



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Caracterización de las Células Ganglionares de la Retina Melanopsínicas y Estudio de la Degeneración y Neuroprotección de las Células Ganglionares de la Retina en el Roedor

Dña. Caridad Galindo Romero
2014



Universidad de Murcia

Laboratorio de Oftalmología Experimental

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica

Facultad de Medicina

Programa de posgrado: “Ciencias de la Visión”

**“CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA
MELANOPSÍNICAS Y ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN Y
NEUROPROTECCIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA
RETINA EN EL ROEDOR”**

Presentada por:

Caridad Galindo Romero

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia

Dirigida por:

Marta Agudo Barriuso, Manuel Vidal Sanz y María Paz Villegas Pérez

2014

“Ver lo que está delante de nuestros ojos

requiere un esfuerzo constante.”

(George Orwell)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN	ix
SUMMARY	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE ILUSTRACIONES (Figuras y Tablas).....	xxiii
ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS	xxix
HALLAZGOS ORIGINALES	xxxii
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	xxxiii
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	3
1.1.1. SISTEMA VISUAL DEL ROEDOR ADULTO	5
1.1.2. ESTRUCTURA DEL GLOBO OCULAR DEL ROEDOR ADULTO.....	5
1.1.3. ESTRUCTURA DE LA RETINA.....	7
1.1.4. LOS FOTORRECEPTORES CLÁSICOS	11
1.1.5. LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	13
1.1.5.1. Proyecciones de las células ganglionares de la retina.....	14
1.1.5.2. Identificación de las células ganglionares de la retina	15
1.1.5.2.1. Identificación morfológica por medio de microscopía óptica	16
1.1.5.2.2. Marcaje retrógrado con trazadores neuronales.....	16
1.1.5.2.3. Inmunodetección.....	17
1.1.5.2.4. Hibridación “in situ”: Gamma-Sinucleína	19
1.1.5.3. Brn3a (POUf1 o Brn3.0).....	19
1.1.5.4. Cuantificación de las células ganglionares de la retina.....	21
1.1.5.5. Distribución espacial de las células ganglionares de la retina	22
1.1.6. LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS.....	24
1.1.6.1. Proyecciones de las células ganglionares de retina melanopsínicas.....	26
1.1.7. LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA.....	27
1.1.7.1. Técnicas de identificación de las células de microglía.....	30

1.2. DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	31
1.2.1. VENTAJAS DE TRABAJAR EN EL SISTEMA VISUAL COMO MODELO DE DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	32
1.2.2. MODELOS DE DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA.....	32
1.2.2.1. Isquemia retiniana.....	33
1.2.2.2. Excitotoxicidad.....	33
1.2.2.3. Neuropatía óptica glaucomatosa	33
1.2.2.4. Lesión del nervio óptico: sección o aplastamiento	34
1.2.3. RESPUESTA CONTRALATERAL DE LA RETINA A LA LESIÓN UNILATERAL.....	36
1.3. NEUROPROTECCIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	37
1.3.1. CONCEPTO, IMPORTANCIA	37
1.3.2. TERAPIAS DE NEUROPROTECCIÓN	37
1.3.3. FACTORES NEUROTRÓFICOS.....	39
1.3.3.1. Factor neurotrófico derivado de cerebro.....	41
2. OBJETIVOS	45
2.1. OBJETIVOS GENERALES.....	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3. MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA	49
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	50
3.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS EN RETINAS DE RATA ADULTA	50
3.2.1. ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE RETINA DE RATÓN ADULTO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF	51
3.3. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA	55
3.3.1. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DESDE EL COLÍCULO SUPERIOR.....	55
3.3.2. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DESDE EL NERVIÓ ÓPTICO	56
3.4. SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO	58
3.5. INYECCIÓN EN CÁMARA VÍTREA	58
3.6. PROCESADO HISTOLÓGICO	60
3.6.1. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES.....	60

3.6.2. DISECCIÓN Y PROCESADO HISTOLÓGICO DE LOS MONTAJES GLOBALES DE RETINA ..	61
3.6.3. ESTUDIO DE LAS SECCIONES TRANSVERSALES DE RETINA	61
3.6.4. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA.....	61
3.6.4.1. Montajes globales de retina	61
3.6.4.2. Secciones transversales de retina	62
3.6.4.3. Anticuerpos y diluciones de trabajo	63
3.7. ESTUDIO MORFOLÓGICO Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	64
3.7.1. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES	64
3.7.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES.....	68
3.7.2.1. Cuantificación de las poblaciones celulares en las retinas de rata	68
3.7.2.1.1. Cuantificación manual de las células ganglionares melanopsínicas en comparación con la población de células ganglionares de retina	68
3.7.2.1.2. Cuantificación automática de las células ganglionares melanopsínicas	68
3.7.2.1.3. Cuantificación automática de células ganglionares de retina inmunodetectadas con Brn3a ..	70
3.7.2.2. Cuantificación de las poblaciones celulares en las retinas de ratón	70
3.7.2.2.1. Cuantificación manual de células ganglionares de secciones transversales de retina	70
3.7.2.2.2. Cuantificación automática de células ganglionares de la retina marcadas con OHSt en retinas control completas montadas a plano.....	71
3.7.2.2.3. Cuantificación semi-automática de células ganglionares marcadas con OHSt en retinas izquierdas y derechas contralaterales en montajes globales de retina después de la sección del nervio óptico.....	71
3.7.2.2.4. Cuantificación automática de células ganglionares de la retina de ratón inmunodetectadas con Brn3a.....	73
3.7.2.2.5. Cuantificación manual de células de microglía fagocítica marcadas con OHSt e Iba1 en montajes globales de retina	74
3.7.3. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS POBLACIONES CELULARES	75
3.7.3.1. Distribución espacial de las células ganglionares de la retina de rata y ratón	75
3.7.3.2. Distribución espacial de las células de microglía fagocítica de retinas de ratón	76
3.7.3.3. Distribución espacial de las células ganglionares de la retina melanopsínicas en retina de ratas.	77
3.7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	78
4. RESULTADOS	81
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS EN LA RATA ADULTA.....	81
4.1.1. IDENTIFICACIÓN DE MELANOPSINA EN LAS RETINAS DE RATA ADULTA	81

4.1.2. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS	85
4.1.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS	90
4.1.4. DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS	91
4.1.5. NÚMERO DE CÉLULAS GANGLIONARES MELANOPSÍNICAS EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA AL NERVIÓ ÓPTICO	95
4.2. DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DESPUÉS DE LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF EN EL RATÓN ADULTO	98
4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN BRN3A COMO MARCADOR DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DE RATÓN ADULTO.....	98
4.2.1.1. Estudio cualitativo del patrón de expresión de Brn3a en secciones transversales de retinas control y axotomizadas.	98
4.2.1.2. Estudio cuantitativo del patrón de expresión de Brn3a en secciones transversales de retinas control....	100
4.2.1.3. Detección de Brn3a en retinas control montadas a plano. Estudio cualitativo y cuantitativo ...	101
4.2.2. CURSO TEMPORAL DE MUERTE DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO	108
4.2.2.1. Análisis cualitativo y cuantitativo del patrón de expresión temporal de Brn3a y OHSt en montajes globales de retina tras la sección del nervio óptico	108
4.2.3. EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE BDNF TRAS LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO.....	115
4.2.3.1. Efecto del BDNF sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina de ratón tras la sección del nervio óptico.....	115
4.2.3.2. Células de microglía fagocítica en las retinas de ratón tras la sección del nervio óptico	127
4.2.4. EFECTO DE LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO EN EL OJO CONTRALATERAL A LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO	136
4.2.4.1. Población de células ganglionares de la retina en el ojo contralateral a la sección del nervio óptico.....	136
4.2.4.2. Población de microglía fagocítica en el ojo contralateral a la lesión	140
5. DISCUSIÓN.....	147
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS EN LA RETINA DE RATA ADULTA.....	147
5.2. CARACTERIZACIÓN DEL BRN3A COMO MARCADOR DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN RATÓN ADULTO	150
5.3. CURSO TEMPORAL DE MUERTE DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO	153
5.4. EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE BDNF EN LA SUPERVIVENCIA DE CGR Y LA APARICIÓN DE MICROGLÍA FAGOCÍTICA TRAS LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO	154

5.5. EFECTO DE LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO SOBRE LA RETINA CONTRALATERAL A LA LESIÓN	157
6. CONCLUSIONES	161
7. CONCLUSIONS	165
8. BIBLIOGRAFÍA	169
9. ANEXO I	189
10. ANEXO II	201
11. ANEXO III	215

AGRADECIMIENTOS

Lo que comenzó siendo un pequeño trabajo de investigación para la tesis de máster, se ha convertido unos años después en mi Tesis Doctoral. Por fin ha llegado el momento de presentarla y, ahora que ya está acabada, me doy cuenta de todas las personas que, de una manera u otra, me han ayudado a conseguirlo. Por ello, me gustaría comenzar con un sincero agradecimiento hacia todas estas personas.

Al Profesor Manuel Vidal, co-director de esta Tesis Doctoral, muchísimas gracias por permitirme trabajar en su grupo de investigación. Gracias por enseñarme a trabajar con constancia y rigor, y por apostar por mí.

A la Dra. Marta Agudo, co-directora de esta Tesis Doctoral, por ayudarme en todo momento, por enseñarme a pensar y a abrir la mente a la investigación. Ahora que he terminado ya no tengo excusa.... ¡prometo ir a correr todas las semanas!

A la Profesora María Paz Villegas, co-directora de esta Tesis Doctoral, gracias por enseñarme cómo hay que ser, tanto profesional como personalmente, y por su ayuda durante estos años.

Gracias a los tres por el tiempo dedicado durante los experimentos y durante las correcciones del manuscrito. Gracias a vosotros, esta tesis ha sido posible.

A la Dra. Paloma Sobrado, porque un consejo adecuado en un momento determinado cambió el rumbo de mi vida. Gracias por animarme a continuar con mi formación y por despertar en mí la curiosidad de aprender.

Gracias a todos los que han contribuido en este trabajo: Al Dr. Marcelino Avilés, por las cirugías de la primera parte del estudio del ratón y su colaboración en el estudio de la melanopsina. A Javier Valiente-Soriano, por la perfección de las cirugías realizadas en la segunda parte del estudio del ratón; muchas gracias por su buena disposición para colaborar en todo momento y por hacer que todo parezca más fácil. A Manuel Jiménez, por el desarrollo de todos los programas informáticos que se utilizan en este trabajo, por estar siempre disponible cuando lo he necesitado y por su amistad. Al Dr. Manuel Salinas, por su contribución con las cirugías realizadas en el estudio de la rata y por su ayuda constante. A Leticia Nieto, gracias por la perfección de los cortes en criostato de las retinas. A José Manuel Bernal, por su colaboración en el procesado de las ratas. Y a Luis Montalbán, gracias por enseñarme pacientemente todas las técnicas que hoy realizo con destreza y por sus consejos en mis inicios.

Y a los demás miembros del laboratorio, porque hacer una tesis con ellos es infinitamente más llevadero. A Francisco Nadal, gracias por ser un verdadero amigo, por su compañerismo, por nuestras interminables conversaciones sobre la vida y por cuidar de la “mengaja” del laboratorio. Al Dr. Diego García, por ser como un hermano mayor para mí; gracias por ayudarme y aconsejarme siempre. A Arturo Ortín, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, en especial, en nuestras clases de inglés, nunca pensé que estudiar inglés fuera tan divertido. A Miriam Sánchez, mi compi del laboratorio desde el principio, por su amistad. A Johnny Di Pierdoménico, por su buena disposición para todo. A M^a Dolores Soria, gracias por ayudarme con tanto cariño. Y a todas las personas que han estado en el laboratorio durante estos años. Al Dr. Luis Alarcón, Sergio Rodríguez y Juanjo Alburquerque.

To Finn Hallböök, from Uppsala University. I feel very grateful to him for giving me the opportunity of working in his laboratory and for making me feel part of his group from the first day. I also want to thank Mohammed Harun-Or Rashid for patiently helping me during my whole stay, and for sharing with me his passion for research and molecular biology.

Gracias a todos mis amigos, por estar a mi lado y hacerme sentir especial. A mis amigos de Villarrobledo, por recibirme todas las vacaciones con tanta ilusión, en especial, a M^aJosé, Isa, Ana, Marian, Aurora, Marta, Rosillo y Edu, que siempre me recuerdan lo que significa la amistad; a mis amigas de Albacete, por todos estos años separadas, pero juntas; a mis amigos de Murcia, gracias por hacerme sentir como en casa; y a todos los amigos que he hecho durante la carrera y máster, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos en las clases, cantinas y viajes; en especial, a Almu y Amalia, gracias por apoyarme siempre.

Por último, a mi familia, todo lo que he conseguido ha sido gracias a ellos. A mi madre, gracias por el amor infinito que me ha dado todos estos años. A mi padre, gracias por enseñarme a luchar y a no darme nunca por vencida. Y a mi hermana, gracias por cuidarme, animarme y ser un ejemplo de valentía. Os quiero.

Muchas gracias a todos/as.

RESUMEN

Introducción

Las lesiones axonales en el sistema nervioso central (SNC) del mamífero adulto así como las enfermedades que cursan con muerte neuronal producen secuelas permanentes e irrecuperables, pues en el SNC del mamífero adulto las neuronas no son reemplazadas ni los axones son capaces de regenerar espontáneamente para reinervar sus dianas. En mamíferos, la retina es probablemente la región del SNC más estudiada debido a su fácil acceso, manipulación experimental y disección. Además el sistema visual del roedor se utiliza ampliamente como modelo de lesión traumática del SNC para estudios moleculares, funcionales, y anatómicos de los procesos neurodegenerativos y su posible prevención (neuroprotección).

Las CGR constituyen la única población de la retina cuyas neuronas proyectan sus axones fuera de la misma. El conjunto de axones de las CGR forma el nervio óptico (NO) y, por tanto, la lesión de éste afecta a las CGR. Para identificar las CGR se han utilizado diversas técnicas. Los trazadores neuronales, como el Fluorogold (FG) se aplican en el NO o en los colículos superiores (CS), los principales territorios retino-recipientes en el cerebro, para marcar retrógradamente la población de CGR. Recientemente se ha descrito que el factor de transcripción Brn3a es un buen marcador de las CGR de la retina de rata, pues el 92,2% de la población de CGR lo expresan, pero sin embargo, en ratón se desconoce el porcentaje de CGR que expresan esta proteína. Por otra parte, se ha descrito un subtipo de CGR que contienen melanopsina, un pigmento capaz de producir una fototransducción y por tanto, es intrínsecamente fotosensible. Estas CGR se han denominado CGR melanopsínicas (CGRm). En la rata, la distribución topográfica y el número total de la población de CGRm no se han descrito en detalle.

La sección intraorbitaria del nervio óptico (SNO) es uno de los modelos de lesión traumática axonal más utilizado en el SNC para estudiar la respuesta neuronal a la axotomía. Esta lesión afecta específicamente a las CGR y se utiliza para el estudio de la respuesta de éstas neuronas tanto a la lesión como a tratamientos neuroprotectores. El curso temporal de muerte de las CGR en rata, así como el efecto del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) como factor neuroprotector de la muerte de CGR, ha sido ampliamente caracterizado. En ratas, una inyección intravítrea de BDNF protege la totalidad de la población hasta 7 días después de la SNO. El ratón es un animal cada vez más utilizado para estudios de degeneración y neuroprotección, debido a la posibilidad de obtener ratones transgénicos o knockout. Sin embargo, en este animal se desconoce el curso temporal de la muerte de las CGR después de la SNO y el efecto que, sobre éstas, tiene el tratamiento con BDNF.

Las células de la microglía son los macrófagos residentes del SNC que tienen su origen en las células hematopoyéticas. En circunstancias normales, estas células se encuentran en estado de reposo. Sin embargo, tras una lesión o patología que curse con neurodegeneración, se activan y se

vuelven fagocíticas, ya que su principal función es la fagocitosis de los desechos celulares. Cuando las neuronas estaban marcadas con trazadores externos, éstos se incorporan a los fagosomas de la microglía y resultan en un marcaje transcelular de la célula microglial fagocítica. Así pues, cuando las CGR están marcadas con trazadores neuronales, las células fagocíticas microgliales de la retina se pueden identificar por su morfología ameboide, por la expresión de marcadores específicos como el Iba1 y por el marcaje transcelular. Se sabe que tras una lesión unilateral del nervio óptico en la rata, se produce una respuesta microglial en el ojo contralateral a la lesión. Este tipo de respuesta también se ha descrito en modelos murinos de glaucoma e isquemia transitoria, pero hasta la fecha no hay estudios que describan en profundidad la activación microglial en las retinas experimentales y contralaterales del ratón tras la SNO.

Objetivos

Caracterizar la población de CGRm de la retina de la rata adulta en relación con la población total de CGR y analizar su distribución espacial en la retina.

Caracterizar si el Brn3a es un buen marcador de las CGR en dos estirpes de ratón, albino (Swiss) y pigmentado (C57/BL6). Analizar la curva temporal de muerte de las CGR de ratón después de la SNO, y evaluar el efecto neuroprotector del BDNF sobre estas células. Investigar también la respuesta de las células de microglía de las retinas de ratón tras la SNO, en las retinas axotomizadas y en las contralaterales a la lesión.

Material y métodos

La caracterización de las CGRm de la retina de rata se llevó a cabo en 16 ratas albinas adultas Sprague-Dawley (SD). Todos los animales se sacrificaron a primera hora de la mañana, para evitar variaciones en la expresión de melanopsina. En primer lugar, caracterizamos la población de CGRm en secciones transversales de retina (n=2). Se inmunodetectaron las CGRm mediante el anticuerpo contra la melanopsina, las CGR mediante el anticuerpo contra Brn3a, los bastones mediante el anticuerpo contra la rodopsina y se contratiñeron los núcleos de todas las células de la retina con DAPI.

A continuación, caracterizamos la población de CGRm en montajes globales de retina. En todas las retinas, las CGRm se inmunodetectaron con anticuerpos contra la melanopsina. Dependiendo de la técnica empleada para identificar la población de CGR, los animales se dividieron en tres grupos experimentales: i) En el primer grupo analizamos si todas las CGRm proyectaban fuera de la retina a través del NO (n=10 retinas). Para ello se aplicó FG en el muñón ocular del NO

seccionado intraorbitariamente. ii) En el segundo grupo, nos propusimos conocer la proporción de CGRm que proyectaban a los colículos superiores (CS), que es la región retinorreceptiva a la que proyectan el 98,4% de las CGR en la rata; para ello se aplicó en este grupo FG en los CS (n=10 retinas). iii) El tercer grupo se utilizó para analizar si las CGRm expresaban el factor de transcripción Brn3a, y para cuantificar y comparar los números y distribución espacial de ambas poblaciones (n=10 retinas). Para ello usamos inmunodetección doble de las CGR con anticuerpos contra el Brn3a y la melanopsina. La cuantificación se realizó mediante una rutina automática especialmente desarrollada para este proyecto y, a partir de los resultados obtenidos, se estudió la distribución de estas células en cada retina individualmente mediante mapas de vecinos en un radio determinado, diferenciando entre ojos derechos e izquierdos. La distribución de las CGRm se comparó con la distribución de las CGR-Brn3a⁺ detectadas en las mismas retinas.

Para el estudio realizado en ratones, se utilizaron 158 ratones adultos pigmentados C57BL/6 y 34 ratones adultos albinos Swiss. Para caracterizar el Brn3a como marcador de las CGR de ratón, se comparó el marcaje de las CGR con este anticuerpo con el producido por el marcaje de las CGR con un trazador lipofílico, el metanosulfonato de hidroxistilbamidina (OHSt), un análogo del FG que, aplicado en el MNO, identifica todas las CGR y que, cuando se aplica en los CS, identifica un 96,5% de la población total de CGR. Se analizó la expresión de Brn3a en secciones transversales y montajes globales de retinas control. Se cuantificó el número total de CGR trazadas y se determinó su distribución topográfica usando el método descrito por Salinas-Navarro y cols. (2009b). Para contar la población completa de CGR inmunodetectadas con Brn3a y analizar su distribución espacial, se desarrollaron y validaron protocolos automatizados nuevos.

Para analizar la degeneración de las CGR del ratón después de la SNO, se utilizaron ratones pigmentados C57BL/6. Las CGR se marcaron retrógradamente con OHSt una semana antes de la cirugía. El NO se seccionó a 0,5 mm del disco óptico teniendo cuidado de no lesionar los vasos retinianos. A diferentes intervalos de supervivencia tras la SNO (2, 5, 7, 9, 14 o 21 días), los ratones se sacrificaron y las retinas se disecaron en montajes globales y se incubaron con el anticuerpo contra Brn3a. La población de CGR-OHSt⁺ se analizó utilizando métodos descritos previamente en este laboratorio (Salinas-Navarro y cols., 2009b). Para cuantificar y analizar la distribución espacial de las CGR-Brn3a⁺ se desarrollaron nuevas rutinas automáticas. Como controles se utilizaron ratones intactos.

En un segundo grupo de experimentos se evaluó el efecto neuroprotector de la inyección intravítrea de BDNF (2,5 µg) inmediatamente después de la SNO, tanto en ratones C57BL/6 como Swiss. Para comprobar que la inyección intravítrea en sí misma no produjera ningún efecto lesivo sobre las CGR, se realizaron grupos experimentales tratados con vehículo (PBS) y se analizaron a los mismos tiempos después de la SNO que los grupos tratados con BDNF. Los tiempos elegidos para analizar las retinas fueron a 3, 5, 7 y 14 días después de la SNO, en función de los resultados obtenidos en el apartado anterior. En estos animales, las CGR identificaron por trazado desde los

CS e inmunodetección del Brn3a. Las células de microglía fagocítica fueron identificadas mediante el marcaje transcelular con OHSt que ocurre cuando fagocitan las CGR OHSt⁺ en degeneración, y con un anticuerpo contra la proteína Iba1, específica de estas células. Las CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ se cuantificaron con la misma rutina informática utilizada anteriormente y se analizó la distribución espacial de las CGR-Brn3a⁺ construyendo mapas de isodensidad celular. Además, en las retinas izquierdas experimentales, se cuantificaron las células de microglía fagocítica marcadas transcelularmente con OHSt e inmunodetectadas con Iba1 y se analizó su distribución espacial mediante mapas de vecinos. El mismo análisis se realizó en las retinas contralaterales a la SNO, para evaluar si la SNO produce algún efecto sobre las CGR y sobre las células de microglía fagocítica de la retina contralateral a la SNO.

Resultados

En las retinas de rata en las que las CGR habían sido marcadas con FG aplicado en el MNO, se observó que el 99,05% de las CGR que expresan melanopsina se trazaban también con FG, por lo que estas neuronas proyectan sus axones a través del NO. Un 90,62% de las CGRm se encontraban marcadas con FG aplicado en los CS, por lo que estas células emiten proyecciones retinotectales. Tan sólo un 0,20% de las CGRm expresan Brn3a. La población total de CGRm fue de 2.046 ± 48 , lo cual supone un 2,62% de la población de CGR de rata adulta. Los mapas de vecinos celulares revelaban una mayor densidad de CGRm en la periferia de la retina, y más concretamente en la región superotemporal. Esta distribución es complementaria a la distribución de la población de general CGR.

En las retinas de ratón, el Brn3a se expresa únicamente en las CGR y su expresión no se ve afectada después de la SNO. En montajes globales de retina de ratón pigmentado C57BL/6, el número total de CGR-OHSt⁺ y de CGR-Brn3a⁺ es de 40.437 ± 3.196 y 34.697 ± 1.821 , respectivamente, por lo que el Brn3a se expresa en un 85,5% de las CGR-OHSt⁺. En los montajes globales de retina de ratón albino Swiss, el número total de CGR-OHSt⁺ y de CGR-Brn3a⁺ es de 51.025 ± 1.425 y 47.211 ± 1.346 , respectivamente, por lo que el Brn3a se expresa en un 92,6% de las CGR-OHSt⁺. En ambas estirpes de ratones, los mapas de isodensidad revelan que la distribución de las CGR-Brn3a⁺ es muy similar a las CGR-OHSt⁺, encontrándose una zona de mayor densidad en la hemirretina superior.

La pérdida de CGR después de la SNO comienza a ser estadísticamente significativa con ambos marcadores a los 3 días después de la SNO. A partir de este momento, el número de CGR disminuye significativamente, quedando a los 9 días post-lesión un 15% de la población total. Desde 9 días hasta los 21 días post-SNO, el número de CGR se mantiene más o menos estable. Los mapas de isodensidad revelan que la muerte de CGR inducida por la SNO es difusa. Aunque el

Brn3a no se expresa en la población completa de CGR, el porcentaje de CGR supervivientes con OHSt y con Brn3a fue similar en todos los tiempos experimentales.

En el grupo experimental cuyas retinas fueron tratadas con vehículo, la muerte de CGR fue similar a la descrita en el apartado anterior para los grupos de animales sin tratamiento. En los grupos tratados con BDNF se obtuvo una supervivencia de CGR significativamente mayor que en los grupos tratados con vehículo, a todos los tiempos después de la SNO. Mientras que con vehículo, la muerte comenzó a ser estadísticamente significativa a los 3 días después de la SNO, con BDNF la muerte fue significativa a los 5 días post-SNO. Además, los mapas de isodensidad muestran que la muerte de CGR en los grupos tratados con BDNF o vehículo sigue siendo homogénea por toda la retina, y revelan que la densidad celular es mayor que en los grupos tratados con BDNF, no únicamente en la zona de la inyección, sino por toda la retina.

En cuanto a las células de microglía fagocítica, observamos que conforme aumenta el tiempo después de la SNO, aumenta el número de células de microglía fagocítica, tanto en los grupos tratados con BDNF como en los tratados con vehículo. Sin embargo, en los grupos tratados con BDNF el número de células de microglía fagocítica es significativamente menor en comparación con los grupos tratados con vehículo, probablemente porque la muerte de CGR es menor. Los mapas de vecinos revelan que las células de microglía fagocítica aparecen a los 3 días de manera homogénea por toda la retina y que, conforme aumenta el tiempo post-SNO, aumenta el número de células microgliales que se distribuyen con un gradiente de densidad decreciente del centro a la periferia de la retina.

Finalmente, en las retinas contralaterales a la SNO, observamos un aumento del número de células de microglía fagocítica, tanto en las retinas tratadas con BDNF como con vehículo, en comparación con las retinas control. El aumento de estas células comienza a los 3 días después de la SNO y su número y distribución se mantiene estable hasta los 14 días post-SNO. Esta respuesta microglial en la retina contralateral a la lesión fue la misma en los grupos cuya retina lesionada se trató con BDNF y los grupos en los que se administró vehículo. Analizamos la población de CGR en estas retinas contralaterales a la SNO y observamos una tendencia a la disminución del número de CGR, tanto marcadas con OHSt como con Brn3a, que es significativamente menor a los 21 días después de la SNO comparado con retinas control.

Conclusiones

Las CGRm suponen un 2,6% de la población de CGR-Brn3a⁺. La mayor densidad de CGRm se encuentra en la región superotemporal, mientras que la mayor densidad de CGR-Brn3a⁺ se encuentra en la hemirretina superior. Un 90,62% de las CGRm se marcan con FG cuando éste se aplica en los CS, por lo que proyectan a esta región del cerebro.

En el ratón adulto el Brn3a es un buen marcador de CGR ya que solamente se expresa en las CGR y su expresión no se ve afectada después de una lesión. Aunque el número de CGR-Brn3a⁺ es menor que las CGR-OHSt⁺, el porcentaje de supervivencia después de la SNO así como su distribución espacial por la retina es similar con ambos marcadores, por lo que ambos marcadores son válidos para el estudio de la degeneración neuronal. Así pues, el Brn3a es un marcador fiable para identificar, cuantificar y valorar la pérdida de CGR del ratón adulto ex vivo.

En ratones, la SNO produce la muerte de las CGR y un aumento del número de células de microglía fagocítica conforme aumenta el tiempo después de la lesión. Esta degeneración de CGR y la aparición de células de microglía fagocítica se ve atenuada con el tratamiento con BDNF. Como respuesta a la SNO unilateral, en las retinas contralaterales se produce una activación microglial, que se mantiene constante a lo largo del tiempo y que no se ve disminuida con la inyección de BDNF en la retina lesionada. Además en las retinas contralaterales se produce una disminución significativa de las CGR-OHSt⁺ y CGR-Brn3a⁺ a los 21 días después de la SNO.

SUMMARY

Introduction

Axonal damage to adult mammalian central nervous system (CNS) as well as diseases that course with neuronal death cause an irreversible loss of function because neurons are not replaced and axons do not regenerate spontaneously to reach their distant targets. In mammals, the retina is probably the most extensively studied part of the CNS due to its easy access, experimental manipulation and dissection. Moreover, the visual system of rodents is widely used as a model of traumatic injury of the CNS to study molecular, functional and anatomically the neurodegenerative processes as well as its possible prevention (neuroprotection).

Retinal ganglion cells (RGC) are the only output neurons of the retina. Since their axons form the optic nerve (ON), damage to the optic nerve primarily affects RGC. To identify RGC several techniques have been used. Neuronal tracers, such as Fluorogold (FG) are applied in the ON stump, or superior colliculi (Sci), the main target territories in the brain, to retrogradely label the RGC population. Recently, Brn3a has been described as a good RGC marker in the rat retina because approximately 92.2% of the RGC population express it, but in mice it is not known the proportion of RGC expressing Brn3a. On the other hand, it has been described a subtype of RGC that are intrinsically photosensitive because they contain melanopsin, a pigment that responds to light. Because of this pigment, these RGC are intrinsically photosensitive and have been termed melanopsin RGC (mRGC). In rat, the total population of mRGC and their topographic distribution have not been described in depth.

Intraorbital optic nerve transection (ONT) is one of the most commonly employed models of axonal injury in the CNS to study the neuronal response to axotomy. This lesion specifically affects the RGC population and it is used to study their response to injury and neuroprotective therapies. In rats, the temporal course of RGC degeneration after ONT as well as the effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as an effective neuroprotective factor for axotomized RGC, has been described previously in detail. In rats, a single intravitreal injection of BDNF protects the whole RGC population up to 7 days after ONT. Transgenic and knockout mice have become an important tool to study a number of relevant questions in the adult mammalian CNS. However, to the best of our knowledge, there are no reports of the time course of RGC loss after ONT and the effect of BDNF on RGC survival after ONT in mice.

Microglial cells are the resident macrophages in the CNS that originate from hemopoietic cells. Under normal circumstances these cells are in resting state, but after a lesion or disease that courses with neurodegeneration, microglial cells become activated and engulf cell carcasses and debris to eliminate them from the tissue. When the dead cells are labeled with exogenous compounds, these are incorporated into the microglial phagosomes, resulting in the transcellular labeling of the

phagocytotic microglial cell. Therefore, when traced-RGC are phagocytosed, the phagocytotic microglial cells in the retina can be identified by their amoeboid morphology, by the expression of specific markers such as Iba1 and by transcellular labeling. It has been known that after unilateral optic nerve injury in rats, there is a microglial response in the eye contralateral to the lesion. This response has also been reported in rodent models of glaucoma and transient ischemia. Until now, there are no studies that describe in depth the microglial activation in the experimental and the contralateral retinas after ONT in mice.

Objectives

To characterize the total numbers and spatial distribution of mRGC in the adult rat retina, and its relation with the total population of RGC.

To characterize whether Brn3a is a good RGC marker in two mouse strains, one albino (Swiss) and one pigmented (C57/BL6) mice. To analyze the temporal loss of RGC after ONT, to assess the neuroprotective effect of BDNF in axotomized RGC. To investigate the response of phagocytic microglial cells after ONT in the injured and contralateral to the lesion retinas.

Material and methods

Two months old albino Sprague-Dawley (SD) rats (n=16) were used to characterize the mRGC population. All the animals were sacrificed at the same time, early in the morning, to avoid variability in the melanopsin expression. Firstly, mRGC expression was characterized in retinal radial sections (n=2). mRGC were immunodetected with the antibody against melanopsin, the total RGC population was immunodetected with the antibody against Brn3a, rods were identified with the antibody against rhodopsin and all retinal nuclei were counterstained with DAPI.

Next, the whole population of mRGC was characterized in flat-mounts retinas. In all the retinas, mRGC were immunodetected with the antibody against melanopsin. Depending on the technique to identify the RGC population, animals were divided in three experimental groups: i) the first group was used to investigate whether all retinal neurons immunodetected with melanopsin antibody send their axons through the ON (n=10 retinas). For that, FG was applied in the ON stump of the intraorbitally transected ON. ii) The second group was used to assess the proportion of mRGC that project their axons to the superior colliculi (SCi), the retinotectal area where 98.4% of the RGC project their axons in the rat, by applying FG onto both SCi (n= 10 retinas). iii) The third group was used to analyze whether mRGC express Brn3a and to quantify and compare the numbers and spatial distribution of both populations (n=10 retinas). For that, double immunodetection with antibodies

against melanopsin and Brn3a was carried out. In this last group, total number of mRGC were quantify with a specific automated routine developed for this purpose, and spatial distribution was analyzed with neighbour maps. Right and left retinas were analyzed separately, in order to analyze the distribution of mRGC in each group. Finally, Brn3a⁺RGC and mRGC distributions were compared.

For the study in mice, two months old animals were used (n= 158 pigmented C57BL/6 mice, and n= 34 albino Swiss mice). To characterize Brn3a as a marker for mouse RGC, we used as control of the RGC population tracing with hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt, a FG analogue). OHSt was applied in the ON stump three days before processing, to trace all the RGC, or in both SCi one week before processing, to trace 96.5% of the RGC population in mice. Brn3a expression was analyzed in radial sections and flat-mount retinas. The total number of OHSt⁺RGC was quantify and their spatial distribution was analyzed using methods described by Salinas-Navarro y cols. (2009b). To quantify and analyze the total population of Brn3a⁺RGC, new automated routines were developed for this purpose.

To analyze the time course of RGC degeneration after ONT, pigmented C57BL/6 mice were used. RGC were retrogradely traced with OHSt one week before surgery. ON was transected at 0.5 mm from the optic disk, sparing the blood supply. At different times post-ONT (2, 5, 7, 9, 14 and 21 days), animals were sacrificed and retinas were dissected as flat-mounts and Brn3a immunodetected. OHSt⁺RGC population was analyzed using previously described methods (Salinas-Navarro y cols., 2009b). To quantify and analyze the spatial distribution of Brn3a⁺RGC population, the new automated routine was used. As control, naive animals were used.

In a second set of experiments, the effect of a single intravitreal injection of BDNF (2,5 µg) in axotomized retinas was studied, in pigmented C57BL/6 and albino Swiss mice. To assess the effect of the intravitreal injection in the retina, one experimental group was treated with vehicle (PBS) and retinas were analyzed at the same times post-ONT as the BDNF-treated groups. Retinas were dissected as flat-mounts at different times post-ONT: 3, 5, 7 and 14 days after ONT. RGC were identified by tracing from both SCi (applied one week before surgery) and by Brn3a immunodetection. Phagocytic microglial cells were identified by transcellular labelling with OHSt, because of the phagocytosis of degenerated OHSt⁺RGC, and by Iba1 immunodetection, specific protein of these cells. OHSt⁺RGC and Brn3a⁺RGC were quantified and isodensity maps were constructed to analyze the spatial distribution of surviving Brn3a⁺RGC. Phagocytic microglial cells were automatically quantified and their spatial distribution assessed by neighbourhood maps. To determine whether there is a contralateral response to the injury, RGC and phagocytic microglial cells populations were analyzed in the contralateral to the lesion retinas.

Results

In rat retinas traced with FG from the ON, 99.05% of the RGC that express melanopsin (mRGC) were traced. Thus, mRGC send their axons through the ON. When the tracer was applied to both SCi, 90.6% of the mRGC were traced, thus, most of the mRGC project to them. Finally, Brn3a and melanopsin were doubly immunodetected to assess whether ipRGC express this transcription factor, and we found that only 0.20% of them were Brn3a⁺. In flat-mount retinas, the total number of mRGC was 2,047±309, which amounts to a 2.6% of the total population of RGC. Neighbour maps disclosed that mRGC are placed preferentially in the retinal periphery and that their density is higher in the supero-temporal quadrant. This distribution is complementary to the general RGC population.

In mouse retinas, Brn3a is only expressed by RGC and its expression does not change after ONT. In flat-mount retinas of pigmented C57BL/6 mice, the total number of OHSt⁺RGC and Brn3a⁺RGC was 40,437±3,196 and 34,697±1,821, respectively. In flat-mount retinas of albino Swiss mice, the total number of OHSt⁺RGC and Brn3a⁺RGC was 51,025±1,425 and 47,211±1,346, respectively. Thus, Brn3a is expressed in 85.5% and 92.6% of the OHSt⁺RGC in pigmented and albino mice, respectively. In both mouse strains, isodensity maps reveal a similar distribution of Brn3a⁺RGC and OHSt⁺RGC, where the highest density of RGC is located in the dorsal retina.

In mice retinas, RGC loss after ONT is first statistically significant at 3 days after ONT with both markers, OHSt and Brn3a. From 3 to 9 days post-ONT, the number of RGC decreases significantly. At 9 days, only 15% of the total population is still alive. From 9 to 21 days post-ONT, the number of RGC is similar. Isodensity maps reveal that ONT induces a diffuse loss of RGC across the retina. Although Brn3a is not expressed by the whole population of OHSt⁺RGC, the percentage of surviving Brn3a or OHSt positive RGC was similar at all times after ONT.

In the experimental groups treated with vehicle, RGC death was similar to those retinas with no treatment. However, BDNF-treated retinas showed a higher number of RGC at all times post ONT compared to vehicle treated groups. While with vehicle, RGC loss is first statistically significant at 3 days, in BDNF-treated retinas RGC loss is delayed until 5 days post-lesion. Isodensity maps showed a higher density of RGC compared to vehicle treated groups. Furthermore, the neuroprotective effect of BDNF was observed in the whole retina, not only in the localized area of the injection.

The number of phagocytic microglial cells was significantly higher in all vehicle-treated groups compared to BDNF-treated ones. In both experimental groups, phagocytic microglial cells appeared at 3 days after ONT and the number of these cells increased as the time post-lesion increased, although this response was attenuated by BDNF injection, probably due to a lower RGC death in this group. At 3 days, phagocytic microglial cells were distributed homogenously across the retina. As the time post-lesion increased, their density was higher in the centre than in the periphery of the retina.

Finally, in all the contralateral to the lesion retinas, an increase of the number of phagocytic microglial cells was observed. The number of phagocytic microglial cells was significantly higher at 3 days after ONT, compared to control retinas, and was constant at all times after ONT, from 3 to 14 days. Phagocytic microglial cells were found scattered across the retina at all time points. Intravitreal injection of BDNF in the injured retina did not decrease the microglial activation in the contralateral to the lesion retinas, as the number and distribution of these cells was the same in vehicle and BDNF treated groups. Concerning the RGC population in the contralateral retinas, their number gradually decreased along time post-lesion, and reached statistical significance at 21 days after ONT, compared to control retinas.

Conclusions

mRGC are 2.6% of the total population of Brn3a⁺RGC. The highest density of mRGC is found in the supero-temporal quadrant of the retina, while the highest density of Brn3a⁺RGC is in the dorsal retina along the naso-temporal axis. mRGC does not express Brn3a and 90,6% of the mRGC are traced with FG applied in SCi.

In the mouse retina, Brn3a is a good marker for RGC because is only expressed in RGC and its expression does not change after injury. The total number of Brn3a⁺RGC is lower than the total population of OHSt⁺RGC. However, both show the same spatial distribution and the temporal course of degeneration is similar with both markers. Thus, Brn3a is a reliable marker to identify, quantify and assess, ex-vivo, retinal ganglion cell loss in adult mice.

In mice, ONT induces a progressive loss of RGC and the appearance of phagocytic microglial cells, whose number increases as the time post-ONT increases. These two effects are attenuated with a single injection of BDNF. In the contralateral to the lesion retinas there is a microglial response that does not change with time post ONT and is not affected by BDNF treatment of the injured retina. In these retinas, the numbers of OHSt⁺RGC is significantly lower at 21 days after ONT.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARVO	Del inglés: “Association for Research in Vision and Ophthalmology”.
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro (del inglés: “Brain Derived Neurotrophic Factor”).
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés: “Bovine Serum Albumine”).
CCG	Capa de células ganglionares.
CFNR	Capa de las fibras nerviosas de la retina.
CFP	Proteína fluorescente de color cian (del inglés: “cyan fluorescent protein”).
CGR	Células ganglionares de la retina.
CGRm	Células ganglionares de la retina melanopsínicas.
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CNE	Capa nuclear externa.
CNI	Capa nuclear interna.
CNTF	Factor neurotrófico ciliar (del inglés: “ciliary neurotrophic factor”).
CPE	Capa plexiforme externa.
CPI	Capa plexiforme interna.
CS	Colículo superior.
DEM	Desviación estándar de la media.
DLGN	Núcleo geniculado dorsolateral (del inglés: “dorso lateral geniculate nucleus”).
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DTMR	Dextrano de tetrametil rodamina.
EP	Epitelio pigmentario.
FG	Fluorogold.

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés: “fibroblast growth factor”).
FR	Fotorreceptores.
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (del inglés: “glial fibrillary acidic protein”).
i.p.	Intraperitoneal.
MLE	Membrana limitante externa.
MLI	Membrana limitante interna.
MNO	Muñón del nervio óptico.
NDS	Suero normal de burro (del inglés: “normal donkey serum”).
NeuN	Proteína nuclear específica de neuronas (del inglés: “neuronal-nuclei”).
NGF	Factor de crecimiento nervioso (del inglés: “nerve growth factor”).
NO	Nervio óptico.
NT	Neurotrofinas.
NSQ	Núcleo supraquiasmático.
OHSt	Metanosulfonato de hidroxistilbamidina (del inglés: “Hydroxystilbamidine methanesulfonate”).
PB	Tampón fosfato (del inglés: “phosphate buffer”).
PBS	Tampón fosfato salino del inglés: “phosphate buffer saline”).
PF	Paraformaldehído.
SEF	Segmentos externos de los fotorreceptores.
SNC	Sistema Nervioso Central.
SNO	Sección del nervio óptico.
SNP	Sistema Nervioso Periférico.

LISTA DE ILUSTRACIONES (Figuras y Tablas)
Figuras:**INTRODUCCIÓN**

- Figura 1.1.**, pág. 3: Esquema de las partes fundamentales de una neurona.
- Figura 1.2.**, pág. 4: Sistema visual.
- Figura 1.3.**, pág. 7: Esquema del globo ocular.
- Figura 1.4.**, pág. 8: Esquema de la retina realizado por Santiago Ramón y Cajal.
- Figura 1.5.**, pág. 11: Organización laminar de la retina y sus principales tipos celulares.
- Figura 1.6.**, pág. 12: Estructura de los fotorreceptores de vertebrados.
- Figura 1.7.**, pág. 15: Localización de los colículos superiores en el cerebro del ratón.
- Figura 1.8.**, pág. 20: Áreas de proyección de las CGR que expresan Brn3a en ratón adulto.
- Figura 1.9.**, pág. 23: Distribución de las CGR trazadas con OHSt desde los colículos superiores en ratón.
- Figura 1.10.**, pág. 27: Principales proyecciones neuronales de las CGRm de ratón.
- Figura 1.11.**, pág. 35: Curso temporal de la muerte de las CGR tras la sección o aplastamiento del nervio óptico en rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Figura 3.1.**, pág. 57: Esquema del trazado retrógrado de las CGR aplicando el trazador en el colículo superior o en el muñón del nervio óptico.
- Figura 3.2.**, pág. 59: Esquemas representativos de la aplicación de OHSt en el colículo superior y de la sección del nervio óptico (A) y de la inyección intravítrea (B) en el ratón.
- Figura 3.3.**, pág. 66: Reconstrucción fotográfica o fotomontaje de una retina de rata control a partir de campos microscópicos individuales.
- Figura 3.4.**, pág. 67: Reconstrucción fotográfica o fotomontaje de una retina control de ratón a partir de campos microscópicos individuales.

- Figura 3.5.**, pág. 69: Validación del método automático de cuantificación de las CGRm en retina de rata.
- Figura 3.6.**, pág. 72: Representación esquemática del método de estimación del número total CGR en función de las tres regiones (centro, media y periferia).
- Figura 3.7.**, pág. 74: Validación del método automático de cuantificación de las CGR de ratón marcadas con Brn3a.
- Figura 3.8.**, pág. 75: Visualización de la distribución de las CGR en retinas de ratón usando mapas de isodensidad.
- Figura 3.9.**, pág. 77: Visualización de la distribución de las células de microglía fagocítica en retinas de ratón usando mapas de vecinos.

RESULTADOS

- Figura 4.1.**, pág. 82: Inmunodetección de melanopsina, Brn3a y rodopsina en secciones transversales de retinas de las ratas albinas SD control.
- Figura 4.2.**, pág. 83: Inmunodetección de las CGRm en montajes globales de la retina.
- Figura 4.3.**, pág. 84: Microfotografías al detalle de las CGRm en diferentes zonas del montaje global de retina.
- Figura 4.4.**, pág. 86: Los axones de las CGRm son parte de la proyección retinofugal.
- Figura 4.5.**, pág. 87: La mayoría de las CGRm proyectan a los colículos superiores.
- Figura 4.6.**, pág. 88: La mayoría de las CGRm no expresan Brn3a.
- Figura 4.7.**, pág. 89: CGR, marcadas con FG y Brn3a, y CGRm.
- Figura 4.8.**, pág. 92: Distribución de CGR-Brn3a⁺ y de CGRm en retinas derechas.
- Figura 4.9.**, pág. 93: Distribución de CGR-Brn3a⁺ y de CGRm en retinas izquierdas.
- Figura 4.10.**, pág. 94: Distribución de las CGR-Brn3a⁺ y CGRm en todas las retinas analizadas.
- Figura 4.11.**, pág. 96: Análisis cuantitativo de la distribución de las CGRm en retinas derechas.
- Figura 4.12.**, pág. 97: Análisis cuantitativo de la distribución de las CGRm en retinas izquierdas.
- Figura 4.13.**, pág. 99: Expresión de Brn3a en secciones sagitales de retinas de ratón C57BL/6 control.

- Figura 4.14.**, pág. 100: Expresión de Brn3a en secciones transversales de retinas de ratón C57BL/6 tras la sección del nervio óptico.
- Figura 4.15.**, pág. 103: Expresión de Brn3a en montajes globales de retina de ratones C57BL/6 control.
- Figura 4.16.**, pág. 106: CGR de ratones C57BL/6 control marcadas con OHSt y con Brn3a y sus mapas de isodensidad.
- Figura 4.17.**, pág. 107: CGR de ratones Swiss control marcadas con OHSt y con Brn3a y sus mapas de isodensidad.
- Figura 4.18.**, pág. 110: Microfotografías representativas de ratones C57BL/6 a los 2, 5 y 7 días después de la sección del nervio óptico.
- Figura 4.19.**, pág. 111: Microfotografías representativas de ratones C57BL/6 a los 9, 14 y 21 días después de la sección del nervio óptico.
- Figura 4.20.**, pág. 113: Porcentaje de CGR de ratones C57BL/6 supervivientes a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.
- Figura 4.21.**, pág. 114: Distribución de las CGR de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.
- Figura 4.22.**, pág. 117: La administración intravítrea de BDNF retrasa la muerte de las CGR en ratones pigmentados C57BL/6.
- Figura 4.23.**, pág. 118: La administración intravítrea de BDNF retrasa la muerte de las CGR en ratones pigmentados C57BL/6.
- Figura 4.24.**, pág. 119: La administración intravítrea de BDNF retrasa la muerte de las CGR en ratones albinos Swiss.
- Figura 4.25.**, pág. 123: Porcentaje de CGR supervivientes a diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
- Figura 4.26.**, pág. 124: La pérdida de CGR tras la sección del nervio óptico sigue un curso lineal.
- Figura 4.27.**, pág. 125: Distribución de las CGR de ratones C57BL/6 en los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
- Figura 4.28.**, pág. 126: Distribución de las CGR de ratones Swiss en los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
- Figura 4.29.**, pág. 127: Distribución de las células de microglía fagocítica de ratones controles C57BL/6.

- Figura 4.30.**, pág. 129: Identificación de las células de microglía fagocítica.
- Figura 4.31.**, pág. 130: Porcentaje de aumento de las células de microglía fagocítica en retinas de ratones C57BL/6 y Swiss tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
- Figura 4.32.**, pág. 131: La aparición de microglía fagocítica tras la sección del nervio óptico sigue un curso lineal.
- Figura 4.33.**, pág. 133: La aparición de microglía fagocítica y la muerte de CGR tras la sección del nervio óptico siguen un curso lineal.
- Figura 4.34.**, pág. 134: Distribución de la microglía fagocítica en ratones C57BL/6 a tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
- Figura 4.35.**, pág. 135: Distribución de la microglía fagocítica en ratones Swiss a tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
- Figura 4.36.**, pág. 138: Porcentaje de CGR en retinas de ratones C57BL/6 contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.
- Figura 4.37.**, pág. 142: Porcentaje de células de microglía fagocítica OHSt e Iba1 positivas en retinas ratones C57BL/6 y Swiss contralaterales a la lesión a los distintos tiempos tras la sección del nervio óptico y tratamiento con BDNF o vehículo.
- Figura 4.38.**, pág. 143: Distribución de la microglía fagocítica en las retinas de ratones C57BL/6 contralaterales a la lesión a tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
- Figura 4.39.**, pág. 144: Distribución de la microglía fagocítica en las retinas de ratones Swiss contralaterales a la lesión a tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Tablas:

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tabla 3.1.**, pág. 50: Ratas utilizadas para la caracterización de la población de CGRm.
- Tabla 3.2.**, pág. 51: Ratones C57BL/6 utilizados para la caracterización de la expresión del factor de transcripción Brn3a en secciones radiales de retina.

Tabla 3.3. , pág. 52:	Ratones utilizados para la caracterización de la expresión del factor de transcripción Brn3a en montajes globales de retina.
Tabla 3.4. , pág. 53:	Ratones C57BL/6 utilizados para el estudio de la degeneración de las CGR después de la sección del nervio óptico y en las retinas contralaterales a la lesión.
Tabla 3.5. , pág. 54:	Ratones utilizados para estudiar el efecto del BDNF sobre las CGR y en las células de microglía en las retinas después de la sección del nervio óptico y en las retinas contralaterales a la lesión.

