVG (C,D). Fotomontaje a plano de una retina derecha representativa de rata SD (**A**) y de rata PVG (**C**), y sus correspondientes mapas de isodensidad donde se observa la distribución típica de las CGRip-FG⁺ en la periferia de la hemirretina temporal con la forma típica de luna creciente, donde la región de alta densidad se sitúa en el cuadrante superotemporal. Se observa que el número total de CGRip-FG⁺ en las retinas de las ratas PVG es superior al de las retinas de las ratas SD. Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Barra de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 900 o más CGR/mm² (rojo) (en **D**, inferior derecha). OD: ojo derecho.

4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE HTO EN ROEDORES

4.2.1. PUESTA A PUNTO DEL MODELO DE HIPERTENSIÓN OCULAR POR FOTOCOAGULACIÓN POR LÁSER

Se realizaron varios grupos experimentales preliminares tanto en rata y ratón albino, con el fin de determinar los parámetros adecuados que indujeran un aumento de la PIO sin producir la pérdida total de las CGR.

En rata se realizó un grupo experimental (grupo 1) para establecer el número de disparos láser necesario para producir un aumento de la PIO. Este grupo se dividió en dos subgrupos, subgrupo 1.1 y 1.2 que recibieron 65-70 u 85-90 disparos respectivamente. En el subgrupo 1.1 no hubo aumento de la PIO, mientras que en el 1.2 la PIO aumentó de forma consistente a una y dos semanas después de la FL (**Fig. 24A**).

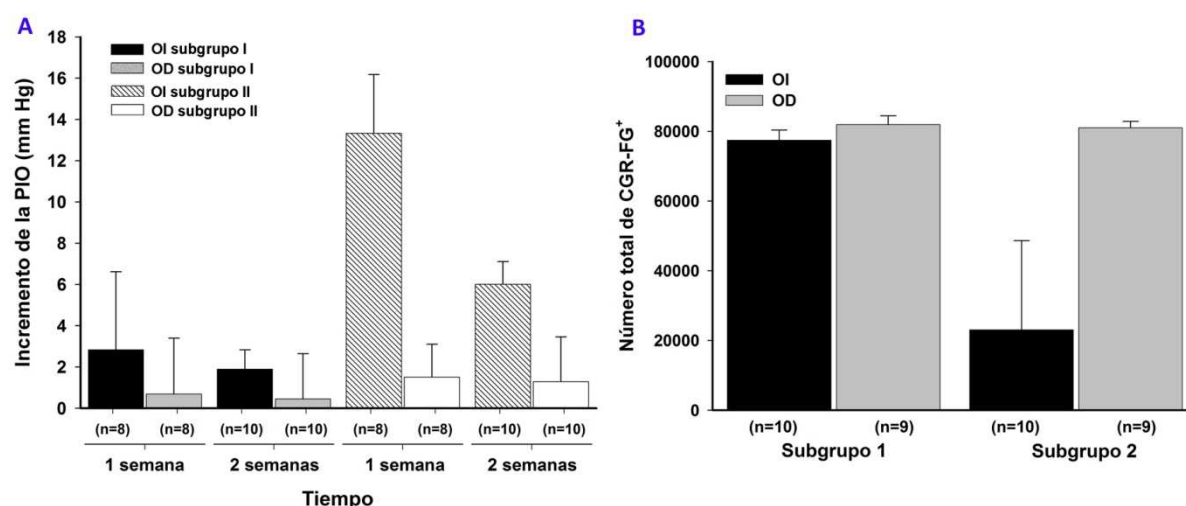


Figura 24. Efecto del incremento de la presión intraocular (PIO) en la población de las células ganglionares de la retina (CGR). **A:** Histogramas donde se representan la media ($\pm$ DE) del incremento de la PIO en los ojos izquierdo (OI) y los ojos derechos (OD) en los subgrupos 1 y 2, a una y dos semanas después del la fotocoagulación por láser del OI. El subgrupo 1 recibió un promedio de 65-70 disparos de láser y la PIO del OI no aumentó significativamente a 1 y 2 semanas. El subgrupo 2 recibió un promedio de 85-90 disparos de láser y hubo una elevación significativa de la PIO a 1 y 2 semanas. **B:** Histogramas donde se representa la media ($\pm$ DE) del número total de CGR trazadas retrógradamente con FluoroGold® (CGR-FG⁺) en las retinas izquierda y derechas tres semanas después de la fotocoagulación por laser del OI. Para identificar las CGR capaces del transporte axonal retrógrado, el FG fue aplicado en ambos colículos superiores (CS) una semana antes del procesado del animal. El número total de CGR-FG⁺ de los OI en el subgrupo 1 fue comparable con los encontrados en sus retinas contralaterales (OD) (*Mann Whitney test*, $p>0,05$). En el subgrupo 2, que mostró una elevación significativa de la PIO en sus OI, el número total de CGR-FG⁺ en el OI representa aproximadamente un cuarto del número total de CGR-FG⁺ en sus retinas contralaterales (OD) (*Mann Whitney test*, $p<0,001$).

El número total de CGR-FG⁺ cuantificadas en el subgrupo 1.1 era comparable al de sus retinas contralaterales derechas controles (**Fig. 24B**), este resultado indica que la FL sin aumento de PIO no induce la degeneración de las CGR.

En el subgrupo 1.2, sin embargo, la población de CGR-FG⁺ había disminuido aproximadamente a un cuarto (**Fig. 24B**). Esta pérdida de CGR-FG⁺ se observó en áreas grandes casi carentes de CGR-FG⁺ en forma de sector con el vértice dirigido hacia el disco óptico. Además, en las zonas donde persistían CGR-FG⁺ se observó una disminución en la densidad de las mismas (**Fig. 25A-H**).

4.2.2. DEGENERACIÓN AXONAL EN LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO

En las secciones de los segmentos proximales al globo ocular de los NO izquierdos del subgrupo 1.1 se observó una apariencia normal de la expresión de pNFH y de la GFAP comparado con las secciones proximales de los NO derechos, que de acuerdo con el análisis de la población de CGR-FG⁺ indica que la FL sin incremento de la PIO no induce lesión en el segmento proximal del NO.

En las secciones de los NO experimentales correspondientes al subgrupo 1.2 se observó una disminución, en sectores, de la expresión de pNFH por la degeneración de los haces de fibras del NO. Esta degeneración en sectores de los axones de las CGR en el NO concuerda con la pérdida topográfica de las mismas observada en el análisis anterior.

Además, y debido a una gliosis reactiva de los astrocitos como respuesta a la PIO, en estos NO se observó una intensa inmunofluorescencia de GAFF (**Fig. 25I, J, K**).

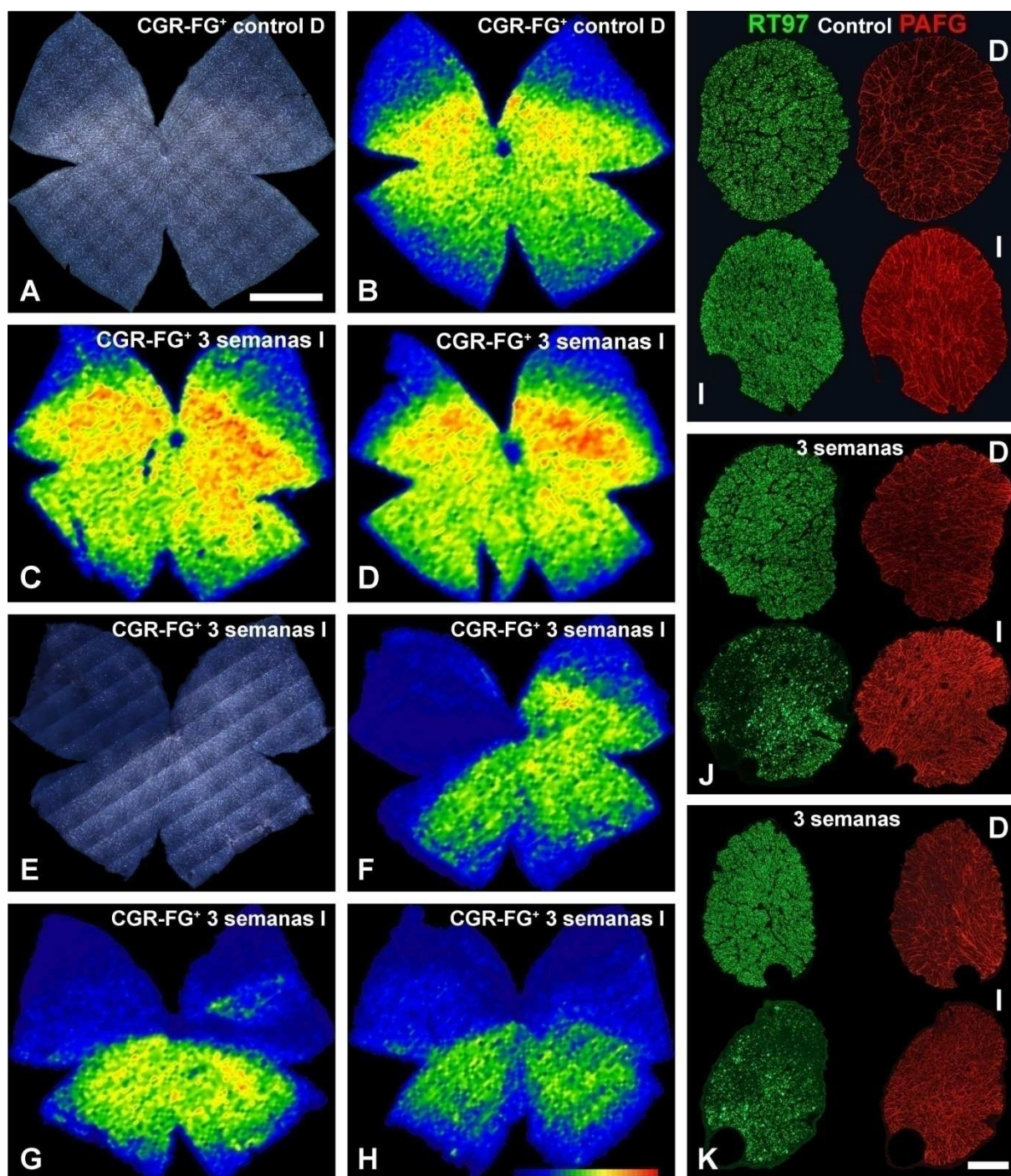


Figura 25. Efecto del incremento de la presión intraocular (PIO) en la población de las CGR y en el segmento proximal del NO. **A:** retina representativa control derecha en el subgrupo de animales 1.1 (**A**) y su correspondiente mapa de isodensidad (**B**). Se observa a las CGR intensamente marcadas con FG aplicado una semana antes del procesado. Tanto en **A** como en **B** las CGR se distribuyen por toda la retina observándose la región de alta densidad a lo largo del eje naso-temporal en la retina superior. **C-H:** retinas representativas izquierdas experimentales del subgrupos 1.1 (65-70 disparos) (**C, D**) o 1.2 (85-90 disparos) (**E-H**). Mientras las retinas experimentales del subgrupo 1.1 mostraron un número total y una distribución de CGR-FG+ (**C, D**) comparables con sus retinas contralaterales, las retinas experimentales (izquierdas) del subgrupo 1.2 muestran una ausencia localizada de CGR-FG+ en el cuadrante superonasal e inferonasal de la retina (**E**), reflejado en su mapa de isodensidad (**F**), o en los cuadrantes superonasal y superotemporal, como se observa en los mapas de isodensidad **G** y **H**. También se aprecia una pérdida difusa en las áreas de las retinas donde persisten

CGR-FG⁺, por ejemplo al observar al microscopio la retina **E** parece que tiene una densidad normal de CGR en el cuadrante supero-temporal, sin embargo en su mapa de isodensidad (**F**) los colores son más fríos que los que le correspondería en una retina control (**B**). **I-K**: Inmunodetección de pNFH (verde) y GFAP (rojo) en secciones transversales de los segmentos proximales de los nervios ópticos (NO) derecho (D) e izquierdo (I) en ratas del subgrupo 1.1 (**I**) y 1.2 (**J, K**). Hay una apariencia normal del p-NFH y de GFAP de los haces de axones en los NO en el subgrupo 1.1 (**I**) así como en los NO derechos del subgrupo 1.2 (**J, K**), mientras que en los NO izquierdos del subgrupo 1.2 (**J, K**) hay sectores desprovistos de la pNFH, típica de la degeneración anterógrada inducida por axotomía, además de la sobreexpresión de GFAP que indica gliosis de los astrocitos. Todas las retinas y secciones de los NO están orientados con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala en las retinas: 1mm. Barra de escala en las secciones de los NO: 100 μ m. Barra de densidad, desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm² (rojo) (en H, inferior derecha). I: izquierdo, D: derecho.

4.2.3. EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR DESPUÉS DE LA FOTOCOAGULACIÓN POR LÁSER

En rata, las medidas de la PIO en los grupos sacrificados a 8d, 2, 3, 8 y 12 semanas después de la FL, son muy similares a las medidas registradas en los mismos periodos de tiempo en el grupo de animales procesados a 12 semanas (**Fig. 26A**). En todos los grupos se observó un aumento de la PIO con un máximo a las 12h después de la FL, momento a partir del cual descendió gradualmente y se mantuvo por encima de los valores basales hasta las 12 semanas, el último punto temporal analizado.

En ratón, el curso temporal de la elevación de la PIO fue equivalente en los distintos grupos procesados a 8, 17, 35 y 63 días después de la FL, y sus valores, en los ojos experimentales o en los ojos controles, fue similar (*Kruskal-Wallis test*, $p=0,8191$) entre los diferentes grupos. A las 24h tras la FL, la PIO del ojo experimental mostró un aumento significativo (*Kruskal-Wallis test*, $p<0,0001$) que fue comparable en todos los grupos analizados (*Kruskal-Wallis test*, $p=0,9024$) (**Fig. 26B**). Este aumento se mantuvo durante 4 días y a partir del quinto día descendió gradualmente, llegando a sus niveles basales al final de la primera semana.

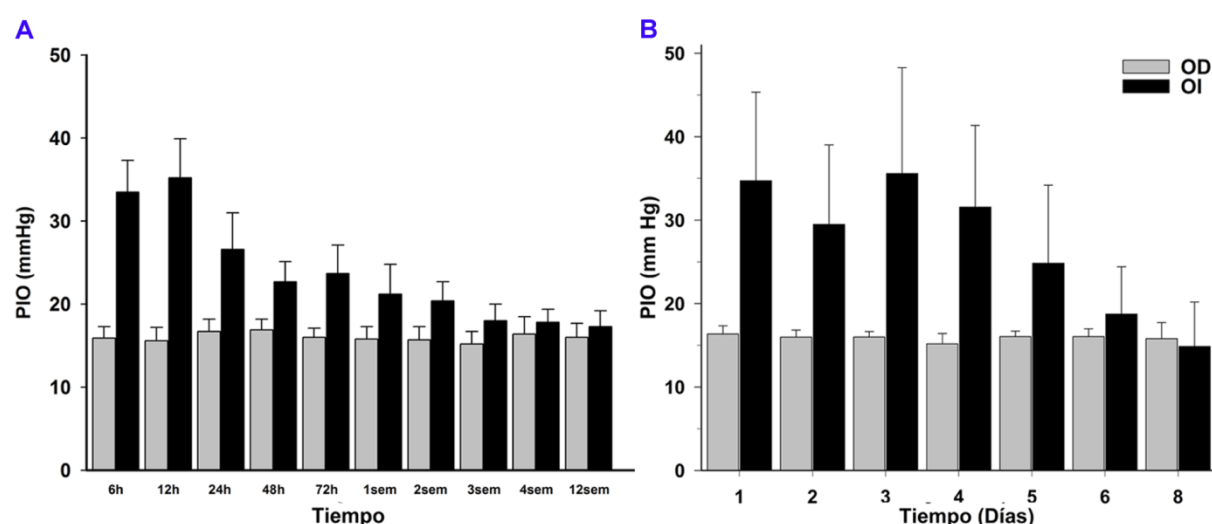


Figura 26. Evolución temporal de la presión intraocular (PIO) después de la fotocoagulación por láser (FL) en rata (A) y ratón (B). A: Histograma que representa en rata la media ($\pm$ DE) de la PIO respecto a los valores pre-láser en el grupo analizado a 12 semanas después de la FL del ojo izquierdo (OI), en los puntos temporales de 6, 12, 24, 48 y 72 horas y a 1, 2, 3, 4 y 12 semanas después de la FL. B: Histograma que representa en ratón la media ($\pm$ DE) de la PIO respecto a los valores pre-láser en el grupo analizado a 8 días después de la FL del ojo izquierdo (OI), en los puntos temporales de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 días después de la FL.

2, 3, 4 y 12 semanas después de de la FL del ojo OI. Dentro de las primeras 72 h después de la FL, la PIO aumentó entre un 34 y 125% sobre los valores basales, con un máximo a 12 h. A 1, 2, y 3 semanas la PIO fue aproximadamente un 35, 30 y 19% mayor que los valores basales, y a 4 y 12 semanas la PIO fue aproximadamente un 8% mayor que los valores basales. **B:** Histograma que muestra en ratón la media ($\pm$ DE) de los valores de la PIO para los ojos derechos (OD) y los ojos izquierdos (OI) en los grupo de ratones sacrificados a 8 días después de la FL del OI. El valor de la PIO aumentó y alcanzó su máximo en el día 1 post-láser y se mantuvo alta hasta el día 5, cuando gradualmente volvió a sus niveles basales pre-láser al final de la semana.

4.2.4. EVOLUCIÓN TEMPORAL DE LA POBLACIÓN DE CGR TRAZADAS RETRÓGRADAMENTE DESPUÉS DE LA FOTOCOAGULACIÓN POR LÁSER

Una vez establecidos los parámetros necesarios para inducir un aumento de la PIO hicimos un análisis cuantitativo de la evolución temporal de la población total de CGR trazadas retrógradamente después de la FL, para estudiar posteriormente cómo afecta la HTO a la distribución total de estas neuronas.

4.2.4.1. Evolución temporal del número total de células ganglionares trazadas retrógradamente después de la fotocoagulación por láser

Para estudiar el efecto de la HTO en el transporte axonal retrógrado (TAR) activo a lo largo del tiempo se analizó la población de CGR trazadas retrógradamente desde el CS a intervalos crecientes de supervivencia, tanto en rata como en ratón.

Como se resume en esta tabla, en ratas SD, las retinas derechas controles de los diferentes subgrupos analizados a 8d, 2, 3, 8 ó 12 semanas después de la FL, tuvieron una media $\pm$ DE de CGR-FG⁺ dentro del rango de los datos obtenidos en retinas control en nuestro estudio de la población total de CGR-FG⁺ en rata SD (ver apartado 4.1.2.2.). En las retinas izquierdas FL hubo variabilidad en el número total de CGR-FG⁺ y por tanto en el tamaño de las áreas desprovistas de CGR-FG⁺ entre los individuos de los grupos, pero los resultados entre los grupos procesados a diferentes intervalos de supervivencia fueron bastante consistentes. En todos los grupos, las retinas FL tuvieron una media del número total de CGR-FG⁺ significativamente más pequeña que sus retinas contralaterales no tratadas (*Mann whitney test*, $p < 0,001$ para cada subgrupo). Esto supone una pérdida de CGR-FG⁺ respecto a la de su ojo contralateral no tratado del 46,5%, 19,1%, 23%, 20,7% ó 23,5% a 8d, 2, 3, 8 ó 12 semanas después de la FL, respectivamente.

Tabla 2. Tabla que presenta la media $\pm$ DE del número total de CGR-FG⁺ de las retinas controles derechas y experimentales izquierdas de ratas albinas (SD), de los grupos experimentales analizados a 8 días, 2, 3, 8 ó 12 semanas después de la FL.

Retinas	Tiempo post-fotocoagulación por láser				
	8 días n=6	2 semanas n=8	3 semanas n=34	8 semanas n=41	12 semanas n=14
Derechas	82.514 $\pm$ 3.651	79.973 $\pm$ 4.478	78.961 $\pm$ 3.961	76.017 $\pm$ 4.404	79.659 $\pm$ 4.915
Izquierdas	38.397 $\pm$ 12.306	15.251 $\pm$ 18.729	18.149 $\pm$ 20.383	15.727 $\pm$ 16.468	18.686 $\pm$ 16.487

A 8d, el número total de CGR-FG⁺ fue significativamente mayor que a 14 y 21 días (*Mann-Whitney test*, $p < 0,02$ o $p < 0,013$, respectivamente). La media del número total de CGR-FG⁺ en las retinas FL analizadas a las 2 semanas y posteriormente fue comparable (*Kruskal-Wallis test*, $p = 0,842$) y constituye, aproximadamente, un quinto de los valores de sus retinas contralaterales. A los 8 días ya hay una pérdida considerable de marcaje retrógrado que evoluciona aún más alcanzando su máximo a los 14 días y no progresa con el tiempo (**Fig. 27A**).

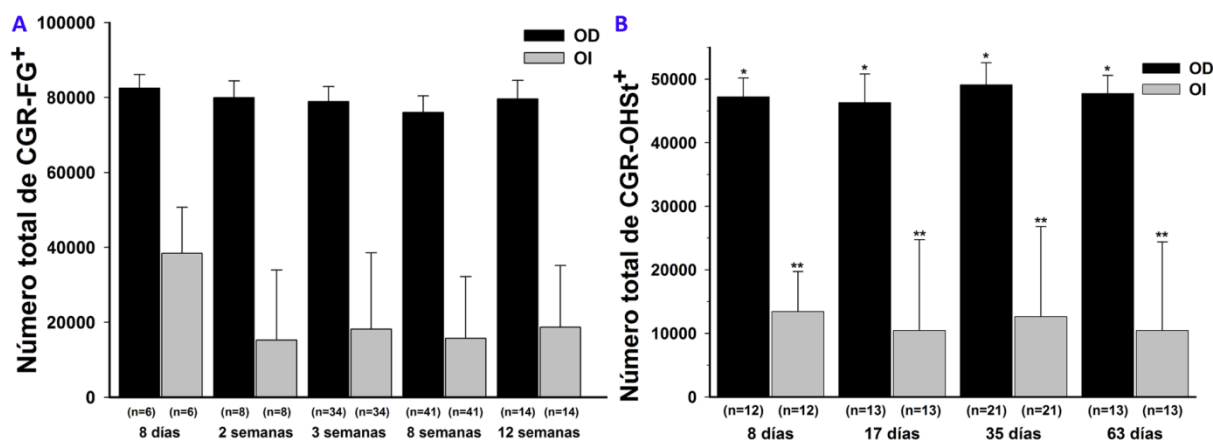


Figura 27. Evolución temporal de la población de CGR trazadas retrógradamente después de la fotocoagulación por láser (FL) en rata (A) y en ratón (B). **A:** Histograma que representan en rata la media ($\pm$ DE) del número total de CGR trazadas retrógradamente con FG (CGR-FG⁺) en los ojos izquierdos (OI) y en los ojos derechos (OD) para los grupos analizados a 8d, 2, 3, 8 ó 12 semanas después de la FL. Para identificar las CGR capaces del transporte axonal retrógrado activo, el FluoroGold (FG) fue aplicado en ambos colículos superiores (CS) una semana antes del procesamiento del animal. Las retinas izquierdas FL tenían una media del número total de CGR-FG⁺ que fue significativamente más pequeña cuando los comparamos con sus retinas contralaterales no tratadas derechas (*Mann-Whitney test*, $p \leq 0,001$, para cada punto temporal), representando aproximadamente un quinto de los valores en sus retinas derechas. El número total de CGR-FG⁺ en las retinas izquierdas (RI) disminuyó considerablemente entre 8 días y 2 semanas (*Mann-Whitney test*, $p = 0,02$), pero no entre 2 semanas y tiempos analizados posteriormente (*Kruskal-Wallis test*, $p = 0,842$). Por tanto, la pérdida principal de CGR-FG⁺ ocurre entre 8 y 2 semanas después de la FL, y a partir de 2 semanas no progresa con el tiempo. **B:** Histogramas que representan en ratón la media ($\pm$ DE) del número total de células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con OHSt (CGR-OHSt⁺) en el ojo izquierdo (OI) y en el ojo derecho (OD) para los grupos analizados a 8, 17, 35 ó 63 días.

después de la FL. Para identificar las CGR capaces del transporte axonal retrógrado activo el OHSt fue aplicado en ambos CS una semana antes del procesamiento del animal. El promedio del número total de CGR-OHSt⁺ de las RIs fue aproximadamente un cuarto del número total de CGR-OHSt⁺ de sus retinas contralaterales no tratadas, en todos los puntos estudiados. La media del número total de CGR-OHSt⁺ en el OD para todos los grupos fue comparable (**Kruskal-Wallis test*, $p=0,1391$). Del mismo modo, la media del número total de CGR-OHSt⁺ en las retinas FL para estos grupos fue también comparable (***Kruskal-Wallis test*; $p=0,420$). Esto sugiere que la pérdida del transporte axonal retrógrado activo no progresa más allá de 8 días. n: número de retinas analizadas por punto temporal.

En ratones Swiss, tal y como se resume en la siguiente tabla, las retinas derechas (control) de los diferentes subgrupos analizados a 8, 17, 35, y 63 días después de la FL, tenían una media $\pm$ DE del número total de CGR-OHSt⁺ dentro del rango de los datos obtenidos en retinas control en nuestro estudio de la población total de CGR-OHSt⁺ en ratones Swiss (ver apartado 4.1.2.2.). En las retinas izquierdas (experimentales) hubo variabilidad en el número total de CGR-OHSt⁺ y también en el tamaño de las áreas lesionadas. Sin embargo, en todos los grupos el número total de CGR-OHSt⁺ de las retinas izquierdas fue significativamente menor que sus retinas contralaterales no tratadas (*Kruskal-Wallis test*, $p<0,0001$). Esto supone una pérdida de la población de CGR-OHSt⁺ respecto al ojo contralateral no tratado del 28%, 23%, 26% ó 22% a 8, 17, 35, ó 63 días tras la FL, respectivamente (**Fig. 27B**).

Tabla 3. Tabla que presenta la media y DE del número total de CGR-OHSt⁺ de las retinas controles derechas y experimentales izquierdas de ratones albinos (Swiss), de los grupos experimentales analizados a 8, 17, 35 ó 63 días después de la FL.

Retinas	Tiempo post-fotocoagulación por láser			
	8 días n=12	17 días n=13	35 días n=21	63 días n=13
Derechas	47.223 $\pm$ 2.936	46.321 $\pm$ 4.492	49.101 $\pm$ 3.489	47.748 $\pm$ 2.829
Izquierdas	13.428 $\pm$ 6.295	10.456 $\pm$ 14.301	12.622 $\pm$ 4.174	10.451 $\pm$ 13.949

La media del número total de CGR-OHSt⁺ en las retinas FL analizadas a los 8 días y posteriormente fue comparable entre ellas (*Kruskal-Wallis test*, $p=0,420$), y constituye aproximadamente un cuarto de los valores de sus retinas contralaterales. La pérdida de marcaje retrógrado se observa ya a los 8 días tras la FL y no progresa con el tiempo.

4.2.4.2. Distribución espacial de las CGR trazadas retrógradamente después de la fotocoagulación por láser

En rata SD, la distribución de las CGR-FG⁺ en las retinas derechas no tratadas tiene un patrón normal (**Fig. 25A, B**). En la mayoría de las retinas con HTO se observaron grandes áreas con una pérdida localizada de CGR-FG⁺ y otras áreas normalmente más pequeñas con pérdida difusa.

Las áreas con pérdida localizada fueron más pequeñas a 8d que a 2 semanas o a tiempos más largos. En la pérdida localizada se observan áreas desprovistas o con muy pocas CGR-FG⁺, estas áreas adoptan la forma de sectores con el vértice apical hacia del disco óptico, frecuentemente se extienden a uno o más cuadrantes de la retina y en el 95% de los casos se localizaron en la retina superior. Gracias a los mapas de isodensidad se apreció que, en las áreas de las retinas donde persisten CGR-FG⁺, que también tienen forma sectorial, hay una pérdida difusa de CGR-FG⁺. En estas zonas los colores son más fríos que en las zonas equivalentes de una retina control, lo que indica que la densidad de CGR-FG⁺ es más baja que la que correspondería a esa región de la retina si no estuviera lesionada (**Fig. 28**).

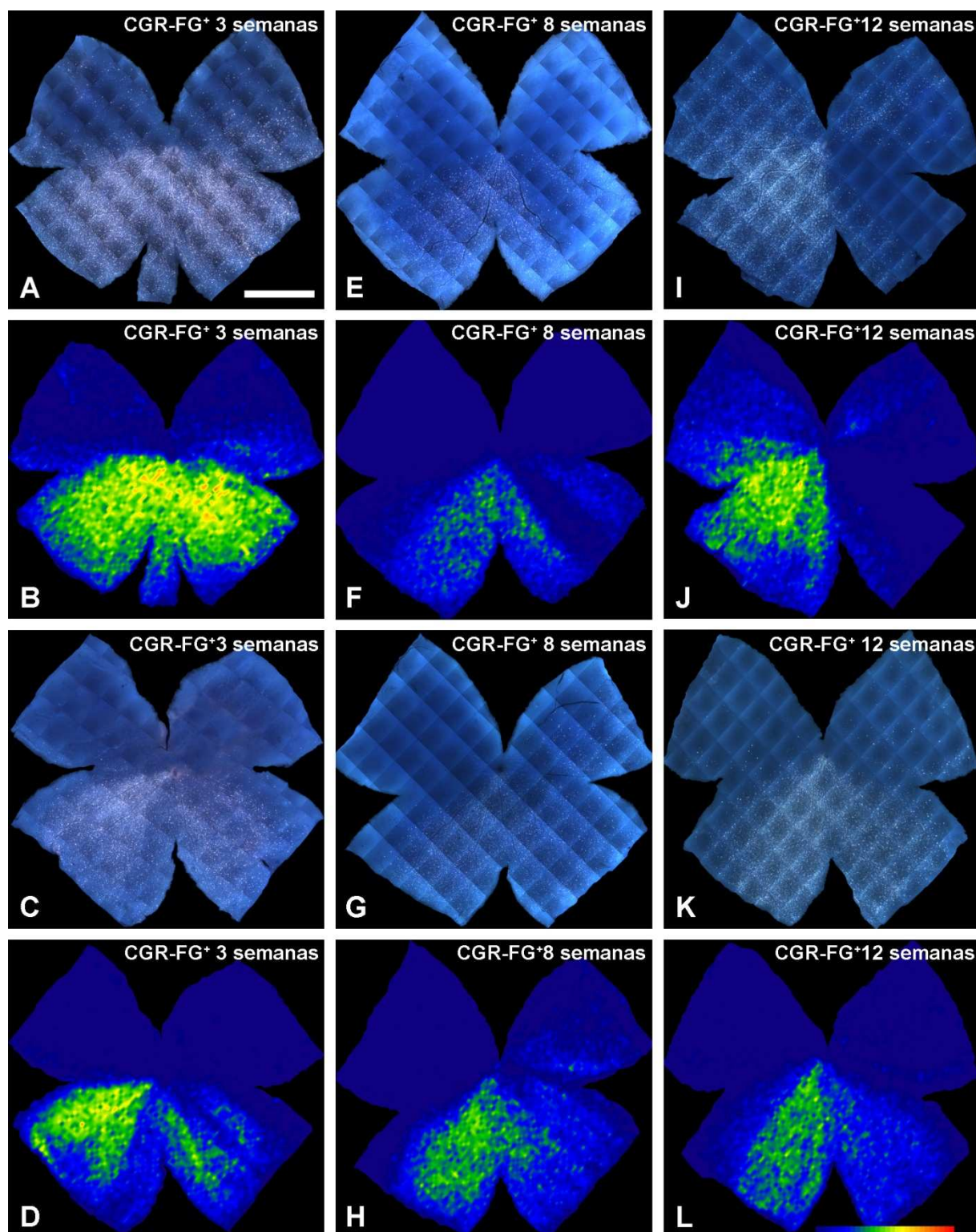


Figura 28. Distribución de las CGR trazadas retrógradamente con FG (CGR-FG⁺) en rata a 3, 8 y 12 semanas después de la fotocoagulación por láser (FL), donde se muestra los dos patrones de pérdida de CGR-FG⁺: **localizada y difusa.** **A-E-I-C-G-K:** Fotomontajes de retinas izquierdas representativas de rata y sus correspondientes mapas de isodensidad (**B-F-J-D-H-L**), examinadas a 3 (**A-D**), 8 (**E-H**) y 12 (**I-L**) semanas después de la FL del ojo izquierdo. Para identificar las CGR capaces del transporte axonal retrógrado el FG fue aplicado en ambos CS una semana antes del procesado del animal. Se observan distintos patrones de pérdida de CGR-FG⁺, en **A, B** la ausencia de las CGR-FG⁺ ocurre

en la hemirretina superior, en **C, D** en la hemirretina superior y en un sector grande en el cuadrante ínfero-temporal y otro pequeño sector en el ínfero-nasal, en **E, F** en la hemirretina superior y en un sector en la retina ínfero-nasal e ínfero-temporal, en **G, H** en la hemirretina superior y en un gran sector en el cuadrantes ínfero-nasal, en **I, J** en el cuadrante ínfero y supero-temporal así como en un sector en el cuadrante supero-nasal y en **K, L** en la hemirretina superior y en un sector del cuadrante ínfero-nasal e ínfero-temporal. En todos los casos la pérdida localizada de las CGR-FG⁺ se sitúa preferentemente en la hemirretina superior. En algunas retinas también se observa una pérdida difusa, como muestran los colores más fríos en los mapas de isodensidad. Por ejemplo en **G, H** o en **K, L**, hay casi una ausencia completa de CGR-FG⁺ en la hemirretina superior y también hay una densidad menor de CGR-FG⁺ en la hemirretina inferior (**G, K**). Esta pérdida difusa se evidencia claramente en los mapas de isodensidad (**H, L**) que tienen colores más fríos que los colores normales para esa región (los colores amarillos han sido reemplazados por los colores verdes y azules claros lo que indica la pérdida difusa de CGR-FG⁺). Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Escala de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm² (rojo) (en **L**, inferior derecha).

En ratón Swiss, las retinas controles mostraron una distribución normal de las CGR-OHSt⁺. En aproximadamente el 91% de las retinas FL hay áreas con ausencias severas de CGR-OHSt⁺ localizadas principalmente en la retina superior (en el 94% de las retinas). Al igual que en rata, se observan las dos patrones de pérdida de CGR-OHSt⁺: localizada y difusa, y tanto las áreas con pérdida localizada como las áreas con pérdida difusa, donde persisten CGR-FG⁺, adoptan una forma sectorial (**Fig. 29**).

4.2.5. ¿LA AUSENCIA DE CGR MARCADAS RETRÓGRADAMENTE SE DEBE A LA MUERTE DE CGR O A UNA ALTERACIÓN DEL TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO?

Para determinar si la ausencia de las CGR marcadas retrógradamente con el trazador neuronal se debe a una muerte de las CGR o a un daño en el transporte axonal retrógrado (TAR), realizamos dos experimentos. En primer lugar realizamos el marcaje retrógrado de las CGR-FG⁺ antes de la FL, y posteriormente realizamos la inmunodetección del marcador molecular de las CGR.

4.2.5.1. Determinación de las CGR supervivientes después de la FL mediante el marcaje retrógrado de las CGR antes de la FL

En un grupo de ratas se aplicó el FG una semana antes de la FL y el DTMR 2 días antes del procesamiento del animal que se realizó a los 17 días post-FL. Estas retinas mostraron a las CGR-DTMR⁺ restringidas al típico sector en cuña anteriormente mencionado mientras que las CGR-FG⁺ aparecían dispersas por toda la retina y no confinadas a los sectores en cuña que contenían a las CGR-DTMR⁺, observándose una discordancia entre el gran número de CGR-FG⁺ que sobreviven y el pequeño número de CGR-DTMR⁺. En este grupo no se llevaron a cabo estudios cuantitativos automáticos detallados por la presencia de la abundante microglía marcada con FG debido a la fagocitosis de las CGR-FG⁺ muertas (*Thanos y Vanselow, 1991; Peinado-Ramón y cols., 1996; Salvador-Silva y cols., 2000; Sobrado-Calvo y cols., 2007*) y al intenso marcado con DTMR de los axones intrarretinianos (*Salinas-Navarro y cols., 2009a*) que impide el conteo automático de las CGR-FG⁺ y de las CGR-DTMR⁺, respectivamente, pero era obvio que el número de CGR-FG⁺ superaba en número y en

distribución a las CGR-DTMR⁺ en la retina (**Fig. 30**). Estos resultados indican que la pérdida de las CGR-DTMR⁺ es debida en parte a una carencia de la difusión pasiva retrógrada través de los axones desde la cabeza del NO hacia al cuerpo celular y en parte a la muerte de las CGR.

Existía la posibilidad de que el pequeño número de CGR-DTMR⁺ observado en los experimentos mencionados arriba, no reflejara una carencia de la difusión pasiva sino una segunda lesión axonal infringida al aplicar el DTMR. Si bien esto es algo improbable porque si fuera así habría una disminución generalizada por toda la retina de CGR-DTMR⁺ y no con la típica distribución sectorial, realizamos otro experimento inmunodetectando las CGR por su expresión de Brn3a puesto que este factor de transcripción es un marcador endógeno de estas neuronas y se expresa siempre que la CGR esté viva (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Sánchez-Migallón y cols., 2011).

4.2.5.2. Determinación de las CGR supervivientes después de la FL mediante el marcador molecular Brn3a

Tanto en rata como en ratón, después de la FL se realizó el marcaje retrógrado de las CGR desde el CS una semana antes del sacrificio, y posteriormente se realizó la inmunodetección para identificar y contar las CGR que sobreviven.

En rata, al observar las imágenes de retinas representativas derechas controles casi todas las CGR-FG⁺ (92,2%, Nadal-Nicolás y cols., 2009) están doblemente marcadas con Brn3a⁺ (**Fig. 31A-C**). En las retinas izquierdas analizadas 8 días después de la FL se observó que el número de CGR-Brn3a⁺ era mayor que el de CGR-FG⁺ (**Fig. 31D-F**). A 21 días la población de CGR-Brn3a⁺ sigue siendo mayor que la de CGR-FG⁺ pero esta diferencia ha disminuido con respecto a la observada a los 8 días (**Fig. 31G-I**). Esto se observa claramente en los mapas de isodensidad. En las retinas control, las CGR-FG⁺ y CGR-Brn3a⁺ tienen una distribución paralela, con las más altas densidades en la hemirretina superior y con la típica estría visual orientada horizontalmente (**Fig. 32A-D**). Sin embargo, a los 8 (**Fig. 32E, F**) y en menor grado a los 21 (**Fig. 32G, H**) días tras la FL hay más colores cálidos en el mapa de isodensidad correspondiente a las CGR-Brn3a⁺, lo que refleja gráficamente, un mayor número de CGR vivas que de células que mantienen su TAR activo íntegro.

En las retinas controles derechas, el número total de ambas poblaciones fue comparable (*Mann-Whitney test*, $p=0,092$ y $p=0,1$ a los 8 y 21 días, respectivamente) (**Fig. 33A**). Las retinas izquierdas FL tenían una población media $\pm$ DE de CGR-Brn3a⁺ de 72.289 ± 5.431 ($n=6$) y 30.942 ± 20.415 ($n=10$) a 8 y 21 días post FL, respectivamente. La media $\pm$ DE de CGR-FG⁺ después de FL fue, a 8 días, de 38.397 ± 12.306 ($n=6$) y a 21 días, de 18.040 ± 21.197 ($n=10$). Así la población de CGR-FG⁺ fue significativamente menor que la de CGR-Brn3a⁺ a 8 días (*Mann-Whitney test*, $p=0,001$) pero no a 21 días (*Mann-Whitney test*, $p=0,068$). El número total de CGR-FG⁺ en el OI representa el 47% y el 22% del número total de CGR-FG⁺ encontradas en sus retinas contralaterales a 8 y 21 días post FL, respectivamente, mientras que el número total de CGR-Brn3a⁺ en el OI representa el 85% y el 37% del número total de CGR-Brn3a⁺ encontradas en sus retinas contralaterales.

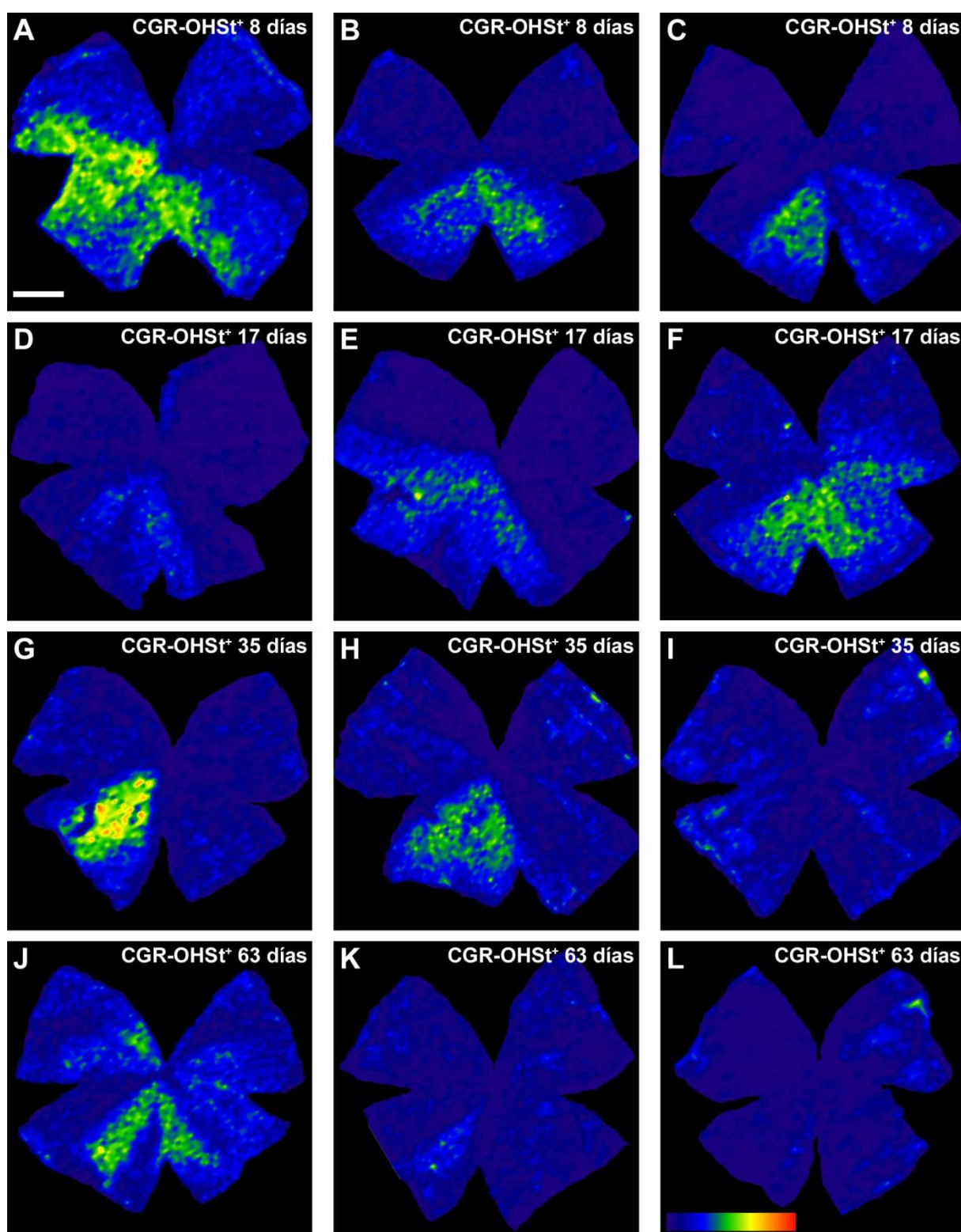


Figura 29. Distribución de las CGR marcadas con OHSt (CGR-OHSt⁺) en ratón a 8, 17, 35 y 63 días después de la fotocoagulación por láser (FL), donde se muestra los dos tipos de pérdida de CGR-OHSt⁺: localizada y difusa. Mapas de isodensidad de retinas experimentales representativas de los grupos analizados a 8 (A-C), 17 (D-F), 35 (G-I), y 63 (J-L) días después de la FL. Para identificar a las CGR capaces del transporte axonal retrógrado activo, el OHSt se aplicó en ambos colículos superiores una semana antes del procesamiento del animal. Hay regiones con una pérdida localizada donde

no hay o hay muy pocas CGR-OHSt⁺ así como regiones con una pérdida difusa donde hay una disminución en la densidad de CGR-OHSt⁺. Por ejemplo, la retina **E** muestra una región que contiene CGR-OHSt⁺ restringida a un eje entre las 5 y las 10 en punto. La retina **A** muestra más número de CGR-OHSt⁺ dentro de un gran eje ente las 5 y las 10 en punto, pero también hay CGR-OHSt⁺ distribuidas en el resto de la retina en densidades más bajas como reflejan los colores más fríos que los colores normales que les correspondería a esa región. Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Barra de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 5.625 o más CGR/mm² (rojo) (en **L**, inferior derecha).

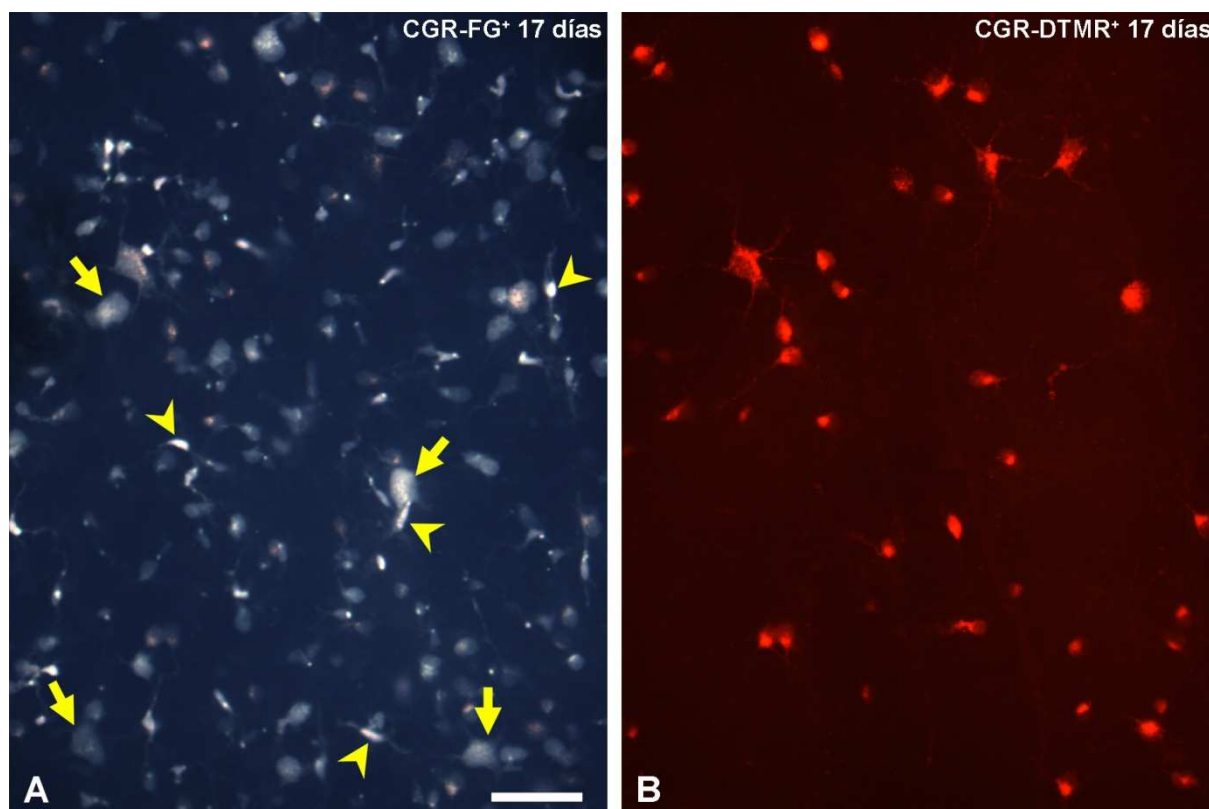


Figura 30. La disminución de CGR marcadas retrógradamente no implica la muerte de las CGR. Imagen de una retina representativa, doblemente marcada, con FG (**A**) aplicado en ambos CS una semana antes de la FL del ojo izquierdo y con DTMR (**B**) aplicado 15 días después de la FL y 2 días antes del procesamiento del animal. El trazado con FG previo a la lesión, identificará las CGR que están vivas en el momento del análisis, mientras que el trazado con DTMR identificará aquellas CGR con un axón competente para la difusión del trazador. Algunas CGR están doblemente marcadas con ambos trazadores. Sin embargo muchas otras CGR-FG⁺ no están doblemente marcadas con el DTMR (flechas en **A**). En estos experimentos las CGR-DTMR⁺ estaban restringidas a un sector en cuña en la retina, mientras que las CGR-FG⁺ estaban dispersas por toda su superficie, habiendo una clara discordancia entre el número de CGR-FG⁺ que sobreviven y el número de CGR trazadas con DTMR. Además de las CGR-FG⁺ en la imagen **A** se observan muchas células de la microglía marcadas transcelularmente con FG (cabezas de flecha) debido a que las CGR premarcadas con FG degeneran y el detritus es fagocitado por la microglía (Thanos y Vanselow, 1991; Peinado-Ramón y cols., 1996; Köbbert y cols, 2000; Salvador-Silva y cols., 2000; Sobrado-Calvo y cols., 2007). Estas observaciones documentan que en tiempos tempranos después del láser hay muchas CGR que sobreviven (CGR-FG⁺) pero que son incapaces de marcarse retrógradamente y pasivamente con DTMR aplicado en la cabeza del NO. Barra de escala: 50µm.

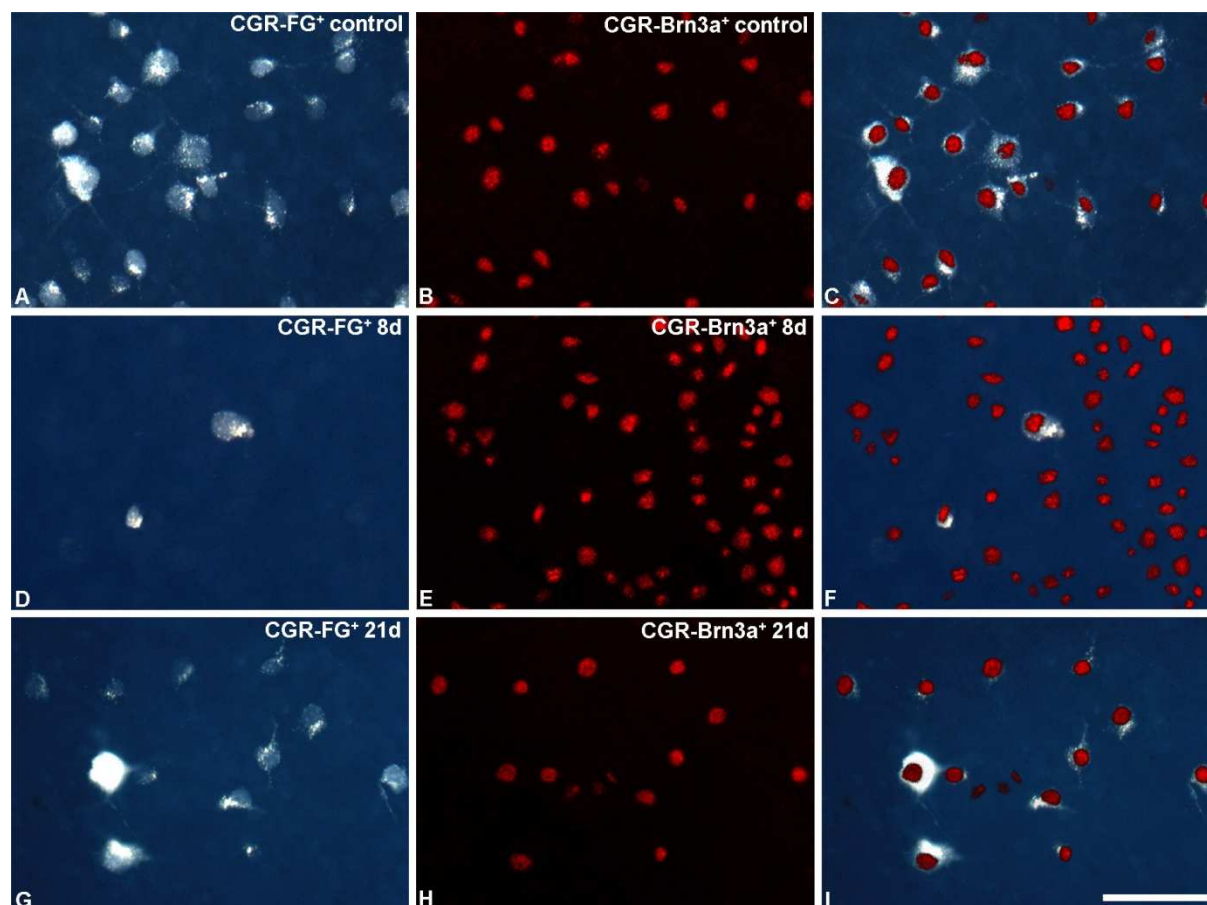


Figura 31. Después de la fotocoagulación por láser hay un daño del transporte axonal retrógrado activo de las CGR. Micrografías de una retina representativa control (**A-C**) y experimentales de rata SD, analizadas a 8 (**D-F**) y a 21 días (**G-I**) después de la fotocoagulación por láser (FL). Las CGR están doblemente identificadas, mediante el trazado con FG (blanco), aplicado en ambos CS una semana antes de la FL, mostrando las CGR que tienen un transporte axonal retrógrado (TAR) activo funcional (**A,D,G**) y mediante la inmunodetección del Brn3a (rojo), mostrando las CGR que sobreviven después de la FL (**B,E,H**). En **A** se observan los somas de las CGR trazados con el FG y en **B** los núcleos Brn3a⁺ de las CGR en esta misma región de una retina control. En este experimento se observa una correspondencia entre las CGR FG⁺ y CGR-Brn3a⁺ positivas (**C**). A 8 días después de la inducción de la HTO, el número de CGR-FG⁺ en las zonas lesionadas disminuye (**D**), sin embargo en este mismo área se observan muchos núcleos Brn3a positivos (**E**). Es decir, la proporción de células Brn3a/FG positivas aumenta en la retina experimental comparado con las retinas controles (**F**) lo que indica que la HTO induce un daño en el TAR. A 21 días después de la FL, el número de las CGR-FG⁺ en las zonas lesionadas está disminuido (**G**), en este mismo área se observan un número un poco mayor de núcleos Brn3a positivos (**H**), es decir hay una mayor correspondencia entre las CGR-FG⁺ y las CGR-Brn3a⁺ (**I**). En conclusión, a 8 días después de la FL se produce un daño en el TAR de las CGR. Este daño del transporte axonal retrógrado induce la degeneración de las CGR. Barra de escala: 50µm.

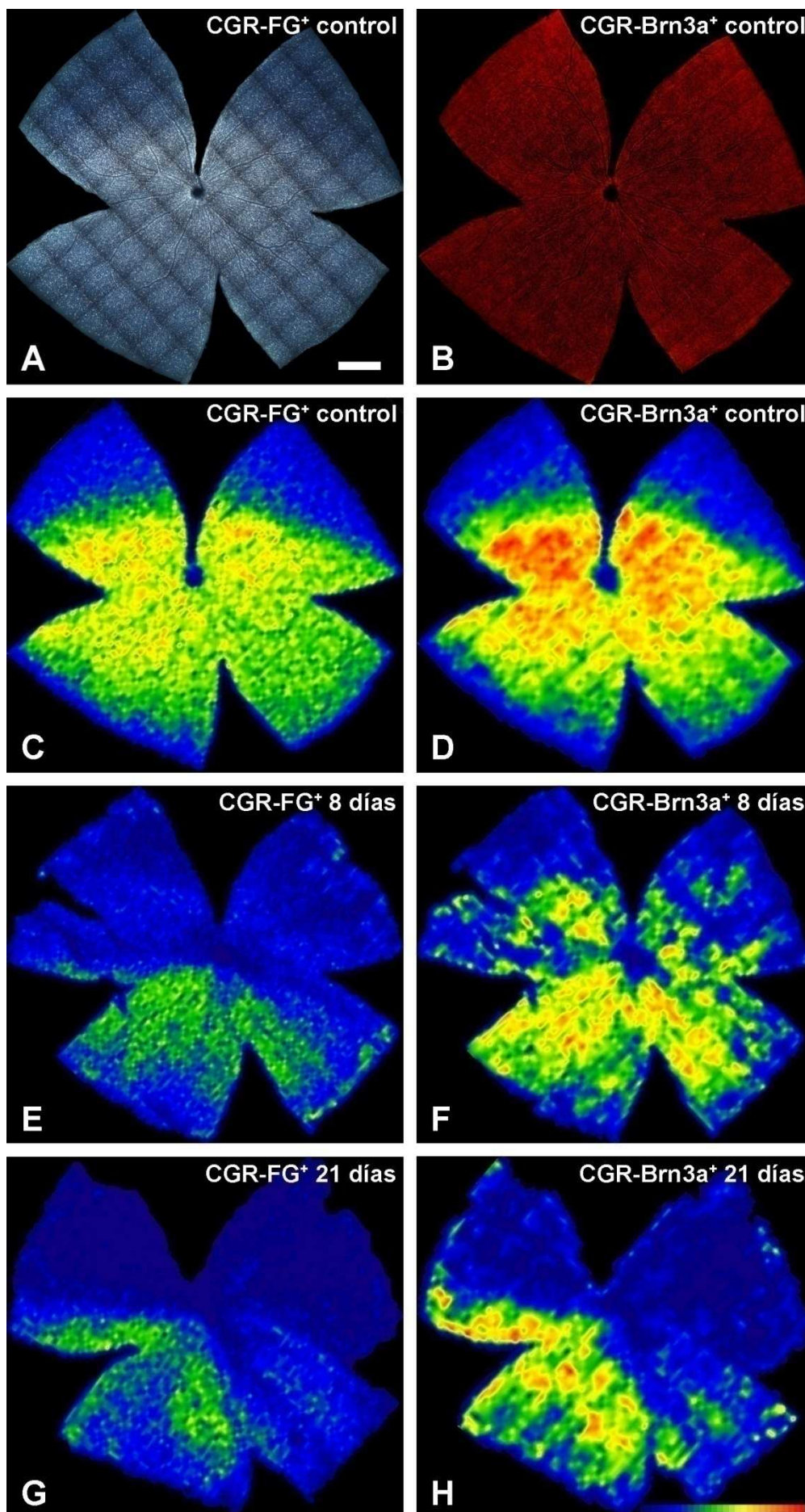


Figura 32. La ausencia de CGR marcadas retrógradamente es debido al daño del transporte axonal y a la pérdida de CGR. A-H. Ejemplos de fotomontajes de retinas representativas de rata, **A-D**: retina control marcada con FluoroGold (FG) (**A**) y su mapa de isodensidad (**C**). En **B** se muestra esta misma retina inmunomarcada con Brn3a (**B**) y en **D** su correspondiente mapa de isodensidad. Para identificar las CGR con capacidad de transporte axonal retrógrado, el FG fue aplicado en ambos CS una semana antes del procesamiento del animal, mientras que para identificar las CGR que sobreviven, a las mismas retinas se les realizó la inmunohistofluorescencia del Brn3a. En los mapas de isodensidad de la retina control tanto de las CGR-FG⁺ (**C**) como en el de las CGR-Brn3a⁺ (**D**) se observa que las CGR están distribuidas por toda la retina, con la típica región de alta densidad a lo largo de la estría naso-temporal en la retina superior (**C, D**). **E-F**: Ejemplo representativo de mapas de isodensidad de la misma retina experimental analizada a 8 días después de la fotocoagulación láser (post-FL), mostrando la distribución de CGR-FG⁺ (**E**) y CGR-Brn3a⁺ (**F**). En **G-H** se muestran los mapas de isodensidad de las CGR-FG⁺ o Brn3a⁺, respectivamente, de una retina representativa analizada 21 días post-FL. A los dos tiempos post-láser, hay menos CGR que en una retina control (**C**), e independientemente del marcaje usado para detectar las CGR, a 8 días su población era mayor que a 21. En estas imágenes se observa además, que la población de CGR-Brn3a⁺ fue más grande que la de CGR-FG⁺ a 8 días después del FL indicando que ya en la primera semana después del láser hay un daño en el transporte axonal retrógrado y que la pérdida del trazado axonal retrógrado en la retina es debido no sólo a la degeneración de las CGR sino también a un daño en el flujo axoplasmático. A 21 días post-láser la población de CGR identificada con ambos métodos es la misma, es decir, a este tiempo post-lesión la degeneración de estas neuronas inducida por el aumento de la PIO se ha estabilizado. Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Escala de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm² (rojo) (en **H** inferior derecha).

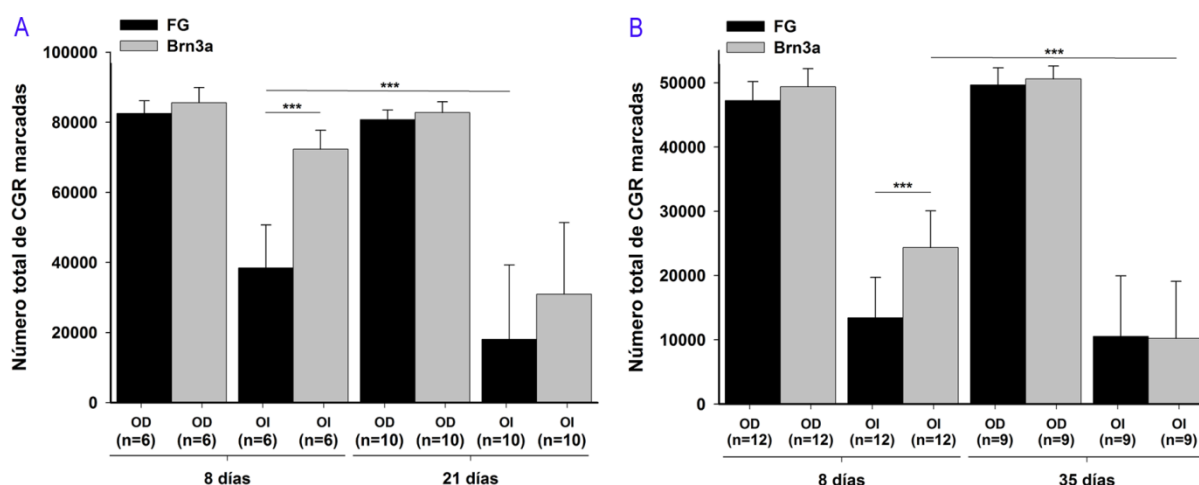


Figura 33. Evolución temporal de la población de CGR marcadas retrógradamente y de la población de CGR que sobreviven después de la FL en rata (A) y en ratón (B). Histogramas que representan la media ($\pm$ DE) del número total de CGR marcadas retrógradamente con FluoroGold (FG) o Brn3a en las retinas izquierdas (OI) y derechas (OD) a 8 y 21 días después de la FL del OI en rata (**A**) y a 8 y 35 días después de la FL en ratón (**B**). Para identificar las CGR capaces de un transporte axonal retrógrado competente, el FG o el OHSt fue aplicado en ambos colículos superiores (CS) una semana antes del procesamiento del animal, mientras que las CGR que sobreviven fueron identificadas con la inmunofluorescencia del Brn3a. La totalidad de CGR marcadas con FG o con OHSt y Brn3a fueron contadas automáticamente. En rata, el número total de CGR-FG⁺ o CGR-Brn3a⁺ en el OD de las retinas examinadas a 8 y 21 días fue comparable. El número total de CGR-FG⁺ en el OI representa el 47% y el 22% del número total de CGR-FG⁺ encontradas en sus retinas contralaterales no tratadas en los correspondientes puntos temporales. El número total de CGR-Brn3a⁺ en el OI representa el 85% y 37% del número total de CGR-Brn3a⁺ de sus retinas contralaterales, en los correspondientes puntos temporales. Documentando que la población de CGR que sobreviven (CGR-Brn3a⁺) es mayor que la población de CGR retrógradamente marcadas con FG (CGR-FG⁺) a 8 días pero no a 21 días. El número total de CGR-OHSt⁺ y CGR-Brn3a⁺ en el OD de las retinas examinadas a 8 y 35 días fue comparable en ratón. El número total de CGR-OHSt⁺ en el OI representan el 28% y el 21% del número total

de CGR-OHSt⁺ encontradas en su retinas contralaterales no tratadas en los correspondientes puntos temporales. El número total de CGR-Brn3a⁺ en el OI representa el 49% y el 20% del número total de CGR-Brn3a⁺ de sus retinas contralaterales, en los correspondientes puntos temporales. Estos datos documentan que la población de CGR que sobreviven (CGR-Brn3a⁺) es mayor que la población de CGR retrógradamente marcadas con OHSt (CGR-OHSt⁺) a 8 días pero no a 21 días. Así, tanto en rata como en ratón la pérdida de marcaje retrógrado no es sólo debido a la degeneración de las CGR sino también a un daño del transporte axonal retrógrado. (*Mann-Whitney test*, *** ($p \leq 0,001$)).

En conclusión, dentro de las primeras tres semanas después de la FL hay una muerte de CGR como se evidencia por el descenso del número total de CGR-Brn3a⁺ entre 8 y 21 días (*Mann-Whitney test*, $p=0,0006$), pero hay también un daño en el transporte axonal puesto que en las retinas izquierdas se observó una clara discordancia entre el número de CGR-FG⁺ y el número de CGR-Brn3a⁺. Estos datos apoyan la idea de que la pérdida de CGR retrógradamente marcadas no es sólo debido a la muerte de CGR sino también una alteración del transporte axonal retrógrado activo

En ratón, en las retinas no tratadas se observó que las CGR-OHSt⁺ y las CGR-Brn3a⁺ tienen una distribución paralela, con las más altas densidades en la hemirretina superior formando la típica estría visual orientada horizontalmente (**Fig. 34A-D**).

La media $\pm$ DE del número total de CGR-Brn3a⁺ en las retinas derechas fue a 8 y 35 días, 49.375 ± 2.822 ($n=12$) y 50.577 ± 2.036 ($n=9$) (**Fig. 33B**), respectivamente. En las retinas FL izquierdas examinadas a los mismos tiempos había 24.343 ± 5.739 ($n=12$) y 10.219 ± 8.887 ($n=9$) CGR-Brn3a⁺, respectivamente. En cuanto a la población de CGR-OHSt⁺ en las retinas derechas fue, a 8 y 35 días de 47.223 ± 2.936 ($n=12$) y 49.649 ± 2.693 ($n=9$) respectivamente, mientras que en sus correspondientes retinas izquierdas fue 13.428 ± 6.295 ($n=12$) y 10.522 ± 9.426 ($n=9$) respectivamente. Así, el porcentaje de CGR que mantiene su TAR activo funcional es el 28% y el 21% de la población presente en las retinas derechas, a 8 y 35 días post FL, respectivamente, mientras que la supervivencia de CGR es del 49% y el 20%, a los correspondientes puntos temporales. Esto se observa gráficamente en los mapas de isodensidad (**Fig. 34**) donde a los 8 (**Fig. 34E-F**) pero no a los 21 (**Fig. 34G-H**) días tras la FL hay más colores cálidos en el mapa de isodensidad correspondiente a las CGR-Brn3a⁺ lo que refleja, gráficamente, un mayor número de CGR vivas que de células que mantienen su TAR íntegro.

En conclusión, durante las 5 primeras semanas después de la FL hay una muerte de CGR, como se evidencia por la disminución progresiva del número total de CGR-Brn3a⁺ a 8 y 35 días después del láser (*Mann-Whitney test*, $p=0,0004$), pero hay también un daño temprano en el transporte axonal retrógrado puesto que en las retinas izquierdas a 8 días, se observó una clara discordancia entre el número de CGR-OHSt⁺ y el número de CGR-Brn3a⁺. Sin embargo, la alteración del flujo axonal retrógrado no progresa, ya que a 35 días después del tratamiento el número de ambas poblaciones fue comparable (*Mann-Whitney test*, $p=0,9397$) (**Fig. 33B**).

En resumen, estos experimentos indican que la pérdida de CGR retrógradamente marcadas tanto en rata como en ratón no es debida sólo a la muerte de CGR, sino también a un daño en el transporte axonal retrógrado activo.