RESULTADOS

Tabla 4.1. , pág. 90:	Número total de CGR-Brn3a ⁺ y CGRm.
Tabla 4.2. , pág. 101:	Número de CGR marcadas con anticuerpo contra Brn3a y con OHSt aplicado en el muñón del nervio óptico (fila superior) o en los colículos superiores (fila inferior).
Tabla 4.3. , pág. 105:	Número de CGR de ratones C57BL/6 y Swiss control trazadas con OHSt desde el colículo superior o inmunodetectadas con Brn3a.
Tabla 4.4. , pág. 112:	Número de CGR de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.
Tabla 4.5. , pág. 120:	Número de CGR de ratones C57BL/6 después de la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
Tabla 4.6. , pág. 121:	Número de CGR de ratones Swiss después de la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
Tabla 4.7. , pág. 128:	Número de células de microglía fagocítica OHSt e Iba1 positivas en retinas control de ratones C57BL/6 y Swiss.
Tabla 4.8. , pág. 129:	Número de células de microglía fagocítica OHSt e Iba1 positivas en retinas de ratones C57BL/6 y Swiss tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.
Tabla 4.9. , pág. 137:	Número de CGR en las retinas de ratones C57BL/6 contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.
Tabla 4.10. , pág. 139:	Número de CGR en las retinas de ratones C57BL/6 contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y tratadas con BDNF o vehículo.

Tabla 4.11., pág. 140: Número de CGR en las retinas de ratones Swiss contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y tratadas con BDNF o vehículo.

Tabla 4.12., pág. 141: Número total de células de microglía fagocítica OHSt e Iba1 positivas en retinas de ratones C57BL/6 y Swiss contralaterales a la lesión a los distintos tiempos tras la sección del nervio óptico y tratamiento con BDNF o vehículo.

ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

Los objetivos generales de esta tesis son dos: la caracterización de la población de células ganglionares de la retina melanopsínicas en la retina de la rata adulta, y el estudio de la degeneración de las células ganglionares de la retina después de la sección del nervio óptico y su protección con BDNF en el ratón adulto.

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

La introducción consta de tres apartados. En el primero de ellos se repasan los conceptos anatómicos y fisiológicos básicos del Sistema Nervioso Central y, en concreto, del sistema visual del roedor, animal de experimentación utilizado en nuestro estudio. Dentro de este apartado se describe en profundidad la retina y sus poblaciones celulares y, en particular, las células ganglionares de la retina. En el segundo apartado se describe la degeneración del Sistema Nervioso Central y los modelos de degeneración neuronal que utilizan el sistema visual para su estudio. En el tercer apartado se describen los aspectos fundamentales de la neuroprotección del Sistema Nervioso Central y las terapias neuroprotectoras utilizadas en los modelos de degeneración del sistema visual.

En el segundo capítulo se exponen de forma breve y concreta los objetivos de este trabajo original y justifican su realización.

El tercer capítulo corresponde a la descripción del material y métodos utilizados para la realización de la tesis. En este capítulo se describe detalladamente la organización de los grupos de animales, la metodología utilizada para la realización de la sección del nervio óptico y la inyección intravítrea, las diferentes técnicas para identificación de las diferentes poblaciones celulares (trazadores neuronales, inmunohistoquímica y marcadores celulares), y los métodos de análisis de imagen utilizados.

El capítulo de resultados se divide en dos apartados principales correspondientes a cada uno de los objetivos fundamentales. El primer apartado muestra los resultados de la caracterización de las células ganglionares de retina melanopsínicas en la retina de la rata adulta. El segundo, los resultados de degeneración de las células ganglionares de la retina después de la sección del nervio óptico y su protección con BDNF en el ratón adulto. Dentro de este segundo apartado, hay cuatro subapartados: el primero muestra los resultados de la utilización del anticuerpo contra Brn3a como marcador de células ganglionares de la retina de ratón; el segundo subapartado, los resultados del curso temporal de muerte de las células ganglionares de la retina después de la sección del nervio óptico; el tercer subapartado, los resultados del efecto del BDNF sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina y en la microglía fagocítica después de la sección del nervio óptico; y el cuarto y último subapartado, el efecto de la sección del nervio óptico sobre las células ganglionares

de la retina y las células de microglia de las retinas ipsilaterales y contralaterales a la lesión. 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.

El quinto capítulo corresponde a la discusión, en la que se analizan de forma crítica los resultados obtenidos. Este capítulo está dividido en dos apartados, el primero referido a la población de células ganglionares melanopsínicas de la retina de la rata, y el segundo, al modelo de degeneración de las células ganglionares de la retina del ratón adulto y su neuroprotección mediante el tratamiento con BDNF. Estos resultados son analizados valorando sus ventajas e inconvenientes, sus semejanzas y diferencias respecto a los resultados obtenidos en estudios previos.

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

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

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

HALLAZGOS ORIGINALES

El desarrollo de este trabajo nos ha permitido documentar los siguientes hallazgos originales:

En referencia al estudio de las células ganglionares melanopsínicas de la retina de rata adulta:

1. Éste es el primer estudio que analiza en profundidad el número total y la distribución topográfica de las células ganglionares melanopsínicas de la retina de rata.
2. Éste es el primer estudio en el que se compara la población de células ganglionares melanopsínicas de la retina con la población total de las células ganglionares de la retina.
3. Éste es el primer estudio que demuestra que una mayoría de las células ganglionares melanopsínicas de la retina proyectan a los colículos superiores.

En referencia al estudio de la degeneración y neuroprotección de las células ganglionares de la retina después de la sección del nervio óptico en el ratón adulto:

1. Éste es el primer estudio que describe la utilidad del anticuerpo contra el factor de transcripción Brn3a como marcador de las células ganglionares de la retina de ratón adulto.
2. Este estudio documenta en profundidad la degeneración de las células ganglionares de la retina después de la sección del nervio óptico, mediante la cuantificación del número total de células ganglionares de la retina a los diferentes tiempos después de la sección del nervio óptico y la descripción de su distribución espacial mediante mapas de isodensidad.
3. Este estudio documenta por primera vez el efecto neuroprotector del BDNF en las retinas de ratón después de la sección del nervio óptico, caracterizando, cuantificando y analizando la distribución espacial de las células ganglionares de la retina.
4. Éste es el primer estudio que cuantifica las células de microglía fagocítica en la retina a los diferentes tiempos después de la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF, y analiza su distribución espacial mediante mapas de vecinos celulares.
5. Éste es el primer estudio que analiza en profundidad el efecto que la sección del nervio óptico unilateral produce sobre las células ganglionares de la retina y las células de microglía fagocítica en la retina contralateral a la lesión.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

Durante mi estancia en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia he participado en diversos trabajos de investigación, que se han divulgado en las publicaciones científicas y comunicaciones a congresos que se encuentran a continuación. Las señaladas con asteriscos constituyen la base experimental de esta Tesis Doctoral.

Artículos

- Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, **Galindo-Romero C**, Valiente-Soriano J, Agudo-Barriuso M, Villa Pde L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection**. *Vision Res.* 2010; 50: 2176-2187.
- **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. **Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses**. *Exp Eye Res.* 2011; 92: 377-387.
- Montalbán-Soler, L., Alarcón-Martínez, L., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., **Galindo-Romero, C.**, Bezerra de Sá, F., García-Ayuso, D., Avilés-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., Villegas-Pérez, MP. **Retinal compensatory changes after light-damage in albino mice**. *Mol Vis.* 2012; 18: 675-93.
- **Galindo-Romero C**, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M. **Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat**. *Exp Eye Res.* 2013; 108: 84-93.
- **Galindo-Romero C**, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia**. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54: 974-85.
- García-Ayuso D., Ortín-Martínez A., Agudo-Barriuso M., Jiménez-López M., **Galindo-Romero C.**, Cuenca N., Pinilla I., Vidal-Sanz M., Villegas-Pérez MP. **Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-dependent survival**. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(8):5888-900.

Capítulos de libros:

- **Galindo-Romero, C.**, Avilés-Trigueros, M., Jiménez-López M., Valiente-Soriano, FJ., Nadal-Nicolás, FM., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso, M. 2010. **Temporal course of axotomy-induced retinal ganglion cell loss in adult mice**. En: Actualización en investigación de retina, M^a Dolores Pinazo Durán y cols., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 133-136.

Avilés-Trigueros M., **Galindo-Romero, C, García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Sellés-Navarro, I., Jiménez-López, M, Nadal-Nicolás, F.M., 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 y cols., eds. Impresión Ramírez S.L. ISBN: 978-84-693-8491-6, pp 129-132.

Contribuciones a congresos internacionales:

Montalbán-Soler, L., Bezerra de Sa, F., Alarcón-Martínez, L., **Galindo-Romero, C.**, Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. **Light-Induced Retinal Degeneration in the Albino Mice Retina**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009; 50: E-Abstract 3614. Fort Lauderdale, Florida, USA

****Galindo-Romero, C**, Avilés-Trigueros, M, Jiménez-López, M, Valiente-Soriano, J, Nadal-Nicolás, F., Rodríguez-Llarena, S., Nieto-López, L, Vidal-Sanz, M, Agudo-Barriuso, M. **Time course of retinal ganglion cell degeneration in adult mice after optic nerve axotomy**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51: E-Abstract 637. Fort Lauderdale, Florida, USA.

****Galindo-Romero, C**, Avilés-Trigueros, M, Jiménez-López, M, Valiente-Soriano, J, Nadal-Nicolás, F., Nieto-López, L, Vidal-Sanz, M, Agudo-Barriuso, M. **Temporal loss and spatial distribution of Brn3a positive retinal ganglion cells in the adult mice retina after optic nerve axotomy**. 2010. Póster. Annual Vision Research Conference. Retinal Ganglion Cells Meeting. Fort Lauderdale, Florida, USA.

Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., **Galindo-Romero, C.**, Agudo, M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M. **Retinal Ganglion Cell Death Induces an Impairment of the Scotopic Threshold Response in Pigmented Mice**. 2010. Póster. Annual Vision Research Conference. Retinal Ganglion Cells Meeting. Fort Lauderdale, Florida, USA.

Avilés-Trigueros M, **Galindo-Romero C, García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Sellés-Navarro I, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás M, Nieto-López L, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **Response of adult rat retina intrinsically photosensitive retinal ganglion cells to different lesions**. 2010. Póster. Annual Vision Research Conference. Retinal Ganglion Cells Meeting. Fort Lauderdale, Florida, USA.

****Galindo-Romero, C**, Avilés-Trigueros, M, Jiménez-López, Nieto-López, L, Vidal-Sanz, M, Agudo-Barriuso M. **Quantitative analysis of retinal ganglion cell degeneration in adult mice after optic nerve axotomy**. Comunicación Digital. Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (Sircova). Ophthalmic Res. 2010; 44: 57-80. Valencia, España.

Avilés-Trigueros, M., **Galindo-Romero, C.**, García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Sellés-Navarro, I., Vidal-Sanz, M. **Response of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells to different lesions in the adult rat retina**. Comunicación Digital. Sociedad de Investigación de Retina de la

- Comunidad Valenciana (Sircova). *Ophthalmic Res.* 2010; 44: 57-80. Valencia, España.
- Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, FM., Nieto-López, L., Jiménez-López, A., Ortín-Martínez, A., García-Ayuso, D., **Galindo-Romero, C.**, Agudo-Barriuso, M., Villegas-Pérez, MP., Vidal-Sanz, M. **Shortly After Ocular Hypertension There Is Loss Of Retinal Ganglion Cells, But Not Of Other Cells Of The Ganglion Cell Layer Of The Retina.** Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52: E-Abstract 2459. Fort Lauderdale, Florida, USA
- Alarcón-Martínez, L., Montalbán-Soler, L., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Valiente-Soriano, FJ., **Galindo-Romero, C.**, Nadal-Nicolás, FM., Sanchez-Migallón, MC., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, MP. **Compensatory Functional Retinal Changes After Light Damage In Albino Mice.** Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: E-Abstract 708. Fort Lauderdale, Florida, USA.
- Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F., López-Nieto, L., Jiménez-López, M., Ortín-Martínez, A., **Galindo-Romero, C.**, Valiente-Soriano, F., Sánchez-Migallón, MC., Avilés-Trigueros, M., Agudo-Barriuso, M., Villegas-Pérez, MP., Vidal-Sanz, M. **Ocular Hypertension Induces in the Ganglion Cell Layer of Adult Albino Rats Specific Retinal Ganglion Cell Loss.** Comunicación Oral. Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (Sircova). *Ophthalmic Res* 2011; 46: 251. Valencia, España.
- Nadal-Nicolás, F., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Nieto-López, L., Ortín-Martínez, A., **Galindo-Romero, C.**, Sanchez-Migallón, MC., García-Ayuso, D., Sobrado-Calvo, P., Villegas-Pérez, MP., Vidal-Sanz, M. **Whole Number and Spatial Distribution of BRN3C and BRN3B Positive Retinal Ganglion Cells in the Adult Rat Retina.** Comunicación Oral. Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (Sircova). *Ophthalmic Res* 2011; 46:246. Valencia, España.
- García-Ayuso, D., Ortín-Martínez, A., Agudo-Barriuso, M., Jiménez-López, M., Bernal-Garro, JM., **Galindo-Romero, C.**, Nieto-López, L., Nadal-Nicolás, FM., Cuenca, N., Pinilla, I., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, MP. **Degeneration of Rods and Cones in the P23H Rat.** Comunicación Oral. Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (Sircova). *Ophthalmic Res* 2011; 46:238. Valencia, España.
- **Galindo-Romero, C.**, Valiente-Soriano, FJ., Nadal-Nicolás, F., Salinas-Navarro, M., Ortín-Martínez, A., Sanchez-Migallón, MC., García-Ayuso, D., Villegas-Pérez, MP., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M. **Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Survival of Axotomized Retinal Ganglion Cells in the Adult Pigmented Mice.** Comunicación Oral. Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (Sircova). *Ophthalmic Res* 2011; 46:236. Valencia, España.
- **Galindo-Romero, C.**, Valiente-Soriano, FJ., García-Ayuso, D., Villegas-Pérez, MP., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M. **Efecto de la inyección intravítrea de BDNF en la muerte de células ganglionares de la retina en un modelo murino de axotomía traumática.** Comunicación Oral. 22 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM 2012). Madrid, España.

- García-Ayuso, D., Ortín-Martínez, A., Agudo-Barriuso, M., Jiménez-López, M., **Galindo-Romero, C.**, Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, MP. **Cambios morfológicos y de distribución espacial de los fotorreceptores en un modelo animal de retinosis pigmentaria.** Comunicación Oral. Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM 2012). Madrid, España
- Sánchez-Migallón Carreras MC, Nadal-Nicolás FM, Ortín-Martínez A, **Galindo-Romero C**, Nieto-López L, Agudo-Barriuso M, Sobrado-Calvo P. **Análisis descriptivo y cuantitativo del daltonismo en una población mediante el test de Farnsworth D-15.** e-Poster. 22 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM 2012). Madrid, España.
- Nadal-Nicolás, FM., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Nieto-López, L., Ortín-Martínez, A., **Galindo-Romero, C.**, Sanchez-Migallón, MC., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M. **Whole Number And Spatial Distribution Of The Pou4f Family Of Transcription Factors In The Adult Rat Retina.** Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci 2012; 53: E-Abstract: 6525. Fort Lauderdale, Florida, USA.
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Agudo-Barriuso, M., Nadal-Nicolás, FM., Jiménez-López, M., **Galindo-Romero, C.**, Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, MP. **Sectorial Loss Of Retinal Ganglion Cells In The RCS Rat.** Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci 2012; 53: E-Abstract: 3487. Fort Lauderdale, Florida, USA.
- **Galindo-Romero C.**, Valiente-Soriano, FJ., Villegas-Pérez, MP., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M. **Brain-derived neurotrophic factor delays axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult pigmented mice.** 2012. Póster. 8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona (España). "http://fens.ekconnect.co/FENS_331/poster_32322/program.aspx".
- **Galindo-Romero C.**, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M., Villegas-Pérez MP., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso M. **Phagocytic microglia in both eyes after unilateral intraorbital optic nerve transection.** Comunicación Oral. Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (Sircova). 2013. Valencia, España. Ophthalmic Res. 2013; 50:27–53. 50, pp. 39. Krager. Disponible en Internet en: "<http://www.karger.com/Article/Pdf/351623>".
- Zorrilla-Matilla L., Salinas-Navarro M., **Galindo-Romero C.**, Beltrán de Heredia J., Agudo-Barriuso M., Vidal Sanz M. Retinal ganglion cell axonal regeneration along peripheral nerve grafts in mice. Comunicación Oral. Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (Sircova). 2013. Valencia, España. Ophthalmic Res. 2013; 50:27–53. 50, pp. 45. Krager. Disponible en Internet en: "<http://www.karger.com/Article/Pdf/351623>".

1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El Sistema Nervioso Central (SNC) está formado por el cerebro, la médula espinal y los nervios centrales, y es el encargado de generar, enviar y conducir los impulsos nerviosos a todo nuestro cuerpo. Está formado por dos componentes celulares principales: las células nerviosas (neuronas) y las células gliales.

Las neuronas (figura 1.1) son células altamente diferenciadas, con una morfología particular que consta de un cuerpo celular o soma, que contiene el núcleo, las mitocondrias y otras organelas; las dendritas, ramificaciones que salen del cuerpo celular y que junto con el soma, reciben los impulsos nerviosos de otras neuronas; y un axón, que transmite los impulsos desde la neurona hacia sus órganos o neuronas diana. El axón puede encontrarse revestido por una vaina de mielina, que lo protege y aumenta la velocidad de transmisión (Hubel, 2000).

Las células gliales son alrededor de diez veces más numerosas que las neuronas y desempeñan diversas funciones en el SNC, entre las que se encuentra la función de soporte neuronal. Las células gliales son distintas en el SNC y el el Sistema Nervioso Periférico. Las células gliales principales del SNC son los oligodendrocitos, los astrocitos, la microglía y las células ependimarias. En la retina no hay células ependimarias, pero se observa un tipo de célula glial característico de la retina: la célula de Müller.

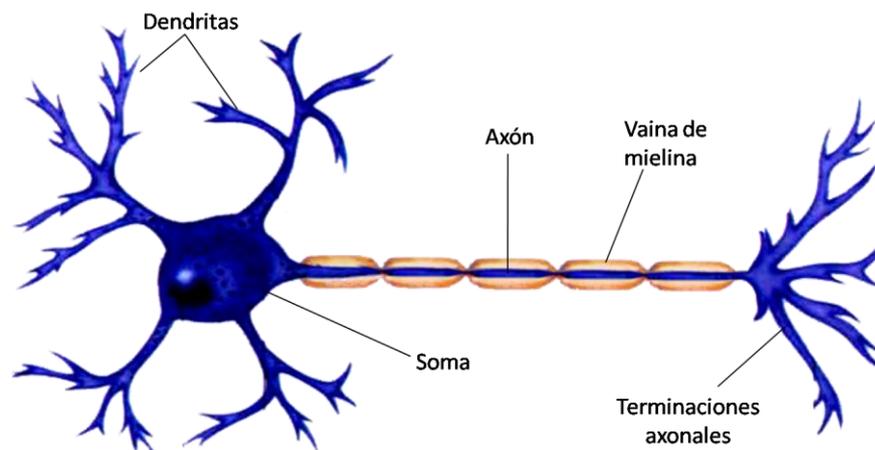


Figura 1.1. Esquema de las partes fundamentales de una neurona.

El sistema visual está formado por la retina, el nervio óptico (NO) y una serie de centros nerviosos dentro del SNC. La retina recoge la información luminosa procedente del exterior y la envía

al cerebro para su procesamiento (figura 1.2). En humanos, la información visual recogida en la retina pasa a través del NO, formado por los axones de las células ganglionares de la retina (CGR). Los NO de los dos ojos se juntan en el quiasma óptico, y la información procedente de éstos se divide antes de llegar al núcleo geniculado dorsolateral (DLGN). Una vez en el DLGN, mediante las radiaciones ópticas, la información es enviada a la corteza visual para su procesamiento (Dowling, 2012).

La retina se considera una extensión del SNC y se ha utilizado mucho para el estudio de éste. Dado que nuestro trabajo ha sido desarrollado en retinas de roedor, describiremos con detalle cada una de las características de este modelo animal.

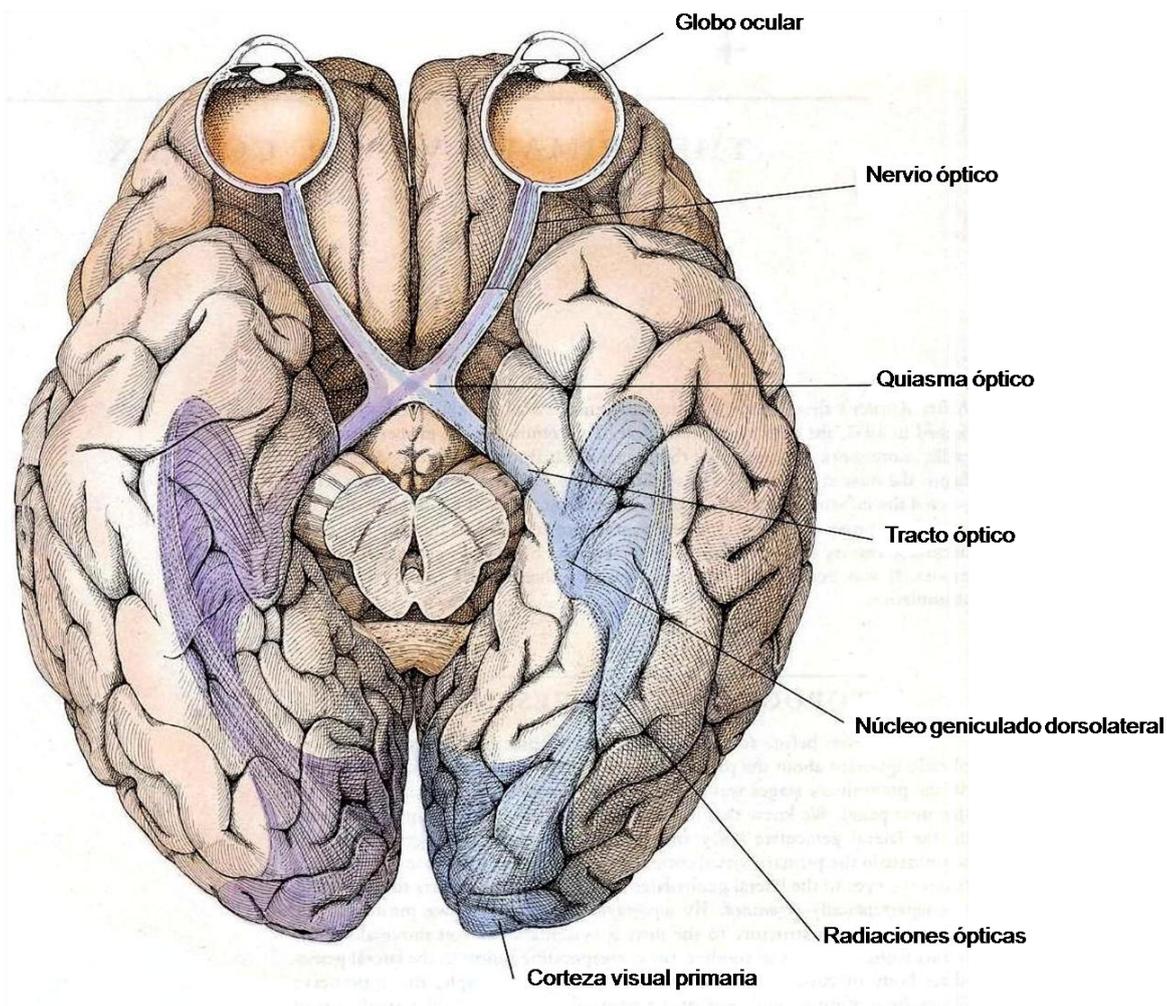


Figura 1.2. Sistema visual.

La retina recibe la información procedente del exterior y la envía por la llamada vía óptica a la corteza visual (Modificada de Hubel, 2000).

1.1.1. SISTEMA VISUAL DEL ROEDOR ADULTO

El sistema visual de los mamíferos en general es similar en cuanto a morfología y funcionalidad. Por ello, los modelos animales se utilizan para conocer detalladamente los mecanismos de una determinada patología y poder, a posteriori, asemejarlos al sistema visual humano. El modelo animal que más se asemeja al sistema visual humano es el del primate. Los primates tienen un tamaño ocular similar, buena agudeza visual y sus centros visuales son también similares, presentando columnas de dominancia ocular y columnas de orientación en la corteza visual. Además, los primates también tienen fóvea, una región especializada de la retina para la visión en detalle que se observa en la retina humana, y los tres mismos tipos de pigmentos visuales en los fotorreceptores (FR) que contiene la retina humana.

Debido a su facilidad de manejo y a otras ventajas, los roedores se utilizan cada vez más en la investigación del sistema visual (Huberman y Niell, 2011). El sistema visual de los roedores se asemeja al del resto de los mamíferos, aunque muestra algunas diferencias anatómicas con respecto a los demás. La estructura de la retina organizada en capas es idéntica a la de los otros mamíferos; sin embargo, no posee fóvea como los humanos y los primates, aunque sí posee una estría visual, una región de alta densidad celular de CGR (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2009). Dentro de los roedores, cada vez es más frecuente la utilización de ratones, ya que son manipulables genéticamente, y existen cepas transgénicas a las que se les hace expresar una determinada proteína exógena, y cepas knockout, a las que se les ha suprimido o inactivado un determinado gen.

1.1.2. ESTRUCTURA DEL GLOBO OCULAR DEL ROEDOR ADULTO

El globo ocular de los roedores posee una estructura muy similar al del resto de los mamíferos. Está formado por tres capas fundamentales (figura 1.3):

- **Capa externa.** Está formada por la córnea y la esclerótica. La córnea está formada por cinco capas, perfectamente organizadas para mantener su transparencia. Esta característica, junto con la forma de lente convexa permiten que la luz que procede del exterior la atraviese y se focalice posteriormente en la retina. En su parte anterior, la córnea está en contacto con la lágrima y en su parte posterior, con el humor acuoso de la cámara anterior. La esclerótica es una estructura rígida formada principalmente por fibras de colágeno, que da forma al globo ocular y protege las capas internas. Ocupa aproximadamente 4/5 partes del globo ocular y se une a la córnea por el limbo esclerocorneal. En su parte anterior y externa, está recubierta de conjuntiva y su parte interna y posterior está en contacto con la coroides.
- **Capa media o úvea.** Está formada por el iris y cuerpo ciliar, en la parte anterior; y la coroides, en la parte posterior. El iris separa la cámara anterior de la cámara posterior y es el encargado de

controlar la cantidad de luz que entra en el ojo. El espacio que deja en el centro forma la pupila, a través de la cual se comunican ambas cámaras, anterior y posterior. El cuerpo ciliar se encarga de producir el humor acuoso. La coroides es la capa vascular del globo ocular, y su principal función es nutrir a las capas externas de la retina.

- **Capa interna:** La capa más interna del globo ocular es la retina y está encargada de recoger la información luminosa procedente del exterior y enviarla al cerebro para su procesamiento. Está formada por capas de neuronas perfectamente organizadas y en su parte más interna, se encuentra en contacto con el humor vítreo de la cámara vítrea. En el siguiente apartado hablaremos de ésta con detalle (ver apartado 1.1.3).

El espacio comprendido entre la cara anterior de la córnea y la zona más anterior del humor vítreo está ocupado por humor acuoso y se divide en dos cámaras: anterior y posterior. La cámara anterior está delimitada por la cara anterior de la córnea y el iris. La cámara posterior comprende desde la parte posterior del iris hasta la zona más anterior de la cavidad vítrea. Por último, la cavidad vítrea es el espacio ocupado por el humor vítreo, está delimitado por la cámara posterior y la retina. El cristalino es una lente que se encuentra sujeta por los procesos ciliares del cuerpo ciliar y se encarga de enfocar la imagen en retina, modificando su curvatura en función de la posición de los objetos. En el roedor, el cristalino es prácticamente redondo y ocupa una gran parte de la cámara posterior del globo ocular.

El globo ocular se encuentra contenido en la órbita, y se mueve gracias a la acción de los músculos extraoculares, que son cuatro músculos rectos y dos oblicuos. En su zona posterior se observa el NO, que está formado por los axones de las CGR. Junto con el NO, se encuentra la arteria central de la retina, que entra en el ojo en la vaina de mielina que recubre al NO. Esta arteria procede de la arteria oftálmica y se divide en varias ramas a la entrada del globo ocular que se denominan arterias ciliares anteriores y posteriores (largas y cortas).

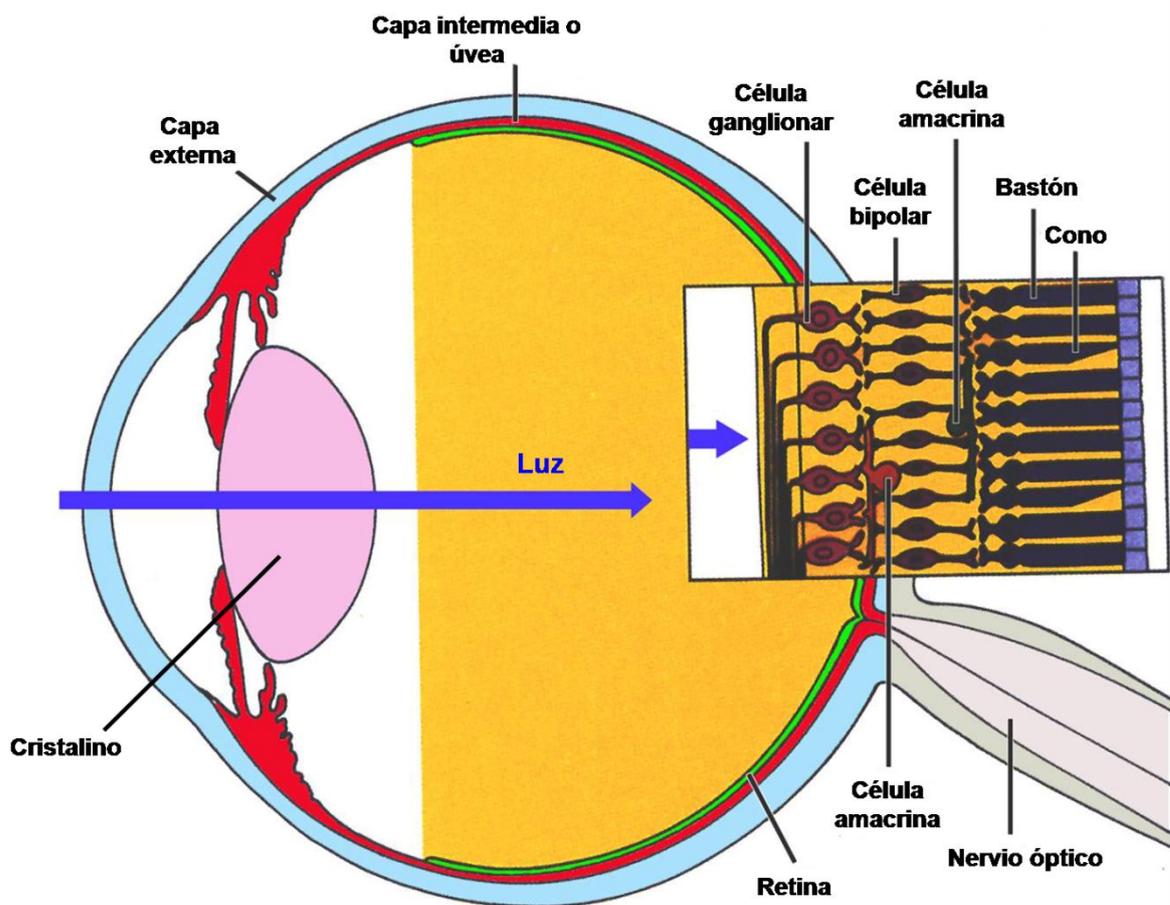


Figura 1.3. Esquema del globo ocular.

En este esquema se muestran las tres capas del globo ocular: la capa externa, la capa media o úvea, y la capa interna o retina (Modificada de Hubel, 2000).

1.1.3. ESTRUCTURA DE LA RETINA

El fácil acceso a la retina, unido a la posibilidad de estudiar el procesamiento de la información en una porción control del SNC convierte a esta estructura en un modelo de gran utilidad para estudios fisiológicos y morfológicos del Sistema Nervioso en general (Dowling, 2012). La retina fue descrita por Don Santiago Ramón y Cajal como “...una extensión periférica del Sistema Nervioso Central, cuya delicadeza, transparencia y otras características estructurales la hacen especialmente apta para el análisis histológico...” (Ramón y Cajal, 1972). La primera función de la retina consiste en la captación de la energía de las ondas electromagnéticas comprendidas en el espectro de luz visible y su transformación en energía eléctrica (Vidal-Sanz, 2006).

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 (1972) fue uno de los pioneros en este campo y la mayoría de sus descripciones y clasificaciones todavía continúan siendo válidas y se mantienen vigentes (figura 1.4).

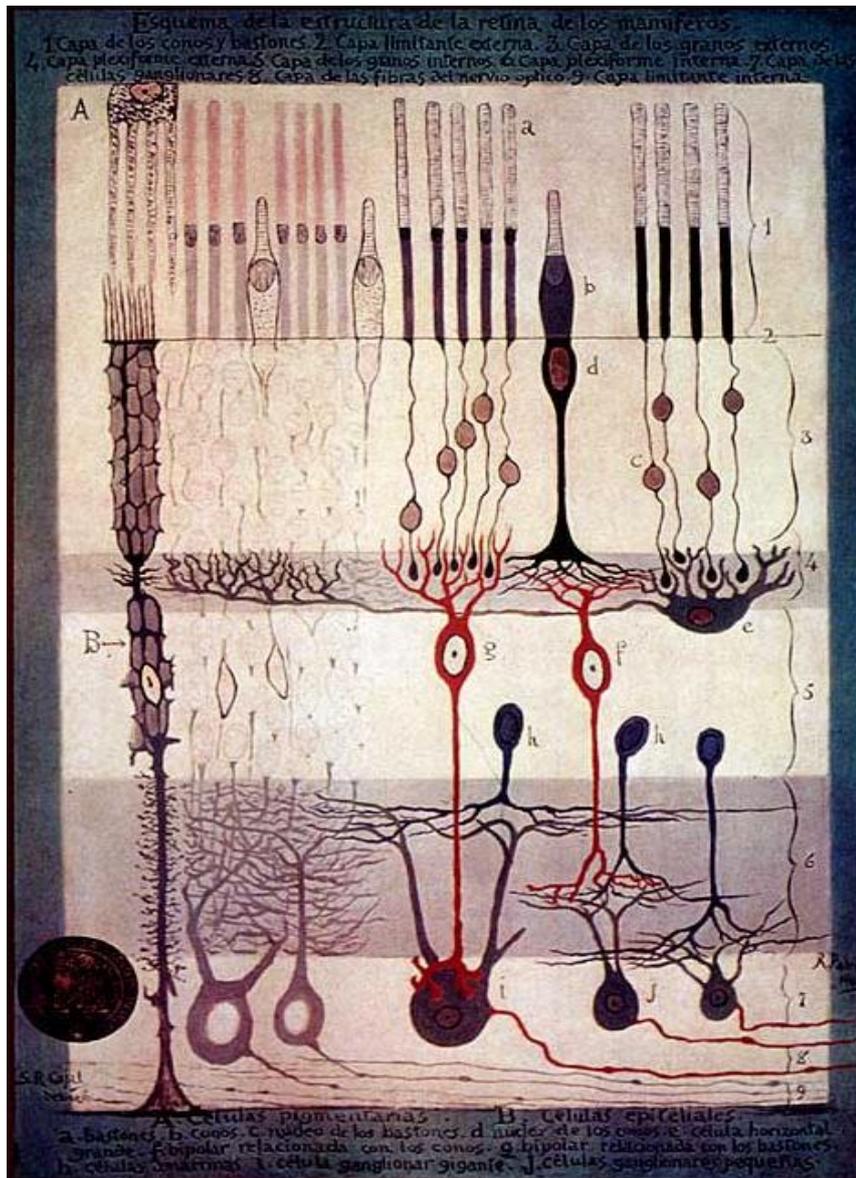


Figura 1.4. Esquema de la retina realizado por Santiago Ramón y Cajal.

En esta imagen se muestran todas las capas de la retina de mamífero. Se puede observar que en la capa inferior, correspondiente a la zona más interna, se encuentran los axones de las CGR que migran fuera de la retina, para formar el NO.

La retina es un centro nervioso altamente complejo. La retina de todos los animales vertebrados adultos, y especialmente la de mamífero, está formada por capas perfectamente organizadas. Aunque cada especie de vertebrado tiene algún tipo de especialización topográfica en la retina que la hace única, la laminación básica es constante en todos ellos. De la capa más interna a la más externa se distinguen (figura 1.5):

- Membrana limitante interna (MLI). Es la capa más interna de la retina. Es una auténtica lámina basal de glicoproteínas adheridas a los pies de las células de Müller, células gliales radiales que sirven de sostén a la retina.
- Capa las de fibras nerviosas de la retina (CFNR). Está formada por los axones de las CGR. Estos axones son lo que, a su salida de la retina, forman el NO (Polyak y cols., 1949; Ehinger, 1987; Ramón y Cajal, 1892; Kolb, 1994) y envían la información al cerebro.
- Capa de las células ganglionares (CCG). Está formada por los somas de las CGR y de las células amacrinas desplazadas (Jeon y cols., 1998). Las CGR reciben la información procedente de los FR, habiendo sido antes modulada por el resto de neuronas retinianas. En esta capa se encuentran también la mayor parte de las CGR intrínsecamente fotosensibles, un subtipo de CGR que contienen el pigmento melanopsina y que responden directamente a la luz (Provencio y cols., 2000). Nos referiremos a ellas como CGR melanopsínicas (CGRm).
- Capa plexiforme interna (CPI). Es una capa de neuropilo donde se establecen los contactos sinápticos entre las células bipolares, interplexiformes, amacrinas y CGR.
- Capa nuclear interna (CNI). Se encuentran los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes.
- Capa plexiforme externa (CPE). Es una capa de neuropilo donde sinaptan los fotorreceptores (lo has puesto antes, pero creo que aquí también viene bien) (FR), las células interplexiformes, las células bipolares y las células horizontales.
- Capa nuclear externa (CNE). En esta capa se encuentran los núcleos de los FR, conos y bastones. En la retina de roedores, los FR más abundantes son los bastones y, por ello está especializada en visión en condiciones escotópicas (Huberman y cols., 2011). A diferencia de los humanos y primates, que tienen tres tipos de conos, los roedores sólo tienen dos tipos, los que detectan la luz azul o conos S y los que detectan la luz roja/verde o conos L/M (Szel y cols., 1992; revisado en Bowmaker y cols., 2006; Ortín-Martínez y cols., 2010).
- Membrana limitante externa (MLE). Se encuentra entre los segmentos externos de los FR y sus núcleos y está constituida por las prolongaciones más externas de las células de Müller.

- Capa de los segmentos externos de los FR (SEF). En esta capa se alojan los segmentos externos de los FR.
- Epitelio pigmentario (EP). Aunque todas las capas de la retina derivan del neuroectodermo, esta es la única capa que no deriva de la retina neural. Está formado por una monocapa de células epiteliales y se encuentra en contacto con la capa media del globo ocular: la coroides, separado de ella por la membrana de Bruch.

Debido a que los FR se encuentran en las capas más externas de la retina, la luz tiene que pasar a través de todas las capas de la retina para llegar a ellos. Como se ha apuntado anteriormente, se distinguen dos tipos de FR: conos y bastones que son los encargados de la captación de la energía electromagnética y su transformación en impulsos eléctricos (Hubel, 2000).

Además de las neuronas, la retina contiene también varios tipos de células gliales: células de Müller, astrocitos y microglía. Aunque, a diferencia de lo que ocurre en el cerebro en la retina las células gliales suponen una pequeña proporción celular, su papel es fundamental para la función neuronal y de otras estructuras retinianas, como la vasculatura.

Las células de Müller son un tipo de glía característico de la retina y se extienden verticalmente a lo largo de todo el espesor de la retina, desde la MLE hasta la MLI. Los núcleos de las células de Müller se encuentran en la CNI. Se cree que su función principal es mantener la citoarquitectura retiniana, pero son también esenciales para mantener la homeostasis de la retina y regulan la función neuronal mediante diversos mecanismos, como la regulación del metabolismo de glutamato (Kanamori y cols., 2005).

Los astrocitos se encuentran en la papila, pero también en la CFNR y en la CCG, donde rodean los axones de las CGR y los vasos sanguíneos. En condiciones normales, su función es mantener las propiedades de las barreras endoteliales (Kanamori y cols., 2005) del SNC y proteger a las neuronas durante los procesos de envejecimiento (Ramírez y cols., 2010). Al igual que las células de Müller, son esenciales para mantener la homeostasis de la retina. Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el cerebro, ocupando un tercio de la masa del cerebro. Ambas poblaciones: astroglia y células de Müller realizan funciones similares, como proporcionar glucosa a las neuronas, regular los niveles de potasio extracelular, regular el metabolismo de neurotransmisores como GABA, eliminar el CO₂ de la retina y mantener la homeostasis del agua de la retina (Gallego y cols., 2012).

Las células de microglía se encuentran en varias capas de la retina: CFNR, CCG, CPI y CPE y presentan una forma ramificada (Sobrado-Calvo y cols., 2007). Son macrófagos vigilantes derivados de la línea hematopoyética, cuya función es fagocitar los detritos celulares, patógenos y los cadáveres de células que hayan muerto.

En las patologías retinianas se observa siempre una activación de las células gliales, extendiendo sus procesos (astroglía y células de Müller) y migrando a través de la retina (microglía) (Dowling, 2012).

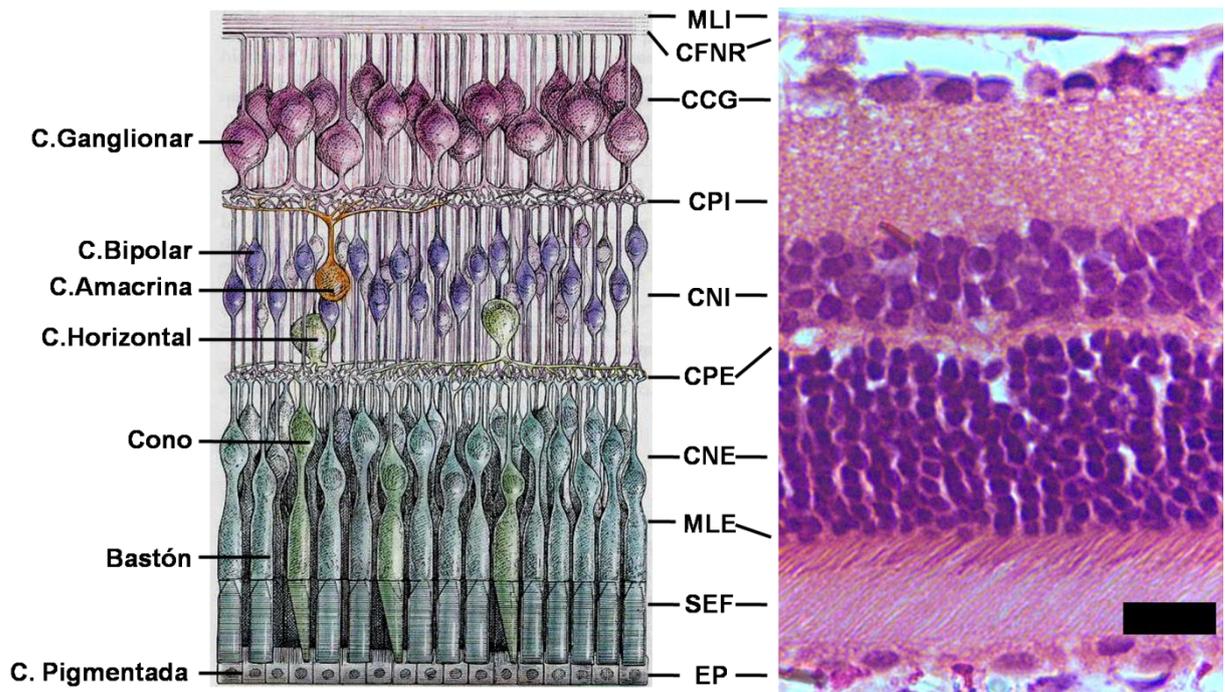


Figura 1.5. Organización laminar de la retina y sus principales tipos celulares.

A la izquierda se muestra un esquema de la estructura básica de la retina (modificada de Hubel, 2000) y a la derecha una microfotografía (40x) de un corte sagital de una retina de rata adulta Sprague-Dawley (Hematoxilina-eosina. Barra= 100 µm. Imagen cedida por el Dr. Diego García Ayuso). Abreviaturas: MLI, membrana limitante interna; CFNR, capa de las fibras nerviosas de la retina; CCG, capa de las CGR; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa; MLE, membrana limitante externa; SEF, segmentos externos de los FR; y EP, epitelio pigmentario.

1.1.4. LOS FOTORRECEPTORES CLÁSICOS

Los FR son las neuronas de la retina encargadas de detectar y transformar el estímulo luminoso en una señal eléctrica. Hasta hace una década se pensaba que en los mamíferos existían dos tipos de FR: los conos y los bastones. Recientes investigaciones han descrito la existencia de un tercer tipo de FR en la retina: las CGR intrínsecamente fotosensibles o melanopsínicas (CGRm), un subtipo de CGR que responde directamente a la luz. Hablaremos de ellas más adelante en profundidad.

En cuanto a los FR clásicos, los bastones son los FR sensibles a bajas intensidades luminosas e intervienen en la visión nocturna (escotópica), mientras que los conos son sensibles a mayores intensidades de luz e intervienen, por tanto, en la visión diurna (fotópica) y cromática. Los conos tienen una alta resolución temporal, pero son mucho menos sensibles que los bastones (Arendt, 2003). En los segmentos externos de los FR se ubican los pigmentos visuales o moléculas fotorreceptoras que están formados por una proteína y un cromóforo. La parte proteica es una proteína con 7 dominios transmembrana (figura 1.6), unidos a una proteína G o transducina intracelular, que transduce la señal y da comienzo a la cascada de fototransducción. Entre los dominios transmembrana se encuentra el cromóforo, derivado de la vitamina A, 11-cis-retinaldehído. Así, cuando los fotones llegan a la retina son absorbidos por estos pigmentos y provocan la isomerización del 11-cis-retinal a su forma trans, produciéndose un cambio conformacional. Estos cambios provocan la hiperpolarización de los FR, y se inicia la transmisión sináptica intrarretiniana.

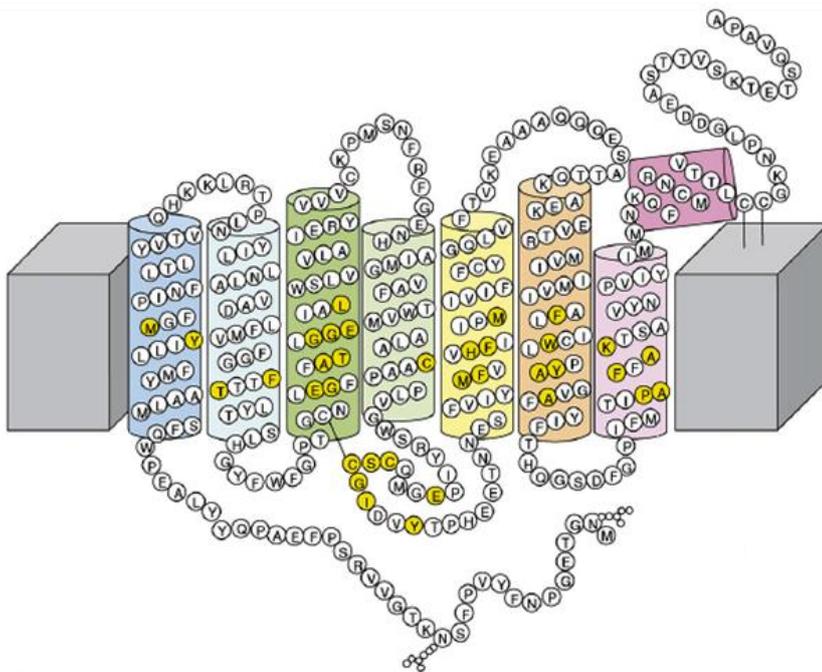


Figura 1.6. Estructura de los fotorpigmentos de vertebrados.

Modelo esquemático del pigmento visual en el que se muestran sus 7 dominios transmembrana insertados en la membrana del disco (Modificada de Hankins y cols., 2008).

Conos y bastones difieren en el tipo de pigmento visual: mientras que los bastones expresan rodopsina, los conos expresan opsinas específicas del tipo de cono. En humanos, existen tres tipos de opsinas de cono: opsina azul, opsina verde y opsina roja. La sensibilidad de las opsinas y rodopsina viene determinada por la máxima longitud de onda a la que responden. Así, pequeñas modificaciones en su estructura proteica hacen que el espectro de absorción sea diferente, con máximos de absorción a longitudes de onda distintas. La rodopsina responde máximamente a

longitudes de onda (λ) de 500 nm, mientras que la opsina azul responde a $\lambda = 450$ nm y se conoce como opsina S (del inglés “short-wavelength”), la opsina verde a $\lambda = 530$ nm y se conoce como opsina M (“medium wave-length”) y la opsina roja a $\lambda = 565$ nm y se conoce como opsina L (“long wave length”) (Yokoyama, 2000).

En los roedores existen solamente dos tipos de conos: los conos S, que expresan la opsina S (Szel y cols., 1993; Bowmaker y cols., 2006) y los conos L, que expresan la opsina LWS, opsina que es sensible a la luz verde (Jacobs y cols., 2001). También se ha documentado la existencia de conos duales en roedores, conos que expresan ambas opsinas (Ortín-Martínez y cols., 2010, 2013). En rata, los conos L son los más numerosos y se distribuyen por toda la retina, con la mayor densidad en la zona central. Los conos S suponen un 15% de la población total de conos y su mayor densidad se encuentra en la periferia de la retina. Por último, los conos duales, suponen en la rata un 3% de la población total de conos y, al igual que los conos S, su densidad es mayor en la periferia de la retina (Ortín-Martínez y cols., 2010). En el ratón pigmentado, se ha descrito que existe un número similar de conos S, de conos L y de conos duales en la retina (Ortín-Martínez y cols., 2013). Los conos L presentan una distribución similar a la de las retinas de rata, encontrándose una zona de mayor densidad en la zona central de la retina. Sin embargo, la distribución de los conos S difiere con respecto a la distribución de los conos S de la rata; en el ratón, los conos S presentan una mayor densidad en la zona inferotemporal de la retina (Ortín-Martínez y cols., 2013).

1.1.5. LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

Las CGR son únicas neuronas aferentes de la retina. Se encargan de recoger la información visual procesada en la retina y la envían al cerebro para su procesamiento a través de sus axones, que forman el NO. La mayoría de las CGR se encuentran en la CCG, aunque una minoría, las llamadas células ganglionares desplazadas, se encuentran en la CNI (Perry, 1979; Nadal-Nicolás y cols., 2012). La clasificación de las CGR es confusa, porque existen muchos tipos, se han denominado de manera diferente en distintas especies y porque se conocen poco o se desconocen las características funcionales y moleculares de los distintos tipos morfológicos.