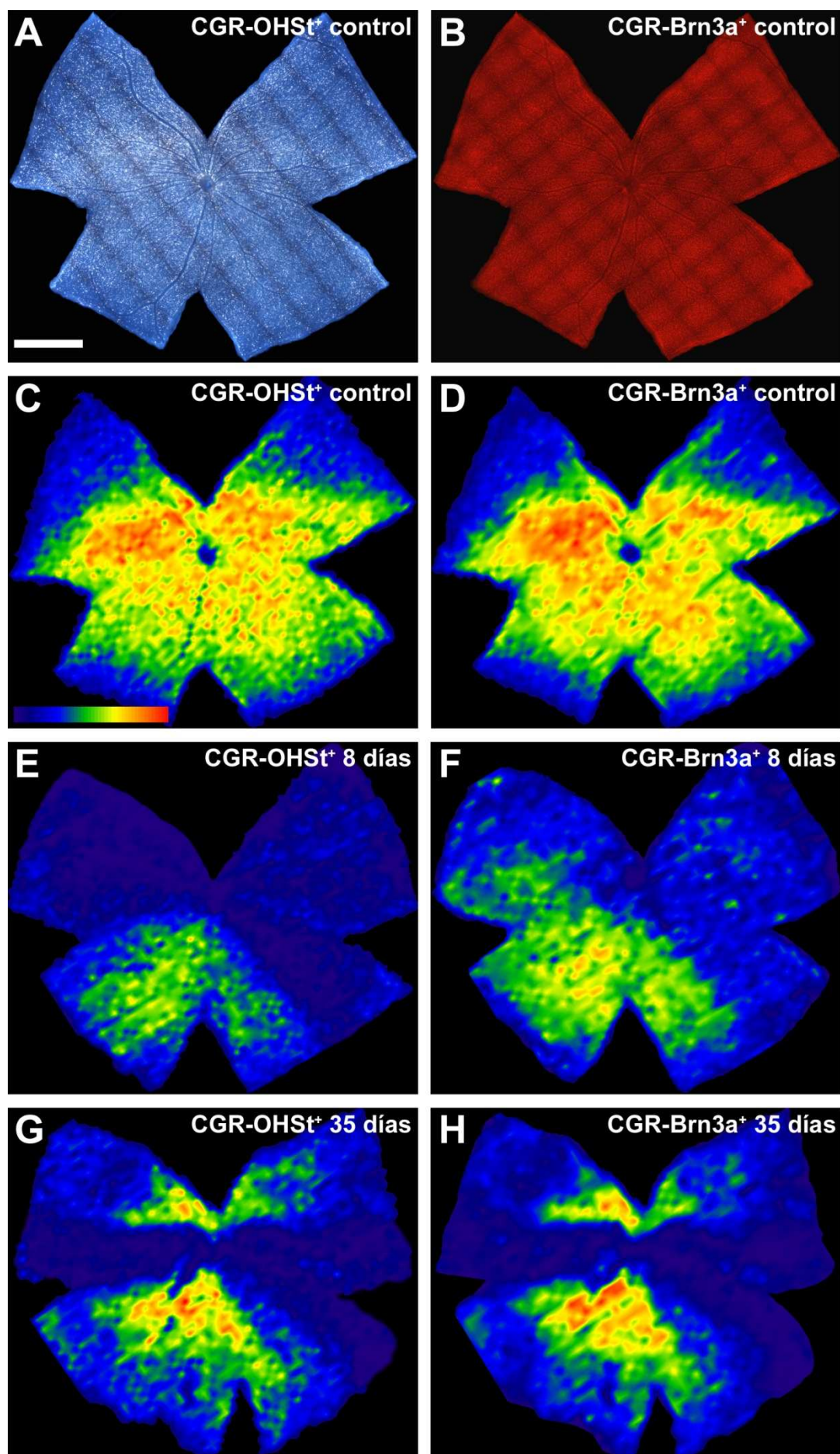


Figura 34. La ausencia de CGR marcadas retrógradamente es debida al daño del transporte axonal y a la degeneración de las CGR. A-D: fotomontajes de una retina representativa control de ratón marcada con 10% de hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) (**A**) y su mapa de isodensidad (**C**), así como la misma retina inmunomarcada con Brn3a (**B**) y su correspondiente mapa de isodensidad (**D**). Para identificar las CGR capaces del transporte axonal retrógrado activo, el OHSt fue aplicado en ambos colículos superiores una semana antes del procesado del animal y para identifica las CGR que sobreviven se realizó la inmunofluorescencia del Brn3a. En el mapa de isodensidad de CGR marcadas con OHSt (**C**) y marcadas con Brn3a (**D**) se observa la presencia de CGR marcadas distribuidas por toda la retina control, con la típica región de alta densidad a lo largo de la estría naso-temporal en la retina superior. **E-H:** mapas de isodensidad de ejemplos representativos de retinas experimentales a 8 (**E, F**) y 35 (**G, H**) días después de la FL. **E, G:** son los mapas de isodensidad de las CGR marcadas con OHSt y **F, H** los marcadas con Brn3a. Ambas retinas experimentales muestran menos CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ que en la retina control. Además, la población de CGR-Brn3a⁺ fue mayor que la de CGR-OHSt⁺ a 8 pero no a 35 días, indicando que el transporte axonal retrógrado activo está comprometido dentro de la primera semana después de la FL y demostrando que la ausencia del marcaje retrógrado en la retina es debido no solo a la degeneración de las CGR sino también a un daño en el flujo axoplasmático. La disminución en el número de CGR-Brn3a⁺ observado entre la retina control y las retinas analizadas 8 y 35 días después de la FL también documenta la degeneración de las CGR. Para todas las retinas, el polo dorsal está orientado a las 12 en punto. Barra de escala: 1mm. Escala de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 5.625 o más alto CGR/mm² (rojo).

4.2.6. ¿LA ALTERACIÓN DEL TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO ES FUNCIONAL O MECÁNICA?

Para responder a esta pregunta, las CGR, tanto de rata como de ratón, fueron doblemente marcadas, mediante la aplicación del FG aplicado en ambos CS para estudiar las CGR que mantienen el transporte axonal retrógrado activo y de DTMR aplicado en el MNO proximal para identificar las CGR con un axón competente a nivel de la cabeza del NO.

La mayoría de las ratas sacrificadas a 2, 3, 8 y 12 semanas tenían sus retinas izquierdas doblemente marcadas con FG y DTMR. Dos semanas después de la FL las retinas mostraron los típicos sectores desprovistos de CGR-FG⁺. Casi todas las CGR-FG⁺ presentes estaban doblemente marcadas con DTMR, pero no a la inversa. (**Fig. 35**). En las retinas control contralaterales (n=4) se contó un total de 5.012 CGR-DTMR⁺ y, aproximadamente, el 99% de estas fueron también FG⁺. En las retinas FL (n=4) de un total de 2.401 CGR-DTMR⁺ sólo el 14% fueron también FG⁺. Estos resultados muestran que el transporte pasivo de DTMR ocurre en una población mayor que la población de CGR que la que todavía conserva el TAR desde el CS, lo que implica un daño funcional del transporte axonal retrógrado anterior al de la difusión pasiva. A 3 o más semanas después del FL, hubo una muy buena correlación entre los sectores de las retinas desprovistas de CGR-FG⁺ y CGR-DTMR⁺, y viceversa (**Fig. 36**), sugiriendo que la ausencia de CGR marcadas a estos tiempos más largos, es debida no sólo a un daño en el TAR desde el CS, sino también a una pérdida de la difusión pasiva desde la cabeza del NO.

Las retinas izquierdas de los grupos de ratones sacrificados a 17, 35 ó 63 días fueron también doblemente marcadas con OHSt y DTMR. En general hubo una buena correlación entre las áreas de la retina desprovistas de CGR-OHSt⁺ y las áreas desprovistas de CGR-DTMR⁺ (**Fig. 37**).

Estos datos documentan que la ausencia de CGR marcadas es debida no sólo a un daño en el TAR activo desde el CS, sino también a una pérdida de la difusión pasiva a lo largo del axón de las

CGR desde la cabeza del NO, y esto es consistente con la idea de una obstrucción mecánica que alteraría la difusión pasiva y el transporte axonal retrógrado activo.

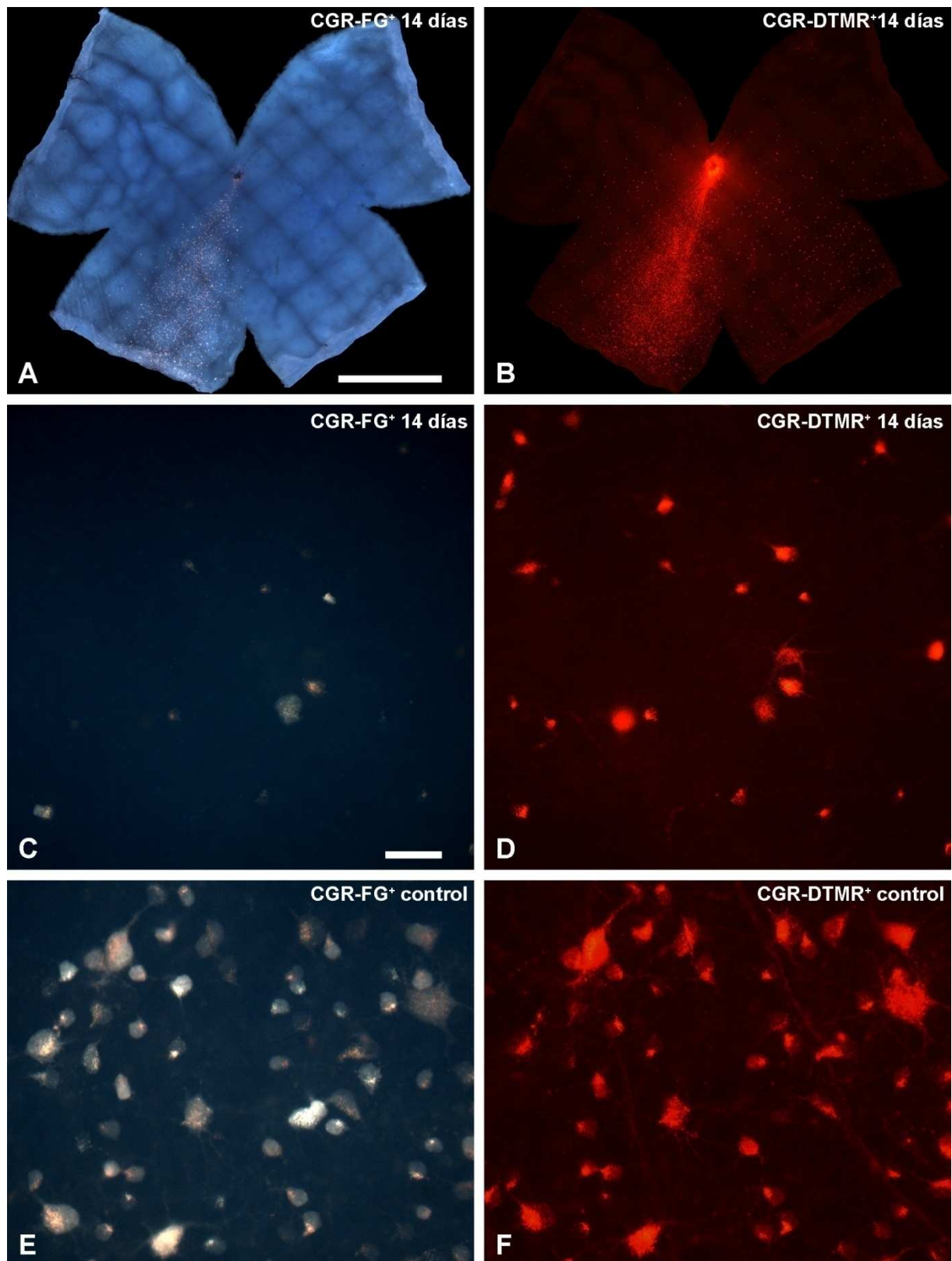


Figura 35. Distribución espacial de las CGR-FG⁺ o DTMR⁺ 2 semanas después de la fotocoagulación por láser en rata donde el daño funcional del transporte axonal retrógrado activo es anterior a la alteración de la difusión pasiva. A, B: fotomontaje de una retina izquierda representativa experimental doblemente marcada con FG (A) y con DTMR (B) de animales procesados 14 días después de la FL. Se observa la ausencia de correspondencia entre las áreas que contiene CGR-FG⁺ (A) las cuales están restringidas a un pequeño sector localizado entre las 6 y 7 en punto horarias y las CGR-DTMR⁺ (B) que se distribuyen en una área mayor en la retina. **C, D:** imágenes de regiones representativas de retina izquierda experimental mostrando una clara discordancia entre el número de CGR-FG⁺ (C) y el de CGR-DTMR⁺ (D), el número de CGR marcadas retrógradamente con DTMR es mayor al número de CGR-FG⁺ para la misma región, solo el 14% de las CGR-DTMR⁺ fueron también marcadas con FG. **E, F:** Imágenes representativas de retinas derechas controles montadas a plano mostrando una clara correspondencia entre el número de CGR-FG⁺ (E) y de CGR-DTMR⁺ (F). Aproximadamente el 99% de las CGR-DTMR⁺ fueron también FG⁺. Estas observaciones documentan que en las ratas con HTO, 2 semanas después de la FL, el transporte retrógrado activo está dañado antes que la difusión pasiva del DTMR desde la cabeza del NO. El polo superior de la retina está orientado a las 12 en punto horarias. Barra de escala: **A, B:** 1mm. **C, D, E, F:** 50µm.

4.2.7. ANÁLISIS TEMPORAL DE LOS CAMBIOS DEGENERATIVOS DE LA CAPA DE FIBRAS NERVIOSAS DE LA RETINA DESPUÉS DE LA FOTOCOAGULACIÓN CON LÁSER

Para estudiar la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), que está formada por los axones de las CGR, éstos se inmunoidentificaron por su expresión de la cadena pesada del neurofilamento fosforilada (pNFH). En retinas control, esta proteína se expresa en los axones estabilizados y, por lo tanto, se circunscribe a la porción más distal del axón que se localiza dentro de la retina media y central donde se agrupan los axones en haces y convergen en el disco óptico. La expresión anormal de pNFH es indicativa de daño axonal (*Drager y cols., 1984; Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Pérez y cols., 1988, 1996, 1998; Wang y cols., 2000, 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006; Parrilla-reverter y cols., 2009b*). Las características degenerativas observadas focalmente en los haces de axones en los NO del grupo 1.2 (**Fig. 25I-K**) incitaron el estudio de la capa de fibras nerviosas en las retinas FL.

En rata, las retinas control mostraron el típico marcaje de pNFH confinado a la porción más distal del axón. Estos axones están uniformemente marcados y su morfología es rectilínea, muy raramente un axón está marcado en la periferia de la retina o se observa expresión de pNFH en el soma o dendritas de las CGR (**Fig. 38A**).

Las retinas FL muestran, principalmente en los sectores de la retina desprovistas de CGR-FG⁺, signos de degeneración axonal retrógrada con una expresión anormal de pNFH que consiste, principalmente, en acumulaciones anormales de esta proteína en los axones y en los somas y dendritas primarias de las CGR (**Fig. 38E-F**). En los axones en degeneración se observa acúmulos en forma de rosario y pequeñas varicosidades altamente pNFH⁺ (**Fig. 38E, F**). Ocho días después de la FL no hubo expresión aberrante de pNFH en los somas de las CGR, aunque sí se observó que los axones de las CGR que eran pNFH⁺ en su porción más proximal localizada en la retina periférica (**Fig. 38B-C**). Dos semanas después de la FL la periferia de la retina mostró algunos axones de las CGR con varicosidades y estructuras en forma de rosario altamente pNFH⁺. Además, también se observó la expresión anormal de esta proteína en algunos somas y dendritas de las CGR. Este patrón

patológico de expresión de pNFH aumentaba con el tiempo y así a 17 y 21 días después de la FL, aparecían cambios en la distribución de pNFH más generalizados, encontrándose dentro de la retina media y periferia numerosas CGR que expresaban en su soma pNFH con diferente intensidad (CGR-pNFH⁺), así como más axones con las acumulaciones anormales de pNFH. Fue muy rara la observación de una CGR-FG⁺ que fuera pNFH⁺ o viceversa (Fig. 38F, G). La disminución en la densidad de haces de axones en la retina central y periférica no fue obvia hasta 12 semanas después de la FL, momento en el que las CGR-pNFH⁺ fueron infrecuentemente observadas, lo que indica que las fibras de las CGR degeneran muy lentamente, puesto que a las 2 semanas ya se ha producido la desconexión entre las CGR y sus territorios de inervación.

En ratón, las retinas control contralaterales mostraron la típica inmunorreactividad de pNFH confinada en la porción más distal de los axones dentro de la retina media y central, donde se agrupan en haces y convergen al disco óptico. Al igual que en rata, raramente los axones en la periferia de la retina o los somas o dendritas de las CGR expresaban esta proteína.

Las retinas experimentales de ratón muestran, principalmente en los sectores de la retina desprovistos de CGR-OHSt⁺, expresión anormal del pNFH signo de degeneración axonal retrógrada tal como lo descrito en rata. Fue rara la observación de una CGR-OHSt⁺ y pNFH⁺ a la vez, de hecho las áreas con CGR-OHSt⁺ presentaron muy pocas anomalías, como recientemente se describió para otros modelos congénitos de hipertensión ocular (Jakobs y cols., 2005; Schlamp y cols., 2006, Howell y cols., 2007; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008). No hubo cambios evidentes en la expresión de pNFH a 8 días post FL, mientras que a 17 días post FL numerosos somas y dendritas de las CGR fueron pNFH⁺. A 35 y 63 días, los cambios mencionados arriba en el patrón de expresión axonal del pNFH habían evolucionado más y había menos CGR-pNFH⁺. A 63 días después de la FL, hubo una disminución en la densidad de haces de axones marcados con pNFH en la retina central y periférica, y las CGR-pNFH⁺ raramente se observaron.

En resumen, nuestros descubrimientos en la expresión aberrante del pNFH después de la HTO, son paralelos a los acontecimientos degenerativos en la capa de CGR que siguen a la axotomía del NO, los cuales se desarrollan algo más despacio cuando la lesión es debida a la compresión axonal que cuando es debida a la sección axonal (Parrilla-Reverter y cols., 2009b). Es decir, la degeneración axonal inducida por HTO es similar a la provocada por axotomía del NO

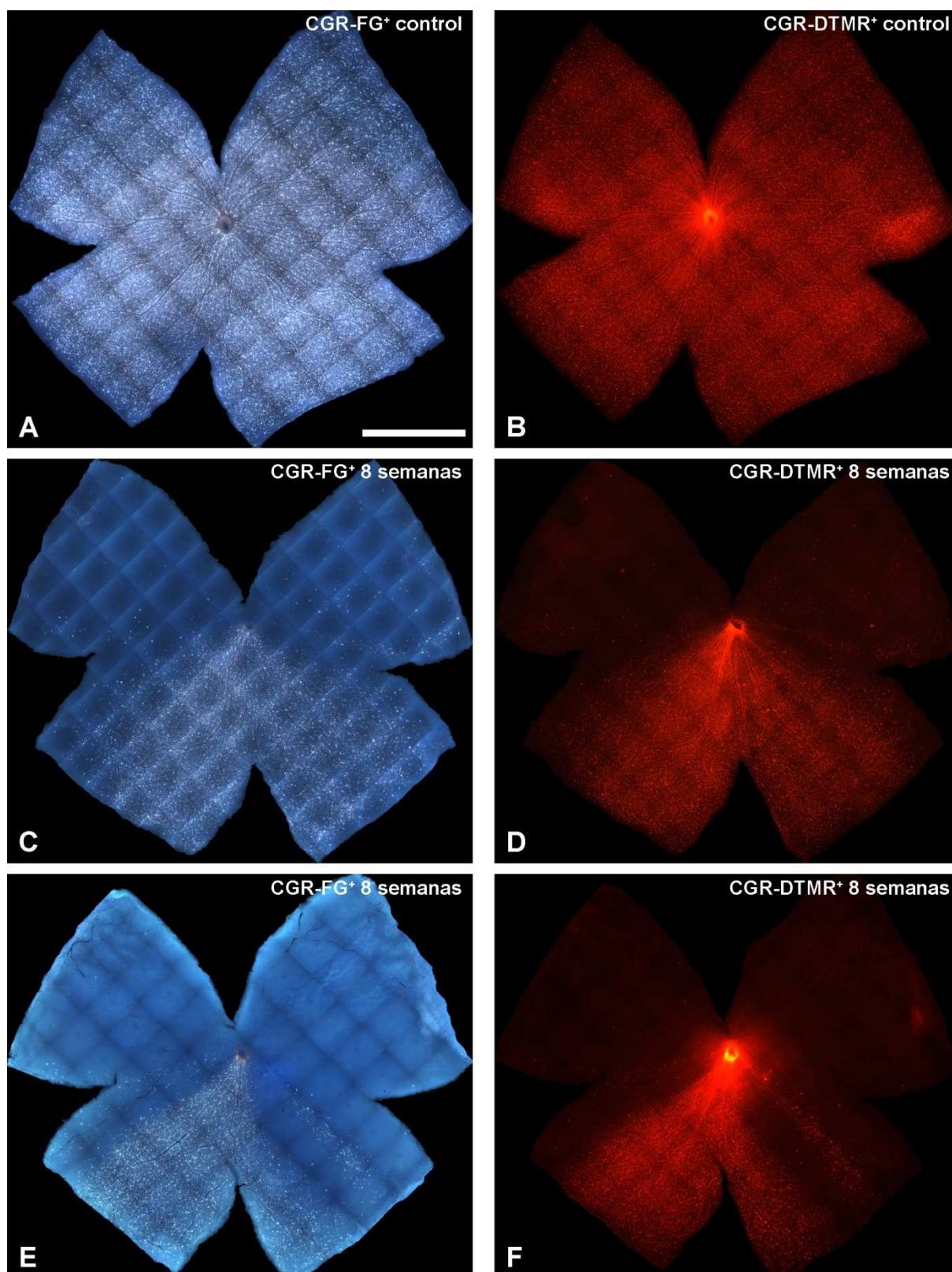


Figura 36. Distribución espacial de las CGR-FG⁺ o DTMR⁺ a 8 semanas después de la fotocoagulación por láser en rata. Fotomontajes de retinas de rata representativas de 8 semanas después de la fotocoagulación por láser (FL) del ojo izquierdo. **A, B:** fotomontaje de una retina derecha control representativa mostrando las CGR, doblemente marcadas con FG (**A**) y con DTMR (**B**) que están distribuidas por toda la retina. **C-F:** Fotomontaje de retinas experimentales

representativas de 8 semanas después de la FL mostrando las CGR doblemente marcadas con FG (**C, E**) y con DTMR (**D, F**). Hay una fuerte correspondencia entre las áreas desprovistas de CGR marcadas retrógradamente con ambos trazadores para cada retina. En **C, D**: el área con CGR marcadas retrógradamente con ambos trazadores está localizada en un sector entre las posiciones 4 y las 8 en punto, mientras que en **E, F** muestra las regiones que contienen CGR marcadas retrógradamente a un pequeño sector localizado entre las 4 y 4.30, y a otro sector entre las 5 y 8 en punto. Estos descubrimientos documentan que la ausencia de CGR marcadas retrógradamente es debida no sólo a un daño en el transporte axonal retrógrado activo desde el CS hacia la retina, sino también a un verdadera pérdida de la difusión pasiva a lo largo del axón de las CGR desde la cabeza del NO, y esto es consistente con la idea de una obstrucción mecánica alterando la difusión pasiva y el transporte axonal retrógrado activo. Para todas las retinas el polo dorsal está orientado a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm.

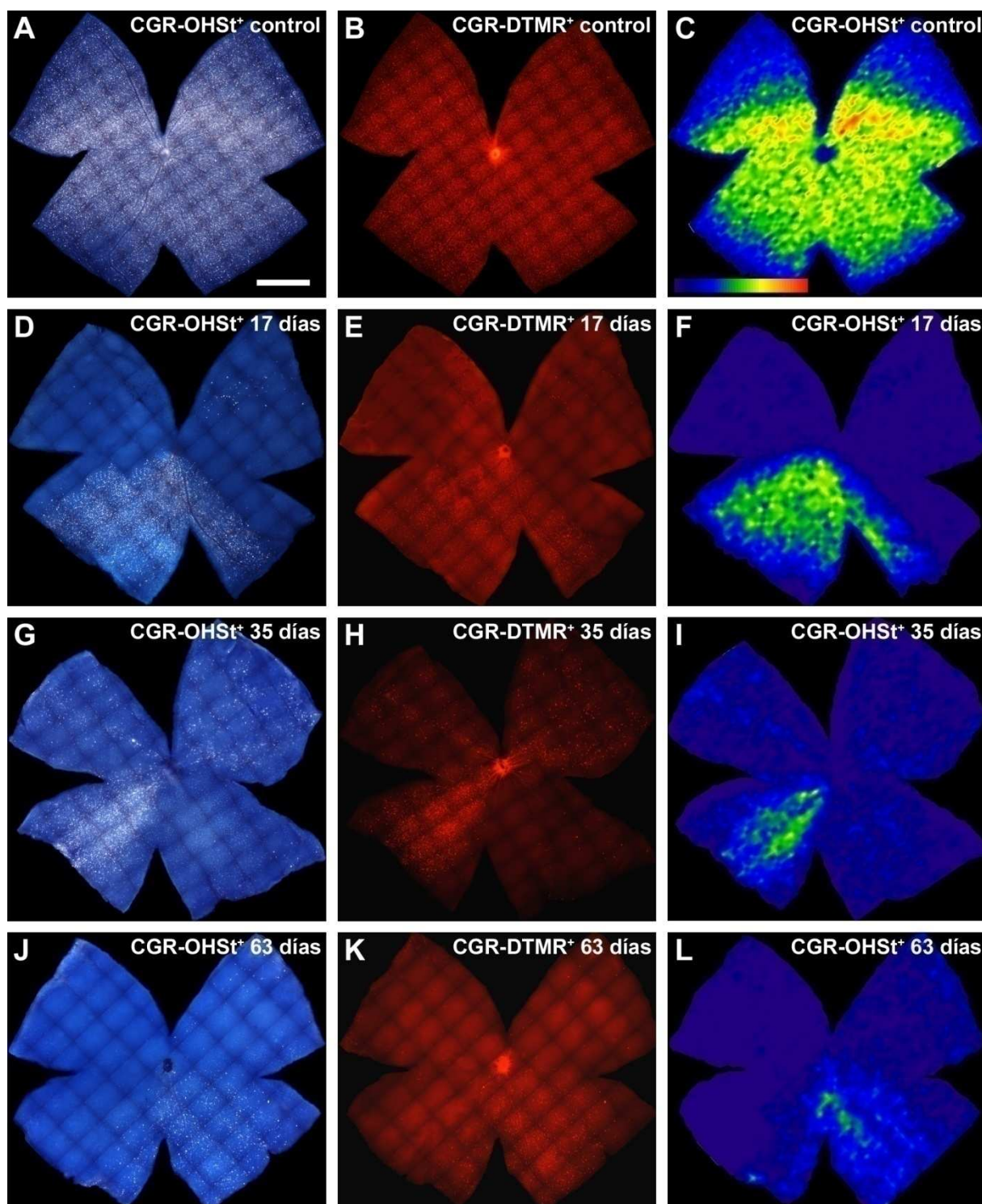


Figura 37. Distribución de las células ganglionares de la retina de ratones marcadas con dextrano tetrametilrodamina (DTMR) y 10% de hidroxistilbamina metanosulfonato (OHSt) a 17, 35 ó 63 días después de la FL. Fotomontajes de retinas doblemente marcadas con OHSt aplicado una semana antes y con DTMR aplicado 2 días antes del procesamiento del animal, de ratón Swiss representativas de diferentes intervalos de supervivencia después de la fotocoagulación por láser (FL) del ojo izquierdo. **A-C:** fotomontaje de una retina derecha control representativa doblemente marcada con OHSt (**A**) y su correspondiente mapa de isodensidad (**C**) y con DTMR (**B**). Hay un intenso marcado de las CGR que se distribuyen por todas partes de la retinas, pero las densidades más altas están presentes en una región a lo largo del eje naso temporal de la retina superior, pareciéndose a una estría visual. **D-F:** fotomontaje de una retinas

experimental izquierda representativa del grupo II (17 días después de la FL) mostrando la presencia de CGR marcadas con OHSt (D) en un sector que comprende desde las 4 y media a las 8 y media, que se aprecia mejor en su correspondiente mapa de isodensidad (F). La misma retina marcada con DTMR (E), el mismo sector de la retina muestra CGR marcadas con DTMR. G-I: fotomontaje de una retina experimental representativa del grupo III (35 días después de la FL) muestra una importante disminución en el número de CGR-OHSt⁺ (G) en todos los cuadrantes de la retina, excepto en el infero-nasal. Cuando marcamos con DTMR (H), el mismo cuadrante de la retina desprovista de CGR-OHSt⁺ muestra pocas o ninguna CGR marcadas con DTMR. El mapa de isodensidad para las CGR-OHSt⁺ (I) ilustra las áreas desprovistas de CGR. J-L: fotomontaje de una retina representativa del grupo IV (63 días después de la FL) que muestra una ausencia de CGR-OHSt⁺ (J) principalmente dentro de la hemirretina superior y del cuadrante supero-temporal. Marcado con DTMR (K), el mismo cuadrante de la retina muestra pocas o ninguna CGR-DTMR⁺. El mapa de isodensidad de CGR-OHSt (L) también ilustra las áreas con pérdida localizada de CGR, así como un pequeño sector del cuadrante inferior temporal que muestra pérdida difusa de las CGR retrógradamente marcadas. Hay una estrecha correspondencia de las áreas desprovistas de CGR marcadas retrógradamente con ambos trazadores para cada retina, sugiriendo que la ausencia de CGR marcadas es debido no sólo a un daño en el transporte axonal retrógrado desde el CS sino también a una pérdida de la difusión pasiva desde la cabeza del nervio óptico y esto es consistente con la idea de una obstrucción mecánica. Para todas las retinas, el polo dorsal está orientado en la posición de las 12 en punto. Barra de escala: 1mm. Escala de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 5.625 o más alto CGR/mm² (rojo), en C inferior-izquierda.

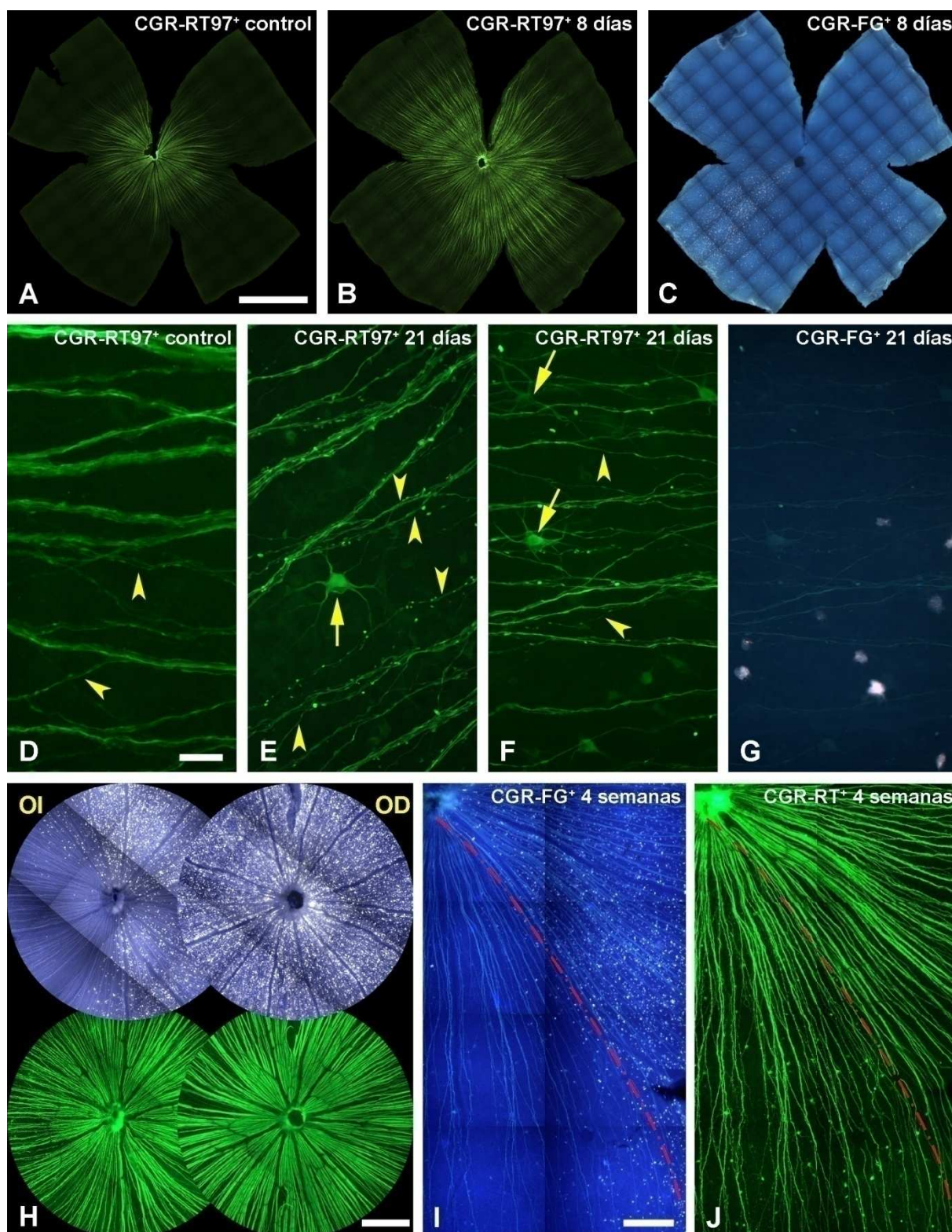


Figura 38. La HTO induce la degeneración axonal retrógrada característica de la axotomía. En retinas procesadas en todos los grupos experimentales, desde 8 días a 12 semanas después de la FL, la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) fue examinada por su expresión de pNFH (RT97). **A:** El patrón de expresión del pNFH en la retina control está restringido a la retina media y central donde los axones inmunomarcados de las CGR convergen hacia el disco óptico, mientras que hay pocos axones pNFH⁺ en la periferia de la retina. **B:** En contraste con las retinas control, el patrón de

expresión de pNFH a 8 días después de la FL se extiende a la retina central, media y periférica. **C**: La distribución de las CGR-FG⁺ aplicado en ambos CS 1 semana antes del procesado, de la misma retina mostrada en **B**, está restringida a un pequeño sector triangular del cuadrante inferonasal entre las 7 y 8 en punto y otro pequeño entre las 2.30 y 3.30 en la hemirretina temporal. **D-G**: detección de pNFH en regiones representativas de una retina control (**D**) y de retinas experimentales (**E-G**) procesadas a 21 días después de la FL. **D**: En retinas control la expresión de pNFH está restringida a los haces de axones (cabeza de flechas) en la retina media y central. **E**: en retinas lesionadas, se observa una expresión anómala de pNFH en el soma de las CGR (flechas) así como en sus axones que presentan forma de cuenta de collar pNFH⁺ (cabeza de flechas). **F**: numerosas CGR intensamente pNFH⁺ están presentes en esta región de la retina lesionada. Esta expresión aberrante de pNFH no se observa en los somas de las CGR-FG⁺ (**G**) que hay en esta región lesionada. **H, I, J**: imágenes de regiones representativas de retinas experimentales 4 semanas después de la FL. **H**: regiones centrales de la retina izquierda experimental (OI) y la derecha control (OD) de una rata mostrando CGR marcadas con FG (arriba) y la expresión en la CFNR (abajo) del pNFH. Las retinas FL muestran un gran sector (localizado entre las 6 y 11 en punto) desprovista de CGR marcadas retrógradamente con FG. En esta misma región los axones pNFH⁺ muestran signos de degeneración axonal retrógrada. **I**: magnificación de una retina izquierda experimental representativa mostrando un sector que tiene muy pocas CGR-FG⁺. Se observa que a 4 semanas después de la lesión, en esta zona las CGR que aún persisten muestran las características típicas de la degeneración axonal retrógrada inducida por axotomía, tales como una intensa expresión de pNFH en los somas y dendritas primarias. La línea discontinua delinea el borde del sector. El polo dorsal está orientado a las 12 en punto horarias. Barra de escala para **A, B, C**: 1mm. **D, E, F, G**: 50µm. **H**: 500µm. **I, J**: 300µm. OD: ojo derecho, OI: ojo izquierdo.

4.2.8. DISTRIBUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CGR-pNFH⁺

El siguiente análisis consistió en la cuantificación, tanto en rata como en ratón, del número total de CGR-pNFH⁺ en retinas controles y experimentales, de las retinas analizadas a 21 y 17 días, en rata y en ratón tras la FL, respectivamente. Se escogió para el análisis este tiempo porque en artículos previos (*Parrilla-Reverter y cols., 2009b*) se determinó que las CGR axotomizadas tienen su máxima expresión del pNFH en el soma celular alrededor de estos intervalos. En este estudio se tuvo en cuenta la intensidad de la señal, fuerte o débil. Los resultados se muestran en esta tabla:

Tabla 4. Tabla que presenta la media y DE del número total de CGR-pNFH⁺ de retinas control derechas y experimentales izquierdas, de ratas (SD) y ratones (Swiss), analizadas a 21 y 17 días después de la FL.

	Rata		Ratón	
	Control n=5	21 días post-FL n=10	Control n=5	17 días post-FL n=5
Número total de CGR-pNFH⁺	2	8.291	40	1.342
Media ±DE	0,25±0,38	829±477	8±7	268±96
Máximo número de CGR-pNFH⁺ en una retina	1	1.669	15	415
Mínimo número de CGR-pNFH⁺ en una retina	0	186	0	165
% CGR-pNFH⁺ débil	100	30	100	27
% CGR-pNFH⁺ fuerte	0	70	0	63

Aunque la población de CGR-pNFH⁺ representó, en el mejor de los casos, sólo el 1 y 2% de la población normal de CGR en ratón y rata, respectivamente, su número en las retinas FL mostró un tremendo aumento cuando las comparamos con las controles.

En ambas especies, en las mismas retinas en que fueron cuantificadas, se comparó la distribución de las CGR-pNFH⁺ con la de las CGR-FG⁺ u OHSt⁺. Se observó que las CGR-pNFH⁺ estaban distribuidas principalmente en regiones desprovistas de CGR trazadas (**Figs. 39, 40**).

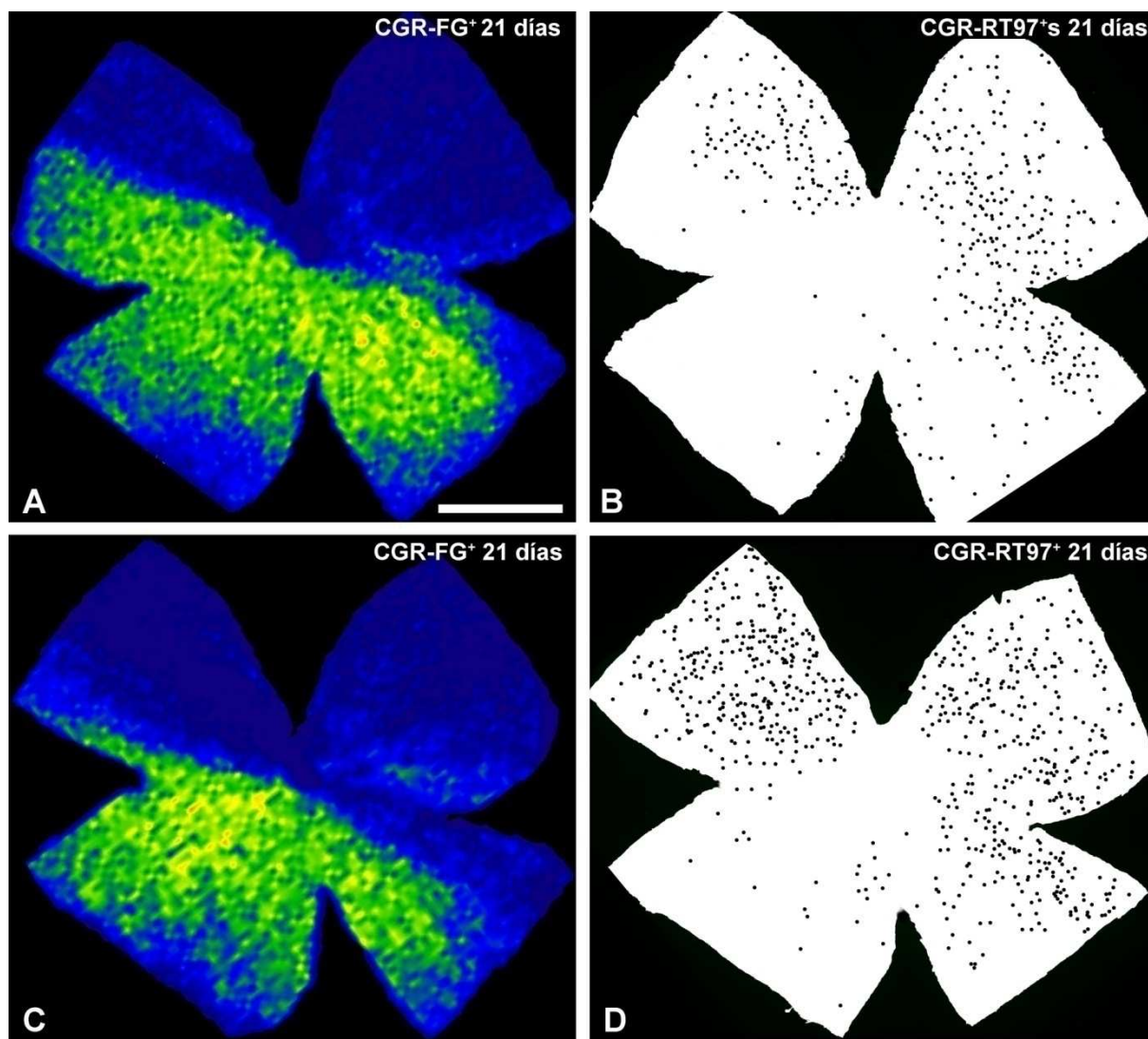


Figura. 39. Diferente distribución en la retina de las CGR-pNFH⁺ y CGR-FG⁺ a 21 días tras la inducción de la HTO en rata. **A** y **C**: mapas de isodensidad en el que se muestra, en dos retinas distintas experimentales de rata, la distribución de las CGR marcadas retrógradamente con FG (CGR-FG⁺) a los 21 días tras la inducción de la HTO. En estas mismas retinas se puntearon las CGR en cuyos somas se expresa aberrantemente pNFH (CGR-RT97⁺) y su distribución se muestra en **B** y **D**, respectivamente. En la retina **A**, se cuantificaron 52.126 CGR-FG⁺ y 395 CGR-pNFH⁺ y en la **C**, 33.443 CGR-FG⁺ y 701 CGR-pNFH⁺. En ambos casos hay una ausencia de correspondencia entre las áreas que contienen CGR-FG⁺ y las que contienen CGR-pNFH⁺. Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala en las retinas: 1mm. Escala de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 3.500 o más CGR/mm² (rojo).

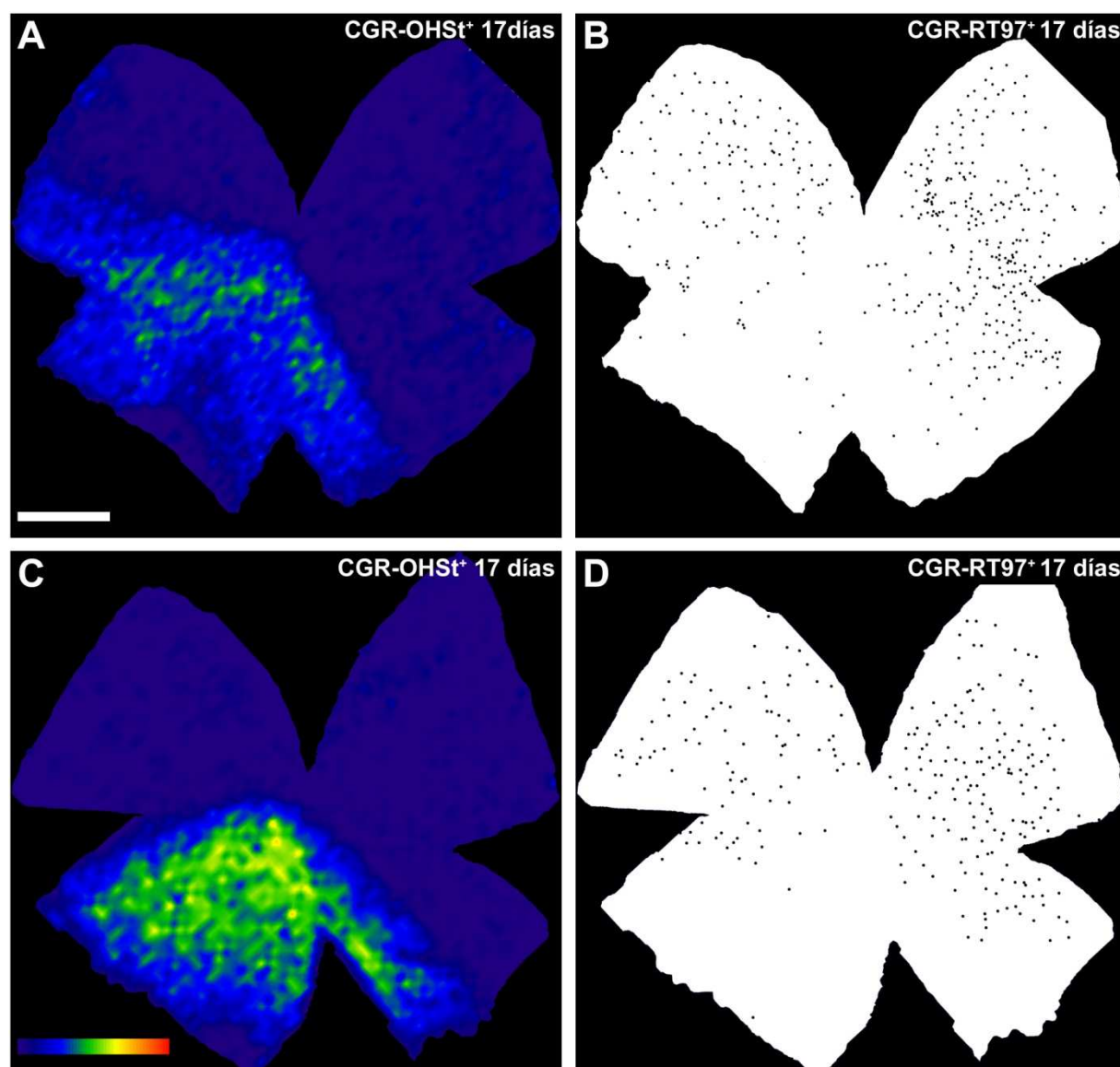


Figura. 40. Diferente distribución en la retina de las CGR-pNFH⁺ y CGR-FG⁺ a 17 días tras la inducción de la HTO en ratón. **A** y **C**: mapas de isodensidad en el que se muestra, en dos retinas distintas experimentales de ratón, la distribución de las CGR marcadas retrógradamente con OHSt (CGR-OHSt⁺) a los 17 días tras la inducción de la HTO. En estas mismas retinas se puntearon las CGR en cuyos somas se expresa aberrantemente pNFH (CGR-RT97⁺) y su distribución se muestra en **B** y **D**, respectivamente. En la retina **A**, se cuantificaron 12.821 CGR-OHSt⁺ y 415 CGR-pNFH⁺ y en la **B**, 10.911 CGR-OHSt⁺ y 269 CGR-pNFH⁺. En ambos casos hay una ausencia de correspondencia entre las áreas que contienen CGR-FG⁺ y las que contienen CGR- pNFH⁺. Todas las retinas están orientadas con el polo superior a las 12 en punto horarias. Barra de escala: 1mm. Escala de densidad: desde 0 (azul oscuro) a 5.625 o más CGR/mm² (rojo).

4.2.9. EFECTO DE LA HTO EN LAS CÉLULA DE LA CAPA DE CGR

Si el daño inducido por la HTO se produjera únicamente en la cabeza del nervio óptico, las CGR serían las únicas neuronas de la retina que estarían afectadas pero, si por el contrario existiera un componente isquémico en la retina, además de las CGR se perderían las otras células de la capa de CGR, que serían principalmente las células amacrinas desplazadas, que constituyen el 50% de las células de esta capa (Covey y Perry, 1979; Perry, 1979, 1981; Perry y cols., 1983; Drager y Olsen, 1981; Jeon y cols., 1998). Como la inmunodetección de las células amacrinas desplazadas no es posible pues no existe, hasta la fecha, ningún marcador específico de las mismas, decidimos teñir los núcleos de todas las células con DAPI. Esta es una tinción inespecífica y por lo tanto se teñirán todos los núcleos: los de las CGR, que serán discriminados por la inmunodetección de Brn3a y el resto que serán en su mayoría núcleos de las células amacrinas desplazadas y en mucha menor proporción, núcleos de las células endoteliales y de la microglía, que son alargados y distinguibles morfológicamente.

Para determinar si la muerte de las CGR es debido a un factor isquémico, en 9 ratas SD analizamos sus retinas a 4 semanas después de la FL, identificamos las CGR que sobreviven mediante la inmunodetección del marcador molecular Brn3a⁺ e identificamos las células totales que sobreviven en la capa de CGR mediante la tinción nuclear DAPI.

En retinas control hubo aproximadamente en la capa de CGR el doble de células DAPI⁺ que Brn3a⁺ (Fig. 41) ya que se marca el núcleo de todas las células que hay en la capa de CGR que en su gran mayoría está constituida por las CGR y las células amacrinas desplazadas en igual proporción (Covey y Perry, 1979; Perry, 1979, 1981; Perry y cols., 1983; Drager y Olsen, 1981; Jeon y cols., 1998).

En regiones lesionadas de retinas FL se observó que las CGR-Brn3a⁺ supervivientes estaban restringidas a la típica forma en sectores con el vértice apuntando hacia el disco óptico, y en estas zonas con muy pocas o ninguna CGR-Brn3a⁺ había muchas células DAPI⁺, en mucha mayor proporción que en las retinas controles. Lo que indica que la HTO induce una pérdida selectiva de las CGR que no afecta a otras células de la capa de CGR. Estos datos sugieren que la HTO induce un daño en los axones a nivel de la cabeza del NO, sin afectar a otras células de la retina, y excluyendo la isquemia retiniana como causa de la muerte de las CGR.

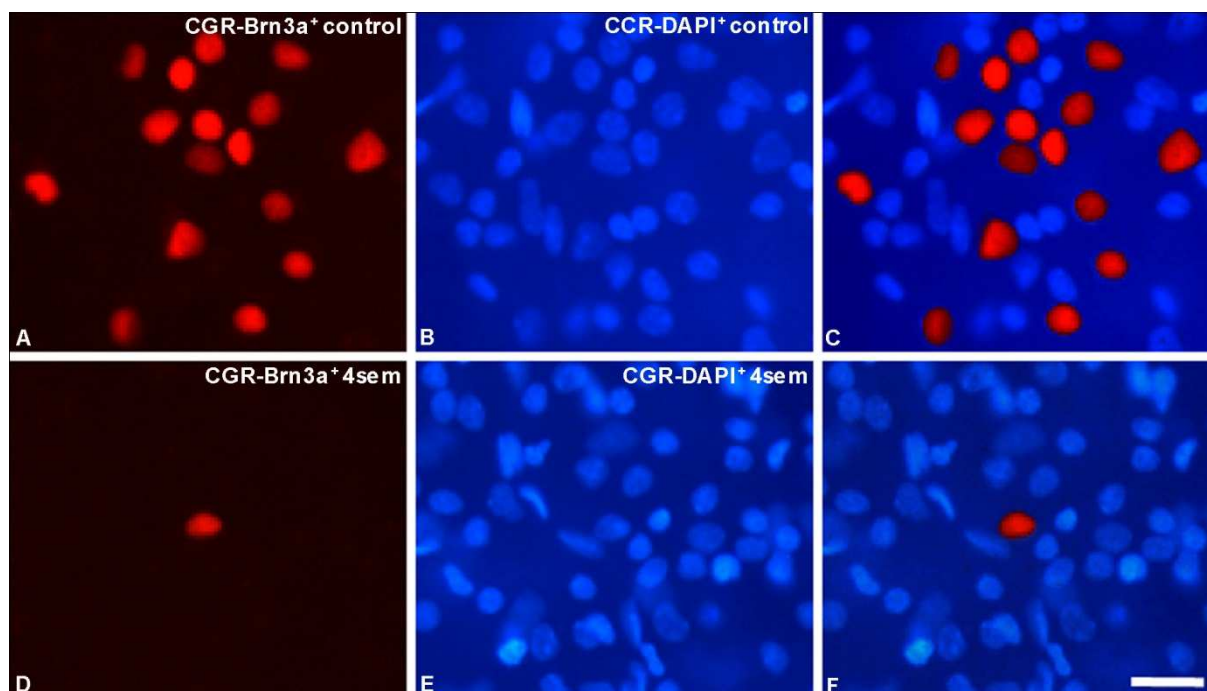


Figura 41. Después de la fotocoagulación por láser hay una pérdida de CGR, pero no de otras células de la capa de CGR. Micrografías representativas de una retina control (**A-C**) y otra experimental de rata SD analizada a 4 semanas después de la fotocoagulación por láser (**D-F**). Las CGR están doblemente identificadas, mediante la inmunodetección del Brn3a (rojo) mostrando las CGR que sobreviven y mediante la tinción del núcleo por DAPI (azul). En **A** se observan los núcleos Brn3a⁺, correspondientes a las CGR y en **B** todas las células que hay en la capa de CGR en esta misma región de una retina control. En este experimento se observa que todas las CGR son Brn3a y DAPI positivas, pero no todas las células de esta capa son CGR, ya que hay núcleos DAPI positivos que son Brn3a negativos (**C**). En la retina control se observa que el número de CGR-DAPI⁺ es aproximadamente el doble que el de CGR-Brn3a⁺. A 4 semanas después de la inducción de la HTO, el número de CGR en las zonas lesionadas disminuye (**D**), sin embargo en este mismo área se observan muchos núcleos DAPI positivos. Es decir, la proporción de células DAPI⁺/Brn3a⁺ aumenta en la retina experimental comparado con las retinas controles (**F**) lo que indica que la HTO induce una pérdida selectiva de las CGR que no afecta a otras células de la capa de CGR. Por lo tanto, la HTO induce un daño en los axones a nivel de la cabeza del NO no afectando a otras células de la retina, y excluyendo la isquemia retiniana como causa de la muerte de las CGR. Barra de escala: 20µm.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En la última parte de esta tesis doctoral discutimos de forma crítica los resultados obtenidos y su posible significado, comparándolos con estudios previos, y apuntamos sus posibles implicaciones.

En primer lugar analizaremos los resultados obtenidos en la primera parte de la tesis que consiste en el estudio mediante el conteo automático de la totalidad de población de CGR retinofugal identificadas desde el MNO, la población de CGR que proyectan a los colículos superiores (CS) identificadas desde ambos CS, la población de CGR que proyecta ipsilateralmente al CS identificadas aplicando el trazador en un único CS y la población de CGR que proyecta contralateralmente al CS, identificadas aplicando el trazador en un único CS. Así como su distribución detallada representada por los mapas de isodensidad, en rata y ratón tanto albinos como pigmentados.

En segundo lugar discutimos los resultados obtenidos en el modelo experimental de HTO desarrollado en nuestro laboratorio, tanto en rata como en ratón albino, analizando el efecto de la HTO en el transporte axonal retrógrado, la supervivencia de la población total de las CGR, y los cambios en los axones que componen el NO y la CFNR.

5.1. POBLACIÓN DE LAS CGR EN ROEDORES

Mediante el método de cuantificación automático de las CGR hemos estudiado el número total de la población de CGR retinotectales, retinofugales y que decusan su axón en el quiasma óptico, y la distribución detallada espacial de estas poblaciones en ratas albinas adultas (SD) y pigmentadas (PVG), así como en ratones albinos (Swiss) y pigmentados (C57).

5.1.1. MÉTODO DE CONTEO AUTOMÁTICO DE LAS CGR

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se realizaron estimaciones cuantitativas de la población de las CGR que consistieron en la identificación y conteo manual de las CGR marcadas retrógradamente sobre fotografías muestreadas de forma estándar de regiones representativas en la retina. El área total cuantificada de esta manera era sólo una pequeña porción de la retina. Aunque el conteo manual puede ser exacto en las manos de expertos (*Vidal-Sanz y cols., 2001*), es un método tedioso y parcial con una pérdida de información debido al muestreo, por lo que es importante obtener un procedimiento de conteo reproducible, rápido, imparcial y objetivo que permita el análisis de más retinas en menos tiempo y, a su vez, el estudio detallado de la población total de CGR en animales control, que sirva posteriormente como base para el estudio cuantitativo en diferentes neuropatías.

No hay un método perfecto para el conteo celular (*Guillery, 2002*), nuestro método de conteo automático realizado por el programa de análisis de imagen es rápido, imparcial y preciso según la validación de los resultados con el conteo manual. Además de fidedigno y reproducible tiene la ventaja de que el software informático está disponible comercialmente y es accesible para cualquier laboratorio.

Sin embargo, el método de cuantificación automática de las CGR trazadas retrógradamente no se puede utilizar en diseños experimentales donde el marcaje retrógrado es anterior a la lesión ya que se produce una interferencia con las células de microglía que se activan en retinas lesionadas fagocitando a las CGR marcadas previamente con el trazador que acumulan en los fagolisosomas y por tanto se marcan transcelularmente (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988a, 2003; Thanos y Vanselow, 1992b; Peinado-Ramón y cols., 1996; Köbbert y cols., 2000; Sobrado-Calvo y cols., 2007), ni en los casos en los que el trazador no se pueda aplicar después de la lesión. Si que se puede utilizar en condiciones normales y experimentales en las que los trazadores neuronales se puedan aplicar eficientemente después de la lesión (Vidal-Sanz y cols., 2001, 2007; Marco-Gomariz y cols., 2006; García-Ayuso y cols., 2008; Salinas-Navarro y cols., 2006, 2007, 2009c, 2010; Schenebelen y cols., 2009) y el transporte axonal retrógrado es competente (Lafuente López-Herrera y cols., 2002).

En nuestro estudio del número total de CGR no tomamos en cuenta las CGR “desplazadas” observadas en la capa nuclear interna y plexiforme de la retina, las cuales constituyen aproximadamente el 1-2% de la población de las CGR en ratón (Dräger y Olsen, 1981) y el 0,35% en rata (Dreher y cols., 1985).

Aunque otros estudios han medido el tamaño de las CGR marcadas retrógradamente, nosotros no lo hemos realizado porque el neurotrazador no se distribuye homogéneamente en todos los casos en el soma celular y además el programa de análisis de imagen realiza unas transformaciones que modifican el tamaño de las CGR, por lo que no contábamos con una información fidedigna del tamaño celular.

5.1.2. POBLACIÓN DE LAS CGR RETINOTECTALES Y RETINOFUGALES

En rata la población de CGR marcada desde el MNO proximal, que constituye la población retinofugal fue ligeramente más grande (1,6% para ratas SD y 2,2% para PVG, respectivamente) que la población de CGR marcadas desde ambos CS, que constituye la población retinotectal, pero en ambos casos las diferencias no fueron significativas (SD, *Mann-Whitney test*, $p=0,3588$; PVG *Mann-Whitney test*, $p=0,1438$).

En ratones, al igual que observamos en ratas, la población de CGR retinofugal, fue ligeramente mayor (1,5% para ratones Swiss y 3,4% para C57, respectivamente) que la población de CGR retinotectal. En ambos casos, esta diferencia tampoco fue significativa (Swiss, *Mann-Whitney test*, $p=0,5426$; C 57 *Mann-Whitney test*, $p=0,1066$).

Estos hallazgos demuestran que en el sistema retinofugal de rata y ratón, la proyección retinotectal es masiva, y coincide con estudios previos realizados en rata (Lund, 1965, 1969; Lund y cols., 1980; Perry, 1981; Linden y Perry, 1983) y en ratones adultos (Lund, 1965; Drager y Olsen., 1981). Otros estudios han indicado que el 35% de las proyecciones retinotectales se ramifican proyectando también al núcleo geniculado (Dreher y cols., 1985; Martin, 1986).

La población de CGR-FG⁺ obtenida en las ratas PVG fue mayor que aquellas obtenidas en las ratas SD, tanto cuando el FG fue aplicado en ambos CS (*Mann-Whitney test*, $p=0,0000$) como en el MNO proximal intraorbitario (*Mann-Whitney test*, $p=0,0035$). De igual forma, los ratones Swiss tienen una población de CGR-OHSt⁺ mayor que los ratones C57, tanto cuando el OHSt fue aplicado en ambos CS (*Mann-Whitney test*, $p=0,0006$) como en el MNO proximal intraorbitario (*Mann-Whitney test*, $p=0,0000$). Este hallazgo coincide con estudios previos y puede reflejar las diferencias genéticas existentes entre las estirpes albinas y pigmentadas de ratas y ratones (*Fukuda y cols., 1982; Williams y cols., 1996*) o las diferencias en el desarrollo temprano de los axones ópticos (*Bunt y cols., 1983*) o el resultado de la consecuencia de una lateralidad anormal en la distribución de los axones ópticos en albinos (*Lund, 1965; Fleming y cols., 2006*). También puede explicar la mayor agudeza visual obtenida en estudios del comportamiento de las ratas pigmentadas respecto a las albinas (*Prusky y cols., 2002*).

El número total de CGR-FG⁺ obtenido en retinas montadas a plano en nuestros experimentos en ratas es comparable con otros estudios donde también se ha investigado, en esta especie, el número de CGR. Identificando las CGR con el trazador dextrano de fluoresceína, Freeman y Grosskreutz (2000) por métodos estereológicos estimaron una población de 74.104 CGR, y Levkovitch-Verbin y cols. (2003) estimaron 87.809 CGR, ambos en rata albina Wistar. Utilizando el 4Di-10ASP aplicado en ambos CS y muestreando regiones de la retina, Fischer y cols., (2000) estimaron 77.400 CGR en ratas SD. Contando axones del NO, Levkovich-Verbin y cols. (2003) estimaron 85.511 axones totales en la cabeza del NO en ratas Wistar. Nuestros resultados son algo más pequeños que aquellos presentados por Siu y cols. (2002) que utilizando FG en ambos CS estimaron desde áreas muestreadas de las retinas 98.725 CGR en ratas SD. Ko y cols. (2001) estimaron que esta población ascendía a 119.988 CGR en ratas Wistar. Utilizando un método de conteo automático similar al nuestro, Danias y cols. (2006) encontraron un número total de CGR de 112.128 y 72.707 en ratas Wistar y Brown Norway respectivamente.

El número total de CGR-OHSt⁺ obtenidos en las retinas montadas a plano de nuestros experimentos en ratones son comparables con otros estudios que también han investigado el número de CGR en estas especies. Utilizando el marcador Thy-1 de las CGR (*Bernstein y cols., 2007*) o contando los axones del NO (*Parson y cols., 1995; Cenni y cols., 1996; Williams y cols., 1996; Jeon y cols., 1998; Mabuchi y cols., 2004; Howell y cols., 2007a*), por ejemplo Jeon y cols., (1998), y Cenni y cols., (1996), estimaron que en ratones C57BL/6 hay 44.860 ± 3125 y 45.400 ± 4.000 , axones en el NO, respectivamente. Nuestros resultados son algo menores que aquellos presentados por otros que utilizan trazadores retrógrados para identificar a las CGR (*Schmidt y cols., 2001; Danias y cols., 2003b*) o cuentan axones del NO (*Zhou y cols., 2001*). Por ejemplo, Danias y cols. (2003b) utilizando un método de conteo automático similar al nuestro obtuvieron un número total de CGR de 84.027 ± 2.171 en los ratones C57BL/6.

Podemos explicar esta variabilidad en el número de CGR entre diferentes grupos de investigación por varias razones: los distintos métodos empleados para estimar la población total de CGR, la utilización de diferentes números de áreas y de regiones muestreadas, la utilización de diferentes trazadores con distintas propiedades y modo de aplicación. También es importante tener

en cuenta las diferentes estirpes de ratas (*Fukuda y cols., 1982*) y ratones empleados para el estudio, Williams y colaboradores en 1996 mostraron que hay grandes variaciones, que están controladas genéticamente, el número total de CGR en ratones de diferentes especies, subespecies y estirpes (con una media de 58.500 ± 7.800 con un rango que va desde 32.000 hasta 87.000 CGR).

5.1.3. POBLACIÓN DE CGR QUE PROYECTAN IPSILATERALMENTE

Nuestros estudios indican que aproximadamente el 2,5% y el 4,2% de la población de CGR retinotectales en ratas SD y PVG respectivamente, no decusan su axón en el quiasma óptico, lo que indica una proyección contralateral masiva del sistema retinofugal (*Lund, 1965; Dräger y Olsen., 1981; Linden y Perry, 1983*). Estas proyecciones cruzadas son menores en animales albinos cuando los comparamos con pigmentados (*Lund, 1965; Dräger y Olsen, 1980; Dreher y cols., 1985; Balkema y Dräger., 1990*). Estos resultados concuerdan con estudios previos que estimaron que entre el 2,6 y el 5% de la población de CGR en diferentes especies de roedores proyectan su axón ipsilateralmente al CS (ejem. Syrian hamsters: *Insausti y cols., 1984; Métin y cols., 1995*; ratas adultas: *Lund y cols., 1980; Cusick y Lund, 1982; Dreher y cols., 1985; Kondo y cols., 1993*; ratones adultos: *Balkema y Dräger, 1990; Moriya y Yamadori, 1993*). Las mutaciones de la tirosina quinasa responsables del albinismo afectan a la población de todos los tipos de CGR en ratones adultos, incluida la proporción de CGR que decusa su axón en el quiasma óptico (*Rice y cols., 1995*).

Nosotros hemos observado que hay varios tipos morfológicos de CGRip-FG⁺ (*Dreher y cols., 1985; Hofbauer y Dräger, 1985*). Las CGRip-FG⁺ se distribuyen principalmente en el creciente temporal de la retina (*Dräger y Olsen, 1980; Reese y Cowey, 1983; Dreher y cols., 1985*). Es interesante recordar que el patrón de decusación de los axones a nivel del quiasma óptico es crítico para la visión binocular.

5.1.4. ÁREA Y DENSIDAD TOTAL DE LAS CGR TRAZADAS RETRÓGRADAMENTE DE LAS RETINA DE ROEDORES

Tanto los valores de densidades de CGR obtenidos en los grupos de ratas SD y PVG como de ratones Swiss y C57 están dentro del rango de valores presentados en estudios previos en laboratorios independientes para estas especies, albinas o pigmentadas (rata: *Thanos y cols., 1993; Schuettauf y cols., 2000; Ahmed y cols., 2001; Klöcker y cols., 2001; Park y cols., 2001; WoldeMussie y cols., 2001; Blair y cols., 2005; Swanson y cols., 2005*; ratón: *Inoue y cols., 2002; Murphy y cols., 2007; Robinson y Madison, 2004*).

Cuando se muestrean las regiones centrales de la retina tanto en rata como en ratón las densidades de las CGR marcadas retrógradamente tienden a ser significativamente más altas, como se refleja en estudios previos en nuestro laboratorio (*Vidal-Sanz y cols., 1988, 2001; Villegas-Pérez y cols., 1988a; Peinado-Ramón y cols., 1996; Selles-Navarro y cols., 1996; Wang y cols., 2000; Lafuente y cols., 2002a, b*) y de otros grupos (*Levkovitch-Verbin y cols., 2000; Pavlidis y cols., 2000; Schmidt y cols., 2001; Bakalash y cols., 2002; Mo y cols., 2002; Nakazawa y cols., 2002; Jakobs y*

cols., 2005; Buckingham y cols., 2008; Haustead y cols., 2008). Esto se puede explicar por la distribución heterogénea de las CGR en la retina, con un gradiente centro periferia, con las densidades más altas en las regiones centrales y las más bajas en las periféricas, en la rata (Lashley, 1932; Fukuda, 1977; Schober y Gruschka, 1977; Perry, 1981; Dreher y cols., 1985; McCall y cols., 1987) y en ratón (Dräger y Olsen, 1981; Jeon y cols., 1998; Jakobs y cols., 2005).

5.1.5. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

En las primeras observaciones al microscopio de fluorescencia de las CGR trazadas retrógradamente en retinas montadas a plano, se apreciaba una distribución heterogénea de éstas, encontrándose las densidades más altas en las regiones centrales de la retina y las más bajas en la periferia. Mediante los mapas de isodensidad, tanto en rata como en ratón, observamos una región de alta densidad aproximadamente a 1mm del disco óptico, que se extiende horizontalmente a lo largo del eje naso-temporal, adoptando la forma de una estría visual, donde sus valores más altos se localizan en la zona superotemporal. Desde esta región de alta densidad, las densidades de las CGR decrecen rápidamente hacia la retina dorsal y ventral, siendo este descenso más pronunciado en la retina dorsal. Este gradiente centro periferia está en concordancia con estudios previos (en rata; Lashley, 1932; Fukuda, 1977; Schober y Gruschka, 1977; Perry, 1981; Dreher y cols., 1985; McCall y cols., 1987 y en el ratón: Dräger y Olsen, 1981; Jeon y cols., 1998; Jakobs y cols., 2005).

La distribución de la región de alta densidad en la retina dorsal se asemeja a una estría visual localizada en el área de la retina que mira hacia el horizonte (Stone, 1983). Tal especialización regional de la distribución de las CGR en la retina que se corresponde con la presentación del campo visual en el CS (Dräger y Hubel, 1976), fue previamente observada en el hámster sirio (Métin y cols., 1995), en la rata (Jeffery, 1985; Reese y Cowey, 1986) y en ratón (Dräger y Olsen, 1981) y ha sido notificado por este laboratorio en las ratas pigmentadas no distrofias RCS (Marco-Gomariz y cols., 2006).

Sin embargo, el hecho de que la región de alta densidad adopte una especialización regional ha sido controvertido (Danias y cols., 2002, 2003; Reese, 2002). Tal concepto es importante porque la distribución de las CGR en la retina refleja la especialización regional y la resolución del sistema visual (Dräger y Hubel, 1976; Prusky y cols., 2002; Schiviz y cols., 2008).

Nuestras observaciones están en discrepancia con estudios previos (Danias y cols., 2002), en los que no se encontró esta zona de alta densidad. En nuestros análisis anteriores no encontramos evidencias claras de la estría visual hasta que construimos mapas de isodensidad de alta resolución. Nuestros mapas de isodensidad de alta resolución contruidos por la división de cada imagen individual en 64 y 36 áreas de interés (ADI), para rata y ratón respectivamente, implican un aumento de resolución de aproximadamente 34 y 15 veces comparado con tal estudio (Danias y cols., 2002). Además para el estudio de la distribución de las CGR es muy importante orientar correctamente el ojo para tener una orientación correcta de la retina (Reese, 2002).

Nuestros mapas muestran que dentro de la estría visual los grupos de más alta densidad tendieron a localizarse en el cuadrante supero-temporal de la mayoría de las retinas y esto coincide con estudios previos en una serie de roedores, incluyendo el hámster Sirio (*Métin y cols., 1995*), ratas (*Lashley, 1932; Fukuda, 1977; Schober y Gruschka, 1977; Dreher y cols., 1985; McCall y cols., 1987*) y ratones (*Drager y Olsen, 1981*).

Estudios previos han señalado la presencia de la estría visual con un gradiente de densidad suave en roedores como ratones y en el cerdo de guinea (*Silveira y cols., 1989; Do Nascimento y cols., 1991*) o con un gradiente de densidad extremadamente pronunciado como el agouti y el capibara (*Picanço-Diniz y cols., 1991*).

La principal característica de la estría visual es que contiene una alta concentración de CGR, fotorreceptores conos L y células bipolares, pero carece casi por completo de conos S (*Rodieck, 1998; Lukats y cols., 2005*). En un estudio publicado recientemente por nuestro grupo (*Ortín-Martínez y cols., 2010*) se describe que, en rata, la distribución de CGR y conos L sigue el mismo patrón, siendo éstos más densos en la zona de alta densidad de CGR. Además, en este mismo estudio se observó que en esta área, la densidad de conos S es la menor en la retina. Si bien no se conoce en rata la distribución de las células bipolares, el hecho de que tanto las CGR como los conos L sean más densos en esta región de alta densidad, y que además no haya casi conos S, ratifica la función de este área como estría visual en ratas.

5.2. MODELO EXPERIMENTAL DE HTO EN RATA Y RATÓN

5.2.1. ELEVACIÓN DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR

Nuestros estudios en rata muestran que hay un incremento de la PIO inducido por la FL durante las primeras 12h que decrece lentamente con el tiempo, permaneciendo más alta que en animales control durante el periodo de estudio. Estos resultados coinciden con estudios previos de modelos de HTO en rata (*Johnson y cols., 2000; Levkovitch-Verbin y cols., 2002a; Danias y cols., 2006; Morrison y cols., 2008*). En ratones se produce el incremento de la PIO a las 24 horas después de la FL manteniéndose durante 4 días y después del quinto día desciende gradualmente a sus niveles basales al final de la semana, similares elevaciones abruptas de la PIO han sido observadas en modelos de HTO en ratones pigmentados inducida mediante la FL de la malla trabecular y las venas episclerales (*Grozdanic y cols., 2003a, 2004*). Sin embargo, mientras que en nuestro estudio la elevación de la PIO se restringió a la primera semana, los ratones pigmentados estudiados por Grozdanic y cols., (2003a) mostraron un aumento persistente de la misma durante 30 días.

La medición de la PIO varía por el tipo de anestesia general utilizada (*Jia y cols., 2000a*), y la hora del día en que se hace la medición de la PIO ya que ésta fluctúa a lo largo del día debido al ritmo circadiano. El aumento y persistencia de la elevación de la PIO varía, además, por las especies de animales utilizadas (*John y cols., 1997; Savinova y cols., 2001; Cone y cols., 2010*), los modelos experimentales de HTO y las diferencias entre las técnicas empleadas dentro de cada modelo (*Chauhan y cols., 2002; Schnebelen y cols., 2009*).

En general hay tres modelos experimentales ampliamente utilizados que difieren en la técnica utilizada y por tanto en los mecanismos por los cuales se produce la HTO. El resultado es una distinta elevación y duración de la PIO así como diferencias en la extensión del daño en el NO y la retina. Por ejemplo, los diferentes métodos láser dan como resultado diferentes perfiles de elevación y duración de la PIO (*Morrison y cols., 1997; Chauhan y cols., 2002; Levkovitch-verbin y cols., 2002a*).

Nuestro método de FL resultó en un aumento rápido de la PIO que se mantuvo durante un corto periodo de tiempo. Mientras que esta característica puede verse como una desventaja cuando lo comparamos con un modelo más crónico, nuestro perfil de la PIO produjo un daño severo en la retina que resultó en la pérdida de CGR y la degeneración de la CFNR que también se producen en el modelo espontáneo de HTO en ratón (*Danias y cols., 2003b; Schuettauf y cols., 2004; Jakobs y cols., 2005; Filippopoulos y cols., 2006; Schlamp y cols., 2006; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008*) frecuentemente utilizado para investigar los mecanismos de muerte celular en la neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) por sus similitudes con la neuropatía humana.

5.2.2. ALTERACIÓN DEL TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO

Para aprender sobre los mecanismos por los cuales la HTO lesiona las CGR realizamos un estudio cuantitativo del número total de CGR trazadas retrógradamente mediante la aplicación del neurotrazador en ambos CS. Se observó una disminución sustancial de las CGR trazadas en las retinas fotocoaguladas cuando las comparamos con sus retinas contralaterales no tratadas tanto en rata como en ratón.

En rata a los 8 días después de la FL hubo una ausencia del transporte axonal retrógrado (TAR) activo que aumentó entre 8 días y 2 semanas pero no entre 2 y 12 semanas, sugiriendo que el daño infringido en el TAR activo debe ocurrir en las primeras 2 semanas después de FL, el periodo de tiempo durante el cual la HTO está más elevada y alcanzando su pico. En ratón a los 8 días después de la FL se observó una ausencia del TAR activo, ausencia que no progresa con el tiempo de estudio (hasta 63 días) sugiriendo, que en esta especie, el daño infringido al TAR ocurre en la primera semana después de la FL.

Observamos variabilidad en la severidad de daño en el TAR activo, algo común en los modelos experimentales de HTO en rata (*Levkovitch-Verbin y cols., 2002a*) y ratones (*Mabuchi y cols., 2004; Schlamp y cols., 2006; Soto y cols., 2008*) así como en los modelos espontáneos (*Mabuchi y cols., 2004; Schlamp y cols., 2006; Soto y cols., 2008*).

En nuestro estudio el número de CGR marcadas retrógradamente después de la FL es más pequeño que el descrito previamente (*WoldeMussie y cols., 2001, 2004; Levkovitch-Verbin y cols., 2002a*), es decir, se produce un mayor daño del TAR, lo que podría explicarse por nuestro diferente perfil de la HTO, que se puede explicar por la diferente técnica de aplicación del láser y la utilización de especies diferentes, ya que la elevación y duración de la PIO afecta a la extensión del daño ocasionado en el NO y en la retina. Alternativamente, esta disparidad en el daño del TAR con otros grupos de investigación también podría estar basada en los métodos de conteo utilizados, porque

ellos muestrean áreas pequeñas de la retina (*WoldeMussie y cols., 2001*) o del NO (*Levkovitch-Verbin y cols., 2002a, 2003*) mientras que nosotros obtenemos el conteo total de las CGR.

La ausencia de células marcadas retrógradamente en las retinas experimentales adoptó dos formas: una ausencia localizada donde no hay CGR marcadas retrógradamente con forma de sectores con su vértice dirigido hacia el disco óptico y otra difusa donde hay CGR trazadas pero con una densidad menor de lo que le correspondería. Un patrón similar de la pérdida de CGR ha sido presentado en ratones DBA/2NNia donde muestran sectores de la retina desprovistos de CGR trazadas retrógradamente (*Danias y cols., 2003b; Schuettauf y cols., 2004; Jakobs y cols., 2005; Filippopoulos y cols., 2006; Schlamp y cols., 2006; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008*). La pérdida localizada aparece más frecuentemente en las regiones superiores del nervio óptico y de la retina en rata (*Morrison y cols., 1997; WoldeMussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002a*) y en ratón (*Danias y cols., 2003b; Mabuchi y cols., 2003, 2004; Jakobs y cols., 2005; Filippopoulos y cols., 2006; Schlamp y cols., 2006; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008*). Ignoramos la razón exacta de la preferencia de la localización del daño en la hemirretina superior, pero podría estar relacionada con la disposición de los vasos sanguíneos en la cabeza del nervio óptico justo antes de entrar a la retina (*Mabuchi y cols., 2003, 2004*).

5.2.3. LA AUSENCIA DE LAS CGR MARCADAS RETRÓGRADAMENTE EN LAS RETINAS LESIONADAS ¿SE DEBE A LA MUERTE DE LAS CGR O A UN TRANSPORTE AXONAL RETRÓGRADO DAÑADO?

Un aspecto importante en la NOG es investigar si la ausencia de CGR trazadas retrógradamente es debido a un daño en el TAR como ha sido mostrado previamente para otras lesiones retinianas en ratas adultas (*Lafuente López-Herrera y cols., 2002*) o a una degeneración y muerte de las CGR. Para resolver esta pregunta realizamos los siguientes experimentos:

En rata se aplicó el trazador neuronal en ambos CS una semana antes de la FL y el DTMR en el MNO proximal 15 días después de la FL y 2 días antes del sacrificio. Se observó que las CGR-DTMR⁺ estaban restringidas en los típicos sectores. Además había más CGR trazadas con FG que con DTMR (**Fig. 30**), lo que significaba que no todas las CGR-FG⁺ que sobreviven mantienen su axón funcional en la cabeza del NO capaz de la difusión pasiva del DTMR. Este número más pequeño de CGR-DTMR⁺ que de CGR-FG⁺ podría explicarse porque los axones sometidos a la HTO son más susceptibles al daño adicional que se infringe en la aplicación del DTMR en el MNO proximal. Esta posibilidad es improbable porque si la HTO fuera la causa de la reducción en la capacidad de los axones del NO para coger el DTMR, observaríamos un número más bajo de CGR-DTMR⁺ que de CGR-FG⁺ distribuidas homogéneamente por toda la retina y no restringido a los típicos sectores degenerativos característicos de la NOG.

Otro experimento realizado, tanto en rata como en ratón para investigar esta cuestión, consistió en la aplicación del trazado neuronal en ambos CS una semana antes al procesamiento del animal, y la realización en las mismas retinas de la inmunofluorescencia del Brn3a para identificar y contar las CGR que sobreviven. Se observó que a los 8 días después de la FL hubo un clara

discordancia entre la población de CGR marcadas retrógradamente y la población de CGR-Brn3a⁺. La cuantificación de ambas poblaciones mostró que el número de CGR-Brn3a⁺, aún siendo menor que en animales control, era casi el doble que el de CGR trazadas, indicando que dentro de las primeras semanas hay un daño en el TAR, como se mostró en el modelo congénito de ratón de HTO (Buckingham y cols., 2008). La ausencia de CGR trazadas retrógradamente en tiempos tempranos (8 días) después de la FL es debida no sólo a una degeneración y muerte de CGR sino también a un daño en el transporte axoplásmico. La pérdida de la población de CGR-Brn3a⁺ progresa con el tiempo (en ratas entre 8 y 21 días y en ratón de 8 a 35 días) lo que concuerda con estudios previos de la pérdida de CGR inducidas por axotomía, tal como la sección del NO (Villegas-Pérez y cols., 1993; Nadal-Nicolás y cols., 2009), o por compresión y estrangulamiento de los haces de axones (Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Wang y cols., 2000, 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006; Parrilla-Reverter y cols., 2009a; Nadal-Nicolás y cols., 2009). En resumen, la HTO induce no sólo un daño en el TAR sino también la muerte de las CGR.

5.2.4. NATURALEZA DEL DAÑO DEL TAR

La ausencia de CGR marcadas retrógradamente es debida a un déficit funcional y/o a una compresión mecánica de los axones de las CGR a nivel de la cabeza del NO.

En rata para poder contestar a esta cuestión se analizó la distribución de las CGR doblemente marcadas con FG y DTMR a diferentes intervalos de supervivencia. En estas retinas a dos semanas tras la FL, el número de CGR-DTMR⁺ que difunde pasivamente a lo largo del NO, excede por 3 o 4 veces la población de CGR capaces del TAR activo desde el CS (Fig. 35). Sin embargo en tiempos posteriores (3, 8 y 12 semanas. Fig. 36) hubo una correspondencia entre los sectores de la retina que conservan el TAR activo funcional y los sectores marcados por la difusión del DTMR. Así, es posible que en cortos periodos de tiempo (2 semanas) después de FL, haya un daño funcional del TAR activo del FG pero no de la difusión pasiva del DTMR. Mientras que a periodos de tiempo más largos de 3 o más semanas después de la FL, la ausencia de CGR trazadas con ambas moléculas, refleje ambos tipos de daño del TAR, tanto el activo como el de difusión pasiva desde la cabeza del NO hacia el cuerpo celular.

En ratón la ausencia de CGR-OHSt⁺ en los sectores con forma de cuña fue paralela a la ausencia de CGR-DTMR⁺ a tiempos tempranos, de 8 días, y esto se mantiene durante todo el periodo de estudio (Fig. 37), sugiriendo que poco después de la FL, la ausencia de CGR retrógradamente trazadas con OHSt o DTMR responden a un daño del transporte axonal retrógrado activo y de la difusión pasiva desde la cabeza del NO hacia el soma celular.

La alteración a la vez del TAR activo como la difusión pasiva del DTMR es consistente con una compresión mecánica de los haces de axones en el NO (Anderson, 1976, 1977; Quigley y cols., 1980b, 1981, 2000; Pease y cols., 2000).

5.2.5. LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN INICIAL

La degeneración anterógrada localizada en los haces de axones en la cabeza del NO del grupo 1.2 (**Fig. 25I-K**) se describió previamente en los NO de HTO en primates (*Quigley y Addicks, 1980a*) y en ratas (*Morrison y cols., 1999; Levkovitch-Verbin y cols., 2002a, 2003*) y ratones (*Mabuchi y cols., 2004; Schlamp y cols., 2006; Howell y cols., 2007a*).

La HTO se distribuye homogéneamente sobre el globo ocular, así podríamos esperar que la PIO elevada dañara las CGR de forma homogénea por toda la retina. Sin embargo, esto no fue el caso, ya que la pérdida de CGR trazadas se observaba en áreas de la retina en forma de sectores. Este patrón de degeneración sectorial sugiere que el sitio donde se inicia el daño inducido por la HTO es en la cabeza del NO, ya que es el lugar en el que los haces de axones se agrupan topológicamente con una ordenación retinotópica más alta (*Guillery y cols., 1995; Fitzgibbon y Reese, 1996; Jeffery, 2001; May y Lütjen-Drecoll, 2002; Schlamp y cols., 2006; Howell y cols., 2007a; Jeffery y cols., 2008*). Este patrón de daño retiniano con forma de cuña es reminiscente al observado en roedores en los cuales los vasos sanguíneos ligan espontáneamente los haces de axones produciendo una intensa constricción que conduce a la interrupción del transporte axonal y pérdida de las CGR (*Villegas-Pérez y cols., 1996, 1998; Wang y cols., 2000, 2003; Marco-Gomariz y cols., 2006*). Estos hallazgos concuerdan con estudios previos realizados en el modelo espontáneo de HTO en ratón (*Danias y cols., 2003b; Jakobs y cols., 2005; Filippopoulos y cols., 2006; Schlamp y cols., 2006; Howell y cols., 2007; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008*). En resumen, la cabeza del NO es el sitio más probable en la cual se inicia la lesión glaucomatosa de las CGR. (*Anderson y Hendrickson, 1974; Quigley y Anderson, 1976; Quigley y cols., 1981*).

5.2.6. EL DAÑO INDUCIDO POR LA HIPERTENSIÓN OCULAR ES SEMEJANTE A LA AXOTOMÍA

Las retinas FL muestran signos de degeneración axonal retrógrada principalmente en los sectores de la retina desprovistos de CGR-FG⁺ mientras que las áreas que contienen CGR-FG⁺ presentaron muy pocas anomalías en el patrón de expresión de pNFH (**Fig. 38, 39, 40**), como recientemente se describió para el modelo espontáneo de HTO en ratón (*Jakobs y cols., 2005; Howell y cols., 2007a; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008*). Estos signos de degeneración axonal de la CFNR con la expresión aberrante del pNFH dentro de los axones de la CFNR y somas son similares a los observados tras la lesión axonal por axotomía (*Vidal-Sanz y cols., 2005; Parrilla-Reverter y cols., 2009b*), los cuales se desarrollan algo más despacio cuando la lesión es debida a la compresión axonal que cuando es debida a la sección axonal (*Parrilla-Reverter y cols., 2009b*).

En ambas especies, el 80% de la población de CGR está desconectada de su región diana en el cerebro, una proporción que puede ser incluso más grande si se toma en cuenta la población de CGR que sobrevive en los sectores. Esto supone una lenta degeneración de los axones intrarretinianos que hace difícil predecir la supervivencia de las CGR basada en la apariencia de la CFNR, como se mostró después de la lesión de aplastamiento del NO (*Parrilla-Reverter y cols., 2009b*).

Cuando estudiamos el patrón de muerte a lo largo del tiempo de la población de CGR-Brn3a⁺, está en concordancia con la pérdida progresiva característica inducida por axotomía documentada en estudios previos (*Villegas-Pérez y cols., 1993; Peinado-Ramón y cols., 1996; Parrilla-Reverter y cols., 2009a*) donde la mayor pérdida de CGR ocurre dentro de las dos primeras semanas después de la lesión. Hay que tener en cuenta que la variabilidad en el daño inducida por la HTO puede ser debida a que los haces de axones tengan varios grados de lesión debido a que la lesión no comienza a la vez en todos ellos, haciendo menos previsible el curso de la pérdida de CGR.

En resumen tanto la degeneración retrógrada de los axones intrarretinianos que componen la CFNR, como el patrón de muerte de las CGR después de la HTO reflejan probablemente un fenómeno de degeneración y muerte de las propias CGR análogo al observado en la axotomía (*Quigley y cols., 1981; Bellezza y cols., 2000*).

5.2.7. LA ISQUEMIA RETINIANA NO ES LA PRINCIPAL CAUSA DE LA MUERTE DE LAS CGR

Para excluir la posibilidad que los niveles de PIO alcanzados en las primeras horas después de la FL puedan inducir, mediante compresión de los vasos intrarretinianos, daño isquémico a la retina (*Flammer y cols., 2002; Costa y cols., 2003, 2009*), realizamos el estudio de las células de la CFNR.

En la capa de CGR de regiones lesionadas de las retinas FL, donde no había o había muy pocas CGR, se observó la presencia de células amacrinias desplazadas. Lo que indica que la HTO induce una pérdida selectiva de las CGR que no afecta a otras células de la capa de CGR, en concordancia con estudios previos (*Jakobs y cols., 2005; Kielczewski y cols., 2005*). Esto sugiere que la HTO induce un daño en los axones a nivel de la cabeza del NO sin afectar a otras células de la retina, y excluyendo la isquemia de la retina como causa de la muerte de las CGR, como se sugirió previamente (*Quigley y cols., 1980b*).

Otra prueba que apoya esta teoría, es el patrón de pérdida de CGR trazadas retrógradamente, que en las retinas FL es diferente a la típica pérdida de CGR en parches característica de la isquemia transitoria de la retina (*Lafuente y cols., 2002a, b; Lafuente López-Herrera y cols., 2002; Avilés-Trigueros y cols., 2003; Mayor-Torroglosa y cols., 2005*).

Así pues, una isquemia generalizada de la retina no parece ser la causa del daño que observamos en la población de CGR de nuestros experimentos de HTO. Nuestros resultados apuntan hacia la idea de que la HTO origina un daño que ocurre en la cabeza del NO donde los axones se encuentran retinotópicamente organizados. Es posible que la HTO induzca un daño semejante a la axotomía por compresión directa de haces de axones, pero no podemos descartar la posibilidad de que la HTO induzca también la compresión de pequeños vasos sanguíneos que irrigan haces de axones del NO.

5.3. RESUMEN

En este trabajo de tesis hemos descrito la población normal de CGR retinotectales y retinofugales en dos especies de roedores, albinos y pigmentados. Además, hemos puesto a punto, en rata y ratón, un modelo de hipertensión ocular, y caracterizado anatómica, cuantitativa y topográficamente, el curso temporal de degeneración de los somas y axones de las CGR inducida por la HTO. Finalmente, sugerimos que en nuestro modelo de HTO la degeneración de las CGR y sus axones sigue un patrón temporal y adopta una disposición geográfica en la retina que hace pensar que la causa se sitúa en la cabeza del NO. Es probable que se produzca la compresión de haces de axones, y que esta compresión simule el efecto de una axotomía, aunque no podemos descartar que estos haces de axones se vean afectados por la compresión de pequeños vasos sanguíneos responsables de su vascularización.

Hemos documentado que la inmensa mayoría de CGR, en rata y ratón albinos como pigmentados, proyectan a los CS, aportando evidencia de la masiva proyección retinotectal en el sistema retinofugal en roedores adultos. En ambas especies, existen diferencias significativas del número total de CGR entre animales albinos y pigmentados, que probablemente refleja diferencias genéticas entre estirpes. Independientemente de la especie y estirpe, las CGR no se distribuyen homogéneamente y se observa una región de alta densidad a aproximadamente 1mm del disco óptico, que se extiende horizontalmente a lo largo del eje naso temporal, y adopta la forma de una estría visual. Dentro de esta estría las densidades más altas se localizan en la zona superotemporal de la retina.

La HTO resulta, en un daño a la población de CGR con la presencia de grandes áreas con forma de sectores con el vértice hacia el disco óptico, preferentemente en la retina dorsal. En estas áreas, se produce primero una deficiencia del transporte axonal retrógrado que afecta al 75-80% de la población de CGR en rata y ratón (*Jakobs y cols., 2005; Buckingham y cols., 2008*), que es seguida de una expresión anormal del pNFH característica de la degeneración retrógrada de los axones intrarretinianos (*Schlamp y cols., 2006*). Finalmente, se produce la degeneración y muerte de los somas de las CGR. La cronología de los eventos degenerativos es consistente con la idea de una compresión de los axones en la cabeza del NO que induce una lesión parecida al aplastamiento del NO (*Jakobs y cols., 2005; Vidal-Sanz y cols., 2005; Marco-Gomariz y cols., 2006; Salinas-Navarro y cols., 2006; 2009c; 2010; Schlamp y cols., 2006; Howell y cols., 2007a; Buckingham y cols., 2008; Soto y cols., 2008*). Esta compresión induce un daño inicial del TAR, que progresa anterógradamente y retrógradamente resultando en una degeneración prolongada de la porción intrarretiniana de los axones y de los somas de las CGR. Aunque los mecanismos por los cuales la HTO lesiona la población de CGR no se conocen del todo, la evolución de los eventos con un lapsus de tiempo conocido entre la primera alteración del flujo axoplásmico y la degeneración de los axones intraoculares y finalmente de los somas, subraya la necesidad de aplicar las estrategias neuroprotectoras dentro de este intervalo de tiempo, antes de que ocurra la muerte de CGR.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Los métodos automáticos desarrollados para cuantificar la población completa de las CGR de rata y ratón trazadas retrógradamente son reproducibles, rápidos y objetivos.
2. La población retinofugal de CGR es discretamente mayor que la retinotectal, documentando que la proyección retinotectal es masiva en ratas y ratones adultos.
3. La población total de CGR retinofugales y retinotectales es significativamente mayor en ratas pigmentadas que en albinas y en ratones albinos que en pigmentados.
4. La inmensa mayoría de la población de CGR decusa su axón a nivel del quiasma óptico. Esta proporción es mayor en ratas pigmentadas que en albinas.
5. La distribución de las CGR en la retina no es homogénea. Las densidades máximas se localizan horizontalmente en la retina dorsal con una forma parecida a una estría visual, dentro de la cual la máxima densidad está en el cuadrante superotemporal.
6. La población de CGR ipsilaterales se distribuye mayoritariamente en la periferia de la retina temporal en forma de luna creciente, dentro de la cual la máxima densidad se encuentra en el cuadrante superotemporal.
7. La fotocoagulación de la malla trabecular, vasos perilimbaires y episclerales induce un aumento de la presión intraocular que causa eventos degenerativos en la retina y en el nervio óptico.
8. La hipertensión ocular produce un daño del transporte axonal retrógrado que se mantiene durante todo el periodo de estudio y afecta a aproximadamente al 75-80% de la población de CGR.
9. El daño en el transporte axonal retrógrado primero es funcional y posteriormente mecánico e induce la degeneración y muerte progresiva de la población de CGR y sus axones.
10. La ausencia de CGR causada por la hipertensión ocular tiene forma de sectores con su ápice dirigido hacia el disco óptico y se presenta preferentemente en la retina dorsal. Se observan dos tipos de pérdida, una localizada con pocas o ninguna CGR marcada retrógradamente y otra difusa donde hay una disminución en la densidad de las CGR.
11. La hipertensión ocular induce una compresión de los axones de la cabeza del nervio óptico que conduce a la degeneración anterógrada de sectores dentro de sus nervios ópticos y retrógrada de los axones intrarretinianos que forman la capa de fibras nerviosas de la retina.
12. Hay una pérdida selectiva de CGR en la capa de CGR que no afecta a otras poblaciones celulares presentes en esta capa, indicando que la causa de la muerte de estas neuronas se localiza en la cabeza del nervio óptico y, probablemente, se deba a una compresión axonal.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

1. The automated routines developed to quantify the whole population of fluorogold-traced rat and mouse RGCs are reliable, quick and objective.
2. In adult mice and rats, the whole population of retinofugal RGCs is slightly bigger than the retinotectal one, indicating that, in these species, there is a massive retinotectal projection in the retinofugal system.
3. The whole population of retinofugal and retinotectal RGCs is significantly bigger in pigmented than in albino rats, while in mice is bigger in the albino ones.
4. The vast majority of RGCs decussate their axon at the optic chiasm. This proportion is bigger in pigmented than in albino rats.
5. Retinal distribution of RGCs is not homogeneous. Maximum densities are found horizontally in the dorsal retina, with a shape similar to a visual streak, wherein the peak density is located in the superotemporal quadrant.
6. The population of ipsilateral RGCs is distributed, mainly, in the temporal retinal periphery shaped as a crescent moon, wherein the peak density is located in the superotemporal quadrant.
7. Photocoagulation of the trabecular mesh, perimacular and episcleral vessels induces an increase of the intraocular pressure that causes degenerative events in the retina and optic nerve.
8. Ocular hypertension induces a long term damage of the retrograde axonal transport that affects approximately 75-80% of the RGC population.
9. Retrograde axonal transport alteration is firstly functional and later mechanic, and induces progressive degeneration and death of the RGCs and their axons.
10. RGC loss triggered by ocular hypertension is sectorial with the sector's apex directed towards the optic disc. This loss is mainly caused in the dorsal retina. There are two types of RGC loss, focal and diffuse.
11. Ocular hypertension induces the compression of the axons in the head of the optic nerve that is followed by a sectorial anterograde degeneration in the optic nerve and a retrograde degeneration of the intraretinal axons that form the nerve fibre layer.
12. This insult causes a selective loss of RGCs in the ganglion cell layer without affecting other cellular populations present in the same layer. This indicates that the death of RGCs is due to damage to axonal bundles in the ON head, probably by axonal compression.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- AGIS, The Advanced Glaucoma Intervention Study (2000) The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am. J. Ophthalmol.* 130: 429-40.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Lonngren 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. *Mol. Vis.* 14:1050-63.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado-Calvo P, Lonngren U, Salinas-Navarro M, Cánovas I, Nadal-Nicolas FM, Miralles-Imperial J, Hallbook F, Vidal-Sanz M (2009) Proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade are immediately up-regulated in the retina after optic nerve transection or optic nerve crush. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50:424-31.
- Ahmed FA, Hegazy K, Chaudhary P, Sharma SC (2001) Neuroprotective effect of alpha(2) agonist (brimonidine) on adult rat retinal ganglion cells after increased intraocular pressure. *Brain Res.* 913: 133-9.
- Ahmed F., Brown KM, Stephan DA, Morrison JC, Johnson EC, Tomarev SI (2004) Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 1247-1258.
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2002) Reduction of intraocular pressure in mouse eyes treated with latanoprost. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:146-150.
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003a) Aqueous humor dynamics in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 5168-73.
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003b) Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure. *Exp. Eye Res.* 77:681-
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003c) Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4314-20.
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003d) Ocular hypertension in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 1581-5.
- Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, Green PJ, Tomlinson BE, Ulrich J, Wood JN, Kahn J (1982) Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature.* 1;298(5869):84-6.
- Anderson DR, Hendrickson A (1974) Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Invest. Ophthalmol.* 13: 771-83.
- Avila MY, Carre DA, Stone RA, Civan MM (2001) Reliable measurement of mouse intraocular pressure by a servo-null micropipette system. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 1841-1846.
- Avila MY, Múnera A, Guzmán A, Do CW, Wang Z, Stone RA, Civan MM (2005) Noninvasive intraocular pressure measurements in mice by pneumotonometry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 3274-80.
- Avilés-Trigueros M, Sauvé Y, Lund RD, Vidal-Sanz M (2000) Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cells axons regeneratin through peripheral nerve grafts in adult rats. *J. Neurosci* 20:361-372.
- Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, García-Avilés A, Lafuente MP, Rodríguez ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2003) Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp. Neurol.* 184:767-777.
- Badea TC, Nathans J (2004) Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J. Comp. Neurol.* 480:331-351.
- Bakalash S, Kipnis J, Yoles E, Schwartz M (2002) Resistance of retinal ganglion cells to an increase in intraocular pressure is immune-dependent. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 2648-53.
- Balkema GW y Dräger UC (1990) Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice. *Visual Neuroscience* 4: 595-604.
- Barnstable CJ, Dräger UC (1984) Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 11: 847-55.
- Bayer AU, Neuhardt T, May AC, Martus P, Maag KP, Brodie S, Lütjen-Drecoll E, Podos SM, Mittag T (2001) Retinal morphology and ERG response in the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 1258-65.

- Beckstead RM, Franckfurter A (1983) A direct projection from the retina to the intermediate grey layer of the superior colliculus demonstrated by anterograde transport of horseradish peroxidase in the monkey, cat and rat. *Exp. Brain Res.* 52: 261-268.
- Beerkelar M, Clarke DB, Wang Y, Bray GM, Aguayo J (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 14: 4368-4374.
- Bellezza AJ, Hart RT, Burgoyne CF (2000) The optic nerve head as a biomechanical structure: initial finite element modeling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 2991-3000.
- Bernstein SL, Koo JH, Slater BJ, Guo Y, Margolis FL (2006) Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol. Vis.* 12: 147-55.
- Bernstein, S. L., Guo, Y., Slater, B. J., Puche, A., & Kelman, S. E. (2007) Neuron stress and loss following rodent anterior ischemic optic neuropathy in double reporter transgenic mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48: 2304–2310.
- Bill A (1965) The aqueous humor drainage in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*) with evidence for unconventional routes. *Invest. Ophthalmol.* 4: 911.
- Bill A, Phillips CI (1971) Uveoscleral drainage of aqueous humor in human eyes. *Exp. Eye Res.* 12: 275.
- Blair M, Pease ME, Hammond J, Valenta D, Kielczewski J, Levkovitch-Verbin H, Quigley H (2005) Effect of glatiramer acetate on primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in the rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46: 884–890.
- Boycott BB, Wassle H (1974) The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J. Physiol.* 240:397-419.
- Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, Vetter ML, Marsh-Armstrong N, Horner PJ (2008) Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J. Neurosci.* 28: 2735–2744.
- Bunt AH, Hendrickson AE, Lund JS, Lund RD, Fuchs AF (1975) Monkey retinal ganglion cells: morphometric analysis and tracing of axonal projections, with a consideration of the peroxidase technique. *J. Comp. Neurol.* 164: 265-285.
- Bunt SM, Lund RD y Land PW (1983) Prenatal development of the optic projection in albino and hooded rats. *Brain Research* 282: 149-168.
- Canola K, Angénieux B, Tekaya M, Quiambao A, Naash MI, Munier FL, Schorderet DF, Arsenijevic Y (2007) Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48: 446-54.
- Cenni MC, Bonfanti L, Martinou J-C, Ratto GM, Strettoi E, Maffei L (1996) Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult bcl-2 transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1735–1745.
- Chang B, Smith RS, Hawes NL, Anderson MG, Zabaleta A, Savinova O, Roderick TH, Heckenlively JR, Davisson MT, John SW (1999) Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA/2J mice. *Nat. Genet.* 21: 405–409.
- Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME, Tremblay F (2002) Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 2969-76.
- Cheunsuang O y Morris R, (2005) Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia* 52:228–233.
- Chew, SJ (1996) Animal model of glaucoma. In: Ritch R, Shields MB, Krupin T, (Eds.), *The Glaucomas*. Basic Sciences, Anatomy and Pathology. Mosby, New York, pp 55-70.
- Chidlow G, Casson R, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Osborne NN (2005) Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol. Vis.* 11:387-96.
- Chierzi S, Cenni M, Maffei L, Pizzorusso T, Porciatti V, Ratto GM, Strettoi E (1998) Protection of retinal ganglion cells and preservation of function after optic nerve lesion in bcl-2 transgenic mice. *Vision. Res.* 38:1537-43.
- Chierzi S, Strettoi E, Cenni MC, Maffei L (1999) Optic nerve crush: axonal responses in wild-type and bcl-2 transgenic mice. *J. Neurosci.* 19:8367-76.
- Cohan BE, Bohr DF (2001) Measurement of intraocular pressure in awake mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2560–2562.
- Cone FE, Gelman SE, Son JL, Pease ME, Quigley HA (2010) Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp. Eye Res.* 91: 415-24.

- Costa VP, Arcieri ES, Harris A (2009) Blood pressure and glaucoma Br. J. Ophthalmol. 93: 1276-82.
- Costa VP, Harris A, Stefánsson E, Flammer J, Krieglstein GK, Orzalesi N, Heijl A, Renard JP, Serra LM (2003) The effects of antiglaucoma and systemic medications on ocular blood flow. Prog. Retin. Eye Res. 22: 769-805.
- Cowey A, Perry VH (1979) The projection of the temporal retina in rats, studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. Exp. Brain Res. 35:457-64.
- Cusick CG y Lund RD (1982) Modification of visual callosal projections in rats. Journal of Comparative Neurology 212: 385-398.
- Dabin I, Barnstable CJ (1995) Rat retinal Müller cells express Thy-1 following neuronal cell death. Glia 14:23-32.
- Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos-Esteban J, Podos SM, Mittag T, (2002) Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43:587-94
- Danias J, Kontiola AI, Filippopoulos T, Mittag T (2003a) Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44: 1138–1141.
- Danias J., Lee KC, Zamora MF, Chen B, Shen F, Filippopoulos T, Su Y, Goldblum D, Podos SM, Mittag T (2003b) Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2NNia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 5151–5162.
- Danias J, Shen F, Kavalarakis M, Chen B, Goldblum D, Lee K, Zamora MF, Su Y, Brodie SE, Podos SM, Mittag T, (2006) Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. Exp. Eye Res. 82: 219–228.
- Dann JF y Buhl EH. (1987) Retinal ganglion cells projecting to the accessory optic system in the rat. J Comp Neurol. 1;262(1):141-58.
- De Juan J, Iñiguez C, Carreres J. (1978) Number, diameter and distribution of the rat optic nerve fibers. Acta Anat (Basel) 102: 294-9.
- DeVries SH, Baylor DA (1993) Synaptic circuitry of the retina and olfactory bulb. Cell 72 (Suppl): 139- 149.
- Dogiel, A. S. (1988) Über das Verhalten der nervösen Elemente in der retina der Ganoiden, Reptilien, Vögel und Säugetiere. Anatomischer Anzeiger, 3, 133–134.
- Do Nascimento JLM, do Nascimento RSV, Damasceno BA, Silveira LCL (1991) The neurons of the retinal ganglion cell layer of the guinea pig: Quantitative analysis of their distribution and size. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 24:199-214.
- Dowling JE (1979) Information processing by local circuits: the vertebrate retina as a model system. En: FO Schmitt, FG Worden (eds) The Neurosciences: Fourth Study Program, pp. 163-181. Cambridge, MA: MIT Press.
- Dowling JE (1987) The retina: an approachable part of the brain. Cambridge, MA: Belknap.
- Dräger UC y Hubel DH (1976) Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. Journal of Neurophysiology, 39, 91–101.
- Dräger UC y Olsen JF (1980) Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. Journal of Comparative Neurology 191: 383–412.
- Dräger UC, Olsen J F (1981) Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 20, 285–293.
- Dräger UC, Hofbauer A (1984) Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina. Nature 309: 624-626.
- Dreher B, Sefton AJ, Ni SYK, y Nisbett G (1985) The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. Brain Behav. Evol. 26: 10-48.
- Dreyer EB., Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA (1996) Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. Arch. Ophthalmol. 114: 299–305.
- Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Denis P, Cooper HM (2008) Glaucoma alters the circadian timing system. PLoS One. 3(12):e3931.
- Eng SR, Lanier J, Fedtsova N, Turner EE (2004) Coordinated regulation of gene expression by Brn3a in developing sensory ganglia. Development. 131: 3859-70.
- Erickson-Lamy KA, Kaufman PL, McDermott ML, France NK (1984) Comparative anesthetic effects on aqueous humor dynamics in the cynomolgus monkey. Arch. Ophthalmol. 102: 1815–1820.

- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron*. 28: 41-51.
- Ferster D (1992) The synaptic inputs to simple cells of the cat visual cortex. *Prog. Brain Res.* 90: 423-441.
- Fileta JB, Huang W, Kwon GP, Filippopoulos T, Ben Y, Dobberfuhr A, Grosskreutz CL (2008) Efficient estimation of retinal ganglion cell number: a stereological approach. *J. Neurosci. Methods* 170: 1-8.
- Filippopoulos T, Danias J, Chen B, Podos SM, Mittag TW (2006) Topographic and morphologic analyses of retinal ganglion cell loss in old DBA/2N mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 1968-74.
- Fitzgibbon, Reese BE (1996) Organization of retinal ganglion cell axons in the optic fiber layer and nerve of fetal ferrets. *Vis. Neurosci.* 13: 847-61.
- Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, Serra LM, Renard JP, Stefánsson E (2002) The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 21: 359-93.
- Fleming MD, Benca RM y Behan M (2006) Retinal projections to the subcortical visual system in congenic albino and pigmented rats. *Neuroscience* 143: 895-904.
- Forrester J y Peters A (1967) Nerve fibres in optic nerve of rat. *Nature* 214: 245-7.
- Fortune B, Bui BV, Morrison JC, Johnson EC, Dong J, Cepurna WO, Jia L, Barber S, Cioffi GA (2004) Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 1854-62.
- Freeman EE y Grosskreutz CL (2000) The effects of FK506 on retinal ganglion cells after optic nerve crush. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 41: 1111-1115.
- Fritzsche B (1993) Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Methods*; 50:95-103.
- Fukuda Y (1977) A three group classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies. *Brain Res.* 119: 327-344.
- Fukuda Y, Sugimoto T y Shirokawa T (1982) Strain differences in quantitative analysis of the rat optic nerve. *Experimental Neurology* 75: 525-532.
- Gaasterland D, Kupfer C (1974) Experimental glaucoma in the rhesus monkey. *Invest. Ophthalmol.* 13: 455-7.
- Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011) Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp. Eye Res.* (En prensa).
- Gallego A y Cruz J (1965) Mammalian retina: associational nerve cells in ganglion cell layer. *Science* 150: 1313-1314.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Coll-Alcaraz L, Cánovas-Martínez I, Bernal-Garro JM, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP (2008) Characterization of the light-sensitive arciform region in the albino rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: E-Abstract 4395.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2010) Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res.* 91(6):800-10.
- García Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, y Sharma SC (1994) Apoptosis in adult retinal ganglion cell after axotomy. *J. Neurobiol.* 25 (4):431-438.
- García-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC (1995) Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp. Eye Res.* 61: 33-44.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280: 120- 125.
- Goldblum D, Kontiola AI, Mittag T, Chen B, Danias J (2002a) Non-invasive determination of intraocular pressure in the rat eye. Comparison of an electronic tonometer (TonoPen), and a rebound (impact probe) tonometer. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 240: 942-6.
- Goldblum D, Mittag T (2002b) Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye. *Vision Res.* 42: 471-478.
- Gregory DS, Aviado DG, Sears ML (1985) Cervical ganglionectomy alters the circadian rhythm of intraocular pressure in New Zealand White rabbits. *Curr. Eye Res.* 4: 1273-9.
- Gross RL, Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, Wu SM (2003) A mouse model of elevated intraocular pressure: retina and optic nerve findings. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 101: 163-9.
- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH (2003a) Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4337-46

- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Kwon YH, Kardon RH, Sonea IM (2003b) Temporary elevation of the intraocular pressure by cauterization of vortex and episcleral veins in rats causes functional deficits in the retina and optic nerve. *Exp. Eye Res.* 77: 27-33.
- Grozdanic SD, Kwon YH, Sakaguchi DS, Kardon RH, Sonea IM (2004) Functional evaluation of retina and optic nerve in the rat model of chronic ocular hypertension. *Exp. Eye Res.* 79: 75-83.
- Guillery RW, Mason CA, Taylor JSH (1995) Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J. Neurosci.* 15: 4727-4737.
- Guo Y, Cepurna WO, Dyck JA, Doser TA, Johnson EC, Morrison JC (2010) Retinal cell responses to elevated intraocular pressure: a gene array comparison between the whole retina and retinal ganglion cell layer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 3003-18.
- Hänninen VA, Pantcheva MB, Freeman EE, Poulin NR, Grosskreutz CL (2002) Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma. *Curr. Eye Res.* 25: 389-95.
- Haustead DJ, Lukehurst SS, Clutton GT, Bartlett CA, Dunlop S A, Arrese CA, Sherrard RM, Rodger J (2008) Functional topography and integration of the contralateral and ipsilateral retinocollicular projections of ephrin-A/- mice. *Journal of Neuroscience*, 28, 7376–7386.
- Hernández MR, Miao H, Lukas T (2008) Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Prog Brain Res* 173: 353-73.
- Higashide T, Kawaguchi I, Ohkubo S, Takeda H, Sugiyama K (2006) In vivo imaging and counting of rat retinal ganglion cells using a scanning laser ophthalmoscope. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 2943-50.
- Hofbauer A y Dräger UC (1985) Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 234: 465-74.
- Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, Barbay JM, Marchant JK, Mahesh N, Porciatti V, Whitmore AV, Masland RH, John SWM (2007a) Axons of retinal ganglion cells are insulated in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J. Cell Biol.* 179: 1523-1537.
- Howell GR, Libby RT, Marchant JK, Wilson LA, Cosma IM, Smith RS, Anderson MG, John SW (2007b) Absence of glaucoma in DBA/2J mice homozygous for wild-type versions of Gpnmb and Tyrp1. *BMC Genet.* 3; 8:45
- Howell GR, Libby RT, John SW (2008) Mouse genetic models: an ideal system for understanding glaucomatous neurodegeneration and neuroprotection. *Prog. Brain Res.* 173: 303-21.
- Huang W, Dobberfuhr A, Filippopoulos T, Ingelsson M, Fileta JB, Poulin NR, Grosskreutz CL (2005a) Transcriptional up-regulation and activation of initiating caspases in experimental glaucoma. *Am. J. Pathol.* 167: 673–681.
- Huang W, Fileta JB, Dobberfuhr A, Filippopoulos T, Guo Y, Kwon G, Grosskreutz CL (2005b) Calcineurin cleavage is triggered by elevated intraocular pressure, and calcineurin inhibition blocks retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 12242–12247.
- Huang W, Fileta J, Guo Y, Grosskreutz CL (2006) Downregulation of Thy1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Curr. Eye Res.* 31: 265–271.
- Hubel DH, Wiesel TN (1959) Receptive fields of single neurons in the cat's striate cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 148: 574- 591.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 160: 106- 154.
- Hubel DH (1995) *Eye, brain and vision*. Ed: WH Freeman and Company, New York, New York and Basingstoke. Edición en castellano, Universidad de Murcia, año 2000.
- Hubel DH (1999) *Ojo, cerebro y visión*. Servicio de publicaciones de la Universidad de Murcia. Murcia (España) ISBN: 84-8371-102-8.
- Hurley JB (1994) Termination of photoreceptor responses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4 (4): 481- 487.
- Hutchins JB, Hollyfield JG (1987) Acetylcholinesterase in the human retina. *Brain Res.* 400(2):300-11.
- Huxlin KR, Goodchild AK (1997) Retinal ganglion cells in the albino rat: revised morphological classification. *J. Comp. Neurol.* 385:309-323.
- Inoue T, Hosokawa M, Morigiwa K, Ohashi Y y Fukuda Y (2002) Bcl-2 overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *Journal of Neuroscience*, 22, 4468–4477.
- Insausti R, Blakemore C, Cowan WM. (1984) Ganglion cell death during development of ipsilateral retino-collicular projection in golden hamster. *Nature* 308: 362-5.

- Ishii Y, Kwong JM, Caprioli J (2003) Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 1982-92.
- Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH (2005) Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J. Cell Biol.* 171: 313-25.
- Jeffery G (1985) The relationship between cell density and the nasotemporal division in the rat retina. *Brain Research.* 347: 354-357.
- Jeffery G (2001) Architecture of the optic chiasm and the mechanisms that sculpt its development. *Physiol. Rev.* 81: 1393-14114.
- Jeffery G, Levitt JB, Cooper HM (2008) Segregated hemispheric pathways through the optic chiasm distinguish primates from rodents. *Neuroscience* 157: 637-643.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland R H (1998) The major cell populations of the mouse retina. *Journal of Neuroscience* 18: 8936-8946.
- Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, Li D, Wu SM, Gross RL (2005) Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Res.* 45: 169-79.
- Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC (2000a) Effect of general anesthetics on IOP in rats with experimental aqueous outflow obstruction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3415-3419.
- Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC (2000b) Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 1380-1385.
- John SW, Hagaman JR, MacTaggart TE, Peng L, Smithes O (1997) Intraocular pressure in inbred mouse strains. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 249-53.
- John SW, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, Davisson M, Roderick TH, Heckenlively JR (1998) Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39: 951-62.
- John SW, Anderson MG, Smith RS (1999) Mouse genetics: a tool to help unlock the mechanisms of glaucoma. *J. Glaucoma* 8: 400-12.
- Johnson EC, Deppmeier LM, Wentzien SK, Hsu I, Morrison JC (2000) Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 431-42.
- Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Doser TA, Morrison JC (2007) Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48: 3161-77.
- Johnson EC, Guo Y, Cepurna W O, Morrison JC (2009) Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: lessons from rat glaucoma models. *Exp. Eye Res.* 88: 808-15.
- Joo CK, Choi JS, Ko HV, Park KI, Sohn S, Chun MH, Oh YJ, Gwag BG (1999) Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40(3): 713-20.
- Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK 2nd, Wilson MR, Gordon MO (2002) The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 120: 701-13.
- Kawaguchi I, Higashide T, Ohkubo S, Takeda H, Sugiyama K (2006) In vivo imaging and quantitative evaluation of the rat retinal nerve fiber layer using scanning laser ophthalmoscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 2911-6.
- Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME (1997) TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 1997 115: 1031-5.
- Kielczewski JL, Pease ME, Quigley HA (2005) The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection on amacrine cells in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(9):3188-96.
- Kim CY, Kuehn MH, Anderson MG, Kwon YH (2007) Intraocular pressure measurement in mice: a comparison between Goldmann and rebound tonometry. *Eye* 21:1202-1209.
- Kipfer-Kauer A, McKinnon SJ, Frueh BE, Goldblum D (2010) Distribution of amyloid precursor protein and amyloid-beta in ocular hypertensive C57BL/6 mouse eyes. *Curr. Eye Res* 35: 828-34.
- Klöcker N, Zerbowski M, Gellrich NC y Bähr M (2001) Morphological and functional analysis of incomplete CNS fiber tract lesion: Graded crush of the rat optic nerve. *Journal of Neuroscience Methods* 110: 147-153.
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog. Neurobiol.* 62: 327-51.

- Kondo Y, Takada M, Honda Y, Mizuno N (1993) Bilateral projections of single retinal ganglion cells to the lateral geniculate nuclei and superior colliculi in the albino rat. *Brain Res.* 608: 204-15.
- Kong JH, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH (2005) Diversity of ganglion cells in the mouse retina: Unsupervised morphological classification and its limits. *J. Comp. Neurol.* 489: 293-310.
- Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, Chen CF (2001) Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci. Lett.* 305 : 139–142.
- Kontiola AI (2000) A new induction-based impact method for measuring intraocular pressure. *Acta Ophthalmol. Scand.* 78: 142-5.
- Kontiola AI, Goldblum D, Mittag T, Danias J (2001) The induction/impact tonometer: a new instrument to measure intraocular pressure in the rat. *Exp. Eye Res.* 73: 781-5.
- Krishna R, Mermoud A, Baerveldt G, Minckler DS (1995) Circadian rhythm of intraocular pressure: a rat model. *Ophthalmic Res.* 27: 163-7.
- Kuffler SW (1952) Neurons in the retina: Organization, inhibition, and excitatory problems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 17: 281- 292.
- Lafuente López-Herrera, MP, Mayor-Torroglosa, S, Miralles de Imperial, J, Villegas-Pérez, MP, & Vidal-Sanz, M (2002) Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Experimental Neurology* 178: 243–258.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sellés-Navarro I, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M (2002a) Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience* 109:157-68.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Mayor S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M (2002b) Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Exp. Eye Res.* 74:181-9.
- Lagnado L, Baylor D (1992) Signal flow in visual transduction. *Neuron.* 8: 955- 1002.
- Laquis S, Chaudhary P, Sharma SC (1998) The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res.* 784: 100-4.
- Lashley K (1932) The mechanism of vision V: the structure and image-forming power of the rat's eye. *J. Comp. Psychol.* 13: 173-200.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zhu Y, Gidday JM, Connor JR, Wax MB (2004) Quantitative ex vivo detection of rodent retinal ganglion cells by immunolabeling Brn3b. *Exp. Eye Res.* 79: 131-40.
- Leske MC (1983) The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *Am. J. Epidemiol.* 118: 166-91.
- Levkovitch-Verbin H, Harris-Cerruti C, Groner Y, Wheeler LA, Schwartz M y Yoles E (2000) RGC death in mice after optic nerve crush injury: Oxidative stress and neuroprotection. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 41: 4169–4174.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, D'Anna SA, Kerrigan D, Pease ME (2001) Optic nerve transection in monkeys may result in secondary degeneration of retinal ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 975-82.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME (2002a) Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 402-10.
- Levkovitch-Verbin H, Martin KR, Quigley HA, Baumrind LA, Pease ME, Valenta D (2002b) Measurement of amino acid levels in the vitreous humor of rats after chronic intraocular pressure elevation or optic nerve transection. *J. Glaucoma* 11: 396-405.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Zack DJ, Pease ME, Valenta DF (2003) A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 3388-93.
- Levkovitch-Verbin H (2004) Animal models of optic nerve diseases. *Eye* 18: 1066-74.
- Levkovitch-Verbin H, Dardik R, Vander S, Nisgav Y, Kaleb-Landoy M, Melamed S (2006) Experimental glaucoma and optic nerve transection induce simultaneous upregulation of proapoptotic and prosurvival genes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47: 2491-7.
- Libby RT, Gould DB, Anderson MG, John SW (2005a) Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6: 15-44.

- Libby RT, Anderson MG, Pang IH, Robinson ZH, Savinova OV, Cosma IM, Snow A, Wilson LA, Smith RS, Clark AF, John SW (2005b) Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis. Neurosci.* 22: 637-48.
- Linden R y Perry VH (1983) Massive retinotectal projection in rats. *Brain Research* 272: 145–149.
- Linden R (1986) Displaced ganglion cells in the retina of the rat. *J. Comp. Neurol.* 258:138-43.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino-acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 3; 330:613-22.
- Lukats A, Szabo A, Rohlich P, Vigh B, Szel A (2005) Photopigment co-expression in mammals: comparative and developmental aspects. *Histol. Histopathol.* 20: 551-574
- Lund RD (1965) Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science* 149: 1506–1507.
- Lund RD (1969) Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 135, 179–208.
- Lund RD, Land PW y Boles J (1980) Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: An HRP study in adults. *Journal of Comparative Neurology* 189: 711-720.
- Lund JS (1988) Anatomical organization of macaque monkey striate visual cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 11: 253-288.
- Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauvé Y, Messina DJ, Harris IR, Kihm AJ, Harmon AM, Chin FY, Gosiewska A, Mistry SK (2007) Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem. Cells* 25: 602–611.
- Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN (2003) Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4321-30.
- Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN (2004) Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 4352-8.
- Marco-Gomariz MA, Hurtado-Montalbán N, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP (2006) Phototoxic induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J. Comp. Neurol.* 498:163-79.
- Martin PR (1986) The projection of different retinal ganglion cell classes to the dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Experimental Brain Research* 62: 77-88.
- Martin KR, Levkovitch-Verbin H, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Quigley HA (2002) Retinal glutamate transporter changes in experimental glaucoma and after optic nerve transection in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 2236–2243.
- Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein R.L., Hauswirth WW (2003) Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4357–4365.
- May CA, Lütjen-Drecoll E (2002) Morphology of the murine optic nerve. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 2206-2212.
- Mayor-Torroglosa S, De la Villa P, Rodríguez ME, Lafuente López-Herrera MP, Avilés-Trigueros M, García-Avilés A, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2005) Ischemia results three months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 3825-35.
- McCall M, Robinson SR, Dreher B (1987) Differential retinal growth appears to be the primary factor producing the ganglion cell density gradient in the rat. *Neuroscience Letters* 79: 78-84.
- McKerracher L, Vallee RB, Aguayo AJ (1989) Microtubule-associated protein 1A (MAP 1A) is a ganglion cell marker in adult rat retina. *Vis. Neurosci.* 2: 349-56.
- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ (1990a) Slow transport rates of cytoskeletal proteins change during regeneration of axotomized retinal neurons in adult rats. *J. Neurosci.* 10: 641-8.
- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ (1990b) Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J. Neurosci.* 10:2834-41.
- McKinnon SJ, Lenhman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, Tahzib NG, Reitsamer HA, Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Zack DJ (2002) Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:1077–1087.
- McKinnon SJ, Reitsamer HA, Ransom NL, Caldwell M, Harrison JM, Kiel JW (2003) Induction and tonopen measurement of ocular hypertension in C57BL/6 mice. *ARVO abstract*, poster 3319.

- McKinnon SJ, Schlamp CL, Nickells RW (2009) Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. *Exp. Eye Res.* 88: 816-24.
- McLaren JW, Brubaker RF, FitzSimon JS (1996) Continuous measurement of intraocular pressure in rabbits by telemetry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 966-75.
- Mermoud A., Baerveldt G., Minckler DS, Lee MB, Rao NA (1994a) Intraocular pressure in Lewis rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 2455–2460.
- Mermoud A, Baerveldt G, Mickler DS, Wu GS, Rao NA (1994b) Animal model for uveitic glaucoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 32: 553-60.
- Mermoud A, Baerveldt G, Minckler DS, Prata JA Jr, Rao NA (1996) Aqueous humor dynamics in rats. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1: S198-203.
- Métin C, Irons WA y Frost DO (1995) Retinal ganglion cells in normal hamsters and hamsters with novel retinal projections. I. Number, distribution, and size. *Journal Comparative Neurology* 353: 179-199.
- Mittag TW, Danias J, Pohorenec G, Yuan HM, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos SM, Tatton WG (2000) Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 3451-9.
- Mo X, Yokoyama A, Oshitari T, Negishi H, Dezawa M, Mizota A, Adachi-Usami E (2002) Rescue of axotomized retinal ganglion cells by BDNF gene electroporation in adult rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43: 2401-2405.
- Moore CG, Milne ST, Morrison JC (1993) Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 363-9.
- Moore CG, Epley D, Milne ST, Morrison JC (1995) Long-term non-invasive measurement of intraocular pressure in the rat eye. *Curr. Eye Res.* 14: 711-7.
- Moore CG, Johnson EC, Morrison JC (1996) Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat *Curr. Eye Res.* 15: 185-91.
- Moriya T y Yamadori T (1993) Correlative study of the morphology and central connections of ipsilaterally projecting retinal ganglion cells in the albino rat. *Exp. Eye Res.* 56: 79-83.
- Morris CA, Crowston JG, Lindsey JD, Danias J, Weinreb RN (2006) Comparison of invasive and non-invasive tonometry in the mouse. *Exp. Eye Res.* 82: 1094–1099.
- Morrison J, Farrell S, Johnson E, Deppmeier L, Moore CG, Grossmann E (1995a) Structure and composition of the rodent lamina cribrosa. *Exp. Eye Res.* 60: 127-35.
- Morrison JC, Fraunfelder FW, Milne ST, Moore CG (1995b) Limbal microvasculature of the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36: 751-6.
- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC (1997) A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp. Eye Res.* 64: 85-96.
- Morrison JC, Nylander KB, Lauer AK, Cepurna WO, Johnson E (1998) Glaucoma drops control intraocular pressure and protect optic nerves in a rat model of glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39: 526-31.
- Morrison JC, Cepurna WO, Johnson EC (1999) Modeling glaucomatous optic nerve damage. *Int Ophthalmol. Clin.* 39: 29-41.
- Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, Jia L (2005) Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog. Retin. Eye Res.* 24: 217-40.
- Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO (2008) Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res* 173: 285-301.
- Morrison JC, Jia L, Cepurna W, Guo Y, Johnson E (2008) Reliability and sensitivity of the TonoLab rebound tonometer in awake Brown Norway rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:2802-8.
- Morrison JC, Jia L, Cepurna W, Guo Y, Johnson E (2009) Reliability and sensitivity of the TonoLab rebound tonometer in awake Brown Norway rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:2802-8.
- Murata H, Aihara M, Chen YN, Ota T, Numaga J, Araie M (2008) Imaging mouse retinal ganglion cells and their loss in vivo by a fundus camera in the normal and ischemia-reperfusion model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: 5546-52.
- Murphy JA, Franklin TB, Rafuse VF y Clarke DB (2007) The neural cell adhesion molecule is necessary for normal adult retinal ganglion cell number and survival. *Molecular and Cellular Neuroscience* 36: 280-292.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50: 3860-8.

- Nakanishi S (1995) Second- order neurons and receptor mechanisms in visual- and olfactory- information processing. *Trends Neurosci.* 18 (8): 359-364.
- Nakazawa T, Tamai M y Mori N (2002) Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43: 3319–3326.
- Nash MS, Osborne NN (1999) Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: 1293-8.
- Neufeld AH, Das S, Vora S, Gachie E, Kawai S, Manning PT, Connor JR (2002) A prodrug of a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase is neuroprotective in the rat model of glaucoma. *J. Glaucoma* 11: 221-5.
- Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, Valiente-Soriano FJ, Yang Z, Davis CH, Bedont JL, Son JL, Wei JO, Buchman VL, Zack DJ, Vidal-Sanz M, Ellisman MH, Marsh-Armstrong N (2011) Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 18;108:1176-81.
- Nickells RW (1996) Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. *J. Glaucoma* 5: 345-56.
- Nissirios N, Goldblum D, Rohrer K, Mittag T, Danias J (2007) Noninvasive determination of intraocular pressure (IOP) in nonsedated mice of 5 different inbred strains. *J. Glaucoma* 16: 57-61.
- Nissirios N, Chanis R, Johnson E, Morrison J, Cepurna WO, Jia L, Mittag T, Danias J (2008) Comparison of anterior segment structures in two rat glaucoma models: an ultrasound biomicroscopic study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: 2478-82.
- Ni SYK y Dreher B (1981) Morphology of rat retinal ganglion cells projecting to the thalamus and midbrain. *Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc.* 12:97 P.
- Nouri-Mahdavi K, Hoffman D, Gaasterland D, Caprioli J (2004) Prediction of visual field progression in glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45: 4346-51.
- O'Leary DDM, Fawcett JW, Cowan WM (1986) Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cell death. *J Neurosci* 6: 3692-3705.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501.
- Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2010) Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(6):3171-83.
- Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JP, Casson RJ, Melena J (2004) Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye* 18: 1075-84.
- Osborne NN (2008) Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Prog. Brain Res.* 173: 339-52.
- Pang IH, Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Shepard AR, Hellberg MR, Clark AF, Morrison JC (2005) Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 1313–1321.
- Pang I-H, Clark AF (2007) Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J. Glaucoma* 16: 483-05.
- Park KH, Cozier F, Ong OC y Caprioli J (2001) Induction of heat shock protein 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42: 1522-1530.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M., Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009a) Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp. Eye Res.* 89: 32–41.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M., Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López, M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009b) Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vision Res.* 49: 2808-25.
- Parson SH, Dhillon B, Findlater GS y Kaufman M H (1995) Optic nerve hypoplasia in the fetal alcohol syndrome: A mouse model. *Journal of Anatomy* 186: 313-320.
- Pavlidis M, Fischer D y Thanos S (2000) Photoreceptor degeneration in the RCS rat attenuates dendritic transport and axonal regeneration of ganglion cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 41: 2318-2328.
- Paxinos y Franklin (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Formato digital.

- Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ (2000) Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 764-74.
- Pease ME, Hammond JC, Quigley HA (2006) Manometric calibration and comparison of TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice. *J. Glaucoma* 15: 512-9.
- Pease ME, Cone FE, Gelman S, Son JL, Quigley HA (2010) Calibration of the TonoLab Tonometer in Mice with Spontaneous or Experimental Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* [Epub ahead of print].
- Peinado-Ramón P, Salvador M, Villegas-Pérez M, 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. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 489-500.
- Peichl L. (1989) Organization of the retina: structure/function relations and a species comparison of retinal ganglion cells. *Fortschr Ophthalmol.* 1989;86(1):47-53. German.
- Perry VH (1979) The ganglion cell layer of the retina of the rat: A Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 23;204(1156):363-75.
- Perry VH (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neurosci.* 6: 931-934.
- Perry VH, Henderson Z, y Linden R (1983) Postnatal changes in retinal ganglion cells and optic axon populations in the pigmented rat. *J. Comp. Neurol.* 219:356-368.
- Perry VH, Morris RJ, Raisman G (1984) Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve? *J. Neurocytol.* 13: 809-24.
- Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL (2007) The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat. Rev. Genet.* 8: 58-69.
- Picanço-Diniz CW, Silveira LC, de Carvalho MS, Oswaldo-Cruz E (1991) Contralateral visual field representation in area 17 of the cerebral cortex of the agouti: a comparison between the cortical magnification factor and retinal ganglion cell distribution. *Neuroscience* 44: 325-33.
- Prusky GT, Harker KT, Douglas RM y Whishaw IQ (2002) Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research*, 136, 339-348.
- Quigley H, Anderson DR (1976) The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest. Ophthalmol.* 15:606-616.
- Quigley HA, Anderson DR (1977) Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16: 640-644.
- Quigley HA, Addicks EM (1980a) Chronic experimental glaucoma in primates. I. Production of elevated intraocular pressure by anterior chamber injection of autologous ghost red blood cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19: 126-136.
- Quigley HA, Flower RW, Addicks EM, McLeod DS (1980b) The mechanism of optic nerve damage in experimental acute intraocular pressure elevation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19: 505-17
- Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE (1981) Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch. Ophthalmol.* 99: 635-649.
- Quigley HA, Hohman RM (1983) Laser energy levels for trabecular meshwork damage in the primate eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24: 1305-7
- Quigley HA, Sanchez RM, Dunkelberger GR, L'Hernault NL, Baginski TA (1987) Chronic glaucoma selectively damages large optic nerve fibers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 913-20.
- Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ (1995) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis.* 36: 774-786.
- Quigley HA (1999) Neuronal death in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 18: 39-57. Review.
- Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, Mitchell RS (2000) Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 3460-6.
- Quigley HA y Broman AT (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.* 90: 262-7.
- Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, Velasquez T, O'Leary DD, Goulding M (2005) Turner EE. Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J. Neurosci.* 25: 11595-604.

- Ramón y Cajal S (1899) Estructura del quiasma óptico y teoría general del entrecruzamiento de las vías nerviosas. *Rev. Trim. Microgr.* Tomo III.
- Ramón y Cajal, S (1952) *Histología del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, vols. 1 y 2.
- Ramón y Cajal S (1972) *The Structure of the retina*. Charles C. Thomas, Springfield Illinois.
- Raymond ID, Pool AL, Vila A, Brecha NC (2008) A Thy1-CFP DBA/2J mouse line with cyan fluorescent protein expression in retinal ganglion cells. *Vis. Neurosci.* 26: 453-65.
- Reese BE y Cowey A (1983) Projection lines and the ipsilateral retino-geniculate pathway in the hooded rat. *Neuroscience* 10: 1233-47.
- Reese BE y Cowey A (1986) Large retinal ganglion cells in the rat: Their distribution and laterality of projection. *Experimental Brain Research* 61: 375-385.
- Reese, B. E. (2002) Rat retinal ganglion cell topography. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43, 587–594 [Letters for Danias y cols.].
- Reichstein D, Ren L, Filippopoulos T, Mittag T, Danias J (2007) Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Exp. Eye Res.* 84: 13-21.
- Reitsamer HA, Kiel JW, Harrison JM, Ransom NL, McKinnon SJ (2004) Tonopen measurement of intraocular pressure in mice. *Exp. Eye Res.* 78: 799–804.
- Rice DS, Williams RW, Goldowitz D (1995) Genetic control of retinal projections in inbred strains of albino mice. *J. Comp. Neurol.* 354: 459-69.
- Robinson GA y Madison RD (2004) Axotomized mouse retinal ganglion cells containing melanopsin show enhanced survival, but not enhanced axon regrowth into a peripheral nerve graft. *Vision Research* 44: 2667-2674.
- Rodiek R W (1979) Visual pathways. *Annual Reviews of Neuroscience* 2: 193–225.
- Rodieck RW (1998) *The first steps in seeing*. Sunderland MA: Sinauer Associates, Inc.
- Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Mouse (2006) model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp. Eye Res.* 82: 879-84.
- Salinas-Navarro M, Triviño A, Ramírez A I, Salazar JJ, Ramírez JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2006) Long term effects of laser-induced ocular hypertension: Retrograde degeneration of retinal ganglion cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 47 E-Abstract 1560.
- Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Cánovas I, Bernal JM, Soro MI, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2007) Laser photocoagulation of perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Effects on the retinal ganglion cell population of the albino mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48: E-Abstract 4353.
- Salinas-Navarro M, Napankangas U, Turunen N, Veijola J, Valiente-Soriano F, Villegas-Pérez MP, M. Vidal-Sanz (2008) Effects of acute increase of intraocular pressure in adult pigmented rats: assessment of the retinal nerve fiber layer (in vivo) and the retinal ganglion cell population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: E-Abstract 5480.
- Salinas-Navarro M, Mayor Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, M. Vidal-Sanz M (2009a) A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49: 115-126.
- Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009b) Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerised analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res.* 49: 637-47.
- Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M (2009c) Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino swiss mice. *Mol Vis.* 15: 2578-98.
- Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010) Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res.* 90: 168-83.
- Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2000) Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J. Comp. Neurol.* 417: 431-47.
- Sánchez-Migallón Carreras MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011). Brn3a expression is maintained in retinal ganglion cells after axotomy and a single injection of brain derived neurotrophic factor. *Exp. Eye Res.* (En prensa).

- Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ (2010) The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 207-16.
- Sasaki H, Coffey P, Villegas-Pérez M. P, Vidal-Sanz M, Young MJ, Lund R D, Fukuda Y (1996) Light induced EEG desynchronization and behavioral arousal in rats with restored retinocollicular projection by peripheral nerve graft. *Neuroscience Letters* 218: 45–48.
- Sauvé Y, Girman S V, Wang S, Lawrence JM, y Lund RD (2001) Progressive visual sensitivity loss in the Royal College of Surgeons rat: perimetric study in the superior colliculus. *Neuroscience* 1: 51–63
- Sauvé Y, Girman S V, Wang S, Keegan D J, y Lund R D (2002) Preservation of visual responsiveness in the superior colliculus of RCS rats after retinal pigment epithelium cell transplantation. *Neuroscience* 114: 389–401.
- Savinova OV, Sugiyama F, Martin JE, Tomarev SI, Paigen BJ, Smith RS, John SW (2001) Intraocular pressure in genetically distinct mice: an update and strain survey. *BMC Genet.* 2: 12.
- Sawada A, Neufeld AH (1999) Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp. Eye Res.* 69: 525-31.
- Schiller PH (1992) The ON and OFF channels of the visual system. *Trends. Neurosci.* 15(3): 86-92.
- Schiviz AN, Ruf T, Kuebber-Heiss A, Schubert C, Ahnelt PK (2008) Retinal cone topography of artiodactyl mammals: influence of body height and habitat. *J Comp Neurol.* 20;507(3):1336-50.
- Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW (2001) Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* 7: 192–201.
- Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickell RW (2006) Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci.* 7:66
- Schmidt SL, Vitral RW y Linden R (2001) Effects of prenatal ionizing irradiation on the development of the ganglion cell layer of the mouse retina. *International Journal of Developmental Neuroscience* 19: 469-473.
- Schmued LC y Fallon JH (1986) Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 377:147-54.
- Schmued LC, Kyriakidis K, Fallon JH, Ribak CE (1989) Neurons containing retrogradely transported Fluoro-Gold exhibit a variety of lysosomal profiles: a combined brightfield, fluorescence, and electron microscopic study. *J. Neurocytol.* 3: 333-43
- Schnapf JL, Baylor DA (1987) How photoreceptor cells response to light. *Sci. Am.* 256: 40- 47.
- Schnebelen C, Pasquis B, Salinas-Navarro M, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Vidal-Sanz M, Bron AM, Bretilon L, Acar N (2009) A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of tinraocular pressure in rats. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 247: 1191-203..
- Schober W y Gruschka H (1977) Retinal ganglion cells of the albino rat: A qualitative and quantitative study. *Zeitschrift fur Zellforschung undmikroskopische Anatomie.* 91: 397–414.
- Schori H, Kipnis J, Yoles E, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Schwartz M (2001) Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 3398-403.
- Schuettauf F, Naskar R, Vorwerk CK, Zurakowski D y Dreyer EB (2000) Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science,* 4: 4313–4316.
- Schuettauf F, Rejdak R, Walski M, Frontczak-Baniewicz M, Voelker M, Blatsios G, Shinoda K, Zagorski Z, Zrenner E, Grieb P (2004) Retinal neurodegeneration in the DBA/2J mouse-a model for ocular hypertension. *Acta. Neuropathol.* 107: 352–358.
- Schumer RA, Podos SM (1994) The nerve of glaucoma! *Arch Ophthalmol* 112: 37-44.
- Sefton AJ y Dreher B (1985) Visual system: The art nervous sytem vol 2 (G. Paxinos, ed.) Academic Press, New York. Pp. 169-222.
- Sellés-Navarro I, Villegas-Péraz MP, Salvador- Silva M, Ruiz- Gómez JM, Vidal- Sanz M (1996) Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure- induced ischemia and survival intervals. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 37: 2002- 2014.
- Shapley R (1986) Cat and monkey retinal ganglion cells and their visual functional roles. *Trends. Neurosci.* 9: 229- 235.
- Shareef SR, García-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC (1995) Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp. Eye Res.* 61: 379-82.

- Silveira LC, Picanço-Diniz CW, Oswaldo-Cruz E (1989) The distribution and size of ganglion cells in the retinae of large Amazon rodents. *Visual Neuroscience* 2: 221-235.
- Simon DK y O'Leary DDM (1990) Limited topographic specificity in the targeting and ching of mammalian retinal axons. *Dev Biol* 137: 125-134.
- Siminoff R, Schawssmann HO, Kruger L (1966) An electrophysiological study of the visual projection to the superior colliculus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 127: 435-447.
- Siu AW, Leung MC, To CH, Siu FK, Ji JZ. y So KF (2002) Total retinal nitric oxide production is increased in intraocular pressure-elevated rats. *Experimental Eye Research* 75: 401-406.
- 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. *J. Comp. Neurol.* 501: 866-878.
- Son JL, Soto I, Oglesby E, Lopez-Roca T, Pease ME, Quigley HA, Marsh-Armstrong N (2010) Glaucomatous optic nerve injury involves early astrocyte reactivity and late oligodendrocyte loss. *Glia* 58: 780-9.
- Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, Inman DM, Vetter ML, Horner PJ, Marsh-Armstrong N (2008) Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J. Neurosci.* 28: 548-61.
- Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N (2010) Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52:434-41.
- Stein BE (1984) Development of the superior colliculus. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 95-125.
- Stone J (1983) Parallel processing in the visual system. New York Plenum Press.
- Stryer L (1987) The molecules of visual excitation. *Sci. Am.* 257 (1): 42-50.
- Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T y Kitazawa Y (1999) Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the Rat Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(13):3084-90
- Sun W, Li N, He S (2002) Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 22:9945-9960.
- Surgucheva I, Weisman AD, Goldberg JL, Shnyra A, Surguchov A (2008) Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* 14: 1540-8.
- Swanson KI, Schlieve CR, Lieven CJ y Levin LA (2005) Neuroprotective effect of sulphydryl reduction in a rat optic nerve crush model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46: 3737-3741.
- Tauchi M, Morigiwa K, Fukuda Y (1992) Morphological comparisons between outer and inner ramifying alpha cells of the albino rat retina. *Exp. Brain Res.* 88:67-77.
- Thanos S, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ (1987) The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res.* 17: 317-21.
- Thanos S (1991) The relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 3:1189-1207.
- Thanos S, Vanselow J, Mey J (1992a) Ganglion cells in the juvenile chick retina and their ability to regenerate axons in vitro. *Exp Eye Res.* 54:377-91.
- Thanos S, Pavlidis C, Mey J, Thiel HJ (1992b) Specific transcelular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocynine-filled retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.* 54:377-391.
- Thanos S, Mey J., Wild M (1993) Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience* 13: 455-466.
- Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H, Ozawa H (1998) Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol* 42: 337-44.
- Van Buskirk EM, Cioffi GA (1992) Glaucomatous optic neuropathy. *Am. J. Ophthalmol.* 113: 447-52.
- Vidal-Sanz, M., Bray, G.M., Villegas-Pérez, M.P., Thanos, S. y Aguayo A.J (1987) Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *Journal of Neuroscience* 7: 2894-2907.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MB, Bray GM, Aguayo AJ (1988) Persistent retrograde labelling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye-dil. *Exp. Neurol.* 102:92-101.

- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., Bray, G.M. y Aguayo, A.J (1993) Use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols*. 3:29-33
- Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Sellé s-Navarro I, Rodríguez E, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Pérez MP (2000) Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox. Res.* 2:215–227.
- Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, Miralles de Imperial J, Villegas- Pérez MP (2001) Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia: neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv. Ophthalmol.* 42: S262- S267.
- Vidal-Sanz M, Avilés-Trigueros M, Whiteley SJ, Sauvé Y, Lund RD (2002) Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Prog Brain Res.* 2002;137:443-52.
- Vidal-Sanz M, Parrilla-Reverter G, Sobrado P, Cánovas I, Bernal JM, Salinas M, Aguilera ME (2005) Intraorbital optic nerve crush-induced retinal ganglion cell death. Degeneration and neuroprotection with BDNF, NT-4 or CNTF. *Ophthalmic. Res.* 37 S1. 31. Abstract.
- Vidal-Sanz M, De la Villa P, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Villegas-Pérez MP (2007) Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye* 21: S42–S45.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1988a) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 8 265-280.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, y Aguayo AJ (1988b) Retinal ganglion cell death after axotomy is influenced by the distance between the lesion and the neuronal somata. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14:673.
- Villegas- Pérez MP, Vidal- Sanz M, Rasminsky GM, Bray GM, Aguayo AJ (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J. Neurobiol.* 24 (1) 23-26.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD (1996) Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport.* 7:1995-1999.
- Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD (1998) Ganglion cell loss in RCS rat retina: A result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *Journal of Comparative Neurology* 392: 58–77.
- Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, Hyman BT, Sabel BA, Dreyer EB (1996) Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:1618–1624.
- Wang RF, Schumer RA, Serle JB, Podos SM (1998) A comparison of argon laser and diode laser photocoagulation of the trabecular meshwork to produce the glaucoma monkey model. *J. Glaucoma* 7: 45-9.
- Wang S, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd Mice (2000) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:537-45.
- Wang S, Mu X, Bowers WJ, Kim DS, Plas DJ, Crair MC, Federoff HJ, Gan L, Klein WH (2002) Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development* 129: 467-77.
- Wang S, Villegas-Pérez MP, Holmes T, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Hurtado- Montalban N, Lund RD (2003) Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr. Eye Res.* 27: 183-196.
- Wang WH, Millar JC, Pang IH, Wax MB, Clark AF (2005) Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: 4617–4621.
- Weber AJ, Zelenak D (2001) Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres. *J. Neurosci. Methods* 111: 39–48.
- Weinreb RN y Khaw PT (2004) Primary open-angle glaucoma. *Lancet.* 363: 1711-20.
- Wessendorf MW (1991) Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res.* 553: 135-48.
- Whiteley SJ, Sauvé Y, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Lund RD (1998) Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Experimental Neurology*, 154: 560–572.
- Whitlock NA, McKnight B, Corcoran KN, Rodriguez LA, Rice DS (2010) Increased Intraocular Pressure in Mice Treated with Dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(12):6496-503.
- Williams RW, Strom RC, Rice DS y Goldowitz D (1996) Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *Journal of Neuroscience* 16: 7193–7205.

-
- Woldemussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA (2001) Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 2849–2855.
- Woldemussie E, Wijono M, Ruiz G (2004) Müller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* 47, 109–119. hypertension. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2849–2855.
- Wood JN, Anderton BH (1981) Monoclonal antibodies to mammalian neurofilaments. *Biosci Rep.* 1(3):263-8.
- Yang Z, Quigley HA, Pease ME, Yang Y, Qian J, Valenta D, Zack DJ (2007) Changes in gene expression in experimental glaucoma and optic nerve transection: the equilibrium between protective and detrimental mechanisms. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 5539–5548.
- Yoles E, Schwartz M (1998) Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesions of the optic nerve. *Arch. Ophthalmol.* 116 (7): 906-910.
- Zhan GL, Miranda OC, Bito LZ (1992) Steroid glaucoma: corticosteroid-induced ocular hypertension in cats. *Exp Eye Res.* 54(2):211-8
- Zhou G, Strom RC, Giguere V y Williams RW (2001) Modulation of retinal cell populations and eye size in retinoic acid receptor knockout mice. *Molecular Vision* 7: 253–260.
- Zhou Y, Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A (2005) Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma. *Mol. Ther.* 12: 402–412.
- Zhou Y, Grinchuk O, Tomarev SI (2008) Transgenic mice expressing the Tyr437His mutant of human myocilin protein develop glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49: 1932-9.

9. ANEXO I

9. ANEXO I

Vision Research 49 (2009) 115–126



Contents lists available at ScienceDirect

Vision Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/visres

A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats

M. Salinas-Navarro ^{a,1}, S. Mayor-Torroglosa ^{a,1}, M. Jiménez-López ^{a,1}, M. Avilés-Trigueros ^a, T.M. Holmes ^b, R.D. Lund ^c, M.P. Villegas-Pérez ^a, M. Vidal-Sanz ^{a,*}

^a Laboratorio de Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, Spain

^b Catherine McAuley Centre, University College Dublin, Dublin, Ireland

^c Casey Eye Institute, Oregon Health and Sciences University, Portland, OR, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2008

Received in revised form 12 September 2008

Keywords:

Retinal ganglion cells

Visual streak

Fluorescent tracers

Computerized image analysis

Retina

Rat

Retrograde labelling

ABSTRACT

In adult albino (SD) and pigmented (PVG) rats the entire population of retinal ganglion cells (RGCs) was quantified and their spatial distribution analyzed using a computerized technique. RGCs were back-labelled from the optic nerves (ON) or the superior colliculi (SCi) with Fluorogold (FG). Numbers of RGCs labelled from the ON [SD: $82,818 \pm 3,949$, $n = 27$; PVG: $89,241 \pm 3,576$, $n = 6$] were comparable to those labelled from the SCi [SD: $81,486 \pm 4,340$, $n = 37$; PVG: $87,229 \pm 3,199$; $n = 59$]. Detailed methodology to provide cell density information at small scales demonstrated the presence of a horizontal region in the dorsal retina with highest densities, resembling a visual streak.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The retinofugal system of the adult rat has been used extensively as an experimental model to study anatomical, physiological and behavioural aspects of regeneration (Avilés-Trigueros, Sauvé, Lund, & Vidal-Sanz, 2000; Sasaki et al., 1996; Vidal-Sanz, Avilés-Trigueros, Whiteley, Sauvé, & Lund, 2002; Vidal-Sanz, Bray, Villegas-Pérez, Thanos, & Aguayo, 1987; Vidal-Sanz, Villegas-Pérez, Bray, & Aguayo, 1993; Whiteley, Sauvé, Avilés-Trigueros, Vidal-Sanz, & Lund, 1998), degeneration (Lafuente, Villegas-Pérez, et al., 2002; Lund et al., 2007; Villegas-Pérez, Lawrence, Vidal-Sanz, Lavail, & Lund, 1998; Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, Bray, & Aguayo, 1988; Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, & Lund, 1996; Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, Rasminsky, Bray, & Aguayo, 1993) and neuroprotection (Avilés-Trigueros et al., 2003; Lafuente López-Herrera, Mayor-Torroglosa, Miralles de Imperial, Villegas-Pérez, & Vidal-Sanz, 2002; Lund et al., 2007; Mayor-Torroglosa et al., 2005; Vidal-Sanz, et al., 2000; Vidal-Sanz, De la Villa, et al., 2007) in the mammalian central nervous system. Indeed, the use of retrogradely transported neuronal tracers to identify the RGC population has allowed investigations into the effects of several types of injuries to the primary visual pathway and quantification of RGC survival (Lafuente, Villegas-Pérez, et al., 2002; Peinado-Ramón,

Salvador, Villegas-Pérez, & Vidal-Sanz, 1996; Sellés-Navarro, Villegas-Pérez, Salvador-Silva, Ruiz-Gómez, & Vidal-Sanz, 1996). Moreover, orthogradely transported neuronal tracers have made it possible to identify not only fine retinofugal projections (Avilés-Trigueros et al., 2000), but also to quantify the volume of the retinotectal afferents to the contralateral visual layers of the superior colliculus (SC) in normal circumstances and after a lesion (Avilés-Trigueros et al., 2003; Mayor-Torroglosa et al., 2005).

Previous studies have indicated that a majority of RGCs project to the superior colliculi (SCi) (Lund, 1965; Perry, 1981) where RGCs axons deploy in a very precise topographic manner (Linden & Perry, 1983; Sauvé, Girman, Wang, Keegan, & Lund, 2002; Sauvé, Girman, Wang, Lawrence, & Lund, 2001), but to date the exact magnitude of this projection has not been quantified. The rat RGC population is distributed throughout the retina in a central-peripheral gradient and some authors have found a region with highest RGC density in the dorsal temporal retina (Dreher, Sefton, Ni, & Nisbett, 1985; Fukuda, 1977; Jeffery, 1985; McCall, Robinson, & Dreher, 1987; Perry, 1981; Reese & Cowey, 1986; Schober & Gruschka, 1977), but whether they adopt some form of regional specialization remains controversial (Danas et al., 2002; Reese, 2002). The Sprague-Dawley (SD) and Piebald Virol Glaxo (PVG) Brown Norway strains of rats with non-pigmented and pigmented eyes, respectively, are commonly employed for a number of experimental approaches aimed at studying injury-induced RGC loss and its prevention, thus it was of interest to determine, as a baseline for

* Corresponding author. Fax: +34 968 36 39 62.

E-mail address: ofmmv01@um.es (M. Vidal-Sanz).

¹ These authors have contributed equally towards this work.

future studies, the population of RGCs in these rats, the proportion of this population responsible for the retinotectal projection as well as their spatial distribution within the retina.

Using retrogradely transported tracers to label the entire RGC population and an automated methodology to count fluorogold (FG)-labelled RGCs (Dánias et al., 2002; Salinas-Navarro et al., 2005) and to represent their detailed spatial distribution (Vidal-Sanz, Salinas-Navarro, et al., 2007; Villegas-Pérez et al., 2006), we report the numbers of rat RGCs that project along the optic nerve both in albino and pigmented adult rats. We have also determined the population of RGCs that project to the main target regions in the brain, the superior colliculi (SCi), and estimated the magnitude of the proportion of RGCs contributing to the retinotectal projection, providing direct evidence for the massive retinotectal projection in the retinofugal system of adult rats. We have also analysed the spatial distribution of RGCs within the retina using detailed isodensity maps, and found that there is a horizontally oriented region in the dorsal retina that contains the highest densities of RGCs, adopting the form of a visual streak (parts of this work have been presented in abstract form, Salinas-Navarro et al., 2005; Vidal-Sanz, Salinas-Navarro, et al., 2007; Villegas-Pérez et al., 2006).

2. Materials and methods

2.1. Animals and anesthetics

Experiments were performed on 33 albino Sprague–Dawley (SD) (33 female) and 33 pigmented Piebald Virol Glaxo (PVG) Brown Norway (5 male and 28 female) adult (180–200 g) rats, obtained from the breeding colony of the University of Murcia (Murcia, Spain). Rats were housed in temperature and light controlled rooms with a 12 h light/dark cycle and had food and water *ad libitum*. Light intensity within the cages ranged from 9 to 24 lux. Animal manipulations followed institutional guidelines, European Union regulations for the use of animals in research and the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. Moreover, adequate measures were taken to minimize pain or discomfort.

Surgical manipulations were carried out under general anaesthesia induced with an intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of ketamine (70 mg/kg, Ketalar®, Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompún®, Bayer, S.A., Barcelona, Spain). During recovery from anaesthesia, rats were placed in their cages, and an ointment containing neomycin and prednisone (Oftalmolosa Cusí Prednisona-Neomicina®, Alcon S.A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent corneal desiccation. Animals were sacrificed with an i.p. injection of an overdose of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol®, Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

2.2. Retrograde labelling

2.2.1. Retrograde labelling from the optic nerve

To quantify the entire RGC population, FG was applied to the intraorbitally transected ON following previously described methods (Vidal-Sanz, Villegas-Pérez, Bray, & Aguayo, 1988; Villegas-Pérez et al., 1993) in 14 (female) SD and 3 (female) PVG rats. In brief, a small pledget of gelatine sponge soaked in saline containing 3% Fluorogold® (FG) (Fluorochrome Inc., Engelwood, CO, USA) and 10% dimethyl sulphoxide (DMSO) was applied to the ocular stump of the cut optic nerve, approximately 3 mm from the optic disc (Lafuente López-Herrera, et al., 2002; Villegas-Pérez et al., 1993), and the animals processed 3 days later.

2.2.2. Retrograde labelling from the superior colliculi

To identify the population of RGCs that project to the superior colliculi (SCi), their main target territory in the brain, we applied

the fluorescent tracer FG to both SCi in 19 (female) SD and 30 (25 female; 5 male) PVG rats, following previously described methods (Vidal-Sanz et al., 1988) that are standard in our laboratory. In brief, after exposing the midbrain, a small pledget of gelatine sponge (Espongostan® Film, Ferrosan A/S, Denmark) soaked in saline containing 3% FG and 10% DMSO was applied over the entire surface of both SCi.

2.2.3. Double labeling of retinal ganglion cells

To further study the spatial distribution of RGCs, and to investigate whether the appearance of a RGC high-density region within the dorsal retina was the consequence of an artifact due to the labeling from the SCi, in 12 additional adult female SD rats we applied two retrogradely transported tracers with different fluorescence properties: FG and dextran tetramethylrhodamine (DMTR; 3000 MW; Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA). FG was applied to both SCi and, 5 days later and 48 h prior to processing, small crystals of DMTR were applied to the ocular stump of the right ON, which had been intraorbitally sectioned approximately 2 mm from the eye, following previously described methods (Lafuente López-Herrera et al., 2002). DMTR diffuses passively through the axon towards the cell soma producing an intense cell labelling (WoldeMussie, Ruiz, Wijono, & Wheeler, 2001). In these animals, DMTR would label the entire retinofugal projection whereas FG would label only RGCs projecting to the SCi.

2.3. Tissue processing

Rats were deeply anesthetized, perfused transcardially through the ascending aorta first with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). For the present studies determining retinal orientation is crucial, thus special care was taken to maintain the orientation of each eye. Right after deep anesthesia and before fixation a suture was placed on the dorsal pole of each eye. Furthermore, the rectus muscle insertion into the dorsal part of the eye, as well as, the nasal caruncle were used as additional landmarks. Retinas from both eyes were dissected as flattened whole-mounts by making four radial cuts (the deepest one in the dorsal pole), post-fixed for an additional hour in the same fixative, rinsed in 0.1 M PB, mounted vitreal side up on subbed slides and covered with anti-fading mounting media containing 50% glycerol and 0.04% *p*-phenylenediamine in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.0).

2.4. Retinal analysis

Retinas were examined and photographed under a fluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with an ultraviolet (BP 365/12, LP 397) filter that allows the observation of the white-gold FG-fluorescence, and with a rhodamine (BP 450–490, LP 520) filter that allows the observation of the orange-red DMTR fluorescence. The microscope was also equipped with a digital high-resolution camera (ProgRes™ C10, Jenoptik, Jena, Germany), computer-driven motorized stage (ProScan™ H128 Series, Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK), controlled by IPP (IPP 5.1 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) with a microscope controller module (Scope-Pro® 5.0 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), following standard procedures in our laboratory (Lafuente López-Herrera, et al., 2002; Vidal-Sanz, Lafuente, Mayor, Miralles de Imperial, & Villegas-Pérez, 2001). To make reconstructions of retinal whole-mounts, retinal multiframe acquisitions were acquired in a raster scan pattern using a x10 objective (Plan-Neofluar, 10×/0.30; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany). Single frames were focused manually prior to the capture of the digitized images. The scan area covers the entire retina and with a frame size of

0.627 mm²/image, usually requires 154 images to be taken for each retina.

The images taken for each retina were saved as a set of 24-bit color image pictures and later, these images were combined into a single high-resolution composite image of the whole retina using IPP. Reconstructed images were further processed when required using Adobe Photoshop® CS 8.0.1 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA).

2.5. Image processing

The individual FG-fluorescent images taken in each retina were processed by a specific cell counting subroutine that we developed to automate repetitive tasks. In brief, we used the IPP macro language to apply a sequence of filters and transformations to each image in order to clarify cell limits and separate individual cells for automatic cell counting. Initially, the images were converted to 8-bit grey scale images to discard the color information. Illumination aberrations caused by the microscope optics were removed by the flatten enhancement filter which evens out the background variations. This was followed by enhancement of the edges of the cells using the large spectral filter edge + command, which extracts positive edges (in this case fluorescently stained bright cells) from the dark background. A setting of 8% (kernel size 20 × 20) was sufficient to enhance the cell edges making detection simpler. Small artifacts and noise were removed by running three passes of the median enhancement filter (kernel size 3 × 3). Cell clusters were then separated by two passes of the watershed split morphological filter which erodes objects until they split and then dilates them until they do not touch. Finally, the cells in each image were counted using predetermined parameters to exclude objects that were larger than 300 μm² or smaller than 7 μm². These parameters correspond to the largest and smallest individual FG-labeled objects detected as RGCs. Finally, each count was exported to a spreadsheet (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) for statistical analysis.

2.6. Retina area measurement

Area of the retinas was measured on the high-resolution photomontage image of the whole retina with the IPP program calibrated off the stage movement. Retinal areas were measured over photomontages obtained from fixed retinas and thus, we ignore the degree of variation due to histological processing.

2.7. Isodensity maps

Using the cell counts obtained for each frame, we first constructed pseudo-colored density maps for each retina by estimating cell density in each of the 154 frames of the whole-mount and converting them manually to different colors using image editing software (Adobe® Photoshop®). This approach depicted an area of high density within the dorsal retina (Fig. 2C). The map was further refined by dividing each frame into four rectangular equally-sized regions and calculating the density in each of these regions again and converted them again to colors using the same software. This improved the resolution of the cell distribution throughout the retina (Fig. 2D). Finally, to demonstrate the distribution pattern of RGCs over the entire retina more graphically, cell densities were calculated and represented as filled contour plot graphs (Fig. 2E) using graphing software (SigmaPlot® 9.0 for Windows®, Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA). Briefly, we developed a specific subroutine using IPP® macro language in which every frame was divided into 64 equally-sized rectangular areas of interest (AOI). In each AOI, the RGC number was obtained using the previously described cell counting subroutine and the cell density was calcu-

lated. RGC densities were later exported to a spreadsheet (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA) and finally, data was once more represented as filled contour plots (Fig. 2E) using a graphing software (SigmaPlot®). Cell density calculating errors due to frames not fully occupied by retinal tissue on the whole retina contour were minimized by the high number of AOI with a relatively small size in each frame and by the near absence of RGCs in the retinal periphery.

2.8. Method validation

To validate the automatic counting method, four different experienced investigators counted in a blind masked fashion FG-labelled RGCs in 40 frames randomly selected from both eyes and representing different density regions of 4 normal rat retinas. These 40 frames were also counted automatically and the results were compared to those obtained manually (Fig. 1).

The criteria used for identifying and counting manually a FG-labelled RGC have been described in detail elsewhere (Vidal-Sanz et al., 2001; Lafuente et al., 2002; Lafuente López-Herrera, et al., 2002). In brief, FG-labelled RGCs had the typical punctuate and diffuse gold fluorescence delineating their somas and occasionally the initial segments of their primary dendrites (Fig. 2). A labeled RGC was counted if the whole cell was included within the frame or the nucleus of the cell was visible within the micrograph.

2.9. Statistics

Statistical analysis of the differences between groups of retinas or groups of animals was done using non-parametric ANOVA tests using Statistix® V1.0 for Windows® 95 software: the Kruskal–Wallis test was used to compare more than two groups and the Mann–Whitney test was used when comparing two groups only. To compare values from both retinas of different rats we used the paired *t*-test. Cell counts obtained by the automated method were compared with those obtained with the manual method using the Pearson correlation test (SigmaStat® for Windows®

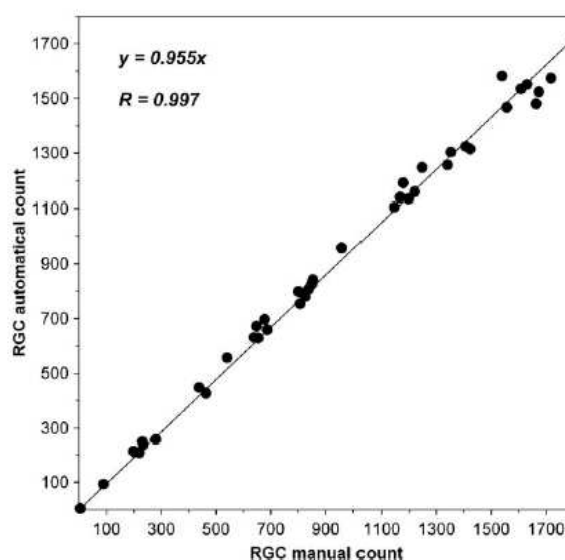


Fig. 1. Validation of automated RGC counting. Correlation of the numbers of RGCs counted manually versus automated methods in 40 frames randomly selected with different RGC densities. The black line is the line of best fit for the data, for which the equation and correlation coefficient are displayed on the graph.

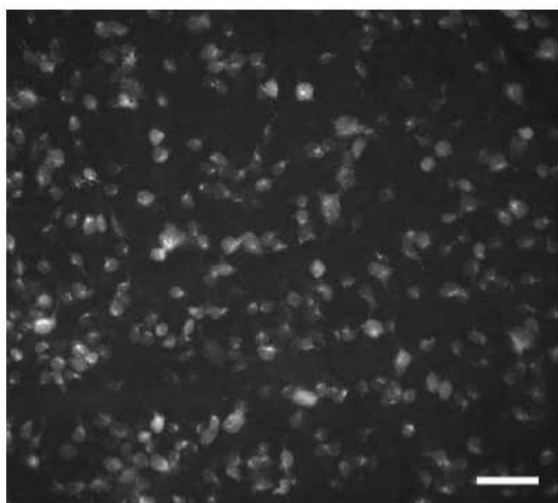


Fig. 2. Fluorescence micrograph from a representative flat-mounted retina showing at high magnification retinal ganglion cells retrogradely labelled with FG applied to both SCI for seven days prior to processing. The micrograph was taken on the periphery of the retina. Scale bar, 50 μ m.

Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results and discussion

In this study, we have examined the total numbers and spatial distribution of RGCs in adult albino (SD) and pigmented (PVG) rats. As revealed by retrograde axoplasmic transport of FG, there are approximately 82,818 and 89,241 RGCs, in the albino and pigmented rat, respectively. The numbers of RGCs retrogradely labeled from both SCI in SD and PVG rats were slightly smaller (1.6% and 2.2%, respectively) but comparable to those retrogradely labeled from the optic nerves showing, as previously suggested (Lund, 1965; Perry, 1981), that most RGCs project to the SCI, and

providing additional evidence for the massive retinotectal projection in the retinofugal system of adult rats. There were significant differences between the total numbers of RGCs in the albino and pigmented rats, which probably reflect a strain difference. The spatial distribution of RGCs within the retina demonstrated a horizontally oriented area of highest density located in the dorsal retina, resembling a visual streak.

3.1. Validation of cell counts

The accuracy of automatic counting was evaluated by comparing manual counts obtained by different expert investigators. Thus, in 40 randomly selected frames from right and left retinas, FG-labelled RGCs were counted manually by four different investigators blinded to the conditions compared. These results were plotted against the counts obtained automatically with the analysis program. There was a strong correlation between both methods (Pearson correlation test, $R = 0.997$; $P < 0.0001$) (Fig. 1).

Previous work in our laboratory requiring quantitative estimates of the retinal ganglion cell (RGC) population has consisted of manual counts of identified retrogradely labelled RGCs over printed photographs of standard regions of the retina, and the sampled area was only a small portion of the retina. Although manual cell counting may be accurate in the hands of an expert researcher (Vidal-Sanz et al., 2001), it is an often tedious, time-consuming and biased method. The need for obtaining a reliable, rapid and objective counting procedure appears of importance in experiments aimed at investigating neuronal survival on injury-induced neuronal death or as a baseline in a range of developmental studies. Thus, even though there is no perfect method for counting cells (Guillery, 2002), the present methodology is unbiased because it is performed by the software analysis program. Moreover, based on our cell count validation results it is also accurate. In addition, our results shown below indicate that it is a reliable and reproducible method to count RGCs, and indeed the total counts of RGCs were quite reproducible from retina to retina in our groups of SD or PVG rat (Tables 1–4).

However, this method to quantify the RGC population with the application of FG is of limited use in experimental designs in which the tracer cannot be applied to the retinofugal system (e.g., in experiments that involve a previous lesion of the ON) and relies

Table 1
Number of ganglion cells retrogradely labeled from the optic nerve (SD rats).

Animal #	Right retina			Left retina		
	Cells	Area (mm^2)	Mean cell density (Cells/ mm^2)	Cells	Area (mm^2)	Mean cell density (Cells/ mm^2)
1	82896	49.9	1660	78994	50.8	1554
2	79498	51.0	1558	77408	52.0	1489
3	87575	48.6	1803	82667	49.5	1671
4	80249	48.8	1646	84756	50.7	1672
5	88101	55.2	1597	82223	47.7	1723
6	82380	49.0	1683	82092	50.6	1622
7	78127	44.2	1769	80812	48.9	1652
8	87643	47.9	1831	–	–	–
9	83871	43.9	1911	77648	48.4	1603
10	84605	51.7	1636	89613	51.0	1758
11	85510	47.4	1804	90749	51.6	1760
12	80299	49.2	1633	88766	49.8	1781
13	79747	46.3	1722	79696	49.0	1627
14	77257	49.4	1565	82915	49.8	1665
Mean	82697 ^b	48.8	1701	82949 ^b	50.0	1660
SD	3634	2.9	108	4409	1.3	84
n	14	14	14	13	13	13
Mean ^a	82818	49.3	1681			
SD ^a	3949	2.3	97			
n	27	27	27			

^a Data from both retinas.

^b Not significantly different (Paired *t*-test, $P = 0.654$).

Table 2
Number of ganglion cells retrogradely labeled from the optic nerve (PVG rats).

Animal #	Right retina			Left retina		
	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (Cells/mm ²)	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (Cells/mm ²)
1	89894	58.08	1548	92844	61.87	1501
2	93012	60.26	1544	89673	60.14	1491
3	85435	57.4	1488	84588	59.12	1431
Mean	89447 ^b	58.6	1527	89035 ^b	60.4	1474
SD	3808	1.5	34	4165	1.4	38
n	3	3	3	3	3	3
Mean ^a	89241	59.5	1501			
SD ^a	3576	1.6	43			
n	6	6	6			

^a Data from both retinas.

^b Not significantly different (Paired *t*-test, *P* = 0.8427).

Table 3
Number of ganglion cells retrogradely labeled from the superior colliculi (SD rats).

Animal #	Right retina			Left retina		
	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (Cells/mm ²)	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (Cells/mm ²)
1	80324	53.2	1509	72595	55.7	1304
2	77501	53.2	1456	82633	56.0	1475
3	83360	54.9	1520	81688	54.3	1504
4	87570	57.0	1536	86031	57.0	1509
5	76842	51.2	1500	74551	48.0	1553
6	72454	45.6	1589	72802	48.6	1497
7	83268	50.1	1661	80798	48.7	1660
8	80207	48.6	1650	79695	50.7	1571
9	81705	46.5	1756	82530	50.8	1626
10	83713	48.4	1731	82357	47.4	1737
11	84744	52.7	1609	81144	52.0	1561
12	90166	46.8	1927	89465	49.9	1792
13	86771	50.5	1717	85735	51.2	1674
14	85510	50.0	1712	–	–	–
15	77872	48.2	1617	78922	52.6	1500
16	79794	50.1	1593	78423	48.5	1617
17	81794	55.7	1469	77978	53.2	1465
18	84586	50.1	1688	84528	51.5	1641
19	82806	53.7	1543	82127	54.5	1507
Mean	82157 ^b	50.9	1620	80778 ^b	51.7	1566
SD	4214	3.2	118	4478	2.9	114
n	19	19	19	18	18	18
Mean ^a	81486	51.3	1594			
SD ^a	4340	3.1	118			
n	37	37	37			

^a Data from both retinas.

^b Not significantly different (Paired *t*-test, *P* = 0.0655).

on an efficient method to apply the tracer (Vidal-Sanz et al., 2001) and on the competence of the retrograde axonal transport (Lafuente López-Herrera, et al., 2002). Moreover, in the present studies we could not analyze the size of the cell somas due to the transformations imposed to the FG-labeled RGCs in the analysis process.

3.2. Population of RGCs in SD and PVG rats

3.2.1. General appearance

Application of tracer to the intraocular aspect of the ON or to both SCi resulted in retinas that showed RGCs typically labeled with bright punctate and diffuse FG-fluorescence delineating their soma and occasionally the initial segment of their primary dendrites (Fig. 2) (Lafuente López-Herrera, et al., 2002; Peinado-Ramón et al., 1996; Sellés-Navarro et al., 1996; Vidal-Sanz et al., 2001). These cells were distributed throughout the RGC layer of the retina in a regular fashion with clusters containing higher cell densities in the central regions of the retina (Fig. 3A). When focusing on the in-

ner nuclear layer of the retina, small numbers of displaced RGCs were observed, but these (so called Dogiel's cells) have not been taken into account for the present study.

3.2.2. RGCs retrogradely labeled from the ON

In the group of 14 SD rats in which their retinas were labeled with FG applied to the intraorbital aspect of the ON for 3 days, the mean number of FG-labeled RGCs in the 27 analyzed retinas was $82,818 \pm 3,949$ (mean $\pm$ SD) (Table 1). There were no significant differences between the numbers of FG-labeled RGCs obtained in the right retinas when compared to their fellow contralateral left retinas (Paired *t*-test, *P* = 0.654; *n* = 13) (Table 1). In the group of 3 PVG rats in which their retinas were labeled with FG applied to the intraorbital aspect of the ON for 3 days, the mean number of FG-labeled RGCs was $89,241 \pm 3,576$ (*n* = 6; mean $\pm$ SD) (Table 2). There were no significant differences between the numbers of FG-labeled RGCs obtained in the right retinas when compared to their fellow contralateral left retinas (Paired *t*-test, *P* = 0.8427; *n* = 3) (Table 2).

Table 4
Number of ganglion cells retrogradely labeled from the superior colliculi (PVG rats).

Animal #	Right retina			Left retina		
	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (Cells/mm ²)	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (Cells/mm ²)
1	84121	48.1	1747	82232	50.0	1646
2	87235	48.5	1799	85300	55.3	1544
3	87920	49.4	1779	86889	49.1	1770
4	82599	48.8	1694	80348	52.8	1522
5	87623	53.9	1626	84128	52.8	1594
6	82186	46.8	1756	82920	50.6	1640
7	87732	54.1	1623	90951	56.3	1617
8	86469	54.6	1583	89508	54.9	1630
9	88725	52.2	1701	88384	55.4	1597
10	86812	51.5	1686	88927	56.7	1568
11	90797	55.9	1625	90523	56.2	1612
12	92557	58.9	1571	93876	59.2	1587
13	92985	59.4	1566	94101	60.7	1551
14	89491	61.5	1456	88438	58.3	1517
15	90499	59.5	1520	89596	61.4	1460
16	84475	53.3	1585	86891	57.3	1518
17	89482	56.1	1594	85657	52.7	1625
18	90772	58.0	1565	83342	57.9	1439
19	87495	54.7	1599	89399	57.6	1552
20	90556	57.4	1578	89001	58.0	1534
21	87924	54.8	1605	87038	53.5	1627
22	89494	53.9	1662	90498	55.2	1639
23	80050	55.1	1454	–	–	–
24	88982	55.4	1608	87762	52.8	1662
25	88187	58.4	1509	87989	54.8	1605
26 ^a	85940	48.3	1780	86531	49.8	1739
27 ^b	84519	48.6	1741	85424	49.4	1731
28 ^b	84742	49.5	1713	82491	51.3	1609
29 ^b	84582	49.0	1727	84763	50.5	1678
30 ^b	84001	49.0	1715	84643	47.4	1788
Mean	87298 ^c	53.5	1639	87157 ^c	54.4	1607
SD	3110	4.1	95	3343	3.7	84
n	30	30	30	29	29	29
Mean ^a	87229	53.9	1623			
SD ^a	3199	3.9	90			
n	59	59	59			

^a Data from both retinas.

^b Male rats.

^c Not significantly different (Paired *t*-test, *P* = 0.3583).

3.2.3. RGCs retrogradely labeled from the SCi

The numbers of FG-labeled RGCs in the SD rat retinas 7 days after FG application to the SCi were $81,486 \pm 4,340$ ($n = 37$; mean $\pm$ SD) (Table 3). There were no significant differences between the numbers of FG-labeled RGCs obtained in the right retinas when compared to their fellow contralateral left retinas (Paired *t*-test, *P* = 0.0655; $n = 18$) (Table 3). In PVG rats, the total numbers of FG-labeled RGCs from the SCi were $87,229 \pm 3,199$ ($n = 59$; mean $\pm$ SD) (Table 4). There were no significant differences between the numbers of FG-labeled RGCs obtained in the right retinas when compared to their fellow contralateral left retinas (Paired *t*-test, *P* = 0.3583; $n = 29$) (Table 4). Thus, the two retinas of an individual animal have comparable numbers of RGCs.

The overall mean number of FG-labelled RGCs obtained when FG was applied intraorbitally was slightly greater than that obtained when FG was applied to both SCi. In SD rats, approximately 1.6% of the population of RGCs that were labeled from the ON did not project to the SCi, a difference that was not statistically significant (Tables 1 and 3; Mann-Whitney test, *P* = 0.3588). Similarly, for the groups of PVG rats, approximately 2.2% of the population of RGCs that were labeled from the ON did not project to the SCi, a difference that was not statistically significant (Tables 2 and 4; Mann-Whitney test, *P* = 0.1438). This finding is in agreement with previous studies and provides additional evidence documenting that there is a massive projection from the retina towards the tectum (Linden & Perry, 1983; Lund, 1965, 1969; Lund, Land, & Boles,

1980). Other studies have also indicated that most axons project to the tectum and that the retinogeniculate projection is formed out of branches from approximately 35% of the retinotectal axons (Dreher et al., 1985; Martin, 1986).

The overall numbers of FG-labelled RGCs obtained in the PVG rats were greater than those obtained in SD rats, either when FG was applied to both SCi for 7 days (Tables 3 and 4; Mann-Whitney test, *P* = 0.0000) or to the intraorbital aspect of the optic nerve for 3 days (Tables 1 and 2; Mann-Whitney test, *P* = 0.0035), and this may reflect genetic differences between albino and pigmented rats (Fukuda, Sugimoto, & Shirokawa, 1982; Williams, Strom, Rice, & Goldowitz, 1996) or developmental differences in the early outgrowth of optic axons (Bunt, Lund, & Land, 1983) or the consequences of an abnormal laterality of distribution of optic axons in albinos (Fleming, Benca, & Behan, 2006; Lund, 1965). Behavioural studies involving visual acuity tests have also reported differences between albino and pigmented rats, the latter showing an enhanced visual acuity when compared to albino (Prusky, Harter, Douglas, & Whishaw, 2002).

The present studies were not designed to investigate the numbers of RGCs that project ipsi- or contralaterally to the SCi, but rather to quantify the population of RGCs contributing to the retinotectal projection. In our experience, FG application to the surface of one midbrain may also result in spurious labeling of the contralateral midbrain, because FG is a highly soluble dye. Other studies have indicated that the total number of RGCs that project ipsilaterally

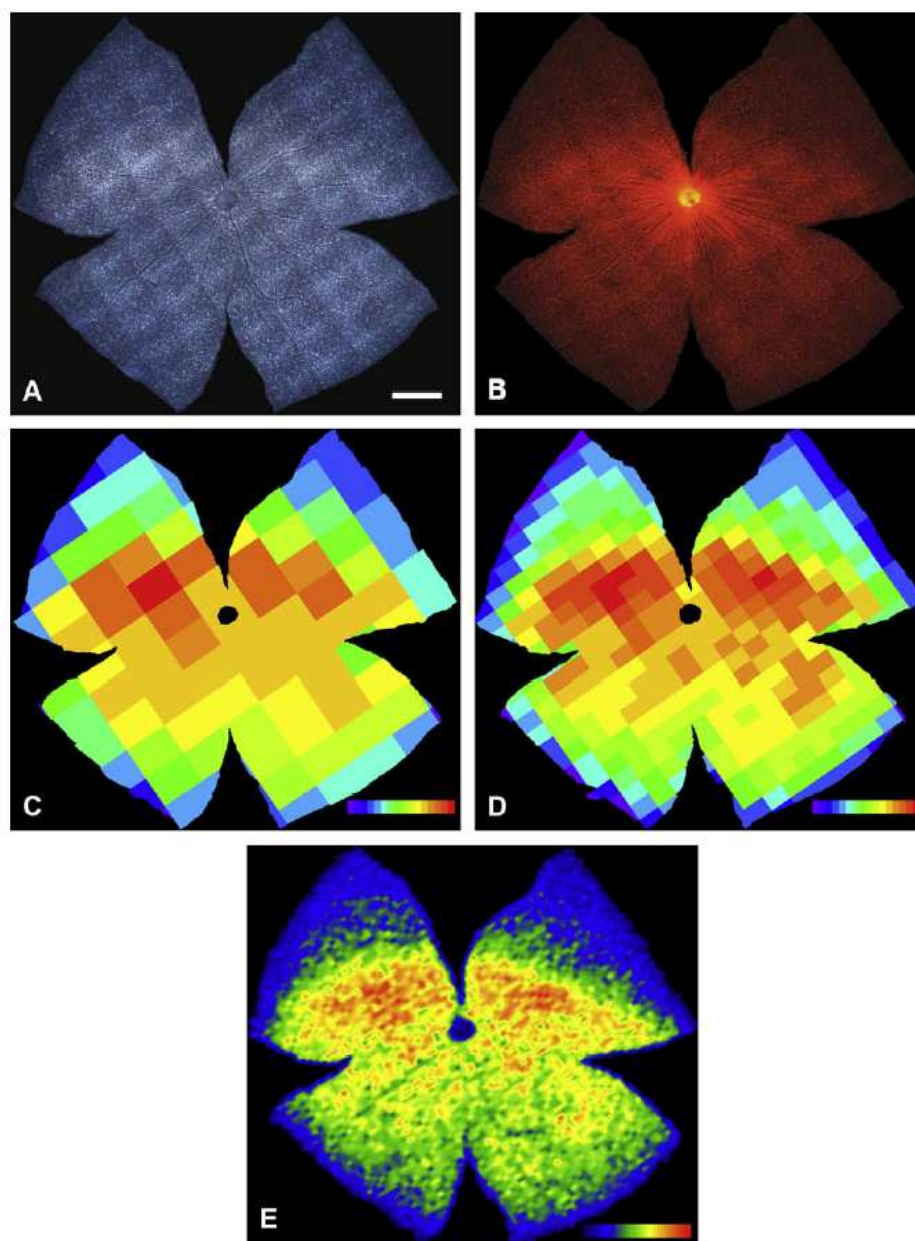


Fig. 3. Whole-mount of a representative SD right rat retina showing RGCs, double labelled with FG (A) applied to both SCI for 7 days and with DTMR (B) applied to the ocular stump of the intraorbitally transected ON 5 days later, distributed with a higher density along a naso-temporal streak in the dorsal retina. Color-coded density maps (C–E). Density maps generated by assigning to each individual frame (C) or each one of the four subdivisions from each individual frame (D) a color code according to its RGC density value within a 16-step color scale ranges from 0 (violet) to 3,000 or higher RGCs/mm² (red). Isodensity map (E) is represented as a filled contour plot generated by assigning to each one of the 64 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGCs density value within a 28-step color scale range from 0 (dark blue) to 3500 or higher RGCs/mm² (red). For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. This retina has 76,390 FG-labeled RGCs. Scale bar, 1 mm.

ally in a range of rodents (e.g., Syrian hamsters, Métin, Irons, & Frost, 1995; adult rats, Cusick & Lund, 1982; Lund et al., 1980) has been estimated to be of approximately 2.6–5% of the RGC population.

The numbers of RGCs obtained in our experiments are comparable to other studies that have investigated the numbers of RGCs in albino or pigmented rats. For instance, in Wistar rats, Levkovitch-Verbin et al., 2003 have estimated a total number

of axons in the ON behind the eye to be 85,511. Using stereologic protocols Freeman and Grosskreutz (2000) estimated a total number of RGCs in the adult Wistar rat of 74,104 and Levkovitch-Verbin et al., 2003 found that the total number of RGCs was 87,809 per eye. Using 4Di-10ASP applied to both SC and sampling regions of the retina, Fischer and colleagues (2000) estimated the total number of RGCs in SD rats to be 77,400.

Our numbers however, are somewhat smaller than those reported by Siu and colleagues (2002) who estimated from sampling areas of SD rat retinas that the total number of RGCs, using FG as a retrograde tracer applied to both SCi, is of approximately 98,725. Ko and colleagues (2001) found in Wistar rats a total of 119,988 RGCs. Using a similar approach Danias and colleagues (2006) found in Wistar and Brown Norway rats a total number of RGCs of 112,128 and 72,707, respectively. These differences may be explained by areal differences in RGC density across the retinal area, the number of areas examined, the different strains employed for the study, the tracers employed and mode of application, or on the methods employed to estimate the total RGC population.

3.3. Retinal area and densities of RGCs in SD and PVG rats

In the SD groups of rats that were labeled with FG applied to both SCi, the areas varied between 45.6 and 57 mm² with a mean value of 51.3 ± 3.1 ($n = 37$; mean $\pm$ SD). In these retinas, the local densities of FG-labeled RGCs varied between 1304 and 1927 with a mean of 1594 ± 118 ($n = 37$; mean $\pm$ SD) (Table 1). In the SD group of rats that were labeled with FG applied to both ONs, the areas varied between 44.2 and 55.2 mm² with a mean value of 49.3 ± 2.3 ($n = 27$; mean $\pm$ SD). In these retinas, the densities varied between 1489 and 1911 with a mean of 1681 ± 97 ($n = 27$; mean $\pm$ SD). (Table 3).

In the PVG group of rats that were labeled with FG applied to both SCi, the areas varied between 46.8 and 61.5 mm² with a mean value of 53.9 ± 3.9 ($n = 59$; mean $\pm$ SD) (Table 2). In these retinas, the local densities varied between 1439 and 1799 with a mean of 1623 ± 90 ($n = 59$; mean $\pm$ SD) (Table 2). In the PVG group of rats that were labeled with FG applied to both ONs, the areas varied between 57.4 and 61.9 mm² with a mean value of 59.5 ± 1.6 ($n = 6$; mean $\pm$ SD) (Table 4). In these retinas, the local densities varied between 1431 and 1548 with a mean of 1501 ± 43 ($n = 6$; mean $\pm$ SD) (Table 4).

Overall, our values obtained in the groups of SD or PVG rats for the densities of RGCs are within the range reported for albino or pigmented rats in previous studies from other independent laboratories (Ahmed, Hegazy, Chaudhary, & Sharma, 2001; Blair et al., 2005; Klöcker, Zerkowski, Gellrich, & Bähr, 2001; Park, Cozier, Ong, & Caprioli, 2001; Schuetttauf, Naskar, Vorwerk, Zurakowski, & Dreyer, 2000; Swanson, Schlieve, Lieven, & Levin, 2005; Thanos, Mey, & Wild, 1993; WoldeMussie et al., 2001).

Nevertheless, when central regions of the retina are sampled, the densities of FG-labelled RGCs tend to be significantly higher. This is reflected in previous studies from this (Lafuente, López-Herrera, et al., 2002; Peinado-Ramón et al., 1996; Sellés-Navarro et al., 1996; Vidal-Sanz et al., 1988, 2001; Villegas-Pérez et al., 1988) and other laboratories (Bakalash, Kipnis, Yoles, & Schwartz, 2002; Mo et al., 2002; Nakazawa, Tamai, & Mori, 2002; Pavlidis, Fischer, & Thanos, 2000) and may be explained by the different distribution of RGC throughout the retina, with highest densities in central regions (Fukuda, 1977; McCall et al., 1987; Perry, 1981; Schober & Gruschka, 1977; see below).

3.4. Retinal distribution of RGCs

Microscopic examination of the retinas revealed that the FG-labeled RGCs were not uniformly distributed throughout the retina. There were higher densities of FG-labeled RGCs in the central regions of the retina when compared to the periphery (see Fig. 3A). Although there was certain variability in the location of highest RGC density areas within each of the retinas, there was a tendency for higher densities to be located in the dorsal retina, within the central region, forming a horizontally oriented area of high density that extended along the naso-temporal axis, approximately 1 mm dorsal to the optic disc.

Table 5

Number of ganglion cells retrogradely labeled from the superior colliculi (SD rats).

Animal #	Right retina		Mean cell density (Cells/mm ²)
	Cells	Area (mm ²)	
1	75644	51.0	1482
2	78311	53.6	1461
3	70766	55.6	1273
4	76690	51.8	1481
5	76390	45.2	1689
6	75731	55.0	1376
7	84028	51.0	1647
8	85231	53.1	1605
9	83651	51.2	1634
10	80973	51.6	1571
11	80879	55.7	1452
12	87705	55.7	1574
Mean	79667	52.5	1520
SD	4917	3.0	122
n	12	12	12

To discard the possibility that this high-density region in the dorsal retina was the result of an artifact due to retrograde labeling from the SCi, in 12 additional SD rats the RGC population of the right retina was double labeled with FG applied to both SCi for 7 days and with DTMR applied to the ocular stump of the intraorbitally transected right ON for two days. When these retinas were examined under the fluorescence microscope with different fluorescence filters (ultraviolet or rhodamine) it was found that almost every FG-labeled RGC was also double labeled with RITC but not vice versa; detailed quantification of these proportions was not undertaken. These double labeled retinas also showed the characteristic high-density region in the dorsal retina when observed under both fluorescent filters, indicating that the spatial distribution was not the result of a labeling artifact. A representative example of this observation is illustrated in Fig. 3A and B. The total numbers of FG-labeled RGCs in these right retinas ($79,667 \pm 4,917$; mean $\pm$ SD; $n = 12$; Table 5) were comparable to those found in the group of animals in which RGCs were labeled from the SCi (Mann-Whitney test, $P = 0.2498$). Similarly the mean areas of these retinas were comparable to those found in such previous group of SD rats (Table 5).

To analyze in more detail this high-density region that adopted the form of a visual streak, we constructed color-coded density maps for these 12 retinas (Fig. 3C). The color-coded density maps confirmed our qualitative impression of a region with the highest density located in the dorsal retina. A further analysis of the high-density region involved the construction of finer density maps, in which individual frame was subdivided by 4 and color-coded in a scale of 16 different steps (each of 187.5) ranging from 0 to 3000 FG-labelled RGCs/mm² (an illustrative example of these finer density maps is shown in Fig. 3D). These maps showed evidence that there was a high-density region located approximately along the naso-temporal axis on the dorsal retina forming a visual streak. From this high-density region, RGC densities fall off rapidly from this area towards the dorsal and ventral retina, but it does so more pronouncedly on the dorsal retina, with a clear gradient toward the periphery (Dreher et al., 1985; Fukuda, 1977; McCall et al., 1987; Perry, 1981; Schober & Gruschka, 1977).

This region of high RGC density was further documented using a filled contour plot graph to construct colored isodensity maps in a scale of 28 different steps (each of 125) ranging from 0 to 3500, and in which every frame was divided into 64 equally-sized rectangular areas, with comparable results in the 74 retinas analyzed (33 retrogradely labeled from the ON and 41 from the SCi). Demonstrative examples of these findings are illustrated in Figs. 3E, 4 and 5. The mean for the highest individual densities were 3579 ± 169

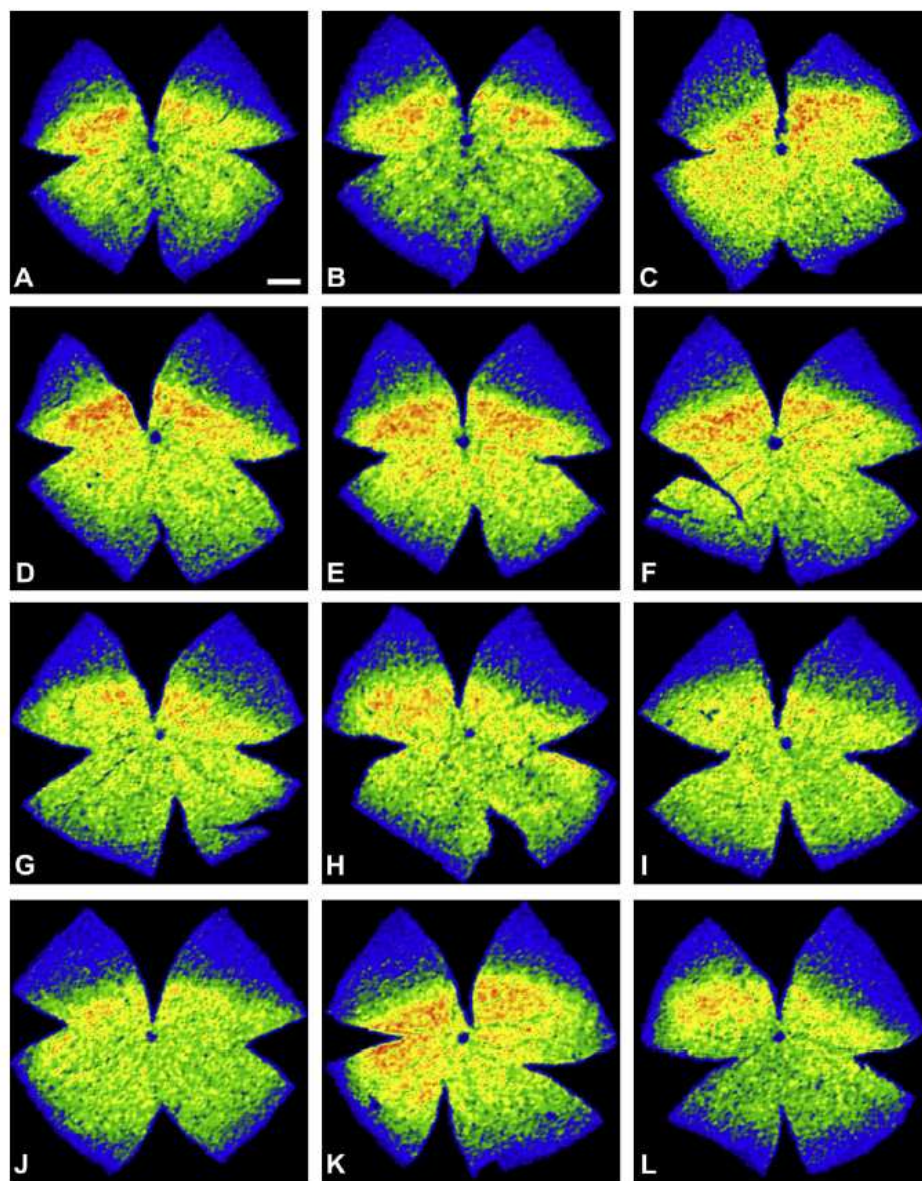


Fig. 4. Isodensity maps represented as a filled contour plot for six representative right SD rat retinas (A–F) and six representative PVG rat retinas (G and H are left retinas and I–L are right retinas). RGCs were retrogradely labelled with FG applied to both SCi for 7 days. Isodensity maps are represented as a filled contour plot generated by assigning to each one of the 64 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGCs density value within a 28-step color scale range from 0 (dark blue) to 3500 or higher RGCs/mm² (red). The high RGC density areas are within the dorsal retina along the naso-temporal axis. For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. Scale bar, 1 mm.

($n = 12$; mean $\pm$ SD) or $3,334 \pm 167$ ($n = 29$; mean $\pm$ SD) for SD or PVG rat retinas, respectively, when FG was applied to both SCi and 3809 ± 249 ($n = 27$; mean $\pm$ SD) or 3504 ± 245 ($n = 6$; mean $\pm$ SD) for the SD or PVG rat retinas, respectively, when FG was applied to the ON.

The distribution of this high-density region in the dorsal retina resembles a visual streak located on the area of the retina that looks out to the horizon (Stone, 1983). Such regional specialization of the RGC distribution in the retina was previously observed and suggested in the hamster (Métin et al., 1995) and in the rat (Jeffery, 1985; Reese & Cowey, 1986) and has been shown by this

Laboratory in the pigmented non-dystrophic RCS rat (Marco-Gomariz, Hurtado-Montalbán, Vidal-Sanz, Lund, & Villegas-Pérez, 2006). This finding may be at odds with a previous study in Wistar rats (Danas et al., 2002; Reese, 2002), but in our analysis we did not find clear evidence for the visual streak until the high-resolution density maps were constructed (Figs. 3C–E, 4 and 5A and B). Furthermore, even though our detailed filled contour plot graph based isodensity maps indicate the presence in the dorsal retina of an elongated region of elevated RGC density horizontally oriented along the naso-temporal axis, the highest density clusters of RGCs tended to localize on the dorsal temporal quadrant in most

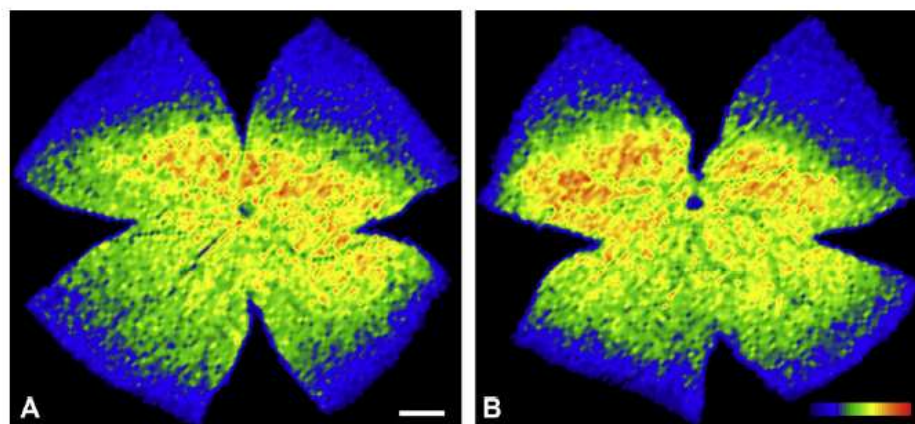


Fig. 5. Isodensity maps represented as a filled contour plot for both left (A) and right (B) retinas, from a representative SD rat labelled with FG applied to the ocular stump of the intraorbitally transected ON for 3 days, showing the typical high-density distribution along a naso-temporal streak in the dorsal retina. Maps were generated by assigning to each one of the 64 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGCs density value within a 28-step color scale range from 0 (dark blue) to 3500 or higher RGCs/mm² (red). For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. Scale bar, 1 mm.

retinas, and this is in agreement with previous studies (Dreher et al., 1985; Fukuda, 1977; McCall et al., 1987; Métin et al., 1995; Schober & Gruschka, 1977).

4. Summary

In SD and PVG strain of rats, the population of RGCs labeled with FG from the ON or the SCI, may be counted automatically with a level of confidence that is comparable to that found when RGCs are counted manually. Our results indicate that only a small percentage of the RGC population does not contribute to the retinotectal projection. In addition we also provide evidence for the distribution of rat retinal ganglion cells adopting a form of regional specialization that resembles a horizontal visual streak rather than an area centralis. Overall, the consistency and similarity of the results obtained in the present studies speak for the presently used method as an unbiased, reliable, reproducible and accurate way to assess the RGC population in adult rats, with a level of accuracy hardly attained with other methods. Moreover, the detailed isodensity maps constructed out of these counts provide a unique graphic system to assess regional RGC distribution in normal circumstances and after injury (García-Ayuso et al., 2008; Marco-Gomariz et al., 2006) and neuroprotection in several experimental models (Salinas-Navarro et al., 2006; Schnebel et al., 2007, 2008; Vidal-Sanz et al., De la Villa, 2007).

Acknowledgments

The authors thank the technical contribution of M.E. Aguilera, J.M. Bernal and I. Cánovas.

Support: This work was supported by research grants from the Regional Government of Murcia CARM BIO2005/016469; Fundación Séneca 02989/PI/05, 05703/PI/07, 04446/GERM/07; Spanish Ministry of Education and Science SAF-2005-04812; and Spanish Ministry of Health ISCIII: FIS P1006/0780 and RD07/0062/0001; and an unrestricted grant from Allergan Inc.

References

- Ahmed, F. A., Hegazy, K., Chaudhary, P., & Sharma, S. C. (2001). Neuroprotective effect of alpha(2) agonist (brimonidine) on adult rat retinal ganglion cells after increased intraocular pressure. *Brain Research*, 21, 133–139.

- Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., García-Avilés, A., Lafuente, M. P., Rodríguez, M. E., Miralles de Imperial, J., et al. (2003). Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Experimental Neurology*, 184, 767–777.
- Avilés-Trigueros, M., Sauvé, Y., Lund, R. D., & Vidal-Sanz, M. (2000). Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *Journal of Neuroscience*, 20, 361–374.
- Bakalash, S., Kipnis, J., Yoles, E., & Schwartz, M. (2002). Resistance of retinal ganglion cells to an increase in intraocular pressure is immune-dependent. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43, 2648–2653.
- Blair, M., Pease, M. E., Hammond, J., Valenta, D., Kielczewski, J., Levkovitch-Verbin, H., et al. (2005). Effect of glatiramer acetate on primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in the rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46, 884–890.
- Bunt, S. M., Lund, R. D., & Land, P. W. (1983). Prenatal development of the optic projection in albino and hooded rats. *Brain Research*, 282, 149–168.
- Cusick, C. G., & Lund, R. D. (1982). Modification of visual callosal projections in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 212, 385–398.
- Danias, J., Shen, F., Goldblum, D., Chen, B., Ramos-Esteban, J., Podos, S. M., et al. (2002). Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43, 587–594.
- Danias, J., Shen, F., Kavalakakis, M., Chen, B., Goldblum, D., Lee, K., et al. (2006). Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Experimental Eye Research*, 82, 219–228.
- Dreher, B., Sefton, A. J., Ni, S. Y., & Nisbett, G. (1985). The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behavioural Evolution*, 26, 10–48.
- Fischer, D., Pavlidis, M., & Thanos, S. (2000). Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41, 3943–3954.
- Fleming, M. D., Benca, R. M., & Behan, M. (2006). Retinal projections to the subcortical visual system in congenic albino and pigmented rats. *Neuroscience*, 143, 895–904.
- Freeman, E. E., & Grosskreutz, C. L. (2000). The effects of FK506 on retinal ganglion cells after optic nerve crush. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41, 1111–1115.
- Fukuda, Y. (1977). A three-group classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies. *Brain Research*, 119, 327–334.
- Fukuda, Y., Sugimoto, T., & Shirokawa, T. (1982). Strain differences in quantitative analysis of the rat optic nerve. *Experimental Neurology*, 75, 525–532.
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Coll-Alcaraz, L., Cánovas-Martínez, I., Bernal-Garro, J. M., Vidal-Sanz, M., et al. (2008). Characterization of the light-sensitive arciform region in the albino rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49 [E-Abstract 4395].
- Guillery, R. W. (2002). On counting and counting errors. *Journal of Comparative Neurology*, 447, 1–7.
- Jeffery, G. (1985). The relationship between cell density and the nasotemporal division in the rat retina. *Brain Research*, 347, 354–357.
- Klöcker, N., Zerfowski, M., Gellrich, N. C., & Bähr, M. (2001). Morphological and functional analysis of incomplete CNS fiber tract lesion: Graded crush of the rat optic nerve. *Journal of Neuroscience Methods*, 110, 147–153.