En los últimos años se han descrito marcadores moleculares que identifican subtipos funcionales de CGR, como la melanopsina, pigmento que se expresa sólo en las CGR melanopsínicas o CGRm (Provencio y cols., 2000) o la proteína Jam-B que es específica de un subtipo de CGR-OFF que responden al movimiento hacia arriba (Kim y cols., 2008). Estudios recientes han descrito 22 subtipos de CGR en la retina del ratón adulto (Coombs y cols., 2006; Volgyi y cols., 2009), una clasificación similar a la descrita en gato y humano (Kolb y cols., 1981; Kolb y cols., 1992). Esta clasificación se basa en parámetros morfométricos, como tamaño y morfología del cuerpo celular y de la estratificación dendrítica, o niveles de estratificación, encontrando desde CGR con cuerpos celulares grandes y largas dendritas hasta pequeños cuerpos celulares y pequeños campos

dendríticos. Algunas de ellas son biestratificadas (Volgyi y cols., 2009). Se debe tener en cuenta la diversidad morfológica y funcional de las CGR del mamífero a la hora de planificar un estudio sobre este grupo celular tan complejo (Jeon y cols., 1998; Masland, 2001; Sharma 2004). La población de CGR de roedores ha sido utilizada para investigar las respuestas degenerativas y regenerativas de las neuronas del SNC adulto frente a estímulos nocivos, así como los efectos neuroprotectores de distintas sustancias o fármacos sobre las neuronas sometidas a estos estímulos. El uso "in vivo" de las CGR como modelo experimental para el estudio de la degeneración, supervivencia y regeneración neuronal en SNC está ampliamente aceptado y avalado por estudios previos (Vidal-Sanz, 2006), aunque en la mayoría de los estudios no se distingue entre los diferentes subtipos de CGR, sino que se estudia esta población de manera global.

1.1.5.1. Proyecciones de las células ganglionares de la retina

Las CGR proyectan sus axones al cerebro. A la salida del globo ocular, los axones convergen para formar el NO, por donde llegan al quiasma óptico. En roedores, más del 95% de los axones de las CGR se decusan a nivel del quiasma (Lund, 1965; Perry, 1979; Drager y Olsen, 1981; Linden y Perry, 1983, Nadal-Nicolás y cols., 2012), a diferencia de los humanos, en los que sólo se decusan el 50% de los axones. Las CGR del roedor proyectan a las siguientes regiones del cerebro: núcleo supraquiasmático, núcleo óptico accesorio, núcleo pretectal, núcleo geniculado ventrolateral, el DLGN y el colículo superior (CS) (Rodiek, 1979). Éste último es el principal territorio de proyección de las CGR en roedores (Lund, 1965; Perry, 1981; Linden y Perry, 1983, Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b). La proyección de los axones en las distintas regiones del cerebro se realiza de una manera topográfica muy precisa (Linden y Perry, 1983; Sauvé y cols., 2001; 2002).

Los CS son dos protuberancias situadas en la parte dorsal del mesencéfalo, rostrales al colículo inferior (figura 1.7). 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. Las tres primeras capas, llamadas capas superficiales o visuales, reciben aferencias retinianas y se encargan de procesar los estímulos visuales (Hofbauer y Dräger, 1985; Sefton y Dreher, 1985), mientras que las cuatro restantes procesan la información auditiva y somatosensorial (Stein, 1984). Se piensa que esta estructura se encarga de coordinar la información visual, auditiva y motora.

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).

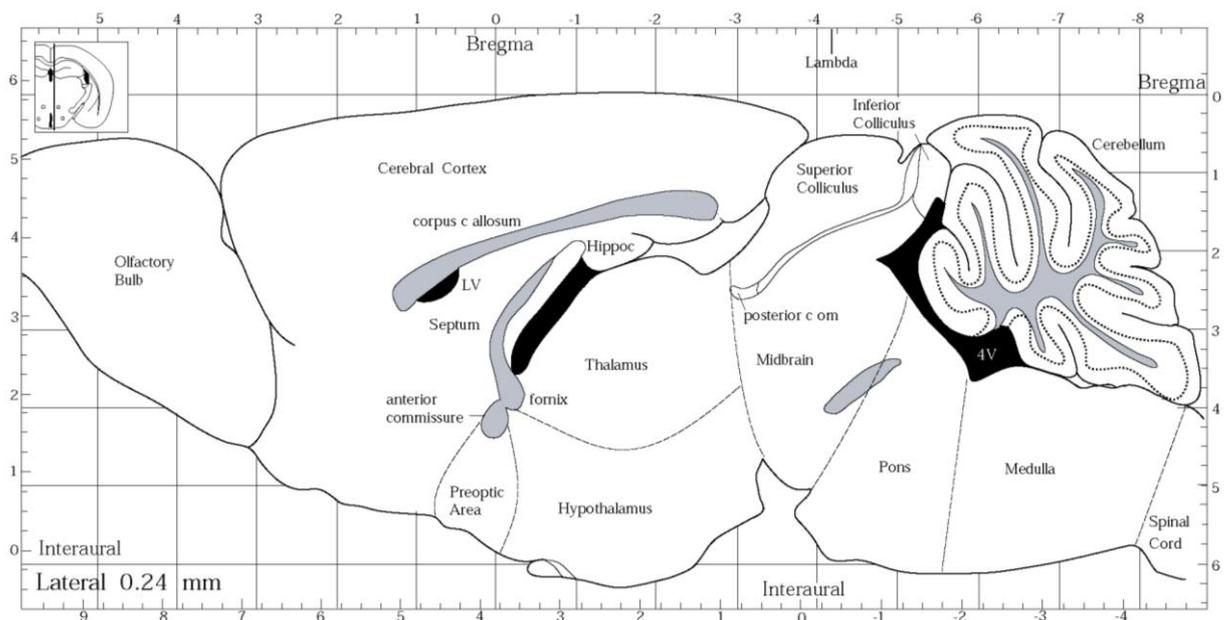


Figura 1.7. Localización de los colículos superiores en el cerebro del ratón.

Esquema sagital del cerebro de ratón donde se aprecia el CS (superior colliculus) como una protuberancia situada en la parte dorsal del mesencéfalo, rostral al colículo inferior (inferior colliculus) (Tomada de Paxinos y Franklin, 2001 ("The mouse brain in stereotaxic coordinates")).

1.1.5.2. Identificación de las células ganglionares de la retina

Las CGR se utilizan como modelo para estudiar los cambios degenerativos asociados a la lesión axonal del SNC y las propiedades neuroprotectoras de diversas sustancias. Para poder conocer con exactitud tanto la proporción de CGR que mueren tras un insulto como la que sobrevive tras un tratamiento, es muy importante su identificación para diferenciar estas células de las células amacrinias desplazadas, ya que ambos tipos celulares se encuentran en la CCG. Para la identificación de las CGR existen diferentes procedimientos que detallaremos a continuación.

1.1.5.2.1. Identificación morfológica por medio de microscopía óptica

La identificación de las CGR por su morfología utilizando tinciones clásicas como la hematoxilina/eosina o el azul de metileno es imperfecto, porque no se pueden discriminar completamente de las células amacrinas desplazadas (Villegas-Pérez y cols., 1988). Además en roedores, éstas células pueden llegar a suponer casi el 50% de las células que se localizan en la capa de CGR (Perry, 1981).

1.1.5.2.2. Marcaje retrógrado con trazadores neuronales

Para la identificación de las CGR se han usado distintos trazadores retrógrados aplicados de distintas formas y en distintos lugares de la vía visual dependiendo del estudio a desarrollar. Este método de marcaje permite, colocando el trazador neuronal correspondiente en el centro de proyección de las CGR, marcar toda la población a estudiar (revisado en Vidal-Sanz y cols., 2012). El trazador se transporta retrógradamente por los axones de las CGR desde el centro de proyección hasta el soma celular. Para identificar la inmensa mayoría de las CGR, en rata y ratón, los trazadores son aplicados en los CS, bien estereotáxicamente, o bien sobre su superficie completa, como se realiza en nuestro grupo. También pueden aplicarse sobre el muñón del NO (MNO) o alrededor del mismo (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2012), para trazar la población retinofugal completa.

Se han utilizado distintos tipos de trazadores neuronales para marcar las CGR: la **peroxidasa de rábano** (HRP; horseradish peroxidase) (Perry, 1981); las **carbocianinas** como: Dil (Vidal-Sanz y cols., 1988), 4Di-10ASP (Thanos, 1993); el **Fast Blue** (Vidal-Sanz y cols., 1998; Villegas-Pérez y cols., 1988); las **rodaminas** (Thanos y cols., 1987), principalmente el dextrano de tetrametil rodamina (DTMR) (WoldeMussie y cols., 2001); y el **Fluorogold** (FG) (Mansour-Robaey y cols., 1994; Sellés-Navarro y cols., 1996; Vidal-Sanz y cols., 2001; Lafuente y cols., 2002). El FG y su análogo, el metanosulfonato de hidroxistilbamidina (OHSt), son los trazadores de elección por la mayoría de los grupos que trabajan en este campo. El número y la distribución espacial de las CGR en ambas especies trazadas desde los CS o desde el MNO, ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2013) (ver más adelante). De ahora en adelante, nos referiremos a las CGR trazadas con FG u OHSt como CGR-FG⁺ (CGR FG positivas) y CGR-OHSt⁺ (CGR OHSt positivas).

1.1.5.2.3. Inmunodetección

Se puede realizar el marcaje de las CGR utilizando la inmunodetección mediante anticuerpos contra proteínas que se expresan en estas células. Se han descrito varias proteínas que se expresan específicamente en las CGR:

- **Thy 1.** Es una proteína de superficie celular que se encuentra en diversas partes del SNC. En retina de roedores, la proteína Thy-1 se expresa en las CGR, tanto rata como ratón (Barnstable y Dräger, 1984; Perry y cols., 1984). Leung y cols., (2008) han descrito que la expresión de proteína fluorescente de color cian (Cyan Fluorescent Protein, CFP) bajo el promotor de Thy-1 marca el 96,1% de la población de CGR de ratón. La proteína Thy-1 ha sido utilizada como marcador de CGR en modelos experimentales de isquemia y excitotoxicidad (Nash y cols., 1999). Sin embargo, otros estudios posteriores han documentado una disminución de la expresión de Thy-1 después de una lesión, sin que suponga la muerte o desaparición de las CGR, en lesiones como glaucoma (Schlamp y cols., 2001; Huang y cols., 2005), sección del NO (SNO) (Chidlow y cols., 2005), aplastamiento del NO (Schlamp y cols., 2001). Este hecho, junto con otros estudios que indican que la proteína Thy-1 no se expresa en todos los subtipos de CGR (Huang y cols., 2006) y que, a consecuencia de la lesión, se expresa en las células de Müller, (Dabin y Barnstable, 1995) hace que la utilización de Thy-1 como marcador de CGR en situaciones patológicas no sea recomendable.
- **Proteínas Bex1 y Bex2.** Se expresan en CGR de ratón, en el soma y los axones de éstas (Bernstein y cols., 2006). El hecho de que estas proteínas marquen también los axones, impide la cuantificación automática de las CGR y por ello estos marcadores son poco utilizados.
- **Rbpms.** Es una proteína de la familia de “proteínas de unión a RNA” que ha sido utilizada como marcador de CGR en modelos de excitotoxicidad, aplastamiento del NO e hipertensión ocular (Kwong y cols., 2009, 2011, 2013). Se expresa en un 99,5% de las CGR trazadas con FG. El inconveniente es que hasta la fecha no existen anticuerpos comerciales.
- **NeuN.** La proteína nuclear específica de neuronas (NeuN) se expresa en la mayoría de las neuronas del SNC (Mullen y cols., 1992). En retina, se expresa en las CGR y ha sido utilizada como marcador de éstas tras una patología (Wang y cols., 2000; Buckingham y cols., 2008). Sin embargo, esta proteína no es un marcador específico de CGR, porque también se expresa en las células amacrinas desplazadas, y por ello en la actualidad está en desuso.
- **Factores de transcripción con dominio POU clase IV (Pou4f) o Brn3 (brain-specific homeobox 3):** Estos factores de transcripción se expresan en neuronas sensoriales, y juegan un papel importante en el desarrollo, diferenciación y supervivencia de las mismas. En la retina de roedor adulto, los factores de transcripción Brn3 se expresan únicamente en las

CGR (Xiang y cols., 1993, 1995). Son tres miembros: Brn3a (POU4f1), Brn3b (POU4f2) y Brn3c (POU4f3). Todos ellos se expresan en CGR, en mayor o menor proporción y, en algunos casos co-expresan ambos a la vez, y cada uno de ellos tiene un papel diferente en el desarrollo de las CGR (Badea y Nathans, 2011; Badea y cols., 2012, Nadal-Nicolás y cols., 2012).

El Brn3a se encarga de controlar la estratificación dendrítica de las CGR (Badea y cols., 2009). En rata adulta, el Brn3a se expresa en un 92,2% de la población total de CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2009). Además, en contraposición con Thy-1, la expresión de Brn3a se mantiene en las CGR mientras estas estén vivas y su patrón de expresión no cambia tras la axotomía retiniana. Es, por tanto, un marcador excelente para analizar el curso temporal de muerte de las CGR es distintos paradigmas experimentales, como la SNO o el aplastamiento del NO (Nadal-Nicolás y cols., 2009), hipertensión ocular (Salinas-Navarro y cols., 2010), o las degeneraciones retinianas (García-Ayuso y cols., 2010, 2011) y su supervivencia tras un tratamiento neuroprotector (Sánchez-Migallón y cols., 2011). En ratón, el Brn3a también se expresa selectivamente en las CGR (Quina y cols., 2005). Como uno de los objetivos de este trabajo es analizar el patrón de expresión y el potencial uso de este factor de transcripción como marcador de CGR de ratón, hablaremos de él en detalle en el apartado 1.1.5.3.

El Brn3b es esencial para la diferenciación, supervivencia y la formación de axones de las CGR. En ratones knockout de la proteína Brn3b, las células que empiezan a diferenciarse en CGR acaban por diferenciarse en células amacrinas u horizontales, por lo que el número de CGR tras la diferenciación se reduce en un 30%, incluyendo algunas CGR que expresarían Brn3a y Brn3c (Badea y cols., 2009). Algunos estudios han documentado que el Brn3b marca la totalidad de las CGR de ratón (Leahy y cols., 2004; Buckingham y cols., 2008) y rata (Leahy y cols., 2004; Bernstein y cols., 2006), aunque un estudio reciente ha descrito que en rata, el Brn3b se expresa únicamente en un 65% de las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2012).

El Brn3c es necesario para las proyecciones ipsilaterales (revisado por Nadal-Nicolás y cols., 2012). Tanto en rata como en ratón, es el factor de transcripción Brn3 que se expresa en menor proporción. En rata, se ha descrito que el Brn3c se expresa en un 51% de las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2012) y en ratón en torno al 30% (Xiang y cols., 1995).

- **Melanopsina.** Es una proteína descubierta por Provencio y cols., (1998, 2000), que se expresa únicamente en la subpoblación de CGR que son sensibles a la luz, CGRm. Como uno de los objetivos de nuestro estudio fue caracterizar esta población celular en la retina de rata adulta, lo detallaremos en profundidad en el apartado 1.1.6.

1.1.5.2.4. Hibridación “in situ”: Gamma-sinucleína

La hibridación in situ se usa para detectar, en vez de la proteína, su ARNm en las CGR. Esta es la técnica que se utiliza para detectar la γ -sinucleína, una proteína específica de CGR, que se expresa en sus somas y axones. La identificación de su ARNm en vez de la proteína permite la cuantificación automática de las CGR que la expresan, ya que en general los ARNm se encuentran en el soma, y por lo tanto la señal es más fácilmente cuantificable (Surgucheva y cols., 2008; Soto y cols., 2008, 2011). Sin embargo, esta técnica es menos utilizada que la inmunodetección de proteínas por ser más complicada.

1.1.5.3. Brn3a (POUf1 o Brn3.0)

El Brn3a es un factor de transcripción y, como tal, reside en el núcleo y actúa interaccionando con sitios específicos de unión a DNA (promotores) situados en la cercanía de los genes a los que regula (Eng y cols., 2004).

Desde el punto de vista estructural, el Brn3a es una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción con dominio POU (Pit-Oct-Unc). Esta familia de factores de transcripción fue inicialmente identificada por un dominio de 150-160 aminoácidos presentes en las proteínas reguladoras Pit-1, Oct-1, Oct-2 y Unc-86 (Latchman y cols., 1998). El Brn3a pertenece a la subfamilia IV, de la cual, en mamíferos, también son miembros el Brn3b y Brn3c. Los tres factores Brn3 están íntimamente relacionados en cuanto al dominio POU, pero muestran escasa homología fuera de estos dominios (Theil y cols., 1993).

El Brn3a se expresa predominantemente en células neuronales, tanto en el SNC como Sistema Nervioso Periférico (SNP). Usando animales transgénicos, en los que se expresaba un gen chivato bajo el promotor de Brn3a, se ha descrito que la expresión de Brn3a comienza durante el desarrollo y se mantiene en el adulto, siendo específica de las CGR (Quina y cols., 2005). Las CGR que expresan Brn3a en ratón son las que proyectan contralateralmente tanto a los CS como al DLGN (figura 1.8), aunque éstas últimas son una minoría. Como el 96,5% de las CGR proyectan contralateralmente, el Brn3a se expresa en la mayoría de las CGR de ratón (Quina y cols., 2005).

Sin embargo, no se sabe qué proporción de la población total de CGR de ratón expresan este factor de transcripción ni si su patrón de expresión se puede alterar en situaciones patológicas. En retina de rata, estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que el Brn3a es un buen marcador de CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2009) ya que permite marcar las CGR una vez procesado el animal, por lo que no requiere marcaje in vivo mediante técnicas quirúrgicas, como se requiere con los trazadores neuronales como el FG. Por otra parte, el Brn3a no se expresa en las células de microglía fagocíticas que, sin embargo, se marcan transcelularmente en retinas trazadas y lesionadas (ver más adelante). Son numerosos los estudios que han utilizado el Brn3a como marcador de CGR

de rata (Parrilla-Reverter y cols., 2009; Ganesh y cols., 2011; García-Ayuso y cols., 2010, 2011; Sánchez-Migallón y cols., 2011; Zhang y cols., 2012).

Uno de los objetivos principales de este estudio fue caracterizar la población de CGR que expresan Brn3a en retinas de ratón, y comprobar si es un buen método de identificación de estas neuronas. Por otra parte, también analizaremos si en las retinas de rata, las CGRm expresan Brn3a. Para hablar de las CGR inmunodetectadas con Brn3a, nos referiremos a ellas de ahora en adelante como CGR-Brn3a⁺ (CGR Brn3a positivas).

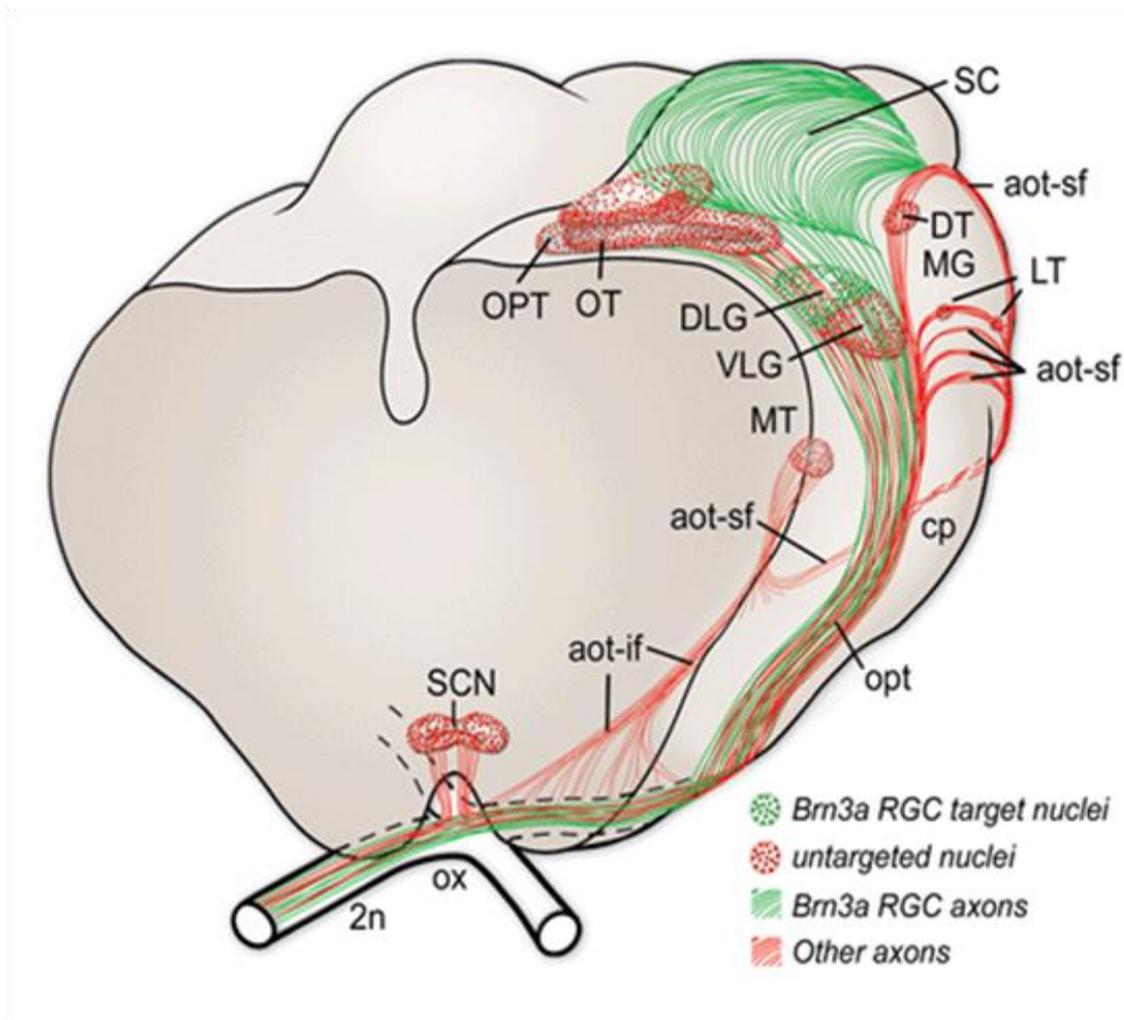


Figura 1.8. Áreas de proyección de las CGR que expresan Brn3a en ratón adulto.

Este gráfico muestra que los axones de las CGR-Brn3a⁺ (verde) proyectan principalmente al colículo superior (SC) y una minoría al núcleo geniculado dorsolateral (DLGN) contralaterales (Modificada de Quina y cols., 2005).

1.1.5.4. Cuantificación de las células ganglionares de la retina

La cuantificación del número de CGR se ha convertido en una herramienta esencial para evaluar tanto los daños patológicos y los efectos neuroprotectores que, sobre esta población celular, pueden tener diversas enfermedades y tratamientos (Fileta y cols., 2008).

La cuantificación de las CGR se ha aplicado en roedores en diferentes modelos experimentales de enfermedades de retina, como: isquemia-reperfusión (Lafuente y cols., 2001, 2002b; Lam y cols., 1997; Sellés-Navarro y cols., 2002; Vidal-Sanz y cols., 2003), aplastamiento parcial del NO (Yoles y cols.; 1999; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla-Reverter y cols., 2009a, 2009b), sección completa de NO (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988; Peinado-Ramón y cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009), inyección citotóxica (Vorwerk y cols., 1996), degeneración retiniana (García-Ayuso y cols., 2010, 2011) o elevación crónica de la presión intraocular (Laquis y cols., 1998; Sawada y Neufeld, 1999; Salinas-Navarro y cols., 2010).

Existen diversos métodos de cuantificación que dependen también del método de identificación utilizado. Algunos métodos utilizados son manuales y otros automáticos. En algunos casos se realiza una estimación del número total en función de la densidad encontrada en unas determinadas áreas. Dado el elevado número de CGR en cada retina de ratón, es interesante poder utilizar métodos automáticos, que faciliten la labor de la cuantificación, además de evitar la subjetividad del investigador. A continuación se detallan los métodos más usados:

- Cuantificación indirecta de CGR contando el número de axones en el NO

Se acepta que en el NO de mamíferos prácticamente la totalidad de las fibras nerviosas pertenecen a los axones de las CGR, asumiéndose que cada axón se corresponde con una CGR. De esta forma se puede estimar esta población celular en la retina. Las estimaciones realizadas en rata determinan, basándose en el número de axones, que el número de CGR de la retina de rata adulta oscila entre 96.200 y 118.300 (De Juan y cols., 1978; Forrester y Peters, 1967). En el ratón, el número de axones cuantificado es 64.746 (Honjin y cols., 1977).

- Cuantificación manual de CGR

La cuantificación de las CGR se realiza mediante el cálculo de su densidad media tras el conteo manual de tres áreas de muestreo estándar preestablecidas (Villegas-Pérez y cols., 1988,1993; Sellés-Navarro y cols., 1996; Peinado-Ramón y cols., 1996) en montajes globales de retina.

- Cuantificación automática de las CGR

Este procedimiento permite cuantificar la totalidad de la población de CGR de rata y ratón. Se ha utilizado cuando estas células son trazadas retrógradamente (Danias y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b), inmunodetectadas por su expresión de Brn3a (Nadal-Nicolás y cols., 2009), o tras la identificación del ARNm de γ -sinucleína (Soto y cols., 2008).

En la rata albina Sprague-Dawley (SD), el número medio de CGR trazadas con FG desde los CS o inmunodetectadas con Brn3a es de 81.486 ± 4.340 y 83.449 ± 4.541 , respectivamente (Salinas-Navarro y cols., 2009a; Nadal-Nicolás y cols., 2009). En ratón pigmentado C57BL/6 y ratón albino Swiss el número medio de CGR trazadas con OHSt desde los CS es de 41.192 ± 3.395 , y 48.733 ± 3.954 , respectivamente (Salinas-Navarro y cols., 2009b).

Tanto el trazado con FG como la inmunodetección de Brn3a tienen sus ventajas e inconvenientes. El trazado nos informa de que las CGR mantienen su transporte axonal retrógrado activo, ya que el FG se transporta activamente. Sin embargo, si las retinas se marcan antes de que ocurra la pérdida de CGR, aparecen en la retina células de microglía transcelularmente marcadas con el trazador (Thanos y cols., 1991b, 1992). Este marcaje se produce porque las células de la microglía fagocitan las CGR trazadas y que posteriormente han muerto y acumulan el trazador en los fagosomas, de manera que también se “marcan”. Este proceso se conoce como marcaje trans-celular (Thanos y cols., 1991b, 1992). Aunque manualmente se puede contar el número de CGR, ya que son morfológicamente distintas de las células de microglía, el marcaje transcelular impide el conteo automático de las CGR (ver más adelante).

La posibilidad de detectar las CGR usando técnicas inmunohistofluorescentes tiene ciertas ventajas sobre el uso de trazadores, ya que no requiere de manipulaciones experimentales previas al procesado del animal y no se produce marcaje de las células de microglía (Sobrado-Calvo y cols., 2007; Wohl y cols., 2010). Sin embargo, la inmunodetección de Brn3a no nos informa del transporte axonal, pero se sabe que el Brn3a es una proteína endógena que deja de expresarse en las CGR cuando éstas entran en apoptosis (Nadal-Nicolás y cols., 2012; Sánchez Migallón, comunicación personal). Así, la inmunodetección de Brn3a permite realizar un curso temporal de muerte más real (Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2012). El uso de ambos métodos combinados es muy útil y ha permitido, por ejemplo, describir que en modelos de hipertensión ocular hay primero una pérdida del transporte axonal seguida de muerte de CGR (Salinas-Navarro y cols., 2010).

1.1.5.5. Distribución espacial de las células ganglionares de la retina

En el estudio de las CGR es importante también saber su distribución espacial en la retina. Utilizando los datos obtenidos de las cuantificaciones automáticas, nuestro grupo ha desarrollado una técnica para realizar mapas de isodensidad de las CGR detallados que ilustran, gráficamente, en qué

áreas de la retina de rata (Salinas-Navarro y cols., 2009a, Nadal-Nicolás y cols., 2009) y ratón (Salinas-Navarro y cols., 2009b) existen mayores o menores densidades de CGR. Estos mapas se pueden realizar cuando las células son identificadas con FG (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b) o por su expresión de Brn3a (Nadal-Nicolás y cols., 2009). Por medio de estos mapas (figura 1.9) hemos podido establecer que las CGR no se distribuyen homogéneamente en la superficie retiniana y que existe una zona de mayor densidad de CGR situada en el área dorsal de la retina a lo largo del eje naso-temporal, a 1 mm del NO aproximadamente, que se ha llamado estría visual (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Ortín-Martínez y cols., 2010).

Los mapas de isodensidad nos permiten saber si una lesión determinada afecta a toda la retina por igual (Nadal-Nicolás y cols., 2009) o si por el contrario, la pérdida celular se produce en áreas concretas (Salinas-Navarro y cols., 2010). De la misma forma, estos mapas pueden servir para ver si un determinado tratamiento neuroprotector aumenta la supervivencia de CGR en toda la retina o solamente en algunas regiones de ésta (Sánchez-Migallón y cols., 2011).

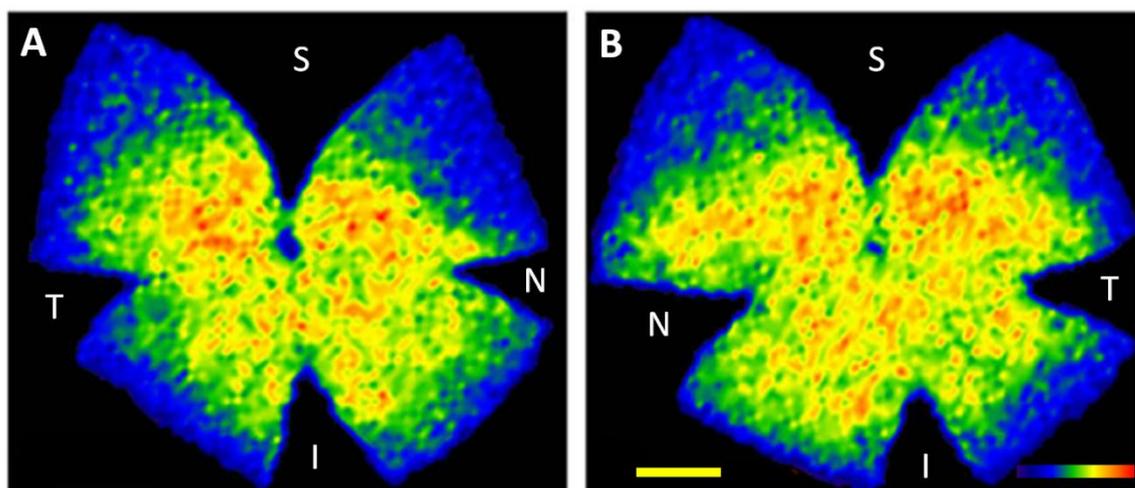


Figura 1.9. Distribución de las CGR trazadas con OHSt desde los colículos superiores en ratón.

En estos mapas de isodensidad podemos ver la distribución de las CGR en un montaje global de una retina derecha (**A**) y una izquierda (**B**). Se puede observar que las CGR no se distribuyen homogéneamente por toda la retina y que hay una zona de mayor densidad en la hemirretina superior. Estos mapas se generan en base a la densidad de CGR en cada una de las 36 divisiones de cada fotografía individual que compone el fotomontaje (154 fotos por retina), y se asigna a cada densidad un código de color que va desde 0 (azul) a 5.625 o más (rojo) CGR/mm² (modificada de Salinas-Navarro y cols., 2009b). Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra=1mm.

1.1.6. LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS

Además de la visión, existen otros procesos fisiológicos que se desencadenan en los animales como respuesta a la luz. Estas funciones son conocidas como “extravisuales”, o sistema no formador de imágenes, por ejemplo, el reflejo pupilar y la sincronización del ritmo circadiano. Los ritmos circadianos son ciclos biológicos endógenos de 24 horas que permiten sincronizar nuestro cuerpo con la luz solar. Estos ritmos se conservan incluso cuando el organismo está privado de las señales ambientales que marcan los cambios de horario, lo que indica que se mantienen por la actividad de un reloj endógeno. Este proceso se denomina sincronización a la luz (en inglés “photoentrainment”) y permite regular el sueño, la temperatura corporal, los niveles hormonales y otras muchas variables fisiológicas que presentan oscilaciones durante el día, cuando se detecta algún cambio en la intensidad luminosa, como el amanecer o anochecer (Hankins y cols., 2008).

Para que los animales, tanto vertebrados como invertebrados, respondan a la luz existen diversos sistemas fotosensibles, órganos fotorreceptores que poseen un determinado fotopigmento similar a los de los FR clásicos de la retina. Los FR extraoculares responden a cambios bruscos en la luz ambiental (irradiancia), para controlar el sueño, los ritmos circadianos, la orientación, regulación de la temperatura corporal, tamaño pupilar y pigmentación y coloración de la piel (Davies y cols., 2010). Los animales invertebrados poseen FR rabdoméricos, expansiones membranosas en forma de microvilli. Para detectar la luz, estos FR se encuentran en la superficie. Los animales vertebrados, sin embargo, poseen FR ciliares, estructuras membranosas que derivan de estructuras ciliares. Durante la evolución de los animales, estos FR han ido localizándose en lugares más específicos del cerebro, con fotopigmentos de diversa complejidad que actúan en diferentes aspectos de la fisiología y comportamiento (Peirson y cols., 2009). Los peces, anfibios y reptiles poseen FR en la glándula pineal, situada en el diencefalo, que es fotosensible gracias a un fotopigmento similar a las opsinas de los conos. La función principal de esta glándula es la de segregar melatonina, en función de los ciclos de luz y oscuridad, y esto le permite controlar los ritmos circadianos, la regulación de los cambios de color de la piel en peces y anfibios (Foster and Hankins, 2002); las ranas y otros anfibios poseen además fotopigmentos dermales, y el “tercer ojo” extracraneal; los peces óseos poseen células horizontales fotosensibles en los ojos laterales, e iridocitos fotosensibles en la córnea (Davies y cols., 2010). De todos los FR extraoculares, los que se encuentran en el cerebro y la glándula pineal han sido encontrados en todos los vertebrados no mamíferos y tienen un papel muy importante en la regulación de los ritmos circadianos.

Durante muchos años se pensaba que, en mamíferos, las únicas células fotosensibles eran los FR conos y bastones, aceptando así que los mamíferos más evolucionados habían limitado la sensibilidad a la luz a éstos, tanto para la función visual como para el sistema no formador de imágenes, mientras que en otros vertebrados más “primitivos” seguían existiendo FR extraoculares. Sin embargo, ya en el año 1928, Clyde Keeler aportó evidencias de que en vertebrados también hay otros tipos de células fotosensibles. Este autor llevó a cabo las primeras observaciones en ratones que presentaban una gran degeneración de las capas externas de la retina, donde se encuentran los

núcleos de los FR. Cuando la mayor parte de los conos y bastones habían degenerado y, por tanto, eran considerados ciegos funcionalmente, observaron que en estos ratones existían aún varios reflejos visuales, como la constricción de pupilas en respuesta a la luz (Keeler y cols., 1928). Foster y cols., (2002) mostraron que estos ratones modificaban sus ritmos biológicos conforme variaban los ciclos de luz y oscuridad (Foster y Hankins, 2002). Sin embargo, si los animales eran enucleados o sufrían una degeneración de CGR (Van Gelder, 2003), este proceso desaparecía. Posteriormente se describieron las CGRm, que explican este fenómeno. Así, en mamíferos, tanto los FR encargados de la función visual como las CGRm forman vías paralelas, actuando como sensores de luz para el sistema visual formador y no formador de imágenes, respectivamente (Graham, 2008).

La melanopsina es una opsina responsable de la redistribución del pigmento de la piel de rana en respuesta a la luz (Provencio y cols., 1998), y también se expresa selectivamente en una pequeña subpoblación de CGR de roedor, las CGRm (Provencio y cols., 2000). Gracias a la expresión de la melanopsina, esta pequeña subpoblación posee la capacidad de responder directamente a la luz. La sensibilidad requerida para la sincronización circadiana difiere de la necesaria para la función visual: la intensidad luminosa debe ser mucho mayor para el ritmo circadiano. Posiblemente, el hecho de que los mamíferos hayan perdido el resto de los FR externos a la retina se deba a que, en mamíferos que viven bajo tierra o que se desenvuelven por la noche, éstos no son lo suficientemente sensibles para discriminar cambios luminosos (Davies y cols., 2010).

La melanopsina es detectada a partir del día 18 del desarrollo embrionario de rata y comienza a responder a la luz en las CGR en el momento del nacimiento, a diferencia de los conos y bastones, que comienzan a ser fotosensibles al décimo día después del nacimiento. Esto podría deberse a la necesidad de adaptarse a los ritmos circadianos incluso antes de poseer visión (Nayak y cols., 2007).

El gen de la melanopsina fue denominado OPN4. En el anfibio *Xenopus Laevis* se expresa en el NSQ, en células horizontales dermales, en el epitelio pigmentario de la retina y el iris. En mamíferos, este gen es similar en diversas especies, como el ratón, mono y humano, y su expresión se encuentra restringida a esta pequeña población de CGRm. La secuencia de aminoácidos de la melanopsina predice una estructura 7 dominios transmembrana, al igual que la de las opsinas de los FR, unida a una proteína G, que transduce la señal. Sin embargo, el proceso de la fototransducción de la melanopsina se asemeja más al de las opsinas de los invertebrados, ya que ambos presentan despolarización de membrana, a diferencia de los conos y bastones, que se hiperpolarizan. Así, la melanopsina posee menos del 25% de similitud con otras opsinas de mamíferos, a diferencia de los conos y bastones, cuyas opsinas se asemejan en más de un 40% (Davies y cols., 2010).

El descubrimiento de las CGRm sienta las bases anatómicas del sistema visual no formador de imágenes (Berson y cols., 2002; Hattar y cols., 2002), una vía paralela a la vía visual. En roedores, las CGRm suponen un 1-3% de la población total de CGR y se distribuyen por toda la retina, encontrándose una mayor densidad en la zona superior de la retina. La melanopsina se expresa en el soma, axones y dendritas de estas neuronas. Los núcleos de las CGRm se encuentran en la CCG

(Hattar y cols., 2002) y sus dendritas forman un extenso plexo dentro de la CPI (Berson, 2003; Hattar y cols., 2002; Provencio y cols., 2002).

Las CGRm son mucho menos sensibles a la luz que los FR clásicos, y su señal es más lenta, menor y con baja resolución espacial (Berson y cols., 2002) y la longitud de onda a la que son sensibles es de 480 nm, menor que la longitud de onda a la que responden las opsinas de conos L.

1.1.6.1. Proyecciones de las células ganglionares de retina melanopsínicas

Las CGRm proyectan sus axones a diferentes núcleos cerebrales que son, en general diferentes, que a los que proyecta la población de CGR no melanopsínicas. El principal centro de proyección de las CGRm es el NSQ, a través del tracto retinohipotalámico. El NSQ es el centro primario de la regulación de los ritmos circadianos (Gooley y cols., 2001; Hannibal y cols., 2002) y está formado por un grupo de neuronas del hipotálamo medial que conforman este reloj interno. A este núcleo proyectan menos del 1% de los axones de la población de las CGR (Provencio y cols., 1998) a través del camino originado inicialmente para la formación de imágenes, el tracto retinohipotalámico (Moore y cols., 1995), y su actividad es regulada por factores externos, fundamentalmente la variación de luz llega la información que posee. Además, estas células también envían proyecciones a la lámina intergeniculada y al núcleo de la oliva pretectal, responsable del reflejo pupilar (figura 1.10). Recientemente se ha descrito la participación de las CGRm de otras regiones del cerebro, como el área preóptica, la zona hipotalámica subparaventricular, el núcleo geniculado ventral-lateral y el CS (Hattar y cols., 2006).

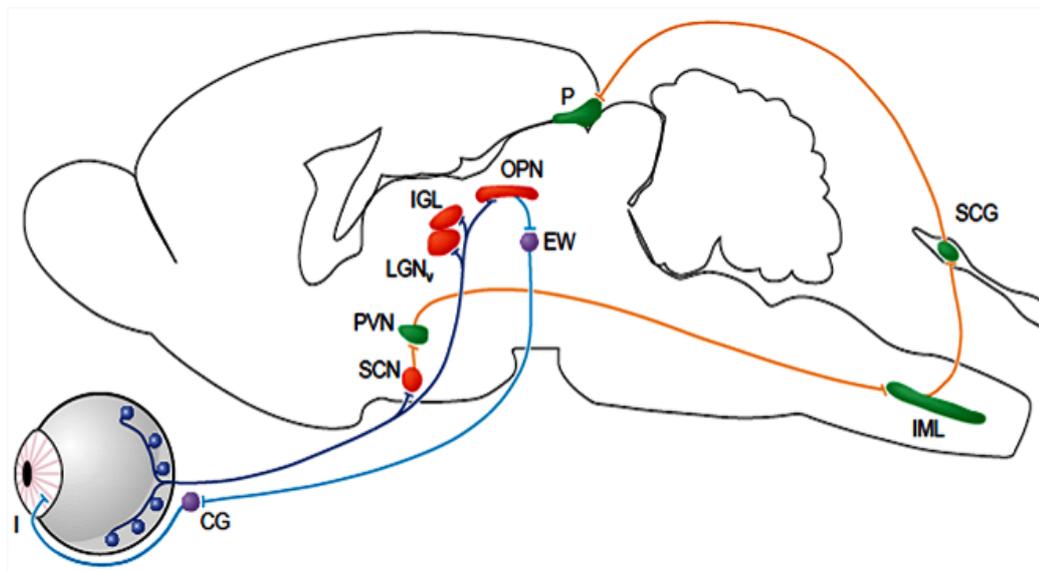


Figura 1.10. Principales proyecciones neuronales de las CGRm de ratón.

Los axones de las CGRm (azul oscuro) proyectan principalmente al núcleo supraquiasmático (SCN), encargado de la regulación de los ritmos circadianos, y una minoría al núcleo intergeniculado lateral (IGL) y núcleo de la oliva pretectal (OPN), encargado del reflejo pupilar. Además, existen circuitos sinápticos (naranja) que se originan en el SCN hacia el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo intermediolateral (IML), y el ganglio cervical superior (SCG). A su vez, el OPN sinapta con el núcleo de Edinger-Westphal (EW), el ganglio ciliar (CG) y el músculo del iris (azul claro) (Modificada de Berson, 2003).

1.1.7. LAS CÉLULAS DE MICROGLÍA

Las células de microglía son macrófagos residentes del SNC (cerebro, médula espinal y retina) y se calcula que suponen un 20% de la población total de células gliales del SNC en los mamíferos. Estas células fueron descubiertas por del Río Hortega (1932), quien además describió su principal función: la fagocitosis de los desechos celulares del SNC. Al igual que en el resto del SNC, las células de microglía también se encuentran en la retina y comparten numerosas similitudes con la microglía del cerebro, tanto en sus características morfológicas como funcionales. La retina posee el mismo privilegio inmunológico que el cerebro, posee la barrera hematorretiniana, ausencia de drenaje linfático e incapacidad de producir respuestas inmunológicas, por lo que las funciones de defensa las realizan las células de microglía.

En función de su morfología, se distinguen tres tipos de células de microglía: ameboides, ramificadas y activas.

Durante etapas tempranas del desarrollo del SNC se produce la entrada de la microglía al cerebro. Para migrar a todas las zonas del cerebro, utilizan los vasos sanguíneos. En este momento,

las células de microglía son muy abundantes, tienen forma **ameboide** y un cuerpo celular grande. Se piensa que en este momento están implicadas en la muerte neuronal fisiológica, limpiando el tejido nervioso de las neuronas que están degenerando. La microglía ameboide tiene la capacidad de migrar largas distancias, proliferar y fagocitar. Estudios inmunohistoquímicos han descrito que en humano, en esta etapa en desarrollo, las células de microglía presentan inmunorreactividad contra la proteína CD45 (leucocitos), y los complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II. Estos CMH son moléculas que se encuentran en la membrana de la célula y son presentadoras del antígeno a los linfocitos T, para que éstos puedan reconocerlos. Sin embargo, hasta las 14 semanas de gestación, coincidiendo con la llegada de los precursores de la vasculatura retiniana, no expresan aún proteínas específicas de macrófagos. Las células de microglía a partir de este momento, son inmunorreactivas contra los antígenos CD68, S22 (macrófago), CD45, CMH de clase I y clase II.

En la retina de la rata, la mayoría de las células de microglía se encuentran en la superficie vítrea en el estado embrionario E12. En E16, la microglía se encuentra localizada en las CCG, CPI y ocasionalmente, la CNI de la retina. La barrera hematorretiniana se caracteriza por tener uniones endoteliales que previenen el paso de elementos celulares al parénquima retiniano. Las células precursoras de la microglía entra en la retina a través de dos fuentes principales: el NO y la periferia de la retina, mediante los vasos sanguíneos del cuerpo ciliar y el iris (Díaz-Araya y cols., 1995). Una vez que los precursores microgliales entran en la retina, migran paralelamente a los fascículos axonales de la CFNR y se distribuyen por todo el parénquima retiniano. Éstas son células de microglía ameboide, que tienen forma ovalada y pequeñas ramificaciones, y son células que juegan un papel muy activo durante el desarrollo, como hemos visto antes.

Una vez terminado el desarrollo del SNC y cuando han alcanzado su destino final en el parénquima nervioso del mamífero adulto, las células de microglía se diferencian en células maduras **ramificadas** en reposo. Estas células se encuentran dispersas por todo el SNC, aunque cada una parece ocupar un territorio definido. Su morfología se ve modificada, pasando a mostrar numerosas ramificaciones y un cuerpo celular pequeño. La función de las células maduras en situaciones fisiológicas es de limpieza de sustancias del espacio extracelular. En esta fase, a diferencia de la microglía durante el desarrollo, la microglía realiza sólo cortos desplazamientos de sus procesos sin translocación del cuerpo celular. En la retina adulta de la rata, estas células se localizan en cuatro capas de la retina: CFNR, CCG, CPI y CPE (Sobrado-Calvo y cols., 2007). En la CFNR, las células de microglía son más abundantes en el centro que en la periferia, tienen una morfología bipolar y sus procesos se alargan paralelos a los axones de las CGR. En la CCG y CPI, se distribuyen por toda la retina en forma de mosaico, sin solapamiento entre células. En la CPE también hay células de microglía, pero en menor número. Las células de microglía maduras expresan el antígeno MCH de clase II, el cual está involucrado en la presentación de antígenos y en controlar la respuesta inmune.

Tras una un insulto al SNC, las células de microglía maduras se transforman en la microglía **reactiva** de manera transitoria, adquiriendo una forma ameboide similar a la que presentaban durante

el desarrollo, aunque también pueden presentar ramificaciones. Dependiendo del insulto, presentan diferentes morfologías, pero todas ellas comparten el paso de la forma ramificada a la ameboide y la retracción de sus procesos. Estos cambios morfológicos indican que las células de microglía son necesarias para un ajuste funcional del tejido (Ellis-Behnke y cols., 2013). Al igual que en la etapa del desarrollo, estas células tienen capacidad de migrar, con el fin de llegar a los territorios dañados por el insulto, migrar, proliferar y fagocitar (revisado en Kettenmann y cols., 2011). Las células de microglía de la retina migran hacia la zona donde se está produciendo la muerte neuronal y comienzan a fagocitar los detritus celulares, por ejemplo de las CGR que han degenerado por un insulto al nervio óptico, eliminando los fragmentos de las células (Marín-Teva y cols., 2012). La microglía activada expresa los CMH de clase I y clase II.

La función de las células de microglía no se conoce por completo. Los daños en el SNC producen una activación de los macrófagos y microglía con características similares: alteración en el perfil de expresión y patrones de distribución celular, cambios morfológicos y aumento de la densidad celular como consecuencia de la proliferación (Wohl y cols., 2010). La activación de células de microglía se ha descrito en retinas de humanos con glaucoma (Neufeld, 1999), en modelos experimentales de glaucoma (Wang y cols., 2000; Naskar y cols., 2002; Tezel y cols., 2003; Johnson y Morrison, 2009, en modelo de glaucoma hereditario en ratón (Inman y Horner, 2007) y tras la sección o aplastamiento del NO (García-Valenzuela y Sharma, 1999; Bodeutsch y Thanos, 2000; García-Valenzuela y cols., 2005; Panagis y cols., 2005, Sobrado-Calvo y cols., 2007).

La función principal de estas células es la fagocitosis de los desechos celulares (Thanos y cols., 1992; 1993). Las células de microglía tienen la capacidad de comportarse como células presentadoras de antígeno. Tras un estímulo, como la degeneración nerviosa, inflamación o lesiones traumáticas nerviosas, la microglía se activa, jugando un papel importante durante condiciones patológicas. Las células de microglía parecen tener un papel importante en la defensa del SNC contra microorganismos, en la inmunorregulación, y en la reparación del tejido dañado, y se cree que además pueden facilitar la supervivencia y la regeneración neuronal. También se ha postulado que pueden facilitar la diferenciación neuronal, la supervivencia y la regeneración produciendo factores neurotróficos, como factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT4/5), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Sin embargo, su activación puede ser deletérea al producir sustancias citotóxicas y expresar receptores y sustancias relacionadas con la presentación de antígenos o endocitosis (Sobrado-Calvo y cols., 2007). Una sobreactivación de las células de microglía puede contribuir a los efectos de la distrofia retiniana en ratas RCS (revisado en Chen y cols., 2002). Thanos (1993) estudió en retinas axotomizadas que supresión de factores de microglía aumentaba la supervivencia de las CGR y un estudio reciente describe que las células de microglía perivascular hematopoyéticas generan citoquinas IL-1 beta y TNF-alfa, iniciando una uveorretinitis, en un modelo experimental de uveítis autoinmune.