- Ko, M. L., Hu, D. N., Ritch, R., Sharma, S. C., & Chen, C. F. (2001). Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neuroscience Letters*, 305, 139–142.
- Lafuente López-Herrera, M. P., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2002). Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Experimental Neurology*, 178, 243–258.
- Lafuente, M. P., Villegas-Pérez, M. P., Mayor, S., Aguilera, M. E., Miralles de Imperial, J., & Vidal-Sanz, M. (2002). Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Experimental Eye Research*, 74, 181–189.
- Lafuente, M. P., Villegas-Pérez, M. P., Sellés-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., & Vidal-Sanz, M. (2002). Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience*, 109, 157–168.
- Levkovich-Verbin, H., Quigley, H. A., Martin, K. R. G., Zack, D. J., Pease, M. E., & Valenta, D. F. (2003). A model to study differences between primary and secondary degeneration of retinal ganglion cells in rats by partial optic nerve transection. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44, 3388–3393.
- Linden, R., & Perry, V. H. (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Research*, 272, 145–149.
- Lund, R. D. (1965). Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science*, 149, 1506–1507.
- Lund, R. D. (1969). Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *Journal Comparative Neurology*, 135, 179–208.
- Lund, R. D., Land, P. W., & Boles, J. (1980). Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: An HRP study in adults. *Journal Comparative Neurology*, 15, 711–720.
- Lund, R. D., Wang, S., Lu, B., Girman, S., Holmes, T., Sauvé, Y., et al. (2007). Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells*, 25, 602–611.
- Marco-Gomariz, M. A., Hurtado-Montalbán, N., Vidal-Sanz, M., Lund, R. D., & Villegas-Pérez, M. P. (2006). Phototoxic-induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *Journal Comparative Neurology*, 498, 163–179.
- Martin, P. R. (1986). The projection of different retinal ganglion cell classes to the dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Experimental Brain Research*, 62, 77–88.
- Mayor-Torroglosa, S., De la Villa, P., Rodríguez, M. E., López-Herrera, M. P., Avilés-Trigueros, M., García-Avilés, A., et al. (2005). Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: Neuroprotection with brimonidine. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 46, 3825–3835.
- McCall, M., Robinson, S. R., & Dreher, B. (1987). Differential retinal growth appears to be the primary factor producing the ganglion cell density gradient in the rat. *Neuroscience Letters*, 79, 78–84.
- Mélin, C., Irons, W. A., & Frost, D. O. (1995). Retinal ganglion cells in normal hamsters and hamsters with novel retinal projections. I. Number, distribution, and size. *Journal Comparative Neurology*, 353, 179–199.
- Mo, X., Yokoyama, A., Oshitari, T., Negishi, H., Dezawa, M., Mizota, A., et al. (2002). Rescue of axotomized retinal ganglion cells by BDNF gene electroporation in adult rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43, 2401–2405.
- Nakazawa, T., Tamai, M., & Mori, N. (2002). Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43, 3319–3326.
- Park, K. H., Cozier, F., Ong, O. C., & Caprioli, J. (2001). Induction of heat shock protein 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42, 1522–1530.
- Pavlidis, M., Fischer, D., & Thanos, S. (2000). Photoreceptor degeneration in the RCS rat attenuates dendritic transport and axonal regeneration of ganglion cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41, 2318–2328.
- 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 and Visual Science*, 37, 489–500.
- Perry, V. H. (1981). Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience*, 6, 931–944.
- Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M., & Whishaw, I. Q. (2002). Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research*, 136, 339–348.
- Reese, B. E. (2002). Rat retinal ganglion cell topography. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43, 587–594 [Letters for Danias et al.].
- Reese, B. E., & Cowey, A. (1986). Large retinal ganglion cells in the rat: Their distribution and laterality of projection. *Experimental Brain Research*, 61, 375–385.
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Holmes, T., Ortiz, A., Bernal, J. M., Canovas, I., et al. (2005). Automatic quantitative analysis of retinal ganglion cells that project to the superior colliculi in adult Sprague-Dawley rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46 [E-Abstract 271].
- Salinas-Navarro, M., Triviño, A., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., Ramírez, J. M., Villegas-Pérez, M. P., et al. (2006). Long term effects of laser-induced ocular hypertension: Retrograde degeneration of retinal ganglion cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47, E-Abstract 1560.
- Sasaki, H., Coffey, P., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Young, M. J., Lund, R. D., et al. (1996). Light induced EEG desynchronization and behavioral arousal in rats with restored retinocollicular projection by peripheral nerve graft. *Neuroscience Letters*, 218, 45–48.
- Sauvé, Y., Girman, S. V., Wang, S., Keegan, D. J., & Lund, R. D. (2002). Preservation of visual responsiveness in the superior colliculus of RCS rats after retinal pigment epithelium cell transplantation. *Neuroscience*, 114, 389–401.
- Sauvé, Y., Girman, S. V., Wang, S., Lawrence, J. M., & Lund, R. D. (2001). Progressive visual sensitivity loss in the Royal College of Surgeons rat: perimetric study in the superior colliculus. *Neuroscience*, 1, 51–63.
- Schnebelen, C., Salinas-Navarro, M., Acar, N., Pasquis, B., Creuzot-Garcher, C. P., Villegas-Pérez, M. P., et al. (2007). Time course of IOP elevation, electroretinographic changes and retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma induced by laser. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48 [E-Abstract 206].
- Schnebelen, C., Salinas-Navarro, M., Acar, N., Pasquis, B., Creuzot-Garcher, C. P., Villegas-Pérez, M. P., et al. (2008). Effect of dietary Omega-3 and Omega-6 fatty acids on IOP elevation, electroretinographic changes and retinal ganglion cell loss in a laser-induced rat model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49 [E-Abstract 5499].
- Schober, W., & Gruschka, H. (1977). Retinal ganglion cells of the albino rat: A qualitative and quantitative study. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 91, 397–414.
- Schuettauf, F., Naskar, R., Vorwerk, C. K., Zurakowski, D., & Dreyer, E. B. (2000). Ganglion cell loss after optic nerve crush mediated through AMPA-kainate and NMDA receptors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 4, 4313–4316.
- 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 and Visual Science*, 37, 2002–2014.
- Siu, A. W., Leung, M. C., To, C. H., Siu, F. K., Ji, J. Z., & So, K. F. (2002). Total retinal nitric oxide production is increased in intraocular pressure-elevated rats. *Experimental Eye Research*, 75, 401–406.
- Stone, J. (1983). *Parallel processing in the visual system*. New York: Plenum Press.
- Swanson, K. I., Schlieve, C. R., Lieven, C. J., & Levin, L. A. (2005). Neuroprotective effect of sulphhydryl reduction in a rat optic nerve crush model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46, 3737–3741.
- Thanos, S., Mey, J., & Wild, M. (1993). Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience*, 13, 455–466.
- Vidal-Sanz, M., Avilés-Trigueros, M., Whiteley, S. J., Sauvé, Y., & Lund, R. D. (2002). Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Progress in Brain Research*, 137, 443–452.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 7, 2894–2909.
- Vidal-Sanz, M., De la Villa, P., Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., et al. (2007). Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye*, 21, S42–S45.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M. P., Mayor, S., Miralles de Imperial, J., & Villegas-Pérez, M. P. (2001). Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia: Neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Survey of Ophthalmology*, 45, 261–267.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., Sobrado-Calvo, P., Selles-Navarro, I., Rodríguez, E., Mayor-Torroglosa, S., et al. (2000). Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotoxicity Research*, 2, 215–227.
- Vidal-Sanz, M., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., García-Ayuso, D., Bernal, J. M., et al. (2007). Spatial distribution and quantitative analysis of retinal ganglion cells in adult albino rodents. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48 [E-Abstract 134].
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1988). Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye DiI. *Experimental Neurology*, 102, 92–101.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1993). The use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols*, 3, 29–33.
- Villegas-Pérez, M. P., Aguilera, M. E., Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Holmes, T., Bernal, J. M., et al. (2006). Retinal ganglion cells in adult albino and pigmented rats: Spatial distribution and quantitative analysis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47 [E-Abstract 3318].
- Villegas-Pérez, M. P., Lawrence, J. M., Vidal-Sanz, M., Lavail, M. M., & Lund, R. D. (1998). Ganglion cell loss in RCS rat retina: A result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 392, 58–77.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 8, 265–280.
- Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Lund, R. D. (1996). Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport*, 7, 1995–1999.
- 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, 23–36.
- Whiteley, S. J., Sauvé, Y., Avilés-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., & Lund, R. D. (1998). Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Experimental Neurology*, 154, 560–572.
- Williams, R. W., Strom, R. C., Rice, D. S., & Goldowitz, D. (1996). Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *Journal of Neuroscience*, 16, 7193–7205.
- WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wijono, M., & Wheeler, L. A. (2001). Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42, 2849–2855.

10. ANEXO II

10. ANEXO II

Vision Research 49 (2009) 637–647



Contents lists available at ScienceDirect

Vision Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/visres



Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: A computerized analysis of the entire population and its spatial distribution

M. Salinas-Navarro^{a,1}, M. Jiménez-López^{a,1}, F.J. Valiente-Soriano^a, L. Alarcón-Martínez^a,
M. Avilés-Trigueros^a, S. Mayor^a, T. Holmes^b, R.D. Lund^c, M.P. Villegas-Pérez^a, M. Vidal-Sanz^{a,*}

^a Laboratorio de Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, Spain

^b Catherine McCauley Centre, University College Dublin, Dublin, Ireland

^c Casey Eye Institute, Oregon Health Sciences University, Portland, OR, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2008

Received in revised form 14 January 2009

Keywords:

Retinal ganglion cells

Visual streak

Fluorescent tracers

Retrograde labeling

Image analysis

Computerized analysis

ABSTRACT

In adult Swiss albino and C57 pigmented mice, RGCs were identified with a retrogradely transported neuronal tracer applied to both optic nerves (ON) or superior colliculi (SCI). After histological processing, the retinas were prepared as whole-mounts, examined and photographed under a fluorescence microscope equipped with a motorized stage controlled by a commercial computer image analysis system: Image-Pro Plus® (IPP). Retinas were imaged as a stack of 24-bit color images (140 frames per retina) using IPP with the Scope-Pro plug-in 5.0 and the images montaged to create a high-resolution composite of the retinal whole-mount when required. Single images were also processed by specific macros written in IPP that apply a sequence of filters and transformations in order to separate individual cells for automatic counting. Cell counts were later transferred to a spreadsheet for statistical analysis and used to generate a RGC density map for each retina. Results: The mean total numbers of RGCs labeled from the ON, in Swiss ($49,493 \pm 3936$; $n = 18$) or C57 mice ($42,658 \pm 1540$; $n = 10$) were slightly higher than the mean numbers of RGCs labeled from the SCI, in Swiss ($48,733 \pm 3954$; $n = 43$) or C57 mice ($41,192 \pm 2821$; $n = 42$), respectively. RGCs were distributed throughout the retina and density maps revealed a horizontal region in the superior retina near the optic disk with highest RGC densities. In conclusion, the population of mice RGCs may be counted automatically with a level of confidence comparable to manual counts. The distribution of RGCs adopts a form of regional specialization that resembles a horizontal visual streak.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The adult rodent primary visual pathway has been widely used to investigate anatomical, functional and behavioral aspects of the mammalian central nervous system regeneration (Avilés-Trigueros, Sauvé, Lund, & Vidal-Sanz, 2000; Sasaki et al., 1996; Vidal-Sanz, Avilés-Trigueros, Whiteley, Sauvé, & Lund, 2002; Vidal-Sanz, Bray, Villegas-Pérez, Thanos, & Aguayo, 1987; Vidal-Sanz, Villegas-Pérez, Bray, & Aguayo, 1993; Whiteley, Sauvé, Avilés-Trigueros, Vidal-Sanz, & Lund, 1998), degeneration (Agudo et al., 2008; Agudo et al., 2009; Chidlow, Casson, Sobrado-Calvo, Vidal-Sanz, & Osborne, 2005; Lafuente, Villegas-Pérez, Sellés-Navarro, et al., 2002; Lund et al., 2007; Sellés-Navarro, Villegas-Pérez, Salvador-Silva, Ruiz-Gomez, & Vidal-Sanz, 1996; Villegas-Pérez, Lawrence, Vidal-Sanz, Lavail, & Lund, 1998; Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, Bray, & Aguayo, 1988; Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, & Lund, 1996;

Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, Rasminsky, Bray, & Aguayo, 1993; Wang, Villegas-Pérez, Vidal-Sanz, & Lund, 2000) and neuroprotection (Avilés-Trigueros et al., 2003; Lafuente López-Herrera, Mayor-Torroglosa, Miralles de Imperial, Villegas-Pérez, & Vidal-Sanz, 2002; Lafuente et al., 2002; Lund et al., 2007; Mayor-Torroglosa et al., 2005; Vidal-Sanz et al., 2007; Vidal-Sanz et al., 2007; Vidal-Sanz et al., 2000).

In rodents, like in most mammals, RGCs project to a number of central regions known as retino-recipient targets including the suprachiasmatic nuclei, the accessory optic nuclei, the pretectal nuclei, the ventral lateral geniculate nuclei, the dorsal lateral geniculate nuclei, and the superior colliculi (Rodiek, 1979). The vast majority of RGCs project to the superior colliculi (Lund, 1965; Perry, 1981) where RGCs axons deploy in a very precise topographic manner (Linden & Perry, 1983; Sauvé, Girman, Wang, Lawrence, & Lund, 2001; Sauvé, Girman, Wang, Keegan, & Lund, 2002), but to date the exact magnitude of this projection has only recently been examined in adult rats (Salinas-Navarro et al., 2009). Within the rodent retina, the RGC population is distributed throughout in a central-peripheral gradient and some authors have

* Corresponding author. Fax: +34 968 36 39 62.

E-mail address: ofmmv01@um.es (M. Vidal-Sanz).

¹ These authors have contributed equally towards this work.

found a region with highest RGC density in the superior retina, mainly within the superior temporal region of mice (Dräger & Olsen, 1981; Jakobs, Libby, Ben, John, & Masland, 2005; Jeon, Strettoi, & Masland, 1998), Syrian hamster (Métin, Irons, & Frost, 1995) and rat (Dreher, Sefton, Ni, & Nisbett, 1985; Fukuda, 1977; Jeffery, 1985; Perry, 1981; Reese & Cowey, 1986; Schober & Gruschka, 1977), but whether they adopt some form of regional specialization has been controversial (Danias et al., 2002; Danias et al., 2003; Reese, 2002; Salinas-Navarro et al., 2009). Such concept is important because the distribution of RGCs in the retina reflect the regional specialization and resolution of the visual system (Dräger & Hubel, 1976; Prusky, Harker, Douglas, & Wishaw, 2002).

Adult Swiss and C57BL/6J strains of mice with non-pigmented and pigmented eyes, respectively, are usually employed for experimental models of injury-induced RGC loss and its prevention, thus it was of interest to determine, as a reference for future studies, the total number of RGCs in these mice, the number of RGCs projecting to the superior colliculi and their regional distribution within the retina. In the present study we have taken advantage of retrogradely transported tracers to identify the entire RGC population and used an automated methodology to count labeled RGCs (Danias et al., 2002; Nadal-Nicolás et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009; Vidal-Sanz, De la Villa, et al., 2007; Vidal-Sanz, Salinas-Navarro, et al., 2007). We report the numbers of RGCs that give rise to the retinofugal projection in Swiss and Adult C57BL/6J mice, as well as the numbers of RGCs that contribute to the retinotectal projection, providing additional direct evidence for the massive contralateral projection in the retinofugal system of adult mice (Dräger & Olsen, 1981; Lund, 1965). The analysis of the RGC spatial distribution, adds to the existing literature showing a horizontally oriented high-density region of RGCs in the dorsal retina, resembling a visual streak. These data provide necessary background information for studying the effects of genetic and induced changes associated with mouse disease models of glaucoma, and the photoreceptor degenerations [part of this work have been presented in abstract form (Salinas-Navarro et al., 2005; Vidal-Sanz, Salinas-Navarro, et al., 2007; Villegas-Pérez et al., 2006)].

2. Methods

2.1. Animals and anesthesia

Experiments were performed on adult male albino Swiss ($n = 34$) and pigmented C57BL/6N ($n = 26$) mice, (weighing 37 and 31 g, respectively) obtained from the breeding colony of the University of Murcia (Murcia, Spain). Mice were housed in temperature and light controlled rooms with a 12 h light/dark cycle and had food and water ad libitum. Light intensity in the animal room was programmed to be of 24 lux, depending on the location of the animal cage within the rack, the intensity varied from 9 to 24 lux.

When animal manipulations were performed, the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85–23, revised 1985), the OPRR Public Health Service Policy of the Human Care and the Use of Laboratory Animals (revised 1986) and the US Animal Welfare Act, as amended, were followed, as well as our institutional guidelines, European Union regulations for the use of animals in research and the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. In addition, additional measures were taken to minimize pain or discomfort.

All surgical manipulations were done under general anesthesia induced with an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (70 mg/kg, Ketalar®, Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompún®, Bayer, S.A., Barcelona, Spain). While recovering from anesthesia, mice were placed in their cages, and an ocular ointment containing neomycin and prednisone (Oftalmolosa Cusí Prednisona-Neomicina®, Alcon S.A., Barcelona, Spain) was applied

on the cornea to prevent corneal desiccation. Animals were euthanized with an i.p. injection of an overdose of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol®, Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

2.2. Retrograde tracing

In the ganglion cell layer of the rodent retina there are RGC and displaced amacrine cell populations in similar proportions (Dräger & Olsen, 1981; Perry, 1981; Perry, Henderson, & Linden, 1983), as well as a small number of displaced horizontal cells (Silveira, Picanço-Diniz, & Oswaldo-Cruz, 1989; Silveira, Yamada, & Picanço-Diniz, 1989). For instance, in the mouse retina approximately 59% of the neurons in the GC layer are displaced amacrine cells (Dräger & Olsen, 1981; Jeon et al., 1998; Schmidt, Vitral, & Linden, 2001). Thus, a well established method to identify RGCs has consisted on the application of retrogradely transported tracers to their main target regions in the brain or to their optic tracts or nerves (Lafuente López-Herrera, et al., 2002; Peinado-Ramon, Salvador, Villegas-Pérez, & Vidal-Sanz, 1996; Sellés-Navarro et al., 1996; Vidal-Sanz, Lafuente, Mayor, de Imperial, & Villegas-Pérez, 2001). One tracer proven reliable and efficient for the visual system is FluoroGold™ (2-Hydroxystilbene-4,4'-dicarboximidine bis (methanesulfonate)) (Salinas-Navarro et al., 2009) or its equivalent hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) a small (472.53 kDa Mw) molecule (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) with similar fluorescent and tracer properties to fluorogold (Cheung & Morris, 2005).

2.2.1. Tracing from the optic nerve

To label the bulk of the retinofugal projection from each retina the optic nerves were transected intraorbitally in 10 Swiss and in 5 C57 mice, a small pledget of gelatin sponge soaked in a solution containing 10% OHSt (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) in 0.9% NaCl and 10% dimethyl sulphoxide (DMSO) was applied to the ocular stump of the cut optic nerve, approximately 1 mm from the optic disk following previously described methods that are standard in our laboratory (Lafuente López-Herrera, et al., 2002; Salinas-Navarro et al., 2009; Vidal-Sanz, Villegas-Pérez, Bray, & Aguayo, 1988; Villegas-Pérez et al., 1993), and the animals were processed 72 h later.

2.2.2. Tracing from the superior colliculi

To identify the population of RGCs contributing to the retinotectal projection, OHSt was applied to both SCi in a group of 24 Swiss or 21 C57 adult mice, from which a total of 43 or 42 retinas were analyzed, respectively. In brief, after exposing the midbrain, a small pledget of gelatin sponge (Espongostan® Film, Ferrosan A/S, Denmark) soaked in saline containing 10% OHSt in 0.9% NaCl and 10% DMSO, was applied over the entire surface of both SCi following previously described methods that are standard in our laboratory (Salinas-Navarro et al., 2009; Vidal-Sanz et al., 1988; Wang et al., 2000).

2.3. Histology and retinal examination

Mice were deeply anesthetized, perfused transcardially through the ascending aorta with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). Special care was taken to maintain the orientation of each eye, and right after deep anesthesia and before perfusion fixation a suture was placed on the superior pole of each eye. Upon dissection of the eyeball, the rectus muscle insertion into the superior part of the eye and the nasal caruncle were used as additional landmarks. Both retinas were dissected and prepared as flattened whole-mounts by making four radial cuts (the deepest one in the superior pole), post-fixed

for an additional hour, rinsed in 0.1 M PB, mounted vitreal side up on subbed slides and covered with anti-fading mounting media containing 50% glycerol and 0.04% p-phenylenediamine in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9).

Retinas were photographed under a fluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with an ultraviolet (BP 365/12, LP 397) filter that allows the observation of the white-gold OHSt fluorescence. The microscope was also equipped with a digital high-resolution camera (ProgRes™ C10, Jenoptik, Jena, Germany) and a computer-driven motorized stage (ProScan™ H128 Series, Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK), connected to an image analysis computer program (IPP 5.1 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) with a microscope controller module (Scope-Pro® 5.0 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Retinal whole-mount reconstructions were obtained with retinal multi-frame acquisitions photographed in a raster scan pattern where the frames were captured contiguously side-by-side with no gap or overlap between them with a $\times 20$ objective (Plan-Neofluar, $20\times/0.50$; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany). Single frames were focused manually prior to the capture of the image, which were then fed into the image analysis program. A scan area was defined to cover completely the whole retina, this area consists of a matrix of m frames in columns and n frames in rows, where the total number of frames in the scan area is indicated by frames in columns times frames in rows ($m \times n$). Usually 140 images, measuring each (0.2161 mm^2) at a resolution of (300 dots per in.), were taken for each mouse retina.

The images taken for each retina were saved in a folder as a set of 24-bit color image pictures and later, these images can be combined automatically into a single tiled high-resolution composite image of the whole retina using IPP® for Windows®. Reconstructed images were further processed using image-editing software (Adobe Photoshop® CS; ver 8.0.1, Adobe Systems, Inc., San Jose, CA) when needed to produce printouts.

2.4. Image analysis

All individual images taken from every retina were processed following a specific cell counting subroutine that was developed to automate repetitive tasks and thus to count FG-labeled RGCs in mice retinas. These subroutines differ slightly from our previously described subroutines to count rat RGCs (Nadal-Nicolás et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009) and have been outlined in a schematic figure (Fig. 1). In brief, we used IPP macro language to apply a sequence of filters and transformations to each image in order to clarify cell limits and separate individual cells for automatic cell counting. In a first step, the images were converted to 8-bit gray scale images. Illumination aberrations caused by the microscope optics were removed by the software flatten enhancement filter which evens out the background variations. This was followed by enhancement of the edges of the cells using the large spectral filter edge+ command, which extracts positive edges (in this case fluorescent stained bright cells) from the dark background. A setting of 8% (kernel size 20×20) was sufficient to enhance the cell edges making detection simpler. Large spectral filters were used where large kernels were required and cut down on the processing overheads. Small artifacts and noise were removed by running three passes of the median enhancement filter (kernel size 3×3). Cell clusters were then separated by two passes of the watershed split morphological filter which erodes objects until they split and then dilates them until they do not touch. The cells in each image were counted using predetermined parameters to exclude objects that were larger than $300 \mu\text{m}^2$ or smaller than $7 \mu\text{m}^2$. These parameters correspond to the largest or smallest individual FG-labeled

object detected as RGC (Fig. 1). Finally, each count was exported by dynamic data exchange to a spreadsheet (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Retinal area was measured on the tiled high-resolution photo-montage image of the whole retina with the IPP® program. For that purpose, a spatial calibration must be applied to the image based on its capture settings and produced by calibrating the stage.

2.5. Pseudo-colored density maps

The pattern of RGC distribution over the entire retina was analyzed with isodensity maps. Cell densities were calculated and represented as a filled contour plot graph. Every captured frame was divided in an equal number of 36 rectangular areas of interest (AOI). These AOI were counted (using the previously described cell counting subroutine as above) and data was exported and saved to a spreadsheet computer program (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA). Finally the data were represented as a filled contour plot using graphing software (SigmaPlot® 9.0 for Windows®, Systat Software, Inc., Richmond, CA) that constructs pseudo-colored isodensity maps in a scale of 45 different steps (each of 125) ranging from 0 to 5625 cells/ mm^2 . This upper limit was chosen on the basis of the earlier animals analyzed in the present studies, that showed mean highest densities around this value. Cell density calculating error due to frames not fully occupied by retinal tissue on the whole retina contour is minimized by the high number of AOI with a relatively small size in each frame and by the almost absence of RGCs in the retinal periphery.

2.6. Method validation

To validate the counting method, a total of 26,606 RGCs labeled by the application of OHSt to both SCi in Swiss and C57 mice, in 41 randomly selected digital images covering different density rates of 4 different normal retinas were counted manually by four different experienced investigators in a masked fashion. These were also counted automatically and the results compared to those obtained manually (Fig. 2).

2.7. Statistics

The statistical analysis of the differences between groups of retinas or groups of animals was done using non-parametric ANOVA tests using Statistix® V1.0 for Windows 95 software: the Kruskal-Wallis test was used to compare more than two groups and the Mann-Whitney test was used when comparing two groups only. To compare cell counts obtained automatically with those obtained manually we used the Pearson correlation test (SigmaStat® for Windows™ Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

The albino (Swiss) and pigmented (C57) strain of mice are commonly employed for a number of experimental approaches aimed at studying the problem of injury-induced RGC loss and its prevention, thus it was of interest to determine as a baseline for future studies, the population and spatial distribution of RGCs in these mice. There is a mean of 49,493 and 42,658 RGCs, in the albino and pigmented mice, respectively, as revealed by retrograde axoplasmic transport of OHSt from the optic nerve. The numbers of RGCs retrogradely labeled from both SCi in Swiss and C57 mice were slightly smaller (1.5% and 3.4%, respectively) but comparable to those retrogradely labeled from the optic nerves. Thus, in mice (Dräger & Olsen,

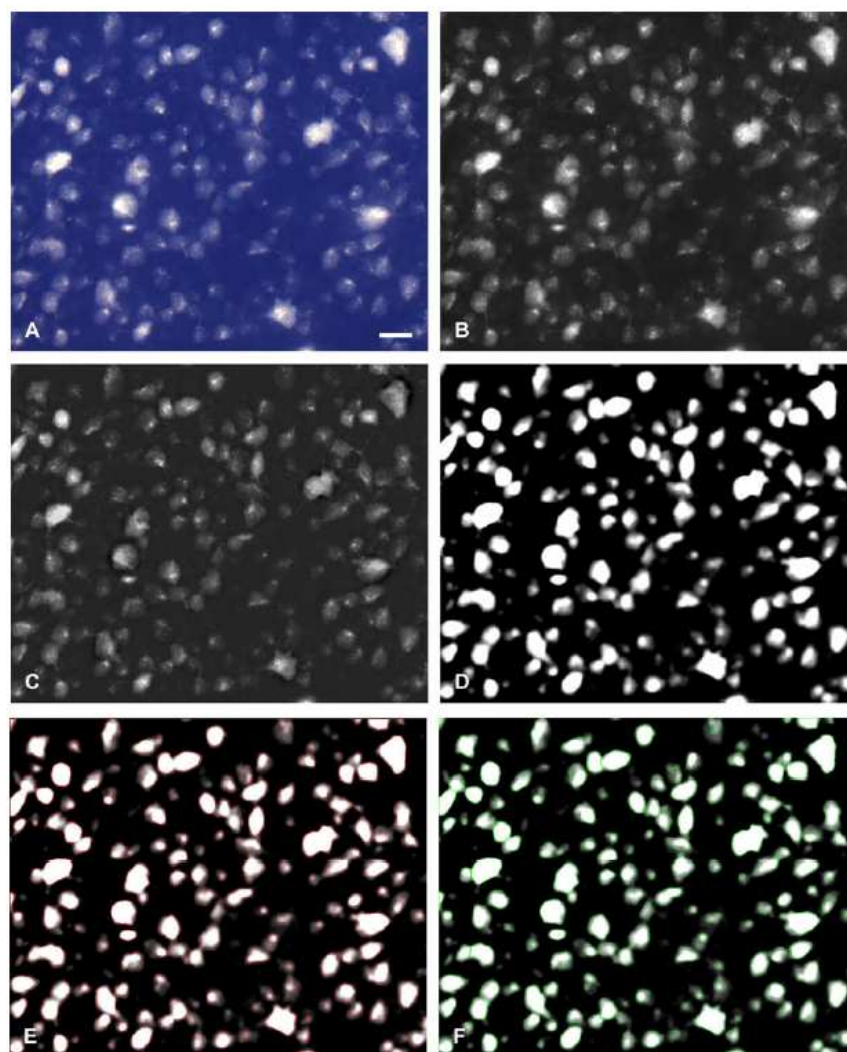


Fig. 1. Outline of automatic subroutines to count labeled retinal ganglion cells. (A) Fluorescence micrograph from a representative whole-mounted C57 mice retina, showing at high power retinal ganglion cells retrogradely labeled with OHSt applied to both SCI for 1 week prior to animal processing. The micrograph was taken on the middle region of the retina and when counted manually shows 154 labeled RGCs. (B) To count automatically this image in a first step the image was converted to 8-bit gray scale image [IpWsConvertImage(IMC_GRAY, CONV_SCALE, 0, 0, 0, 0)]. (C) Illumination aberrations were removed by the software flatten enhancement filter [IpFltFlatten(1, 20)]. (D) The edges of the cells were enhanced by using the large spectral filter edge+ command [IpLSFltApply(LF_EDGEPL, 50, 50, 1, 10)] and small artifacts and noise were removed by running three passes of the median enhancement filter [IpFltMedian(3, 3)]. (E) Cells were counted by running the counting function [IpBibCount()]. (F) Cell clusters were then separated by two passes of the watershed split morphological filter [IpBibSplitObjects(1)] and recounted. Scale bar for A, 20 μ m.

1981), as has been shown for rats (Lund, 1965; Perry, 1981; Salinas-Navarro et al., 2009), the retinofugal system gives rise to a massive retinotectal projection. There were significant differences between the total numbers of RGCs in the albino and pigmented mice, which probably reflect genetic differences (Williams, Strom, Rice, & Goldowitz, 1996). The spatial distribution of RGCs within the retina was examined with filled contour plot graphs and these provided additional direct evidence (Drager & Olsen, 1981) of a horizontal area of highest density in the dorsal retina.

3.1. Validation of cell counts

In 41 randomly selected frames from right and left retinas, 26,492 OHSt-labeled RGCs were counted manually by four differ-

ent investigators blinded to the conditions compared. These results were plotted against the counts obtained automatically with the analysis program and revealed a strong correlation between both methods (Pearson correlation test, $R = 0.995$; $P < 0.0001$) (Fig. 2), thus indicating the accuracy of the automatic counting.

3.2. RGCs in Swiss and C57 mice

The mice retinas showed RGCs labeled (Fig. 1A) with bright punctate and diffuse white or yellow-gold OHSt fluorescence delineating their soma and occasionally the proximal aspects of their primary processes (Lafuente López-Herrera, et al., 2002; Lafuente, Villegas-Pérez, et al., 2002; Peinado-Ramon et al., 1996; Sellés-Navarro et al., 1996; Vidal-Sanz et al., 2001). Labeled RGCs

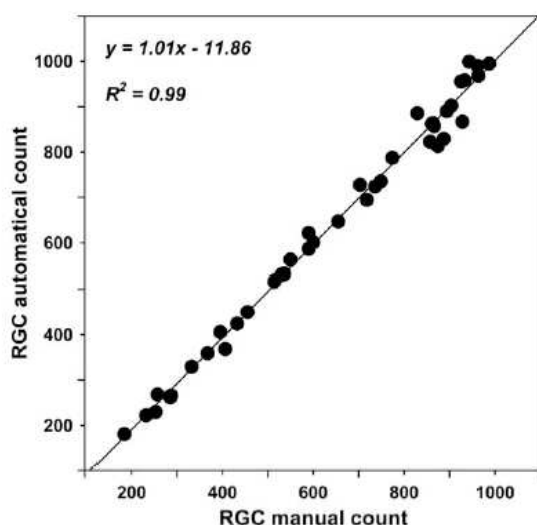


Fig. 2. Validation of automated RGC counting. The numbers of retinal ganglion cells counted manually were correlated to those obtained automatically in 40 randomly selected frames with various RGC densities. The dark line is the line that corresponds to best fit for the data, for which the equation and correlation coefficient are displayed on the graph.

were observed throughout the RGC layer of the retina with clusters containing higher cell densities in the central regions of the retina (Fig. 3A). Small numbers of displaced OHSt-labeled RGCs, also called Dogiel's cells (Dogiel, 1888), were observed when focusing the inner nuclear layer of the retina but these were not taken into account for the present study.

3.2.1. Retinofugal population of RGCs

Three days after tracer application to the intraorbital aspect of the ON, the mean total number of retrogradely labeled RGCs was $49,493 \pm 3936$ ($n = 18$; mean $\pm$ SD) (Table 1) or $42,658 \pm 1540$ ($n = 10$; mean $\pm$ SD) (Table 2) for Swiss or C57 mice, respectively. There were no significant differences between the numbers of

OHSt-labeled RGCs obtained in the right retinas when compared to their fellow contralateral left retinas for the Swiss (Mann–Whitney test, $P = 0.5962$) (Table 1) or C57 mice retinas (Mann–Whitney test, $P = 0.5309$) (Table 2), respectively.

3.2.2. Retinotectal population of RGCs

Seven days after OHSt application to the SCi the numbers of labeled RGCs were $48,733 \pm 3954$ ($n = 43$; mean $\pm$ SD) (Table 3) or $41,192 \pm 3395$ ($n = 42$; mean $\pm$ SD) (Table 4), in the Swiss or C57 mice retinas, respectively. There were no differences between the numbers of labeled RGCs obtained in the right retinas when compared to their fellow contralateral left retinas in the Swiss (Mann–Whitney test, $P = 0.9129$) (Table 3) or C57 (Mann–Whitney test, $P = 0.1249$) (Table 4) mice, respectively. Overall, the values obtained were quite consistent within each group of retinas analyzed.

3.3. Areas and RGC densities

In the group of Swiss mice, the areas of the retinas varied between 12.5 and 22.7 mm² with a mean value of 16 ± 2.3 ($n = 43$; mean $\pm$ SD) for the group of Swiss mice labeled from the SCi and between 12.4 and 20.8 mm² with a mean value of 16 ± 2.3 ($n = 18$; mean $\pm$ SD) for the group of Swiss mice labeled from the ONs. (Tables 1 and 3). In these retinas, the mean densities of labeled RGCs varied between 2280 and 3898 with a mean of 3083 ± 378 ($n = 43$; mean $\pm$ SD) (Table 1) for the group of Swiss mice labeled from the SCi and between 2616 and 3771 with a mean of 3122 ± 277 ($n = 18$; mean $\pm$ SD) (Table 3) for those labeled from the ONs.

In the groups of C57 mice, the areas of the retinas varied between 12.8 and 17 mm² with a mean value of 14.6 ± 0.8 ($n = 42$; mean $\pm$ SD) (Table 2) for the group of C57 mice labeled from the SCi and between 12.8 and 16.2 mm² with a mean value of 14.5 ± 1 ($n = 10$; mean $\pm$ SD) (Table 4) for the group of C57 mice labeled from the ONs. In these retinas, the densities of labeled RGCs varied between 2044 and 3549 with a mean of 2821 ± 281 ($n = 42$; mean $\pm$ SD) (Table 2) for the group of C57 mice labeled from the SCi and between 2693 and 3155 with a mean of 2949 ± 143 ($n = 10$; mean $\pm$ SD) (Table 4) for the group of C57 mice labeled from the ONs.

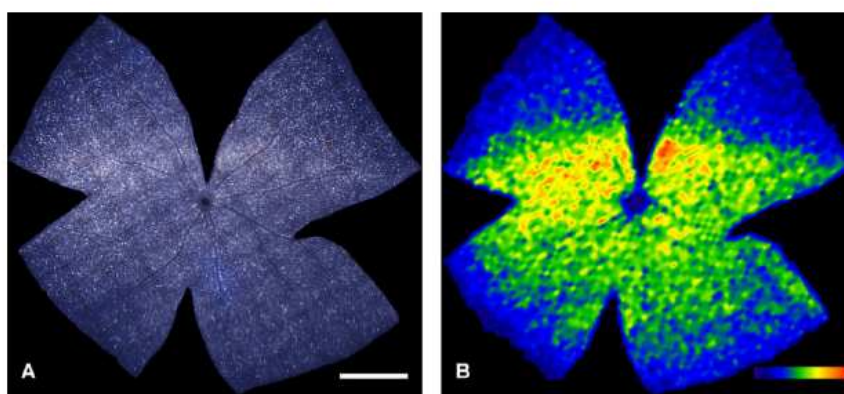


Fig. 3. Retinal whole-mount of a representative Swiss mice right retina showing RGCs retrogradely labeled with OHSt applied to both SCi for 1 week prior to animal processing and its corresponding filled contour plot pseudo-color isodensity map. (A) Whole-mount reconstruction prepared with the aid of a motorized stage on a photomicroscope with a high-resolution camera connected to an image analysis system with an automatic frame grabber device (Image-Pro® Plus, V5; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Retinal multi-frame acquisitions were photographed in a raster scan pattern where the frames were captured contiguously side-by-side with no gap or overlap between them. Intensely labeled RGCs are distributed throughout the retina, but present higher densities in a region along the naso-temporal axis on the superior retina. (B) Isodensity map constructed for this retina, represented as a filled contour plot generated by assigning to each one of the 36 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGCs density value within a 45-step color scale range from 0 (dark blue) to 5625 or higher RGCs/mm² (red). For all retinas the superior pole is orientated at the 12 o'clock orientation. This retina has 47,823 OHSt-labeled RGCs. Scale bar = 1 mm.

Table 1
Number of ganglion cells retrogradely labeled from the superior colliculi (Swiss mice).

Animal #	Right retina			Left retina		
	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (cells/mm ²)	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (cells/mm ²)
1	–	–	–	48,383	15.2	3175
2	45,398	12.8	3536	46,716	13.2	3547
3	50,712	13.0	3898	50,362	14.0	3605
4	48,358	14.0	3457	50,947	14.4	3538
5	45,961	14.9	3085	48,613	13.8	3525
6	44,332	12.5	3538	44,345	12.5	3548
7	47,748	14.0	3411	47,880	13.8	3470
8	54,940	15.2	3622	51,620	14.0	3700
9	49,949	18.0	2780	44,215	15.8	2806
10	49,871	15.4	3234	51,616	16.4	3140
11	51,300	16.1	3178	52,924	16.4	3223
12	46,158	14.5	3188	44,306	16.1	2760
13	45,994	15.8	2907	–	–	–
14	44,700	16.1	2776	43,979	15.0	2923
15	44,246	15.6	2837	39,281	15.1	2598
16	52,579	20.5	2563	51,353	19.7	2601
17	56,143	20.6	2723	56,721	22.7	2502
18	45,150	15.5	2907	–	–	–
19	–	–	–	49,956	16.6	3002
20	50,128	17.2	2911	50,108	17.1	2934
21	52,414	17.9	2928	40,513	17.9	2280
22	51,156	16.4	3121	52,321	17.2	3037
23	52,248	18.0	2901	52,031	18.5	2819
24	47,823	20.4	2345	–	–	–
Mean	48969 ^b	16.1	3084	48485 ^b	16	3082
SD	3502	2.4	378	4370	2.4	414
n	22	22	22	21	21	21
Mean ^a	48,733	16.0	3083			
SD ^a	3954	2.3	378			
n	43	43	43			

^a Data from both retinas.

^b Not significantly different (Mann–Whitney Test, $P = 0.913$).

Table 2
Number of ganglion cells retrogradely labeled from the optic nerve (Swiss mice).

Animal #	Right retina			Left retina		
	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (cells/mm ²)	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (cells/mm ²)
1	51,835	16.8	3080	49,182	16.2	3042
2	50,044	16.7	2993	–	–	–
3	49,809	16.4	3035	49,298	17.7	2784
4	52,620	18.9	2792	54,011	18.4	2942
5	56,276	19.2	2937	54,410	20.8	2616
6	49,042	14.2	3444	46,723	12.4	3771
7	48,389	14.6	3319	49,251	15.0	3292
8	–	–	–	48,777	14.4	3387
9	49,539	14.9	3325	49,824	15.3	3261
10	40,686	13.2	3078	41,151	13.3	3106
Mean	49804 ^b	16.1	3111	49181 ^b	15.9	3133
SD	4180	2.0	210	3902	2.7	344
n	9	9	9	9	9	9
Mean ^a	49,493	16.0	3122			
SD ^a	3936	2.3	277			
n	18	18	18			

^a Data from both retinas.

^b Not significantly different (Mann–Whitney Test, $P = 0.596$).

3.4. Topography of RGCs

Upon fluorescence microscopic examination of the retinas, it was clear that OHST-labeled RGCs were not uniformly distributed throughout the retina, but rather tended to concentrate in the central retina compared to the periphery (Figs. 3 and 4). Within the many retinas examined, there was certain variability in the location of the region containing the highest RGC density, but there was a clear tendency for this high-density region to localize in

the superior retina, forming a horizontally oriented area extending naso-temporally, approximately 1 mm dorsal to the optic disk, adopting the form of a visual streak.

This high-density area was analyzed in depth using filled contour plot graph to construct colored isodensity maps in a scale of 45 different steps (each of 125) ranging from 0 to 5625 (Figs. 3 and 4). These detailed maps showed a region with highest density located in the superior retina, with RGC densities falling off rapidly from this area towards the superior and inferior retina, but

Table 3
Number of ganglion cells retrogradely labeled from the superior colliculi (C57 mice).

Animal #	Right retina			Left retina		
	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (cells/mm ²)	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (cells/mm ²)
1	41,096	13.8	2978	43,072	14.5	2962
2	43,841	15.0	2921	44,361	15.5	2858
3	46,173	13.0	3549	43,059	14.7	2935
4	39,509	12.8	3084	45,416	13.8	3303
5	42,978	14.7	2926	45,033	14.8	3037
6	38,810	14.8	2629	40,171	14.3	2817
7	41,502	13.6	3045	40,027	13.2	3032
8	40,924	13.6	3005	47,259	16.0	2963
9	46,123	14.3	3234	45,271	14.3	3168
10	44,906	14.3	3151	45,920	15.8	2903
11	41,006	14.6	2809	41,184	14.2	2892
12	40,767	14.8	2753	42,089	15.0	2810
13	33,201	14.7	2262	36,291	14.8	2457
14	38,326	15.2	2525	41,880	16.3	2574
15	41,519	15.1	2744	42,266	15.0	2812
16	40,675	14.7	2773	–	–	–
17	–	–	–	40,584	15.1	2688
18	35,708	14.9	2397	37,949	15.0	2528
19	38,656	14.8	2617	39,359	15.0	2629
20	38,813	14.7	2635	40,138	14.8	2719
21	31,952	15.6	2044	38,421	13.1	2931
22	39,451	14.3	2761	44,362	17.0	2613
Mean	40283 ^b	14.4	2802	42101 ^b	14.9	2840
SD	3658	0.7	340	2916	0.9	212
n	21	21	21	21	21	21
Mean ^a	41,192	14.6	2821			
SD ^a	3395	0.8	281			
n	42	42	42			

^a Data from both retinas.

^b Not significantly different (Mann–Whitney Test, $P = 0.125$).

Table 4
Number of ganglion cells retrogradely labeled from the optic nerve (C57 mice).

Animal #	Right retina			Left retina		
	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (cells/mm ²)	Cells	Area (mm ²)	Mean cell density (cells/mm ²)
1	42,185	14.1	3002	40,288	12.8	3155
2	41,506	13.8	3014	42,417	15.8	2693
3	45,945	16.2	2841	41,554	14.1	2958
4	43,479	15.3	2844	42,347	15.0	2829
5	43,188	14.1	3065	43,674	14.1	3089
Mean	43261 ^b	14.7	2953	42056 ^b	14.3	2945
SD	1695	1.0	104	1246	1.1	188
n	5	5	5	5	5	5
Mean ^a	42,658	14.5	2949			
SD ^a	1540	1.0	143			
n	10	10	10			

^a Data from both retinas.

^b Not significantly different (Mann–Whitney Test, $P = 0.531$).

doing so more pronouncedly on the superior retina, with a clear gradient toward the periphery (Fukuda, 1977; McCall, Robinson, & Dreher, 1987; Perry, 1981; Schober & Gruschka, 1977). This region had the highest individual densities; the mean for these highest densities were 5959 ± 495 ($n = 43$; mean $\pm$ SD) or 5851 ± 430 ($n = 42$; mean $\pm$ SD) for Swiss or C57 mice, respectively, when OHSt was applied to both SCi and 6290 ± 605 ($n = 18$; mean $\pm$ SD) or 6352 ± 319 ($n = 9$; mean $\pm$ SD) for the Swiss or C57 mice, respectively, when OHSt was applied to the optic nerve. The difference between central and peripheral retina varied but in general, there is a factor of 35–38. These values are comparable to those obtained in our laboratory for adult albino and pigmented rats, where densities differed by a factor of 33–34 (Salinas-Navarro et al., 2009).

4. Discussion

The Swiss and C57 strain of mice are commonly employed for a number of experimental approaches aimed at studying the problem of injury-induced RGC loss and its prevention, thus it was of interest to determine as a baseline for future studies, the population of RGCs in these mice to compare with mice undergoing experimental manipulations. The need for modern accurate methods to identify a specific population of neurons (e.g., RGCs) is highlighted by the fact that numbers of ganglion cells among diverse types of mice have been reported to be highly variable, with a range between 32,000 and 87,000 (Williams et al., 1996).

Identification of RGCs within the RGC layer is not a simple task. Classic morphological criteria or molecular markers have not been

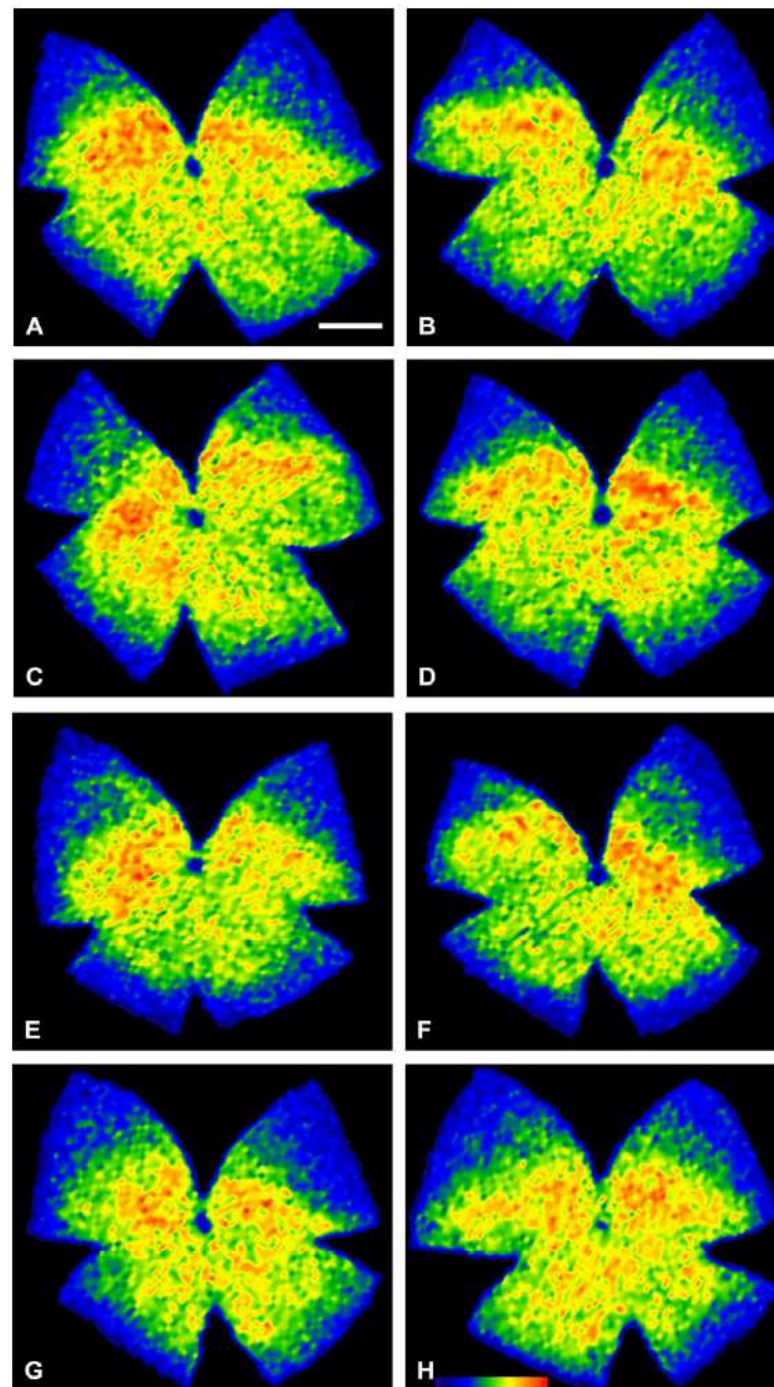


Fig. 4. Filled contour plots showing densities of RGCs in whole-mounts from both right (left column, A,C,E,G) and left (right column, B,D,F,H) retinas in three representative Swiss (A,B,C,D,E,F) and one C57 (G,H) mice in which OHSt had been applied to both superior colliculi for 1 week prior to animal processing. Maps are represented as filled contour plots generated by assigning to each one of the 36 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGCs density value within a 45-step color scale range from 0 (dark blue) to 5625 or higher RGCs/mm² (red). The maps show the typical high-density distribution along a naso-temporal streak in the superior retina. For all retinas the superior pole is orientated at the 12 o'clock orientation. Scale bar = 1 mm.

proven to reliably distinguish RGCs from the many amacrine cells that are displaced into the rodent RGC layer (Dräger & Olsen, 1981;

Jeon et al., 1998; Perry, 1981; Perry et al., 1983; Schmidt et al., 2001) even though recent stereological approaches (Fileta et al.,

2008) as well as some molecular markers for RGCs (Nadal-Nicolás et al., 2009; Quina et al., 2005; Soto et al., 2008) look promising. Indeed, displaced amacrine cells and small RGCs overlap in size, thus making it difficult to distinguish these classes of retinal neurons (Villegas-Perez et al., 1988; Villegas-Perez et al., 1993). For this reason, identification of RGCs in the rodent retina has relied on the use of retrogradely transported tracers applied to the optic nerves, optic tracts or to their main target regions in the brain (Salinas-Navarro et al., 2009; Vidal-Sanz et al., 1988; Villegas-Perez et al., 1993; Wang et al., 2000). Our previous work requiring quantitative estimation of the population of retinal ganglion cells (RGC) has consisted of manual counts of identified retrogradely labeled RGCs from printed photographs from standard regions of the retina that only comprised a small portion of the retina. This method is not only tedious and time consuming but also requires expertise from the investigator to identify RGCs.

Using a retrogradely transported neuronal tracer to identify the RGC population and a methodology to count labeled RGCs (Dánias et al., 2002; Dánias et al., 2003; Salinas-Navarro et al., 2009), in the present study we have quantified the population of RGCs giving rise to the retinofugal and retinotectal projection, respectively, and we have also constructed filled contour plot graphs to demonstrate their spatial distribution within the retina, in Swiss albino and C57 pigmented adult mice. In performing the task of counting the number of RGCs, compared to manual counting the present method takes advantage of commercially available software to do the job automatically. Moreover it is reproducible; indeed the total counts of RGCs obtained in different retinas of our groups of albino or pigmented mice were comparable (Tables 1–4). We anticipate that this counting procedure will be useful in normal and in experimental conditions in which neuronal tracers may be applied efficiently after injury (García-Ayuso et al., 2008; Marco-Gomariz, Hurtado-Montalbán, Vidal-Sanz, Lund, & Villegas-Pérez, 2006; Salinas-Navarro et al., 2006; Salinas-Navarro et al., 2009; Schnebelen et al., 2007; Schnebelen et al., 2008; Vidal-Sanz, De la Villa, et al., 2007; Vidal-Sanz, Salinas-Navarro, et al., 2007). The present studies, however, could not analyze the size of the cell somas due to the transformations imposed to the OHSt-labeled RGCs in the analysis process. Neither did we take into account the displaced RGCs observed in the inner nuclear layer of the retina, which accounts for approximately 1–2% of the RGC population in mice (Dräger & Olsen, 1981), is smaller in albinos compared to pigmented mice (Dräger & Olsen, 1980) and may be responsible for the decreased uncrossed projection in albinos as compared to pigmented mice (Balkema & Dräger, 1990).

Overall, the population of RGCs labeled from the ONs, and thus contributing to the retinofugal projection, was slightly greater (1.5% for Swiss and 3.4% for C57 mice, respectively) than the population of RGCs labeled from both SCi, and thus contributing to the retinotectal projection, but in both cases the differences were not significant (Swiss mice, *Mann-Whitney test*, $P = 0.5426$; C57 mice, *Mann-Whitney test*, $P = 0.1066$). This finding is in agreement with previous studies and provides additional evidence towards the massive projection from the retina towards the tectum (Dräger & Olsen, 1980; Dräger & Olsen, 1981; Linden & Perry, 1983; Lund, 1965; Lund, 1969; Lund, Land, & Boles, 1980).

In our study the population of RGCs was greater in Swiss than in C57 mice. This was the case for RGCs giving rise to the retinofugal (*Mann-Whitney test*, $P = 0.0006$) or the retinotectal (*Mann-Whitney test*, $P = 0.0000$) projection. This finding is in agreement with previous studies and may reflect a genetic difference between albino and pigmented mice (Fukuda, Sugimoto, & Shirokawa, 1982; Williams et al., 1996).

The total numbers of RGCs obtained in our experiments from counts of OHSt-labeled RGCs in wholemounts are comparable to other studies that have investigated the numbers of RGCs in albino

or pigmented mice counting ON axons (Cenni et al., 1996; Howell et al., 2007; Jeon et al., 1998; Mabuchi, Lindsey, Aihara, Mackey, & Weinreb, 2004; Parson, Dhillon, Findlater, & Kaufman, 1995; Williams et al., 1996) or using RGC markers (Bernstein, Guo, Slater, Puche, & Kelman, 2007). For instance, in C57/BL6 mice Jeon and colleagues (1998) and Cenni and colleagues (1996), counting ON axons found a total number of approximately $44,860 \pm 3125$ and $45,400 \pm 4000$, respectively. Our results are however somewhat smaller than those reported by others using retrograde tracers to label RGCs (Dánias et al., 2003; Schmidt et al., 2001) or counting ON axons (Zhou, Strom, Giguere, & Williams, 2001). For instance, Dánias and colleagues (2003) using a similar approach found in C57/BL6 mice a total number of RGCs of $84,027 \pm 2171$, which is larger than that found in our study. There are several possible explanations for these differences; the different regions and number of areas examined, the tracers employed and their mode of application, or the methods employed to estimate the total RGC population. Overall, the more likely explanation may relate to the different strains employed for the studies. Williams and colleagues (1996) have shown that there are large variations in the total numbers of RGCs in mice of different species, subspecies and strains (with a mean of $58,500 \pm 7800$ with a range from 32,000 to 87,000), and that these are genetically controlled.

The values obtained for the densities of RGCs in the groups of Swiss or C57 mice are within the range reported for albino or pigmented mice in previous studies from other independent laboratories using retrograde tracers to label RGCs (Inoue, Hosokawa, Morigiwa, Ohashi, & Fukuda, 2002; Murphy, Franklin, Rafuse, & Clarke, 2007; Robinson & Madison, 2004). Nevertheless, when central regions of the retina are sampled, the densities of FG-labeled RGCs tend to be significantly higher. This is reflected in previous studies from this (Wang et al., 2000) and other laboratories (Buckingham et al., 2008; Haustead et al., 2008; Jakobs et al., 2005; Levkovitch-Verbin et al., 2000; Schmidt et al., 2001) and this may be due to the different RGC distribution throughout the retina, with highest densities in central regions (see below). Moreover, the eyes of mice grow through early adult life, thus changing their absolute density (Jeon et al., 1998), something we could only control for the present study by using animals of comparable weight. Although it is unlikely, we cannot rule out the possibility that the mice used in our experiments had similar weights but different ages, and this would explain the variations observed in the areas of the retinas in some of these mice.

The presence in the dorsal retina of an elongated region of elevated RGC density horizontally oriented along the naso-temporal axis, resembles a visual streak. This regional specialization of the RGC distribution in the retina, which has its counterpart on the visual field representation in the superior colliculus (Dräger & Hubel, 1976), was observed by others in the Syrian hamster (Métin et al., 1995), in the rat (Jeffery, 1985; Reese & Cowey, 1986) and in pigmented (C57BL/6J) mice (Dräger & Olsen, 1981), and also in this Laboratory for the pigmented non-dystrophic RCS rat (Marco-Gomariz et al., 2006), the Sprague-Dawley and the PVG rat (Salinas-Navarro et al., 2009). Previous studies have pointed out the presence of visual streaks with very shallow gradients, such as those presented in this work for mice, in the guinea pig (do Nascimento, do Nascimento, Damasceno, & Silveira, 1991) or with extremely pronounced gradients in larger rodents such as the agouti and the capybara (Silveira et al., 1989; Silveira et al., 1989).

Our present findings are in contrast to previous reports (Dánias et al., 2003), but in our analysis we did not find evidence for the visual streak until detailed density maps, based on small frames, were constructed (Figs. 3 and 4). Indeed, our filled contour plots constructed on the base of the analysis of the 36 areas of interest in which every frame was divided, implies an increase in resolution of approximately 15 times, when compared to such study (Dánias

et al., 2003). This was also the case for our previous study in which we did examine the retinal distribution of RGCs in adult pigmented and non-pigmented rat retinas (Salinas-Navarro et al., 2009). Nevertheless, our maps show that the highest density clusters of RGCs tended to localize on the superior temporal quadrant in most retinas, and this is in agreement with previous studies in range of rodents, including Syrian hamster (Métin et al., 1995) rat (Dreher et al., 1985; Fukuda, 1977; Jeffery, 1985; McCall et al., 1987; Perry, 1981; Reese & Cowey, 1986; Schober & Gruschka, 1977) and mice (Dräger & Olsen, 1981; Jakobs et al., 2005; Jeon et al., 1998).

Acknowledgments

The technical contribution of Isabel Cánovas and José M. Bernal is greatly acknowledged.

This work was supported by research grants from the Regional Government of Murcia, Fundación Séneca 02989/PI/05, 05703/PI/07, 04446/GERM/07; Spanish Ministry of Education and Science SAF-2005-04812; and Spanish Ministry of Health ISCIII: FIS PIO06/0780 and RD07/0062/0001; and an unrestricted grant from Allergan Inc.

References

- Agudo, M., Pérez-Marín, M. C., Lönnngren, U., Sobrado, P., Conesa, A., Cánovas, I., et al. (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., et al. (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 and Visual Science*, 50, 424–431.
- Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., García-Avilés, A., Lafuente, M. P., Rodríguez, M. E., Miralles de Imperial, J., et al. (2003). Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: Long-term neuroprotection with brimonidine. *Experimental Neurology*, 184, 767–777.
- Avilés-Trigueros, M., Sauvé, Y., Lund, R. D., & Vidal-Sanz, M. (2000). Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *Journal of Neuroscience*, 20, 361–374.
- Balkema, G. W., & Dräger, U. C. (1990). Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice. *Visual Neuroscience*, 4, 595–604.
- Bernstein, S. L., Guo, Y., Slater, B. J., Puche, A., & Kelman, S. E. (2007). Neuron stress and loss following rodent anterior ischemic optic neuropathy in double-reporter transgenic mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48, 2304–2310.
- Buckingham, B. P., Inman, D. M., Lambert, W., Oglesby, E., Calkins, D. J., Steele, M. R., et al. (2008). Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *Journal of Neuroscience*, 28, 2735–2744.
- Cenni, M. C., Bonfanti, L., Martinou, J. C., Ratto, G. M., Strettoi, E., & Maffei, L. (1996). Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult bcl-2 transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*, 8, 1735–1745.
- Cheunsuang, O., & Morris, R. (2005). Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia*, 52, 228–233.
- Chidlow, G., Casson, R., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., & Osborne, N. N. (2005). Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: An RT-PCR study. *Molecular Vision*, 11, 387–396.
- Danias, J., Lee, K. C., Zamora, M. F., Chen, B., Shen, F., Filippopoulos, T., et al. (2003). Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2Nnia glaucomatous mice: Comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44, 5151–5162.
- Danias, J., Shen, F., Goldblum, D., Chen, B., Ramos-Esteban, J., Podos, S. M., et al. (2002). Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43, 587–594.
- do Nascimento, J. L. M., do Nascimento, R. S. V., Damasceno, B. A., & Silveira, L. C. L. (1991). The neurons of the retinal ganglion cell layer of the guinea pig: Quantitative analysis of their distribution and size. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 24, 199–214.
- Dogiel, A. S. (1888). Über das Verhalten der nervösen Elemente in der retina der Ganoiden, Reptilien, Vögel und Säugetiere. *Anatomischer Anzeiger*, 3, 133–134.
- Dräger, U. C., & Hubel, D. H. (1976). Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. *Journal of Neurophysiology*, 39, 91–101.
- Dräger, U. C., & Olsen, J. F. (1980). Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *Journal of Comparative Neurology*, 191, 383–412.
- Dräger, U. C., & Olsen, J. F. (1981). Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 20, 285–293.
- Dreher, B., Sefton, A. J., Ni, S. Y., & Nisbett, G. (1985). The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behavior and Evolution*, 26, 10–48.
- Fileta, J. B., Huang, W., Kwon, G. P., Filippopoulos, T., Ben, Y., Dobberfuhl, A., et al. (2008). Efficient estimation of retinal ganglion cell number: A stereological approach. *Journal of Neuroscience Methods*, 170, 1–8.
- Fukuda, Y. (1977). A three-group classification of rat retinal ganglion cells: Histological and physiological studies. *Brain Research*, 119, 327–334.
- Fukuda, Y., Sugimoto, T., & Shirokawa, T. (1982). Strain differences in quantitative analysis of the rat optic nerve. *Experimental Neurology*, 75, 525–532.
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Coll-Alcaraz, L., Cánovas-Martínez, I., Bernal-Garro, J. M., Vidal-Sanz, M., et al. (2008). Characterization of the light-sensitive arciform region in the albino rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49 [E-Abstract 4395].
- Haustead, D. J., Lukehurst, S. S., Clutton, G. T., Bartlett, C. A., Dunlop, S. A., Arrese, C. A., et al. (2008). Functional topography and integration of the contralateral and ipsilateral retinocollicular projections of ephrin-A/- mice. *Journal of Neuroscience*, 28, 7376–7386.
- Howell, G. R., Libby, R. T., Jakobs, T. C., Smith, R. S., Phalan, F. C., Barter, J. W., et al. (2007). Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *Journal of Cell Biology*, 179, 1523–1537.
- Inoue, T., Hosokawa, M., Morigiwa, K., Ohashi, Y., & Fukuda, Y. (2002). Bcl-2 overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *Journal of Neuroscience*, 22, 4468–4477.
- Jakobs, T. C., Libby, R. T., Ben, Y., John, S. W., & Masland, R. H. (2005). Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *Journal of Cell Biology*, 171, 313–325.
- Jeffery, G. (1985). The relationship between cell density and the nasotemporal division in the rat retina. *Brain Research*, 347, 354–357.
- Jeon, C. J., Strettoi, E., & Masland, R. H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 18, 8936–8946.
- Lafuente López-Herrera, M. P., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2002). Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: Neuroprotection with brimonidine. *Experimental Neurology*, 178, 243–258.
- Lafuente, M. P., Villegas-Pérez, M. P., Mayor-Torroglosa, S., Aguilera, M. E., Miralles de Imperial, J., & Vidal-Sanz, M. (2002). Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: A dose response in vivo study. *Experimental Eye Research*, 74, 181–189.
- Lafuente, M. P., Villegas-Pérez, M. P., Sellés-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., & Vidal-Sanz, M. (2002). Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience*, 109, 157–168.
- Levkovitch-Verbin, H., Harris-Cerruti, C., Groner, Y., Wheeler, L. A., Schwartz, M., & Yoles, E. (2000). RGC death in mice after optic nerve crush injury: Oxidative stress and neuroprotection. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41, 4169–4174.
- Linden, R., & Perry, V. H. (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Research*, 272, 145–149.
- Lund, R. D. (1965). Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science*, 149, 1506–1507.
- Lund, R. D. (1969). Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 135, 179–208.
- Lund, R. D., Land, P. W., & Boles, J. (1980). Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: An HRP study in adults. *Journal of Comparative Neurology*, 189, 711–720.
- Lund, R. D., Wang, S., Lu, B., Girman, S., Holmes, T., Sauvé, Y., et al. (2007). Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells*, 25, 602–611.
- Mabuchi, F., Lindsey, J. D., Aihara, M., Mackey, M. R., & Weinreb, R. N. (2004). Optic nerve damage in mice with a targeted type I collagen mutation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45, 1841–1845.
- Marco-Gomáriz, M. A., Hurtado-Montalbán, N., Vidal-Sanz, M., Lund, R. D., & Villegas-Pérez, M. P. (2006). Phototoxic-induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *Journal of Comparative Neurology*, 498, 163–179.
- Mayor-Torroglosa, S., De la Villa, P., Rodríguez, M. E., López-Herrera, M. P., Avilés-Trigueros, M., García-Avilés, A., et al. (2005). Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: Neuroprotection with brimonidine. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46, 3825–3835.
- McCall, M. J., Robinson, S. R., & Dreher, B. (1987). Differential retinal growth appears to be the primary factor producing the ganglion cell density gradient in the rat. *Neuroscience Letters*, 79, 78–84.
- Métin, C., Irons, W. A., & Frost, D. O. (1995). Retinal ganglion cells in normal hamsters and hamsters with novel retinal projections I. Number, distribution, and size. *Journal of Comparative Neurology*, 353, 179–199.
- Murphy, J. A., Franklin, T. B., Rafuse, V. F., & Clarke, D. B. (2007). The neural cell adhesion molecule is necessary for normal adult retinal ganglion cell number and survival. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 36, 280–292.
- Nadal-Nicolás, F., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M., et al. (2009). Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: Qualitative and quantitative time course studies in naïve and optic nerve injured retinas. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

- Parson, S. H., Dhillon, B., Findlater, G. S., & Kaufman, M. H. (1995). Optic nerve hypoplasia in the fetal alcohol syndrome: A mouse model. *Journal of Anatomy*, 186(Pt 2), 313–320.
- Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, 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 and Visual Science*, 37, 489–500.
- Perry, V. H. (1981). Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience*, 6, 931–944.
- Perry, V. H., Henderson, Z., & Linden, R. (1983). Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *Journal of Comparative Neurology*, 219, 356–368.
- Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M., & Whishaw, I. Q. (2002). Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research*, 136, 339–348.
- Quina, L. A., Pak, W., Lanier, J., Banwait, P., Gratwick, K., Liu, Y., et al. (2005). Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *Journal of Neuroscience*, 25, 11595–11604.
- Reese, B. E. (2002). Rat retinal ganglion cell topography. *Investigative Ophthalmology and Visual Science eLetters for Danias et al.*, 43, 587–594.
- Reese, B. E., & Cowey, A. (1986). Large retinal ganglion cells in the rat: Their distribution and laterality of projection. *Experimental Brain Research*, 61, 375–385.
- Robinson, G. A., & Madison, R. D. (2004). Axotomized mouse retinal ganglion cells containing melanopsin show enhanced survival, but not enhanced axon regrowth into a peripheral nerve graft. *Vision Research*, 44, 2667–2674.
- Rodiek, R. W. (1979). Visual pathways. *Annual Reviews of Neuroscience*, 2, 193–225.
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Holmes, T., Bernal, J. M., Cánovas, I., Aguilera, M. E., et al. (2005). Automatic quantitative analysis of retinal ganglion cells that project to the superior colliculi in adult Sprague-Dawley rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46 [E-Abstract 271].
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T., Lund, R. D., et al. (2009). A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Research*, 49, 115–126.
- Salinas-Navarro, M., Triviño, A., Ramirez, A. I., Salazar, J. J., Ramirez, J. M., Villegas-Pérez, M. P., et al. (2006). Long term effects of laser-induced ocular hypertension: Retrograde degeneration of retinal ganglion cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47.
- Sasaki, H., Coffey, P., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Young, M. J., Lund, R. D., et al. (1996). Light induced EEG desynchronization and behavioral arousal in rats with restored retinocollicular projection by peripheral nerve graft. *Neuroscience Letters*, 218, 45–48.
- Sauvé, Y., Girman, S. V., Wang, S., Keegan, D. J., & Lund, R. D. (2002). Preservation of visual responsiveness in the superior colliculus of RCS rats after retinal pigment epithelium cell transplantation. *Neuroscience*, 114, 389–401.
- Sauvé, Y., Girman, S. V., Wang, S., Lawrence, J. M., & Lund, R. D. (2001). Progressive visual sensitivity loss in the Royal College of Surgeons rat: Perimetric study in the superior colliculus. *Neuroscience*, 103, 51–63.
- Schmidt, S. L., Vitral, R. W., & Linden, R. (2001). Effects of prenatal ionizing irradiation on the development of the ganglion cell layer of the mouse retina. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19, 469–473.
- Schnebelen, C., Salinas-Navarro, M., Acar, N., Pasquís, B., Creuzot-Garcher, C. P., Villegas-Pérez, M. P., et al. (2007). Time course of IOP elevation, electroretinographic changes and retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma induced by laser. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48 [E-Abstract 206].
- Schnebelen, C., Salinas-Navarro, M., Acar, N., Pasquís, B., Creuzot-Garcher, C. P., Villegas-Pérez, M. P., et al. (2008). Effect of dietary omega-3 and omega-6 fatty acids on IOP elevation, electroretinographic changes and retinal ganglion cell loss in a laser-induced rat model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49, 20 [E-Abstract 5499].
- Schober, W., & Gruschka, H. (1977). Retinal ganglion cells of the albino rat: A qualitative and quantitative study. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung*, 91, 397–414.
- Sellés-Navarro, I., Villegas-Pérez, M. P., Salvador-Silva, M., Ruiz-Gomez, 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 and Visual Science*, 37, 2002–2014.
- Silveira, L. C., Picanço-Diniz, C. W., & Oswaldo-Cruz, E. (1989). The distribution and size of ganglion cells in the retinae of large Amazon rodents. *Visual Neuroscience*, 2, 221–235.
- Silveira, L. C., Yamada, E. S., & Picanço-Diniz, C. W. (1989). Displaced horizontal cells and biplexiform horizontal cells in the mammalian retina. *Visual Neuroscience*, 3, 483–488.
- Soto, I., Oglesby, E., Buckingham, B. P., Son, J. L., Roberson, E. D., Steele, M. R., et al. (2008). Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *Journal of Neuroscience*, 28, 548–561.
- Vidal-Sanz, M., Avilés-Trigueros, M., Whiteley, S. J., Sauvé, Y., & Lund, R. D. (2002). Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: Anatomical and functional studies. *Progress in Brain Research*, 137, 443–452.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 7, 2894–2909.
- Vidal-Sanz, M., De la Villa, P., Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., et al. (2007). Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye*, 21, S42–S45.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M. P., Mayor, S., de Imperial, J. M., & Villegas-Pérez, M. P. (2001). Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. Neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Survey of Ophthalmology*, 45, 261–267.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., Sobrado-Calvo, P., Sellés-Navarro, I., Rodríguez, E., Mayor-Torroglosa, S., et al. (2000). Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotoxicity Research*, 2, 215–227.
- Vidal-Sanz, M., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., García-Ayuso, D., Bernal, J. M., et al. (2007). Spatial distribution and quantitative analysis of retinal ganglion cells in adult albino rodents. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48 [E-Abstract 134].
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1988). Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Experimental Neurology*, 102, 92–101.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1993). The use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols*, 3, 29–33.
- Villegas-Pérez, M. P., Aguilera, M. E., Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Holmes, T., Bernal, J. M., et al. (2006). Retinal ganglion cells in adult albino and pigmented rats: Spatial distribution and quantitative analysis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47 [E-Abstract 3318].
- Villegas-Pérez, M. P., Lawrence, J. M., Vidal-Sanz, M., Lavail, M. M., & Lund, R. D. (1998). Ganglion cell loss in RCS rat retina: A result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 392, 58–77.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 8, 265–280.
- Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Lund, R. D. (1996). Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport*, 7, 1995–1999.
- 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, 23–36.
- Wang, S., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Lund, R. D. (2000). Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41, 537–545.
- Whiteley, S. J., Sauvé, Y., Avilés-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., & Lund, R. D. (1998). Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Experimental Neurology*, 154, 560–572.
- Williams, R. W., Strom, R. C., Rice, D. S., & Goldowitz, D. (1996). Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *Journal of Neuroscience*, 16, 7193–7205.
- Zhou, G., Strom, R. C., Giguere, V., & Williams, R. W. (2001). Modulation of retinal cell populations and eye size in retinoic acid receptor knockout mice. *Molecular Vision*, 7, 253–260.

11. ANEXO III

11. ANEXO III



Molecular Vision 2009; 15:2578-2598 <<http://www.molvis.org/molvis/v15/a276>>
Received 7 August 2009 | Accepted 3 November 2009 | Published 5 December 2009

© 2009 Molecular Vision

Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice

Manuel Salinas-Navarro,¹ Luis Alarcón-Martínez,¹ Francisco Javier Valiente-Soriano,¹
Arturo Ortín-Martínez,¹ Manuel Jiménez-López,¹ Marcelino Avilés-Trigueros,¹ María Paz Villegas-Pérez,¹
Pedro de la Villa,² Manuel Vidal-Sanz¹

(The first two authors contributed equally to this work.)

¹Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, Spain; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Spain

Purpose: To investigate the effects of laser photocoagulation (LP)-induced ocular hypertension (OHT) on the survival and retrograde axonal transport of retinal ganglion cells (RGC), as well as on the function of retinal layers.

Methods: Adult albino Swiss mice (35–45 g) received laser photocoagulation of limbal and episcleral veins in the left eye. Mice were sacrificed at 8, 17, 35, and 63 days. Intraocular pressure (IOP) in both eyes was measured with a Tono-Lab before LP and at various days after LP. Flash electroretinogram (ERG) scotopic threshold response (STR) and a- and b-wave amplitudes were recorded before LP and at various times after LP. RGCs were labeled with 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) applied to both superior colliculi before sacrifice and in some mice, with dextran tetramethylrhodamine (DTMR) applied to the ocular stump of the intraorbitally transected optic nerve. Retinas were immunostained for RT97 or Brn3a. Retinas were prepared as whole-mounts and photographed under a fluorescence microscope. Labeled RGCs were counted using image analysis software, and an isodensity contour plot was generated for each retina.

Results: IOP increased to twice its basal values by 24 h and was maintained until day 5, after which IOP gradually declined to reach basal values by 1 wk. Similar IOP increases were observed in all groups. The mean total number of OHSt⁺ RGCs was 13,428±6,295 (n=12), 10,456±14,301 (n=13), 12,622±14,174 (n=21), and 10,451±13,949 (n=13) for groups I, II, III, and IV, respectively; these values represented 28%, 23%, 26%, and 22% of the values found in their contralateral fellow retinas. The mean total population of Brn3a⁺ RGCs was 24,343±5,739 (n=12) and 10,219±8,887 (n=9), respectively, for groups I and III; these values represented 49% and 20%, respectively, of the values found in their fellow eyes. OHT retinas showed an absence of OHSt⁺ and DTMR⁺ RGCs in both focal wedge-shaped and diffuse regions of the retina. By 1 wk, there was a discrepancy between the total number of surviving OHSt⁺ RGCs and Brn3a⁺ RGCs, suggesting that a large proportion of RGCs had impaired retrograde axonal transport. In the retinal areas lacking backlabeled RGCs, neurofibrillar staining revealed aberrant expression of RT97 within axons and RGC bodies characteristic of axotomy. Elevated IOP induced significant reductions in the registered ERG waves, including positive STR, a- and b-waves, that were observed by 24 h and remained throughout the period of study for the three groups analyzed.

Conclusions: LP of the perilimbal and episcleral veins resulted in OHT leading to a lack of retrograde axonal transport in approximately 75% of the original RGC population. This lack did not progress further between 8 and 63 days, and it was both focal (in sectors with the apex located in the optic disc) and diffuse within the retina. In addition, severe amplitude diminutions of the STR and a- and b-waves of the ERG appeared as early as 24 h after laser and did not recover throughout the period of study, indicating that increased IOP results in severe damage to the innermost, inner nuclear, and outer nuclear layers of the retina.

The mammalian retina is a layered structure [1] that processes and sends to the brain the information obtained from light stimulation in the visual field. This is done with increasing complexity in each of the three main neuronal layers: the outer nuclear layer, where the cell bodies of the rod and cone photoreceptors lie; the intermediate or inner nuclear

layer, where the cell bodies of the bipolar, horizontal, interplexiform, and amacrine interneurons reside; and the innermost retinal layer, also known as the retinal ganglion cell layer, where displaced amacrine interneurons and retinal ganglion cells (RGCs), the sole output neurons of the retina, reside [2]. A common disease that affects many of these retinal neurons is glaucoma. Glaucomatous optic neuropathy is a human disease that characteristically affects the RGC population but may also affect other retinal neuronal populations [3], including the inner [4] and outer nuclear layers of the retina [5,6]; it provokes optic disc changes and

Correspondence to: Manuel Vidal-Sanz, Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, Spain; Phone: +34 868 883961; FAX: +34 868 883962; email: ofmmv01@um.es

leads to visual field losses that may progress to complete blindness. Effects on non-RGC neuronal populations in the retina have been shown in several studies that investigated the thickness and functional status of the inner and outer retinal layers both morphologically and with electroretinogram (ERG) recordings [7,8]. Indeed, major wave components of the ERG have been shown to be severely affected in humans with glaucoma [9,10] or ocular hypertension (OHT) [11] as well as in experimental glaucoma [12]. Experimental models of elevated intraocular pressure (IOP) [13-17] have shown important alterations of several ERG components, including scotopic threshold response (STR), a-wave, and b-wave, which are associated with RGCs, photoreceptors, and bipolar cells, respectively.

Even though not all glaucoma visual field loss may be correlated with IOP [18] and lowering IOP does not completely halt progression of the disease [19], elevation of IOP remains one of the most important risk factors associated with the progression of glaucomatous optic neuropathy in humans [20-22]. Up-to-date therapeutic intervention against glaucoma progression is based mainly on medical or surgical treatments to diminish IOP in an attempt to control or slow the progression of the disease and its damaging effects [23, 24]. Thus, it is of interest to characterize the effects of elevated IOP on retinal neurons.

In the present work, we have used one of the available experimental models of OHT-induced retinal damage [24, 25] to study the mechanisms by which elevated IOP causes retinal damage in adult albino mice. The experimental model we have chosen is based on laser photocoagulation (LP) of the perilimbal and episcleral veins [26], a method originally described to induce OHT in monkeys [27] and later modified for albino rats [26,28-31] and pigmented mice [32,33]. These models do not fully resemble human glaucoma, but they are suitable to improve understanding of the pathophysiology involved in OHT-induced retinal damage [25], as well as to test neuroprotective strategies and substances [25,34,35]. Injured RGCs are known to undergo early functional deficits [17,36-38], including alterations in their axoplasmic flow properties [26,39-43], in several metabolic functions such as diminutions of their *Thy-1* mRNA levels [36,44-46], or induction of phagocytic activity in microglia [47,48], and in the regulation of a substantial number of genes [49,50] including the downregulation of *Bn3a* [51] shortly before cell death. Transgenic mice are used in increasing numbers as experimental models for various neurodegenerative diseases [25], including the line of DBA/2 mice used as glaucomatous optic neuropathy models [3,52-57]; this, with their availability, their well characterized genome, and the relatively low cost of producing diverse genetic manipulations [58], underscores the need to characterize the effects of ocular hypertension in wild mice, as well. This has been done for pigmented mice [17,32,59-61]. However, there is as yet no information regarding the results of IOP in adult albino mice.

Thus, we have here extended our previous observations in the adult albino rat [26] and further characterized the effects of increased IOP in the retinal neuronal population of adult albino mice. Specifically, we have investigated the fate of the RGC population using various neuronal tracers and molecular markers and studied the functional effects in the retinal layers by recording full-field ERGs.

Our studies show, for the first time in adult albino Swiss mice, that lasering of the limbal tissues results in elevated IOP, which in turn induces several sequential degenerative events in the RGC layer that result in degeneration of the RGC population, with a time lapse between the first alteration in the axoplasmic flow and the delayed degeneration of the intraocular axons and their parent cell bodies; this underlines the opportunity for neuroprotective strategies to be applied within a long interval before actual RGC death and is consistent with our recent studies in adult albino rats [26]. Moreover, we show permanent significant diminution of the scotopic threshold response that is associated with the loss of the great majority of RGCs following elevated IOP; this indicates the value of noninvasive functional ERG measurements to document RGC loss in adult rodents. Finally, we show permanent significant diminution of the major components of the ERG, the a-wave, and the b-wave, all of which imply severe alterations of the inner and outer nuclear layers of the retina. Short accounts of this work have been published in abstract form [62,63].

METHODS

Animals and anesthetics: Experiments were performed on adult male albino Swiss mice (35–45 g), obtained from the breeding colony of the University of Murcia (Murcia, Spain). Mice were housed in temperature- and light-controlled rooms with a 12 h:12 h light-dark cycle and had food and water ad libitum. Light intensity within the cages ranged from 9 to 24 lx. Animal care guidelines comparable those published by the Institute for Laboratory Animal Research (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) and the USA Public Health Service (Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals) were followed. In addition, animal manipulations followed institutional guidelines, European Union regulations for the use of animals in research, and the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research.

All surgical manipulations were performed under general anesthesia induced with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (75 mg/kg, Ketolar®, Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, S.A., Barcelona, Spain). During recovery from anesthesia, rats were placed in their cages, and an ointment containing tobramycin (Tobrex®, Alcon Cusi S.A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent corneal desiccation. Additional measures were taken to minimize discomfort and pain after surgery. Animals were

sacrificed with an intraperitoneal injection of an overdose of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol®, Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

Induction of ocular hypertension: To induce ocular hypertension, the left eyes of anesthetized mice were treated during a single session with a series of diode laser (532 nm, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France) burns. The laser beam was delivered directly, without any lenses, aimed at the limbal and episcleral veins. The spot size, duration, and power were 50–100 μm , 0.5 s, and 0.3 W, respectively. Four groups of 12 (group I), 13 (group II), 21 (group III), and 13 (group IV) mice were prepared, each receiving approximately 72 spots in a single session.

Measurement of intraocular pressure, experimental groups, and survival intervals: To assess IOP in the treated mice, we obtained accurate and reliable readings using the rebound tonometer (Tono-Lab®; Tiolat, OY, Helsinki, Finland) [64, 65]. Both eyes of each animal were measured under anesthesia before laser treatment and 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 21, 28, 42, or 56 days after treatment. At each time point, 36 consecutive readings were performed for each eye, and the results were averaged. To avoid fluctuations due to the circadian rhythm of the mice [33] or to the elevated IOP itself [66], we tested IOP always around the same time, preferentially in the morning and immediately after deep anesthesia. Moreover, because general anesthesia lowers IOP in rats, we measured both the IOP-treated eye and the contralateral intact fellow eye in all cases. Mice were divided into four groups that were sacrificed and analyzed 8 (group I, $n=12$); 17 (group II, $n=13$), 35 (group III, $n=21$), or 63 (group IV, $n=13$) days after laser treatment.

Electroretinography recordings: One of the purposes of this study was to evaluate the effects of OHT on the function of the retina. To this end, we analyzed animals from groups II–IV that were sacrificed at 17, 35, and 63 days, respectively. Animals were dark-adapted for 8 h before ERG recordings, and they were manipulated under dim red light ($\lambda > 600$ nm). Mice were anesthetized, their IOP was measured as above, and bilateral pupil mydriasis was induced by applying in both eyes a topical drop of 1% tropicamide (Colircusi tropicamida 1%®; Alcon-Cusi, S.A., El Masnou, Barcelona, Spain). The light-stimulation device consisted of a Ganzfeld dome, which ensures homogeneous illumination throughout the retina, with multiple reflections of the light generated by light-emitting diodes (LEDs), providing a wide range of light intensities. For high-intensity illuminations, a single LED placed close (1 mm) to the eye was used. The recording system was composed of Burian-Allen bipolar electrodes (Hansen Labs, Coralville, IA) with a corneal contact shape; a drop of 2% methylcellulose (Methocel 2%®; Novartis Laboratories CIBA Vision, Annonay, France) was placed between the eye and the electrode to maximize conductivity of the generated response. The reference electrode was placed in the mouth and

the ground electrode in the tail. Electrical signals generated in the retina were amplified ($\times 1000$) and filtered (band pass from 1 Hz to 1000 Hz) using a commercial amplifier (Digitimer Ltd., Letchworth Garden City, UK). The recorded signals were digitized (Power Lab; ADInstruments Pty. Ltd., Chalgrove, UK) and displayed on a PC computer. Bilateral ERG recording was performed simultaneously on both eyes. Light stimuli were calibrated before each experiment, and the calibration protocol ensured the same recording parameters for both eyes. Scotopic ERG responses were recorded by stimulating the retina with light intensities between 10^{-6} and 10^{-4} $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ for the scotopic threshold response (STR), between 10^{-4} and 10^{-2} $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ for the rod response, and between 10^{-2} and 10^2 $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ for the mixed (rod and cone) response. After five minutes of light adaptation (50 $\text{cd}\cdot\text{m}^{-2}$ background light), the photopic ERG responses were recorded at a light intensity of 10^2 $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. For each light intensity, a series of ERG responses was averaged, and the interval between light flashes was adjusted to allow response recovery. At the end of each session, the animals were treated with topical tobramycin (Tobrex®; Alcon-Cusi, S.A., El Masnou, Barcelona, Spain) in both eyes. The recordings were analyzed using the normalization criteria established for the ISCEV for the measures of amplitude and implicit time for the various waves that were studied.

The STR was analyzed for each stimulus; positive scotopic threshold response (pSTR) was measured from the baseline to the “hill” of the positive deflection, ~ 110 ms from the flash onset. The a-wave was measured from the baseline to the first valley, ~ 10 ms from the flash onset. The b-wave amplitude was measured from the bottom of the a-wave valley to the top of the hill of the positive deflection; the time point of the measurement varied depending on the light intensity used. Implicit time was measured from the presentation of the stimulus to the top of the b-wave. Data from laser-treated and untreated eyes were compared; ERG wave amplitudes and implicit times were calculated for each animal group, II–IV. The results were analyzed with SigmaStat® 3.1 for Windows® (Systat Software Inc., Richmond, CA). Descriptive statistics were calculated and *t*-test was used in all studied groups for the comparison between percent response both pre- and post-laser treatment. We performed the same tests before surgery to demonstrate similar functionality in both eyes before the lesions. One-way ANOVA was applied for the comparison between different animal groups, as an attempt to estimate a possible interrelation between the progressions of response along studied times. The statistic significance was placed in a $p < 0.05$ for all tests and the statistic was always of two tails.

Retrograde labeling of retinal ganglion cells with hydroxystilbamidine methanesulfonate: To identify RGCs that retain their axoplasmic transport after laser treatment, hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), a small molecule

(472.53 kDa Mw) with similar fluorescent and tracer properties to Fluorogold® [67], was applied to both superior colliculi (SCi) one week before animal sacrifice following previously described methods that are standard in our laboratory [51,68]. In brief, after exposing the midbrain, a small pledget of gelatin sponge (Espongostan Film, Ferrosan A/S, Denmark) soaked in saline containing 10% OHSt in 0.9% NaCl and 10% dimethyl sulphoxide (DMSO) was applied over the entire surface of both SCi [68-71]. Previous studies in control mice indicate that OHSt application to both SCi, which are the main retinorecipient target regions in the brain, results in the labeling of 48,733 RGCs one week later; these represent 98.5% of the RGC population in albino Swiss mice [69].

Retrograde labeling of retinal ganglion cells with dextran tetramethylrhodamine: To identify RGCs surviving retinal lasering with a competent axon at the level of the optic nerve (ON) head, the fluorescence tracer dextran tetramethylrhodamine (DTMR; 3,000 MW; Molecular Probes, Inc. Eugene, OR) was applied to the ocular stump of the intraorbitally transected left optic nerve 5 days after OHSt application and 2 days before sacrifice in groups II, III, and IV, following already described methods that are standard in our Laboratory [26,43,69,72-74]. In brief, small crystals of DMTR were applied to the ocular stump of the left ON, which had been intraorbitally sectioned approximately 0.5 mm from the eye. Care was taken not to damage the retinal vessels that run in the inferior aspect of the dural sheaths [75,76]. DTMR diffuses through the axon toward the cell soma at a rate of 2 mm/h without requiring active transport [77] producing an intense labeling [28,69]. In these animals, DTMR would label the surviving retinofugal RGC population with a competent axon at the level of the ON head, whereas OHSt would identify RGCs that retain their capability to transport the compound from the SCi back to their cell somas in the retina.

Animal processing: Mice were deeply anesthetized and perfused transcardially through the ascending aorta with saline and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; 1:1.087 sodium phosphate monobasic and sodium phosphate dibasic at pH 7.2-7.4). The orientation of each eye was carefully maintained with a suture placed on the superior pole immediately after deep anesthesia and before perfusion fixation. Moreover, upon dissection of the eye, the insertion of the rectus muscle and the nasal caruncle were used as additional landmarks. Both retinas were dissected and prepared as flattened whole-mounts by making four radial cuts (the deepest in the superior pole); post-fixed for an additional hour; rinsed in 0.1 M PB; mounted vitreal side up on subbed slides; and covered with antifading mounting media containing 50% glycerol and 0.04% p-phenylenediamine in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9).

Immunocytochemical studies: Twelve animals from group I and nine animals from group III (sacrificed 8 and 35 days after

lasering, respectively) were further processed for Brn3a immunocytochemistry in whole-mounts following previously described methods [51]. Brn3a is part of the Brn3 family of POU-domain transcription factors, recently shown to be a reliable marker to quantify naïve and axotomized RGCs in adult albino rats [51]. Axotomized RGCs are known to undergo downregulation of the Brn3a gene [49,50] shortly before they die. Moreover, two to three days after optic nerve injury, there is an important decrease in the expression of the protein (as observed by western blotting and immunohistochemistry) [51]; thus, an indirect way to examine the physiologic functional properties of RGCs is to examine their Brn3a expression. In brief, immediately after retinal dissection, retinas were permeabilized in PBS 0.1 M (pH 7.2-7.4) 0.5% Triton® X-100 by freezing them overnight at -70 °C, rinsed in new PBS 0.5% Triton® X-100, and incubated the following day at 4 °C with goat anti-Brn3a (C-20) antibody (Santa Cruz Biotechnologies Heidelberg, Germany) diluted 1:100 in blocking buffer (PBS, 2% BSA (BAS), 2% Triton® X-100). Then, retinas were washed three times in PBS and incubated 2 h at room temperature (RT) with a secondary antibody, Alexa Fluor-568 donkey anti-goat IgG (H+L) (Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain), diluted 1:500 in blocking buffer. Finally, retinas were thoroughly washed in PBS, mounted vitreal side up on subbed slides, and covered with antifading mounting media.

The intraretinal course of RGC axons was examined in retinal whole mounts with the monoclonal antibody RT97 (Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA) in both retinas of animals from groups I-IV. The RT97 antibody developed by John Wood [78] was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biologic Sciences, Iowa City, IA. This antibody was raised in mouse against Wistar rat neurofilaments and recognizes in western blots the phosphorylated heaviest subunit (200 kDa) of the neurofilament triplet [78-80]. In our laboratory, we have used this commercial antibody extensively, because, in our experience, RT97 labels RGC axons intensely and the horizontal cell plexus faintly in the rodent whole-mount retina [74,81-86]. Moreover, it is a good marker for axotomized RGCs and their axons [26,74,81-84]. Immunodetection was performed using protocols that are standard in our laboratory [26,71,74,82,83,85,86]. In brief, whole-mount dissected retinas were incubated 1 h at RT in blocking buffer (Triton® X-100 2% and 2.5% BSA in PBS) followed by overnight incubation at 4 °C with the primary antibody diluted 1:1,000 in the same blocking buffer. The following day, retinas were washed in PBS (3×15 min at RT), and secondary detection was performed by 2 h incubation at RT with goat antimouse FITC antibody (F-4018; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted 1:50 in blocking buffer. After that, retinas were washed in PBS, mounted vitreal side up on gelatin-coated

slides, with antifading mounting media containing 50% glycerol and 0.04% p-phenylenediamine in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9).

We performed several negative controls for immunohistochemistry by incubating the retinas without the primary antibodies, and we did not obtain specific signals.

Retinal analysis: Retinas were examined and photographed under a fluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with an ultraviolet (BP 365/12, LP 397) filter that allows the observation of the white-gold OHSt fluorescence, a rhodamine (BP 546/12, LP 590) filter that allows the observation of the orange-red DTMR fluorescence of the Alexa Fluor-568 donkey anti-goat IgG (H_L) antibody, and a fluorescein (BP 450/490, LP 515–565) filter that allows the observation of the fluorescein conjugated antibodies. The microscope was also equipped with a digital high-resolution camera (ProgResTM C10; Jenoptik, Jena, Germany) and a computer-driven motorized stage (ProScanTM H128 Series; Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK), connected to an image analysis computer program (Image-Pro Plus 5.1 for Windows (IPP); Media Cybernetics, Silver Spring, MD) with a microscope controller module (Scope-Pro 5.0 for Windows; Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Retinal whole-mount reconstructions were obtained as recently described in detail [68,69]. In brief, retinal

multiframe acquisitions were photographed in a raster scan pattern in which frames were captured side-by-side with no gap or overlap between them with a 20X objective (Plan-Neofluar, 20/0.50; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany). Single frames were focused manually before the capture of each image, which was then fed into the image analysis program. A scan area was defined to cover the whole retina, consisting of a matrix of *m* frames in columns and *n* frames in rows, where the total number of frames in the scan area is indicated by frames in columns times frames in rows (*m* × *n*). Usually, 140 images, each measuring 0.2161 mm² at a resolution of 300 dots per inch, were taken for each mouse retina. The images of each retina were saved in a folder as a set of 24-bit color image pictures, and these images were later combined automatically into a single tiled high-resolution composite image of the whole retina using IPP. Reconstructed images were further processed using image-editing software (Adobe® Photoshop® CS ver. 8.0.1; Adobe Systems Inc., San Jose, CA) when needed to produce printouts.

Retinal ganglion cell counts and isodensity maps: All images taken from the retinas were processed by specific macros written in IPP that apply a sequence of filters and transformations to each image of the stack in turn before finally counting the resulting cells and transferring the data to a spreadsheet for analysis. These subroutines were recently described in detail [68,69].

The topology of RGCs was analyzed with isodensity maps. Cell densities were calculated and represented as a filled contour plot graph following previously described methods [68,69]. In brief, every captured frame was divided into an equal number of 36 rectangular areas of interest (AOI) for OHSt labeling and 25 AOI for Brn3a labeling. These AOI were automatically counted, and data was exported and saved to a spreadsheet computer program (Microsoft Office Excel 2003; Microsoft Corporation, Redmond, WA). Finally, the data were represented as a filled contour plot using graphing software (SigmaPlot 9.0 for Windows; Systat Software, Inc., Richmond, CA) that constructs pseudocolored isodensity maps in a scale of 45 different steps (each of 125) ranging from 0 to 5,625 cells/mm². This upper limit was chosen on the basis of earlier studies that showed mean highest densities around this value [69].

The RGCs expressing aberrant RT97 staining of their soma were counted in a masked fashion in 5 experimental and 5 naïve retinas from group II, sacrificed 17 days after laser injury. This survival interval was chosen because it has been shown in rats that the largest number of RT97 immunopositive (RT97⁺) RGCs occurs between two and three weeks after injury, either by axotomy [74] or by elevated IOP [26]. Digitized retinal whole-mount reconstructions were examined frame by frame at high magnification, and every RT97⁺ RGC was marked with a colored dot to identify either faint or strong RT97 immunoreactivity with the aid of Photoshop® software.

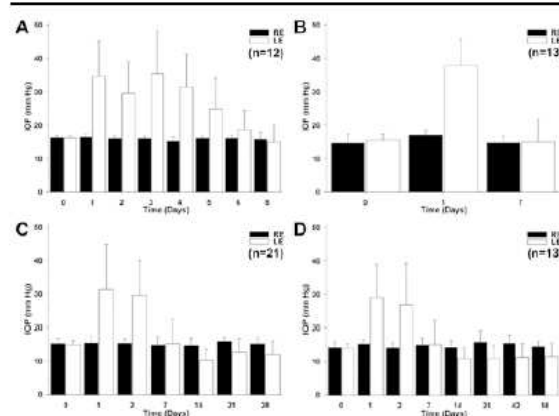


Figure 1. Measurements of intraocular pressure. **A–D:** Histograms show mean ($\pm$ SD) intraocular pressures (IOP) for the right eye (RE) and left eye (LE) in groups I (**A**), II (**B**), III (**C**), and IV (**D**) of mice sacrificed 8, 17, 35, and 63 days, respectively, after laser photocoagulation of the limbal and episcleral veins of the LE. Each received an average of 72 laser-burning spots in a single session. IOP values in group I (**A**) rose and peaked by day 1 post-treatment, were maintained until day 5, and then gradually returned to basal preoperative levels by the end of a week. IOP values in groups II (**B**), III (**C**), and IV (**D**) followed a similar pattern of pressure variations, indicating that elevated IOP was not maintained beyond 1 week.

A subroutine developed with the IPP image analysis program counted the number of dots (RT97⁺ RGCs) and their topological distribution within each analyzed retina [26,74]. The retinal distribution of RT97⁺ RGCs and OHSt⁺ RGCs within the same retina was examined by comparing their respective topological maps.

Statistical analysis: In quantitative morphological studies, data are presented as mean±standard deviation (SD) while in quantitative electrophysiological studies, data are represented as mean±standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of the differences between groups of retinas or groups of animals was conducted with non-parametric ANOVA tests using Statistix® V1.0 for Windows® 95 (Analytical Software, Tallahassee, FL) software; the Kruskal–Wallis test was used to compare more than two groups, and the Mann–Whitney test was used when comparing two groups only. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Laser-induced intraocular pressure values: There was some variability among maximum IOP values in the lasered eyes within individuals and within groups processed at different survival intervals, but the results were generally consistent. Individual IOP measurements in the groups sacrificed at 8, 17, 35, and 63 days after laser treatment are shown in detail in individual histograms for each group (group I; Figure 1A, group II; Figure 1B, group III; Figure 1C, and group IV; Figure 1D). Overall, our data show a similar time course elevation of the IOP for all groups of mice. The statistical analysis showed that within animal groups, IOP values were comparable in the lasered eyes at 24 h (Kruskal–Wallis test, $p = 0.0891$) and 48 h (Kruskal–Wallis test, $p = 0.9024$) after laser. In general, an important increase of the IOP was already evident and peaked at 24 h after laser (Kruskal–Wallis test, $p < 0.0001$); this was maintained for four days and returned gradually after the fifth day to the basal value, so that by one week after laser, the IOP values in animals of different groups were comparable for both eyes (Kruskal–Wallis test, $p = 0.8191$; Figure 1).

Electroretinography responses:

ERGs in control albino mice—To study the effect of IOP elevation on the ERG waves in albino mice, simultaneous ERG recordings were performed on the right and left eyes of each animal before surgery. Before surgery, no significant differences were observed between the left and right eyes in any of the animals in the STR, a-wave, and b-wave ERG amplitudes or in the implicit times for the b-waves. Figure 2 shows a representative example of ERG traces recorded in both eyes before surgery in response to flash stimuli of increasing intensity. The STRs were elicited by weak light stimuli (-5.4 to -4.02 log cd-s-m⁻²). The STR amplitude increased exponentially with the intensity of the light stimuli. No ERG a-wave was observed for light intensities below

-2.80 log cd-s-m⁻². The b-wave elicited by light intensities beginning at -3.96 cd-s-m⁻² also increased exponentially, reaching its maximum for 2.03 cd-s-m⁻². The photopic ERG response was elicited by a light intensity of 2.03 log cd-s-m⁻² after 5 min of light adaptation (Figure 2).

Electroretinography in experimental albino mice after elevated intraocular pressure—ERG recordings were performed simultaneously for right untreated and left lasered eyes in albino Swiss mice at increasing survival intervals after laser. Recordings from representative mice in groups III (sacrificed at 35 days) and IV (sacrificed at 63 days) are shown in Figure 2 and Figure 3, respectively. In addition, data are shown as percentages (mean±SEM) of reduction in wave amplitudes in operated eyes with respect to baseline values obtained for the same eyes before surgery (Figure 4). These figures illustrate that reductions in pSTR after laser are maintained over time. Moreover, the changes observed in the a- and b-wave amplitudes of the scotopic and mixed ERG were obvious at short intervals (7 days and 4 weeks) and were maintained for long periods after laser (8 weeks). A reduction in the b-wave amplitude of the photopic response was also observed after eye laser (see photopic response in Figure 2).

Group II: Mice from this group ($n = 13$) showed pSTR reductions of approximately 87% and 83%, respectively, 1 and 7 days after laser when compared to their baseline (preoperative values; t -test, $p < 0.001$). Scotopic and mixed ERG recorded in these mice 1 and 7 days after laser showed reduced a-wave amplitudes of 68% and 67% and reduced b-wave amplitudes of 72% and 71%, respectively (t -test, $p < 0.001$; Figure 4A).

Group III: ERG traces from this group ($n = 18$) were recorded before laser treatment and 1, 7, 14, and 28 days after treatment. When compared to their baseline (preoperative values), there were significant (t -test, $p < 0.001$) reductions in pSTR of approximately 94%, 83%, 85%, and 60%, respectively, when analyzed at 1, 8, 14, and 28 days. Similarly, significant reductions were seen in the a- and b-wave amplitudes over the same period: a-waves were 72%, 69%, 58%, and 45% of their baseline at 1, 8, 14, and 28 days, and b-waves were 72% 66%, 66%, and 55% of their baseline at 1, 8, 14, and 28 days, respectively (t -test, $p < 0.001$) (Figure 2, Figure 4B).

Group IV: ERG traces from a representative mouse in group IV ($n = 13$), recorded before laser treatment and 1, 7, 14, 28, 42, and 56 days after treatment, are shown in Figure 3. When laser-treated eyes are compared to contralateral untreated fellow eyes, mice in this group showed significant (t -test, $p < 0.001$) reductions in pSTR of approximately 81%, 90%, 72%, 56%, 77%, and 74%, respectively, at 1, 7, 14, 28, 42, and 56 days. Similarly, there were significant reductions in the a- and b-wave amplitudes: Compared with the values recorded in their fellow eyes (t -test, $p < 0.001$; Figure 4C) the a-wave amplitudes of the treated eyes were observed at 64%,

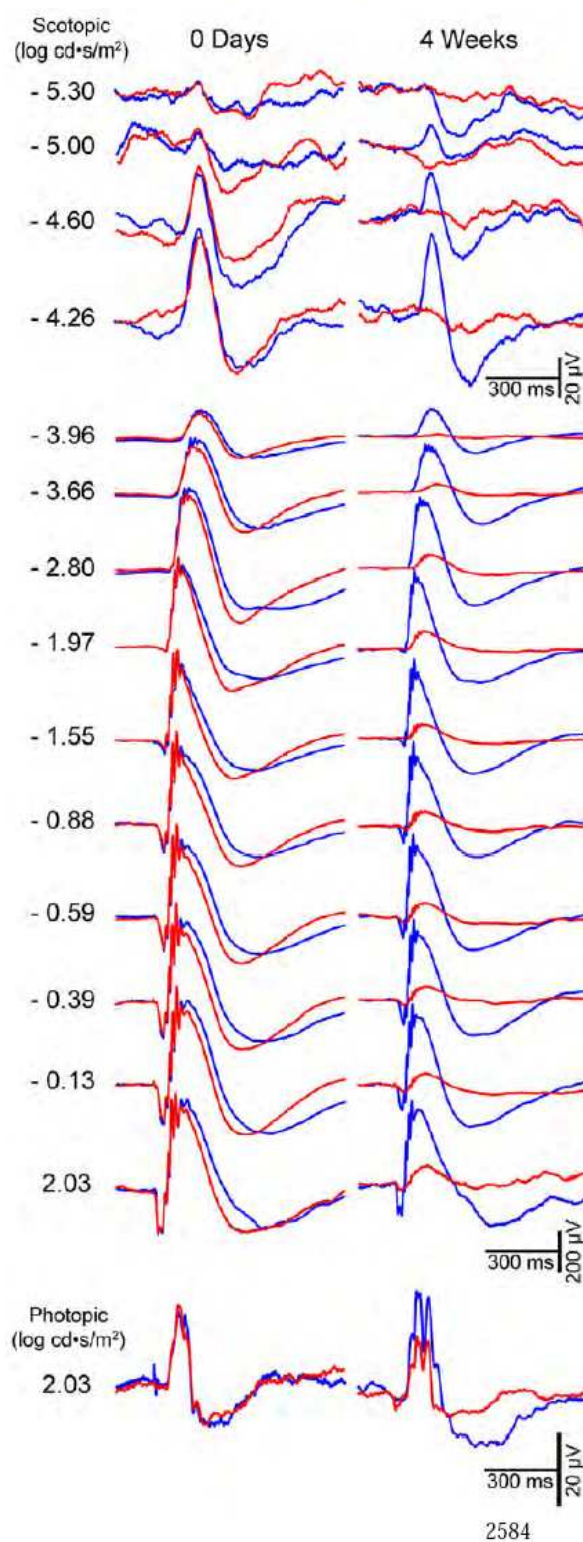


Figure 2. Examples of ERG traces recorded before and four weeks after laser photocoagulation in one representative animal. Electroretinogram recordings in response to flash stimuli of increasing intensity for the untreated right eye (blue traces) and for the lasered left eye (red traces) from one animal in group III. The intensity of the flash stimulus is indicated to the left of each of the recording traces. No difference was observed between the electroretinogram amplitudes of the left and right eyes before laser treatment (0 days), while a significant reduction in all components is clearly visible in the treated eye at four weeks post-treatment (4 weeks), both in scotopic and photopic light conditions.

70%, 58%, 38%, 44%, and 54% at 1, 8, 14, 28, 42, and 56 days, respectively, while b-wave amplitudes were 54%, 64%, 60%, 47%, 49%, and 59%, respectively, for the same intervals.

Time course of ocular hypertension-induced loss of retrograde-labeled retinal ganglion cells: To determine the effects of elevated IOP on the retrograde axonal transport of OHSt, groups of mice were analyzed at increasing survival intervals of 8, 17, 35, and 63 days after laserling. Some variability was observed among animals belonging to the same group, in that individual retinas exhibited variable numbers of OHSt-labeled RGCs (Figure 5) and differed in corresponding areas of the retina without labeled RGCs (Figures 6 and Figure 7). Most of the lasered retinas analyzed at 8, 17, 35, and 63 days showed typical areas lacking RGCs labeled with OHSt that had been applied to both SCi one week before animal processing. The areas that lacked OHSt-labeled RGCs were comparable in the four groups of retinas (Figure 6).

Experimental retinas from the different groups showed mean total numbers of retrograde-labeled RGCs that were significantly less than in their untreated fellow retinas (Kruskal–Wallis test, $p < 0.0001$). For group I, the treated eyes had approximately 28% of the OHSt-labeled RGCs in the untreated eyes (Mann–Whitney test, $p < 0.0001$); for group II,

23% (Mann–Whitney test, $p = 0.0001$); for group III, 26% (Mann–Whitney test, $p = 0.0000$); and for group IV, 22% (Mann–Whitney test, $p = 0.0001$) (Figure 5). The mean number of OHSt-labeled RGCs in the left (experimental) retinas of the groups sacrificed 8, 17, 35, and 63 days after laserling were $13,428 \pm 6,295$ ($n = 12$), $10,456 \pm 14,301$ ($n = 13$), $12,622 \pm 14,174$ ($n = 21$), and $10,451 \pm 13,949$ ($n = 13$), respectively, while the right (untreated) retinas presented mean total numbers of $47,223 \pm 2,936$ ($n = 12$), $46,321 \pm 4,492$ ($n = 13$), $49,101 \pm 3,489$ ($n = 21$) and $47,748 \pm 2,829$ ($n = 13$), respectively (Figure 5). The mean total numbers of OHSt-labeled RGCs in the contralateral retinas from the four groups were comparable (Kruskal–Wallis test, $p = 0.1391$). Similarly, the mean total numbers of OHSt-labeled RGCs in the lasered retinas from the four groups were also comparable (Kruskal–Wallis test, $p = 0.2991$), indicating that in this experimental paradigm, the lack of OHSt-labeled RGCs is present by 8 days after laserling and does not progress beyond that point (Figure 5).

Retinal distribution of retrograde-labeled retinal ganglion cells: Microscopic examination of the control fellow retinas showed the typical distribution of RGCs throughout the retina (Figure 7A–C), while the lasered retinas revealed large areas devoid of OHSt-labeled RGCs (Figure 6A–L and Figure 7D–L). This absence was seen in approximately 91% of the experimental retinas, in the form of a wedge-shaped space with an apical vertex toward the optic disc. Approximately 94% of the retinas showed these areas lacking RGCs backlabeled with OHSt in the upper retina. The pattern of OHSt-labeled RGC distribution within the retina was examined in detail by constructing an isodensity map for each retina (Figure 6A–L). Representative examples that illustrate typical areas lacking OHSt-labeled RGCs, as well as their topological distribution, are shown in Figure 6 and Figure 7. When analyzed 8 (Figure 6A–C), 17 (Figure 6D–F and Figure 7D–F), 35 (Figure 6G–I and Figure 7G–I), and 63 (Figure 6J–L and Figure 7J–L) days after laserling, approximately 100%, 92%, 86%, and 92% of the retinas, respectively, showed areas lacking RGCs labeled with OHSt. These contour plot isodensity maps revealed that in addition to the retinal sectors that lacked backlabeled RGCs, there was also a diffuse absence of OHSt-labeled RGCs even within retinal areas where some labeled RGCs appeared (Figure 6 and Figure 7). Thus, the lack of OHSt-labeled RGCs within the OHT retinas was both focal and diffuse.

Double labeling of retinal ganglion cells: Animals from all groups were backlabeled with OHSt applied to both SCi one week before sacrifice. In addition, in groups II ($n = 13$), III ($n = 13$), and IV ($n = 13$), DTMR was applied to the ocular stump of the intraorbitally transected left optic nerve 5 days after OHSt application and 2 days before sacrifice. OHSt would identify RGCs that retained their retrograde axoplasmic transport capacities, while DTMR would identify RGCs with a competent axon at the level of the ON head. In general, there

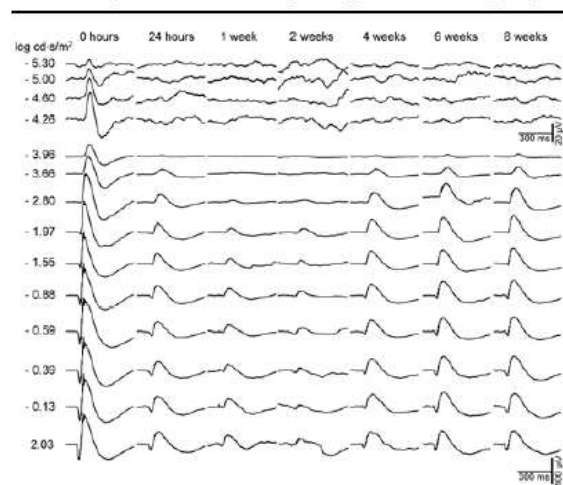


Figure 3. Electrophysiological traces from a laser-treated eye in a representative adult albino Swiss mouse. Electrophysiological recordings in response to flash stimuli of increasing intensity for the from a representative animal in group IV registered before laser treatment (0 h) and 24 h, 1 week, 4 weeks, 6 weeks and 8 weeks later. We found a significant reduction in the scotopic threshold response, a-wave, and b-wave amplitudes by 24 h after laserling, amounting to approximately 81%, 64%, and 54% of their basal values, respectively. The changes observed in the electrophysiological never fully recovered for survival times of up to 8 weeks after laserling, indicating that these are permanent.

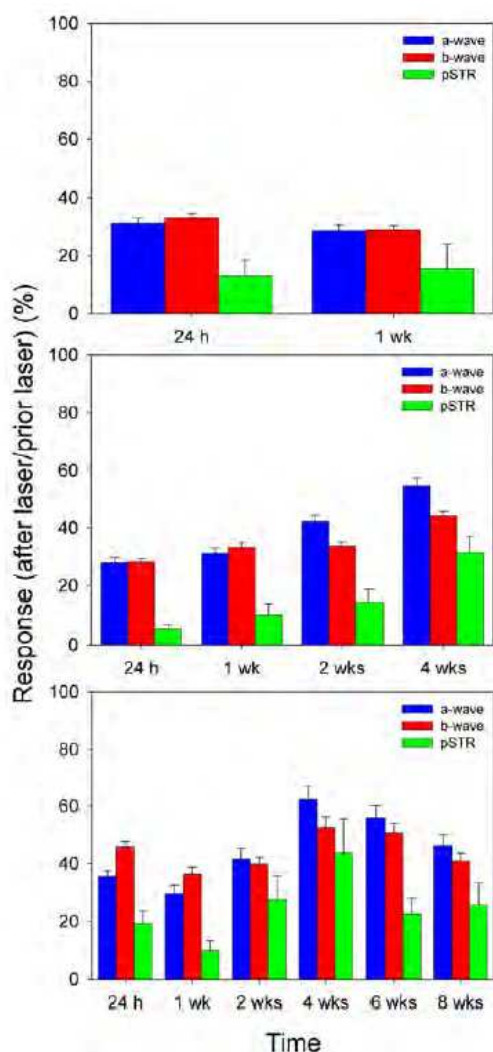


Figure 4. Histograms illustrating evolving changes in the electroretinograms. Average values (mean $\pm$ SEM) of the positive scotopic threshold response (pSTR) and a- and b-waves are presented as percentages of their basal values in three different experimental groups that were analyzed at increasing survival intervals and sacrificed at 17 (A), 35 (B), or 63 (D) days after lasering. At 24 h after laser treatment, a large reduction can be seen in the amplitudes of all the registered waves when compared to their basal levels. These reductions are maintained over time and do not recover significantly even for the animal group examined at 8 weeks after lasering (C), suggesting that laser treatment induces a permanent functional impairment within the innermost, inner and outer retina.

was a good correlation between the retinal areas lacking OHSt-labeled RGCs and the areas lacking DTMR-labeled RGCs (Figure 7A–L).

Immunocytofluorescence studies:

Brn3a immunostaining of the retina—To determine whether the absence of backlabeled RGCs represented actual RGC death or a functional impairment of axonal transport, retinal whole-mounts of mice analyzed 8 (n=12) or 35 (n=9) days after lasering were processed for Brn3a immunohistochemistry to identify and count surviving RGCs. These retinas had been labeled with OHSt applied to both SCi one week before sacrifice. Control retinas showed a typical distribution of OHSt-labeled RGCs throughout the retina (Figure 8A), and the retinal distribution of Brn3a-labeled RGCs (Figure 8B) paralleled that of OHSt-labeled RGCs (Figure 8C,D), as recently described for rats [51]. The average total numbers of Brn3a-labeled RGCs in the right control retinas at 8 and 35 days were 49,375 ($\pm$ 2,822; n=12) and 50,577 ($\pm$ 2,036; n=9), respectively. The left LP retinas

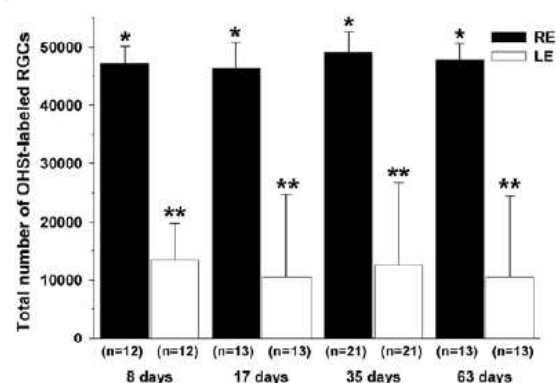


Figure 5. Populations of retinal ganglion cells labeled with 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate at 8, 17, 35, and 63 days after lasering. Histograms represent the mean ($\pm$ SD) total numbers of retinal ganglion cells (RGCs) labeled with 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) in the left eye (LE) and right eye (RE) for groups I, II, III, and IV, analyzed 8, 17, 35 or 63 days, respectively, after laser treatment of the LE. To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, OHSt was applied to both superior colliculi 1 week before sacrifice. Retinas were imaged with adjacent, nonoverlapping frames captured in a raster pattern. OHSt-labeled RGCs were counted in each frame using image analysis software. The average total numbers of OHSt-labeled RGCs in the LE were approximately one fourth of the total numbers of OHSt-labeled RGCs found in their untreated fellow retinas (RE) at all time points studied. The mean total numbers of OHSt-labeled RGCs in the RE for all four groups were comparable (*Kruskal-Wallis test; $p=0.1391$). Similarly, the mean total numbers of OHSt-labeled RGCs in the lasered retinas (LE) for these groups were also comparable (**Kruskal-Wallis test; $p=0.2991$). This suggests that the loss of retrograde axonal transport does not change beyond 8 days.

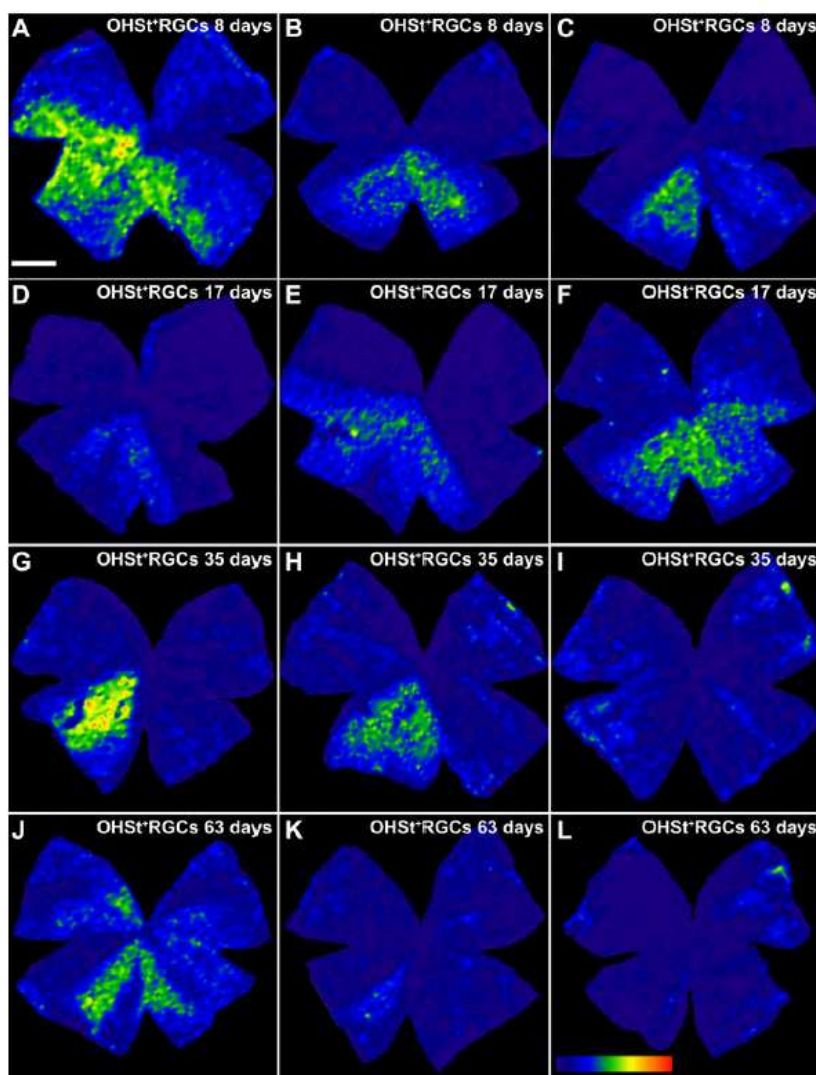


Figure 6. Isodensity maps of retinal ganglion cells labeled with 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate in experimental retinas. The isodensity maps of representative experimental retinas from groups I (A-C), II (D-F), III (G-I), and IV (J-L) illustrate regions with different densities of retinal ganglion cells labeled with 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt⁺ RGCs). To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, OHSt was applied to both superior colliculi one week before animal processing. Whole-mount reconstructions were prepared with the aid of a motorized stage on a photomicroscope with a high-resolution camera connected to an image analysis system (Image-Pro Plus, V5; Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Retinal multi frame acquisitions were photographed in a raster scan pattern in which contiguous frames were captured with no gap or overlap. Isodensity maps were generated by assigning a color code to each of the 36 subdivisions of each individual frame according to its RGC density value within a 45-step color scale range, from 0 (dark blue) to 5,625 RGCs/mm² or higher (red). For all retinas, the dorsal pole is orientated at 12 o'clock (scale bar=1 mm). Note that there are many regions with focal loss—that is, with almost no backlabeled RGCs—as well as regions with sparsely distributed RGCs. For example, the retina illustrated in E shows a region containing backlabeled RGCs restricted to a wedge between the 5 and 10 o'clock positions. The retina illustrated in A also shows backlabeled RGCs in higher numbers within a large wedge between 5 and 10 o'clock, but spared RGCs are also distributed throughout the rest of the retina in lighter densities, as reflected by the cooler than normal colors. In the four groups, approximately 91% of the retinas show areas with severe absence of RGCs. This absence is primarily (in 94% of the retinas) in the dorsal retina.

examined 8 and 35 days after lasering showed 24,343 ($\pm 5,739$; $n=12$) and 10,219 ($\pm 8,887$; $n=9$) Brn3a-labeled RGCs, respectively. Eight days after lasering, these numbers were greater than those obtained for the OHSt-labeled RGCs ($13,428 \pm 6,295$; $n=12$) (Mann-Whitney test, $p=0.0007$; Figure

8E-F), but 35 days after treatment the numbers were comparable ($10,522 \pm 9,426$; $n=9$; Mann-Whitney test, $p=0.9397$; Figure 8G-H). The progressive diminution of the total number of Brn3a-labeled RGCs in treated retinas analyzed 8 and 35 days after lasering

TABLE 1. TOTAL NUMBERS OF OHSt+RGCs OR BRN3A+RGCs IN CONTROL AND INJURED RETINAS.

RGC cells	8 days after laser photocoagulation		35 days after laser photocoagulation	
	RE (n=12)	LE (n=12)	RE (n=9)	LE (n=9)
Brn3a+RGCs	49,375±2,822†	24,343±5,739*#	50,577±2,036†	10,219±8,887**#
OHSt+RGCs	47,223±2,936†	13,428±6,295*	46,649±2,693†	10,522±9,426**

Number (mean±SD) of RGCs immunodetected for Brn3a or labeled with OHSt applied to both superior colliculi one week before animal sacrifice, in contralateral (RE) or injured (LE) retinas of mice examined 8 or 35 days after laser photocoagulation of the left eyes. *Mann-Whitney test, p=0.0007; **Mann-Whitney test, p=0.9397; # Mann-Whitney test, p=0.004; † Kruskal-Wallis test, p=0.0796.

(Mann-Whitney, p=0.0004) also documents the death of RGCs (Table 1).

RT97 immunostaining of the retina—Dissected retinas were stained with RT97, an antibody that recognizes phosphorylated neurofilament heavy chain (pNFH) and whose abnormal expression is an index of axonal injury [71, 81-88]. This antibody has been recently studied after optic nerve axotomy, either by complete intraorbital optic nerve transection or crush [74] or after ocular hypertension in adult albino rats [26]. In the present study, fellow control retinas showed typical RT97 immunostaining confined to the most distal portion of the axons within the middle and central retina, where they group into bundles and converge at the optic disk. Rarely, an axon was stained to the retinal periphery, and RT97 staining was infrequently observed in the somas or dendrites of RGCs (Figure 9A,B). In contrast, the pattern of RT97 expression in LP retinas processed at 8, 17, 35, and 63 days after lasering showed typical signs of axotomy-induced neuronal degeneration [26,74] (Figure 9C,D). In general, abnormal RT97 staining consisted mainly of abnormal pNFH accumulations both in the intraretinal aspect of RGC axons (shaped like rosary beads and small varicosities) and also within the cell bodies and primary dendrites of some RGCs (Figure 9D). RT97 labeling within the cell soma and primary dendrites varied from a faint but clear staining to an intense labeling (Figure 9C,D). Abnormal expression of RT97 was confined mainly to the sectors of the retina that lacked backlabeled RGCs, while the areas showing OHSt-labeled RGCs presented fewer abnormalities in RT97 immunoreactivity, as recently described for other inherited mouse models of ocular hypertension [53-57] and in a rat model of ocular hypertension [26]. While there were no noticeable changes in RT97 expression eight days post-treatment when the retinas were examined at low magnification, numerous RGC bodies and proximal dendrites were positive for RT97 by 17 days after lasering (Figure 9C,D); still, it was rare to observe a OHSt+ RGC doubly labeled with RT97, or vice versa (Figure 9 and Figure 10). At 35 and 63 days, the abovementioned changes in the RT97 expression pattern within axons had evolved further, and there were fewer RT97+ RGCs.

In the five control retinas, the number of RT97+ RGCs in each was 0, 0, 12, 15, and 13, respectively, with a mean (±SD) of 8±7 (n=5). The 40 RT97+ RGCs found in control retinas were all faintly stained. In contrast, in the 5 experimental retinas, totals of 202, 415, 269, 165, and 291 RT97+ RGCs were counted in each individual retina, with a mean (±SD) of 268±96 (n=5). Out of a total of 1,342 RT97+ RGCs found in the experimental retinas, 27% were strongly labeled and 73% were faintly stained. The population of RGCs in Swiss mouse retinas has been recently shown to be of 49,493 RGCs [69]; thus, the population of RT97+ RGCs represented, in the best case, less than 1% of the total population of RGCs. Nevertheless, the number of RT97+ RGCs in the LP retinas showed a great increase when compared to control retinas.

In the retinas in which manual counts were performed, a comparison of the topological distribution showed that RT97+ RGCs were mainly distributed in regions that lacked OHSt-labeled RGCs. Two representative examples of this spatial analysis are provided in Figure 10.

In the wedge-shaped sectors devoid of OHSt+ RGCs and DTMR+ RGCs, normal-looking RT97 stained axonal bundles were observed converging toward the optic disk throughout the retina. By 63 days after LP, there was a diminution in the density of RT97-labeled axonal bundles in the central and peripheral retina, and RT97-stained somas in RGCs were infrequently observed.

DISCUSSION

The present study provides new information regarding the effects of elevated IOP on adult albino Swiss mice and extends our previous observations of the adult albino rat [26]. Lasering of the limbal and perilimbal veins resulted in an abrupt increase of IOP, already measurable at 24 h, that persisted until day 5, when IOP started to decrease gradually, reaching preoperative baseline values by one week post-treatment. Important diminutions in the numbers of backlabeled OHSt+ RGCs were already evident by 8 days after lasering and remained constant thereafter. Thus, the lack of OHSt+ RGCs occurred soon after lasering, did not progress between 8 and 63 days and in general approximately 25% of the original population of RGCs maintained their retrograde axonal

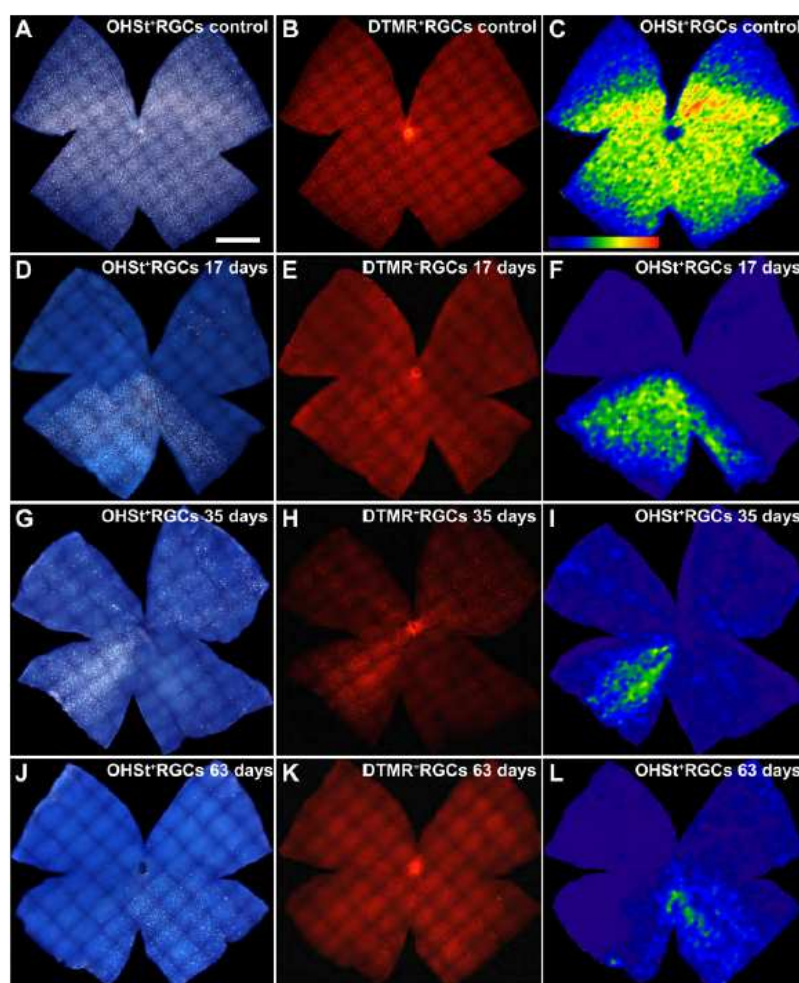


Figure 7. Isodensity maps of retinal ganglion cells labeled with dextran tetramethylrhodamine and 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate in control and experimental retinas. Retinal whole-mounts of representative adult albino Swiss mice are shown at different survival intervals after laserizing the left eye and treating with dextran tetramethylrhodamine (DTMR) and 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt). To identify retinal ganglion cells (RGCs) capable of retrograde axonal transport, OHSt was applied to both superior colliculi 1 week before animal sacrifice, and to identify RGCs with a competent axon at the level of the optic nerve (ON) head, DTMR was applied to the ocular stump of the intraorbitally divided ON 2 days before sacrifice. These retinal whole-mounts illustrate typical topological distributions of OHSt⁺ RGCs and DTMR⁺ RGCs throughout these retinas. Note the close correspondence of the areas lacking backlabeled RGCs with both tracers for each illustrated retina. For all retinas, the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock position (scale bar=1 mm). **A-C**: Whole-mount of a representative control right retina double-labeled with OHSt (**A**) applied 1 week before dissection and DTMR (**B**) applied 5 days later. An isodensity map of OHSt-labeled RGCs was constructed by splitting each frame into 36 parts and estimating RGC densities (**C**). Intensely labeled RGCs are distributed throughout the retina, but higher densities are present in a region along the naso-temporal axis of the superior retina, resembling a visual streak [69]. **D-F**: Whole-mounts of a representative experimental left retina from Group II (17 days after laserizing) show the lack of OHSt-labeled RGCs (**D**) in a large sector that comprises the superior and small sectors of the inferior retina. Stained with DTMR (**E**), the same retinal sector shows few to no DTMR-labeled RGCs. An OHSt-labeled RGC isodensity map (**F**) illustrates the areas lacking backlabeled RGCs in a sector that spans almost from the 4 o'clock position to half past 8 o'clock. **G-I**: These whole-mounts of representative experimental retinas from Group III (35 days after laserizing) show important diminutions in the numbers of OHSt-labeled RGCs (**G**) in all quadrants of the retina, except for the inferior-nasal. When stained with DTMR (**H**), the same retinal quadrants show few to no DTMR-labeled RGCs. The OHSt-labeled RGC isodensity map (**I**) illustrates the areas that lack backlabeled RGCs. **J-L**: Whole-mounts of a representative experimental retina from Group IV (63 days after laserizing) show a lack of OHSt-labeled RGCs (**J**) mainly within the nasal retina and the superior-temporal quadrant. Stained with DTMR (**K**), the same retinal quadrants showed few to no DTMR-labeled RGCs. The OHSt-labeled RGC isodensity map (**L**) also illustrates the areas with focal loss of RGCs, as well as a small sector of the inferior temporal quadrant that shows diffuse loss of backlabeled RGCs.

2589

transport at 8 days or greater survival periods examined. The geographical distribution of the backlabeled RGCs shows that elevated IOP induces — as has been shown in the albino rat [26] — both sectorial (in the form of wedge-shaped regions) and diffuse loss of RGCs. Our immunofluorescence studies also indicate that early after IOP elevation, retrograde axonal transport is impaired in a subpopulation of RGCs that are Brn3a⁺ and thus survive in the retina. RT97 immunostaining further shows that in the sectors of the retina lacking OHSt⁺ RGCs, some surviving RGCs show typical signs of crush-injury-like induced degeneration. Our electrophysiological analysis demonstrates that shortly after LP, there is an important reduction in the amplitude of the STR and the other two main components of the ERG, the a- and b-waves; these reductions are permanent throughout the period of study, indicating that elevation of IOP in albino mice results in damage not only to the RGC layer, but also to other retinal layers. All together, we found that laserling of the limbal tissues in albino mice results in profound alterations of retrograde axoplasmic transport that are followed by degeneration of RGCs, as well as important alterations of the innermost, inner nuclear, and outer nuclear layers of the retina.

Elevation of intraocular pressure: Elevation of IOP, the primary risk factor for glaucoma, is also the most common approach to induce experimental models in which to study pathophysiology involved with glaucomatous optic neuropathy. Injection of hypertonic saline into the episcleral veins [89], cauterization of the episcleral veins [90], and laser photocoagulation of the trabecular meshwork [30] are some accepted approaches to induce ocular hypertension in animal models of glaucomatous damage. Much is known about inherited mouse models of glaucoma, the DBA/2J line of mice, and also about the experimentally induced models of glaucoma in pigmented mice [32,33,59], but little is known about the subject in albino mice.

The extent of IOP elevation varies with different experimental approaches and animal species [15,30]. Indeed, different laserling methods result in different IOP elevation profiles with variations in the time at which the peak IOP is reached and maintained, as well as differences in how long ocular hypertension persists [15,30,89]. The laserling methodology employed in the present study resulted in a rapid increase of IOP that was maintained for a short period of time. While this may be seen as a disadvantage when compared to a more chronic model of IOP elevation, our IOP profile produced a severe injury to the retina that resulted in several features — loss of RGCs and degeneration of the nerve fiber layer, for example — that are common in an inherited mouse model of ocular hypertension [54-57] commonly used to investigate mechanisms of cell death in glaucomatous optic neuropathy. Similar abrupt elevations of IOP have been observed for pigmented mice, in which the trabecular meshwork and the episcleral veins were photocoagulated with

a laser [60]. The pigmented mice studied by Grozdanic and colleagues [12] showed persistent IOP increases for over 30 days, while in our study, the IOP elevation was restricted to the first week. Nevertheless, our results are somewhat comparable, in that they also show important alterations of the STR, a-waves, and b-waves of the ERG recordings, all of which imply severe retinal damage (see below).

Absence of retrograde-labeled retinal ganglion cells: Evaluation of RGC survival was based on the use of specific markers and retrograde-transported tracers that allowed specific identification of RGCs over flattened mouse retina whole-mounts, along with the application of recently developed techniques to automatically count labeled RGCs and construct topological isodensity maps of their distribution within the retina. Quantitative analysis of the number of RGCs backlabeled with OHSt applied to both SCi showed substantial diminution of OHSt⁺ RGCs in lasered retinas when compared with their contralateral fellow retinas. Within each group examined at different survival intervals, there was some variability in the intensity of retinal damage, as judged by the size of areas lacking labeled RGCs and the total number of RGCs labeled with OHSt. At present, we have no clear explanation for the variability of retinal damage in the present work, but similar variations in the intensity of retinal damage have been reported in experimental [30] and inherited [55, 56,59] models of ocular hypertension, including our recent study that used similar laserling methodology in adult albino rats [26]. There were no differences among the groups analyzed at different survival intervals; thus, it is conceivable that whatever damage was induced in these retinas occurred soon after injury.

The lack of retrograde-labeled cells in the experimental retinas took two primary forms: a focal absence, in wedge-shaped sectors with their vertex on the optic disc and their periphery toward the retinal periphery; and another, less conspicuous reduction that was diffuse and affected retinal areas containing some backlabeled RGCs. Focal loss occurred in wedges of different sizes within the retinal quadrants but more often in the dorsal retina, as has been previously observed in other ocular hypertension studies in rats [26,28, 30,89] and mice [54,55,59,64]. We ignore the exact reason for the preferential location of retinal damage in the dorsal retina but suppose it may be related to the basic structure of the optic nerve. The spatial distribution of OHSt⁺ RGCs in the lasered retinas suggests a diffuse lack of backlabeled RGCs in addition to the focal loss of the cells. Indeed, the isodensity maps constructed on the basis of the OHSt⁺ RGCs provided a vivid demonstration of the presence of retinal areas with lower than normal RGC densities (Figure 6, Figure 7, and Figure 8). A similar pattern of RGC loss has been reported in aged DBA/2NNia mice [52] as well as in adult OHT rats [26].