1.1.7.1. Técnicas de identificación de las células de microglía

Existen numerosas técnicas para identificar las células de microglía. Las más utilizadas para identificar las células de microglía son las siguientes:

- **Trazadores fluorescentes.** Las células de microglía son las encargadas de fagocitar los detritus de las CGR que, tras una lesión, han muerto. A la vez que las células de microglía fagocitan estos detritus, los trazadores fluorescentes que se utilizan para marcar las CGR, como Dil o FG, son también fagocitados por las células de microglía. Esto nos permite observar las células de microglía marcadas con el trazador, diferenciándose de las CGR por su morfología (Thanos, 1991, 1993; Thanos y cols., 1992; Naskar y cols., 2002; Zhang and Tso, 2003). Como se ha descrito anteriormente, este tipo de marcaje fue descrito por Thanos y cols., (1992) como marcaje transcelular.
- **Histoquímica enzimática.** La nucleosido difosfatasa (NDPasa) es una enzima que reconoce la actividad de la membrana celular de la microglía (Murabe y cols., 1981; Murabe and Sano, 1982). También marca vasos sanguíneos, y otras células gliales. Se ha descrito que la cantidad de actividad NDPasa está relacionada con la actividad fagocítica (Schnitzer, 1989; Schnitzer and Scherer, 1990), por lo que se utiliza como marcador en condiciones patológicas (Castellano y cols., 1991; Vela y cols., 1995; Salvador-Silva y cols., 2000; Sobrado-Calvo y cols., 2007).
- **Lectinas.** La isolectina B4 es una proteína que se une a glicoproteínas de la membrana plasmática de las células de microglía, tanto en reposo como activadas (revisado en Chen y cols., 2002). Sin embargo, no es un marcador específico de microglía, ya que también marca vasculatura (revisado en Ellis-Behnke y cols., 2013)
- **Inmunohistofluorescencia.** Actualmente, es la técnica más utilizada para identificar las células de microglía. Para ello, existen anticuerpos contra proteínas específicas de estas células. La molecula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1) es una proteína específica de células de microglía y macrófagos, que no se expresa ni en neuronas ni en astrocitos (Ito y cols., 1998) y es muy utilizada como marcador de microglía (Naskar y cols., 2002). Es una proteína pequeña de 17 kDa formada por 147 aminoácidos, que marca el cuerpo celular y las dendritas de las células de microglía. La proteína Iba1 puede estar involucrada en la homeostasis del calcio (Imai y cols., 1996, 2002). También se ha utilizado un ratón transgénico que expresa la proteína GFP bajo el promotor Iba1 (Hirasawa y cols., 2005). El gen Iba1 se encuentra dentro del CMH de clase III (Imai y cols., 1996).

Los complejos mayores de histocompatibilidad (CMH) también son utilizados para detectar microglía. Existen tres tipos de CMH: de clase I, II y III. El CMH de clase II es un marcador de células activas presentadoras de antígenos, encargados de la respuesta inmune. Se utilizan como marcador de células de microglía, aunque se expresa únicamente en una subpoblación

de células de microglía y también se expresa en macroglía (Zhang y cols., 2002; Gallego y cols., 2012). Se sabe que las células de microglía se comportan como células presentadoras de antígenos en el cerebro, por lo que la utilización de CMH es útil para estudiar la actividad de las células de microglía (Thomas, 1992).

Otras proteínas que se utilizan para el marcaje de células de microglía son proteínas específicas de macrófagos son ED-1, ED-2 y ED-3 (Dijkstra y cols., 1985). Estudios previos han documentado que la señal de ED-1 coincide con la de Iba1 pero no reacciona contra la microglía ramificada (Zhang y cols., 2002). OX41, OX42 (Robinson y cols., 1986; Castellano y cols., 1991; Zhang y cols., 2002), OX3, OX6, OX18, ED1, Mac-1, F4/80 y 5D4, son proteínas que se expresan en microglía, monocitos y macrófagos (revisado en Chen y cols., 2002).

1.2. DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los impulsos nerviosos del SNC se transmiten por los axones neuronales hacia las sinapsis. Cualquier daño que se produzca en el axón de una neurona provoca una interrupción de estos impulsos nerviosos y, por lo tanto, una pérdida inmediata de la funcionalidad neuronal. Además, las neuronas no tienen capacidad de dividirse, por lo que no existe la posibilidad en el SNC de que se formen nuevas neuronas y sustituyan a aquellas que están dañadas. La única manera de volver a establecer la funcionalidad sería mediante la regeneración de los axones dañados: que se produzca la elongación de los axones lesionados, alcancen sus territorios de inervación, y reestablezcan los contactos sinápticos. En el SNP, las neuronas en su mayoría son capaces de sobrevivir, regenerar y restablecer su conectividad y sus funciones normales, después de una lesión axonal mientras que en el SNC, las neuronas suelen degenerar y morir.

Cuando se lesiona el axón de una neurona, se producen dos tipos de degeneraciones: una degeneración retrógrada, que va desde la zona lesionada hasta el soma neuronal y que acaba por producir la degeneración y muerte de la neurona; y una degeneración anterógrada, en la que el axón degenera desde la zona de la lesión hacia su extremo distal. Además, cualquier lesión en el Sistema Nervioso produce una respuesta de las células gliales, que se hipertrofian en un intento de mantener la homeostasis tisular.

En el SNC, esta degeneración neuronal suele ser rápida y se produce apoptosis (Bekelaar y cols., 1994), proceso controlado en el que sintetizan proteínas que producen la desintegración interna de la célula mientras que las membranas permanecen casi controladas, manteniéndose así la integridad del resto del tejido. La muerte por apoptosis está implicada en procesos neurodegenerativos, como la enfermedad del Alzheimer, el Parkinson y otras patologías humanas.

1.2.1. VENTAJAS DE TRABAJAR EN EL SISTEMA VISUAL COMO MODELO DE DEGENERACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Para llevar a cabo investigaciones sobre la degeneración del SNC, numerosos autores utilizan la retina de los roedores como modelo, ya que posee numerosas ventajas con respecto al resto del SNC para la realización de estos estudios (Aguayo y cols., 1987; Bray y cols., 1987; Vidal-Sanz y cols., 2012) como: i) su localización, ya que la retina se encuentra dentro del globo ocular, aislada del resto de SNC, por lo que es fácilmente accesible para manipulaciones y no es necesario manipular el resto del SNC, evitando así alteraciones en el resto del SNC y permitiendo realizar estudios a largo plazo (Vidal-Sanz y cols., 1991); ii) la población de CGR de roedor está muy bien caracterizada anatómicamente y funcionalmente, y puede ser estudiada tanto en secciones transversales como en montajes globales de retina (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Ortín-Martínez y cols., 2010); iii) los axones de las CGR forman el NO y están muy organizados topográficamente (Guillery y cols., 1995; Fitzgibbon and Taylor, 1996; Jeffery, 2001; Jeffery y cols., 2008). iv) la técnica del electrorretinograma nos permite estudiar la funcionalidad de retina en animales in vivo (Alarcón-Martínez y cols., 2009, 2010); v) la SNO o el aplastamiento del NO son un modelo de lesión específica de las CGR (Peinado-Ramón y cols., 1996; Parrilla-Reverter y cols., 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2009); vi) se puede incrementar la presión intraocular y estudiar el efecto de esta sobre la retina (Selles y cols., 1996; Morrison y cols., 1995a, 1995b); vii) los vasos sanguíneos retinianos llegan al globo ocular en la vaina que recubre el NO, en la zona ínfero-nasal. Esto permite realizar estudios del efecto de la isquemia en las neuronas, interrumpiendo temporalmente el flujo sanguíneo sin dañar el NO (Lafuente y cols., 2002a); viii) las inyecciones intravítreas de diferentes sustancias neuroprotectoras nos permiten tratar las CGR de manera sencilla (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; Lindqvist y cols., 2004); y por último, ix) los modelos experimentales se realizan utilizando un ojo como experimental (generalmente el ojo izquierdo) y su contralateral se utiliza como control, ya que no se realiza en el ninguna cirugía. De esta manera se puede comparar cuantitativamente la población de CGR en ambos ojos. Existen diversos estudios donde se describe el efecto que produce la cirugía en el ojo contralateral a la lesión, por lo que se podrá utilizar siempre que se tenga en cuenta este hecho (Bodeutsch y cols., 1999; Lönnngren y cols., 2006; Ramírez y cols., 2010). Como estudiar el efecto que se produce en el ojo contralateral a la SNO es uno de los objetivos de nuestro estudio, lo detallaremos más adelante (ver apartado 1.2.3).

1.2.2. MODELOS DE DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

Al igual que el resto de las neuronas del SNC, las CGR no tienen capacidad de regeneración y tras una determinada lesión suelen degenerar y morir en su gran mayoría. Los modelos de degeneración de las CGR son muy utilizados ya que se pueden extrapolar al SNC en general. Los más utilizados se detallan a continuación.

1.2.2.1. Isquemia retiniana

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

1.2.2.2. Excitotoxicidad

El glutamato es el aminoácido excitatorio predominante en varias regiones del SNC, incluido la retina. La neurotransmisión mediada por glutamato es la que se produce en las sinapsis de los FR a las células bipolares, de éstas a las CGR, y de las CGR al cerebro. Los receptores glutamatérgicos de la retina están localizados en la CPE, donde se producen las conexiones sinápticas entre los FR y las células bipolares y horizontales; y en la CPI, donde sinaptan las bipolares con CGR y amacrinas. El daño excitotóxico se produce cuando el exceso de glutamato se une a sus receptores como el N-metil-D-Aspartato (NMDA) desencadena un influjo de calcio y activa cascadas de señalización intraneuronales proapoptóticas, que llevan a la neurodegeneración. Las células gliales son las responsables de eliminar el exceso de glutamato y si hay un déficit en ésta función, se produce un daño de las CGR (revisado en Almasieh y cols., 2012). Algunos modelos experimentales realizan una inyección intravítrea de NMDA (Lam y cols., 1999; Nash y cols., 1999; Schlamp y cols., 2001; Casson y cols., 2004), que produce una muerte progresiva de las CGR por excitotoxicidad. Por otra parte, la inhibición de los receptores de glutamato tiene un efecto neuroprotector en modelos experimentales de isquemia retiniana o glaucoma lo que sugiere que en estos modelos al menos parte de la muerte de las CGR está causada por una liberación masiva de glutamato o por una disminución de la actividad glial que elimina el glutamato liberado (Dong y cols., 2008; Almasieh y cols., 2012).

1.2.2.3. Neuropatía óptica glaucomatosa

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

se asocian a elevación de la presión intraocular, cómo ésta es el factor de riesgo más importante en humanos, la mayoría de tratamientos farmacológicos tienen como objetivo la disminución de la misma (Vidal-Sanz y cols., 2012, Agudo-Barriuso y cols., 2013).

Numerosos modelos animales experimentales se han utilizado para entender los mecanismos de degeneración de CGR en glaucoma. Algunos de ellos, tratan de reproducir el daño glaucomatoso mediante el aplastamiento del NO o la isquemia transitoria pero, en general, los más usados son los que se basan en reproducir el factor de riesgo más común, la hipertensión ocular. Los métodos utilizados para aumentar la presión intraocular son la cauterización de las venas episclerales (García-Valenzuela y cols., 1995), la deformación del globo ocular (Selles-Navarro y cols., 1996), la inyección de suero salino hipertónico en las venas episclerales (Morrison y cols., 1997), fotocauterización por láser de las venas limbares y episclerales (WoldeMussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2010; Cuenca y cols., 2010) y la inyección de microesferas en cámara anterior (Sappington y cols., 2010; Chen y cols., 2011).

1.2.2.4. Lesión del nervio óptico: sección o aplastamiento

Uno de los modelos animales de degeneración neuronal más utilizados es la lesión del NO. La lesión del NO en roedores induce en pocos días la degeneración retrógrada y muerte de gran parte de la población de CGR y, las CGR que no mueren inmediatamente tras la lesión, siguen muriendo durante meses después. La degeneración de las CGR varía dependiendo del tipo de lesión que se realice. Estudios previos han documentado que la lesión parcial en el NO produce la degeneración de las CGR cuyos axones han sido dañados y progresivamente, las CGR cuyos axones están intactos comienzan también a degenerar (Yoles y Schwartz, 1998). Las lesiones completas del NO, bien por aplastamiento del NO (Berkelaar y cols., 1994; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla-Reverter y cols., 2009a, 2009b), o bien mediante la sección completa de éste (Madison y cols., 1984; Barron y cols., 1986; Thanos, 1988, 1993; Thanos y Vanselow, 1989; Villegas-Pérez y cols., 1993; Berkelaar y cols., 1994) producen una degeneración más severa de las CGR. Estos dos modelos son los más utilizados para el estudio de la degeneración neuronal.

El estudio del patrón de muerte de las CGR tras la SNO o el aplastamiento del NO en la rata adulta ha permitido conocer que dichas lesiones producen una fase de muerte rápida durante las dos semanas siguientes a la lesión y posteriormente, una fase de muerte más lenta (Villegas-Pérez y cols., 1993; Berkelaar y cols., 1994). La muerte de CGR es más dramática cuando se secciona el NO que cuando se aplasta. Después de la SNO, la muerte de CGR comienza a ser estadísticamente significativa a los 3 días después de la SNO, y el número de CGR comienza a disminuir hasta los 14 días después de la SNO. A este tiempo, solamente sobrevive un 5% de la población total de CGR. Por otra parte, el aplastamiento del NO produce una muerte más lenta de las CGR, y a los 14 días, la población de CGR que sobrevive es de un 12% (Berkelaar y cols., 1994; Parrilla-Reverter y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2009).

Aunque la SNO induce siempre la degeneración retrógrada de una gran parte de las CGR, se ha documentado que en la rata adulta los porcentajes de muerte neuronal tras la SNO varían, para los mismos periodos de supervivencia, dependiendo de la distancia a la que se seccione el NO con respecto al globo ocular (Vidal-Sanz y cols., 1990; Domenici y cols., 1991; Villegas-Pérez y cols., 1993). La sección a 0,5 mm del ojo induce mayor porcentaje de muerte que la sección a 3 mm, 8 mm y 10 mm del ojo, cuando se comparan periodos de supervivencia iguales (Villegas-Pérez y cols., 1993; Berkeelar y cols., 1994). En la figura 1.11 se observa el porcentaje de CGR (identificadas por trazado y por inmunodetección) que sobrevive a la SNO realizado a 0,5 mm del ojo y al aplastamiento del NO, a 3 mm del ojo y durante 10 segundos. Nueve días después de la SNO la pérdida es de cerca del 60%, y a los 14 días después de la SNO la población ha disminuido a cerca del 10% de la población control (Peinado-Ramón y cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009). La muerte de CGR se observa antes cuando éstas se identifican por su expresión de Brn3a que cuando se marcan con FG, debido a la distinta naturaleza de ambos marcadores. Mientras que el Brn3a es un marcador endógeno cuya expresión desaparece al morir la neurona, el FG es un marcador exógeno, que sólo desaparece del tejido cuando los detritus de las CGR son fagocitados por las células de microglía.

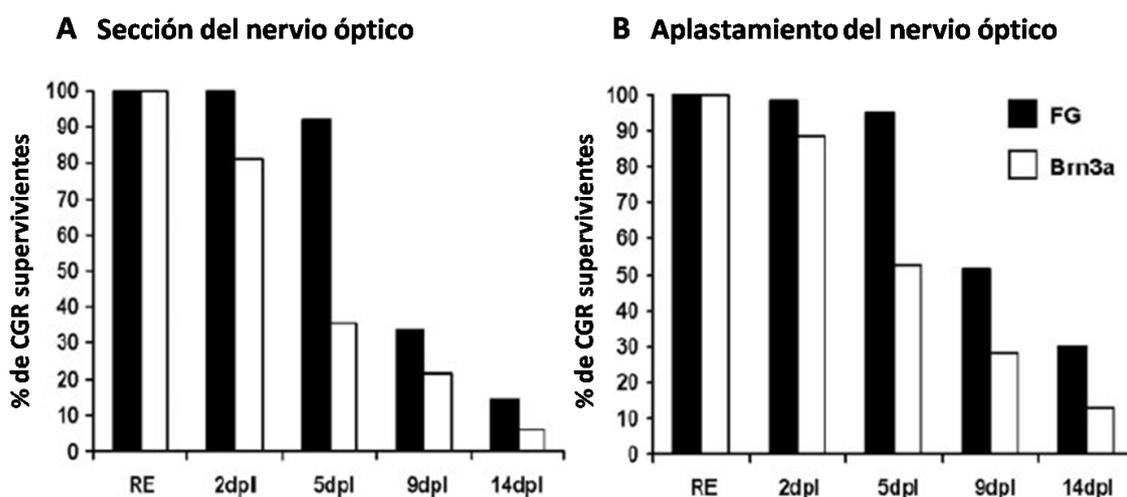


Figura 1.11. Curso temporal de la muerte de las CGR tras la sección o aplastamiento del nervio óptico en rata.

En este gráfico se representa el porcentaje de supervivencia de CGR a lo largo del tiempo tras la SNO (A), realizado a 0,5 mm del ojo, y el aplastamiento del NO (B) realizado durante 10 segundos a 3 mm del ojo, comparado con el número de CGR cuantificadas en los ojos derechos, que se considera el 100%. Las barras negras representan el porcentaje de CGR-FG⁺ y las blancas el porcentaje de CGR-Brn3a⁺ (modificada de Nadal-Nicolás y cols., 2009). Abreviaturas: RE= ojo derecho. dpl= días post-lesión.

En el ratón, el modelo de la SNO o el aplastamiento ha sido utilizado para estudiar la funcionalidad de la retina mediante electroretinografía (Alarcón-Martínez y cols., 2010), documentando una disminución de la onda STR, correspondiente a la actividad de las CGR, a los 14 días después de la SNO, y describe una supervivencia del 15% de la población de CGR marcadas con OHSt. Otros autores describen un porcentaje similar de supervivencia a los 14 días post-SNO (Kilic y cols., 2002; Lebrun-Julien y cols., 2009). Sin embargo, el curso temporal de la degeneración de las CGR inducida por la SNO en el ratón adulto no ha sido descrito en profundidad.

1.2.3. RESPUESTA CONTRALATERAL DE LA RETINA A LA LESIÓN UNILATERAL

El Sistema Visual es bilateral. Esta característica permite utilizar un ojo como experimental y mantener el contralateral control con el fin de, además de cumplir las normas de manipulación de animales de experimentación y no dejar ciego al animal de ambos ojos, comparar los resultados obtenidos entre el ojo experimental y el contralateral.

En los últimos años, algunos estudios han demostrado que una lesión unilateral produce una respuesta en el ojo contralateral a dicha lesión en diferentes modelos experimentales, como hipertensión ocular (Ramírez y cols., 2010; Gallego y cols., 2012, De Hoz y cols., 2013), SNO (Bodeutsch y cols., 1999; Sobrado-Calvo y cols., 2007; Macharadze y cols., 2009) o isquemia (Lönngren y cols., 2006). Esta respuesta es siempre mayor en el ojo lesionado experimental, pero en comparación con una retina control, la retina contralateral presenta una respuesta significativa. Así, se ha documentado una alteración de la expresión de genes como c-jun, un factor de transcripción que se activa tras una lesión, una respuesta inflamatoria y la activación de células de microglía fagocítica inmunodetectada con Iba1 (Bodeutsch y cols., 1999). Después de la SNO, se observan las células de microglía en varias capas de la retina, en la CFN, CPI y CCG de la retina, tras axotomía (Sobrado-Calvo y cols., 2007). Esta activación se puede observar por los cambios de morfología. Las células de microglía aparecen con somas más largos, y los procesos primarios y secundarios más adelgazados y ramificados. Por otra parte, las células macrogliales (astrocitos y las células de Müller), que tras una lesión se hipertrofian y sobrerregulan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio del citoesqueleto que se usa como marcador de activación glial en respuesta a un daño neuronal (Bodeutsch y cols., 1999), se encuentran sobrerreguladas en la retina contralateral, en un modelo de hipertensión ocular (Gallego y cols., 2012) y después de la SNO (Kanamori y cols., 2005).

1.3. NEUROPROTECCIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

1.3.1. CONCEPTO, IMPORTANCIA

Durante muchos años se han realizado investigaciones para tratar de evitar la degeneración de las neuronas del SNC. A diferencia del SNP, las neuronas del SNC no tienen capacidad de regenerar, por lo que cualquier patología que curse con la degeneración de éstas es irreversible. Con el fin de preservar los circuitos neuronales, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas para aumentar la supervivencia neuronal a la lesión y su conectividad (Harvey y cols., 2009).

Una de las ventajas de utilizar la retina como modelo de degeneración del SNC es su fácil accesibilidad. Para llevar a cabo terapias neuroprotectoras, pueden realizarse bien de manera sistémica (oral, intravenoso, intraperitoneal); bien retrógradamente desde los centros de proyección del SNC; bien mediante inyecciones locales intravítreas, camerales o subretinianas; o bien de manera tópica, mediante gotas en la córnea (Isenmann y cols., 2006).

Los mecanismos biológicos que producen el daño celular son relevantes para el diseño de estrategias terapéuticas. Se ha visto que la muerte de las CGR después de la lesión del nervio óptico se produce por apoptosis (Berkelaar y cols., 1994; García-Valenzuela y cols., 1994). Al igual que en otros modelos experimentales se han utilizado varias estrategias terapéuticas para evitar la apoptosis de las CGR tras la SNO (Watanabe y cols., 2002).

1.3.2. TERAPIAS DE NEUROPROTECCIÓN

Las terapias de neuroprotección de CGR tras la lesión del nervio óptico que se han utilizado hasta ahora son las siguientes:

- **Factores neurotróficos.** Inyecciones intravítreas de factores neurotróficos recombinantes como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), las neurotrofinas-4/5 (NT-4/5), y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) aumentan la supervivencia de las CGR tras la SNO (revisado en Watanabe y cols., 2002) (ver apartado 1.3.3).
- **Inhibidores de caspasas.** las caspasas son una familia de proteasas que se activan tras la axotomía o isquemia y provocan la cascada de apoptosis hasta el suicidio celular (Thornberry y Lazebnik, 1998; Boonman y Isacson, 1999). La inactivación directa de las caspasas previene la apoptosis de las CGR, por lo que se ha probado como terapia anti-apoptótica la administración intraocular de inhibidores de caspasas, obteniendo una disminución de la muerte de un subtipo de CGR de gato, las CGR beta, tras la SNO (Kermer y cols., 1998;

Kurimoto y cols., 2003), aunque no existen aún estudios que evalúen la función visual tras el tratamiento anti-apoptótico (revisado en Watanabe y cols., 2002).

- **Bcl-2 y Bax.** La familia de genes Bcl-2 está implicada en la muerte por apoptosis (Adams y Cory, 2007). Se ha descrito que los miembros de la familia Bcl-2 ejercen efectos opuestos en la muerte celular. Bcl-2, Bclx y Ced9 son anti-apoptóticos, previniendo la muerte celular; por el contrario, otros como Bax, Bak y Bad, promueven la muerte celular. En la retina, estudios previos demuestran que los ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína Bcl-2 son más resistentes al estrés neurotraumático que provoca la muerte de las CGR en ratones wild type (Martinou y cols., 1994), y la amplitud de la onda pERG tras aplastamiento del NO no varía en estos ratones, por lo que sugieren que las CGR supervivientes son funcionales (revisado en Watanabe y cols., 2002). Por el contrario, la proteína Bax es pro-apotótica. La inactivación de Bax protege de la degeneración de las CGR (Isenmann y cols., 1999) y el bloqueo de Bax durante el desarrollo previene la muerte natural (Ogilvie y cols., 1998)
- **Receptores antagonistas de NMDA.** La neurotoxicidad por exceso de glutamato produce un influjo de calcio, síntesis de proteínas y muerte celular, por lo que antagonistas de NMDA podrían prevenir la muerte celular por glutamato (Lam y cols., 1997). Este tipo de neuroprotección se aplica solamente a la muerte por neurotoxicidad y ocurre después de un corto periodo de isquemia (revisado en Levin y cols., 2002).
- **Agonistas de los receptores α_2 adrenérgico.** Inducen la producción de factor de crecimiento de fibroblastos, un agente neuroprotector. Ha sido demostrado que los agonistas del receptor α_2 aumentan la supervivencia de las CGR en varios modelos experimentales, como isquemia o aplastamiento NO. El mecanismo de acción incluye inducción de factores de crecimiento, inhibición del daño excitotóxico por glutamato, aumento de los niveles de Bcl_{XL} y la reducción de influjo de calcio (revisado en Levin y cols., 2002).
- **Agonistas de los receptores β_1 adrenérgico.** Produce un efecto neuroprotector en diversos modelos animales (Chidlow y cols., 2000; Osborne y cols., 1997, 1999).
- **Vectores virales recombinantes** que contienen genes que codifican determinadas proteínas e inducen la producción de éstas en la retina. Para introducir genes neuroprotectores que lleguen a las neuronas en degeneración, o bien a las células gliales vecinas, podría aumentar la duración de la neuroprotección de las CGR dañadas (revisado en Harvey y cols., 2009). Son numerosos los vectores virales que se han probado para proteger las CGR, como por ejemplo, vectores adenovirales conteniendo el gen del CNTF (Van Adel y cols., 2005) y BDNF (Di Polo y cols., 1998).

Todas estas terapias neuroprotectoras tienen un efecto a corto plazo, hasta 15 días después de la axotomía (Vidal-Sanz y cols., 1987; Villegas-Pérez y cols., 1988; Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; Cheng y cols., 2002). Doce horas después de la SNO o el

aplastamiento del NO, se produce una regulación de genes. Algunos de ellos se regulan de manera transitoria, mientras que otros permanecen regulados con el tiempo (Agudo y cols., 2008). El número de secuencias génicas que se sobreexpresan es mayor en SNO que en aplastamiento del NO, lo cual concuerda con el número de células que muere. A los 15 días, aunque la población de CGR sea en torno al 15%, sigue habiendo muchos genes regulados, por lo que se deben estar produciendo cambios en otras células retinianas, aunque no significa que éstas estén muriendo. Se está produciendo cascadas extrínsecas de apoptosis, deregulación de ciclos celulares, respuestas inflamatorias unidas a muerte celular, caminos intrínsecos de apoptosis (Agudo y cols., 2008, 2009). Todos estos cambios moleculares impiden la supervivencia a más largo plazo de las CGR dañadas, por lo que no se ha encontrado una terapia válida por el momento.

1.3.3. FACTORES NEUROTRÓFICOS

Los factores neurotróficos son factores de crecimiento necesarios para la supervivencia de determinados grupos neuronales. Intervienen en el desarrollo del SNC y SNP, regulando la supervivencia y crecimiento de las neuronas. Las CGR, al igual que el resto de neuronas, reciben continuamente aporte de factores neurotróficos desde el cerebro, de manera retrógrada, y de las células de Müller, principales células de glía del SNC.

Son numerosos los trabajos que describen la eficacia de los factores neurotróficos después de SNO o aplastamiento del NO (Mey y Thanos, 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Cohen y cols., 1994; Di Polo y cols., 1998; Peinado-Ramón y cols., 1996, Parrilla-Reverter y cols., 2009b; Sanchez-Migallón y cols., 2011). La rápida muerte de las CGR tras la SNO podría deberse a la falta de aporte de estos factores tróficos, los que le proporcionan sus centros de proyección y los componentes no neuronales del NO y el tracto óptico, por lo que cualquier fuente exógena de moléculas es necesario para su supervivencia (Mansour-Robaey y cols., 1994).

Entre los factores neurotróficos destacan el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Baird y cols., 1985), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Manthorpe y cols., 1986; Stöckli y cols., 1989) y las neurotrofinas (Funakoshi y cols., 1993).

El CNTF aumenta la supervivencia de las CGR (May y Thanos, 1993; Watanabe y cols., 2002; Van Adel y cols., 2005; Leaver y cols., 2006a, 2006b; Harvey y cols., 2006), aunque en menor proporción que el BDNF o NT-4/5 (Parrilla-Reverter y cols., 2009b). Sin embargo, es el mejor en cuanto a regeneración axonal (Harvey y cols., 2006), ya que promueve la regeneración tanto en neuronas de la espina dorsal (Ye y Houle, 1997) como de las CGR (Cho y cols., 1999; Jo y cols., 1999; Cui and Harvey, 2000, 2006)

Las **neurotrofinas** son necesarias para el desarrollo normal de las CGR es necesario la participación de diversas moléculas, como las neurotrofinas, que participan en la proliferación,

diferenciación, crecimiento axonal y formación de sinapsis y dendritas (Almasieh y cols., 2012); facilitarán la formación de los axones de las CGR y las conexiones entre las neuronas y los centros de proyección en el SNC. Además, las neurotrofinas también son necesarias para la supervivencia de las CGR.

La familia de neurotrofinas son péptidos pequeños secretados que, en mamíferos, incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina (NT-3) y las neurotrofinas 4/5 (NT-4/5). Los efectos biológicos están mediados por dos tipos de receptores de superficie, el receptor p75, que une todas las neurotrofinas con afinidad similar, y el receptor de tropomiosina kinasa (Trk). Dentro de la familia del receptor Trk, se distinguen varios tipos, y cada uno de ellos será el receptor de las diferentes neurotrofinas. Así, el TrkA es el receptor de NGF; TrkB, el del BDNF y NT-4/5, y se expresa durante el desarrollo y en el adulto en la CCG; y TrkC, receptor de NT-3.

Las neurotrofinas son utilizadas para promover la supervivencia de neuronas adultas del SNC que han sufrido algún insulto (Lebrun-Julien y cols., 2009). Tras la axotomía, tanto el BDNF como NT4/5 son neuroprotectores sobre las CGR de retina de rata tras la sección del nervio óptico (Peinado-Ramón y cols., 1996). La efectividad del BDNF y NT4/5 en la neuroprotección es lógica, ya que poseen el receptor TrkB, necesario para la activación de vías de señalización intracelular, incluidas aquellas implicadas en la supervivencia celular (Pérez y Caminos, 1995; Watson y cols., 1999; Wahlin y cols., 2000). El BDNF y el TrkB se encuentran también en el NGL, los colículos superiores, la corteza visual primaria y la cabeza del NO (Cabelli y cols., 1996; Silver y Stryker, 2001; Lambert y cols., 2001), por lo que su importancia no se limita únicamente a la retina, sino a todo el sistema visual.

Las **NT-3** son otro miembro de la familia de factores neurotróficos (Lamballe y cols., 1991) y se expresa en las neuronas retinianas durante el desarrollo en el pollo (Rodríguez-Tébar y cols., 1993; Escandon y cols., 1994) y en mamíferos (Allendoerfer y cols., 1994). Sin embargo, estudios en la supervivencia de las CGR después de la SNO describen que las NT-3 no promueven la supervivencia neuronal (Peinado-Ramón y cols., 1996). El receptor de las NT-3, el TrkC ha sido descrito en las neuronas retinianas de pollo, pero no existen evidencias de que se encuentre en la retina de la rata. Los resultados de Peinado-Ramón y cols., (1996) sugieren que este receptor no se encuentra en las CGR de la rata. Las NT-3 también pueden unirse al receptor TrkB, que se encuentra en las CGR de la rata, aunque la señal es mucho menor que la del BDNF. Peinado-Ramón y cols., (1996) sugieren que una mayor concentración de NT-3 podría tener algún efecto neuroprotector.

Las **NT-4**, otro miembro de la familia de factores neurotróficos, también previenen la muerte de las CGR después de una lesión (Funakoshi y cols., 1993; Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996).

Entre todas las neurotrofinas, el **BDNF** ha recibido especial atención por su efecto en la supervivencia de las CGR. Como el BDNF es objeto de nuestro estudio, hablaremos detalladamente de él a continuación (Meyer y cols., 1992; Funakoshi y cols., 1993).

1.3.3.1. Factor neurotrófico derivado de cerebro

Durante el desarrollo de las neuronas, una proporción de ellas mueren. Existen algunos agentes moleculares que se encargan de regular esta muerte celular, como NGF, y el BDNF. El BDNF es una proteína purificada del cerebro de los mamíferos, necesaria para la supervivencia de las neuronas y su desarrollo hacia sus centros de proyección (Johnson y cols., 1986). De todas las neurotrofinas, el BDNF y su receptor, el TrkB han recibido especial atención, por su efecto en el desarrollo y la supervivencia de las CGR.

El mRNA de BDNF se expresa en la retina (Maisonpierre y cols., 1990) y se localiza en las células de la CCG y la CNI (Cohen-Cory y Fraser, 1994; Pérez y Caminos, 1995; Vecino y cols., 1998). El BDNF también se expresa en los CS (Hofer y cols., 1990; Maisonpierre y cols., 1990; Wetmore y cols., 1990), principales territorios de proyección de las CGR. Por lo tanto, el BDNF es transportado retrógradamente por los axones de las CGR hasta la retina (Herzog y Von Bartheld, 1998; Ma y cols., 1998).

Tras una lesión, se produce una sobreexpresión de BDNF como respuesta temprana de las CGR que son sometidas a un daño axonal (revisado en Almasieh y cols., 2012). Se han llevado a cabo numerosos estudios de CGR adultas o en desarrollo tras la SNO, en los que se evaluó el efecto del BDNF, en rata (Johnson y cols., 1986; Thanos y cols., 1989; Mey y Thanos, 1993; Castillo y cols., 1994; Mansour-Robaey y cols., 1994; Weibel y cols., 1995; Peinado-Ramón y cols., 1996; Gao y cols., 1997; Di Polo y cols., 1998; Klöcker y cols., 1998, 2000; Isenmann y cols., 1998; Ma y cols., 1998; Kido y cols., 2000; Parrilla-Reverter y cols., 2009b); en gatos (Chen y Weber, 2001; Watanabe y Fukuda, 2002; Weber y cols., 2008); en pollo (Rodríguez-Tébar y cols., 1989); y en humanos (Takano y cols., 2002). En todos estos estudios, el BDNF promueve la supervivencia neuronal, aunque su efecto neuroprotector es transitorio (Isenmann y cols., 2004). En rata, el tratamiento con BDNF protege la totalidad de las CGR a los 7 días después de la SNO, a diferencia de las retinas que no fueron tratadas, que a este tiempo solamente sobrevivían un 50% de ellas (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; Sanchez-Migallón y cols., 2011). Sin embargo, a los 14 días después de la SNO, aunque el número de CGR es mayor en las retinas tratadas con BDNF, el porcentaje se ve disminuido hasta 55% (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sanchez-Migallón y cols., 2011). En gatos, el BDNF protege las CGR de la muerte tras SNO, aunque para conseguir el mismo efecto que en rata, la proporción de BDNF que se inyecta es mucho mayor (Chen y Weber, 2001; Watanabe y Fukuda, 2002; Weber y cols., 2008).

El efecto en la supervivencia de las CGR en ratón adulto es desconocido. Un estudio realizado in vitro evalúa el efecto del CNTF combinado con BDNF en ratones rd1, ratones que sufren una degeneración de los FR (Azadi y cols., 2007). Este estudio describe una disminución del número de FR apoptóticos cuando se trataban con CNTF y BDNF, y un aumento de los niveles de expresión del ARNm de CNTF y BDNF. Por ello, uno de los objetivos de nuestro estudio fue evaluar el efecto del BDNF en nuestro modelo de SNO en ratón adulto.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de este estudio son:

1. Caracterización de la población de CGR melanopsínicas de la rata adulta.
2. Estudio de la degeneración de las CGR después de la SNO y su protección con BDNF en el ratón adulto.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

2.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACION DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS DE LA RATA ADULTA

1. Puesta a punto de un protocolo de inmunohistofluorescencia para detectar la melanopsina en montajes globales y en secciones transversales de retina.
2. Puesta a punto de un método de contaje automático de las CGRm en los montajes globales de retina.
3. Puesta a punto de un método de análisis de la distribución espacial de CGRm.

2.2.2. DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DESPUÉS DE LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF EN EL RATÓN ADULTO

2.2.2.1. Caracterización del Brn3a como marcador de las CGR de ratón

1. Puesta a punto de un protocolo de inmunohistofluorescencia para detectar el factor de transcripción Brn3a en montajes globales y en secciones transversales de retina.
2. Caracterización del patrón de expresión de Brn3a en secciones transversales de retinas control y retinas experimentales a diferentes tiempos tras la SNO.

3. Caracterización del patrón de expresión de Brn3a en montajes globales de retinas control y comparación del marcaje de las CGR con Brn3a y con OHSt aplicado en los colículos superiores.
4. Puesta a punto de un método de contaje automático de CGR-Brn3a⁺ en montajes globales de retina.
5. Puesta a punto de un método de estimación del número total de CGR-OHSt⁺ a partir de contajes manuales en diferentes áreas de la retina (centro, medio y periferia).

2.2.2.2. Curso temporal de muerte de las CGR del ratón después de la sección del nervio óptico

1. Analizar la curva temporal de muerte de CGR marcadas con OHSt y con Brn3a en retinas de ratón a los 2, 5, 7, 9, 14 y 21 días después de la SNO.
2. Estudiar la distribución de la población de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ en retinas control y la distribución de la población de CGR-Brn3a⁺ en retinas de ratón a los diferentes periodos de tiempo después de la SNO.

2.2.2.3. Efecto del BDNF sobre las CGR y las células de microglía fagocítica en retinas de ratón tras la sección del nervio óptico

1. Analizar la curva temporal de muerte de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ en retinas de ratón a los 3, 5, 7 y 14 días después de la SNO y el tratamiento con BDNF o vehículo mediante una única inyección intravítrea.
2. Estudiar la distribución de la población de CGR-Brn3a⁺ en retinas de ratón a los distintos tiempos después de la SNO y tras el tratamiento con BDNF o vehículo.
3. Estudiar las células de microglía fagocítica en retinas de ratón después de la SNO y tras el tratamiento con BDNF o vehículo.
4. Puesta a punto de un método de contaje semi-automático de células de microglía fagocítica y desarrollo de un método de análisis de su distribución espacial.

2.2.2.4. Efecto de la sección de nervio óptico sobre las CGR y las células de microglía en las retinas de ratón contralaterales a la lesión

1. Estudiar el efecto de la SNO sobre la población de CGR en retinas contralaterales a la lesión.
2. Estudiar el efecto de la SNO sobre las células de microglía fagocítica en retinas contralaterales a la lesión.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA

Los animales fueron tratados de acuerdo con la normativa europea (Directiva 86/609/CEE) y nacional (RD 53/2013) vigente sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. De la misma forma, se siguieron las directrices de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO).

La caracterización de la población de CGRm se realizó en ratas adultas albinas Sprague Dawley (SD). Para ello, se utilizaron 16 ratas, de un peso medio de 200-220 gramos, adquiridas en Janvier (Le Genest-St-Isle, Francia). El estudio de la caracterización del Brn3a como marcador de CGR, la degeneración de las CGR después de la SNO y el efecto protector de BDNF se realizó en ratones adultos. Se utilizaron 129 ratones hembra pigmentados C57BL/6 y 34 ratones hembra albinos Swiss, con un peso medio entre 20-25 gramos, y 30-35 gramos respectivamente, adquiridos en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Murcia.

Tanto las ratas como los ratones fueron criados y mantenidos en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Murcia. En éste, se alimentaron "ad libitum" y se mantenían en jaulas, en habitaciones aclimatadas a una temperatura controlada, y con los ciclos alternos de luz-oscuridad de 12 horas (el periodo de luz comenzaba a las 8 horas de la mañana y tenía una intensidad de 100-250 lux, con una variación dentro de las cajas entre 5-30 lux, dependiendo de la posición de las cajas respecto a su posición en la habitación).

Para todas las manipulaciones y procedimientos experimentales que implicaban dolor, sufrimiento o lesión, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de Ketamina (70mg/kg de peso corporal Ketolar[®], Pfizer, Alcobendas, Madrid, España) y Xilacina (10 mg/kg de peso corporal, Rompun[®], Bayer, Kiel, Alemania) en 0,1 ml suero salino estéril al 0,9%. Las manipulaciones microquirúrgicas se efectuaron con la ayuda de un microscopio quirúrgico OPMI-11-FC (Carl Zeiss, S.A.) instalado sobre una columna S-21 (Carl Zeiss, S.A.) y con el instrumental de microcirugía apropiado.

Inmediatamente después de la cirugía, se les aplicó a los animales por vía tópica en la córnea un ungüento oftalmológico con tobramicina (Tobrex[®], Alcon-Cusí, S.A., El Masnou, Barcelona, España) para prevenir la desecación corneal. Los animales fueron entonces devueltos a su jaula y colocados bajo una fuente de luz emisora de calor hasta su recuperación de la anestesia y posteriormente fueron enviados al animalario, donde permanecieron hasta su sacrificio. Para sacrificar a los animales, se les administró intraperitonealmente una sobredosis de 0,3-0,4 ml de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal[®], Vetoquinol, S.A., Lure, Francia).

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este apartado se detallan todos los animales utilizados para el desarrollo de nuestro trabajo y las técnicas utilizadas para su análisis.

Dividimos el diseño experimental en función de nuestros objetivos principales. En todos ellos, nos referiremos como “animales control”, a aquellos a los que no se les realizó ninguna lesión y que nos sirvieron para caracterizar las poblaciones celulares de la retina en condiciones normales, y como “animales experimentales” a aquellos ratones a los que se les seccionó el NO.

3.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS EN RETINAS DE RATA ADULTA

La caracterización de CGRm se llevó a cabo en ratas SD control. En la tabla 3.1 se resumen todos los grupos utilizados, en función de los objetivos del estudio.

Objetivo	Procesado de la retina	Marcadores utilizados	Tamaño muestral
Estudiar la estructura normal de la retina	Secciones transversales	Inmunodetección de melanopsina, Brn3a y rodopsina; tinción con DAPI	(n=2)
Estudiar si las CGRm proyectan sus axones en el nervio óptico	Montajes globales	FG aplicado en el MNO (3 días antes del procesado) e inmunodetección de melanopsina	(n=10)
Estudiar cuántas CGRm proyectan al CS	Montajes globales	FG aplicado en los CS (7 días antes del procesado) e inmunodetección de melanopsina	(n=10)
Estudiar si las CGRm expresan Brn3a. Estudio del número total y distribución de CGRm y comparación con las CGR-Brn3a ⁺	Montajes globales	Inmunodetección de melanopsina y Brn3a	(n=10)

Tabla 3.1. Ratas utilizadas para la caracterización de la población de CGRm.

Abreviaturas: CS= colículo superior, MNO= muñón del nervio óptico, n= tamaño muestral.

3.2.1. ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE RETINA DE RATÓN ADULTO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF

En primer lugar, caracterizamos la expresión del factor de transcripción Brn3a en secciones transversales de retinas de ratón pigmentados C57BL/6 (tabla 3.2). El diseño experimental fue el siguiente:

Objetivo	Procesado de la retina	Grupo	Periodo de estudio	Marcadores utilizados	Tamaño muestral
Cuantificar cuántas células que expresan Brn3a se marcan con OHSt aplicado en el MNO	Secciones transversales	Controles	---	OHSt aplicado en el MNO (3 días antes del procesado) e inmunodetección de Brn3a	(n=5)
Caracterizar la expresión de Brn3a en retina. Cuantificar cuántas CGR-Brn3a ⁺ proyectan a los CS	Secciones transversales	Controles	---	OHSt aplicado en los CS (7 días antes del procesado) e inmunodetección de Brn3a	(n=5)
Caracterizar la expresión de Brn3a en retina después de la SNO	Secciones transversales	Experimentales	2 días post-SNO	OHSt aplicado en los CS (7 días antes de la SNO) e inmunodetección de Brn3a	(n=3)
			7 días post-SNO	OHSt aplicado en los CS (7 días antes de la SNO) e inmunodetección de Brn3a	(n=3)
			14 días post-SNO	OHSt aplicado en los CS (7 días antes de la SNO) e inmunodetección de Brn3a	(n=3)

Tabla 3.2. Ratones C57BL/6 utilizados para la caracterización de la expresión del factor de transcripción Brn3a en secciones radiales de retina.

Abreviaturas: CS= colículo superior, MNO= muñón del nervio óptico, n= tamaño muestral.

A continuación, caracterizamos la expresión del factor de transcripción Brn3a en montajes globales de retina de ratones controles C57BL/6 y Swiss. En la tabla 3.3 se detallan todos los grupos que se realizaron. Para todos estos grupos, el objetivo fue el mismo: Cuantificar y analizar la distribución espacial de las CGR-OHSt⁺ y CGR-Brn3a⁺, y el número de células de microglía fagocítica.

Procesado de la retina	Estirpe	Marcadores utilizados	Tamaño muestral
Montajes globales	Ratones pigmentados C57BL/6	OHSt aplicado en los CS (7 días antes del procesado); inmunodetección de Brn3a e Iba1	(n=9)
		OHSt aplicado en los CS (10 días antes del procesado); inmunodetección de Brn3a e Iba1	(n=6)
		OHSt aplicado en los CS (30 días antes del procesado); inmunodetección de Brn3a e Iba1	(n=8)
	Ratones albinos Swiss	OHSt aplicado en los CS (10 días antes del procesado); inmunodetección de Brn3a e Iba1	(n=12)

Tabla 3.3. Ratones utilizados para la caracterización de la expresión del factor de transcripción Brn3a en montajes globales de retina.

La inmunodetección de Iba1 se realizó en 4 retinas representativas de cada grupo, para cuantificar las células de microglía fagocítica. Los grupos de ratones procesados a los 10 y 30 días después del marcaje nos servirán para compararlos con los grupos experimentales tratados con BDNF o vehículo y procesados 3 y 21 días después de la SNO (ver tabla 3.5). Abreviaturas: CS= colículo superior, MNO= muñón del nervio óptico, n= tamaño muestral.

Una vez caracterizada la población de CGR-OHSt⁺, según las técnicas descritas por Salinas-Navarro y cols., (2009), y la población de CGR-Brn3a⁺ en montajes globales de retinas de ratones controles, nos propusimos analizar la degeneración de las CGR de ratón después de la SNO, con ambos marcadores, OHSt y Brn3a. Para ello, cuantificamos las CGR-OHSt⁺ y CGR-Brn3a⁺ y analizamos la distribución espacial de las CGR-Brn3a⁺ en montajes globales de retina después de la SNO. También analizamos la población de CGR en las retinas contralaterales a la SNO. El diseño experimental fue el siguiente (tabla 3.4):

Procesado de la retina	Estirpe	Marcadores utilizados	Periodo de estudio	Tamaño muestral
Montajes globales	Ratones pigmentados C57BL/6	OHSt aplicado en los CS (7 días antes de la SNO) e inmunodetección de Brn3a	2 días post-SNO	(n=7)
			5 días post-SNO	(n=7)
			7 días post-SNO	(n=8)
			9 días post-SNO	(n=7)
			14 días post-SNO	(n=8)
			21 días post-SNO	(n=8)

Tabla 3.4. Ratones C57BL/6 utilizados para el estudio de la degeneración de las CGR después de la sección del nervio óptico y en las retinas contralaterales a la lesión.

El tamaño muestral que aparece en esta tabla fue el mismo para las retinas izquierdas y para las derechas contralaterales. Abreviaturas: SNO= sección del nervio óptico, MNO= muñón del nervio óptico, CS= colículo superior, n= tamaño muestral.

Para evaluar el efecto de la inyección intravítrea de BDNF después de la SNO, realizamos una cuantificación de las CGR-OHSt⁺ y CGR-Brn3a⁺ y de las células de microglía fagocítica en montajes globales. Estudiamos la distribución espacial de las CGR-Brn3a⁺ y de las células de microglía fagocítica en retinas izquierdas después de la SNO y el tratamiento con BDNF o vehículo, y en las retinas derechas contralaterales a la lesión. El diseño experimental fue el siguiente (tabla 3.5):

Procesado de la retina	Estirpe	Marcadores utilizados	Tratamiento	Periodo de estudio	Tamaño muestral
Montajes globales	Ratones pigmentados C57BL/6	OHSt aplicado en los CS (7 días antes del procesado); inmunodetección de Brn3a y Iba1	BDNF	3 días post-SNO	(n=7)
				5 días post-SNO	(n=7)
				7 días post-SNO	(n=7)
				14 días post-SNO	(n=8)
			Vehículo	3 días post-SNO	(n=8)
				5 días post-SNO	(n=6)
				7 días post-SNO	(n=7)
				14 días post-SNO	(n=8)
	Ratones albinos Swiss	OHSt aplicado en los CS (7 días antes del procesado); inmunodetección de Brn3a y Iba1	BDNF	3 días post-SNO	(n=7)
				7 días post-SNO	(n=7)
			Vehículo	3 días post-SNO	(n=8)
				7 días post-SNO	(n=6)

Tabla 3.5. Ratones utilizados para estudiar el efecto del BDNF sobre las CGR y en las células de microglía en las retinas después de la sección del nervio óptico y en las retinas contralaterales a la lesión.

La inmunodetección de Iba1 se realizó en 4 retinas representativas de cada grupo, para cuantificar las células de microglía fagocítica. Abreviaturas: SNO= sección del nervio óptico, MNO= muñón del nervio óptico, CS= colículo superior, n= tamaño muestral.

3.3. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA

Una de las técnicas más utilizadas para identificar las CGR es el marcaje retrógrado con trazadores neuronales aplicados en el NO o en los territorios de proyección de las CGR en el cerebro, ya que permite identificar únicamente esta población celular. Los axones de las CGR captan el trazador y lo transportan activa y retrógradamente hasta el soma celular, donde se acumulan. Este acúmulo es fácilmente identificable y permite distinguir las CGR de otros tipos de neuronas que están presentes en la CCG, como las células amacrinias desplazadas (Perry, 1981) y así, poder cuantificar el número y densidad de éstas. Para el marcaje de las CGR de rata, se utilizó el trazador neuronal fluorescente FG (Fluorochrome Inc., Engelwood, CO, USA) y para marcar las CGR de ratón se utilizó un análogo del FG, el trazador hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt; H22845, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EE.UU).

Existen dos métodos para trazar retrógradamente las CGR. El primero de ellos consiste en aplicar el trazador en el MNO tres días antes del procesado del animal. De esta forma, se marcan la totalidad de las CGR. El segundo método consiste en aplicar el trazador en ambos CS, principales territorios de proyección de las CGR en roedores (Perry, 1981). Estudios anteriores han descrito que la aplicación de FG en los CS de la rata y del ratón se marcan aproximadamente un 98,4% y un 96,5% del total de las CGR, respectivamente (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b) (ver introducción, apartado 1.1.5.2.2). Los procedimientos quirúrgicos de estas dos técnicas se detallan a continuación.

3.3.1. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DESDE EL COLÍCULO SUPERIOR

De acuerdo con técnicas previamente establecidas (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988) y estandarizadas en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, el FG o el OHSt se aplicaron en ambos CS (figura 3.1A). El procedimiento para la realización de este marcaje implica la rasuración de la parte dorsal de la cabeza del animal, realizando una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo, para exponer el cráneo del animal. Tras una craneotomía parietal bilateral con ayuda de una fresadora (Free-Wheeler, Cordless Moto-tool, Model 850; Dremel), se reseca con ayuda de una micropipeta conectada a un sistema de aspirado (Ordisi S.A., L'Hospitalet, Barcelona, España) la porción de encéfalo e hipocampo necesario para exponer bilateralmente la parte posterior del tálamo y ambos CS. En la rata, se retira la piamadre que recubre los CS, mientras que en el ratón, no es necesario retirarla, solamente se expone el CS. Una vez expuestos ambos CS, se aplicó una pequeña porción de esponja de fibrina (Spongostan® Film; Ferrosan, Dinamarca) previamente empapada en FG para las ratas y en OHSt para los ratones, diluidos al 3% y al 10%, respectivamente, en una disolución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en suero salino al 0,9%. Finalmente, se cubre la superficie del CS con esponja de fibrina y se sutura la

piel del animal con seda de 4/0 (Lorca Marín S.A., Murcia, España), se aplica ungüento oftálmico de tobramicina (Tobrex®; Tobramicina 3 mg/g) sobre las córneas del animal para evitar su desecación durante la recuperación de la anestesia.

El tiempo que tarda el FG en llegar a las CGR desde el día de su aplicación en los CS es de 7 días, tanto en rata como en ratón (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b). Finalizado este tiempo, los animales control fueron procesados. A los animales experimentales, 7 días después del marcaje con FG se les realizó la SNO y, transcurridos los días necesarios después de la SNO, se procesaron los animales.

Dos grupos de animales control fueron procesados 10 y 30 días después del marcaje con FG, con el objetivo de compararlos con los grupos experimentales procesados 3 y 21 días después de la SNO (esto significa que, para el grupo procesado 3 días después de la SNO, han transcurrido 10 días desde el marcaje con FG; y para el grupo procesado 21 días después de la SNO, han transcurrido 30 días desde el marcaje con FG) (ver apartado resultados 4.2.1.3).

3.3.2. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DESDE EL NERVIO ÓPTICO

La aplicación del trazador en el MNO proximal al globo ocular se llevó a cabo según el método estándar descrito anteriormente en nuestro laboratorio (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993; Sellés-Navarro y cols., 1996; Parrilla-Reverter y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2009a). En primer lugar, se realizó la SNO (ver procedimiento detallado en el apartado 3.4). Una vez seccionado el NO, aplicamos una pequeña porción de Spongostan® previamente empapada con el trazador en la superficie del MNO (figura 3.1B) y se sutura la piel del animal con seda de 4/0. Finalmente, se comprobó mediante observación del fondo de ojo a través del microscopio operatorio que la vasculatura retiniana estaba normal. Estudios previos han determinado, tanto en rata como en ratón, que el tiempo necesario para que el FG llegue hasta el soma de las CGR desde su aplicación en el MNO es de 3 días (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b). Transcurrido este tiempo, se procesa del animal.

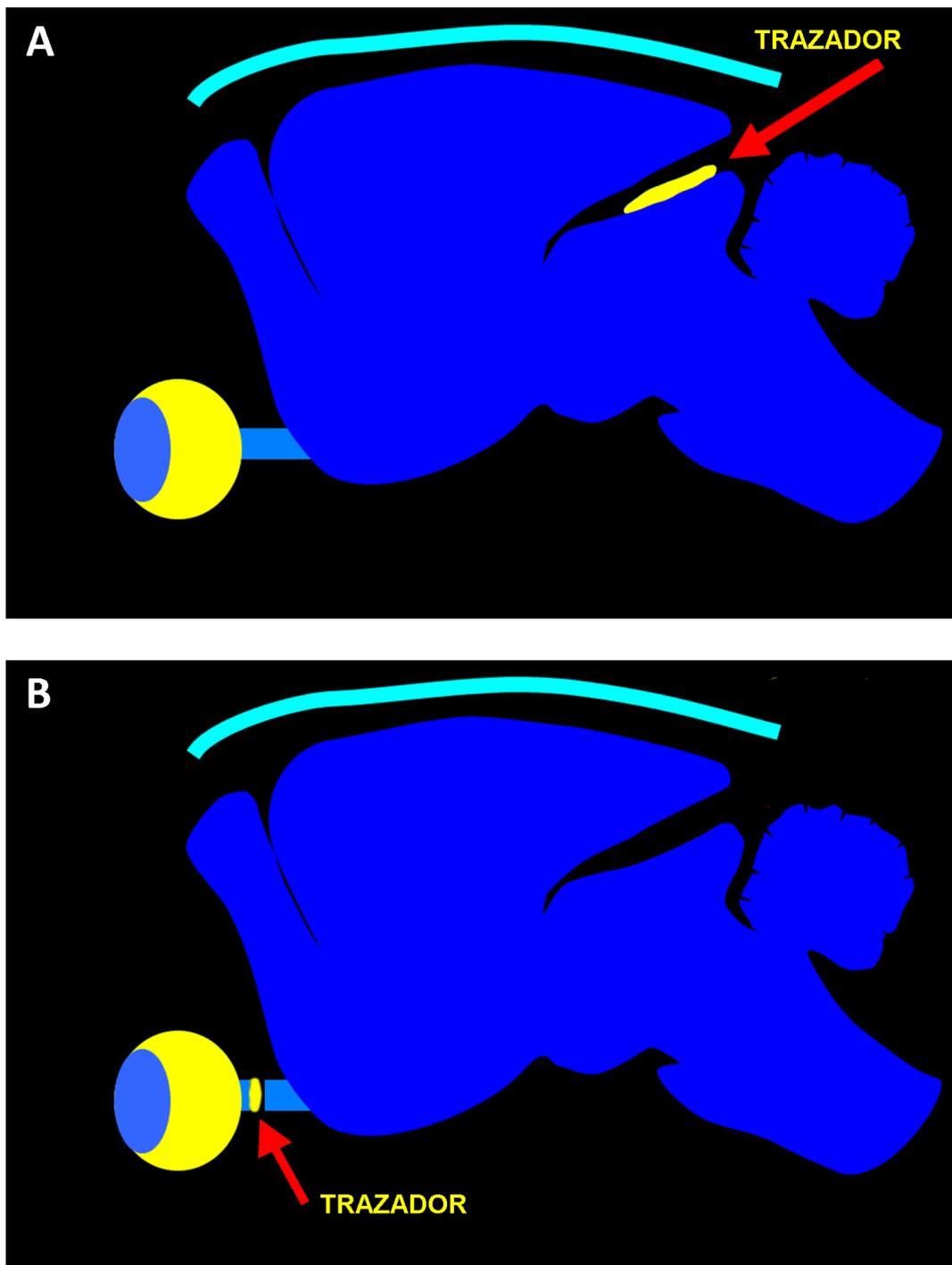


Figura 3.1. Esquema del trazado retrógrado de las CGR aplicando el trazador en el colículo superior o en el muñón del nervio óptico.

El trazador (FG en rata, y OHSt en ratón) se aplicó en ambos CS (A) para marcar todas las CGR que proyectan a éstos. Para marcar todas las CGR, el trazador se aplicó en el MNO (B).

3.4. SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

Para marcar las CGR desde el MNO y en todos los grupos experimentales de ratones se llevó a cabo la sección completa intraorbitaria del NO izquierdo, según técnicas previamente establecidas y descritas en rata (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sobrado-Calvo y cols., 2007; Nadal-Nicolás y cols., 2009, Parrilla-Reverter y cols., 2009a, 2009b). El procedimiento quirúrgico fue el siguiente: primero se rasura la parte dorsal de la cabeza del animal y se hace una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo. Se abre la piel de la cabeza, se desplaza hacia abajo y se realiza una condrotomía alrededor de la ceja orbitaria. A continuación, se seccionan los músculos recto superior y recto externo, y se tracciona el globo ocular para visualizar el NO. Se retira el tejido que recubre el NO y se procede a la apertura de las cubiertas durales. Para no provocar la isquemia de los vasos retinianos se secciona longitudinalmente la vaina dural en la zona superior del NO, ya que en la zona ínfero-nasal están situados los vasos oftálmicos (Morrison y cols., 1999; Sugiyama y cols., 1999). Una vez abierta la vaina dural, el NO queda expuesto y se secciona transversalmente a 0,5 mm del globo ocular aproximadamente (figura 3.2A). Tras realizar la SNO, se comprobó la integridad funcional de la vascularización de la retina mediante observación del fondo de ojo a través del microscopio operatorio. En el caso de que no se observara una correcta circulación sanguínea en la retina, el animal era desechado del estudio.

3.5. INYECCIÓN EN CÁMARA VÍTREA

Para evaluar el efecto de la administración intravítrea del BDNF sobre la supervivencia de las CGR y sobre las células de microglía fagocítica de los ratones, se realizaron dos grupos experimentales: En el primero de ellos se administró BDNF y en el segundo, vehículo. El BDNF se diluyó en tampón fosfato salino 0.1 M (PBS) con 1% de albúmina de suero bovino (BSA), con una concentración final de 1µg/µl. Para la inyección de vehículo se utilizó PBS. La administración se llevó a cabo inmediatamente después de la SNO, mediante una inyección intravítrea en el ojo experimental (ojo izquierdo). En ambos grupos, se siguió el mismo protocolo, realizando una única inyección intravítrea de un volumen final de 2,5 µl, con una jeringa Hamilton de 5 µl con una aguja de 30G. En primer lugar se realizaba una punción con una aguja de 26G en la esclerótica, a 1mm del limbo esclerocorneal (figura 3.2B). Inmediatamente después, se introdujo la aguja de la Hamilton lentamente, con el fin de evitar lesionar el cristalino. Una vez introducida en la cámara vítrea, se inyectó lentamente y se esperó unos segundos para retirar la aguja, evitando así que el volumen inyectado refluyera una vez finalizada la inyección. Finalmente, se comprobó el estado del fondo de ojo a través del microscopio operatorio.

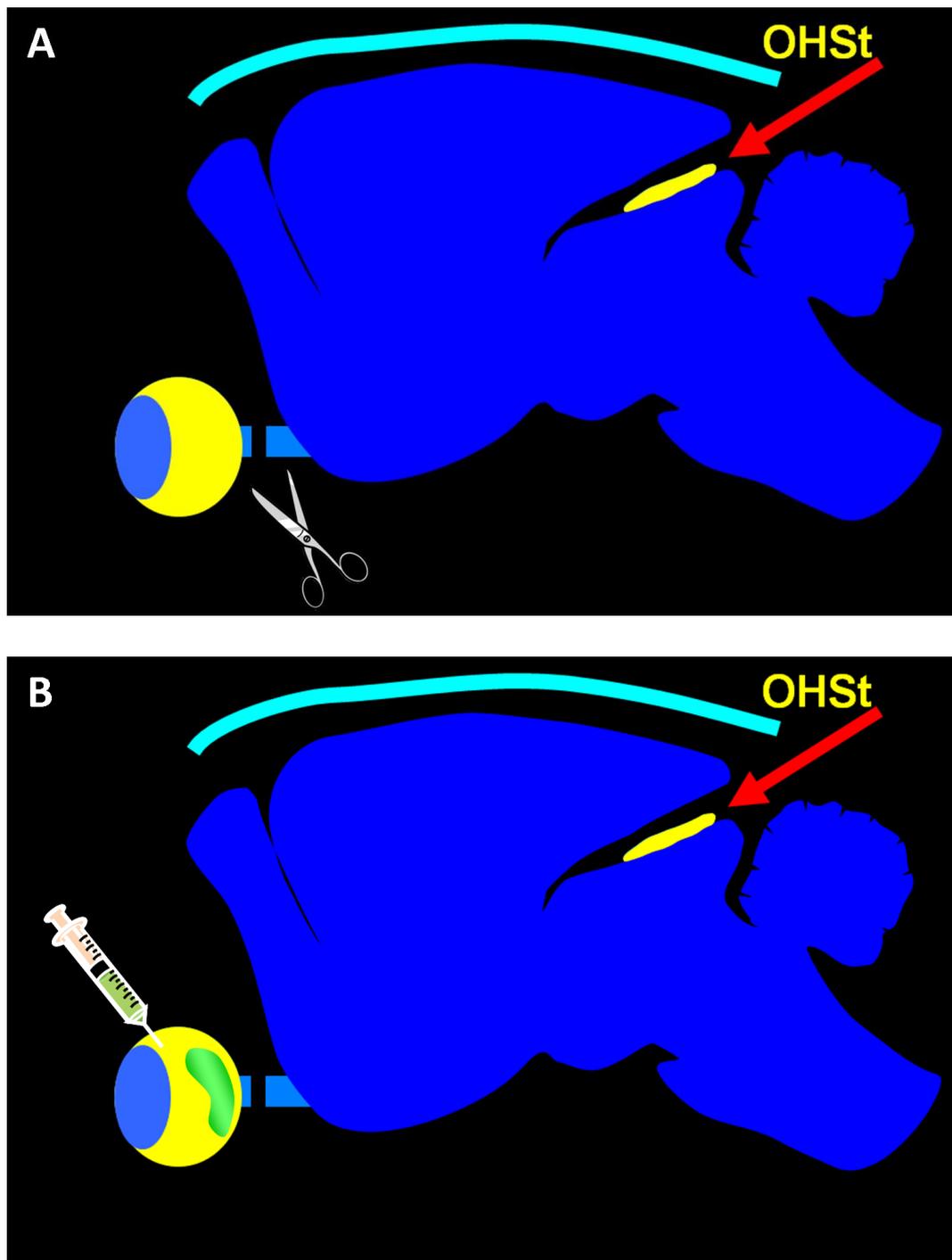


Figura 3.2. Esquemas representativos de la aplicación de OHSt en el colículo superior y de la sección del nervio óptico (A) y de la inyección intravítrea (B) en el ratón.

La SNO (A) se realizó a 0,5 mm de la cabeza del NO. Inmediatamente después, se realizó una única inyección intravítrea de BDNF o vehículo (B).

3.6. PROCESADO HISTOLÓGICO

3.6.1. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal[®], Vetoquinol S.A., Lure, Francia). Cuando el animal no respondía a estímulos dolorosos ni presentaba reflejos, pero aún mantenía el latido cardíaco, se procedía a la perfusión intracardiaca.

Para el procesado de las ratas, se seccionan los músculos del abdomen, accediendo a la cavidad abdominal, desde donde se secciona el diafragma. 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 perfunde con 50 ml de suero salino (NaCl al 0,9%) para limpiar la sangre de los vasos y órganos, a continuación se perfunde con 150 ml de una solución de paraformaldehído (PF) al 4% en tampón fosfato 0,1 M, a 4°C de temperatura. El procesado de las ratas fue realizado a primera hora de la mañana en todos los grupos experimentales, para evitar diferencias en la expresión de la melanopsina, ya que ésta varía a lo largo del día.

Para el procesado de los ratones se realiza el mismo procedimiento, pero no se clampa la aorta abdominal y no se utiliza la bomba peristáltica, sino que se realiza manualmente, inyectando con una aguja de 20G en el ventrículo izquierdo un volumen de entre 30-40 ml de suero salino para eliminar la sangre de los vasos y órganos y seguidamente, se inyecta por esta aguja un volumen de entre 40-50 ml de PF.

Una vez perfundidos los animales, se exenteran los globos oculares con todo el tejido orbitario alrededor y se coloca un punto de sutura en el centro del párpado superior, para saber la orientación del ojo. El tejido exenterado se postfija en PF durante 1 hora y seguidamente se lava en PBS. A continuación, se procedió a diseccionar los ojos para separarlos del resto del tejido orbitario, a excepción de la parte del párpado superior que contenía la sutura. A continuación, se realizaba una incisión en el limbo esclerocorneal para eliminar la córnea en toda su circunferencia. Con unas pinzas, se elimina el iris y se extrae el cristalino, retirando así las estructuras del polo anterior del ojo. En este momento sólo queda la zona posterior del globo ocular, que tiene forma de copa. A continuación, las retinas se diseccionaron en montajes globales (ver apartado 3.6.2) o se prepararon para cortar en secciones transversales (ver apartado 3.6.3).

3.6.2. DISECCIÓN Y PROCESADO HISTOLÓGICO DE LOS MONTAJES GLOBALES DE RETINA

Para la disección de las retinas en montajes globales, se realizaron cuatro cortes transversales de la copa óptica desde el limbo esclero-corneal hasta cerca del disco óptico. Estos cortes radiales se practicaban en los polos inferior, nasal, temporal y superior del ojo, siendo el corte realizado en el polo superior el más profundo y próximo al disco óptico para permitir orientar las retinas correctamente. Una vez realizados los cuatro cortes transversales, se extrajeron las retinas separándolas de la coroides y la esclerótica con la ayuda de unas pinzas. Una vez separada de la coroides, la retina quedaba sujeta al resto de la copa óptica por el NO y el cuerpo ciliar. Se separaba con cuidado de no traccionar la retina del cuerpo ciliar y finalmente, se cortaba su anclaje al NO. La retina se colocaba sobre un papel de filtro Whatman nº 1 (Whatman, Internacional Ltd. Maidstone, Reino Unido) al que quedaba adherida por su superficie vítrea y se postfijó en PF al 4% en PB durante 1 hora a 4°C. Por último, las retinas "in toto" eran puestas a plano con la cara vítrea hacia arriba en portaobjetos microscópicos, se eliminaban los restos de vítreo adheridos a la retina y se mantenían en PBS a 4°C hasta realizar la inmunohistofluorescencia.

3.6.3. ESTUDIO DE LAS SECCIONES TRANSVERSALES DE RETINA

Para las secciones transversales de retina, el proceso fue el siguiente. La copa óptica se crioprotegió por inmersión secuencial en concentraciones crecientes de sacarosa (15% y 30%). A continuación, esta copa se incluía en el medio óptimo de montaje para congelación (Tissue-Tek® O.C.T.™; Sakura, Finetek U.S.A, Inc., Torrance, CA, EE.UU), se orientan correctamente dejando la parte del párpado que contiene la sutura en el polo superior, y se congelan rápidamente en isopentano a -60°C. Seguidamente, se obtuvieron secciones histológicas de 15 µm de espesor con ayuda de un criostato (Jung CM3000, Leica, Heidelberg, Alemania).

3.6.4. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

Se siguieron dos protocolos de inmunohistofluorescencia diferentes según el tipo de muestra, montajes globales de retina o secciones transversales de retina. Tanto para las retinas de rata como las de ratón, los protocolos fueron idénticos.

3.6.4.1. Montajes globales de retina

El protocolo de inmunohistofluorescencia utilizado para los montajes globales de retina fue el siguiente:

- **Permeabilización:** Las retinas se lavaron en PBS a temperatura ambiente y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en PBS conteniendo un 0,5% de Triton 100 (Tx; Triton® X-100, Sigma X100, Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) tras los cuales se congelaron inmersas en el mismo tampón a -70°C durante 15 minutos. Después se atemperaron y se lavaron en PBS a temperatura ambiente.
- **Incubación de los anticuerpos primarios:** Las retinas se incubaron en el anticuerpo primario diluido en el tampón de bloqueo (PBS conteniendo un 2% de Tx y un 2% de suero normal de burro -Normal Donkey Serum, NDS, Jackson ImmunoResearch Inc., Cambridge, Reino Unido) durante 1 hora a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C. Tras atemperar de nuevo las retinas y posteriormente a un enjuague rápido en PBS, se lavaron en 0,5% Tx en PBS a temperatura ambiente.
- **Incubación con los anticuerpos secundarios:** Los anticuerpos secundarios que se usaban estaban unidos a distintos fluoróforos (ver apartado 3.6.4.3). Primero se realizó la incubación con el anticuerpo secundario diluido en 2% Tx en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras acabar la incubación, se lavaron las retinas en 0,5% Tx en PBS a temperatura ambiente y posteriormente en PBS. La retina se montó "in toto" sobre un portaobjetos, colocando su cara vítrea hacia arriba, con un medio de montaje, (glicerol al 50% y p-fenilendiamina al 0,04% en tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9,0; Dodd y cols., 1984) y un cubreobjetos. Los bordes del cubreobjetos se sellaron con laca de uñas. Posteriormente se examinaron con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania).

3.6.4.2. Secciones transversales de retina

En las secciones transversales de retina, el protocolo de inmunofluorescencia que se realizó fue el siguiente:

- **Permeabilización:** Los cortes radiales obtenidos en el criostato se lavaron primero en PBS y después en 0,1% Tx en PBS a temperatura ambiente para disolver el Tissue-tek® adherido a la sección y al porta.
- **Incubación con el anticuerpo primario:** Las retinas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo (2% Tx, 2% NDS en PBS) durante toda la noche a 4°C. Tras atemperar de nuevo las retinas, se lavaron en 0,1% Tx en PBS a temperatura ambiente.
- **Incubación con el anticuerpo secundario:** Se realizó la incubación del anticuerpo secundario diluido en 2% Tx en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las retinas en 0,1% Tx en PBS a temperatura ambiente y, por último en PBS.

Las secciones transversales de retinas de las ratas SD, se montaron con un medio de montaje comercial conteniendo DAPI (4',6-diamidina-2-fenilindol) para contrateñir los núcleos (Vectashield Mounting Medium con DAPI, Vector Atom, Alicante, España). El DAPI es un compuesto fluorescente que se une al ADN de doble cadena, preferentemente a las regiones ricas en A-T y forma un complejo estable que fluoresce 20 veces más que el DAPI solo. De esta manera, el DAPI tiñe los núcleos de todas las células de un determinado tejido. El pico de excitación es 358 nm y el de emisión es 461 nm (azul) y, por lo tanto, la señal del DAPI se observa con luz ultravioleta bajo el filtro azul.

Las secciones radiales de retinas de ratón, se montaron con el mismo medio de montaje utilizado para los montajes globales de retina, descrito en el apartado anterior.

3.6.4.3. Anticuerpos y diluciones de trabajo

A continuación se detallan los anticuerpos que se utilizaron para la inmunodetección de las diferentes poblaciones celulares:

Anticuerpos utilizados en las retinas de rata:

- **Detección de melanopsina:** Para la inmunodetección de la melanopsina, se utilizó un anticuerpo de conejo anti-melanopsina (rabbit anti-melanopsina, PA1-781, Affynity Bioreagents. Fisher Scientific, Madrid, España) diluido 1:500, tanto en secciones transversales como en montajes globales. Para detectar este anticuerpo, se utilizaron los anticuerpos secundarios (Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) burro anti-conejo Alexa Fluor 488 y 594 (donkey anti-rabbit, alexa-488 y 594), que emiten fluorescencia verde y roja, respectivamente, diluidos 1:500.
- **Detección de Brn3a:** Para la inmunodetección del Brn3a, se utilizó un anticuerpo de cabra anti-Brn3a (goat anti-Brn3a, sc-31984, Santa Cruz Biotechnologies. Heidelberg, Alemania) diluido 1:750, tanto en secciones transversales como en montajes globales. Para detectar este anticuerpo, se utilizaron los anticuerpos secundarios (Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) burro anti-cabra Alexa Fluor 488 y 594 (donkey anti-goat, alexa-488 y 594), que emiten fluorescencia verde y roja, respectivamente, diluidos 1:500.
- **Detección de rodopsina:** Para la inmunodetección de la rodopsina en secciones transversales, se utilizó un anticuerpo de ratón anti-rodopsina (mouse anti-rhodopsin, Sigma-Aldrich, Alcobendas, España) diluido 1:10.000. Para detectar este anticuerpo, se utilizó el anticuerpo secundario (Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) burro anti-ratón Alexa Fluor 594 (donkey anti-mouse, alexa-594), que emite fluorescencia roja, diluido 1:500.

Anticuerpos utilizados en retinas de ratón:

- Detección de Brn3a: Para la inmunodetección del Brn3a, se utilizó un anticuerpo de cabra anti-Brn3a (goat anti-Brn3a, sc-31984, Santa Cruz Biotechnologies. Heidelberg, Alemania) diluido 1:500, tanto en secciones transversales como en montajes globales. Para detectar este anticuerpo, se utilizó el anticuerpo secundario (Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) burro anti-cabra Alexa Fluor 594 (donkey anti-goat, alexa-594), que emite fluorescencia roja, diluido 1:500.
- Detección de Iba1: Para la inmunodetección del Iba1, se utilizó un anticuerpo de cabra anti-Iba1 (rabbit anti-Iba1, PA1-781, Affynity Bioreagents. Fisher Scientific, Madrid, España) diluido 1:500, tanto en secciones transversales como en montajes globales. Para detectar este anticuerpo, se utilizó el anticuerpo secundario (Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) burro anti-conejo Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit, alexa-488), que emite fluorescencia roja, diluido 1:500.

3.7. ESTUDIO MORFOLÓGICO Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

3.7.1. ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

Una vez montadas las retinas, se examinaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (Axioscop 2 Plus, Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con un filtro ultravioleta (excitación BP 365/12, supresión LP 397) y tres filtros de color rojo, verde y azul, para captar la señal fluorescente roja, verde y azul, correspondientes en este trabajo a los fluoróforos alexa 594, alexa 468 y DAPI o OHSt, respectivamente.

El microscopio está equipado a una cámara digital de alta resolución (ProgRes[®], C10, Jenoptik, Jena, Alemania) y una pletina motorizada controladas por ordenador (ProScan H128 Series Motor Controller, Prior Scientific Instruments Ltd., Cambridge, UK) mediante un programa informático de análisis de imagen (Image-Pro[®]Plus 5.1 for Windows[®], Media Cybernetics, Inc., Silver, Spring, MD, EE.UU) con un módulo de control de microscopio (Scope-Pro[®] 5.0 for Windows[®], Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EE.UU).

Secciones transversales de retina:

Las secciones transversales de las retinas de rata fueron utilizadas para analizar la estructura retiniana de las ratas albinas SD. Para ello, se realizaron microfotografías individuales de áreas representativas con el objetivo de 20x, con los tres filtros diferentes (verde, para observar la señal de

la melanopsina; azul, para la señal del DAPI; y rojo, para la señal de la rodopsina o Brn3a). Todas ellas se capturaron sin desplazar la pletina, para obtener el mismo campo microscópico y superponerlos después con Adobe Photoshop®CS.

Las secciones transversales de las retinas de ratón se utilizaron para caracterizar la expresión de Brn3a, comparándolas con la población de CGR trazadas con OHSt desde el MNO, y con las CGR marcadas con OHSt desde los CS. Para ello, en cada retina muestreada se microfotografiaron un mínimo de 6 secciones transversales y en cada sección se microfotografiaron 4 campos microscópicos. Las microfotografías se realizaron con el objetivo de 20x, capturando el mismo campo microscópico con el filtro ultravioleta, para capturar la señal del OHSt, y con el filtro rojo, para capturar la señal del Brn3a. Una vez adquiridas todas las microfotografías se analizó la co-localización de ambas señales, superponiendo la señal de OHSt sobre la de Brn3a con ayuda del programa de tratamiento de imágenes Adobe Photoshop®CS.

Montajes globales de retina:

Para la reconstrucción fotográfica (fotomontaje) de los montajes globales de retina se realizó la adquisición automática secuencial de campos microscópicos contiguos, sin uniones ni solapamientos entre campos, siguiendo el patrón de muestreo de una matriz de celdas regulares con un área preestablecida que cubría la superficie de la retina, usando un objetivo de 10x para las retinas de rata (figura x) y un objetivo de 20x para las retinas de ratón (figura x) (Plan-Neufuar, 20x/0.50; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania). Cada microfotografía fue enfocada manualmente antes de ser capturada y almacenada digitalmente con el programa de análisis de imagen Image-Pro®Plus 5.1. Todas las imágenes que componen una retina se guardaron en un archivo como imágenes de color de 24 bit usando el módulo control del microscopio Scope-Pro® 5.0 del programa de imagen de análisis Image-Pro® Plus 5.1. Estas imágenes pueden ser combinadas automáticamente de forma ordenada permitiendo la realización de un fotomontaje o imagen única con alta resolución de cada montaje global de la retina para su posterior estudio (figuras 3.3 y 3.4).

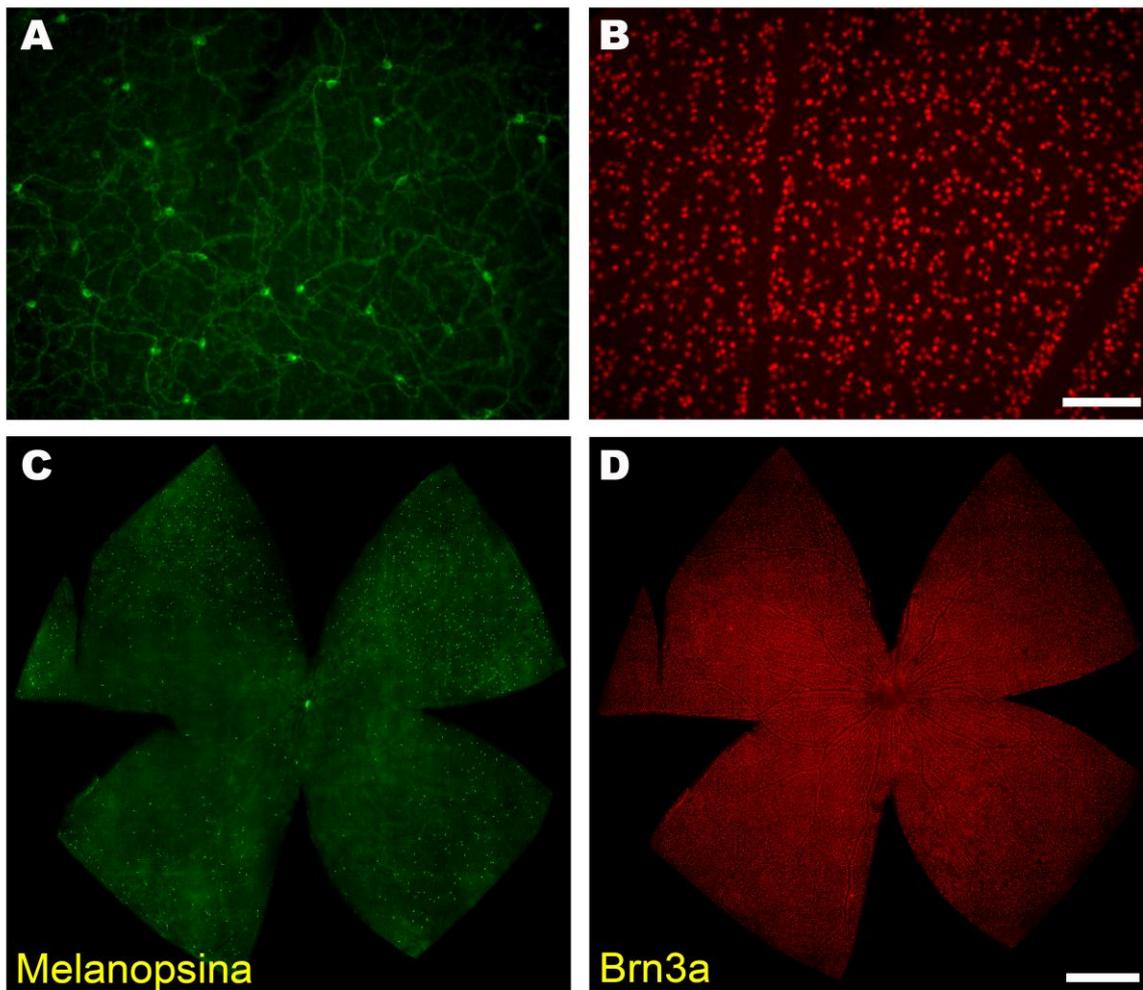


Figura 3.3. Reconstrucción fotográfica o fotomontaje de una retina de rata control a partir de campos microscópicos individuales.

En esta figura se muestra un campo microscópico individual adquirido con el filtro verde (**A**) para detectar la melanopsina, y con el filtro rojo (**B**), para detectar el Brn3a, y la reconstrucción de los fotomontajes con cada filtro a partir de las microfotografías individuales. Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 10X. Barra en **A** y **B**=100 μm . Barra en **C** y **D**= 1mm.

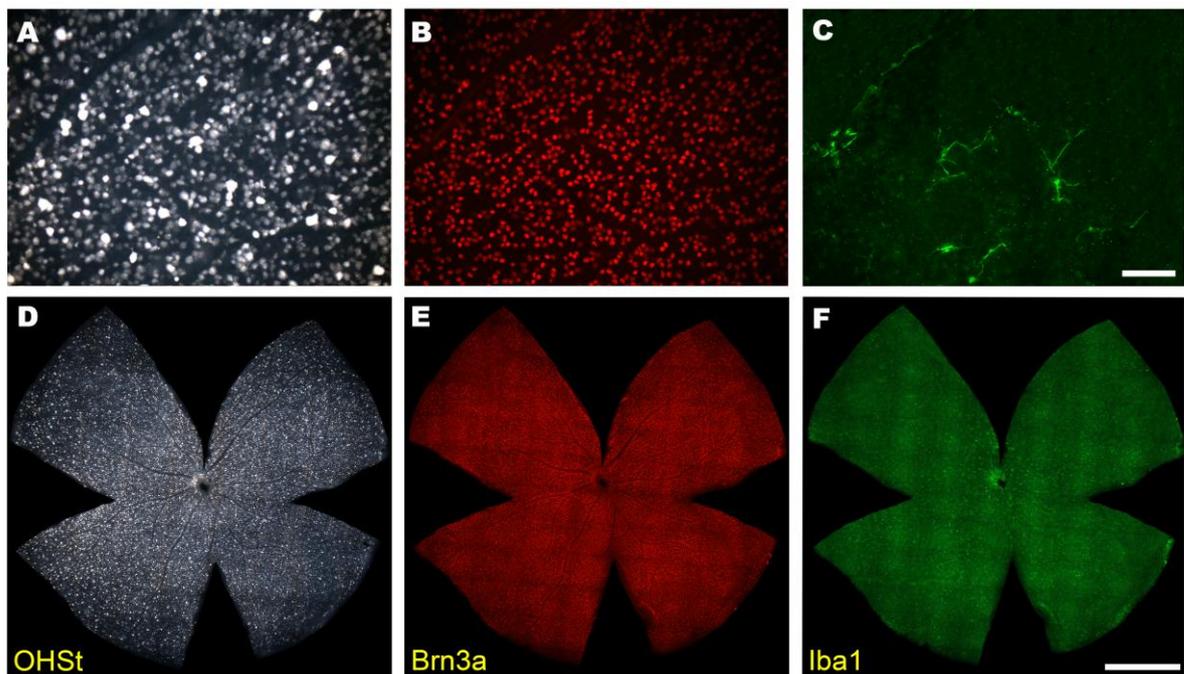


Figura 3.4. Reconstrucción fotográfica o fotomontaje de una retina control de ratón a partir de campos microscópicos individuales.

En esta figura se muestra un campo microscópico individual adquirido con el filtro ultravioleta (**A**) para detectar el OHSt, un filtro rojo (**B**), para detectar el Brn3a, un filtro verde (**C**), para detectar el Iba1, y la reconstrucción de los fotomontajes con cada filtro a partir de las microfotografías individuales. Estas imágenes fueron adquiridas con un aumento de 20X. Barra en **A, B y C**= 50 μ m. Barra en **D, E y F**= 1mm

A continuación, se tomaron fotografías de diferentes áreas de interés en las retinas de rata con aumentos de 10X, 20X y 40X; y en las retinas de ratón con aumento de 20X. Las retinas reconstruidas y las imágenes individuales, fueron tratadas con el programa de edición de imágenes Adobe Photoshop®CS (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, EE.UU) para su mejor visualización sin alterar la información relevante para su análisis y estudio.

3.7.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES CELULARES

3.7.2.1. Cuantificación de las poblaciones celulares en las retinas de rata

Los diferentes métodos que se utilizaron para cuantificar las poblaciones celulares de las retinas de rata fueron los siguientes:

3.7.2.1.1. Cuantificación manual de las células ganglionares melanopsínicas en comparación con la población de células ganglionares de retina

Para analizar la población de CGRm en comparación con la población de CGR, se acoplaron con el programa Adobe Photoshop® las imágenes al detalle de cada campo microscópico capturadas con los diferentes filtros y se cuantificó manualmente el número de CGRm que, a su vez, eran CGR FG⁺ o Brn3a⁺. Para cada uno de los tres grupos, los cuales se diferenciaban por el marcaje de las CGR, bien con FG aplicado en el MNO, bien con FG aplicado en los CS o bien mediante la inmunodetección de Brn3a, se utilizaron 10 retinas y de cada una de ellas se seleccionaron 20 microfotografías. Con estos datos se calculó el porcentaje de CGRm trazadas con FG (desde el MNO o desde el CS) o que expresaban Brn3a. Se consideró 100% el número total de CGRm⁺ contadas en cada análisis.

3.7.2.1.2. Cuantificación automática de las células ganglionares melanopsínicas

En colaboración con D. Manuel Jiménez López desarrollamos un método para contar automáticamente esta población celular. El procedimiento de cuantificación de las CGRm está implementada en el lenguaje de macros del programa de análisis de imagen Image-Pro® Plus 5.1 for Windows® (IPP) y procesa la retina a fin cuantificar y cualificar las células objeto del estudio; en esta fase obtenemos el área de cada objeto y su situación espacial en el eje X e Y, para estudiar posteriormente su distribución espacial mediante mapas de vecinos celulares, como veremos en el apartado 3.7.3.3.

En primer lugar se coloca un punto en el centro del NO, y dicha coordenada se almacena a fin de realizar una translación del origen al NO. Las imágenes se almacenan como una matriz, donde el píxel (0,0) corresponde al primer píxel del margen superior-izquierda. Así, mediante la translación, las coordenadas de todas las células del estudio son desplazadas con respecto al NO. En segundo lugar, se traza el contorno de la retina, para obtener el área total de ésta. Además, dicha selección nos permitirá aplicar los filtros y transformaciones sólo sobre el área seleccionada, lo cual produce resultados más ajustados. En primer lugar, se aplica el filtro Flatten(), que reduce las variaciones de "background" presentes en la imagen; en segundo lugar, se aplica el filtro Hipass(5x5), que resalta la

información de alta frecuencia, aumentando de esta forma el contraste; en tercer lugar, se aplica el filtro Median(5x5), que reduce el ruido y homogeneiza la imagen mediante un suavizado, eliminando las aberraciones que pudieran ser generadas por el filtro anterior; después se aplica el filtro Sharpen(), para resaltar los detalles; y finalmente, se procede a contar y medir las CGRm, cuantificando aquellas que cumplen con nuestros criterios de tamaño e intensidad de marcaje. Una vez aplicados dichos filtros, exportamos los datos relativos a la retina a una hoja de Excel, donde se especifica el nombre de la retina, su área y el número total de células. En la misma hoja de Excel se almacenan de forma ordenada las distintas mediciones de cada célula, en concreto el área, coordenada X y coordenada Y. Esta hoja es almacenada tanto en formato.xls como en formato.txt con columnas separadas por tabulaciones, este último formato responde al tipo de datos aceptados por el programa Java descrito a continuación.

Para validar las rutinas informáticas desarrolladas, se escogieron aleatoriamente 15 imágenes de 5 retinas diferentes inmunodetectadas con melanopsina y se contaron manualmente por dos investigadores diferentes. Posteriormente, estas mismas imágenes se cuantificaron con la rutina automática y se compararon los resultados (Figura 3.5). El número total de células contadas manualmente fue 685, mientras que automáticamente, el número fue de 688 células. Se compararon ambos resultados, y obtuvimos un coeficiente de correlación de Pearson de 0.95, lo que indica que la rutina automática es válida y fiable.

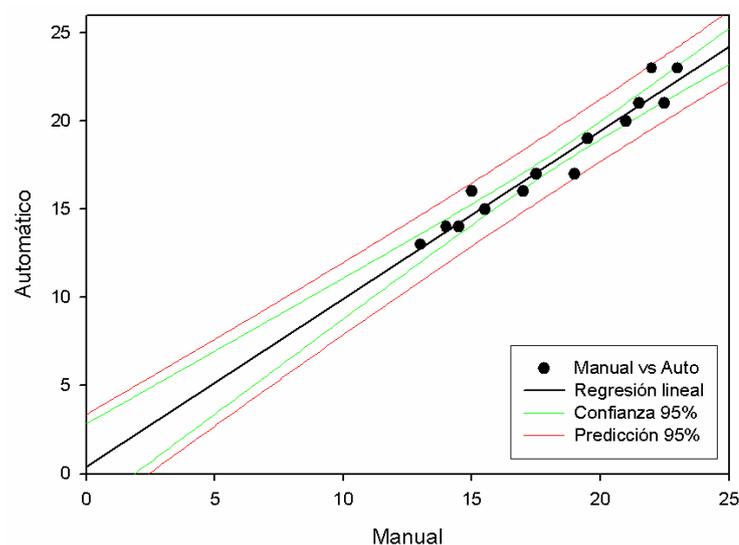


Figura 3.5. Validación del método automático de cuantificación de las CGRm en retina de rata.

En esta figura se muestra la validación del método de conteo automático de las CGRm. En el eje de ordenadas se muestra el número de células obtenido en la cuantificación manual, y en eje de ordenadas, el número de células obtenido en la cuantificación automática. El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.95.

3.7.2.1.3. Cuantificación automática de células ganglionares de retina inmunodetectadas con Brn3a

Para llevar a cabo la cuantificación del número total de CGR-Brn3a⁺ en las montajes globales de retina de rata utilizamos una subrutina informática específica desarrollada previamente en el Laboratorio (Nadal-Nicolas y cols., 2009). Brevemente, a cada imagen individual digital se le aplicaron una secuencia de filtros y transformaciones utilizando el lenguaje macro del programa de análisis de imagen IPP. En el primer paso, los datos de la imagen se procesan usando el filtro HiGauss que resalta los núcleos positivos. En un segundo paso, la imagen resultante se vuelve a procesar con el filtro LoPass, que normaliza las variaciones de fondo. Finalmente, la imagen resultante se procesa de nuevo con el filtro HiPass. Los grupos de núcleos se separaron aplicando dos veces el filtro de separación para poder diferenciarlos como objetos independientes. Los núcleos se cuentan bajo parámetros específicos que excluyen los objetos en función de su tamaño, descartando aquellos objetos que no cumplen dicho requisito y no puedan ser núcleos inmunodetectados con Brn3a. Finalmente, los datos de cada contaje (retina completa) se exportan (dynamic data Exchange) a una hoja de Excel (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) donde los datos se guardan para análisis posteriores.

3.7.2.2. Cuantificación de las poblaciones celulares en las retinas de ratón

3.7.2.2.1. Cuantificación manual de células ganglionares de secciones transversales de retina

Para cuantificar el número de células en la retina de ratón que expresan Brn3a y que, a su vez, están marcadas con OHSt, se capturaron microfotografías a detalle de secciones transversales del mismo campo microscópico con ambos marcadores, y se acoplaron mediante el programa Adobe Photoshop. Una vez acopladas, se realizó un contaje manual del número de CGR-Brn3a⁺ que estaban marcadas con OHSt. Esta cuantificación se realizó tanto en las retinas marcadas con OHSt desde los CS, método mediante el cual se marca la práctica totalidad de las CGR de ratón (Sellés-Navarro y cols., 1996; Mansour-Robaey y cols., 1994; Vidal-Sanz y cols., 2001a; Lafuente y cols., 2002), y en las retinas marcadas con OHSt desde el MNO, vía por la cual se traza la población retinofugal completa (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993; Salinas-Navarro y cols., 2009a).

3.7.2.2.2. Cuantificación automática de células ganglionares de la retina marcadas con OHSt en retinas control completas montadas a plano

Las imágenes fueron procesadas por medio de una subrutina informática específica para el conteo de las CGR en montajes globales de retina marcadas con OHSt desde los CS, previamente desarrollada en el Laboratorio (Salinas-Navarro y cols., 2009b) automatizando las tareas repetitivas mediante la programación del lenguaje de macros del programa de análisis de imagen Image-Pro Plus[®]. Así, aplicando una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada imagen salvada podemos contar las células resultantes exportando los datos a una hoja de cálculo (Microsoft[®] Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA) para su análisis. Para contar el número de CGR-OHSt⁺ y medir el área de la retina en una de las imágenes de alta resolución obtenidas a partir de fotomontajes se aplica la correspondiente calibración espacial a la imagen reconstruida basada en las características usadas para su captura. En el primer paso, para realizar el conteo celular, las imágenes fueron convertidas a Barra de grises 8-bit para descartar el exceso de información del color. Las aberraciones de iluminación causadas por la óptica del microscopio fueron eliminadas por el filtro de mejora "flatten" del programa IPP el cual nos elimina las variaciones de iluminación de fondo. A continuación se realzan los bordes de las células usando comandos de filtrado del IPP. Los agrupamientos de células fueron separados con dos pasos por medio del filtro "watershed split" del IPP el cual erosiona los objetos hasta la desaparición, para luego dilatarlos evitando que lleguen a tocarse. Las células son contadas dentro de unos parámetros predeterminados para excluir objetos que son demasiado grandes o pequeños para ser una CGR. Finalmente, los datos de cada conteo se exportan a una hoja de cálculo Microsoft[®] Office Excel 2003, donde los datos se guardan para un análisis posterior.

3.7.2.2.3. Cuantificación semi-automática de células ganglionares marcadas con OHSt en retinas izquierdas y derechas contralaterales en montajes globales de retina después de la sección del nervio óptico

Las imágenes que se procesaron mediante esta técnica procedían de retinas izquierdas experimentales después de la SNO y las retinas derechas contralaterales a la lesión. Estas retinas no pudieron ser procesadas automáticamente, ya que a partir de 3 días después de la SNO se observó la aparición de células de microglía marcada vía transcelular con OHSt y la subrutina informática desarrollada no las diferencia de las CGR que sobreviven a la SNO. En las retinas contralaterales a la SNO también se observó la aparición de células de microglía fagocítica, por lo que también se cuantificaron semi-automáticamente.

En estudios previos (Villegas-Pérez y cols., 1988, 1993; Peinado-Ramón y cols., 1996) el número de CGR-OHSt⁺ se estimaba contándolas en microfotografías individuales de 12 campos microscópicos estándar de la retina capturados manualmente. Para realizar esta estimación del

número total de CGR-OHSt⁺ se desarrolló una subrutina informática que obtuviera estas 12 microfotografías a partir de fotomontajes de retina y que, una vez contadas manualmente, fuera extrapolado al número total de células. Para obtener estos 12 campos microscópicos, se dividió la retina en tres regiones central, media y periférica (Parrilla-Reverter y cols., 2009b) y se obtuvieron 4 microfotografías en cada una de las regiones de la retina, correspondiendo 3 campos microscópicos de 0,05 mm² en cada cuadrante de la retina (figura 3.6).

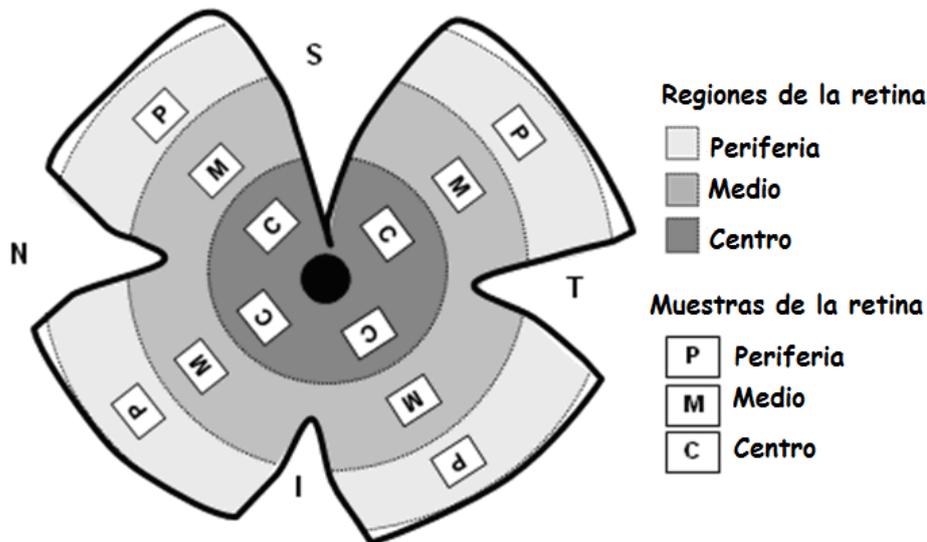


Figura 3.6. Representación esquemática del método de estimación del número total de CGR en función de las tres regiones (centro, media y periferia).

Este dibujo ilustra las muestras seleccionadas automáticamente en cada fotomontaje para contar manualmente las CGR-OHSt⁺ en los ojos lesionados: se toma 1 fotografía por cuadrante y 4 fotografías por área (central (C), media (M) y periférica (P)). En cada cuadrante se analizaron 3 fotografías equidistantes, tomando como referencia el nervio óptico. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior.

Para ello, el investigador trazaba manualmente el contorno de la retina, lo que permite calcular el área total de ésta, se marca con un punto la posición del NO y se coloca otro punto en cada uno de los extremos de los cuadrantes de la retina, de manera que el software utilizado calculaba la longitud existente desde el NO hasta cada dicho punto y obtenía 3 campos microscópicos de 0,1 mm² equidistantes por cuadrante. Teniendo en cuenta que la densidad de CGR en ratón varía en cada una de las regiones de la retina, disminuyendo conforme nos alejamos del NO (Salinas-Navarro y cols., 2009b), podíamos conocer la densidad media de cada una de las regiones y con ella, estimar la densidad total de forma más precisa. El conteo manual de las CGR se realizó a doble ciego, sin saber el investigador a qué grupo experimental pertenecía cada retina. Únicamente se contaron aquellas células que, por la acumulación de OHSt citoplásmica (las células de microglía

acumulan el OHSt fagocitado con un característico patrón punteado) y por su morfología eran CGR, según criterios previamente establecidos (Vidal-Sanz y cols., 2001a).

La validación del método de cuantificación se realizó utilizando 5 retinas control. El número total de CGR-OHSt⁺ fue obtenido mediante conteo automático, según la metodología previamente descrita (Salinas-Navarro y cols., 2009b) y mediante la estimación del número total de células con esa subrutina. Una vez contadas manualmente las 12 microfotografías obtenidas, se estimó el número total de células en función del área total de la retina y en función de las tres regiones de la retina (central, media y periférica). Observamos que extrapolar la cuantificación por regiones parciales la estimación era más precisa que la obtenida en función del área total de la retina, obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson igual a 0,96.

3.7.2.2.4. Cuantificación automática de células ganglionares de la retina de ratón inmunodetectadas con Brn3a

Al igual que para contar las CGR-OHSt⁺, las imágenes fueron procesadas por medio de una aplicación informática específica para el conteo de la inmunorreactividad positiva frente a Brn3a en montajes globales de retina que ha sido puesto a punto para este trabajo de investigación.

Las imágenes fueron procesadas usando una subrutina informática específica, automatizando las tareas repetitivas mediante la programación en lenguaje de macros del programa de análisis de imagen Image-Pro[®] Plus. Así, aplicando una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada imagen salvada, se pueden contar las células resultantes, exportando los datos a una hoja de cálculo (Microsoft[®] Office Excel 2003) para su análisis. Para contar el número de CGR y medir el área de la retina en una de las imágenes de alta resolución obtenidas a partir de fotomontajes se aplica la correspondiente calibración espacial a la imagen reconstruida basada en las características usadas para su captura. En el primer paso para la cuantificación, los datos de la imagen se procesaron usando el filtro HiGauss que resalta los objetos positivos. En un segundo paso, la imagen resultante se vuelve a procesar con el filtro LoPass, que normaliza las variaciones de fondo. Finalmente, la imagen resultante se procesa de nuevo con el filtro HiPass. Los grupos de células se separaron aplicando dos veces el filtro de división morfológica “watershed” que erosiona los objetos hasta poder diferenciarlos como objetos independientes. Los objetos de interés, núcleos de CGR-Brn3a⁺, se cuentan bajo parámetros específicos que excluyen los objetos en función de su tamaño, descartando aquellos objetos que no cumplan dicho requisito. Finalmente, los datos de cada conteo (retina completa) se exportan a una hoja de cálculo (Microsoft[®] Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA) donde los datos se almacenan para análisis posteriores.