Functional impairment of retrograde axonal transport: The results for the experimental groups in which OHSt was

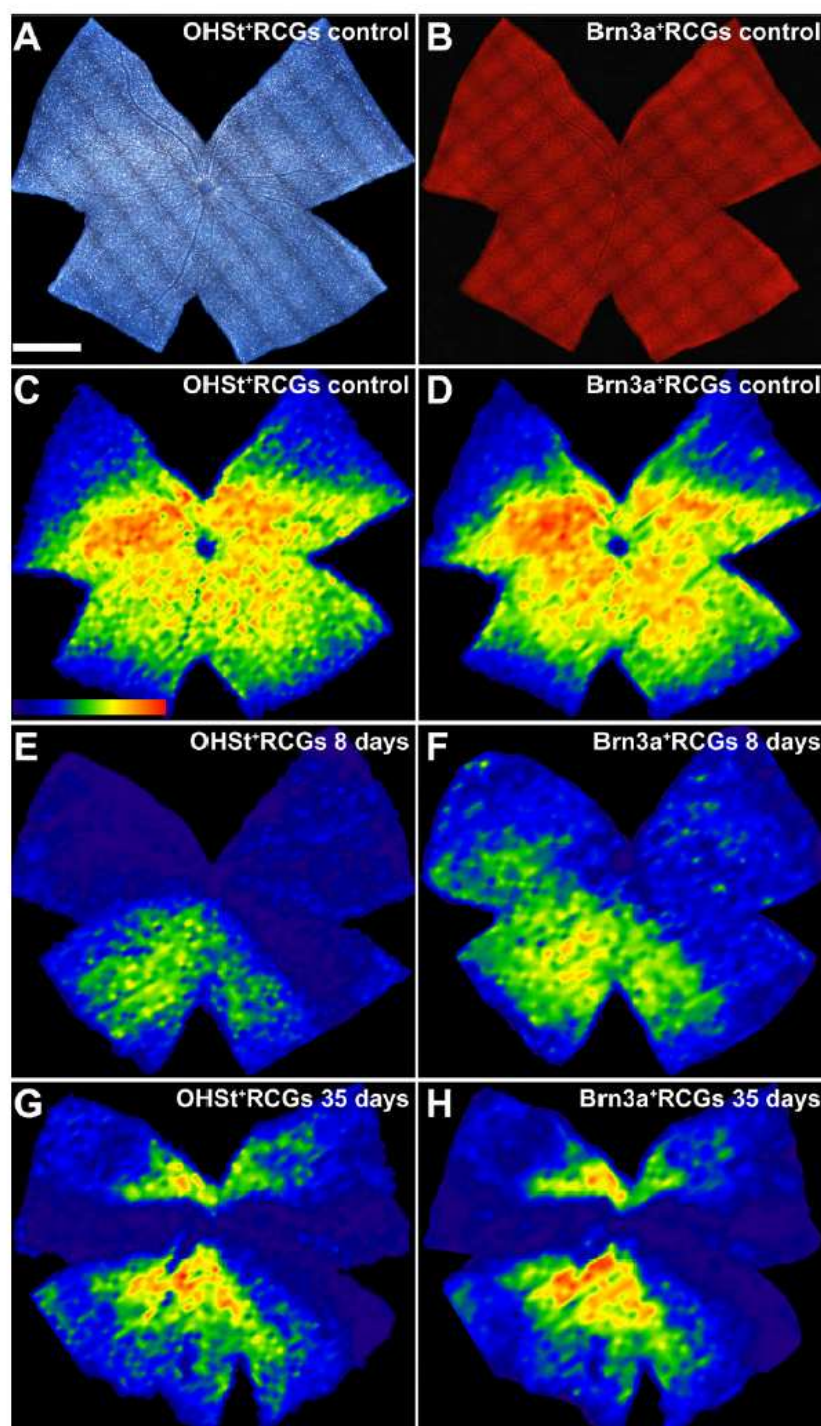


Figure 8. Absence of backlabeled retinal ganglion cells due to axonal transport impairment and cell loss. **A-H:** These representative examples show whole-mounts of a control retina (**A-D**) labeled with 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) (**A**) and its isodensity map (**C**), as well as the same retina immunolabeled with Brn3a (**B**) to identify surviving RGCs and the corresponding isodensity map (**D**). To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, OHSt was applied to both superior colliculi 1 week before sacrifice. To identify surviving RGCs, retinas were processed for Brn3a immunohistochemistry. Note the presence of intensely stained RGCs distributed throughout the entire control retina, with a typical high-density region along a naso-temporal streak in the superior retina, which is clearly shown in the isodensity maps of OHSt-labeled RGCs (**C**) and Brn3a-labeled RGCs (**D**). **E-H:** Representative examples of experimental retinas at 8 (**E, F**) and 35 (**G, H**) days after laser injury, showing the isodensity maps of OHSt-labeled RGCs (**E, G**) and Brn3a-labeled RGCs (**F, H**). Both experimental retinas show fewer OHSt- and Brn3a-labeled RGCs than in the control retinas. Moreover, the population of Brn3a-labeled RGCs was greater than that of OHSt-labeled RGCs at 8 but not at 35 days, indicating compromised retrograde axonal transport within the first week after laser injury and demonstrating that the lack of retrograde labeling in the retina is due not only to RGC degeneration but also to an impairment of the axoplasmic flow. The diminution in the numbers of Brn3a⁺RGCs observed between the control retina and retinas analyzed 8 and 35 days after laser injury also documents the loss of RGCs. Isodensity maps were generated by assigning a color code to each of the subdivisions of each individual frame according to its RGC density value within a 45-step color scale range, from 0 (dark blue) to 5,625 RGCs/mm² or higher (red). For all retinas, the dorsal pole is orientated at 12 o'clock (scale bar=1 mm).

used as a retrograde tracer to identify RGCs demonstrated large areas of the retina that lacked labeled RGCs. While the absence of backlabeled RGCs may reflect degeneration and death of RGCs, it might also be related to a functional impairment of axoplasmic flow, as has been previously shown for other retinal injuries in adult rats, such as transient ischemia [43] or ocular hypertension [26]. In these studies it was shown that a proportion of the RGC population that survives transient ischemia of the retina or ocular hypertension exhibits impairment of retrograde axonal transport [26,43]. To investigate whether the lack of OHSt-labeled RGCs was a reflection of axonal transport impairment, OHSt was applied to both SCi 1 wk before animal processing, and the retinas were processed for Brn3a immunohistochemistry to identify and count surviving RGCs. There was a clear mismatch between the number of OHSt⁺ RGCs and the number of Brn3a⁺ RGCs, indicating that within the first days after lasering, retrograde axonal transport of OHSt from the SCi back to the RGC cell body is compromised. The number of surviving, functionally competent RGCs is much larger as judged by Brn3a expression, further demonstrating that not all surviving RGCs retain normal physiologic properties [26,43]. These experiments indicate that the lack of retrograde labeling in the retina, at the early time point of 8 days after lasering, is due not only to an actual degeneration and loss of RGCs but also to an impairment of the axoplasmic transport.

The absence of OHSt⁺ RGCs in the wedge-shaped sectors was paralleled by the lack of retrograde labeling with DTMR, suggesting that the scarcity of labeled RGCs is due also to a lack of passive diffusion along the RGC axon (Figure 7). It is possible that early after lasering, within 8 days of treatment, there is an actual impairment of active retrograde axonal transport of OHSt along the axon, while by 17 or more days after lasering, the lack of RGCs backlabeled with OHSt or DTMR responds to impairment of active retrograde axonal transport and of passive diffusion from the optic nerve head toward the cell body. This is consistent both with a mechanical obstruction altering passive diffusion and retrograde transport of DTMR and also with retrograde cell loss of unlabeled RGCs. Indeed, the observation that the number of Brn3a⁺ RGCs diminishes progressively from the control samples to retinas examined at 8 days and then retinas examined at 35 days provides evidence for the loss and death of RGCs. Thus, it seems that OHT induces not only a scarcity of labeled RGCs but also the death of RGCs.

Axotomy-like injury post-ocular hypertension: The topologic distribution of RGCs in the form of triangular sectors suggests a lesion inflicted at a point where optic axons are topographically grouped together; this must occur at the level of the optic nerve head, where retinotopic arrangement is highest [91,92]. These wedge-shaped patterns of retinal damage are reminiscent of those observed in other types of inherited or acquired retinal degeneration, in which blood

vessels ligate bundles of axons, thus producing an intense constriction that leads to axonal transport interruption, loss of retrograde tracing, and loss of RGCs [71,83-86]. The latter situation affects bundles of axons close to the optic disc, with effects that radiate out toward the periphery, but no anomalies are seen within unconstricted bundles of axons. The geographical distribution of areas without backlabeled RGCs in our present study sharply contrasts with the characteristic patchy cell loss observed after transient ischemia of the retina induced by selective ligation of the ophthalmic vessels [43, 72,73].

It was interesting to find apparently normal neurofilament staining in sectors with labeled RGCs, but not in sectors lacking labeled RGCs (Figure 9C,D). In agreement with our double-labeling studies, which showed that a large number of surviving Brn3a⁺ RGCs had lost their capacity for retrograde axonal transport of OHSt, some RT97⁺ RGCs were found within the areas that lacked labeled RGCs, as were bundles of RT97⁺ retinal axons (Figure 9C,D and Figure 10). This suggests that retrograde degeneration and death of OHT-lesioned RGCs and their axons takes longer, as previously suggested [26,54,56]. The degenerative events in the ganglion cell layer following optic nerve injury vary depending on the type of injury and are somewhat slower when the injury is due to axonal compression than when it is due to axonal transection [74].

There was no indication of further diminution in the numbers of OHSt⁺ RGCs between 8 and 63 days after lasering. By 63 days, the retinas showed total numbers of OHSt⁺ RGCs that were not significantly different from those observed in the similar groups of animals processed at 8, 17, and 35 days after lasering, implying that perhaps the numbers of backlabeled RGCs do not decrease further with increasing survival intervals. Progressive loss of RGCs was observed when these neurons were identified with Brn3a immunofluorescence, which agrees with previous studies of RGC loss induced by an axotomy-like insult, such as ON transection [93], ON crush [74,94], or axon bundle ligation [71,83-86].

Functional impairment of the retina (electroretinography): Our previous studies on OHT-induced retinal degeneration in adult rats [26], together with the present studies, indicate that shortly after IOP elevation, severe pathology develops in the retina, affecting the RGC population. However, little is known about changes in retinal function in an OHT model induced by LP of episcleral and limbal veins in adult albino Swiss mice; thus, ERG were recorded in this study to examine functionally the progression of retinal damage in living animals induced by OHT over time in this experimental paradigm.

It is likely that IOP elevation results in permanent damage to the outer retinal layers, because in our experiments, both the a-wave and the b-wave amplitudes diminish soon after

laser and do not recover with time. Indeed, our results are consistent with other studies in rat OHT eyes showing severe alteration of the a- and b- waves shortly after OHT only when the peak of IOP is elevated [13,14,17,95,96]. Whether diminution in the amplitudes of the a- and b-waves reflects a functional impairment that precedes actual degeneration of the outer retinal layers remains to be studied further, but parallel studies conducted in our laboratory [97] suggest that

the degeneration of the outer retinal layers is a protracted event following IOP elevation. In those studies, the morphology and

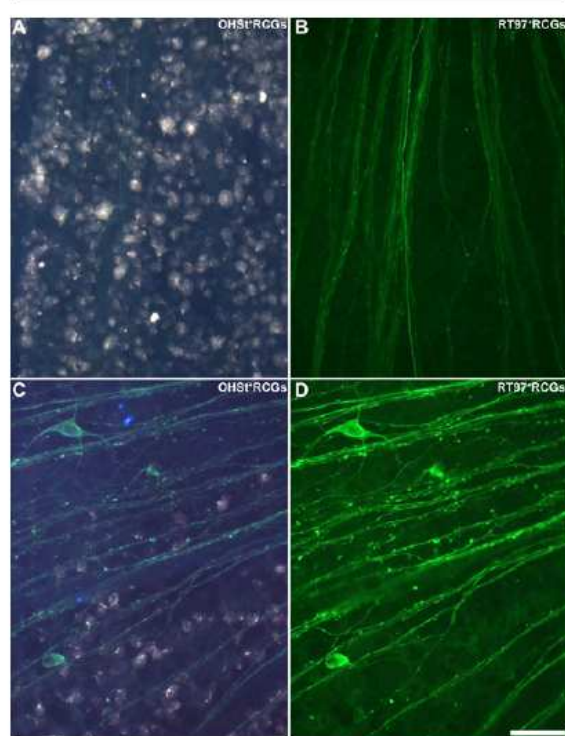


Figure 9. Ocular hypertension induces aberrant expression of phosphorylated neurofilament heavy chain. Fluorescence photomicrographs show representative middle regions of right eye (control; **A, B**) and left eye (lasered; **C, D**) mouse retinas, with 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) applied to the superior colliculi for 1 week, that were processed for RT97 immunofluorescence 17 days after laser photocoagulation. Micrographs were taken under ultraviolet and fluorescein filters to examine OHSt or RT97 immunofluorescence, respectively. **A, B**: In the control (right-eye) retina, OHSt-labeled RGCs show typical distribution (**A**) and RT97 immunofluorescence is restricted to axonal bundles (**B**). **C, D**: In the lasered (left-eye) retina, the distribution of retinal ganglion cells (RGCs) retrograde-labeled with OHSt is restricted to the lower part of the picture (**C**), which under the fluorescein filter (**D**) shows a lack of RT97 staining within OHSt⁺ RGCs. Abnormal phosphorylated neurofilament heavy chain expression, which depicts several intensely RT97-stained RGCs and RT97 beaded axons, is concentrated in the region that lacks OHSt backlabeled RGCs. Scale bars for **A-D**=50 μ m.

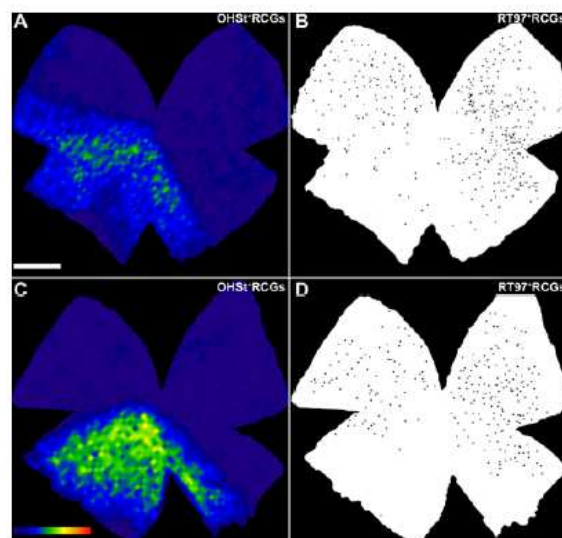


Figure 10. Different geographical distribution of RT97-labeled and OHSt-labeled retinal ganglion cells in retinas with ocular hypertension. These examples of representative left retinas in experimental animals 17 days after laser of the left eye show retinal ganglion cells (RGCs) labeled with 10% hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) and RT97, illustrating the near confinement of abnormal expression of RT97 to sectors of the retina that lack OHSt backlabeled RGCs; meanwhile, sectors containing OHSt⁺ RGCs present fewer RGCs with abnormal RT97 staining. To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, OHSt was applied to both superior colliculi 1 week before sacrifice. Retinal whole-mounts were immunostained with RT97 antibodies to identify RT97⁺ RGCs. OHSt⁺ RGC isodensity maps were generated by assigning a color code to each of the 36 subdivisions of each individual frame according to its density value within a 45-step color scale, ranging from 0 (dark blue) to 5,625 RGCs/mm² or higher (red). RT97⁺ RGCs are represented as dots over the outline of the retinal whole-mount. **A, B**: A whole-mount of a representative experimental left retina doubly labeled with OHSt (**A**) and RT97 (**B**) illustrates the typical topological distribution of 12,821 OHSt⁺ RGCs and 415 RT97⁺ RGCs throughout the retina in these experiments. Note the lack of correspondence between areas containing OHSt-labeled RGCs (**A**), which are restricted to a large wedge located between the 5 and 10 o'clock positions, and the RT97⁺ RGCs (**B**), which are distributed mainly in the opposite area of the retina. The dorsal pole of the retina is orientated at 12 o'clock. **C, D**: Another whole-mount representative experimental left retina doubly labeled with OHSt (**C**) and RT97 (**D**) illustrates the topological distribution of 10,911 OHSt⁺ RGCs and 269 RT97⁺ RGCs throughout the retina in these experiments. Note the lack of correspondence between areas containing OHSt-labeled RGCs (**C**) which are restricted to a large wedge between 4:30 and 8:30 o'clock, and the RT97⁺ RGCs (**D**) found mainly in the opposite area of the retina. The dorsal pole of the retina is orientated at 12 o'clock (scale bar=1 mm).

general appearance of the outer retinal layers, as observed with several antibodies, do not appear altered shortly after lasering (two weeks post-treatment), but they become very distorted by 4 months after lasering. Our present results are also consistent both with other rat OHT eye studies that show cellular disorganization and thickness reduction of all retinal layers [12] and a severe thinning of the retinal structures [14] and also with reports in human advanced glaucoma that indicate altered scotopic ERG parameters [8] and thinning of the outer and inner nuclear layers with loss of photoreceptors [6].

Our results on the recorded a-waves and b-waves illustrate damage to the outer and middle retinal layers, but they provide no information about the innermost retina. Recording STR, the lowest detectable response in scotopic conditions, appears to be a fine and sensitive functional test to detect damage to the innermost layer of the retina, specifically involving the RGC population [13,98]. In both pigmented [13,37] and albino [38] rats, the STR diminishes significantly shortly after optic nerve transection, a diminution that correlates with the pattern of axotomy-induced RGC loss and persists for long periods of time without recovery, indicating that the integrity of the RGC population is needed to evoke a full STR in these rodents. Our measurement of ERG responses using a series of flashes with varying light intensity allowed us to evaluate the functional changes longitudinally; the results showed that the STR was severely affected shortly after the rise in IOP, and this alteration was maintained throughout the longest survival interval examined, 8 weeks, thus providing additional functional evidence of the loss of RGCs in this model. This is consistent with previous OHT studies in adult albino rats [26], as well as with our present anatomic data indicating degeneration of the RGC population. Moreover, a significant reduction in STR has been associated with chronic [14,17,60,99,100] and acute [95,101] OHT in adult rats, mice [96], and monkey OHT models and human glaucoma patients [8,98].

Thus, taken together our present data shows that elevation of IOP in albino mice results in important diminutions of the STR, a-wave, and b-wave amplitudes, which are generated by the innermost, outer and inner nuclear layers of the retina, respectively. A similar effect has been observed in rat and monkey models of glaucoma [14,98]. To our knowledge, we report for the first time significant decreases in STR, a-wave, and b-wave ERG scotopic responses in adult albino Swiss mice with elevated IOP. Correspondence in physiologic measurements in this mouse OHT model indicates the value of noninvasive ERG measurements to document retinal pathophysiology in rodent glaucoma models.

Concluding remarks: Our data indicate that OHT in adult albino Swiss mice induces several severe degenerative events in the retina. The first event observed in our experiments is

the loss of the capacity for active retrograde axonal transport from target territories in the brain back to cell soma in the retina. This is seen within a week of retinal lasering. Shortly after, axonal transport appears blocked for bundles of neighboring axons, in such a way that even a passively diffusing retrograde tracer does not reach the somas of the surviving RGCs in the retina; this appears between 8 and 17 days after lasering and is maintained for the period of study. At the early time point (8 days), however, there are still larger numbers of RGCs distributed throughout the retina, as identified by the expression of the RGC-specific marker Brn3a. Simultaneously, the nerve fiber layer of the retina shows signs of retrograde degeneration of axons and RGC bodies that are compatible with an axotomy-like injury, and the chronology of the degenerative events speaks in favor of a crush-like injury to bundles of axons in the ON head. Up to 63 days post-treatment, the retinas exhibit a small proportion (approximately 22%) of the original RGC population that maintains their capacity both for active retrograde transport of OHSt from their target territories in the brain back to the retina and for passive retrograde diffusion of DTMR from the ON head toward the cell soma in the retina. These events are paralleled by an important functional impairment that consists of reductions in the amplitudes of the a- and b-waves and the STR wave to approximately half of their basal levels. These reductions, which are observed as early as 24 h after laser treatment, are maintained for as long as 8 weeks, suggesting permanent damage to the innermost, inner nuclear and outer nuclear layers of the retina.

The mechanism by which the outer, inner and innermost retinal layers are compromised in the present model is not fully understood, but it may result from different types of insults. It has been largely known that increased IOP may mimic the effect of an axotomy-like injury to RGC axons somewhere near the optic nerve head [26,102-104], where ON axons are highly arranged retinotopically [91,92]. Additionally, the inner retinal blood supply may also be compromised by ON head compression; thus, a vascular compromise or mechanical compression of retinal vessels cannot be disregarded completely [105-107]. Finally, astrocytes have also been implicated in the structural remodeling that occurs in the optic nerve head of glaucomatous eyes, thus glial activation may also be an important contributor to glaucomatous optic neuropathy [56,108].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the technical contributions of Isabel Cánovas, María E. Aguilera, Leticia Nieto, and José M. Bernal. This work was supported by research grants from the Regional Government of Murcia; Fundación Séneca 05703/PI/07 (MPVP), 04446/GERM/07 (MVS); Spanish Ministry of Education and Science SAF-2005-04812, SAF-2009-10385 (MVS), SAF-2007-

66175 (PdIV); and Spanish Ministry of Health ISCIII: FIS PIO06/0780 (MPVP), RD07/0062/0001 (MVS), and RD07/0062/0008 (PdIV).

REFERENCES

- Ramón y Cajal S. La rétine des vertébrés. La cellule. Lierre-Louvain; 1894.
- Dowling J. The retina: An approachable part of the brain. Cambridge, MA: Harvard UP; 1987.
- Bayer AU, Neuhardt T, May AC, Martus P, Maag KP, Brodie S, Lütjen-Drecoll E, Podos SM, Mittag T. Retinal morphology and ERG response in the DBA/2Nnia mouse model of angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:1258-65. [PMID: 11328737]
- Panda S, Jonas JB. Inner nuclear layer of the retina in eyes with secondary angle-block glaucoma. *Ophthalmologe* 1992; 89:468-71. [PMID: 1486262]a
- Panda S, Jonas JB. Decreased photoreceptor count in human eyes with secondary angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:2532-6. [PMID: 1634350]b
- Nork TM, Ver Hoeve JN, Poulsen GL, Nickells RW, Davis MD, Weber AJ, Vaegan, Sarks SH, Lemley HL, Millecchia LL. Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Arch Ophthalmol* 2000; 118:235-45. [PMID: 10676789]
- Fazio DT, Heckenlively JR, Martin DA, Christensen RE. The electroretinogram in advanced open-angle glaucoma. *Doc Ophthalmol* 1986; 63:45-54. [PMID: 3732012]
- Korth M, Nguyen NX, Horn F, Martus P. Scotopic threshold response and scotopic PII in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:619-25. [PMID: 8113012]
- Vaegan Graham SL, Goldberg I, Buckland L, Hollows FC. Flash and pattern electroretinogram changes with optic atrophy and glaucoma. *Exp Eye Res* 1995; 60:697-706. [PMID: 7641852]
- Holopigian K, Seiple W, Mayron C, Koty R, Lorenzo M. Electrophysiological and psychophysical flicker sensitivity in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:1863-8. [PMID: 2211032]
- Mehaffey L, Holopigian K, Seiple W. Electro-oculogram changes in patients with ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Doc Ophthalmol* 1993; 83:103-10. [PMID: 8334925]
- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH. Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:4337-46. [PMID: 14507878]
- Bui BV, Fortune B. Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *J Physiol* 2004; 555:153-73. [PMID: 14578484]
- Fortune B, Bui BV, Morrison JC, Johnson EC, Dong J, Cepurna WO, Jia L, Barber S, Cioffi GA. Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:1854-62. [PMID: 15161850]
- Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME, Tremblay F. Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:2969-76. [PMID: 12202517]
- Feghali JG, Jin JC, Odom JV. Effect of short-term intraocular pressure elevation on the rabbit electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:2184-9. [PMID: 2071332]
- Holcombe DJ, Lengefeld N, Gole GA, Barnett NL. Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model. *Br J Ophthalmol* 2008; 92:683-8. [PMID: 18296504]
- Schumer RA, Podos SM. The nerve of glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1994; 112:37-44. [PMID: 8285890]
- Van Buskirk EM, Cioffi GA. Glaucomatous optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 1992; 113:447-52. [PMID: 1558122]
- The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS). 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol* 2000; 130:429-40. [PMID: 11024415]
- Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK 2nd, Wilson MR, Gordon MO. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:701-13. [PMID: 12049574]
- Nouri-Mahdavi K, Hoffman D, Gaasterland D, Caprioli J. Prediction of visual field progression in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:4346-51. [PMID: 15557442]
- Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, Jia L. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24:217-40. [PMID: 15610974]
- Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO. Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res* 2008; 173:285-301. [PMID: 18929117]
- Howell GR, Libby RT, John SW. Mouse genetic models: an ideal system for understanding glaucomatous neurodegeneration and neuroprotection. *Prog Brain Res* 2008; 173:303-21. [PMID: 18929118]
- Salinas-Navarro M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Ocular hypertension impairs optic nerve axoplasmic flow leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 2010; 90: 168-83. [PMID: 19835874]
- Quigley HA, Hohman RM. Laser energy levels for trabecular meshwork damage in the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24:1305-7. [PMID: 6885314]
- WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2849-55. [PMID: 11687528]
- Woldemussie E, Wijono M, Ruiz G. Müller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* 2004; 47:109-19. [PMID: 15185390]
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:402-10. [PMID: 11818384]
- Schnebelen C, Pasquis B, Salinas-Navarro M, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Vidal-Sanz M, Bron AM, Bretillon L, Acar N. A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced

- by elevation of intraocular pressure in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247:1191-203. [PMID: 19437028]
32. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:4314-20. [PMID: 14507875]a
 33. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure. *Exp Eye Res* 2003; 77:681-6. [PMID: 14609556]b
 34. Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, de Imperial JM, Villegas-Pérez MP. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol* 2001; 45:S261-7. [PMID: 11377446]
 35. Pang I-H, Clark AF. Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J Glaucoma* 2007; 16:483-05. [PMID: 17700292]
 36. Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW. Changes in Thyl gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2001; 7:192-201. [PMID: 11509915]
 37. Alarcon-Martinez L, Avilés-Trigueros M, Blanco-Velasco R, De la Villa P, Vidal-Sanz M. Scotopic threshold response as an index of retinal ganglion cell function in axotomized adult rat retina. ARVO Annual Meeting; 2009 May 3-7; Fort Lauderdale (FL).
 38. Alarcon-Martinez L, De la Villa P, Avilés-Trigueros M, Blanco-Velasco R, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Short and long term axotomy-induced erg changes in albino and pigmented rats. *Mol Vis* 2009; 15:2373-83. [PMID: 19936311]
 39. McKerracher L, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ. Slow transport rates of cytoskeletal proteins change during regeneration of axotomized retinal neurons in adult rats. *J Neurosci* 1990; 10:641-8. [PMID: 2106015]a
 40. McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ. Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J Neurosci* 1990; 10:2834-41. [PMID: 1696983]b
 41. Quigley H, Anderson DR. The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest Ophthalmol* 1976; 15:606-16. [PMID: 60300]
 42. Quigley HA, Anderson DR. Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16:640-4. [PMID: 68942]
 43. Lafuente López-Herrera MP, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol* 2002; 178:243-58. [PMID: 12504883]
 44. Nash MS, Osborne NN. Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1293-8. [PMID: 10235569]
 45. Chidlow G, Casson R, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Osborne NN. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis* 2005; 11:387-96. [PMID: 15947739]
 46. Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Vidal-Sanz M, Osborne NN. The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:685-93. [PMID: 14744915]
 47. Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol* 2000; 417:431-47. [PMID: 10701865]
 48. Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 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. *J Comp Neurol* 2007; 501:866-78. [PMID: 17311318]
 49. Agudo M, Pérez-Marín MC, Lonngren U, Sobrado P, Conesa A, Cánovas I, Salinas-Navarro M, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M. Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis* 2008; 14:1050-63. [PMID: 18552980]
 50. Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado-Calvo P, Lonngren U, Salinas-Navarro M, Cánovas I, Nadal-Nicolas FM, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M. Proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade are immediately up-regulated in the retina after optic nerve transection or optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:424-31. [PMID: 18775855]
 51. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:3860-8. [PMID: 19264888]
 52. Filippopoulos T, Dánias J, Chen B, Podos SM, Mittag TW. Topographic and morphologic analyses of retinal ganglion cell loss in old DBA/2N^{nia} mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:1968-74. [PMID: 16639004]
 53. Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, Barbay JM, Marchant JK, Mahesh N, Porciatti V, Whitmore AV, Masland RH, John SW. Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol* 2007; 179:1523-37. [PMID: 18158332]
 54. Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* 2005; 171:313-25. [PMID: 16247030]
 55. Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickells RW. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci* 2006; 7:66. [PMID: 17018142]
 56. Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, Inman DM, Vetter ML, Horner PJ, Marsh-Armstrong N. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci* 2008; 28:548-61. [PMID: 18184797]
 57. Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, Vetter ML, Marsh-Armstrong N, Horner PJ. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 2008; 28:2735-44. [PMID: 18337403]
 58. Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL. The mouse as a model for human biology: a

- resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet* 2007; 8:58-69. [PMID: 17173058]
59. Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN. Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:4352-8. [PMID: 15557443]
 60. Grozdanic SD, Kwon YH, Sakaguchi DS, Kardon RH, Sonea IM. Functional evaluation of retina and optic nerve in the rat model of chronic ocular hypertension. *Exp Eye Res* 2004; 79:75-83. [PMID: 15183102]
 61. Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, Li D, Wu SM, Gross RL. Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Res* 2005; 45:169-79. [PMID: 15581918]
 62. Alarcon-Martinez L, De La Villa P, Salinas-Navarro M, García-Ayuso D, Cánovas I, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Functional effects in the albino mice retina. ARVO Annual Meeting; 2007 May 6-10; Fort Lauderdale (FL).
 63. Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcon-Martinez L, Cánovas I, Bernal J, Soro MI, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Effects of the retinal ganglion cell population of the albino mouse. ARVO Annual Meeting; 2007 May 6-10; Fort Lauderdale (FL).
 64. Danias J, Kontiola AI, Filippopoulos T, Mittag T. Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:1138-41. [PMID: 12601041]
 65. Wang WH, Millar JC, Pang IH, Wax MB, Clark AF. Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:4617-21. [PMID: 16303957]
 66. Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Denis P, Cooper HM. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One* 2008; 3:e3931. [PMID: 19079596]
 67. Cheunsuang O, Morris R. Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia* 2005; 52:228-33. [PMID: 15968634]
 68. Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res* 2009; 49:115-26. [PMID: 18952118]
 69. Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano F, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerised analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res* 2009; 49:636-46.
 70. Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp Neurol* 1988; 102:92-101. [PMID: 3181354]
 71. Wang S, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:537-45. [PMID: 10670486]
 72. Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sellés-Navarro I, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience* 2002; 109:157-68. [PMID: 11784707]
 73. Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Mayor S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Exp Eye Res* 2002; 74:181-9. [PMID: 11950228]
 74. Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Soro-Martínez MI, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Time course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intraorbital optic nerve transection or crush: A comparative study. *Vision Res* 2009; 49:2808-25. [PMID: 19715716]
 75. Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y. Optic Nerve and Peripapillary Choroidal Microvasculature of the Rat Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:3084-90. [PMID: 10586928]
 76. Morrison JC, Johnson EC, Cepurna WO, Funk RWH. Microvasculature of the Rat Optic Nerve Head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1702-9. [PMID: 10393039]
 77. Fritsch B. Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Methods* 1993; 50:95-103. [PMID: 7506342]
 78. Wood JN, Anderton BH. Monoclonal antibodies to mammalian neurofilaments. *Biosci Rep* 1981; 1:263-8. [PMID: 7028152]
 79. Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, Green PJ, Tomlinson BE, Ulrich J, Wood JN, Kahn J. Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature* 1982; 298:84-6. [PMID: 6178036]
 80. Balkema GW, Dräger UC. Light-dependent antibody labelling of photoreceptors. *Nature* 1985; 316:630-3. [PMID: 2412124]
 81. Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Pérez MP, Thanos S, Aguayo AJ. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 1987; 7:2894-09. [PMID: 3625278]
 82. Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 1988; 8:265-80. [PMID: 2448429]
 83. Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport* 1996; 7:1995-9. [PMID: 8905711]
 84. Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol* 1998; 392:58-77. [PMID: 9482233]
 85. Wang S, Villegas-Pérez MP, Holmes T, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Hurtado-Montalbán N, Lund RD. Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr Eye Res* 2003; 27:183-96. [PMID: 14562184]

86. Marco-Gomariz MA, Hurtado-Montalbán N, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP. Phototoxic induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J Comp Neurol* 2006; 498:163-79. [PMID: 16856141]
87. Drager UC, Hofbauer A. Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina. *Nature* 1984; 309:624-6. [PMID: 6203041]
88. Dieterich DC, Trivedi N, Engelmann R, Gundelfinger ED, Gordon-Weeks PR, Kreutz MR. Partial regeneration and long-term survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression, phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins. *Eur J Neurosci* 2002; 15:1433-43. [PMID: 12028353]
89. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 1997; 64:85-96. [PMID: 9093024]
90. Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res* 1995; 61:379-82. [PMID: 7556500]
91. Fitzgibbon T, Reese BE. Organization of retinal ganglion cell axons in the optic fiber layer and nerve of fetal ferrets. *Vis Neurosci* 1996; 13:847-61. [PMID: 8903028]a
92. Fitzgibbon T, Taylor SF. Retinotopy of the human retinal nerve fibre layer and optic nerve head. *J Comp Neurol* 1996; 375:238-51. [PMID: 8915828]b
93. Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 1993; 24:23-36. [PMID: 8419522]
94. Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: A quantitative in vivo study. *Exp Eye Res* 2009; 89:32-41. [PMID: 19268467]a
95. He Z, Bui BV, Vingrys AJ. The rate of functional recovery from acute IOP elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:4872-80. [PMID: 17065501]
96. Kong YX, Crowston J, Vingrys AJ, Trounce IA, Bui BV. Functional Changes in the Retina During and Following Acute Intraocular Pressure Elevation in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:5732-40. [PMID: 19643960]
97. Pinilla I, Cuenca N, Salinas-Navarro M, Fernández-Sánchez L, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Changes in the outer retina after acute increase of the intraocular pressure in adult mice. ARVO Annual Meeting; 2008 April 27-May 1; Fort Lauderdale (FL).
98. Frishman LJ, Shen FF, Du L, Robson JG, Harwerth RS, Smith EL 3rd, Carter-Dawson L, Crawford ML. The scotopic electroretinogram of macaque after retinal ganglion cell loss from experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:125-41. [PMID: 8550316]
99. Li B, Barnes GE, Holt WF. The decline of the photopic negative response (PhNR) in the rat after optic nerve transection. *Doc Ophthalmol* 2005; 111:23-31. [PMID: 16502304]
100. Li RS, Tay DK, Chan HH, So KF. Changes of retinal functions following the induction of ocular hypertension in rats using argon laser photocoagulation. *Clin Experiment Ophthalmol* 2006; 34:575-83. [PMID: 16925706]
101. Bui BV, Edmunds B, Cioffi GA, Fortune B. The gradient of retinal functional changes during acute intraocular pressure elevation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:202-13. [PMID: 15623775]
102. Bellezza AJ, Hart RT, Burgoyne CF. The optic nerve head as a biomechanical structure: initial finite element modeling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2991-3000. [PMID: 10967056]
103. Greene PR. Mechanical considerations in myopia: relative effects of accommodation, convergence, intraocular pressure, and the extraocular muscles. *Am J Optom Physiol Opt* 1980; 57:902-14. [PMID: 7223834]
104. Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:635-49. [PMID: 6164357]
105. Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Kriegelstein GK, Serra LM, Renard JP, Stefánsson E. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21:359-93. [PMID: 12150988]
106. Costa VP, Arcieri ES, Harris A. Blood pressure and glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2009; 93:1276-82. [PMID: 19336425]
107. Costa VP, Harris A, Stefánsson E, Flammer J, Kriegelstein GK, Orzalesi N, Heijl A, Renard JP, Serra LM. The effects of antiglaucoma and systemic medications on ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22:769-805. [PMID: 14575724]
108. Hernandez MR, Miao H, Lukas T. Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Prog Brain Res* 2008; 173:353-73. [PMID: 18929121]

The print version of this article was created on 2 December 2009. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.

12. ANEXO IV

12. ANEXO IV

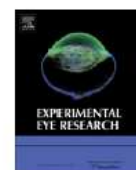
Experimental Eye Research 90 (2010) 168–183



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer



Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration

Manuel Salinas-Navarro, Luis Alarcón-Martínez, Francisco J. Valiente-Soriano, Manuel Jiménez-López, Sergio Mayor-Torroglosa, Marcelino Avilés-Trigueros, María Paz Villegas-Pérez, Manuel Vidal-Sanz*

Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Campus Universitario de Espinardo, Universidad de Murcia, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2009

Accepted in revised form

8 October 2009

Available online 14 October 2009

Keywords:

ocular hypertension

adult albino rat retinal ganglion cells

retrograde axonal transport

fluorogold

dextran tetramethylrhodamine

Bm3a

RT97

fluorescent tracers

phosphorylated neurofilament heavy chain

neuronal degeneration

ABSTRACT

Ocular hypertension (OHT) is the main risk factor of glaucoma, a neuropathy leading to blindness. Here we have investigated the effects of laser photocoagulation (LP)-induced OHT, on the survival and retrograde axonal transport (RAT) of adult rat retinal ganglion cells (RGC) from 1 to 12 wks. Active RAT was examined with fluorogold (FG) applied to both superior colliculi (SCI) 1 wk before processing and passive axonal diffusion with dextran tetramethylrhodamine (DTMR) applied to the optic nerve (ON) 2 d prior to sacrifice. Surviving RGCs were identified with FG applied 1 wk pre-LP or by Bm3a immunodetection. The ON and retinal nerve fiber layer were examined by RT97-neurofibrillar staining. RGCs were counted automatically and color-coded density maps were generated. OHT retinas showed absence of FG⁺ or DTMR⁺RGCs in focal, pie-shaped and diffuse regions of the retina which, by two weeks, amounted to, approximately, an 80% of RGC loss without further increase. At this time, there was a discrepancy between the total number of surviving FG-prelabelled RGCs and of DTMR⁺RGCs, suggesting that a large proportion of RGCs had their RAT impaired. This was further confirmed identifying surviving RGCs by their Bm3a expression. From 3 weeks onwards, there was a close correspondence of DTMR⁺RGCs and FG⁺RGCs in the same retinal regions, suggesting axonal constriction at the ON head. Neurofibrillar staining revealed, in ONs, focal degeneration of axonal bundles and, in the retinal areas lacking backlabeled RGCs, aberrant staining of RT97 characteristic of axotomy. LP-induced OHT results in a crush-like injury to ON axons leading to the anterograde and protracted retrograde degeneration of the intraocular axons and RGCs.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Retinal ganglion cells (RGCs) are the innermost layer of neurons in the retina whose axons converge radially towards the optic disc where they form the optic nerve (ON) which conveys visual information gathered in the retina to the subcortical retinorecipient target regions in the brain. In rats the superior colliculus (SC) receives axons from 98% of the RGC population (Salinas-Navarro et al., 2009a, b). RGC axons leaving the retina are organized retinotopically with respect to their retinal quadrant and centropertipheral position (Guillery et al., 1995; Fitzgibbon and Taylor, 1996; Jeffery, 2001), so that fibers carrying the information from different eccentricities are mixed within a wedge, extending from the periphery to the centre of the nerve (Fitzgibbon and Taylor, 1996), but this topographic organization may not be completely

maintained as they travel towards the chiasm (Guillery et al., 1995; Jeffery, 2001; Jeffery et al., 2008). One human disease that characteristically affects this neuronal population is glaucoma, a chronic neurodegenerative disease that affects RGCs and their axons, provokes optic disc changes and leads to visual field losses that may progress to complete blindness. Elevation of the intraocular pressure (IOP) is one of the most important risk factors associated with glaucoma in humans (Nouri-Mahdavi et al., 2004), and yet the only variable for which a number of medical and surgical treatments are available to control or slow down disease progression (Morrison et al., 2005, 2008).

To further study elevated IOP-induced retinal damage we have used one model of ocular hypertension (OHT), based on laser photocoagulation (LP) of the trabecular meshwork and perilimbal and episcleral veins, originally described to induce OHT in monkey (Quigley and Hohman, 1983) and later modified for the rat (WoldeMussie et al., 2001, 2004; Levkovitch-Verbin et al., 2002). These models do not fully mimic the human glaucomatous optic neuropathy, but are useful to understand the pathophysiology

* Corresponding author. Tel.: +34 868 88 3961; fax: +34 868 88 3962.
E-mail address: ofmmv01@um.es (M. Vidal-Sanz).

involved in OHT-induced retinal damage (for review see; Morrison et al., 2005, 2008), as well as to test for neuroprotective substances (WoldeMussie et al., 2001; Pang et al., 2005; Zhou et al., 2005) and can be used to investigate RGC responses to OHT within a relative short period of time in the albino rat, an available laboratory animal for which there are few transgenic animals in which to study neurodegenerative diseases. Injured RGCs are known to undergo early functional deficits (Schlamp et al., 2001; Alarcón-Martínez et al., in press), including alterations in their axoplasmic flow properties (McKerracher et al., 1990a, 1990b; Quigley and Anderson, 1976, 1977; Lafuente López-Herrera et al., 2002), in several metabolic functions (Nash and Osborne, 1999; Schlamp et al., 2001; Chidlow et al., 2005; Parrilla-Reverter et al., 2009) and in the regulation of a substantial number of genes (Agudo et al., 2008; 2009), including the downregulation of *Brn3a* (Nadal-Nicolás et al., 2009) shortly before they die.

Previous work in rats (WoldeMussie et al., 2001, 2004; Levkovitch-Verbin et al., 2002; Danias et al., 2006) and pigmented mice (Danias et al., 2003; Jakobs et al., 2005; Filippopoulos et al., 2006; Schlamp et al., 2006; Howell et al., 2007; Buckingham et al., 2008; Soto et al., 2008) has provided important information regarding the effects of OHT in the retina of these animals. Using retrogradely transported and diffusing neuronal tracers and molecular markers to identify RGCs and their axons, as well as a recently developed technology to image their distribution within the retina and to count the total population of RGCs (Salinas-Navarro et al., 2009a,b; Nadal-Nicolás et al., 2009; Parrilla-Reverter et al., in press) we have further investigated OHT-induced damage in the Sprague Dawley rat retina and addressed the following questions: i) Does increased IOP result in retinal damage; ii) Is OHT-induced retinal damage a progressive event; iii) Does the lack of labeled RGCs represent an impairment of retrograde axonal transport (RAT) and/or an actual loss of RGCs; iv) Is the lack of retrograde labeling due to a functional deficit and/or to a mechanical compression of the RGCs axons at the level of the ON head; and; v) Do the degenerative events in the RGC layer mimic an axotomy-like type of insult. Our first group of experiments shows that increased IOP results in large areas of the retina lacking backlabeled RGCs from the SCi and in anterograde axonal degeneration of sectors within their optic nerves. A second group established that lack of RAT progresses between 1 and 2, but not between 2 and 12 weeks post-LP. While lack of labeled RGCs is mainly due to actual RGC degeneration, at early time periods there is also a substantial proportion of surviving RGCs that have their RAT impaired, as shown by *Brn3a* as well as by RT97 immunofluorescence. The lack of RAT may appear functional at the beginning, within the first two weeks but is shortly followed by an impairment of passive retrograde dye diffusion, implying optic axon compression somewhere near the ON head. This is further evidenced by the neurofibrillar staining of the RGC fiber layer showing characteristic features of crush injury-induced to ON axons (Parrilla-Reverter et al., in press). Short accounts of this work have been published in abstract form (Mayor-Torroglosa et al., 2004; Villegas-Pérez et al., 2005; Vidal-Sanz et al., 2005; Salinas-Navarro et al., 2006).

2. Methods

2.1. Animals and anesthetics

Female adult (180–200 g) albino Sprague–Dawley (SD) rats from the breeding colony of the University of Murcia (Murcia, Spain) were housed in temperature and light controlled rooms with a 12 h light/dark cycle and food and water *ad libitum*. Animal manipulations followed institutional guidelines, Spanish and European Union regulations for the use of animals in research and the ARVO

statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. All surgical manipulations were carried out under general anesthesia; intraperitoneal (i.p.) ketamine (70 mg/kg, Ketalar[®], Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompun[®], Bayer, S.A., Barcelona, Spain). A drop of topical anesthetics (Colircusí anestésico doble[®], Alcón Cusí, S.A., Barcelona, Spain) was instilled on both eyes prior to IOP measurements. During recovery from anesthesia a topical ointment (Tobrex[®], Alcón Cusí, S.A., Barcelona, Spain) was applied to prevent corneal desiccation. Additional measures were taken to minimize discomfort and pain after surgery. For sacrifice an i.p. overdose of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol[®], Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain) was used.

2.2. Induction of OHT

The left eyes were treated on a single session with diode laser burns (Viridis Ophthalmic Photocoagulator-532 nm laser, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France). Laser beam was directly delivered without any lenses and aimed to the trabecular meshwork, the perimlimbar and episcleral veins with modifications of previous methods (WoldeMussie et al., 2001; Levkovitch-Verbin et al., 2002). The spot size, duration and power used were 50–100 μ m, 0.5 s and 0.4 W, respectively. A number of ocular complications such as hyphema and corneal opacities were observed shortly after lasering in a small number of animals and, as described (Levkovitch-Verbin et al., 2002), these resolved within several days in most cases and in those instances in which these did not resolve the animals were discarded.

2.3. Retrograde tracing of RGCs: FG and DTMR

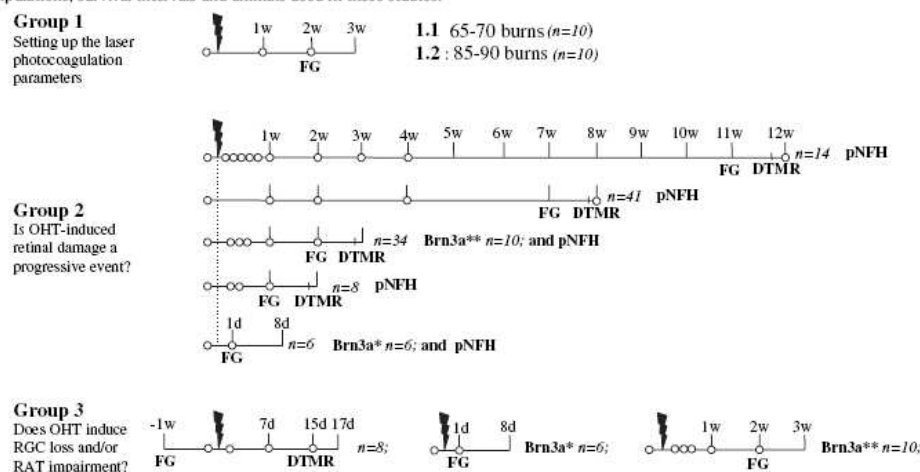
Application of 3% FG (Fluorochrome Inc., Englewood, CO, USA) to the SCi followed described methods (Vidal-Sanz et al., 1988; 1993; 2000; 2001, 2007; Salinas-Navarro et al., 2009a, b). The fluorescent tracer dextran tetramethylrhodamine (DTMR; 3000 MW; Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, USA) was applied intraorbitally 2 days prior to sacrifice as previously described (Sellés-Navarro et al., 1996; Lafuente López-Herrera et al., 2002; Salinas-Navarro et al., 2009a,b). DTMR diffuses passively through the axon towards the cell soma producing an intense labeling in normal (WoldeMussie et al., 2001, 2004; Salinas-Navarro et al., 2009a, b) and OHT eyes (WoldeMussie et al., 2001). Although we do not have total counts for DTMR⁺RGCs, the labeling is efficient enough as to depict the spatial distribution of RGCs along a visual streak in the superior retina, something only observed when practically all RGCs are labeled (see Fig. 3A of Salinas-Navarro et al., 2009a). A summary of the different experimental manipulations, survival intervals and number of animals used to address the main questions posed in this study is provided in Table 1.

2.4. Measurement of IOP

The intraocular pressure (IOP) was measured under anesthesia in both eyes with a tonometer (Tono-Pen[®] XL Reichert[®] Ophthalmic Instruments Depew, NY, USA) (Moore et al., 1993, 1996) prior to, and 24, 48, 72 h and 1, 2 or 4 weeks after LP for groups 2–3 (Table 1), except for animals surviving 12 weeks in which IOP was measured prior to, and at 6, 12, 24, 48 and 72 h, and 1, 2, 3, 4, and 12 weeks after LP (Table 1). At each time point 8–12 consecutive readings from each eye were averaged. IOP was tested at the same time in the morning and right after deep anesthesia to avoid IOP fluctuations due to circadian rhythm (Moore et al., 1996; Krishna et al., 1995; Jia et al., 2000) or to elevation of the IOP itself (Drouyer et al., 2008).

Table 1

Experimental manipulations, survival intervals and animals used in these studies.



The LP parameters resulting in OHT were determined in two subgroups (Group 1). IOP measurements revealed significant IOP increases for the second subgroup only, thus all animals thereafter were treated with 90–95 laser burns. To study if OHT-induced retinal damage progressed with time, several subgroups were analyzed at different survival intervals of 8 d, 2, 3, 8 or 12 w after LP (Group 2). To determine if the absence of FG⁺ RGCs represent loss of RGCs or impairment of their RAT we designed two experiments. In a first one FG was applied to the SCI 1 wk pre-LP whilst DTMR was applied to the ocular stump of the intraorbitally transected ON 15 days post-LP and 2 days prior to sacrifice ($n=8$) (Group 3). In the second, retinas from Group 2 rats, sacrificed at 8* ($n=6$) or 21** ($n=10$) days after LP, were immunoreacted with Brn3a to identify surviving RGCs. To explore whether the lack of retrograde labeling is due to a functional deficit and/or to axonal compression at the ON head, most of the rats sacrificed at 2, 3, 8, or 12 wks had DTMR also applied to the ocular stump of the intraorbitally transected left ON 5 d after FG application and 2 d prior to sacrifice, and the populations of RGCs labeled with these tracers were compared. Finally, to study the degenerative events of the RGC axons associated with OHT, the expression pattern of pNFH was examined in a number of retinas (at least $n=6$ per time point) analyzed between 8 d and 12 wks after LP. Induction of laser photocoagulation is indicated by the black ray, and was always performed at day 0. Open circles indicate time points at which the IOP was measured in both eyes. All retinas were analyzed for fluorogold (FG) tracing by applying this tracer on both superior colliculi, and in many of these RGCs were also backlabeled with DTMR applied to the optic nerve stump, 2 d prior to sacrifice (time points at which these tracers were applied are indicated by FG or DTMR respectively). Study of Brn3a and/or pNFH expression is specified at the right of each of the subgroups. Abbreviations: LP: laser photocoagulation; OHT: ocular hypertension; FG: fluorogold; DTMR: dextran tetramethylrhodamine; pNFH: phosphorylated neurofilament heavy chain; RAT: retrograde axonal transport; d: days; w: weeks.

2.5. Tissue processing: retinal whole-mounts and optic nerve sections

Rats were deeply anesthetized, perfused transcardially through the ascending aorta with saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4) as previously described (Salinas-Navarro et al., 2009a, b). The retinas of rats in which FG and/or DTMR had been applied were photographed shortly after mounting. Brn3a immunoreaction was undertaken in retinas immediately after dissection, then the retinas were mounted and photographed right away. Finally, certain retinas were unmounted, reacted for RT97 immunofluorescence, remounted and photographed again. In 9 rats from group 1, the intraorbital portions of their ONs were dissected, cross sectioned and stained for RT97 and GFAP (see below).

2.6. Immunofluorescence studies

Intraretinal RGC axons were stained in retinal whole-mounts with the monoclonal antibody RT97 against phosphorylated neurofilament heavy chain (pNFH) (Wood and Anderton, 1981; Anderton et al., 1982; Drager and Hofbauer, 1984; Balkema and Drager, 1985) (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), following standard protocols in our laboratory (Wang et al., 2000, 2003; Villegas-Pérez et al., 1996, 1998; Marco-Gomariz et al., 2006; Parrilla-Reverter et al., in press). In brief, retinas were incubated overnight with the primary antibody diluted 1:1000 and primary antibody detection was carried out by 2 h incubation with goat anti-mouse-FITC antibody (F-4018, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) diluted 1:50.

Paraffin microtome 3- μ m thick sagittal sections from group 1 experimental and control ONs were incubated with rabbit anti-gial fibrillary acidic protein polyclonal (GFAP, Dako Z-0334, Glostrup, Denmark) and RT97 antibodies diluted 1:1000 in the same blocking solution. Secondary detection was carried out by 2 h incubation with goat anti-mouse-FITC antibody (F-4018, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) diluted 1:50 and with goat anti-rabbit IgG conjugated to rhodamine (T-6778, Sigma), diluted 1:40 in blocking buffer. Sections were then washed in PBS and covered with antifading mounting media containing 50% glycerol and 0.04% p-phenylenediamine in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9).

Brn3a is a member of the Brn3 family of POU-domain transcription factors, recently shown to be a reliable marker to quantify RGCs under normal conditions and after axotomy (Nadal-Nicolás et al., 2009). In control SD rats, total numbers of Brn3a⁺RGCs ($83,449 \pm 4541$; $n=14$) are comparable to those identified with FG applied to the SCI for 1 wk ($82,818 \pm 3949$; $n=27$), with a small discrepancy of approximately 1–2% of the entire RGC population (Nadal-Nicolás et al., 2009). Interestingly, this small number of RGCs that are Brn3a⁺ but not FG⁺, distributes itself around the region of highest cell density, within the visual streak (Nadal-Nicolás et al., 2009) (see Fig. 9 and below). Retinal whole-mounts were immunoreacted for Brn3a as described (Nadal-Nicolás et al., 2009). In brief, retinas were incubated overnight with goat-antiBrn3a (C-20) antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Inc. Santa Cruz, Ca, USA) diluted 1:100 and primary antibodies were detected with the secondary Alexa Fluor-568 donkey anti-goat IgG (H + L) antibody (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, USA) diluted 1:500 in blocking buffer. Negative controls for immunofluorescence studies consisted

of tissues incubated without primary antibodies, and these showed no specific signal.

2.7. Retinal analysis: RGC counts and isodensity maps

Retinas were examined and photographed in a fluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with an ultraviolet (BP 365/12, LP 397), a rhodamine (BP 546/12, LP 590) and a fluorescein (BP 450/490, LP 515–565) filter to observe the fluorescence of white-gold FG, orange-red of DTMR or red of the Alexa Fluor-568 donkey anti-goat IgG (H + L) antibody, and of the fluorescein conjugated antibodies, respectively. The microscope was equipped with a digital high-resolution camera (ProgRes™ C10, Jenoptik, Jena, Germany), a computer-driven motorized stage (ProScan™ H128 Series, Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK), controlled by image analysis software Image Pro Plus (IPP 5.1 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) with a microscope controller module (Scope-Pro® 5.0 for Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Retinal wholemount reconstructions were photographed following previous methods (Marco-Gomariz et al., 2006; Salinas-Navarro et al., 2009a, b; Nadal-Nicolás et al., 2009; Parrilla-Reverter et al., in press). Individual and reconstructed images were further processed when required using Adobe Photoshop® CS 8.0.1 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA).

To obtain the total number of FG⁺RGCs or Brn3a⁺RGCs in each retina, the individual FG- or Brn3a-fluorescent images taken for each retinal photomontage were processed by a specific cell counting subroutine developed to automatically count labelled RGCs in each frame (Salinas-Navarro et al., 2009a, b; Nadal-Nicolás et al., 2009). To demonstrate the distribution of RGCs over the entire retina, cell densities were calculated and represented as filled contour plot graphs using graphing software (SigmaPlot 9.0 for Windows, Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA) as recently described (Salinas-Navarro et al., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás et al., 2009).

To demonstrate that passive transport of DTMR is possible in RGCs lacking active RAT, in 20 randomly selected frames from 4 control and in 63 randomly selected frames from the regions lacking FG⁺RGCs in 4 experimental retinas (from Group 2 retinas examined 14 d after LP), the numbers of DTMR⁺RGCs and FG⁺RGCs were counted manually over digitized images in a masked fashion.

RT97⁺RGCs were counted in a masked fashion in experimental as well as in naïve retinas from a subgroup of retinas ($n = 10$) that were analyzed 21 days after LP. Digitized images of these retinal wholemount reconstructions were examined at high magnification frame by frame, and with the aid of Photoshop software every RT97⁺RGC was marked with a dot of different color to identify faint or strong RT97⁺RGC. A subroutine developed with the Image-ProPlus image analysis program allowed counting the number of dots (RT97⁺RGCs) as well as its topological distribution within each of the analyzed retinas (Parrilla-Reverter et al., in press). The distribution of RT97⁺RGCs and FG⁺RGCs in these retinas was examined by comparing their respective topological maps.

2.8. Statistics

The initial number of animals prepared for each group or subgroups tended to be similar, but not all animals survived the various procedures. Moreover, some of the left or right retinas were either lost or damaged on the handling procedures or tissue processing, and this would also explain the disparity between the numbers of right and left retinas within the same subgroup of animals. Data is shown as mean $\pm$ SD. Statistical analysis of the differences between groups of retinas or groups of animals was

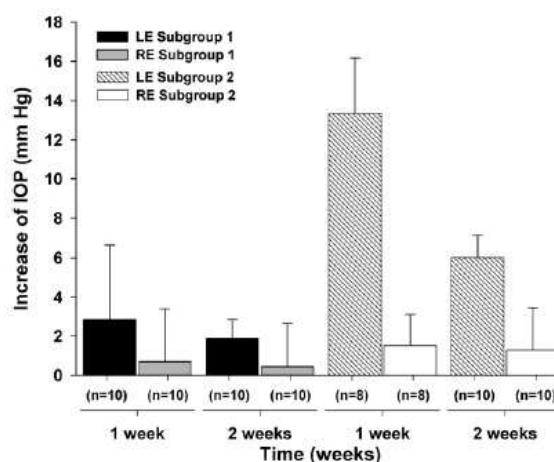


Fig. 1. Intraocular pressure (IOP) measurements in subgroups 1 and 2. Histograms representing mean ($\pm$ SD) intraocular pressure raises for the right (RE) and left (LE) eye at one or two weeks (wks) after laser treatment of the left eye (LE). Subgroup 1 received on average 65–70 laser burnings and the intraocular pressure (IOP) of the LE did not rise significantly at 1 or 2 wks. Subgroup 2 received on average 85–90 burning spots and there was significant elevation of the IOP at 1 and 2 wks.

done using non-parametric ANOVA tests using Statistix® V1.0 for Windows® 95 software: the Kruskal–Wallis test was used to compare more than 2 groups and the Mann–Whitney test was used when comparing two groups only. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. IOP increase results in retinal damage

Our first group consisted of two subgroups receiving 65–70 or 85–90 laser burns, respectively (Table 1). The first did not show IOP increments while the second resulted in consistent IOP increases

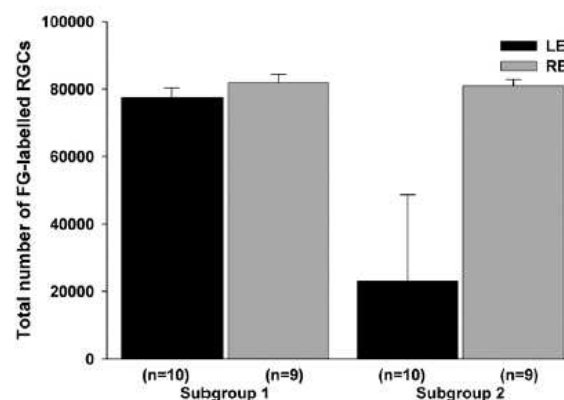


Fig. 2. Populations of Fluorogold-labelled RGCs in subgroups 1 and 2. Histograms representing mean ($\pm$ SD) total numbers of FG-labelled RGCs in the left (LE) and right (RE) retinas three weeks after laser treatment of the LE. To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, Fluorogold was applied to both superior colliculi (SCi) 1 wk prior to animal processing. The total number of FG-labelled RGCs in subgroup 1 was comparable to that found in their fellow retinas (RE) (Mann–Whitney test, $p > 0.05$). Subgroup 2 showed significant elevation of the IOP in their LE and the total numbers of FG-labelled RGCs in the LE represented approximately one fourth of the total number of FG-labelled RGCs in their fellow retinas (RE) (Mann–Whitney test, $p < 0.001$).

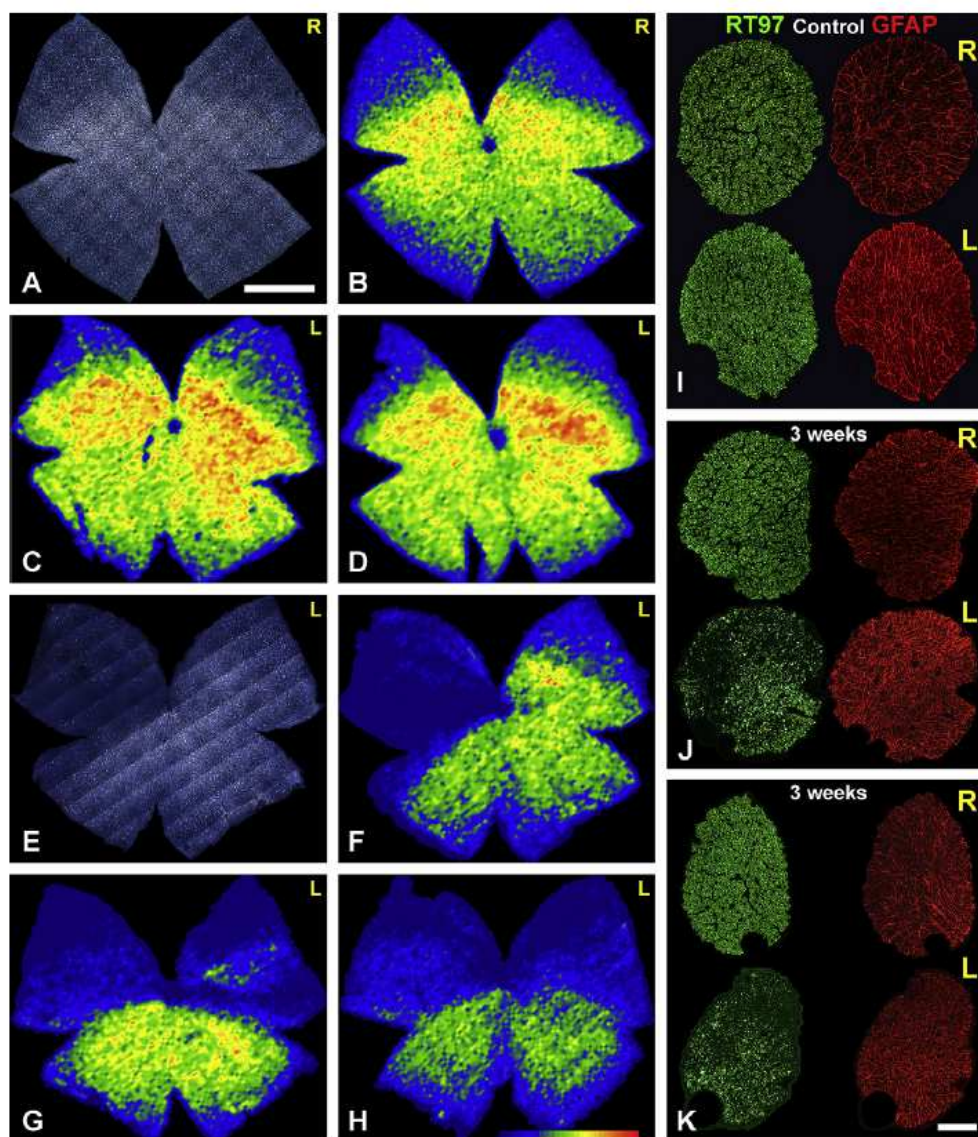


Fig. 3. Retinal distribution of backlabeled RGCs and ON immunohistochemistry in subgroups 1.1 and 1.2. A–H. Retinal whole-mounts of representative rat retinas in group 1 animals 3 weeks after laser injury of the left eye (L), showing RGCs retrogradely labeled with FG and its corresponding filled contour plot pseudo-color isodensity map. A, B. Representative control right retina in subgroup 1 animals. (A) Whole-mount reconstruction prepared with the aid of a motorized stage on a photomicroscope with a high-resolution camera connected to an image analysis system (Image-Pro Plus, V5; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Retinal multi-frame acquisitions were photographed in a raster scan pattern where the frames were captured contiguously side-by-side with no gap or overlap between them. Intensely labeled RGCs are distributed throughout the retina, but present higher densities in a region along the naso-temporal axis on the superior retina. (B) Isodensity map demonstrating the topological distribution of FG-labeled RGCs is represented as a filled contour plot generated by assigning to each one of the 64 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGCs density value within a 28-step color scale range from 0 (dark blue) to 3500 or higher RGCs/mm² (red). C–H. Representative experimental left retinas from subgroup 1.1 (C,D) or 1.2 (E–H). While retinas in subgroup 1.1 showed total numbers and distribution of FG-labeled RGCs (C,D) comparable to their fellow retinas, the experimental (left) retinas in subgroup 1.2 show, 3 weeks after laser injury, absence of FG-labeled RGCs in the superonasal and in part of the inferonasal quadrant of the retina (E), also depicted in the isodensity map (F), or in the superonasal and superotemporal quadrants of the retina as depicted in their isodensity maps (G,H). Figures E,F illustrate a typical example of an experimental retina examined 3 wks after LP of the left eye showing both focal and diffuse loss of RGCs. The superior nasal quadrant exhibits a wedge shaped sector located approximately between 8.30 and 10.00 o'clock orientation which is devoid of FG-RGCs, and this is clearly observed in the pseudo-color isodensity map where the sector acquires a dark blue color all over, implying lack of RGCs. Within the same retina, the superior-temporal quadrant shows the presence of FG-RGCs, which at first glance on the microscope could appear with a normal distribution (Fig. 3E), but the isodensity map reveals the presence of cooler colors, indicating smaller than normal densities of FG-RGCs (Fig. 3F). Indeed, the typical concentration of FG-RGCs that results in the visual streak (as observed in the same figure 3B, D) is largely missing in this quadrant, thus confirming the presence of diffuse loss of RGCs in this region of the retina. For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. Scale bar = 1 mm. I,J,K. Paraffin embedded cross sections from the proximal segments of the optic nerves (ONs) showing RT97 and GFAP immunostaining in right (R) and left (L) ONs in rats from subgroup 1.1 (I) or 1.2 (J,K). Note that RT97 expression depicts labeling of axon bundles with a normal appearance in subgroup 1.1 ONs (I) as well as in the right eyes from subgroup 1.2 (J,K), whereas there are focal areas lacking RT97 immunoreactivity in the left ONs from subgroup 1.2 animals (J,K), which is typical of axotomy-induced anterograde degeneration. The superior aspect of the nerve is on the top. Scale Bar = 100 μm.

1 and 2 wks after LP (Fig. 1). Accordingly, LP-retinas from the first subgroup had total numbers of FG⁺RGCs comparable to those of their fellow retinas (Fig. 2) while LP-retinas from the second showed large areas, wedge-shaped with the vertex towards the optic disc, in which there were few to none FG⁺RGCs (Fig. 3), and the mean total number of FG⁺RGCs in the left retinas represented less than one third of those found in their fellow retinas (Fig. 2). The proximal segments of the ONs were examined for pNFH and GFAP expression and showed a normal appearance in the first subgroup whereas sectorial degeneration of ON fiber bundles and intense GFAP immunofluorescence was seen in the second (Fig. 3).

IOP measurements within each of the animals and subgroups processed at different survival intervals showed some variability among the maximum IOP values registered for the lasered eyes, but overall the results were rather consistent. Individual IOP measurements in the groups sacrificed at 8 d, 2 wks, 17 d, 3 or 8 wks after LP, matched quite closely those registered for the same period of time in the subgroup of animals sacrificed at 12 wks, whose results are shown in detail in Fig. 4.