La validación del método de cuantificación automático se realizó contando manualmente un total de 13.162 núcleos Brn3a⁺ en 20 imágenes seleccionadas al azar entre 5 retinas control

abarcando diferentes densidades de CGR. El conteo manual se llevó a cabo por 3 investigadores diferentes. La media aritmética de estos 3 conteos manuales por fotografía fue la que se usó para compararla con el número de núcleos Brn3a⁺ obtenido de las mismas imágenes usando el método automático (figura 3.7). Los resultados obtenidos mostraron una correlación de $R^2 = 0,98$ con el test de correlación de Pearson.

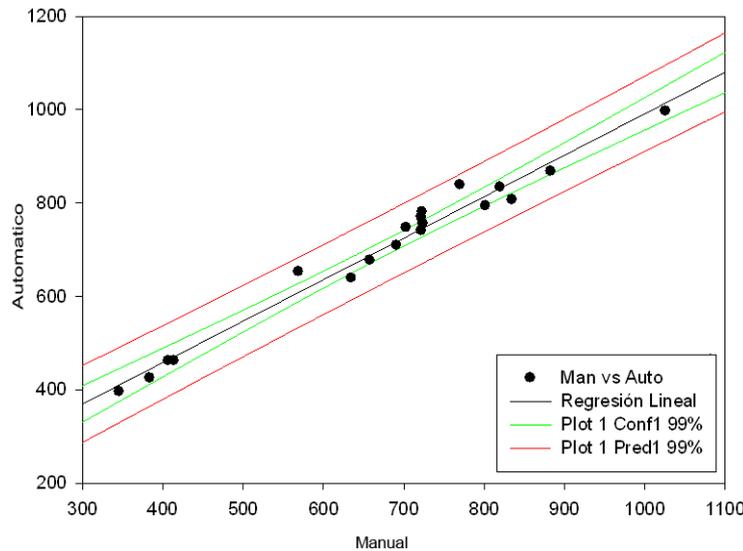


Figura 3.7. Validación del método automático de cuantificación de las CGR de ratón marcadas con Brn3a.

En esta figura se muestra la validación del método de conteo automático de las CGR-Brn3a⁺. En el eje de ordenadas se muestra el número de CGR-Brn3a⁺ obtenido mediante la cuantificación manual, y en eje de ordenadas el número obtenido mediante la cuantificación automática. El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.98.

3.7.2.2.5. Cuantificación manual de células de microglía fagocítica marcadas con OHSt e Iba1 en montajes globales de retina

La cuantificación de las células de microglía fagocítica OHSt e Iba1⁺ fue realizada en montajes globales de retina. Se llevó a cabo una cuantificación manual, se colocaron manualmente con Adobe Photoshop un punto en la posición de cada una de las células de microglía fagocítica OHSt e Iba1⁺. Una vez punteada la retina completa, mediante una rutina informática desarrollada en el programa Image Pro-Plus, se cuantificaron automáticamente el número de puntos existentes en la retina. Los datos de la localización espacial de cada uno de los puntos se guardaron en un archivo de Excel para la posterior realización de los mapas de distribución.

3.7.3. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS POBLACIONES CELULARES

3.7.3.1. Distribución espacial de las células ganglionares de la retina de rata y ratón

Para estudiar el patrón de distribución espacial de las CGR en la totalidad de la retina, se calculó la densidad celular y a continuación estas densidades se representaron gráficamente como mapas de isodensidad (figura 3.8). Este procedimiento se utilizó tanto para las CGR de retinas de rata como de ratón.

Los fotomontajes fueron procesados automáticamente usando una rutina informática previamente desarrollada al efecto en el programa de imagen "Image Pro-Plus" (IPP) (Salinas-Navarro y cols., 2009a). Para analizar el patrón de distribución de CGR-OHSt⁺ o Brn3a⁺, los fotomontajes de montajes globales de retina fueron procesadas automáticamente usando el programa informático de análisis de imagen Image-Pro[®] Plus 5.1 for Windows[®]. Para ello, se desarrolló una subrutina específica en la que cada microfotografía se dividía en áreas rectangulares de interés de tamaño conocido (36 áreas por microfotografía para OHSt, y 25 para Brn3a). En cada área de interés se contó en número de CGR (descrito anteriormente) y se calculaba la densidad celular. Los datos se exportaban a una hoja de cálculo (Microsoft[®] Office Excel 2003). Finalmente, estos datos se representaron en una gráfica de curvas cerradas para contornos o mapas de isodensidad, usando el programa de representación gráfica SigmaPlot[®] 9.0 for Windows[®] (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EE.UU).

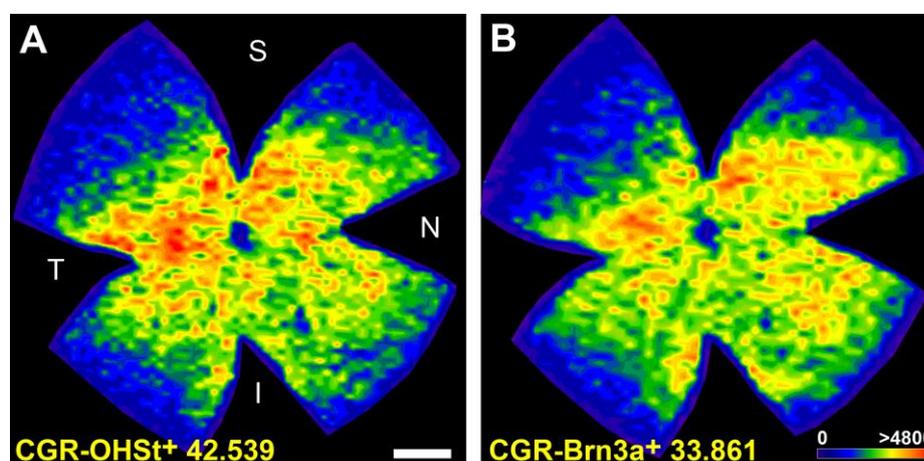


Figura 3.8. Visualización de la distribución de las CGR en retinas de ratón usando mapas de isodensidad.

En esta imagen se muestran los mapas de isodensidad de las CGR-OHSt⁺ (A) y CGR-Brn3a⁺ (B) de una retina control de ratón. Estos mapas fueron generados en una escala de color, donde los colores fríos corresponden a las zonas de menor densidad y los colores cálidos a las zonas de mayor densidad (desde 0 hasta 4.800 o más CGR). En la parte inferior izquierda se muestra el número total de CGR cuantificado con cada marcador. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

3.7.3.2. Distribución espacial de las células de microglía fagocítica de retinas de ratón

La distribución de las células de microglía fagocítica OHSt e Iba1⁺, se visualizó usando mapas del número de vecinos, ya que la población de estas células no es lo suficientemente alta como para realizar mapas de isodensidad.

Para realizar los maps de vecinos se desarrolló una aplicación en Java que carga el fichero resultante del contaje del número de células de microglía fagocítica anteriormente descrito (ver apartado 3.7.2.2.5). La elección de Java como lenguaje de programación responde a varios factores, como son: la buena gestión de memoria dinámica, que es un lenguaje libre, su portabilidad (puede ser ejecutado en cualquier computadora con la maquina virtual de Java instalada) y, por ultimo, su robustez.

Este programa realiza los siguientes cálculos para cada célula. En primer lugar, se realiza la translación con respecto al NO de cada célula, en segundo lugar se mide la distancia euclidea al NO y, en tercer lugar, se aplica el algoritmo de los K-Vecinos con radio fijo, en este caso, el radio es de 0,1023 mm (correspondiente a 200 píxeles). Así, mediante este algoritmo se contará para cada célula cuántas células se encuentran a una distancia menor o igual al radio dado. Conceptualmente es sencillo, sin embargo el orden de complejidad computacional es de orden $O(n^2)$ ya que la comprobación de la distancia ha de ser realizada para cada par de células. Para reducir dicho orden de complejidad, se tuvo en cuenta que la relación de vecindad fuera recíproca, ahorrando de esta forma cientos de cálculos.

Una vez analizada la retina completa, los resultados son almacenados en un fichero de texto con columnas delimitadas por tabulaciones que puede ser abierto por la mayoría de las hojas de cálculo disponibles en el mercado. Finalmente, mediante el programa Sigmaplot (SigmaPlot® 9.0 for Windows®; Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU), realizaremos una representación de las células en función de su posición con respecto al NO y el número de vecinos. Para diferenciar el número de vecinos de cada una de las células, se estableció una Escala de color, de manera que los colores más fríos (lila-azul) corresponden a las células con menor número de vecinos y los colores más cálidos (rojo-granate) a las que poseen mayor número de vecinos (figura 3.9). La Barra ha sido fijada en función de los resultados obtenidos. Así, para el estudio de las células de microglía fagocítica se estableció una escala de 0 a 21 o más vecinos.

Gracias a la perfecta orientación de las retinas y a su punto de referencia común, el NO, podemos estudiar las retinas en conjunto, para ello simplemente es necesario componer un nuevo.txt donde copiamos las coordenadas X e Y de todas las células de todas las retinas a normalizar, después lanzamos el estudio espacial del conjunto de células, obteniendo de esta forma una distribución espacial que describe la normalidad para dicho conjunto de retinas. Cabe destacar que el número total de células es directamente proporcional al tiempo de procesamiento requerido por el programa.

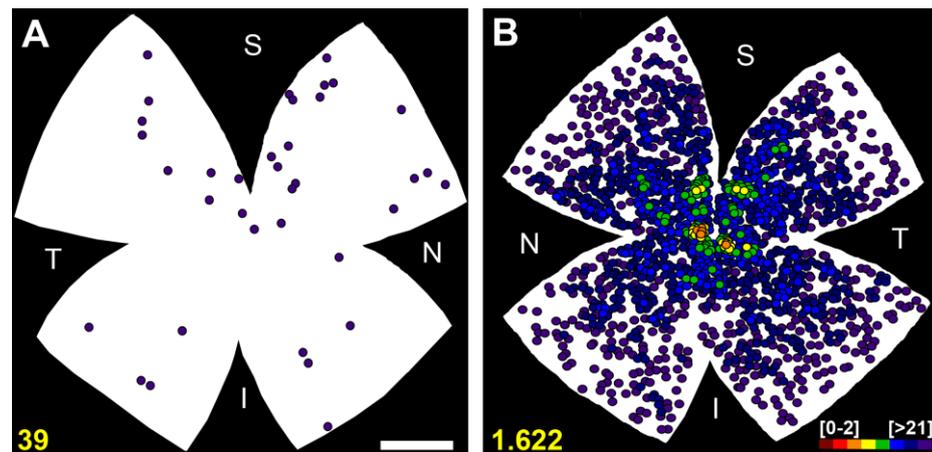


Figura 3.9. Visualización de la distribución de las células de microglía fagocítica en retinas de ratón usando mapas de vecinos.

En esta imagen se muestran dos retinas de ratón representativas, correspondientes a una retina control derecha (A) y una retina experimental izquierda (B). La escala de colores de cada célula nos muestra el número de células vecinas que tiene en un radio determinado. Las células lilas poseen un rango de entre 0-2 células vecinas, y aumenta el número hasta las células granates que tienen entre 19-21 células vecinas. En la parte inferior izquierda se muestra el número total de células de microglía fagocítica de cada retina. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

3.7.3.3. Distribución espacial de las células ganglionares de la retina melanopsínicas en retina de ratas

Para estudiar la distribución de las CGRm en las retinas de rata, se utilizó el mismo método descrito en el apartado anterior. Se realizaron mapas de vecinos celulares, donde se muestran las células con mayor número de vecinos representadas en colores cálidos (rojo-granate) y las células con menor número de vecinos, en colores fríos (azul-lila). En estas retinas, el radio fijo utilizado fue de 0,22mm, ya que el tamaño de la retina de rata es diferente que el de la de ratón.

Además del estudio de la distribución de estas células en función del número de vecinos de cada célula, los datos obtenidos nos permiten obtener el número total de células en cada cuadrante de la retina y a qué distancia se encuentra cada una de ellas con respecto al NO. Así, podemos agrupar las células que se encuentran a la misma distancia y estudiar la diferencia a distintas distancias. Para ello, subdividimos la retina en partes de 200 píxeles a partir del NO, donde 200 píxeles corresponden a 0,22 mm de distancia, y cuantificamos el número total de células en cada uno de esos puntos.

3.7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat® for Windows™ version 3.11 (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EE.UU) y las diferencias entre grupos analizados se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

La cuantificación automática de células fue comparada con la obtenida manualmente mediante el test de correlación de Pearson.

Para comparaciones múltiples entre grupos se utilizó el test ANOVA para comparaciones múltiples, tras cumplir la condición de que la F global de ANOVA fuese estadísticamente significativa, se realizó un análisis post hoc con el test de Tukey para comparaciones específicas dos a dos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS EN LA RATA ADULTA

4.1.1. IDENTIFICACIÓN DE MELANOPSINA EN LAS RETINAS DE RATA ADULTA

El primer objetivo de este estudio fue poner a punto un protocolo de inmunohistofluorescencia para detectar las CGR que expresan melanopsina (CGRm) en secciones transversales y comprobar la integridad de la retina de las ratas albinas SD, ya que estudios previos habían descrito que se produce una degeneración con la edad de los FR en las ratas SD (O'Steen y cols., 1974). En la figura 4.1 se observan dos secciones transversales de una retina de rata SD de dos meses de edad en las que podemos observar la inmunofluorescencia de la melanopsina en la CCG. También podemos ver en estas secciones que la retina tiene un aspecto normal. La tinción con DAPI nos permite observar toda la estructura de la retina, ya que tiñe todos los núcleos celulares y no observamos que se haya producido una pérdida celular. Por otra parte, vemos que los segmentos externos de los bastones (figura 4.1E,F) tienen un aspecto normal y también podemos observar las CGR-Brn3a⁺ (Figura 4.1B,C).

A continuación, pusimos a punto un protocolo para realizar la inmunodetección de la melanopsina en montajes globales de retina. En la figura 4.2 se muestra una imagen a gran aumento en la que podemos observar que la melanopsina está presente tanto en el cuerpo celular como en las dendritas de las CGRm. En la figura 4.3 se puede observar además que las CGRm son más abundantes en la periferia que en la zona central de la retina.

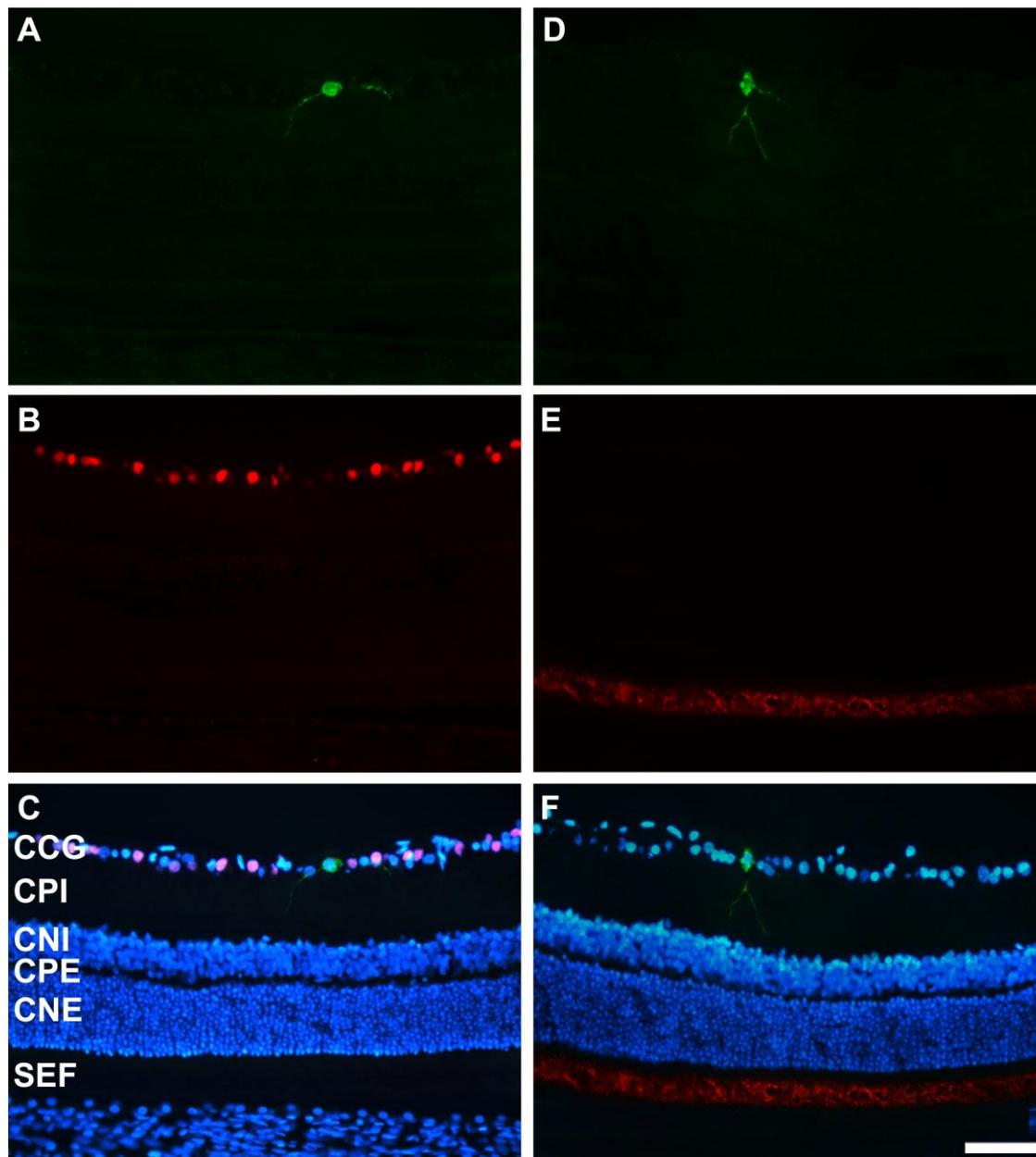


Figura 4.1. Inmunodetección de melanopsina, Brn3a y rodopsina en secciones transversales de retinas de las ratas albinas SD control.

En esta figura se observa una sección transversal marcada con melanopsina, Brn3a y DAPI (A-C) y otra sección marcada con melanopsina, rodopsina y DAPI (D-F). Podemos observar la señal de la melanopsina en la CCG y que la retina tiene una estructura normal. En C y F se muestran ambas señales solapadas y la contratinción de los núcleos con DAPI (señal azul). Abreviaturas: CCG= capa de células ganglionares, CPI= capa plexiforme interna, CNI= capa nuclear interna, CPE= capa plexiforme externa, CNE= capa nuclear externa, SEF= segmentos externos de los FR. Barra= 50 μ m.

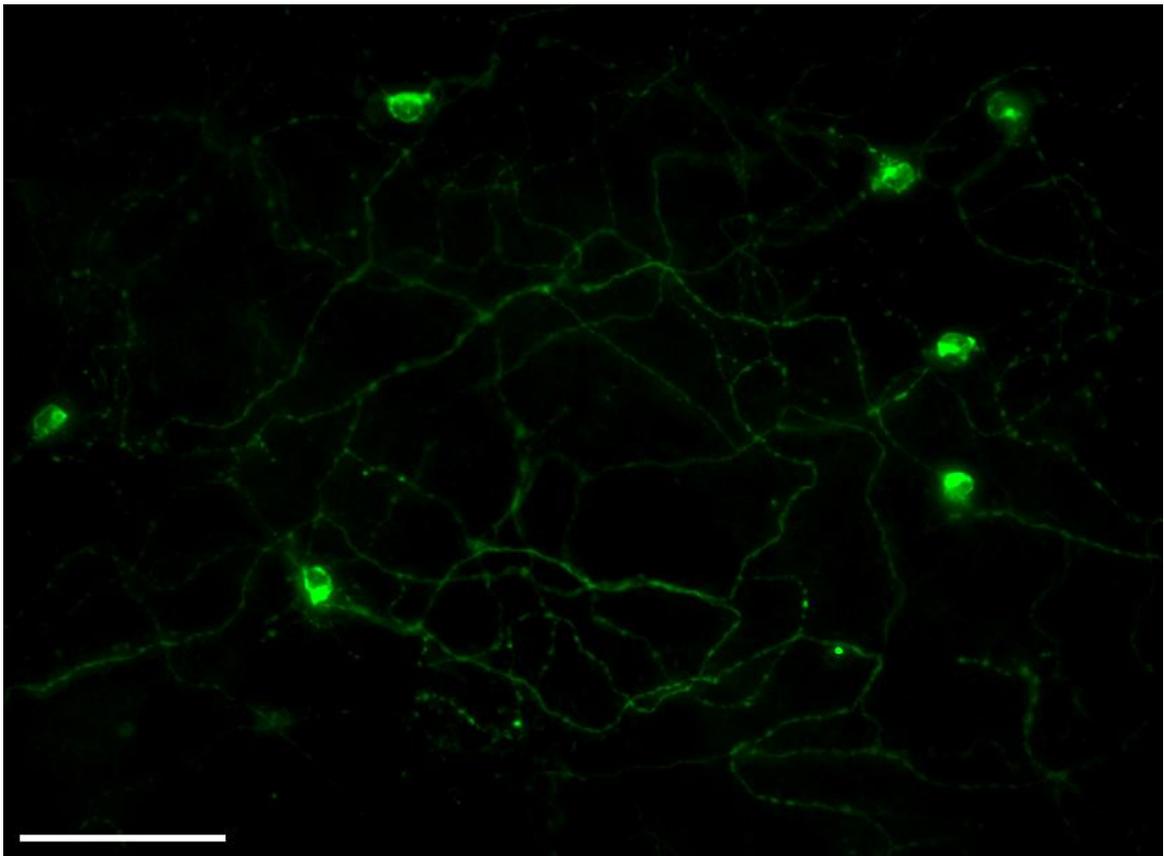


Figura 4.2. Inmunodetección de las CGRm en montajes globales de la retina.

En esta microfotografía (20x) de un montaje global de retina de una rata SD control podemos observar que la melanopsina se expresa tanto en los somas como en las dendritas de las CGRm. Barra= 100 μ m.

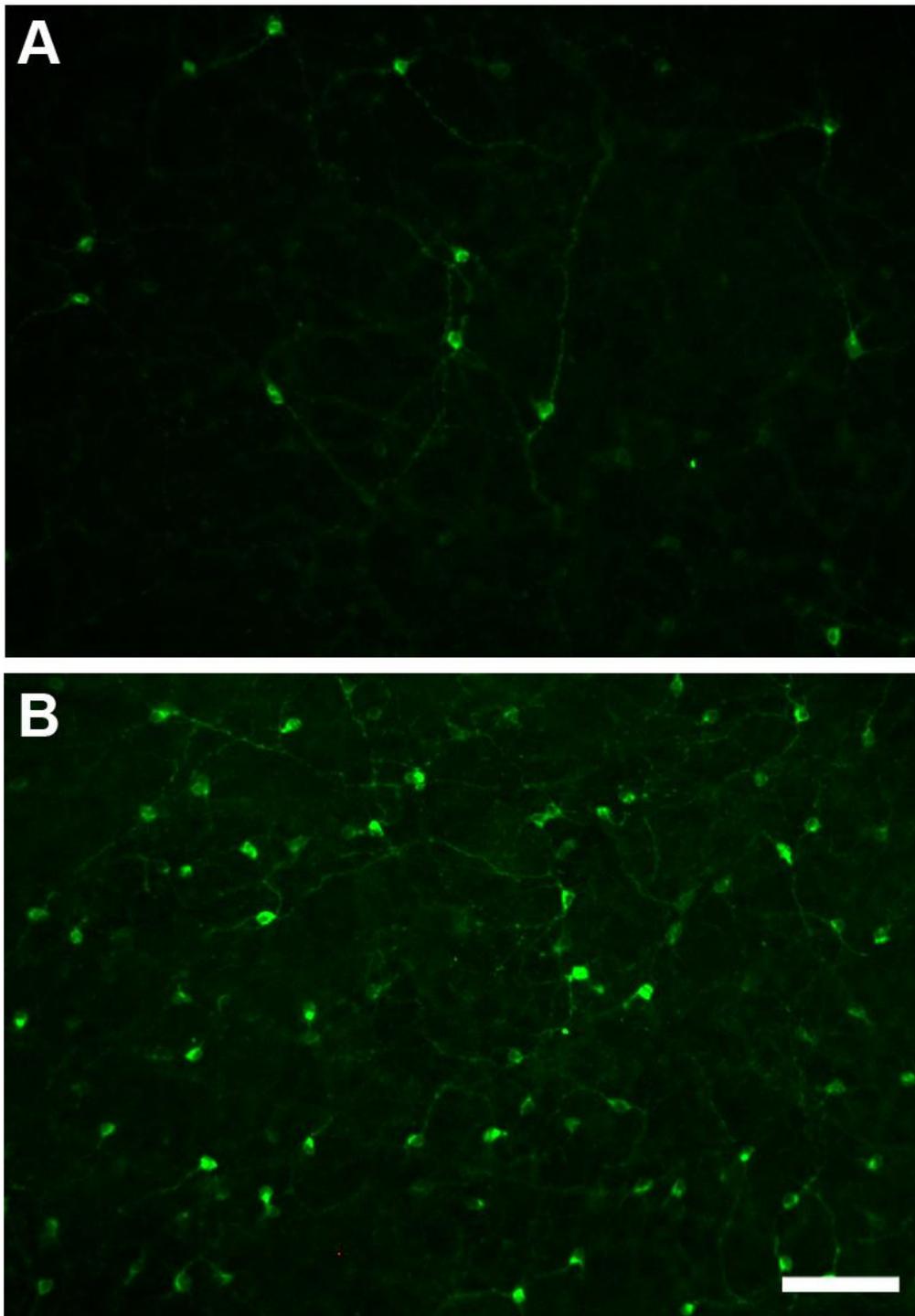


Figura 4.3. Microfotografías al detalle de las CGRm en diferentes zonas del montaje global de retina.

En estas dos microfotografías (10x) tomadas de la zona central (**A**) y periférica (**B**) de un montaje global de una retina de una rata adulta SD control se observa que la densidad de CGRm es menor en la retina central que en la retina periférica. Barra= 100 μ m.

Una vez puesto a punto el protocolo para detectar la melanopsina en montajes globales de la retina, estudiamos qué parte de la población la población total de CGR expresa la melanopsina (CGRm), cuantificamos automáticamente el número total de las CGRm, y analizamos su distribución espacial.

4.1.2. ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS

Para llevar a cabo la caracterización de estas células, nos propusimos comparar su población con la población total de CGR. Las CGR son las únicas neuronas de la retina que proyectan sus axones fuera del ojo formando el NO. Las CGR en rata proyectan masivamente a los CS (Salinas-Navarro y cols., 2009a), por lo que el trazado de las mismas desde estas estructuras marca el 98,4% de la población total de CGR. Sin embargo, si queremos trazar el 100% de las CGR, el trazador ha de aplicarse en el MNO (Salinas-Navarro y cols., 2009a).

Así, analizamos cuántas CGRm se trazaban cuando el FG se aplicaba en el MNO. De un total de 734 CGRm contadas, 727 se habían marcado con FG (figura 4.4). Esto supone que un $99\pm 1,8\%$ de las CGRm se trazan al aplicar FG en el MNO, por lo que las células que expresan melanopsina son CGR ya que sus axones salen de la retina y forman parte del nervio óptico.

Las CGR-FG⁺ marcadas desde ambos CS superiores suponen un 98,4% de la población total de CGR (Salinas-Navarro y cols., 2009a). Aunque las CGRm proyectan principalmente al NSQ (Gooley y cols., 2001; Hannibal y cols., 2002), quisimos también estudiar qué proporción de CGRm proyecta a los CS. De un total de 671 CGRm, 611 eran CGR-FG⁺ cuando éste se aplicaba en los CS (figura 4.5D, E y F). Es decir, un $90,6\pm 7\%$ de la población de CGRm proyecta a los CS.

El Brn3a es un factor de transcripción que, en retina de rata, se expresa en un 91,6% de las CGR trazadas desde el CS. Cuando en las retinas de rata SD controles observamos qué población de CGRm expresaban también Brn3a, es decir, qué porcentaje de CGRm eran Brn3a⁺, de un total de 1.439 CGRm contadas, solamente 3 eran Brn3a⁺. Esto supone que solamente el $0,20\pm 0,36\%$ de las CGRm expresan Brn3a (figura 4.6). En la figura 4.7 podemos observar una imagen a gran aumento de una retina de rata SD control trazada con FG desde los CS y en la que se ha realizado la inmunodetección doble de Brn3a y melanopsina. Se observa que la mayoría de las CGRm se han trazado con FG pero no expresan Brn3a.

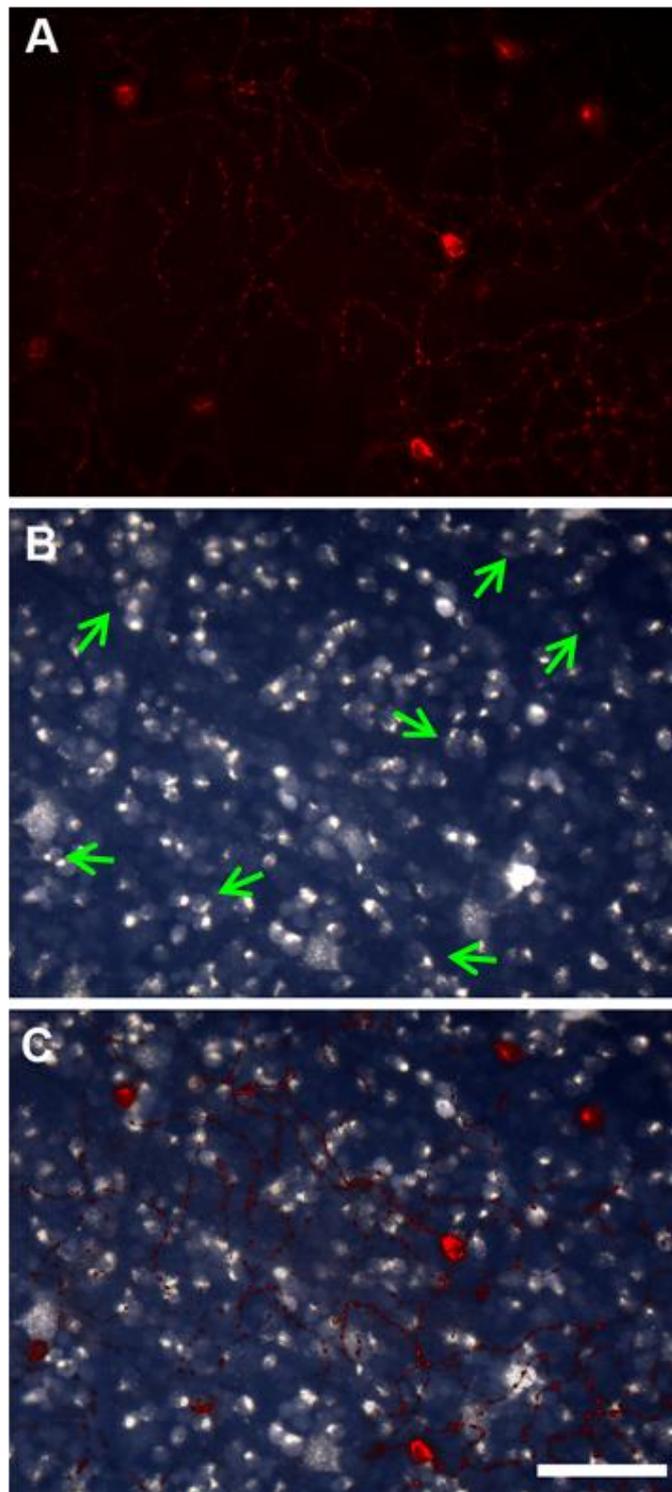


Figura 4.4. Los axones de las CGRm son parte de la proyección retinofugal.

Microfotografías (20x) tomadas de la misma zona de una retina control trazada desde el MNO en la que se observan las CGRm (A) la señal del FG (B) y ambas señales (C) Las flechas verdes señalan que todas las CGRm se han trazado. Barra= 100 μ m.

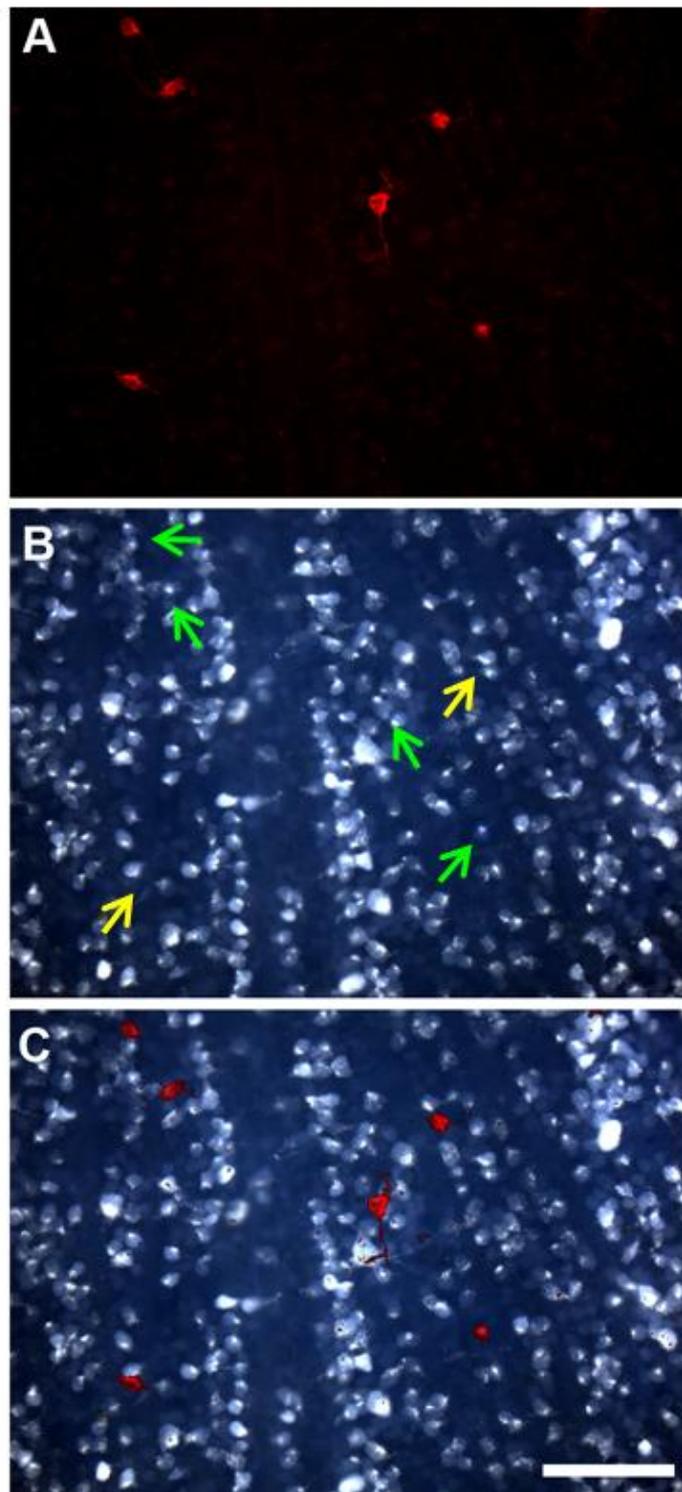


Figura 4.5. La mayoría de las CGRm proyectan a los colículos superiores.

Microfotografías (20x) tomadas de la misma zona de una retina control trazada desde el CS en la que se observan las CGRm (A) la señal del FG (B) y ambas señales (C) Las flechas verdes y amarillas señalan las CGRm que se han trazado y las que no. Barra= 100 μ m.

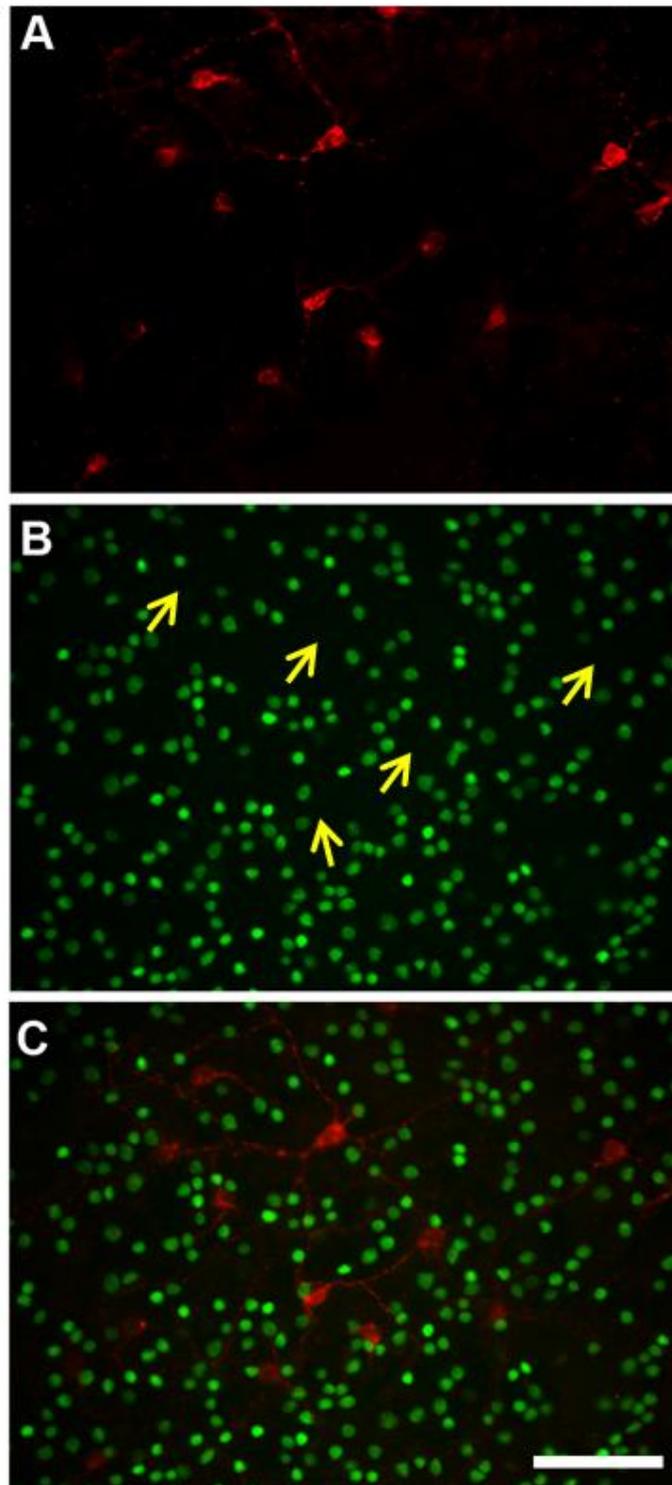


Figura 4.6. La mayoría de las CGRm no expresan Brn3a.

Microfotografías (20x) tomadas de la misma zona de una retina control inmunodetectada con melanopsina (A) y Brn3a (B), y ambas señales (C) Las flechas verdes señalan las CGRm que no expresan Brn3a. Barra= 100 μ m.

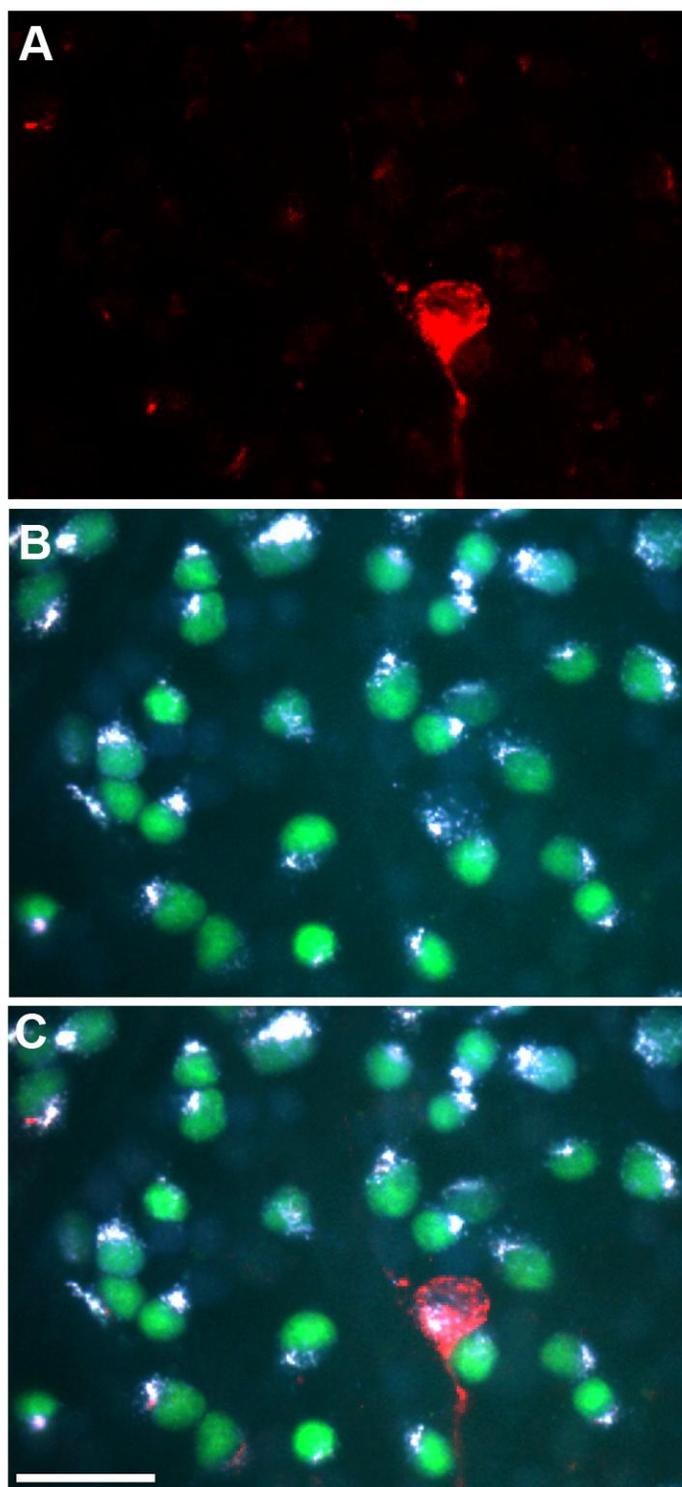


Figura 4.7. CGR, marcadas con FG y Brn3a, y CGRm.

Microfotografías (40x) tomadas de la misma zona de una retina control en las que se observa una CGRm (A) y las CGR doblemente marcadas, trazada con FG aplicado en los CS e inmunodetectadas con Brn3a (B), y las tres señales acopladas (C). Barra= 50 μ m.

4.1.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS

El siguiente objetivo fue cuantificar automáticamente la población de CGRm en los montajes globales de retina. Este análisis se llevó a cabo en el grupo experimental en el que se realizó la inmunodetección doble de melanopsina y Brn3a (n=10 retinas), ya que era el único grupo experimental que no había sufrido ninguna manipulación quirúrgica previa y, por tanto, evitamos posibles alteraciones en la expresión de melanopsina tras cirugía. Los resultados de la cuantificación automática del número total de CGR-Brn3a⁺ y CGRm, se muestran en la tabla 4.1.

Retina	Retinas derechas			Retinas izquierdas		
	CGR-Brn3a ⁺	CGRm	Área	CGR-Brn3a ⁺	CGRm	Área
1	80.914	1.966	47,15	82.564	1.745	45,80
2	75.627	2.496	49,35	78.689	2.265	48,85
3	79.558	1.704	50,99	78.640	1.989	48,80
4	77.864	2.360	48,23	75.900	2.412	48,71
5	81.518	1.776	48,29	72.956	1.752	48,59
Media	79.096,20	2.060,40	48,80	77.749,80	2.032,60	48,15
DEM	2.394,60	352,25	1,45	3.579,57	300,54	1,31
Media total	78.423	2.046,50	48,48			
DEM	2.957,51	309,04	1,35			

Tabla 4.1. Número total de CGR-Brn3a⁺ y CGRm.

Número total de CGR que expresan Brn3a y que expresan melanopsina cuantificadas en 5 retinas derechas y 5 retinas izquierdas de ratas SD. Abreviaturas: DEM= desviación estándar de la media.

Si comparamos retinas derechos e izquierdos, comprobamos que no existe diferencia estadísticamente significativa en el número de CGR-Brn3a⁺ o CGRm (p=0,505, p=0,897 respectivamente). Así, el número total medio (retinas derechos e izquierdos) de CGR-Brn3a⁺ fue de 78.423±2.957 el número de CGRm fue de 2.046±48. Por lo tanto, el porcentaje de CGRm con respecto a la población de CGR-Brn3a⁺ es de 2,62%.

4.1.4. DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS

El siguiente objetivo fue estudiar la distribución topográfica de las CGRm y su relación con el resto de la población de CGR, es decir las CGR-Brn3a⁺, ya que este factor de transcripción se expresa en la todas las CGR excepto en la mitad de la población que proyecta ipsilateralmente (Nadal-Nicolás y cols., 2012) y en las CGRm (ver apartado 4.1.2 de esta tesis). En este estudio, por tanto, se utilizaron las mismas retinas que en el apartado anterior, en las que se habían identificado a la vez las CGRm y las CGR-Brn3a⁺.

Los datos cuantitativos obtenidos nos proporcionaban, además del número total de CGRm, las coordenadas espaciales de cada una de ellas con respecto al NO. Esto permite realizar una representación de su distribución en toda la retina, teniendo en cuenta el número de vecinos (otras CGRm) que tiene cada una de ellas en un radio fijo de 0,22mm. La gama de colores utilizada para representar el número de vecinos comprende 7 colores, y a cada uno de los colores representa un incremento de 3 vecinos. Los colores varían desde el morado, al que corresponden las CGRm con 0-2 vecinos hasta el el granate, al que corresponde un número de vecinos mayor de 21.

En las mismas retinas se realizaron mapas de isodensidad de las CGR-Brn3a⁺ usando métodos descritos anteriormente (Nadal-Nicolás y cols., 2009). Los resultados se muestran en las figuras 4.8- 4.10. En los mapas de vecinos de las CGRm podemos observar que el mayor número de CGRm se encuentra en la zona superior de la retina, y más concretamente en el cuadrante supero-temporal, tanto en retinas derechas como izquierdas. Y también que el número de vecinos es mayor en el cuadrante superotemporal. Además, se observa a distribución de las CGRm es complementaria a la población de CGR-Brn3a⁺ ya que, justamente donde la población de CGR-Brn3a⁺ comienza a ser menor (hacia la periferia) el número de CGRm es cada vez mayor.

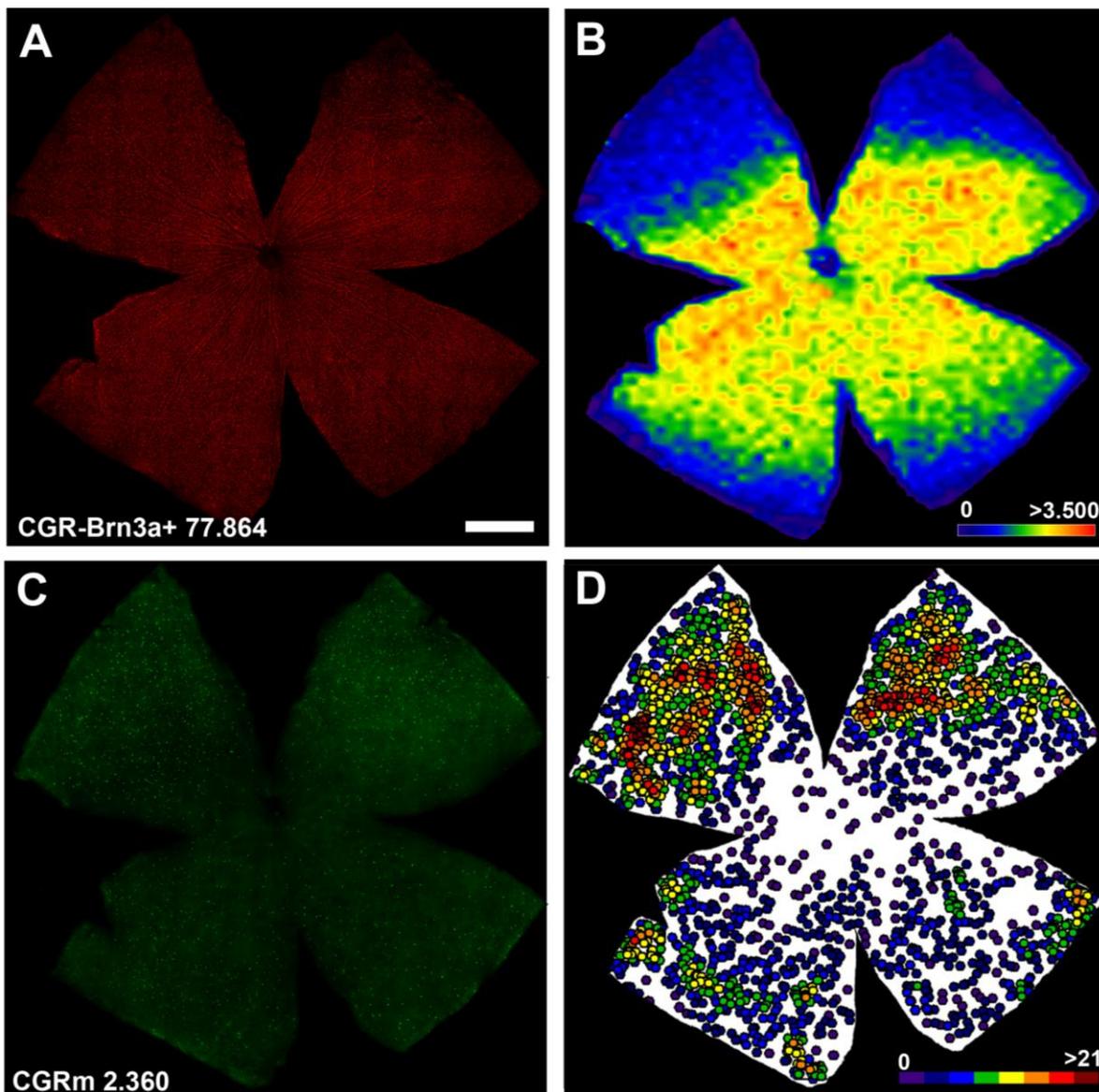


Figura 4.8. Distribución de CGR-Brn3a⁺ y de CGRm en retinas derechas.

Fotomontaje de una retina derecha de una rata SD control se observan las CGR-Brn3a⁺ (A) y su correspondiente mapa de isodensidad (B); y las CGRm (C) y su correspondiente mapa de vecinos (D). En la esquina inferior izquierda (A y C) se muestra el número de CGR-Brn3a⁺ y CGRm contadas en esta retina. Debajo de cada mapa se muestra la escala de color (CGR-Brn3a⁺/mm² en B, número de vecinos en D). Barra= 1mm.