3.2. Retinal distribution and time course of OHT-induced loss of FG-labelled RGCs

To examine if the numbers of FG-retrogradely labelled RGCs decreased with time, several subgroups were analyzed at increasing survival intervals after LP (Table 1). Consistent with our recent study (Salinas-Navarro et al., 2009a), the right control retinas showed a typical distribution of FG⁺RGCs within the retina and had mean total numbers of FG⁺RGCs that were within the ranges of previously published data (Salinas-Navarro et al., 2009a) (Fig. 5). In contrast, in the LP-retinas there was some variability among individuals of the same subgroup in the total numbers of FG-labelled RGCs (FG⁺RGCs) as well as in the size of areas lacking backlabelled RGCs. Almost all the experimental LP-retinas examined at 8 d and at 2 wks or longer, respectively, revealed large areas

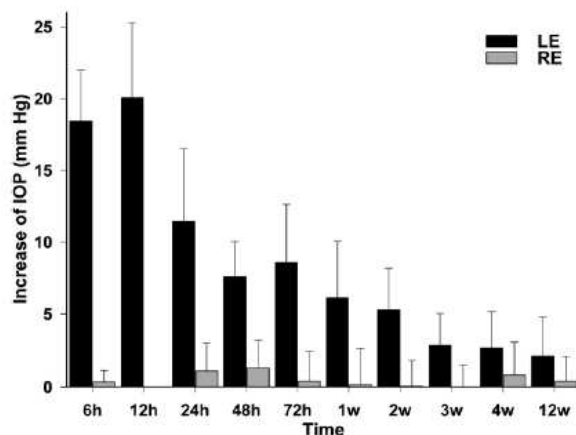


Fig. 4. Intraocular pressure (IOP) measurements. Histograms representing mean ($\pm$ SD) differences between IOP levels measured at each time point and those registered prior to laser, for the right (RE) and left (LE) eye at 6, 12, 24, 48 or 72 h and at 1, 2, 3, 4, or 12 weeks after laser photocoagulation of the trabecular meshwork, perilimbar and episcleral veins of the left eye (LE) with an average of 90–95 laser burning spots. The intraocular pressure (IOP) was measured preferentially in the morning and right after deep anesthesia in both eyes with a tonometer (Tono-Pen XL), and at each time point 8–12 consecutive readings were carried out for each eye and averaged. Within the first 72 h after laser IOP increased between 34 and 125% over baseline with the peak at 12 h. At 1, 2 and 3 weeks the IOP was approximately 35, 30 and 19% over baseline and by 4 and 12 weeks the IOP was approximately 8% over baseline.

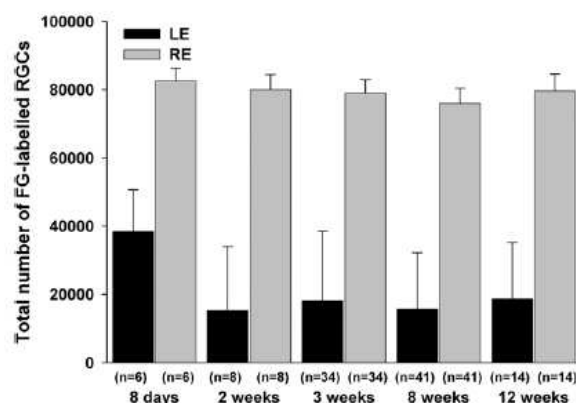


Fig. 5. Progression of retrograde axonal transport impairment 8 days to 12 weeks after laser. Histograms representing mean ($\pm$ SD) total numbers of FG-labelled RGCs in the left (LE) and right (RE) retinas 8 d, 2, 3, 8 or 12 weeks after LP of the LE. To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, Fluorogold was applied to both superior colliculi (SCi) 1 wk prior to animal processing. Retinas were imaged by adjacent, nonoverlapping frames captured in raster pattern. FG-labelled RGCs were counted in each of these frames with an image analysis software. The mean total numbers of FG-labelled RGCs in the fellow retinas (RE) from these subgroups were within range of previously published data (Salinas-Navarro et al., 2009a). However, the LP-retinas had mean total numbers of FG⁺RGCs that were significantly smaller when compared to their fellow untouched retinas (Mann Whitney test, $p \leq 0.001$ for each time point), and represented approximately one fifth of the values in their fellow retinas. The total numbers of FG-labelled RGCs in the LE diminished considerably between 8 days and 2 weeks (Mann Whitney test: $p = 0.02$), but not between 2 wks or longer (Kruskal Wallis test: $p = 0.842$), thus, overall the major lack of FG⁺RGCs occurs between 8 and 14 days after LP, and does not progress beyond 2 wks after laser.

almost devoid of FG⁺RGCs. These areas, which were smaller at 8 d than at 2 wks or longer, adopted the form of a wedge with an apical vertex towards the optic disc, often extended to one or more retinal quadrants and were localized in the superior retina in 95% of the cases. In most OHT retinas the lack of FG⁺RGCs was both focal and diffuse, the isodensity maps constructed for each retina (Fig. 6) revealed that in addition to retinal sectors lacking backlabeled RGCs, there were also retinal areas with lower than normal densities of backlabeled RGCs.

In general LP-retinas had mean total numbers of FG⁺RGCs significantly smaller when compared to their fellow untouched retinas (Mann Whitney test, $p \leq 0.001$ for each subgroup). At 8 d, total numbers of FG⁺RGCs were greater than those at 14 or 21 days (Mann Whitney test, $p < 0.02$ or $p < 0.013$, respectively). The mean total numbers of FG⁺RGCs in LP-retinas sacrificed 2 wks or later were comparable among them (Kruskal–Wallis test, $p = 0.842$), and represented approximately one fifth of the values in their fellow retinas. Thus, overall the lack of retrograde labeling is already present 8 d after LP, the major lack of FG⁺RGCs occurs between 8 and 14 days after LP, but does not progress beyond 2 wks (Fig. 5).

3.3. The absence of retrogradely labeled RGCs is due to RGC loss and to impaired axonal transport

Retinas in which FG was applied 1 wk pre-LP and DTMR 15 days post-LP but 2 d prior to sacrifice, showed DTMR⁺RGCs restricted to the typical above mentioned wedge sectors. When examined for FG⁺RGCs there was a clear mismatch between the large number of surviving FG⁺RGCs and the small number of DTMR⁺RGCs. Detailed quantitative studies were not undertaken in this group of experiments because the presence of abundant microglia labeled with FG (Gómez-Ramírez et al., 1999; Salvador-Silva et al., 2000; Sobrado-

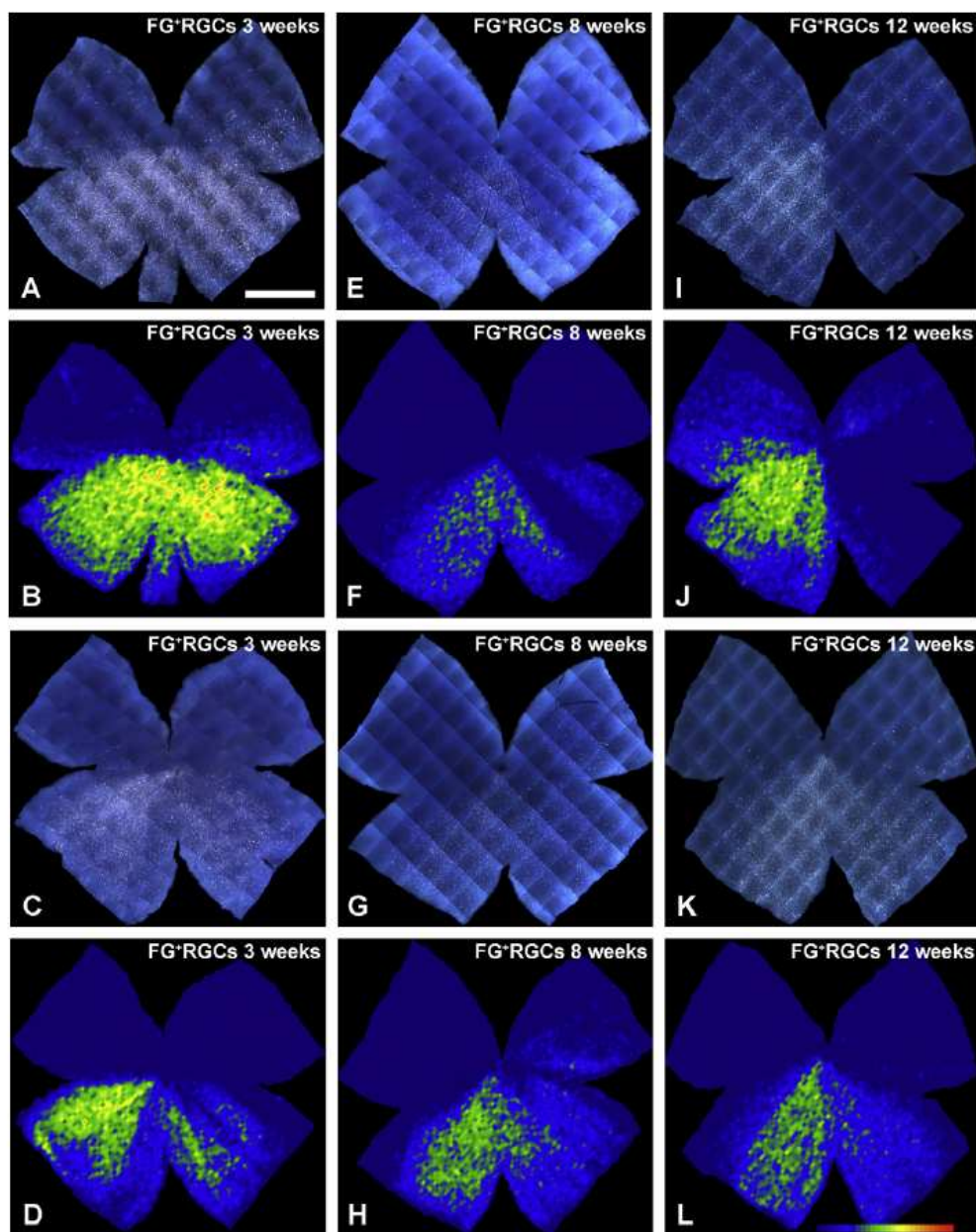


Fig. 6. Topological distribution of FG-labelled RGCs at 3, 8 or 12 wks after lasering. Retinal whole-mounts of representative rat retinas examined 3 (A–D), 8 (E–H) or 12 (I–L) weeks after lasering the left eye. To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, Fluorogold was applied to both superior colliculi (SCi) one week prior to animal processing. Isodensity maps were generated by assigning to each one of the 64 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGCs density value within a 28-step color scale range from 0 (dark blue) to 3500 or higher RGCs/mm² (red). The pictures correspond to two representative retinas analyzed at each time point demonstrating FG⁺RGCs and its corresponding isodensity map, showing absence of FG⁺RGCs in the superior retina (A,B), superior retina and one wedge-sector of the inferotemporal and another small wedge on the inferonasal retina (C,D), in the superior retina and a wedge of the inferonasal retina (E,F), in the superior retina and a large wedge of the inferonasal quadrant (G,H), in the infero- and superotemporal quadrants as well as a wedge of the superonasal quadrant (I,J) and in the superior quadrants and a wedge of the inferonasal and of the inferotemporal quadrants (K,L). Note the absence of FG-backlabeled RGCs preferentially in the superior retina adopting the form of focal as well as diffuse loss as evidenced in the cooler colors of the isodensity maps. For example, in the inferotemporal quadrant of retina shown in G, H or in K, L, there is almost complete absence of FG⁺RGCs in the superior retina but there are FG⁺RGCs in the inferior retina (K), which upon observation of the isodensity map (L) reveal cooler than normal colors for that region (e.g. there are only green and light blues with a lack of yellows) indicating diffuse RGCs loss. For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. Scale bar = 1 mm.

Calvo et al., 2007) and the intense DTMR labelling of the intraretinal axons (Salinas-Navarro et al., 2009a,b) precluded automatic counting of FG⁺RGCs or DTMR⁺RGCs, but it was obvious that the number of surviving FG⁺RGCs, which were scattered throughout the entire retina and not confined to the wedge-sector containing DTMR⁺RGCs, outnumbered DTMR⁺RGCs (Fig. 7). These results indicate that the absence of DTMR⁺RGCs is due in part to a lack of passive diffusion from the ON head back to the cell body and in part to RGC loss.

To discard the possibility that the small numbers of DTMR⁺RGCs observed in the above mentioned experiments did not reflect a lack of passive diffusion but the fact that axons with high IOP are more susceptible to the second axonal injury inflicted to apply DTMR, or that axons were severed or disconnected beyond the point of DTMR application, we also analyzed rats in which FG was applied to the SCI 1 wk prior to sacrifice, the retinas were processed 8 ($n = 6$) or 21 ($n = 10$) days after LP and Brn3a immunohistochemistry allowed to identify, count and map surviving RGCs. Control retinas showed a normal distribution of FG-labeled RGCs throughout the retina with higher densities on the superior retina and a typical horizontally oriented visual streak (Fig. 8). The retinal distribution of Brn3a⁺RGCs paralleled the distribution of the FG⁺RGCs and, as recently described (Nadal-Nicolás et al., 2009) the total numbers of both populations were comparable at each time point for the right control retinas (Mann Whitney test, $p = 0.092$ and $p = 0.1$ for 8 and 21 days, respectively) (Fig. 9). The left retinas examined 8 or 21 days after LP showed Brn3a⁺RGCs that were distributed throughout the retinas, and total numbers of Brn3a⁺RGCs were $72,289 (\pm 5431; n = 6)$ or $30,942 (\pm 20,415; n = 10)$ at 8 or 21 days post-LP, respectively. These total numbers of Brn3a⁺RGCs were greater than those obtained for the FG⁺RGCs at 8 ($38,397 \pm 12,306; n = 6$) (Mann Whitney test, $p = 0.001$) but not at 21 days ($18,040 \pm 21,197; n = 10$) (Mann Whitney test, $p = 0.068$) after LP, respectively (Fig. 9). Thus, in the LP-retinas there was a clear mismatch between the number of FG⁺RGCs and the number of Brn3a⁺RGCs. This observation, illustrated in the detailed isodensity maps of representative

animals (Fig. 8), adds evidence to the idea that lack of retrogradely labeled RGCs is not only due to RGC loss but also to an impairment of the axonal transport. In conclusion within the first three weeks after LP there is RGC death as evidenced by the decreasing total numbers of Brn3a⁺RGCs between 8 and 21 days (Mann Whitney, $p = 0.0006$), but there is also a compromise in retrograde axonal transport of FG from the SCI back to the RGC somata for many Brn3a⁺RGCs still present in the retina.

3.4. Is axonal transport impairment functional or mechanical?

Most of the rats sacrificed at 2, 3, 8 or 12 wks also had DTMR applied to the ocular stump of the intraorbitally transected left ON 5 d after FG application and 2 d prior to sacrifice. Two weeks after LP the retinas showed the typical pie-shaped areas lacking FG⁺RGCs and most if not all FG⁺RGCs were also doubly labeled with DTMR. However, the retinal areas with DTMR⁺RGCs were larger than those with FG⁺RGCs (Fig. 10). In fellow control retinas ($n = 4$) a total of 5012 DTMR⁺RGCs were counted, and approximately 99% of these were also FG⁺, whereas in the LP-retinas ($n = 4$) a total of 2401 DTMR⁺RGCs were counted, and only 14% of these were also FG⁺ (Fig. 10). These results show that passive transport of DTMR was possible in a larger population of RGCs than that still conserving active retrograde transport from the SCI (Fig. 10), thus implying functional impairment of RAT in surviving RGCs. By three or more weeks after LP, there was a very good correlation between the retinal sectors lacking FG⁺RGCs and DTMR⁺RGCs, and vice versa (Fig. 11), suggesting that the lack of labeled RGCs is due not only to an impairment of RAT from the SCI but also to an actual lack of passive diffusion from the ON head (Fig. 11).

3.5. Nature of the OHT-induced retinal insult

The degenerative features observed in the optic nerves of group 1 (Fig. 3) were compatible with focal injury to bundles of ON axons

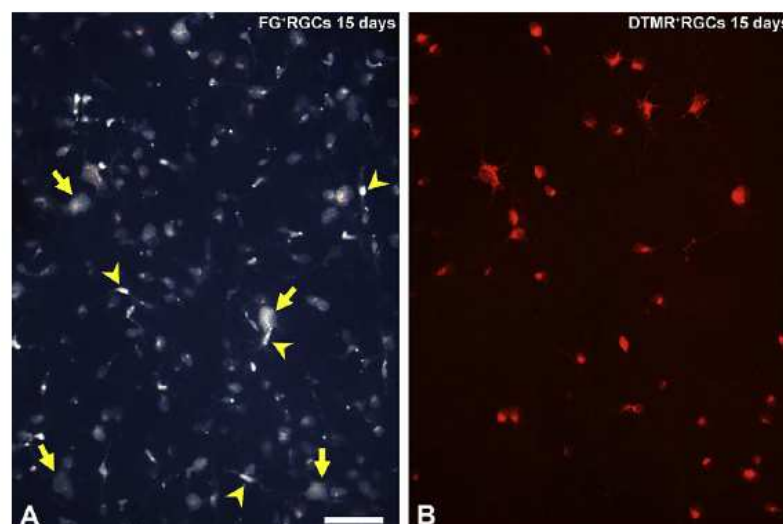


Fig. 7. Lack of RGCs labelled with a diffusible tracer does not imply RGC loss. (A,B) Photomicrographs from a representative retina doubly labeled with FG applied to both SCI 1 wk prior to laser injury of the left eye and with DTMR applied 15 days after laser injury but 2 days prior to animal processing showing surviving RGCs labelled with FG (A), some of which are also doubly labelled with DTMR (B), but there are many FG⁺RGCs that were not doubly labelled with DTMR (arrows) (A). In these experiments DTMR⁺RGCs were restricted to a typical wedge-sector of the retina, while FG⁺RGCs were scattered throughout the retina, thus exhibiting a clear mismatch between the numbers of surviving FG⁺RGCs and the numbers of DTMR⁺RGCs. In addition to FG⁺RGCs there are many FG-labelled microglial cells (arrowheads), a typical finding in experiments in which FG-pre-labelled RGCs degenerate and debris are taken up by microglia becoming transcellularly labelled (Thanos and Vanselow, 1989; Peinado-Ramón et al., 1996; Salvador-Silva et al., 2000; Sobrado-Calvo et al., 2007). These findings document that early after laser injury there were many surviving RGCs (FG⁺RGCs) incapable of becoming passively labelled with DTMR applied to the ON head. Scale bar = 50 μ m.

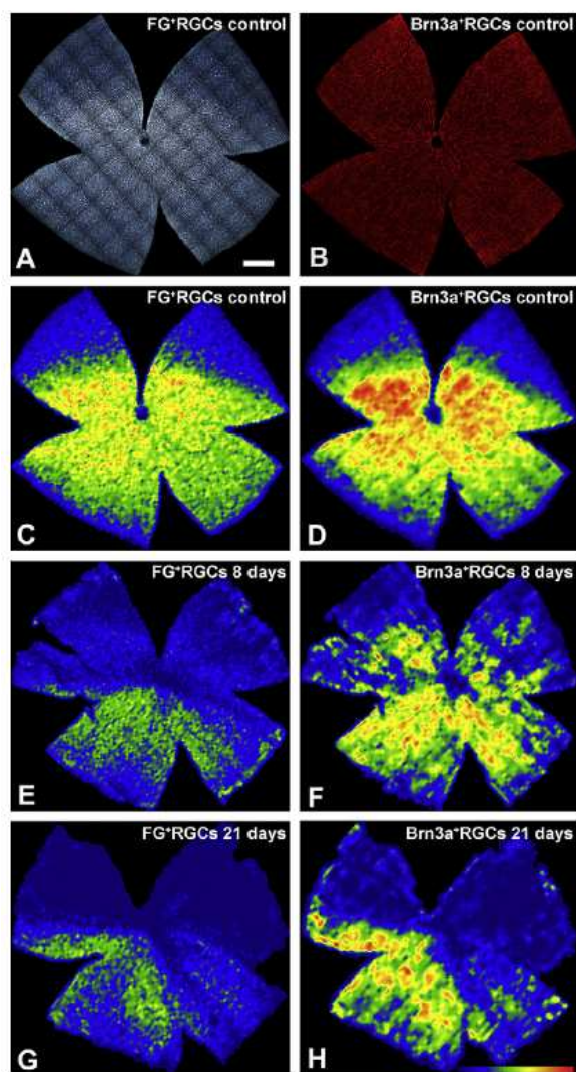


Fig. 8. Absence of backlabeled RGCs is due to axonal transport impairment and to RGC loss. A–H. Representative examples showing whole-mounts of a representative control retina (A–D) labeled with fluorogold (FG) (A) and its isodensity map (C), that was also immunolabeled with Brn3a (B) to identify surviving RGCs and its corresponding isodensity map (D). To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, Fluorogold was applied to both superior colliculi (SCI) 1 wk prior to sacrifice. To identify surviving RGCs, retinas were processed for Brn3a immunohistochemistry. Note intensely labeled RGCs distributed throughout the entire control retina, with the typical high-density region along a naso-temporal streak in the superior retina, which is clearly observed in the isodensity maps of FG⁺RGCs (C) and Brn3a⁺RGCs (D). E–H. Representative examples of experimental retinas at 8 (E,F) or 21 (G,H) days after laser injury, showing the isodensity maps of FG⁺RGCs (E,G) or Brn3a⁺RGCs (F,H). Both experimental retinas show less numbers of FG⁺RGCs than in the control retina (C), but there were more FG⁺RGCs at 8 (E) than at 21 (G) days. Moreover, the population of Brn3a⁺RGCs was greater than that of FG⁺RGCs at 8 days after LP indicating that already within the first week after laser injury there is a compromise in retrograde axonal transport and demonstrating that the lack of retrograde labeling in the retina is due not only to RGC degeneration but also to an impairment of the axoplasmic flow. Isodensity maps were generated by assigning to each one of the 64 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGCs density value within a 28-step color scale range from 0 (dark blue) to 3500 or higher RGCs/mm² (red). For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. Scale bar = 1 mm.

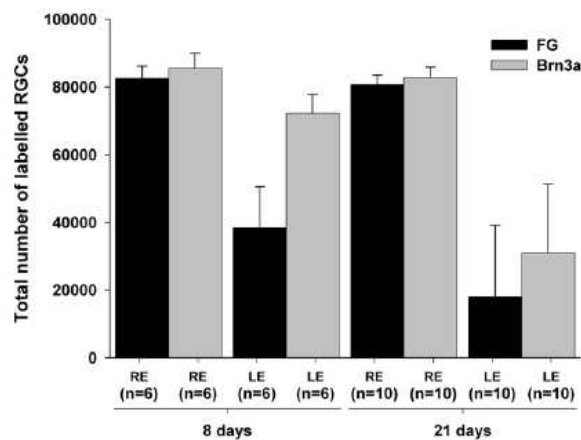


Fig. 9. Total numbers of FG⁺RGCs or Brn3a⁺RGCs 8 or 21 days after laser injury. Histograms representing mean (±SD) total numbers of Fluorogold (FG)- or Brn3a-labeled RGCs in the left (LE) and right (RE) retinas 8 or 21 days after laser injury. To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, Fluorogold was applied to both superior colliculi (SCI) 1 wk prior to sacrifice, while surviving RGCs were identified with Brn3a immunohistochemistry. Retinas were imaged by adjacent, nonoverlapping frames captured in raster pattern. FG- or Brn3a-labeled RGCs were counted in each of these frames with image analysis software. The total numbers of FG⁺RGCs or Brn3a⁺RGCs in the RE of the retinas examined at 8 or 21 days were comparable. The total numbers of FG⁺RGCs in the LE represented 47% and 22% of the total numbers of FG⁺RGCs found in their fellow retinas at corresponding time intervals, respectively. The total numbers of Brn3a⁺RGCs in the LE represented 85% and 37% of the total numbers of Brn3a⁺RGCs found in their fellow retinas at corresponding time intervals, documenting that the population of surviving RGCs (Brn3a⁺RGCs) is larger than the population of RGCs retrogradely labeled with FG at 8 days but not at 21 days. Thus, the lack of retrograde labeling is not only due to RGC degeneration but also to impairment of retrograde axonal transport in a large proportion of surviving RGCs.

and this prompted examination of the nerve fiber layer in retinas from animals processed between 8 d and 21 wks after LP. The control retinas showed typical RT97 axonal staining confined to the most distal portion, within the middle and central retina where they group into bundles and converge in the optic disk. These axons are uniformly labelled and their morphology is rectilinear, very rarely an axon was stained to the retinal periphery and pNFH expression was very seldom observed in the soma or dendrites of an RGC (Fig. 12). LP-retinas showed, mainly in retinal sectors lacking backlabeled RGCs, abnormal RT97 staining within the intra-retinal aspect of the axon and in cell bodies and dendrites of some RGCs. At 8 d there were no noticeable changes on pNFH expression (Fig. 12) except for the staining of RGC axons in their most proximal portion, which was evident in the retinal periphery. Two wks after LP the retinal periphery showed some RGC axons with a varicose morphology and bead-like structures highly RT97⁺. Moreover, some RGC bodies and their proximal dendrites also appeared RT97⁺. At 21 and 30 days post-LP changes in RT97 staining appeared more generalized throughout the retinal sectors lacking FG⁺RGCs, and within the midperipheral retina numerous cell bodies with various degrees of RT97 staining as well as axons with intra-axonal pNFH accumulations were found (Figs. 12 and 13), but it was very seldom to observe an FG⁺RGC doubly labeled with RT97 or vice versa (Fig. 13). In naïve untouched retinas ($n = 5$) the numbers of RT97⁺RGCs ranged from 0 to 1 with a mean (±SD) of 0.25 ± 0.38 and a total of 2 faintly RT97⁺ cells. In contrast, in retinas examined 21 d post-LP ($n = 10$) the numbers of RT97⁺RGCs ranged from 186 to 1669 with a mean (±SD) of 829 ± 477 and a total of 8291 RT97⁺RGCs, of which 70% were faintly and 30% intensely stained. Although the population of RT97⁺RGCs represented in the best case only 2% of the normal population of RGCs, in naïve retinas overall the

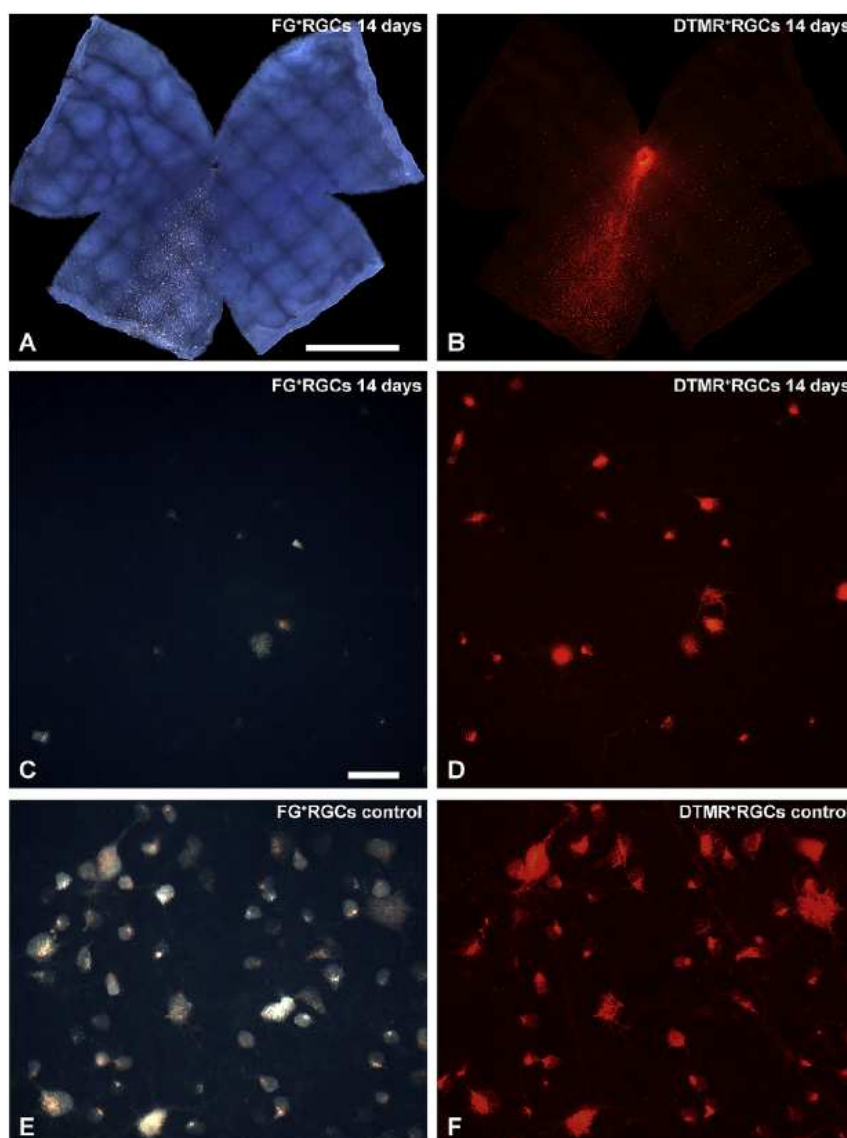


Fig. 10. Axoplasmic flow in OHT retinas: Retrograde transport is halted before passive diffusion. Examples of representative left retinas (A–D) in experimental animals 14 days after laser of the left eye showing retinal ganglion cells (RGCs) labeled with FG and DTMR. FG was applied to both SCI 1 wk prior to sacrifice and DTMR was applied to the ocular stump of the intraorbitally transected left ON 5 days later. For comparison, fluorescence micrographs from a control right retina are also shown (E,F), in these FG was applied to both SCI 1 wk prior to sacrifice and 5 days later DTMR was applied to the ocular stump of the intraorbitally transected right ON. A,B. Whole-mount of a representative experimental left retina doubly labeled with FG (A) and with DTMR (B), illustrating typical examples of the topological distribution of FG⁺RGCs or DTMR⁺RGCs throughout the retina in these experiments. Note the lack of correspondence between areas containing FG⁺RGCs (A) which are restricted to a small wedge located between 6 and 7 o'clock and the DTMR⁺RGCs (B) that distribute in a larger area of the retina. The dorsal pole of the retina is orientated at the 12 o'clock orientation. C,D. Fluorescence micrographs from representative regions of flat-mounted left retina showing a clear mismatch between the numbers of FG⁺RGCs (C) and of DTMR⁺RGCs (D). In other words, the numbers of DTMR-labelled RGCs outnumber the number of FG-labelled RGCs for the same region, only 14% of the DTMR⁺RGCs were also labeled with FG. E,F. Fluorescence micrographs from representative regions of flat-mounted control right retina showing a clear correspondence between the numbers of FG⁺RGCs (E) and of DTMR⁺RGCs (F). Approximately 99% of the DTMR⁺RGCs were also FG⁺. These observations document that in OHT rats, 2 wks after laser, retrograde active transport is impaired before passive diffusion of DTMR from the ON head is halted. Scale bar, A,B = 1 mm, C,D,E,F = 50 μ m.

number of RT97⁺RGCs in LP-retinas showed a tremendous increase when compared to naïve ones. In the 10 retinas in which manual counts of RT97⁺RGCs were performed, comparison of the topological distribution of RT97⁺RGCs or FG⁺RGCs showed that RT97⁺RGCs were distributed mainly in regions lacking FG⁺RGCs (Fig. 13).

Within the wedge sectors lacking backlabeled RGCs there were normally looking RT97 stained axonal bundles coursing to the optic disk (Fig. 12) and diminutions in the density of RT97 labeled axonal bundles in the central and peripheral retina was not obvious until 12 wks, when RT97⁺RGCs were infrequently observed. At this time,

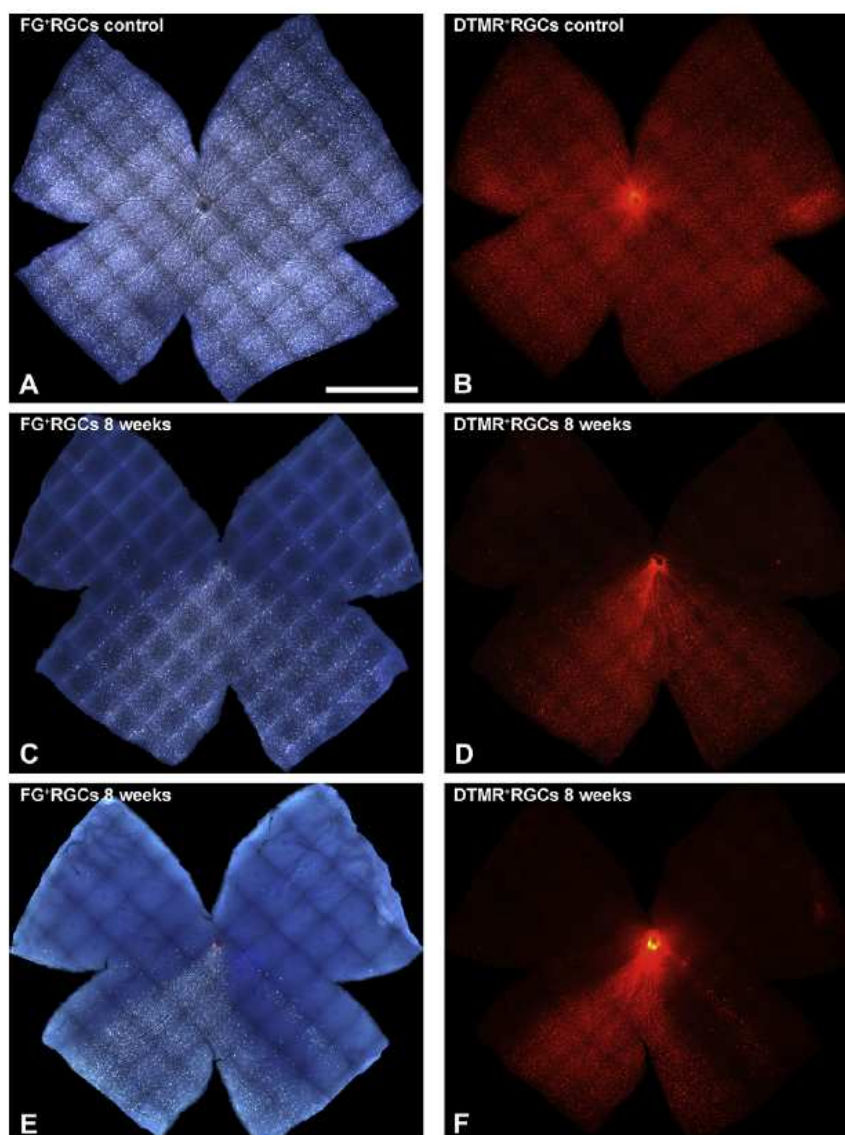


Fig. 11. Topological distribution of FG⁺ or DTMR⁺ RGCs at 8 wks after laser injury. Retinal whole-mounts of representative rat retinas 8 wks after laser injury of the left eye. To identify RGCs capable of retrograde axonal transport Fluorogold was applied to both superior colliculi (SCI) 1 wk prior to animal processing, and to identify RGCs with a competent axon at the level of the optic nerve (ON) head DTMR was applied to the ocular stump of the intraorbitally divided ON 2 days prior to animal processing. A,B. Whole-mount of a representative control right retina showing RGCs, doubly labeled with FG (A) and with DTMR (B) distributed throughout the retina. C–F. Retinal whole-mounts of representative experimental retinas 8 weeks after laser injury illustrating typical examples of the topological distribution of FG⁺ RGCs or DTMR⁺ RGCs throughout these retinas. Note the close correspondence of the areas lacking backlabeled RGCs with both tracers for each illustrated retina. In one case the areas lacking backlabeled RGCs are located in a wedge-shaped sector that almost spans between the 7 and a half and the 3 o'clock position (C,D), while the other example shows a region containing backlabeled RGCs restricted to a small wedge located between the 4 and 4 and a half, and to another sector between the 5 and 8 o'clock position (E,F). These findings document that the lack of labeled RGCs is due not only to an impairment of active retrograde axonal transport from the SCI back to the retina, but also to an actual lack of passive diffusion along the RGC axon from the ON head, and this is consistent with the notion of a mechanical obstruction altering passive diffusion and active retrograde axonal transport. For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. Scale bar = 1 mm.

however, approximately 80% of the RGC population is disconnected from their target region in the brain (Fig. 5), a proportion that may be even larger if one takes into account the population of surviving RGCs in those wedges, implying a slow degeneration of intraretinal axons and making it difficult to predict the survival of RGCs based on the appearance of the RGC fiber layer, as shown after ON

crush-injury (Parrilla-Reverter et al., in press). Overall our findings on the aberrant expression of pNFH within these retinas paralleled the degenerative events in the ganglion cell layer that follow ON axotomy, which are somewhat slower when the injury is due to axonal compression than when is due to axonal transection (Parrilla-Reverter et al., in press).

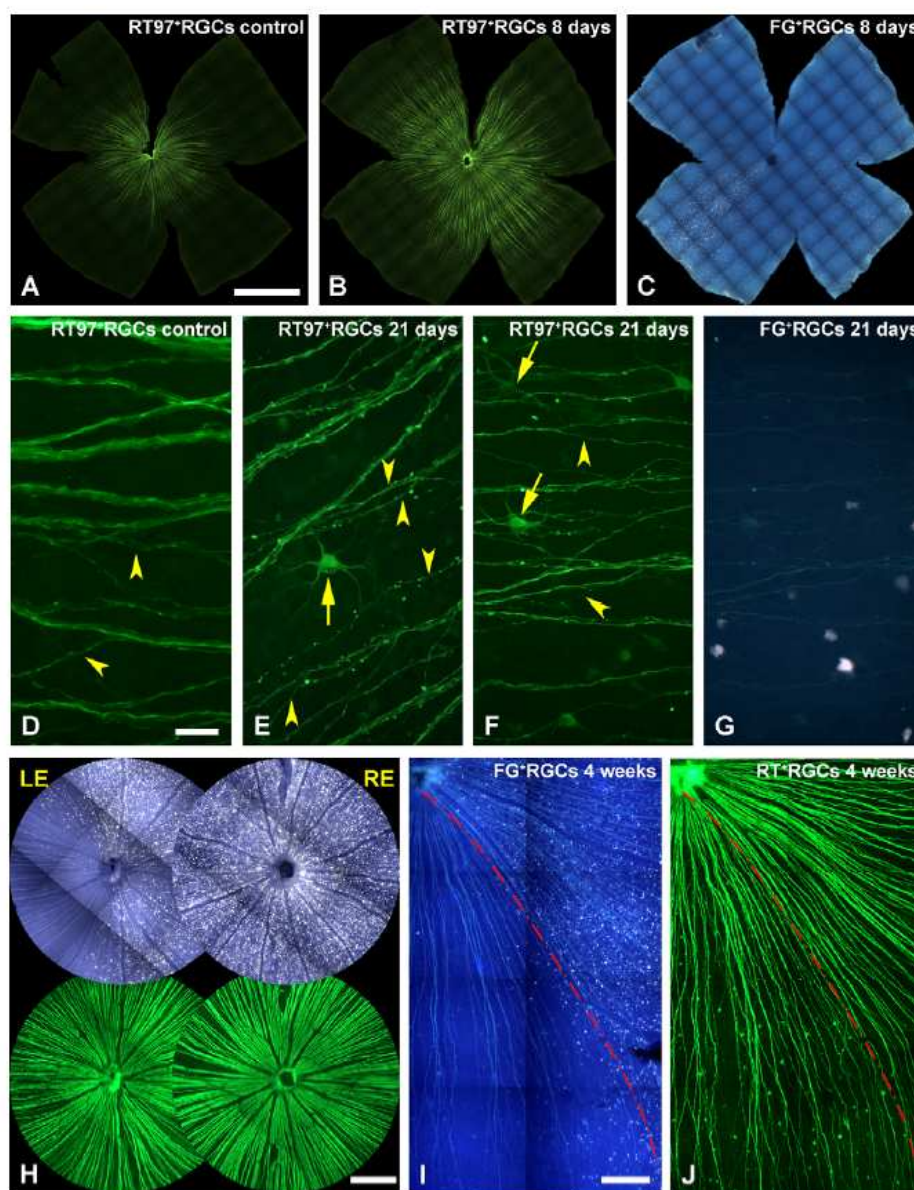


Fig. 12. OHT induces aberrant expression of pNFH, compatible with a crush-like injury to the ON. In a number of retinas processed between 8 d and 12 wks after lasering the nerve fiber layer was stained with RT97 antibodies. A,B,C. Retinal whole-mounts immunostained with RT97 antibodies. A. The expression pattern of RT97 in the control retina is restricted to the middle and central retina where immunostained RGC axons converge towards the optic disk, while in the periphery few axons are RT97-positive. B. In contrast, the expression pattern of RT97 in this retina, 8 days after lasering extends to the central, middle and periphery. C. The distribution of RGCs retrogradely labeled with FG applied to the SCi 1 wk prior to processing, in the same retina shown in B, was restricted to a small triangular sector of the inferonasal quadrant between 7 and 8 o'clock and another small one between 2.30 and 3.30 o'clock on the temporal retina. The dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. D,E,F,G. Fluorescence photomicrographs from representative regions of a control (D) and experimental retinas (E–G), with FG applied to the superior colliculi for 1 wk, and processed at 21 days after lasering for RT97 immunofluorescence. D. In control naïve retinas the RT97 immunoreactivity is restricted to axonal bundles (arrowheads) in the central and middle retina. E. The abnormal pNFH expression depicts RT97-intensely stained RGCs (arrows) as well as RT97 beaded axons (arrowheads). F. Numerous RT97-intensely stained RGCs are present in this region of the retina that observed with the UV filter (G) demonstrates lack of RT97 staining within RGCs retrogradely labeled with FG. H,I,J. Fluorescence photomicrographs from representative regions of experimental retinas, with FG applied to the superior colliculi for 1 wk, and processed 4 weeks after lasering for RT97 immunofluorescence. H. Central regions of the left experimental (LE) and right (RE) control retina (overlapping on the right) of one rat showing FG-labeled RGCs (Top) and RT97 staining of the nerve fiber layer (Bottom). The lasered retina shows a large sector (located between 6 and 11 o'clock) devoid of FG backlabeled RGCs and this same region shows RT97 stained axons with some signs of retrograde axonal degeneration. For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. I,J. Photomicrographs of a region in a representative experimental left retina showing a sector that lacks or has very few FG⁺ RGCs (I). The same region of the retina visualized with RT97 antibody (J) shows typical features of axotomy-induced retrograde axonal degeneration, such as intense abnormal RT97 expression within the RGC bodies and their primary dendrites. Note in the wedge-sector lacking FG-labelled RGCs the normally looking RT97 stained axonal bundles converging toward the optic disk throughout the retina. Dashed line delineates the tentative border of the sector. Scale bars for A,B,C = 1 mm. D,E,F,G = 50 μ m. H = 500 μ m. I,J = 300 μ m.

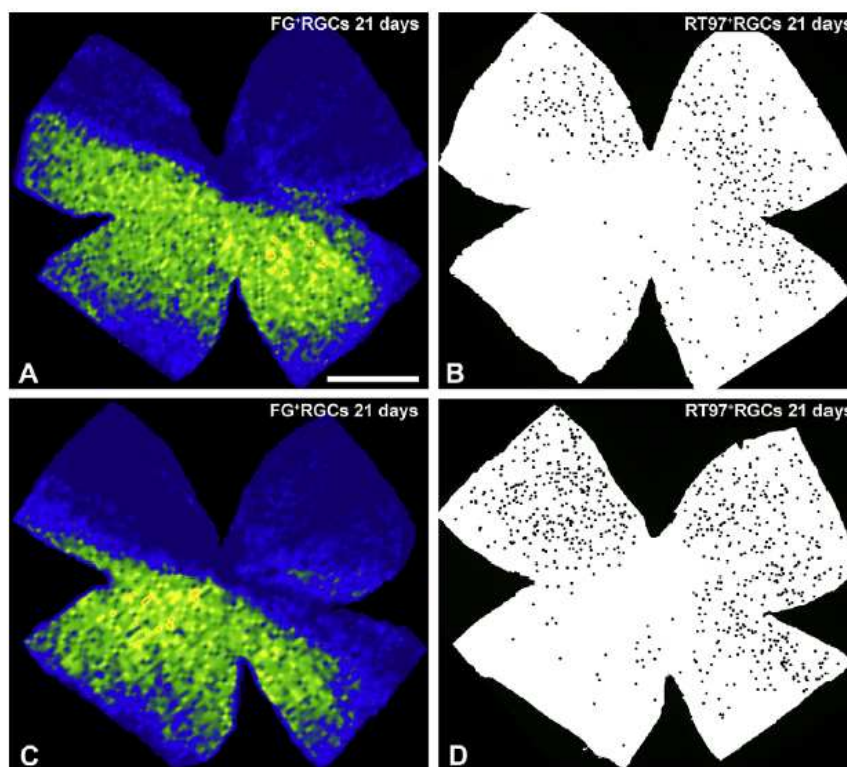


Fig. 13. Different geographical distribution of RT97⁺RGCs and FG⁺RGCs in OHT retinas. Examples of representative left retinas in experimental animals 21 days after laserizing the left eye showing retinal ganglion cells (RGCs) labeled with FG and RT97, illustrating abnormal expression of pNFH mainly confined to sectors of the retina lacking FG backlabelled RGCs, whereas sectors containing FG⁺RGCs presented smaller numbers of RGCs with abnormal RT97 staining. To identify RGCs capable of retrograde axonal transport, Fluorogold was applied to both superior colliculi (SCi) 1 wk prior to sacrifice. Retinal whole-mounts were immunostained with RT97 antibodies to identify RT97⁺RGCs. FG⁺RGC isodensity maps were generated by assigning to each one of the 64 subdivisions of each individual frame a color code according to its density value within a 28-step color scale range from 0 (dark blue) to 3500 or higher RGCs/mm² (red). RT97⁺RGCs are represented as dots over the outline of the retinal wholemount. A,B. Whole-mount of a representative experimental left retina doubly labeled with FG (A) and with RT97 (B), illustrating typical examples of the topological distribution of 52,126 FG⁺RGCs or 395 RT97⁺RGCs throughout the retina in these experiments. Note the lack of correspondence between areas containing FG⁺RGCs (A) which are restricted to a large wedge located between 4 and 10 o'clock and the RT97⁺RGCs (B) that distribute mainly in the opposite area of the retina. C,D. Whole-mount of another representative experimental left retina doubly labeled with FG (C) and with RT97 (D), illustrating the topological distribution of 33,443 FG⁺RGCs or 701 RT97⁺RGCs throughout the retina in these experiments. Note the lack of correspondence between areas containing FG⁺RGCs (C) which are restricted to a large wedge located between 4,30 o'clock and 9,30 o'clock and the RT97⁺RGCs (D) that distribute mainly in the opposite area of the retina. For all retinas the dorsal pole is orientated at the 12 o'clock orientation. Scale bar, A–D = 1 mm.

4. Discussion

4.1. The absence of backlabeled RGCs affects the superior retina and is both focal and diffuse

The IOP elevations of our studies show similarities with those of other rat OHT studies (Johnson et al., 2000; Levkovitch-Verbin et al., 2002; Danias et al., 2006; Morrison et al., 2008) and many of our pathological findings are comparable to those reported in a commonly used pigmented mice model of inherited glaucoma (DBA/2J) (Buckingham et al., 2008; Soto et al., 2008; Schlamp et al., 2006; Jakobs et al., 2005; Howell et al., 2007). Moreover, in agreement with previous studies in OHT rats (Levkovitch-Verbin et al., 2002) and mice (Mabuchi et al., 1994; Schlamp et al., 2006; Soto et al., 2008) we observe variability in the severity of retinal damage, although the numbers of backlabeled RGCs in our study appear smaller than those reported previously (WoldeMussie et al., 2001, 2004; Levkovitch-Verbin et al., 2002), something that could be explained by our IOP profile which peaked during the first 12 h and remained elevated the following week decreasing slowly thereafter (Fig. 4). Alternatively, the disparities could be based on

the counting methods because they sample small areas of the retina (WoldeMussie et al., 2001) or ON (Levkovitch-Verbin et al., 2002) while we provide total RGCs counts. Consistent with OHT studies in rat (Morrison et al., 1997, 2008; WoldeMussie et al., 2001; Levkovitch-Verbin et al., 2002;) and mice (Mabuchi et al., 1994; Danias et al., 2003, 2006; Jakobs et al., 2005; Filippopoulos et al., 2006; Schlamp et al., 2006) our LP-retinas showed retinal sectors lacking FG⁺RGCs mainly in the dorsal retina, and the isodensity maps illustrated not only the location but also the type of RGC loss, which was focal and diffuse (Figs. 3, 6, 8). The exact mechanism responsible for the preferential damage in the superior retina remains unknown but may be related to the basic structure of the rat ON head.

4.2. Lack of backlabelled RGCs represents RGC loss or RAT impairment

The lack of backlabelled RGCs following LP could represent functional impairment of RAT, as shown for other retinal injuries (Lafuente López-Herrera et al., 2002). This was explored in retinas with RGCs labelled with FG before LP and with DTMR 15 days after

LP and 2 d prior to sacrifice, and it was found that not all RGCs surviving OHT maintain a functional axon at the proximal stump of the ON, capable of DTMR diffusion. Alternatively, the smaller numbers of DTMR⁺RGCs than of FG⁺RGCs could be explained because axons subjected to OHT are more susceptible to the additional injury required for DTMR application and/or that ON axons are severed and disconnected beyond the point of DTMR application. The latter possibilities are unlikely because if OHT was to cause a reduction in the capacity of ON axons to uptake DTMR we would expect lower DTMR⁺RGCs within the entire retina and not restricted to the typical wedge sectors. Further evidence for RAT impairment in large numbers of surviving RGCs was obtained in the subgroups examined 8 or 21 days after LP for Brn3a immunofluorescence, a method which obviates the use of tracers and does not require axonal transport. By 8 days after LP the population of Brn3a⁺RGCs almost doubled the population of FG⁺RGCs, indicating that already within the first week there is a compromise in RAT, as shown in OHT mice models (Buckingham et al., 2008).

RAT impairment could also be explained by axonal compression at the ON head. This possibility was examined by comparing, in retinas analyzed at different survival intervals, the distribution of RGCs doubly labeled with FG and DTMR applied 1 wk and 2 d prior to sacrifice, respectively. By two wks the number of RGCs that can be identified with DTMR diffusing along the ON outnumber by three- to four-fold the population of RGCs capable of active RAT from the SCi (Fig. 10). However at later time points (3, 8 and 12 weeks, Fig. 11) there was a remarkable correspondence between retinal sectors conserving functional RAT and the same sectors labeled by DTMR diffusion from the ON head. Thus, it is possible that shortly (2 wks) after LP there is impairment of active RAT of FG but not of a passive DTMR diffusion along the axon, while by 3 or more wks after LP, the lack of backlabeled RGCs reflects both impairment of active retrograde axonal transport and of passive diffusion from the optic nerve head towards the cell body, and this is consistent with the idea of a mechanical blockade for optic axons (Quigley and Anderson, 1977; Quigley et al., 1981, 2000; Pease et al., 2000). We cannot discard, however, the possibility that focal injury to bundles of axons at the ON head could result in physical disruption of the axons and this would also result in lack of RAT.

4.3. OHT results in an axotomy-like injury

To learn about the mechanisms by which OHT results in RGC damage we studied the diminution of backlabeled RGCs with time. Lack of RAT was already present by 8 days, increased between 8 and 2 wks but not between 2 and 12 wks, thus suggesting that whatever damage is inflicted to the retina this must occur within the first 2 wks after LP, the time period during which OHT is highly elevated and reaches its peak. Overall these results agree with previous axotomy-induced RGC loss studies (Villegas-Pérez et al., 1993; Peinado-Ramón et al., 1996; Parrilla-Reverter et al., 2009) in that the greatest loss occurred within the second week after injury. However the lack of RAT did not evolve further after 2 wks and this might be at odds with the typical axotomy-induced progressive loss (Villegas-Pérez et al., 1993), but the variability in OHT-induced retinal damage may have induced varying degrees of injury to axonal bundles and this may imply different starting time points for different axon bundles, thus making unpredictable the course of RGC loss.

Cross sections of the ONs from lasered eyes showed focalized sectors of anterograde degeneration, as shown in ONs of OHT primates (Quigley and Addicks, 1980) and mice (Mabuchi et al., 1994; Schlamp et al., 2006). OHT is evenly distributed over the eye globe, thus one could expect elevated IOP to damage RGCs throughout the retina but this was not the case. Retinal pie-shaped

areas lacking backlabeled RGCs suggests that in our experiments OHT inflicts damage to bundles of optic axons within the proximal portion of the ON, where they are retinotopically organized and grouped together (Guillery et al., 1995; Fitzgibbon and Taylor, 1996; Jeffery, 2001; Jeffery et al., 2008). These wedge-shaped patterns of retinal damage are reminiscent of those observed in other types of inherited or acquired retinal degeneration in which blood vessels ligate bundles of axons producing an intense constriction that leads to axonal transport interruption, loss of retrograde tracing and loss of RGCs (Villegas-Pérez et al., 1996; 1998; Wang et al., 2000, 2003; Marco-Gomariz et al., 2006). We cannot exclude the possibility that IOP levels achieved in the first hours after LP may have also induced ischemic damage to the retina, but this is unlikely because in our experience, the absence of backlabeled RGCs in LP-retinas is different from the characteristic patchy cell loss observed after transient ischemia of the retina (Lafuente et al., 2002a, b; Lafuente López-Herrera et al., 2002; Avilés-Trigueros et al., 2003; Mayor-Torroglosa et al., 2005).

Neurofilament staining in whole-mounts revealed, mainly in wedge sectors lacking backlabeled RGCs, abnormal expression of pNFH typical of ON axotomy (Parrilla-Reverter et al., in press) as reported in retinas of aged mice with inherited glaucoma (Schlamp et al., 2006; Howell et al., 2007; Soto et al., 2008; Buckingham et al., 2008). We have extended these observations by providing quantitative data as well as spatial analysis of the distribution of RT97⁺RGCs. Our quantitative data shows that RT97⁺RGCs in LP-retinas are several orders of magnitude greater than in control naïve retinas, as described after ON injury (Parrilla-Reverter et al., in press), and the different geographical distribution of RT97⁺RGCs and FG⁺RGCs implies that RGCs maintaining their RAT were spared from axonal injury (Figs. 12FG, 13).

4.4. Concluding Remarks

Our present studies show that LP-induced IOP increments that peaked during the first 12 h and remained elevated the following week decreasing slowly thereafter. Such OHT resulted in devastating damage to the RGC population as shown by the presence of large pie-shaped areas with the vertex towards the optic disc, preferentially in the dorsal retina, that lacked retrograde axonal transport in approximately 75–80% of the RGC population and presented loss of RGCs as evidenced with Brn3a immunofluorescence and abnormal pNFH expression, all of which are consistent with the idea of a crush-like injury somewhere near the ON head. It is possible, as has been suggested (Mayor-Torroglosa et al., 2004; Vidal-Sanz et al., 2005; Villegas-Pérez et al., 2005; Salinas-Navarro et al., 2006, in press; Jakobs et al., 2005; Schlamp et al., 2006; Howell et al., 2007; Buckingham et al., 2008; Soto et al., 2008) that initial damage inflicted by OHT involves an axotomy-like compression of the axons at the ON head region that progresses retrogradely involving initial impairment of RAT, impairment of passive axonal diffusion of dyes, and then a protracted degeneration of the intraocular portion of the axons and their parent RGCs. Although the mechanism by which OHT damages the RGC population is not fully understood, the time evolving sequence of events underscores the potential for neuroprotective agents to prevent some of these degenerative processes.

Acknowledgements

The authors would like to thank the technical contribution of I. Cánovas, L. Coll, M.E. Aguilera and J.M. Bernal. Special thanks to Elizabeth WoldeMussie and Larry A. Wheeler for their help in establishing the laser technique, and to Marta Agudo for critical reading of the manuscript and her help with Table 1. The work was

supported by research grants from the Regional Government of Murcia Fundación Séneca 05703/PI/07, 04446/GERM/07; Spanish Ministry of Education and Science SAF-2005-04812, SAF 2009-10385; and Spanish Ministry of Health ISCIII: FIS PIO06/0780 and RD07/0062/0001.

References

- Agudo, M., Pérez-Marín, M.C., Lonngrén, 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. *Mol. Vis.* 14, 1050–1063.
- Agudo, M., Pérez-Marín, M.C., Sobrado-Calvo, P., Lonngrén, U., Salinas-Navarro, M., Cánovas, I., Nadal-Nicolas, F.M., Miralles-Imperial, J., Hallböök, F., Vidal-Sanz, M., 2009. Proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade are immediately up-regulated in the retina after optic nerve transection or optic nerve crush. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 424–431.
- Alarcón-Martínez, L., De la Villa, P., Avilés-Trigueros, M., Blanco, R., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M. Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats. *Mol. Vis.* in press.
- Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., García-Avilés, A., Lafuente, M.P., Rodríguez, M.E., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2003. Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retino-tectal projection: long term neuroprotection with brimonidine. *Exp. Neurol.* 184, 767–777.
- Anderton, B.H., Breinburg, D., Downes, M.J., Green, P.J., Tomlinson, B.E., Ulrich, J., Wood, J.N., Kahn, J., 1982. Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature* 298, 84–86.
- Balkema, G.W., Dräger, U.C., 1985. Light-dependent antibody labelling of photoreceptors. *Nature* 316, 630–633.
- Buckingham, B.P., Inman, D.M., Lambert, W., Oglesby, E., Calkins, D.J., Steele, M.R., Vetter, M.L., Marsh-Armstrong, N., Homer, P.J., 2008. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J. Neurosci.* 28, 2735–2744.
- Chidlow, G., Casson, R., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Osborne, N.N., 2005. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol. Vis.* 11, 387–396.
- Danias, J., Lee, K.C., Zamora, M.F., Chen, B., Shen, F., Filippopoulos, T., Su, Y., Goldblum, D., Podos, S.M., Mittag, T., 2003. Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2NNia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5151–5162.
- Danias, J., Shen, F., Kavalakakis, M., Chen, B., Goldblum, D., Lee, K., Zamora, M.F., Su, Y., Brodie, S.E., Podos, S.M., Mittag, T., 2006. Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp. Eye Res.* 82, 219–228.
- Dräger, U.C., Hofbauer, A., 1984. Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina. *Nature* 309, 624–626.
- Drouyer, E., Dkhissi-Benyahya, O., Chiquet, D., WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wheeler, L.A., Denis, P., Cooper, H.M., 2008. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS ONE* 3, 12.
- Filippopoulos, T., Danias, J., Chen, B., Podos, S.M., Mittag, T.W., 2006. Topographic and morphologic analyses of retinal ganglion cell loss in old DBA/2NNia mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1968–1974.
- Fitzgibbon, T., Taylor, S.F., 1996. Retinotopy of the human retinal nerve fibre layer and optic nerve head. *J. Comp. Neurol.* 375, 238–251.
- Gómez-Ramírez, A.M., Villegas-Pérez, M.P., Miralles de Imperial, J., Salvador-Silva, M., Vidal-Sanz, M., 1999. Effects of intramuscular injection of botulinum toxin and doxorubicin on the survival of abducens motoneurons. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 414–424.
- Guillery, R.W., Mason, C.A., Taylor, J.S.H., 1995. Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J. Neurosci.* 15, 4727–4737.
- Howell, G.R., Libby, R.T., Jakobs, T.C., Smith, R.S., Phalan, F.C., Barter, J.W., Barbay, J.M., Marchant, J.K., Mahesh, N., Porciatti, V., Whitmore, A.V., Masland, R.H., John, S.W., 2007. Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J. Cell. Biol.* 179, 1523–1537.
- Jakobs, T.C., Libby, R.T., Ben, Y., John, S.W., Masland, R.H., 2005. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J. Cell. Biol.* 171, 313–325.
- Jeffery, G., 2001. Architecture of the optic chiasm and the mechanisms that sculpt its development. *Physiol. Rev.* 81, 1393–1414.
- Jeffery, G., Levitt, J.B., Cooper, H.M., 2008. Segregated hemispheric pathways through the optic chiasm distinguish primates from rodents. *Neuroscience* 157, 637–643.
- Jia, L., Cepurna, W.O., Johnson, E.C., Morrison, J.C., 2000. Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1380–1385.
- Johnson, E.C., Deppmeier, L.M., Wentzien, S.K., Hsu, I., Morrison, J.C., 2000. Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 431–442.
- Krishna, R., Mermoud, A., Baerveldt, G., Minckler, D.S., 1995. Circadian rhythm of intraocular pressure: a rat model. *Ophthalmic Res.* 27, 163–167.
- Lafuente, M.P., Villegas-Pérez, M.P., Sellés-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Vidal-Sanz, M., 2002a. Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience* 109, 157–168.
- Lafuente, M.P., Villegas-Pérez, M.P., Mayor, S., Aguilera, M.E., Miralles de Imperial, J., Vidal-Sanz, M., 2002b. Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Exp. Eye Res.* 74, 181–189.
- Lafuente López-Herrera, M.P., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2002. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp. Neurol.* 178, 243–258.
- Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H.A., Martin, K.R., Valenta, D., Baumrind, L.A., Pease, M.E., 2002. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 402–410.
- Mabuchi, F., Aihara, M., Mackey, M.R., Lindsey, J.D., Weinreb, R.N., 1994. Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 4352–4358.
- Marco-Gomáriz, M.A., Hurtado-Montalbán, N., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., Villegas-Pérez, M.P., 2006. Phototoxic-induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J. Comp. Neurol.* 498, 163–179.
- Mayor-Torroglosa, S., Villegas-Pérez, M.P., Salazar, J.J., Ramirez, J.M., Triviño, A., Ramirez, A.J., Coll, L., Vidal-Sanz, M., 2004. Chronic ocular hypertension alters retrograde axoplasmic transport in adult rats. *Ophthalmic Res.* 36 (S1), 19 (Abstract 362).
- Mayor-Torroglosa, S., De la Villa, P., Rodríguez, M.E., Lafuente, M., Avilés-Trigueros, M., García, A., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2005. Ischemia results three months later in altered ERG, degeneration of inner retinal layers and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 10, 3825–3835.
- McKerracher, L., Vidal-Sanz, M., Aguayo, A.J., 1990a. Slow transport rates of cytoskeletal proteins change during regeneration of axotomized retinal neurons in adult rats. *J. Neurosci.* 10, 641–648.
- McKerracher, L., Vidal-Sanz, M., Essagian, C., Aguayo, A.J., 1990b. Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J. Neurosci.* 10, 2834–2841.
- Moore, C.G., Johnson, E.C., Morrison, J.C., 1996. Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat. *Curr. Eye Res.* 15, 185–191.
- Moore, C.G., Milne, S.T., Morrison, J.C., 1993. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the tonopen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 363–369.
- Morrison, J.C., Moore, C.G., Deppmeier, L.M., Gold, B.G., Meshul, C.K., Johnson, E.C., 1997. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp. Eye Res.* 64, 85–96.
- Morrison, J.C., Johnson, E.C., Cepurna, W., Jia, L., 2005. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 217–240.
- Morrison, J.C., Johnson, E., Cepurna, W.O., 2008. Rat models for glaucoma research. *Prog. Brain Res.* 173, 285–301.
- 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 naïve and optic nerve injured retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3860–3868.
- Nash, M.S., Osborne, N.N., 1999. Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1293–1298.
- Nouri-Mahdavi, K., Hoffman, D., Coleman, A.L., Liu, G., Li, G., Gaasterland, D., Caprioli, J., 2004. Predictive factors for glaucomatous visual field progression in the advanced glaucoma intervention study. *Ophthalmology* 111, 1627–1635.
- Pang, I.H., Johnson, E.C., Jia, L., Cepurna, W.O., Shepard, A.R., Hellberg, M.R., Clark, A.F., Morrison, J.C., 2005. Evaluation of inducible nitric oxide synthase in glaucomatous optic neuropathy and pressure-induced optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 1313–1321.
- 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. *Exp. Eye Res.* 89, 32–41. doi:10.1016/j.exer.2009.02.015.
- Parrilla-Reverter, G., Agudo, M., Nadal-Nicolás, F., Alarcón-Martínez, L., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Bernal-Garro, J.M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M. Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vis. Res.* in press. doi:10.1016/j.visres.2009.08.020.
- 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. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 764–774.
- 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. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 489–500.
- Quigley, H., Anderson, D.R., 1976. The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest. Ophthalmol.* 15, 606–616.

- Quigley, H.D., Anderson, D.R., 1977. Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 640–644.
- Quigley, H.A., Addicks, E.M., 1980. Chronic experimental glaucoma in primates. II. Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve head and axonal transport. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 137–152.
- Quigley, H.A., Addicks, E.M., Green, W.R., Maumenee, A.E., 1981. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch. Ophthalmol.* 99, 635–649.
- Quigley, H.A., Hohman, R.M., 1983. Laser energy levels for trabecular meshwork damage in the primate eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 1305–1307.
- Quigley, H.A., McKinnon, S.J., Zack, D.J., Pease, M.E., Kerrigan-Baumrind, L.A., Kerrigan, D.F., Mitchell, R.S., 2000. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3460–3466.
- Salinas-Navarro, M., Triviño, A., Ramírez, A.I., Salazar, J.J., Ramírez, J.M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2006. Long term effects of laser-induced ocular hypertension: retrograde degeneration of retinal ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (E-Abstract 1560).
- 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., 2009a. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vis. Res.* 49, 115–126.
- Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F., Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., Holmes, T., Lund, R.D., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009b. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vis. Res.* 49, 636–646.
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F.J., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M.P., de la Villa, P., Vidal-Sanz, M., 2009. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol. Vis.*, in press.
- Salvador-Silva, M., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., 2000. Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J. Comp. Neurol.* 417, 431–447.
- Sellés-Navarro, I., Villegas-Pérez, M.P., Salvador-Silva, M., Ruiz-Cómez, 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. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2002–2014.
- 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. *J. Comp. Neurol.* 501, 866–878.
- Schlamp, C.L., Johnson, E.C., Li, Y., Morrison, J.C., Nickells, R.W., 2001. Changes in *Thy1* gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* 7, 192–201.
- Schlamp, C.L., Li, Y., Dietz, J.A., Janssen, K.T., Nickells, R.W., 2006. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci.* 7, 66.
- Som, I., Oglesby, E., Buckingham, B.P., Son, J.L., Roberson, E.D., Steele, M.R., Inman, D.M., Vetter, M.L., Homer, P.J., Marsh-Armstrong, N., 2008. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J. Neurosci.* 28, 548–561.
- Thanos, S., Vanselow, J., 1989. Adult retinal ganglion cells retain the ability to regenerate their axons up to several weeks after axotomy. *J. Neurosci. Res.* 22, 144–149.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1988. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp. Neurol.* 102, 92–101.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1993. The use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols* 3, 29–33.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., Sobrado-Calvo, P., Sellés-Navarro, I., Rodríguez, E., Mayor-Torroglosa, S., Villegas-Pérez, M.P., 2000. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox. Res.* 2, 215–227.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M.P., Mayor, S., de Imperial, J.M., Villegas-Pérez, M.P., 2001. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. Neuroprotective effects of two α -2 agonists. *Surv. Ophthalmol.* 45, 261–267.
- Vidal-Sanz, M., Mayor, S., Ramírez, A.I., Triviño, A., Salazar, J.J., Ramírez, J.M., Salinas, M., Villegas-Pérez, M.P., 2005. Laser of the trabecular meshwork and limbal veins in adult rats results in ocular hypertension and retrograde degeneration of retinal ganglion cells. *Ophthalmic Res.* 37, 48 (Abstract).
- Vidal-Sanz, M., De la Villa, P., Avilés-Trigueros, M., Mayor-Torroglosa, S., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Villegas-Pérez, M.P., 2007. Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye* 21, S42–S45.
- 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. *J. Neurobiol.* 24, 23–36.
- Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., 1996. Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport* 7, 1995–1999.
- Villegas-Pérez, M.P., Lawrence, J.M., Vidal-Sanz, M., Lavail, M.M., Lund, R.D., 1998. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J. Comp. Neurol.* 392, 58–77.
- Villegas-Pérez, M.P., Mayor-Torroglosa, S., Salazar, J.J., Ramírez, J.M., Triviño, A., Ramírez, A.I., Salinas, M., Miralles, J., Vidal-Sanz, M., 2005. In adult rats laser of the trabecular meshwork and limbal veins results in ocular hypertension: alteration of retrograde axoplasmic transport. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (E-Abstract-1234).
- Wang, S., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., 2000. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 537–545.
- Wang, S., Villegas-Pérez, M.P., Holmes, T., Lawrence, J.M., Vidal-Sanz, M., Hurtado-Montalban, N., Lund, R.D., 2003. Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr. Eye Res.* 27, 183–196.
- Woldemussie, E., Ruiz, G., Wijono, M., Wheeler, L.A., 2001. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2849–2855.
- Woldemussie, E., Wijono, M., Ruiz, G., 2004. Müller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* 47, 109–119.
- Wood, J.N., Anderton, B.H., 1981. Monoclonal antibodies to mammalian neurofilaments. *Biosci. Rep.* 1, 263–268.
- Zhou, Y., Pemet, V., Hauswirth, W.W., Di Polo, A., 2005. Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma. *Mol. Ther.* 12, 402–412.