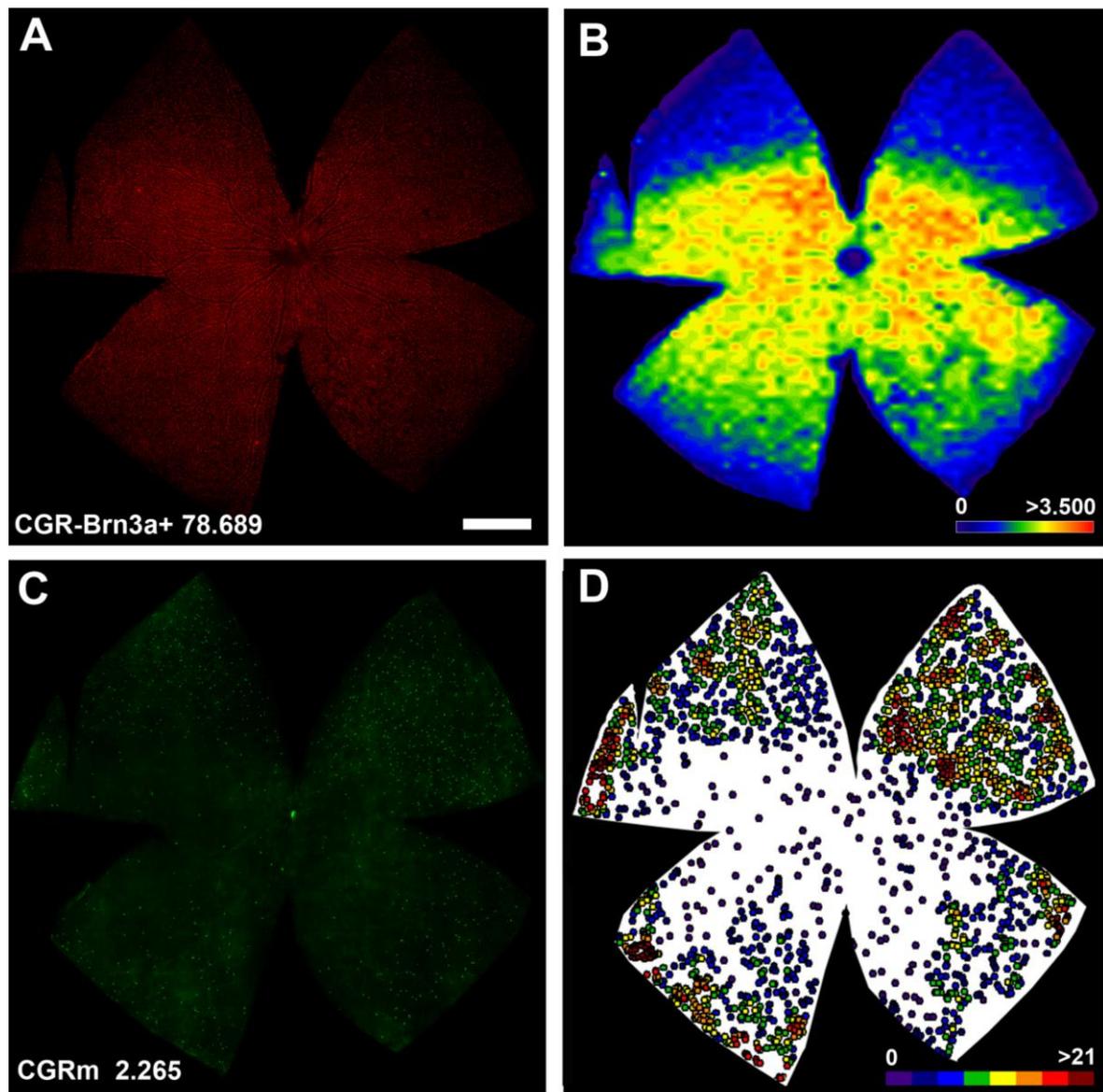


Figura 4.9. Distribución de CGR-Brn3a⁺ y de CGRm en retinas izquierdas.

Fotomontaje de una retina izquierda de una rata SD control se observan las CGR-Brn3a⁺ (A) y su correspondiente mapa de isodensidad (B); y las CGRm (C) y su correspondiente mapa de vecinos (D). En la esquina inferior izquierda (A y C) se muestra el número de CGR-Brn3a⁺ y CGRm contadas en esta retina. Debajo de cada mapa se muestra la escala de color (CGR-Brn3a⁺/mm² en B, número de vecinos en D). Barra= 1mm.

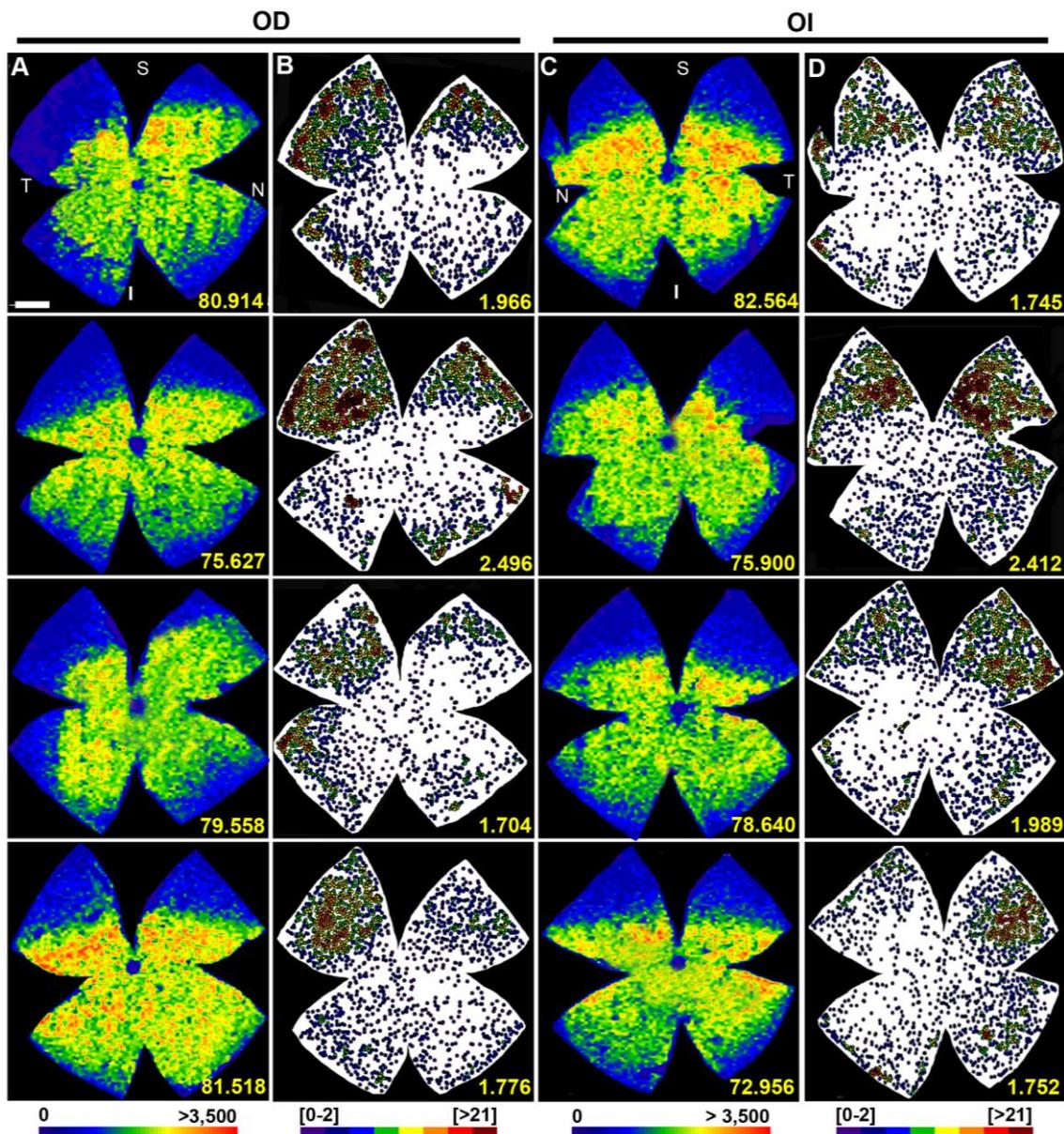


Figura 4.10. Distribución de las CGR-Brn3a⁺ y CGRm en todas las retinas analizadas.

En esta figura se muestran los mapas de isodensidad de las CGR-Brn3a⁺ (columnas **A**, **C**) y los mapas de vecinos de las CGRm (columnas **B** y **D**) en las mismas retinas derechas (columnas **A** y **B**) e izquierdas (columnas **C** y **D**). Podemos observar que en todas las retinas, la distribución entre ambas poblaciones es complementaria, observándose mayores densidades de CGR-Brn3a⁺ en la zona más central de la retina y mayores densidades de CGRm en las zonas media y periférica de la retina, sobre todo en el cuadrante superotemporal. En la esquina inferior derecha de cada imagen se muestra el número de CGR-Brn3a⁺ o CGRm contadas cada retina. Abreviaturas: OD= ojo derecho, OI= ojo izquierdo, S= superior, T= temporal, I= inferior, N= nasal. Debajo de cada columna se muestra la escala de color (CGR-Brn3a⁺/mm² en **A** y **C**, número de vecinos en **B** y **D**). Barra= 1mm.

4.1.5. NÚMERO DE CÉLULAS GANGLIONARES MELANOPSÍNICAS EN FUNCIÓN DE LA DISTANCIA AL NERVIÓ ÓPTICO

Los datos obtenidos tras el análisis del número de vecinos pueden representarse como hemos visto en el apartado anterior o se pueden trasladar a un gráfico para conocer el número de CGRm a distancias crecientes desde el nervio óptico en la retina completa o en cada uno de los cuadrantes de la retina (superotemporal, superonasal, inferotemporal, inferonasal). El análisis del número total de estas neuronas que hay a una distancia determinada del NO (figuras 4.11B, 4.12B) muestra que, a mayor distancia del NO, el número total de CGRm aumenta, es decir, la mayoría de las CGRm se encuentran en la periferia, encontrándose en mayor número a 4mm del NO. Si estos datos se representan por cuadrantes, se observa que hay más CGRm en la hemirretina superior, siendo el cuadrante supero-temporal el más poblado de acuerdo con la representación del mapa de vecinos individuales, tanto en retinas derechas, (figura 4.11C) como en retinas izquierdas (figura 4.12C). Además, en el cuadrante inferonasal, si bien hay una zona de más densidad, (mapa A en figuras 4.11 y 4.12) el número de CGRm es más homogéneo desde los 2,2 hasta los 4,6 mm desde el nervio óptico.

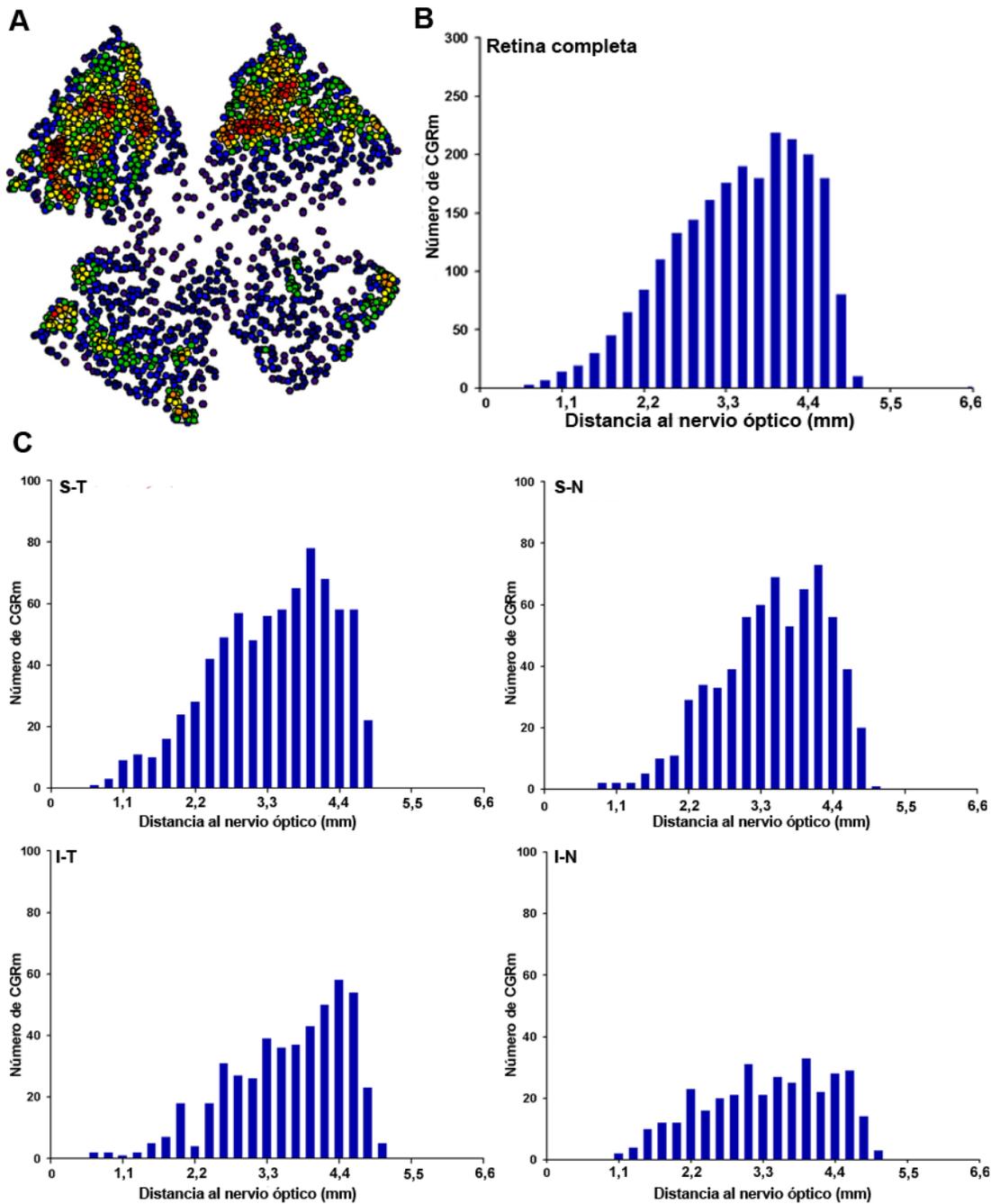


Figura 4.11. Análisis cuantitativo de la distribución de las CGRm en retinas derechas.

En esta figura se muestra un mapa de vecinos de CGRm de una retina derecha representativa (**A**, el mismo mapa que en la figura 4.8)) donde se observa que existe un mayor número de éstas células en la periferia y, más concretamente, en la región supero-temporal. Estas observaciones viene corroboradas por los datos obtenidos en las gráficas mostradas en **B** y **C**, donde se cuantifican las CGRm en función de su distancia al NO, tanto en la retina completa (**B**) como por cuadrantes (**C**). Abreviaturas: S-T= cuadrante supero-temporal, S-N= cuadrante supero-nasal, I-N= cuadrante infero-nasal, I-T= cuadrante infero-temporal.

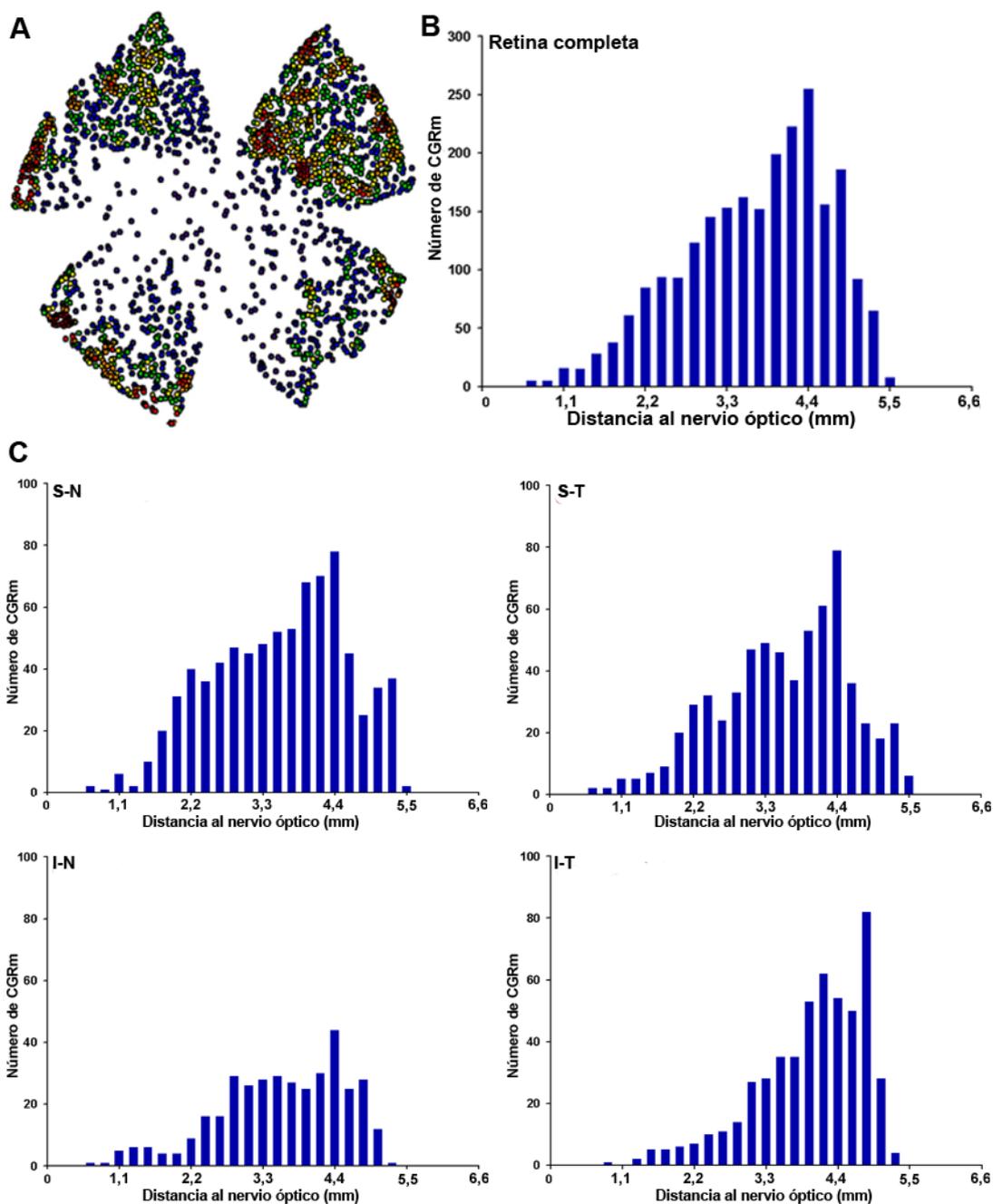


Figura 4.12. Análisis cuantitativo de la distribución de las CGRm en retinas izquierdas.

En esta figura se muestra un mapa de vecinos de CGRm de una retina izquierda representativa (**A**, el mismo mapa que en la figura 4.9)) donde se observa que existe un mayor número de éstas células en la periferia y, más concretamente, en la región supero-temporal. Estas observaciones viene corroboradas por los datos obtenidos en las gráficas mostradas en **B** y **C**, donde se cuantifican las CGRm en función de su distancia al NO, tanto en la retina completa (**B**) como por cuadrantes (**C**). Abreviaturas: S-T= cuadrante supero-temporal, S-N= cuadrante supero-nasal, I-N= cuadrante infero-nasal, I-T= cuadrante infero-temporal.

4.2. DEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DESPUÉS DE LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF EN EL RATÓN ADULTO

4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN BRN3A COMO MARCADOR DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DE RATÓN ADULTO

El siguiente objetivo de nuestro estudio fue caracterizar el factor de transcripción Brn3a como marcador de CGR del ratón adulto.

4.2.1.1. Estudio cualitativo del patrón de expresión de Brn3a en secciones transversales de retinas control y axotomizadas.

En la retina de ratón, se había descrito que la expresión de Brn3a es específica de las CGR (Quina y cols., 2005), pero no se había documentado si ésta expresión se veía afectada por la lesión axonal, es decir, si tras la lesión el patrón de expresión de Brn3a cambiaba. Para responder a esta pregunta, analizamos la expresión del Brn3a en secciones sagitales de retinas control y experimentales en las que las CGR habían sido marcadas previamente con OHSt desde los CS.

En la figura 4.13 se muestra la inmunodetección de Brn3a en retinas control de ratón pigmentado C57/BL6 que habían sido trazadas previamente con OHSt aplicado a ambos CS. Se observa que el Brn3a sólo se expresa en CGR y que la mayoría de ellas están trazadas. Sin embargo no todas las CGR trazadas expresan Brn3a (figura 4.13C). En el siguiente apartado se describe cuantitativamente cuántas CGR expresan Brn3a usando como control de la población total el trazado desde el NO y cuántas de las CGR-Brn3a⁺ proyectan hasta los CS, usando retinas trazadas de estas regiones.

Una vez estudiado el patrón de expresión de Brn3a en retinas de ratón controles, quisimos determinar si éste se mantenía después de lesionar el NO, ya que había la posibilidad de que tras la SNO, nuevas células comenzaran a expresar este factor de transcripción o que, debido al daño, las CGR-Brn3a⁺ dejaran de expresar este factor de transcripción, sin que ello significara que hubieran muerto. Así, al igual que se hizo en secciones de retinas control, se estudió el patrón de expresión de Brn3a en secciones de retina axotomizadas a tiempos crecientes tras la SNO (2, 7 y 14 días) en retinas experimentales en las que las CGR habían sido trazadas con OHSt⁺ desde el CS previamente a la SNO. En la figura 4.14 se puede observar que, en las retinas experimentales la expresión de Brn3a se mantuvo localizada en la capa de CGR a los 2, 7 y 14 días tras la SNO. Se observó que tras la SNO disminuía el número de CGR-OHSt⁺ y a la vez disminuían también el número de CGR-Brn3a⁺. Además, se observó también que tras la SNO aparecían en las secciones células de microglía fagocíticas que se encontraban marcadas con OHSt pero que no expresaban Brn3a (figura 4.14G, flecha).

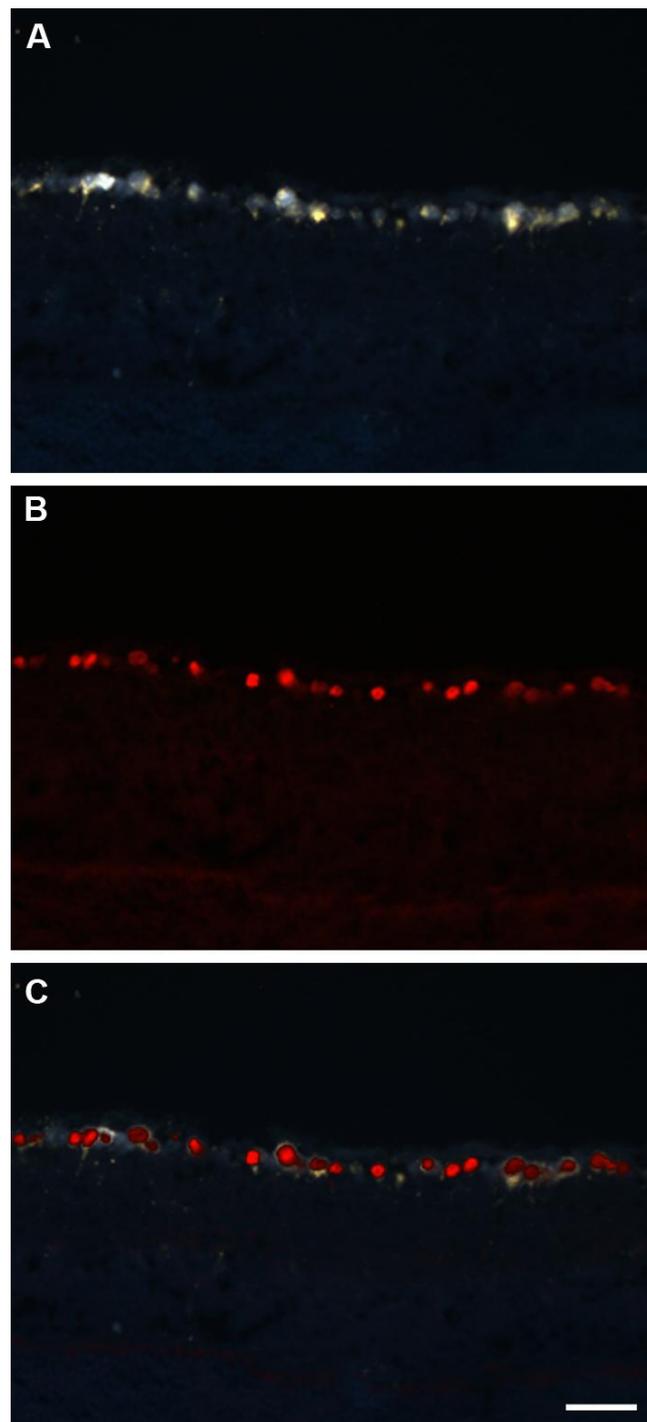


Figura 4.13. Expresión de Brn3a en secciones sagitales de retinas de ratón C57BL/6 control.

Microfotografías de una misma sección de una retina control representativa en la que se observan se las CGR trazadas con OHSt desde el CS (A) e inmunodetectadas con Brn3a (B). En C se muestran ambas señales superpuestas. En las tres imágenes podemos observar que aparecen CGR-OHSt⁺ o Brn3a⁺ únicamente en la capa de CGR y que la mayoría de las CGR trazadas con OHSt expresan Brn3a. Barra= 50 μ m.

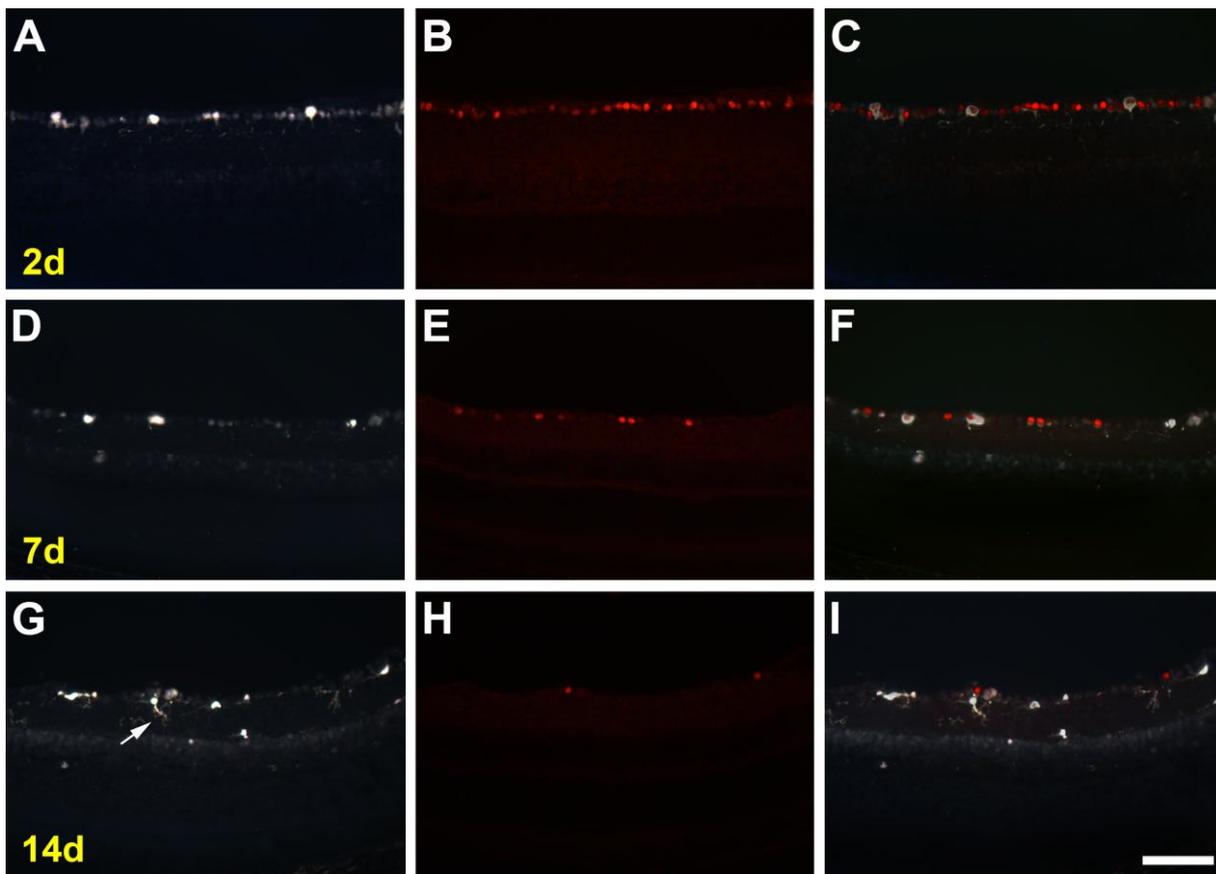


Figura 4.14. Expresión de Brn3a en secciones transversales de retinas de ratón C57BL/6 tras la sección del nervio óptico.

Microfotografías de tres secciones sagitales de tres retinas de ratón representativas analizadas a los 2 (A-C), 7 (D-F) y 14 días (G-I) después de la SNO. **A, D y G:** señal del OHSt, donde se observan CGR trazadas y células de la microglía transcelularmente trazadas (flecha en **G**). **B, E, H:** CGR-Brn3a⁺. En **C, F, I:** se muestran las señales de OHSt y Brn3a superpuestas. Podemos ver que tras la SNO, la expresión de Brn3a es específica de CGR. Barra= 50 μ m.

4.2.1.2. Estudio cuantitativo del patrón de expresión de Brn3a en secciones transversales de retinas control

Una vez caracterizado el patrón de expresión de Brn3a en la retina de ratón, estudiamos 1) si todas las células que expresan Brn3a eran CGR, en retinas trazadas desde el MNO y 2) la proporción de CGR que expresan Brn3a y proyectan a los CS, inmunodetectando el Brn3a en retinas trazadas desde estas regiones.

En primer lugar realizamos un grupo experimental (n=5) de ratones C57BL/6 en el que las CGR fueron marcadas con OHSt desde el MNO y las retinas fueron posteriormente inmunodetectadas con el anticuerpo contra el Brn3a. Una vez procesadas, se cuantificaron en las secciones transversales de las retinas las CGR-Brn3a⁺ que también se marcaban con OHSt desde el MNO (tabla 4.2). Contamos en estas retinas un total de 2.706 células Brn3a⁺ y, de ellas, 2.693 células eran OHSt⁺, por lo que un 99,5% de las células Brn3a⁺ eran OHSt⁺. Con estos resultados concluimos que todas las células Brn3a⁺ son CGR.

A continuación realizamos un segundo grupo experimental (n=5) de ratones C57BL/6 en los que se aplicó OHSt en ambos CS y se estimó la proporción de CGR-Brn3a⁺ que proyectan a los CS. En estos animales se cuantificaron un total de 2.651 CGR-Brn3a⁺ y, de ellas, 2.446 células eran OHSt⁺, por lo que un 92,2% de las CGR que expresan Brn3a proyectan a los CS mientras que el 7,8% restante proyecta a otras zonas del cerebro.

	Número total de CGR-Brn3a ⁺ contadas	Número de CGR-Brn3a ⁺ marcadas con OHSt	Porcentaje de CGR-Brn3a ⁺ marcadas con OHSt
Marcaje de las CGR con OHSt desde el MNO (n=5)	2.706	2.693	99,5%
Marcaje de las CGR con OHSt desde los CS (n=5)	2.651	2.446	92,3%

Tabla 4.2. Número de CGR marcadas con anticuerpo contra Brn3a y con OHSt aplicado en el muñón del nervio óptico (fila superior) o en los colículos superiores (fila inferior).

Abreviaturas: MNO= Muñón del nervio óptico, CS= colículos superiores.

4.2.1.3. Detección de Brn3a en retinas control montadas a plano. Estudio cualitativo y cuantitativo

Una vez caracterizada la población de CGR-Brn3a⁺ en las secciones transversales de retina de ratón C57BL/6, se procedió al estudio de esta población en montajes globales de retina de ratones de pigmentados C57/BL6 y de ratones albinos Swiss, para cuantificar, en ambas estirpes, el número total de CGR que expresan Brn3a. Todas estas retinas habían sido previamente trazadas con OHSt aplicado en los CS, para identificar la gran mayoría de CGR (Salinas-Navarro y cols., 2009b) y así saber, al contar ambas poblaciones de CGR, OHSt y Brn3a positivas, la proporción de CGR que expresan Brn3a.

Se realizaron tres grupos de ratones C57BL/6 control. El primer grupo fue procesado 7 días después del marcaje, que es el tiempo estimado que el OHSt tarda en llegar a las CGR (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 2002). El segundo grupo se procesó 10 días después del marcaje con OHSt para comparar los resultados con los resultados de la activación de células de microglía fagocítica en las retinas del grupo experimental procesado 3 días después de la SNO y 10 días tras el marcaje con OHSt (estos resultados nos servirán a posteriori para compararlos con este grupo, ver apartado 4.2.3.2). El tercer grupo se procesó 30 días después del marcaje con OHSt, para comparar los resultados con los obtenidos en las retinas derechas contralaterales a la lesión del grupo experimental procesado 21 días tras la SNO y 30 días tras el marcaje con OHSt (ver apartado 4.2.3.2).

Por último, realizamos un grupo control de ratones albinos Swiss, procesados 10 días después del marcaje, para compararlos con los resultados con los resultados de la activación de células de microglía fagocítica en la retinas del grupo experimental procesado 3 días después de la SNO y 10 días tras el marcaje con OHSt (ver apartado 4.2.3.2).

Al igual que en las secciones transversales de la retina, se pudo observar en estos grupos controles que la mayoría de las CGR se encuentran doblemente marcadas con OHSt desde los CS e y con el anticuerpo contra el Brn3a, excepto una minoría de las CGR-OHSt⁺, que no expresan Brn3a (figura 4.15).

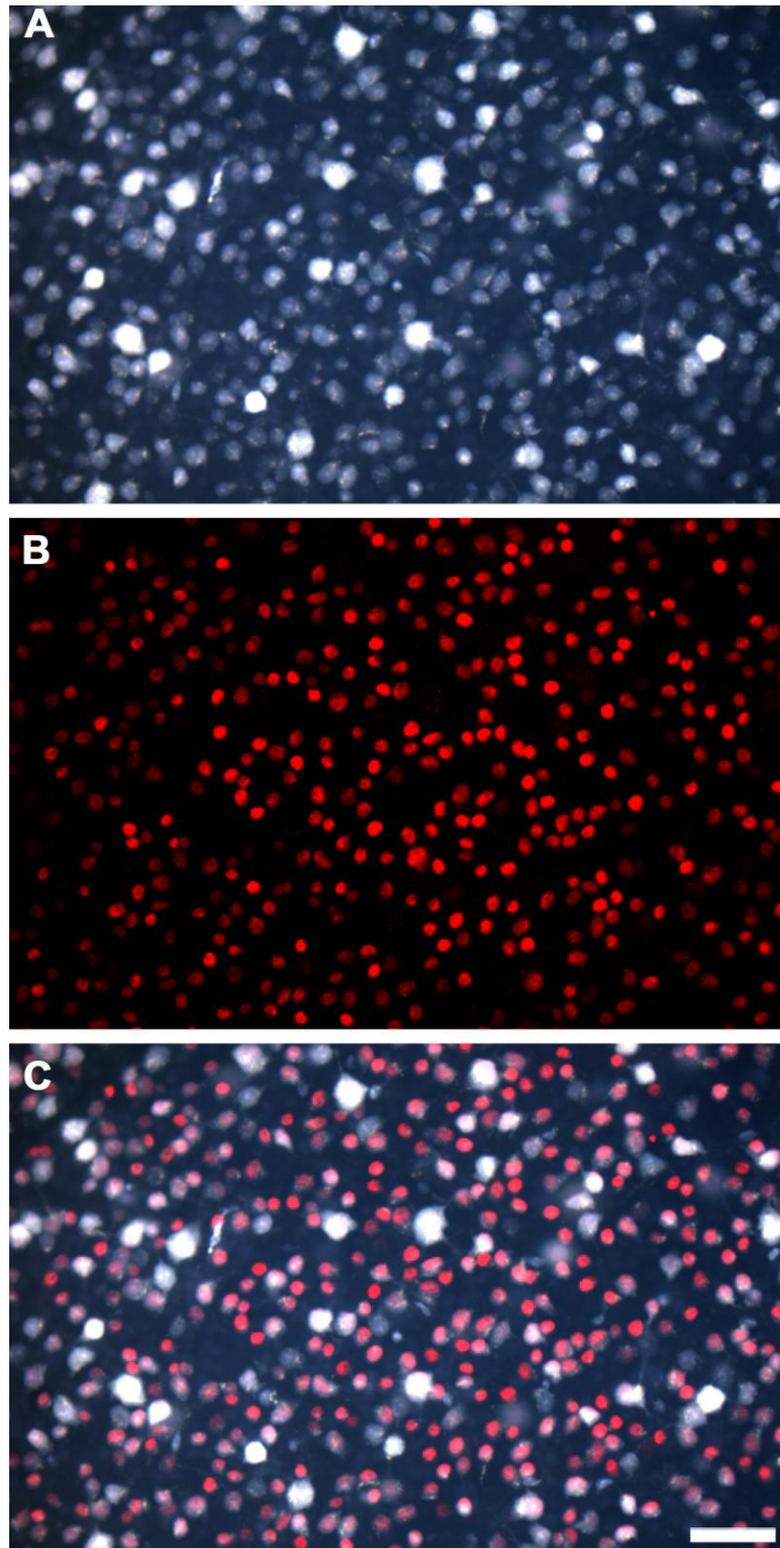


Figura 4.15. Expresión de Brn3a en montajes globales de retina de ratones C57BL/6 control.

Microfotografías (20x) del mismo área de un montaje global de retina representativa de ratón C57BL/6 trazada con OHSt desde el CS 7 días antes del procesado (A) e inmunodetectada con Brn3a (B). En C se muestran ambas señales superpuestas. Se observa que la mayoría de las CGR trazadas expresan Brn3a. Barra= 50 μ m.

En las figuras 4.16 y 4.17 se muestran fotomontajes representativos de una retina control de un ratón C57BL/6 y de otro ratón Swiss, respectivamente, marcadas con OHSt e inmunodetectadas con Brn3a. Podemos observar que en ambas retinas los marcadores se observaban en toda la superficie de la retina.

A continuación, se cuantificó la población de CGR-OHSt⁺, utilizando el programa informático previamente desarrollado en nuestro laboratorio (Salinas-Navarro y cols., 2009b), y la población de CGR-Brn3a⁺, mediante un nuevo programa desarrollado para este estudio. Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes (tabla 4.3). Para las retinas de los ratones C57BL/6 procesados 7 días tras el marcaje con OHSt (n=9), el promedio de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ fue 40.437±3.196 y 34.627±1.821, respectivamente. Diez días después del marcaje con OHSt (n=6), el promedio de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ fue 41.011±2.174 y 33.769±1.210, respectivamente. En el último grupo, procesado 30 días después del marcaje (n=8), el promedio de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ fue 39.954±1.589 y 32.661±2.614, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de células marcadas con OHSt o con Brn3a entre los tres grupos.

En los ratones Swiss (n=11), el promedio de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ fue de 51.025±1.425 y 47.211±1.346, respectivamente. En concordancia con el trabajo de Salinas-Navarro y cols. (2009) observamos, con ambos métodos de identificación de CGR, que la población de CGR es mayor en la cepa albina que en la cepa pigmentada.

Así, el porcentaje de CGR-Brn3a⁺ con respecto a la población trazada con OHSt desde los colículos superiores es 85,4% en ratones pigmentados C57BL/6 y 92,5% en ratones albinos Swiss.

Finalmente, a partir de los fotomontajes, se realizaron mapas de isodensidad, tanto de los fotomontajes con OHSt, según técnicas previamente descritas en nuestro laboratorio (Salinas-Navarro y cols., 2009b), como con Brn3a (nueva técnica desarrollada para este estudio), en retinas de ratón C57BL/6 y Swiss (figuras 4.16 y 4.17, respectivamente). Estos mapas de isodensidad muestran el patrón de distribución de las CGR en retina de ratón. En estas dos figuras se observa que el patrón de distribución de las CGR-Brn3a⁺ es similar al de las CGR-OHSt⁺. Podemos observar que la zona de mayor densidad celular se encuentra en la región nasotemporal de la hemirretina superior. Debido a que el Brn3a no se expresa en todas las CGR-OHSt⁺, la densidad de CGR que se observa cuando se utiliza este marcador en ratón es menor en toda la retina, pero las células tienen un patrón de distribución espacial similar al que se observa cuando se utiliza el OHSt como trazador.

Los resultados obtenidos en estos grupos experimentales corroboraban los obtenidos en las secciones transversales, ya que documentaban que, aunque el Brn3a no se expresa en todas las CGR de ratón adulto, sí marca un alto porcentaje de éstas y su patrón de distribución es muy similar al de las CGR-OHSt⁺, por lo que podemos concluir que el Brn3a es un buen marcador de CGR de ratón.

Retina	C57BL/6									Swiss		
	Controles (7 días)			Controles (10 días)			Controles (30 días)			Controles (10 días)		
	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área
1	38.757	32.710	14,0	40.453	35.628	13,9	32.029	29.496	14,2	51.912	47.487	15,5
2	43.064	33.704	14,3	37.627	34.023	12,9	37.856	31.337	14,1	52.101	45.504	16,4
3	42.677	35.911	14,5	39.645	32.894	14,1	42.305	36.214	14,5	50.412	46.868	16,1
4	35.567	33.089	12,9	42.151	33.061	14,3	39.484	34.683	13,9	50.064	47.880	15,8
5	36.655	33.533	12,6	43.201	33.520	13,5	39.873	29.940	14,0	49.574	46.001	14,9
6	39.446	33.272	14,0	42.990	33.491	13,7	40.948	35.872	12,8	48.640	46.991	15,6
7	42.199	34.855	13,9	---	---	---	41.749	31.434	15,2	51.736	47.522	16,7
8	40.149	36.647	14,2	---	---	---	38.391	32.310	14,6	49.559	46.127	16,0
9	45.416	37.918	13,6	---	---	---	---	---	---	52.401	45.988	15,4
10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	51.962	49.381	15,8
11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	52.914	49.576	16,2
Media	40.437	34.627	13,8	41.011	33.769	13,7	39.954	32.661	14,2	51.025	47.211	15,8
DEM	3.196	1.821	0,6	2.174	1.210	0,5	1.589	2.614	0,7	1.425	1.346	0,5
d (cel/mm²)	2.944	2.522	---	2.987	2.462	---	2.827	2.314	---	3.220	2.980	---
DEM	262	193	---	149	127	---	177	259	---	110	111	---

Tabla 4.3. Número de CGR de ratones C57BL/6 y Swiss control trazadas con OHSt desde el colículo superior o inmunodetectadas con Brn3a.

Todas las retinas fueron trazadas con OHSt desde los CS e inmunodetectadas con Brn3a. Para los ratones C57BL/6 se realizaron tres grupos, el primero fue procesado 7 días después de la aplicación del trazador OHSt; el segundo, 10 días después de la aplicación del trazador; y el tercero, 30 días después de la aplicación del trazador. No se encontraron diferencias estadísticamente significativa entre el número de CGR marcadas con OHSt entre los tres grupos. Los ratones Swiss fueron procesados 10 días después del marcaje con OHSt. Se midió el área de cada retina para obtener así la densidad media (d) de CGR en la retina de ratón. Abreviaturas: d=densidad. DEM= desviación estándar de la media.

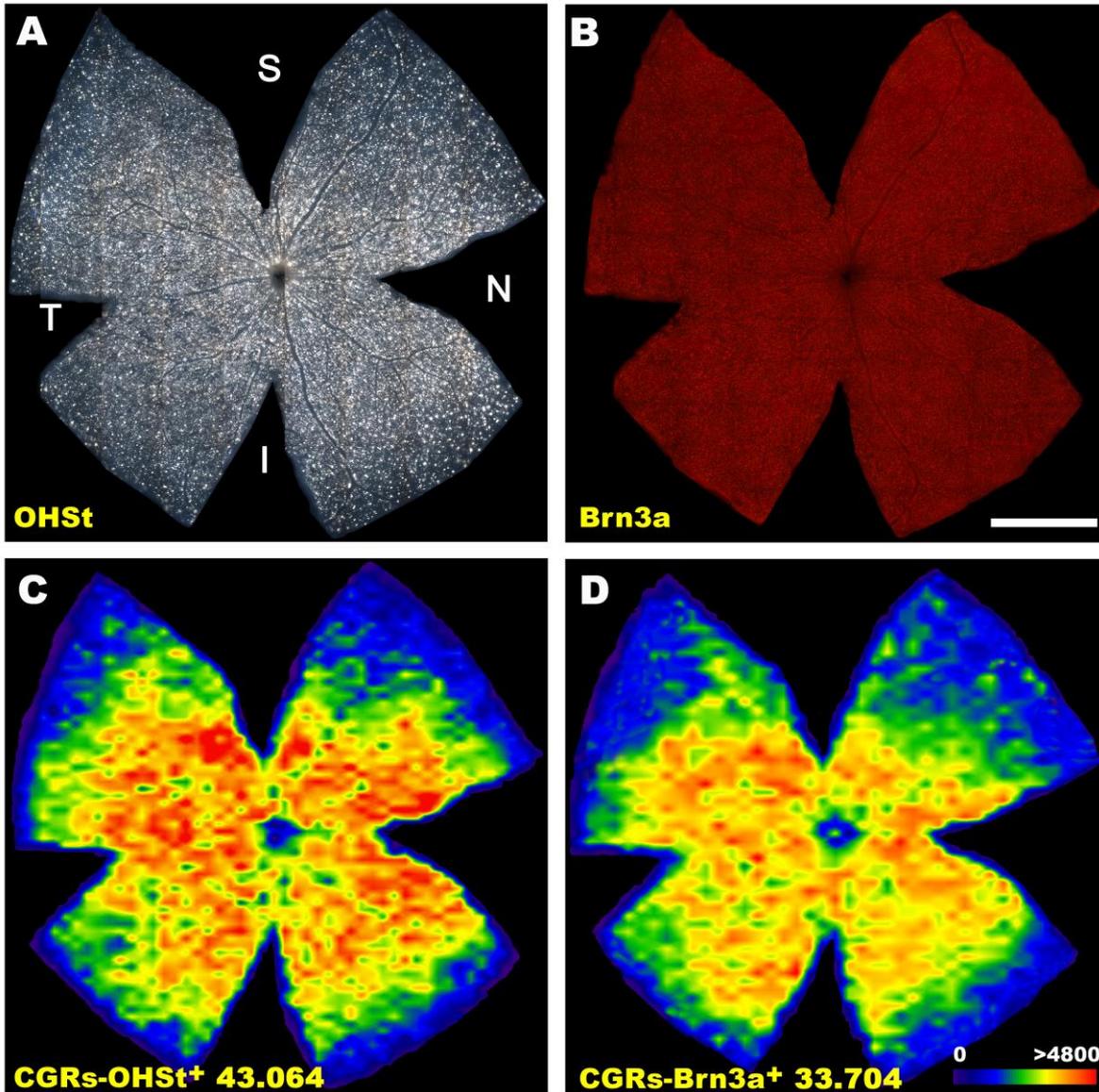


Figura 4.16. CGR de ratones C57BL/6 control marcadas con OHSt y con Brn3a y sus mapas de isodensidad.

En la fila superior se muestran las reconstrucciones fotográficas de una retina representativa control de ratones C57BL/6 marcada con OHSt (A) y Brn3a (B). En la fila inferior se observan los mapas de isodensidad de CGR correspondientes a la población de CGR-OHSt⁺ (C) y CGR-Brn3a⁺ (D). En la parte inferior derecha de D se muestra la escala de color de la densidad de CGR que va desde 0 CGR/mm² (morado) a 4800 o más CGR/mm² (rojo). Como el número de CGR-Brn3a⁺ es menor que el número de CGR trazadas, la densidad en D es menor que en C. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

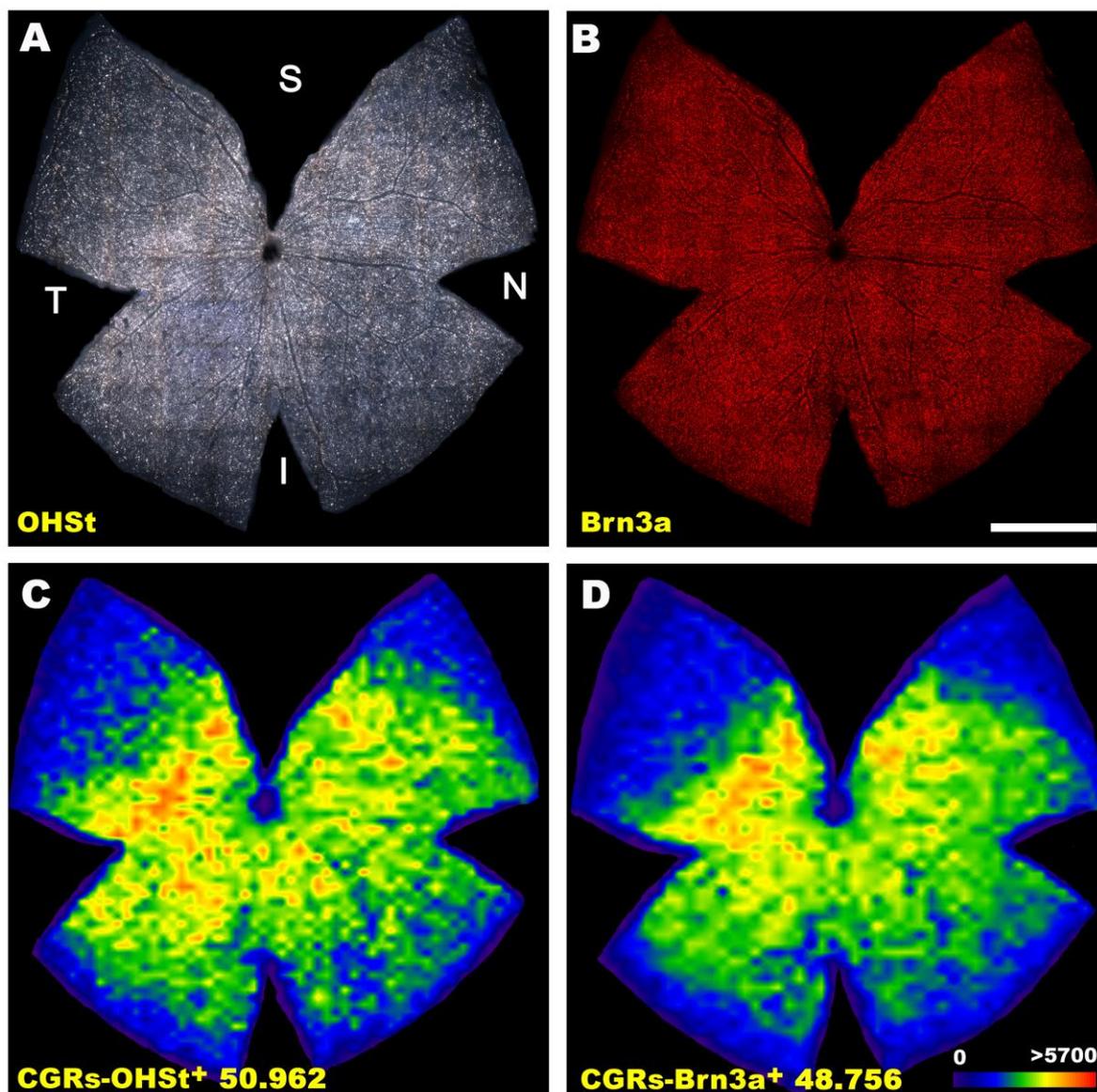


Figura 4.17. CGR de ratones Swiss control marcadas con OHSt y con Brn3a y sus mapas de isodensidad.

En la fila superior se muestran las reconstrucciones fotográficas de una retina representativa control de ratones Swiss marcada con OHSt (A) y Brn3a (B). En la fila inferior se observan los mapas de isodensidad de CGR correspondientes a la población de CGR-OHSt⁺ (C) y CGR-Brn3a⁺ (D). En la parte inferior derecha de D se muestra la escala de color de la densidad de CGR que va desde 0 CGR/mm² (morado) a 4800 o más CGR/mm² (rojo). Como el número de CGR-Brn3a⁺ es menor que el número de CGR trazadas, la densidad en D es menor que en C. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

4.2.2. CURSO TEMPORAL DE MUERTE DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

El siguiente objetivo de nuestro estudio fue caracterizar el modelo de SNO en ratón. Este modelo de degeneración de CGR se ha utilizado mucho para el estudio de la degeneración neuronal en la rata, animal en el que ha sido ampliamente caracterizado (Villegas-Pérez y cols., 1993; Peinado-Ramón cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009). Sin embargo, no existen estudios previos que describan en profundidad el curso temporal de muerte de las CGR en el ratón después de la SNO.

4.2.2.1. Análisis cualitativo y cuantitativo del patrón de expresión temporal de Brn3a y OHSt en montajes globales de retina tras la sección del nervio óptico

Para caracterizar el curso temporal de la muerte de las CGR tras la SNO en el ratón C57BL/6, realizamos un estudio cualitativo y cuantitativo a distintos tiempos tras la SNO en montajes globales de retina. En todos los grupos experimentales las CGR se trazaron desde los CS y se inmunodetectaron por su expresión de Brn3a

Los tiempos después de la SNO utilizados en este estudio fueron escogidos atendiendo a los resultados de los estudios previos realizados en la rata. En ésta, la muerte de las CGR comienza a ser significativa 3 días tras la SNO y continúa disminuyendo hasta 14 días después de la SNO. Por ello, estudiamos en el ratón la población de CGR a los 2, 5, 7, 9, 14 y 21 días después de la SNO.

En la figuras 4.18 y 4.19 se muestran unas imágenes representativas de retinas de ratones C57BL/6 experimentales a todos los tiempos después de la SNO. Como podemos observar, conforme aumenta el tiempo tras la SNO, el número de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ comienza a disminuir. Además, se observa que a partir de 5 días después de la SNO aparecen células de microglía fagocítica marcada transcelularmente con OHSt.

Cuantificamos el número de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ en todas las retinas izquierdas a los distintos tiempos después de la SNO (tabla 4.4) y se compararon los resultados con las retinas control. Debido a la aparición de células de microglía fagocítica transcelularmente marcada con OHSt, las retinas izquierdas a partir de 5 días después de la SNO no se pudieron cuantificar automáticamente, por lo que se realizó una estimación del número total en función de la cuantificación manual de 12 microfotografías representativas de cada retina y su área total (ver apartado 3.7.2.3). Las retinas control y las izquierdas experimentales del grupo procesado a los 2 días después de la SNO, pudieron ser cuantificadas automáticamente.

Los resultados de estos grupos experimentales mostraron que, en todos los tiempos tras la SNO, los resultados fueron similares con ambos marcadores. Dos días después de la SNO, existía una disminución del número de CGR, aunque no se encontró diferencia estadísticamente significativa

con respecto a las retinas control. La pérdida de CGR fue significativa a los 5 días post-SNO, momento en el que la población media de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ fue 22.772 ± 4.316 y 15.867 ± 2.656 , respectivamente, lo que supone que aproximadamente la mitad de la población de CGR han muerto en los primeros 5 días tras la SNO. Conforme aumentaba el tiempo tras la SNO, el número de CGR disminuía significativamente hasta los 9 días después de la SNO, momento en el que solamente quedaba un promedio de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ de 6.779 ± 1.742 y 4.661 ± 1.615 , respectivamente, lo que supone aproximadamente un 15% de la población total de CGR. A partir de 9 días y hasta 21 días tras la SNO (el tiempo más largo de estudio), el número de CGR supervivientes se mantenía estable con ambos marcadores. En la figura 4.20 podemos observar el porcentaje de CGR supervivientes tras la SNO con ambos marcadores. Aunque el número de CGR-Brn3a⁺ sea en todos los tiempos de estudio algo menor que el número de CGR-OHSt⁺, el porcentaje de CGR que sobreviven en todos los tiempos tras la SNO es muy similar en ambos casos, por lo que concluimos que el Brn3a es un buen marcador para analizar el curso temporal de muerte tras la SNO en el ratón.

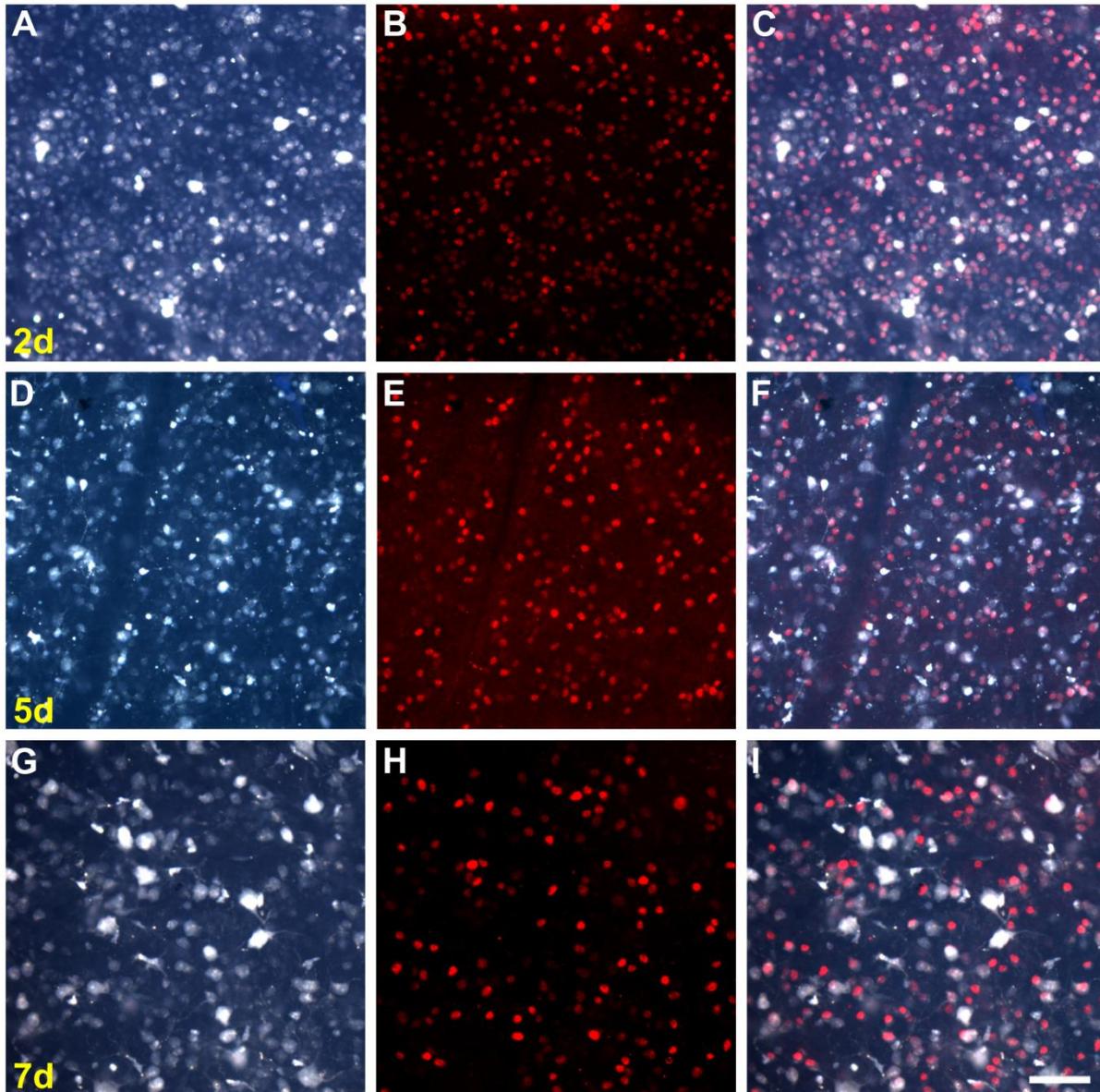


Figura 4.18. Microfotografías representativas de ratones C57BL/6 a los 2, 5 y 7 días después de la sección del nervio óptico.

Estas microfotografías muestran en las tres filas áreas representativas (20x) de las retinas izquierdas de ratones C57BL/6 a los 2 (A-C), 5 (D-F) y 7 días (G-I) después de la SNO. Las imágenes de la columna de la izquierda han sido tomadas con el filtro ultravioleta para ver las CGR trazada con OHSt; la columna central, con el filtro rojo para observar las CGR marcadas con Brn3a; y la columna de la derecha muestra la colocación de ambos marcadores. Las flechas en D y G señalan células de microglía fagocítica trazada transcelularmente con OHSt. Barra= 50 μ m.

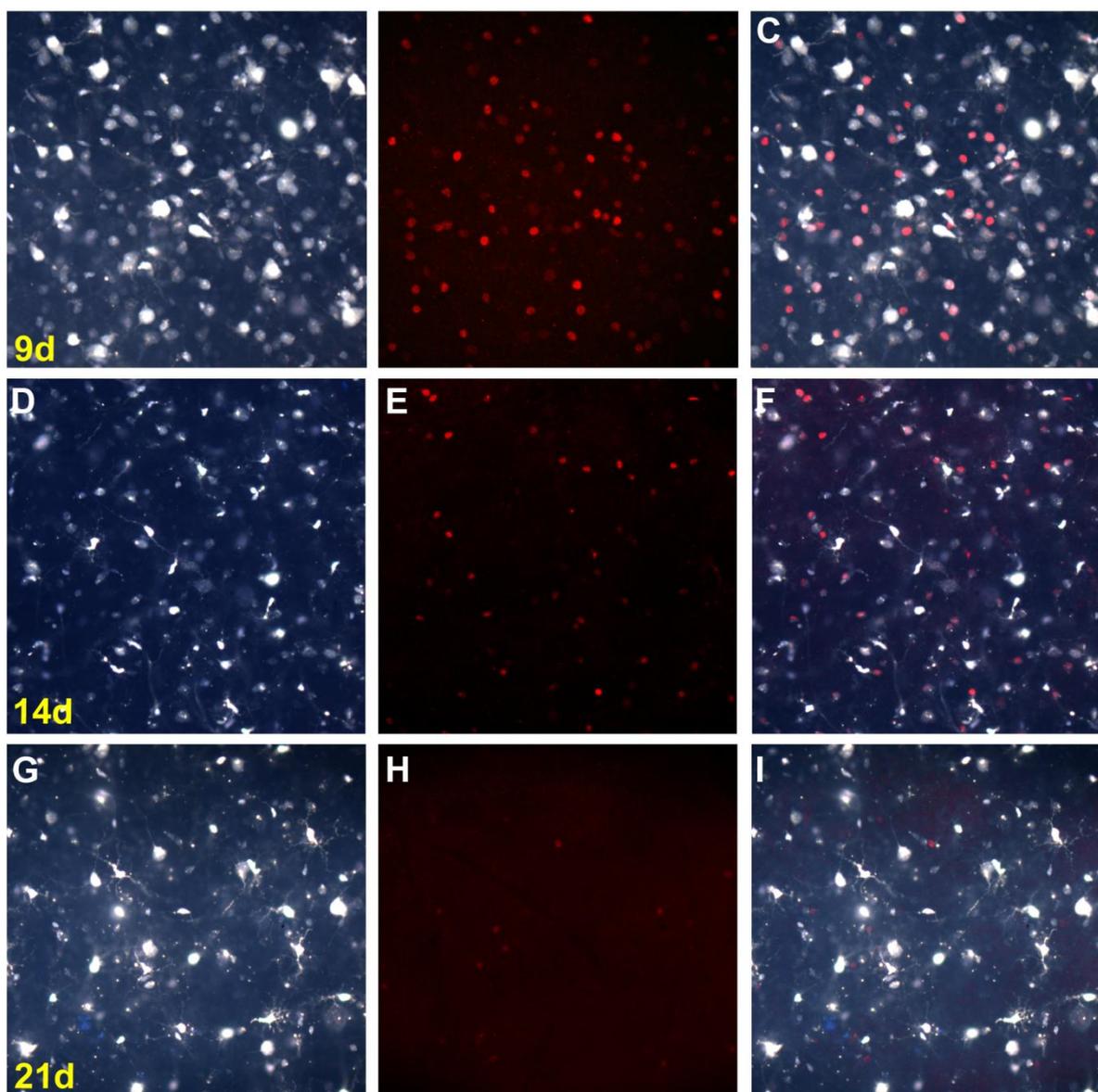


Figura 4.19. Microfotografías representativas de ratones C57BL/6 a los 9, 14 y 21 días después de la sección del nervio óptico.

Estas microfotografías muestran en las tres filas áreas representativas (20x) de las retinas izquierdas de ratones C57BL/6 a los 9 (A-C), 14 (D-F) y 21 días (G-I) después de la SNO. Las imágenes de la columna de la izquierda han sido tomadas con el filtro ultravioleta para ver las CGR trazadas con OHSt; la columna central, con el filtro rojo para observar las CGR marcadas con Brn3a; y la columna de la derecha muestra la colocalización de ambos marcadores. Las flechas en D y G señalan células de microglía fagocítica trazadas transcelularmente con OHSt. Barra= 50 μ m.

Retina	Días tras la sección del nervio óptico								
	2 días			5 días			7 días		
	OHSt	Brn3a	Área	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b}	Área	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b}	Área
1	36.495	36.730	13,4	17.627	19.174	14,1	11.476	10.099	14,9
2	39.053	34.416	12,6	20.664	15.924	14,6	15.849	13.584	14,8
3	35.828	36.598	14,1	21.365	15.876	13,7	12.614	10.476	15,1
4	40.333	34.991	14,7	30.954	14.135	14,6	12.208	11.677	15,0
5	35.773	26.091	13,7	25.618	15.150	15,3	15.490	11.486	15,0
6	32.410	33.381	14,2	20.880	19.110	14,7	14.623	9.957	14,3
7	42.458	35.494	13,0	22.297	11.700	12,1	11.252	12.780	14,3
8	---	---	---	---	---	---	16.401	9.933	12,5

Media	37.479	33.957	13,7	22.772	15.867	14,0	13.739	11.249	14,4
DEM	3.359	3.663	0,7	4.316	2.656	1,0	2.081	1.381	0,9

d (cel/mm²)	2.916	2.490	---	1.613	1.120	---	955	777	---
DEM	218	309	---	296	162	---	187	90	---

Retina	Días tras la sección del nervio óptico								
	9 días			14 días			21 días		
	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b}	Área	OHSt ^a	Brn3a ^a	Área	OHSt ^a	Brn3a ^a	Área
1	6.812	3.023	14,0	5.893	2.931	15,3	3.945	4.021	13,1
2	7.822	5.309	14,5	6.623	4.161	16,3	5.071	3.706	14,2
3	9.501	6.730	14,2	7.514	5.126	14,5	6.173	5.122	15,4
4	6.628	4.009	14,1	7.612	5.909	14,8	6.663	5.068	14,8
5	5.029	2.843	12,4	5.942	5.540	13,7	4.032	3.605	11,0
6	4.885	6.051	14,1	5.789	5.861	14,4	7.299	5.694	14,6
7	---	---	---	5.268	4.903	13,8	6.321	2.772	12,2
8	---	---	---	6.915	4.213	11,7	7.736	1.960	13,1

Media	6.779	4.661	13,7	6.444	4.831	14,2	5.905	3.994	13,6
DEM	1.742	1.615	0,8	856	1.018	1,4	1.422	1.264	1,6

d (cel/mm²)	489	346	---	454	341	---	436	292	---
DEM	102	103	---	78	77	---	97	77	---

Tabla 4.4. Número total de CGR de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.

Se muestra el número total de CGR cuantificadas en cada una de las retinas analizadas a los distintos tiempos, así como el área de cada retina. Debajo de cada tabla se ha calculado el número medio de CGR y la densidad media (d) de CGR en cada tiempo post lesión y sus correspondientes desviaciones estandar de la media (DEM). ^a = estadísticamente significativo comparado con las retinas control (Test de Mann Whitney p<0,05), ^b = estadísticamente significativo comparado con el tiempo post-SNO anterior (Test de Mann Whitney p<0,05).

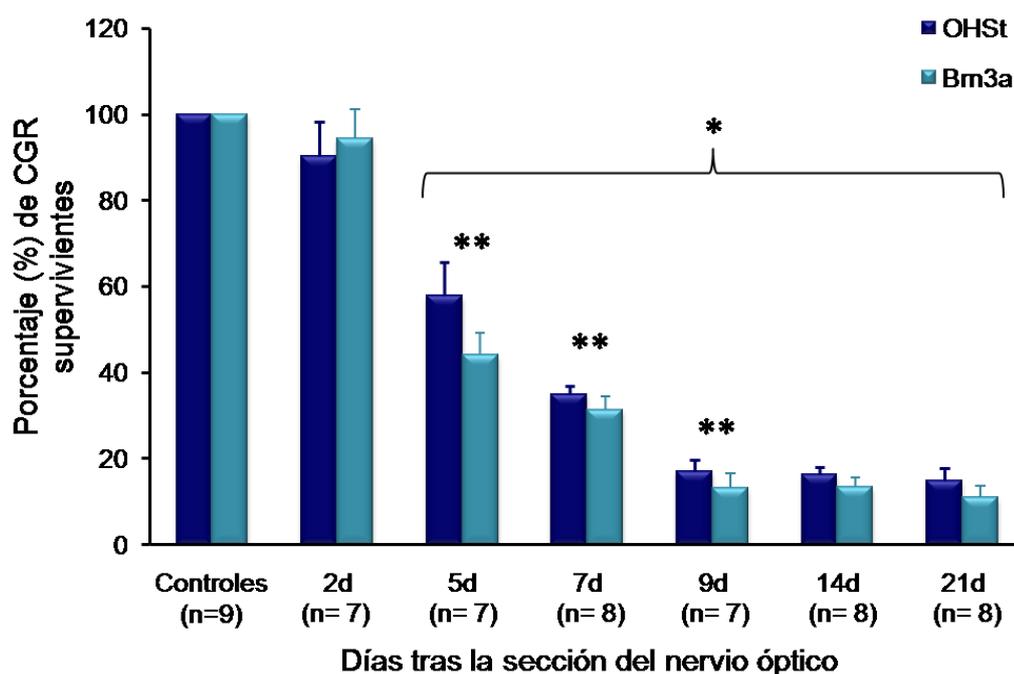


Figura 4.20. Porcentaje de CGR de ratones C57BL/6 supervivientes a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.

Porcentaje de CGR-OHSt⁺ (barras azules oscuras) y Brn3a⁺ (barras azules claras) a los diferentes tiempos después de la SNO, con respecto a las retinas control, que se han considerado el 100% de la población. * = diferencia estadísticamente significativa en comparación con las retinas control (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). ** = diferencia estadísticamente significativa en comparación con el anterior tiempo experimental (Test de Mann Whitney $p < 0,05$).

En la figura 4.21 observamos los mapas de isodensidad de las CGR-Brn3a⁺ a los distintos tiempos tras la SNO. Como se observa, el mapa correspondiente a la retina representativa del grupo de 2 días post-SNO (figura 4.21A) muestra una densidad de CGR-Brn3a⁺ muy similar a la densidad observada en las retinas control, pero cuanto mayor es el tiempo transcurrido tras la SNO, menor es la densidad de CGR-Brn3a⁺, y en las retinas representativas de los grupos de 9, 14 y 21 días después de la SNO (figura 4.21D,E,F), la densidad es muy similar. Estos mapas de isodensidad de CGR nos muestran que la SNO provoca una pérdida progresiva de CGR que se produce de forma difusa por toda la retina.

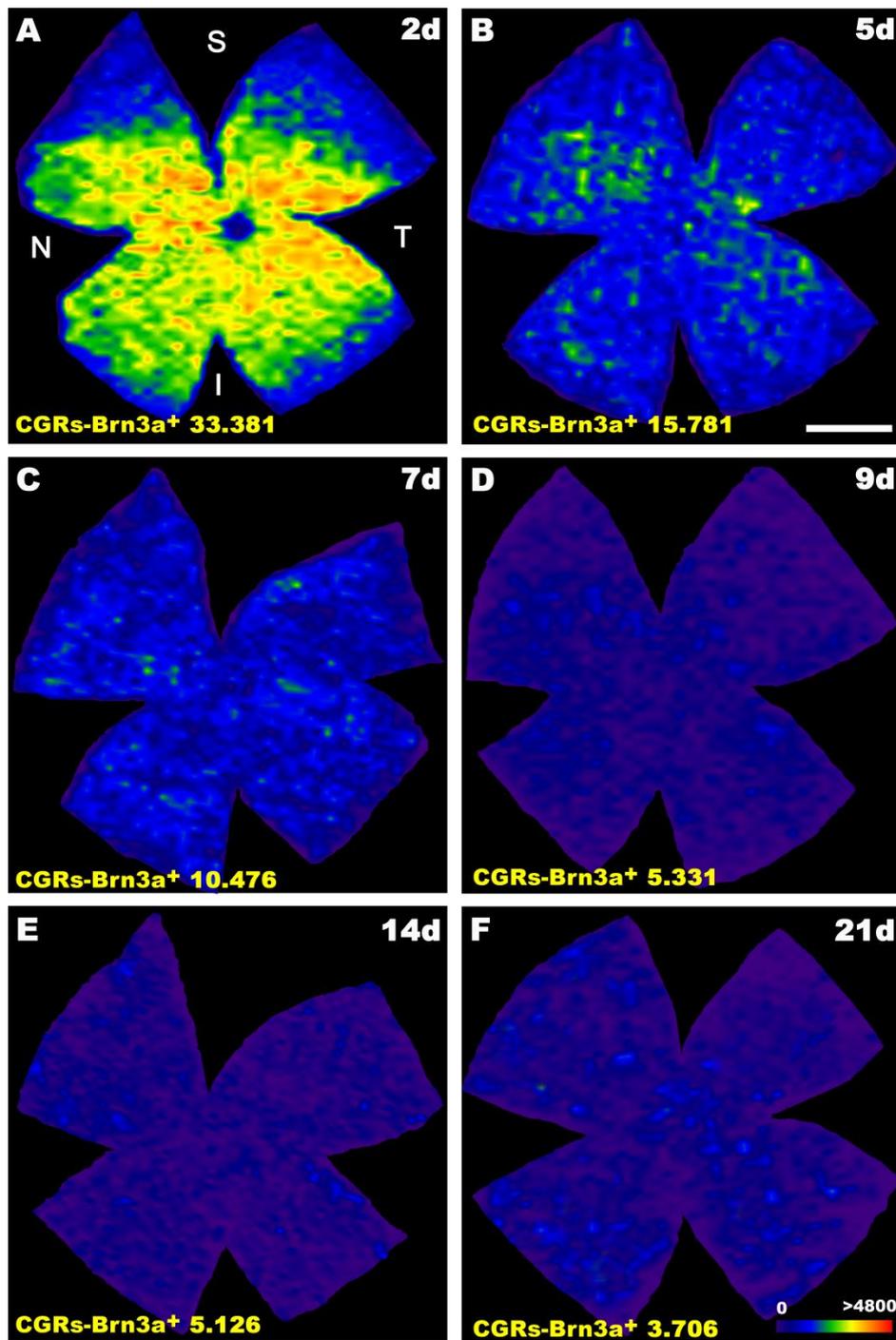


Figura 4.21. Distribución de las CGR de ratones C57BL/6 a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.

La imagen muestra las densidades de CGR-Brn3a⁺ en retinas representativas a los 2 (A), 5 (B), 7 (C), 9 (D), 14 (E) y 21 días post-SNO (F). La pérdida de CGR es difusa y se distribuye por toda la retina. En la parte inferior izquierda de cada retina se muestra el número de CGR-Brn3a⁺ y en la parte inferior derecha de F se muestra la escala de la densidad de CGR. Abreviaturas: S=superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

4.2.3. EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE BDNF TRAS LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

El siguiente objetivo de nuestro estudio fue analizar el efecto neuroprotector de una única inyección intravítrea de BDNF sobre las CGR de ratones C57BL/6 después de la SNO. Analizamos también la respuesta de las células de microglía fagocítica tras la SNO y el efecto que la inyección intravítrea de BDNF tuvo sobre esta población.

Además, estudiamos también estos hechos en ratones albinos Swiss, para comprobar si el BDNF producía el mismo efecto en ambas estirpes. En los ratones Swiss, solamente realizamos los grupos experimentales de los tiempos más representativos, en función de los resultados obtenidos en los ratones C57BL/6, como veremos más adelante.

4.2.3.1. Efecto del BDNF sobre la supervivencia de las células ganglionares de la retina de ratón tras la sección del nervio óptico

Para llevar a cabo este estudio, se realizaron dos grupos experimentales: en el primero de ellos, se realizó una inyección intravítrea de BDNF (2,5µl; 1µg/µl); en el segundo, se inyectó intravítreo el mismo volumen de vehículo (2,5µl PBS). En todos los animales se realizó el trazado de las CGR mediante la aplicación de OHSt en ambos CS una semana antes de realizar la SNO y se llevó a cabo también la inmunodetección de las CGR con Brn3a.

Para elegir los tiempos post-SNO, nos basamos en los resultados previos. Como hemos visto anteriormente, en ratones C57BL/6, la SNO produce una muerte de CGR estadísticamente significativa a 5 días y esta muerte continúa al menos hasta 9 días después de la SNO. A partir de este tiempo y hasta 21 días, el número de CGR supervivientes se mantiene estable. Como a 2 días post-SNO existía una disminución de las CGR, aunque no fuera estadísticamente significativa, y a 5 días ya era significativo, decidimos realizar un grupo experimental que se procesó 3 días después de la SNO, y además realizamos otros grupos experimentales a los 5, 7 y 14 días después de la SNO. En el grupo de ratones Swiss realizamos solamente 2 grupos experimentales a los 3 y 7 días después de la SNO, ya que eran los tiempos más representativos de este estudio, como veremos a continuación.

Las imágenes de las figuras 4.22 y 4.23 muestran el aspecto de las retinas izquierdas correspondientes a los dos grupos experimentales: tratadas con BDNF y tratadas con vehículo de los ratones C57BL/6, y en la figura 4.24, las correspondientes a los ratones Swiss. Se puede observar que, en todos los grupos experimentales de ambas estirpes, las retinas tratadas con BDNF presentan un mayor número de CGR, tanto marcadas con OHSt como con Brn3a. A 3 días después de la SNO, observamos que las microfotografías representativas correspondientes a la retinas tratadas con BDNF (figura 4.22 A,B,C y 4.24 A,B,C) tiene un aspecto muy similar a una retina control.

Podemos observar también, que en las microfotografías donde se muestran las CGR trazadas aparecen células de microglía fagocítica transcelularmente marcada con OHSt en todos los tiempos experimentales. Al igual que en la caracterización del modelo de degeneración, el hecho de que aparezcan las células de microglía fagocítica marcadas con OHSt nos impidió su cuantificación automática, por lo que se estimó el número total de CGR de estas retinas a partir de 12 áreas representativas. La población total de CGR-Brn3a⁺ sin embargo, fue cuantificada automáticamente.

En las tablas 4.5 y 4.6 muestran los datos cuantitativos. Las retinas tratadas con vehículo (PBS) mostraron un promedio de CGR, tanto marcadas con OHSt como con Brn3a, similar a las de los grupos que no recibieron inyección (ver apartado 4.2.2.1). Estos resultados se observaron en todos los tiempos después de la SNO, lo cual nos indica que la inyección intravítrea de vehículo no tiene ningún efecto protector sobre la supervivencia de las CGR tras la SNO.

En los animales procesados a los 3 días después de la SNO y la inyección de vehículo ya se observó una muerte de CGR estadísticamente significativa con respecto a las retinas control. El promedio de CGR marcadas con OHSt y con Brn3a fue de 34.937 ± 2.589 y 25.725 ± 1.809 , respectivamente, en los ratones C57BL/6 y 42.232 ± 3250 y 40.903 ± 2.031 , en los ratones Swiss. Por lo tanto, en el modelo de SNO en ratón, la muerte de CGR comienza a ser significativa a los 3 días después de la SNO.

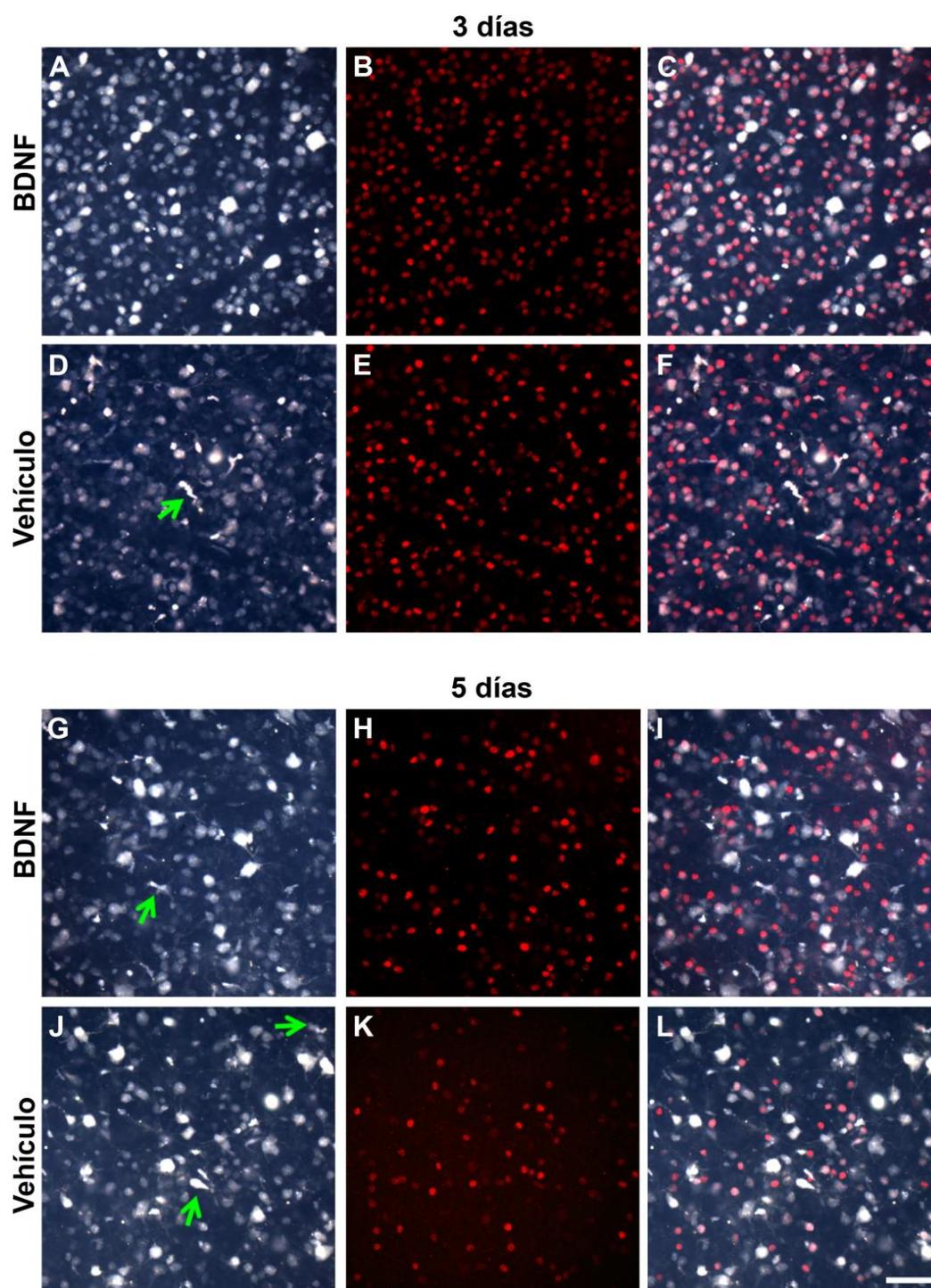


Figura 4.22. La administración intravítrea de BDNF retrasa la muerte de las CGR en ratones pigmentados C57BL/6.

Estas microfotografías muestran en las tres filas áreas representativas (20x) de las retinas izquierdas de ratones C57BL/6 a los 3 (A-F) y 5 días (G-L) después de la SNO y el tratamiento con BDNF (A-C, G-I) o vehículo (D-F, J-L). La columna de la derecha muestra la superposición de ambas señales. Las flechas en D, G y J señalan células de microglía fagocítica marcada transcelularmente con OHSt. Barra= 50 μ m.

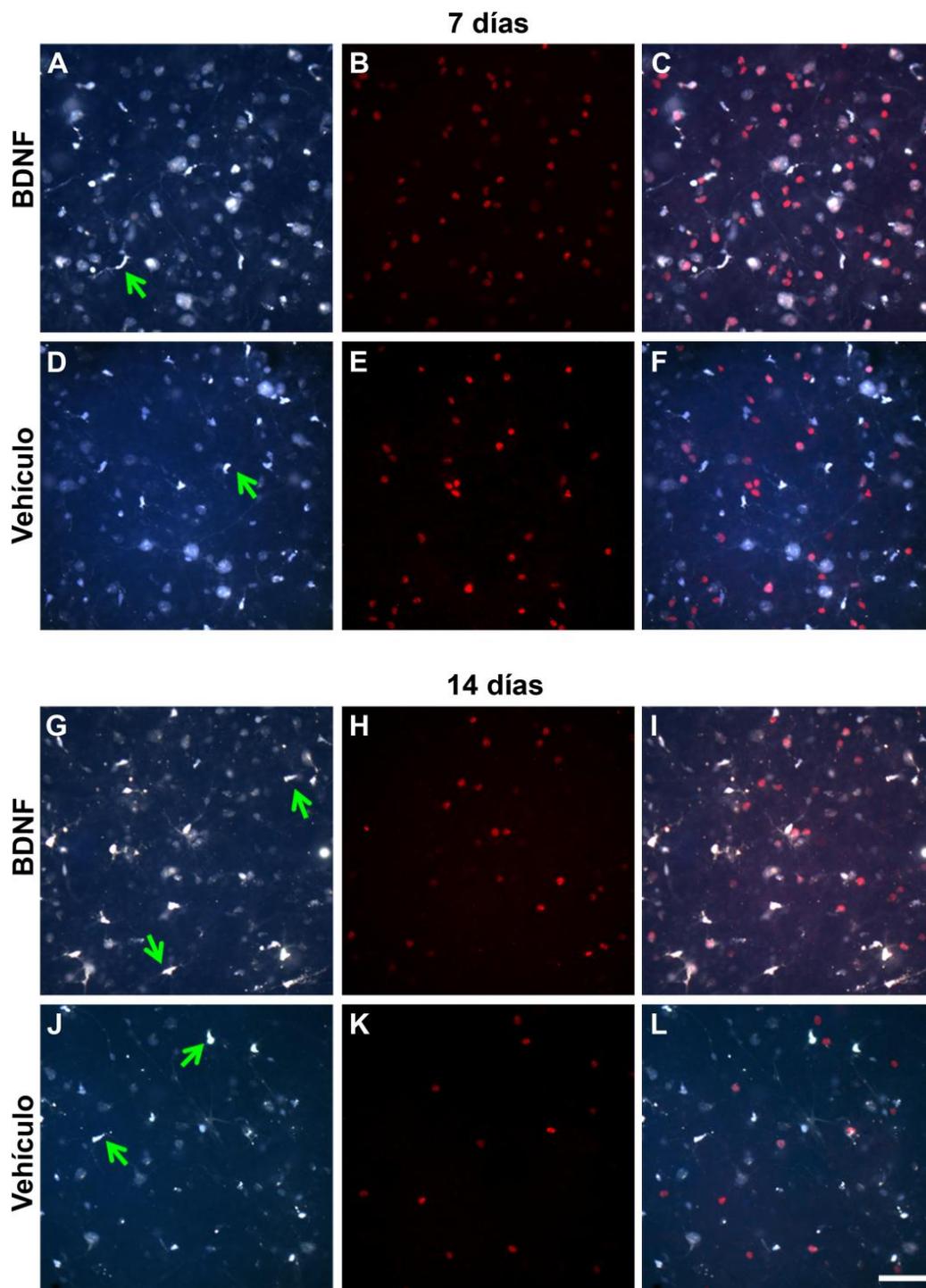


Figura 4.23. La administración intravítrea de BDNF retrasa la muerte de las CGR en ratones pigmentados C57BL/6.

Estas microfotografías muestran en las tres filas áreas representativas (20x) de las retinas izquierdas de ratones C57BL/6 a los 7 (A-F) y 14 días (G-L) después de la SNO y el tratamiento con BDNF (A-C, G-I) o vehículo (D-F, J-L). La columna de la derecha muestra la superposición de ambas señales. Las flechas en D, G y J señalan células de microglía fagocítica marcada transcelularmente con OHSt. Barra= 50 μ m.

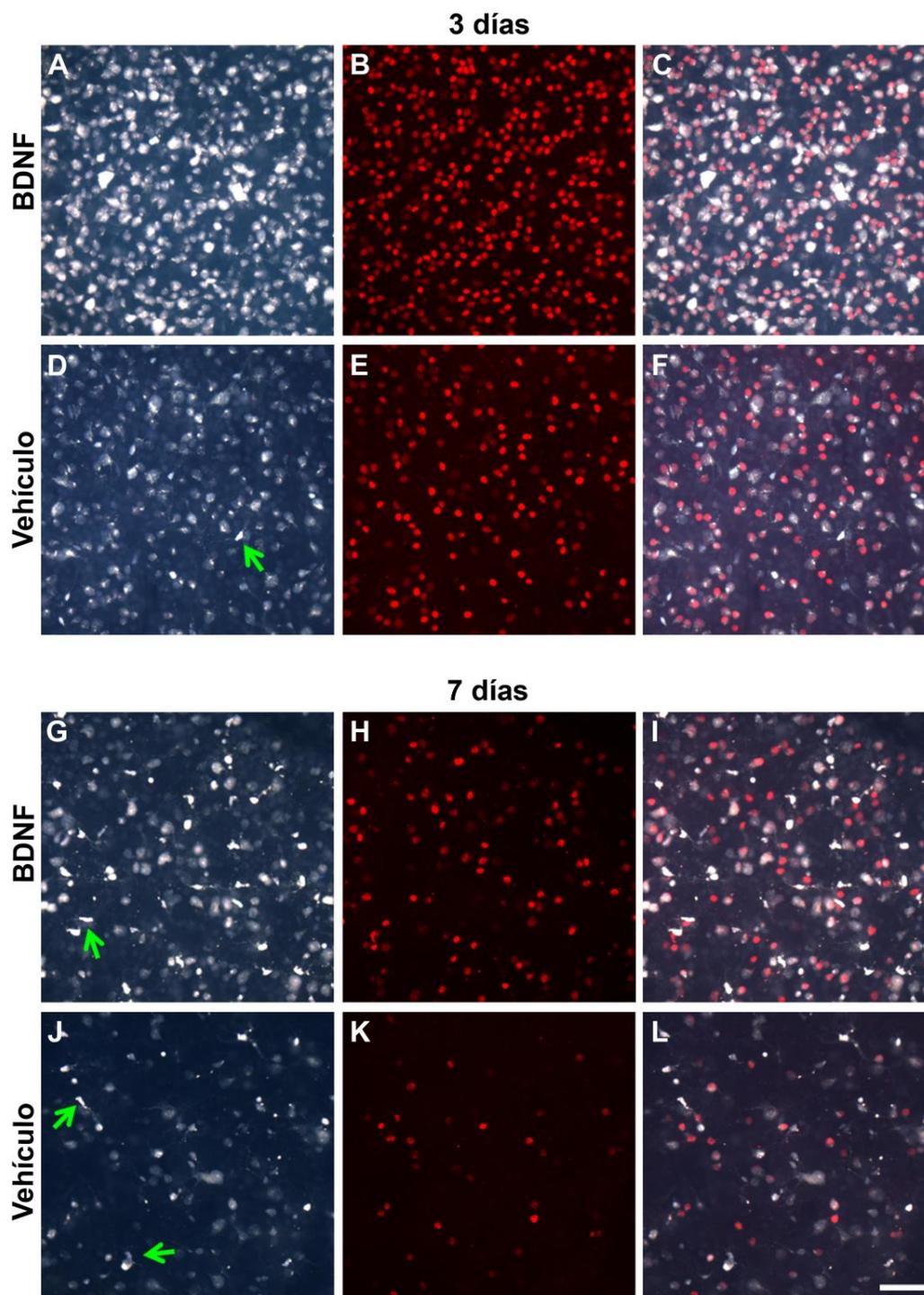


Figura 4.24. La administración intravítrea de BDNF retrasa la muerte de las CGR en ratones albinos Swiss.

Estas microfotografías muestran en las tres filas áreas representativas (20x) de las retinas izquierdas de ratones Swiss a los 3 (A-F) y 7 días (G-L) después de la SNO y el tratamiento con BDNF (A-C, G-I) o vehículo (D-F, J-L). La columna de la derecha muestra la superposición de ambas señales. Las flechas en D, G y J señalan células de microglía fagocítica marcada transcelularmente con OHSt. Barra= 50 μ m.

Tratamiento	Días tras la sección del nervio óptico											
	3 días						5 días					
	BDNF			Vehículo			BDNF			Vehículo		
Retina	OHSt	Brn3a	Área	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b}	Área	OHSt ^a	Brn3a ^a	Área	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b,c}	Área
1	41.546	30.183	13,6	35.484	23.341	10,3	34.569	20.110	13,9	20.287	15.204	14,3
2	39.515	31.170	12,9	37.111	26.159	13,9	33.438	24.575	13,5	24.681	19.531	13,6
3	42.201	32.443	12,7	36.155	26.145	12,2	29.817	29.795	13,4	22.778	16.819	13,6
4	39.215	30.156	13,6	34.101	24.147	13,5	27.588	20.164	13,7	24.480	11.012	13,6
5	39.854	29.545	13,4	31.356	25.589	14,6	32.606	30.432	12,9	25.487	10.444	14,7
6	39.665	27.038	14,1	36.156	26.852	14,2	27.511	25.466	14,2	24.257	13.467	13,4
7	39.555	28.154	13,2	31.021	24.454	15,1	27.943	23.506	13,5	---	---	---
8	---	---	---	38.112	29.111	14,8	---	---	---	---	---	---

Media	40.222	29.813	13,3	34.937	25.725	13,6	30.496	24.864	13,6	23.661	14.413	13,9
DEM	1.160	1.805	0,5	2.589	1.809	1,6	3.001	4.129	0,4	1.874	3.488	0,5

d (cel/mm ²)	2.594	2.240	---	2.620	1.916	---	2.245	1.835	---	1.708	1.043	---
DEM	1.146	203	---	446	213	---	249	349	---	150	267	---

Tratamiento	Días tras la sección del nervio óptico											
	7 días						14 días					
	BDNF			Vehículo			BDNF			Vehículo		
Retina	OHSt ^a	Brn3a ^a	Área	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b}	Área	OHSt ^a	Brn3a ^a	Área	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b}	Área
1	29.929	25.593	14,8	15.361	10.410	14,7	18.256	15.400	14,8	7.732	6.041	14,6
2	27.828	21.489	13,6	15.669	10.248	13,4	16.967	16.220	14,7	8.107	5.880	15,5
3	25.893	19.922	15,4	13.669	11.318	13,3	18.228	14.406	14,6	5.215	6.453	15,5
4	26.767	18.385	13,9	9.479	8.242	14,0	18.237	12.997	15,7	5.501	4.569	16,8
5	25.720	16.423	13,5	13.987	8.676	14,9	18.702	10.054	14,3	7.942	4.278	14,3
6	25.559	16.443	15,5	19.239	9.629	15,1	17.061	14.380	16,4	7.745	5.685	14,8
7	27.172	19.997	13,5	18.441	7.308	16,3	18.357	14.524	15,7	6.855	5.600	13,5
8	---	---	---	---	---	---	20.652	14.691	14,2	6.104	6.201	14,7

Media	26.981	19.750	14,3	15.121	9.404	14,5	18.315	14.084	15,0	6.900	5.588	15,0
DEM	1.543	3.192	0,9	3.255	1.397	1,1	1.226	1.870	0,8	1.158	773	1,0

d (cel/mm ²)	1.888	1.381	---	1.038	655	---	1.222	938	---	585	375	---
DEM	164	229	---	192	134	---	124	131	---	48	58	---

Tabla 4.5. Número de CGR de ratones C57BL/6 después de la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Número total de CGR cuantificadas en cada una de las retinas analizadas a los distintos tiempos y tratamientos, así como el área de cada retina. Debajo de cada tabla se ha calculado el número medio de CGR y la densidad media (d) de CGR en cada tiempo postlesion y sus correspondientes desviaciones estandar de la media (DEM). ^a = estadísticamente significativo comparado con las retinas control (Test de Mann Whitney p<0,05), ^b = estadísticamente significativo comparado con el mismo tiempo post-SNO tratado con vehículo

(Test de Mann Whitney $p < 0,05$), ^c = estadísticamente significativo comparado con el número de OHSt del mismo grupo experimental (Test de Mann Whitney $p < 0,05$).

Tratamiento	Días tras la sección del nervio óptico											
	3 días						7 días					
	BDNF			Vehículo			BDNF			Vehículo		
Retina	OHSt	Brn3a	Área	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b}	Área	OHSt ^a	Brn3a ^a	Área	OHSt ^{a,b}	Brn3a ^{a,b}	Área
1	48.505	45.595	13,7	42.114	38.545	13,8	25.737	22.223	14,7	18.671	15.141	13,2
2	51.886	48.291	12,9	47.011	43.990	12,5	27.690	23.235	12,1	20.841	13.604	12,4
3	49.696	44.353	12,2	45.950	41.225	13,3	30.955	26.129	13,4	19.354	16.893	14,4
4	53.057	50.043	13,4	40.823	39.762	13,0	32.499	29.868	13,2	26.484	12.008	15,8
5	49.703	48.286	13,7	39.925	40.992	10,5	34.939	29.030	12,3	16.407	23.072	13,1
6	49.519	46.886	13,7	49.628	45.270	14,4	18.356	16.418	13,2	8.952	12.455	13,7
7	48.723	46.272	13,8	---	---	---	---	---	---	15.246	10.991	15,0
8	49.029	45.274	14,0	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Media	49.972	46.697	13,5	42.232	40.903	12,6	30.364	26.097	13,1	19.599	15,073	13,9
DEM	1511	1846	0,6	3250	2031	1,3	3.687	3.392	1,0	6,066	3,858	1,1
d(cel/mm²)	3.702	3.458	---	3.418	3.273	---	2.317	2.000	---	1.128	1.102	---
DEM	242	211	---	322	436	---	304	331	---	556	326	---

Tabla 4.6. Número de CGR de ratones Swiss después de la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Número total de CGR cuantificadas en cada una de las retinas analizadas a los distintos tiempos y tratamientos, así como el área de cada retina. Debajo de cada tabla se ha calculado el número medio de CGR y la densidad media (d) de CGR en cada tiempo postlesion y sus correspondientes desviaciones estandar de la media (DEM). ^a = estadísticamente significativo comparado con las retinas control (Test de Mann Whitney $p < 0,05$), ^b = estadísticamente significativo comparado con el mismo tiempo post-SNO tratado con vehículo (Test de Mann Whitney $p < 0,05$), ^c = estadísticamente significativo comparado con el número de OHSt del mismo grupo experimental (Test de Mann Whitney $p < 0,05$).

En comparación con los grupos tratados con vehículo, los grupos tratados con BDNF mostraron una supervivencia de CGR estadísticamente mayor en todos los tiempos experimentales analizados, es decir, el porcentaje y número de CGR, tanto OHSt⁺ como Brn3a⁺, que sobrevivieron a la SNO fue significativamente mayor en todos los grupos experimentales tratados con BDNF que en los tratados con vehículo (figura 4.25). En los grupos experimentales procesados a los 3 días después de la SNO, tanto de ratones C57BL/6 como de ratones Swiss, la inyección intravítrea de BDNF previno la muerte de las CGR en su totalidad, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las retinas tratadas con BDNF y las retinas control. Siete días después de la SNO, el porcentaje de CGR supervivientes en los grupos tratados con BDNF y vehículo, fueron de 65% y 37% en los ratones C57BL/6; y de 63% y 41% en los ratones Swiss, respectivamente. Catorce días después de la SNO en el grupo de ratones C57BL/6, el porcentaje de supervivencia de las CGR tratadas con BDNF fue de 45%, mientras que en el grupo tratado con vehículo fue del 18%.

El porcentaje de pérdida de CGR a todos los tiempos tras la SNO y en todos los grupos experimentales fue similar con ambos marcadores, excepto a 5 días post-SNO en el grupo de ratones C57BL/6 tratados con vehículo, donde se observó que el porcentaje de pérdida de CGR marcadas con Brn3a fue mayor que el porcentaje de las CGR marcadas con OHSt (figura 4.25).

Tanto con el tratamiento con BDNF como con el tratamiento de con vehículo, conforme aumentaba el tiempo después de la SNO disminuía la población de CGR. Con los datos cuantitativos realizamos un análisis de regresión lineal comparando número de CGR vs tiempo post-lesión (figura 4.26). Este análisis muestra que la muerte de las CGR es lineal en ambos grupos experimentales (figura 4.26, valor de R^2). El valor de la pendiente revela (m), por una parte que la velocidad de la pérdida de CGR es más alta en el grupo tratado con vehículo que con BDNF y por otra predice el número de CGR que mueren diariamente en este modelo de lesión que, de acuerdo con lo anterior, es más alto en el grupo tratado con vehículo que con BDNF.

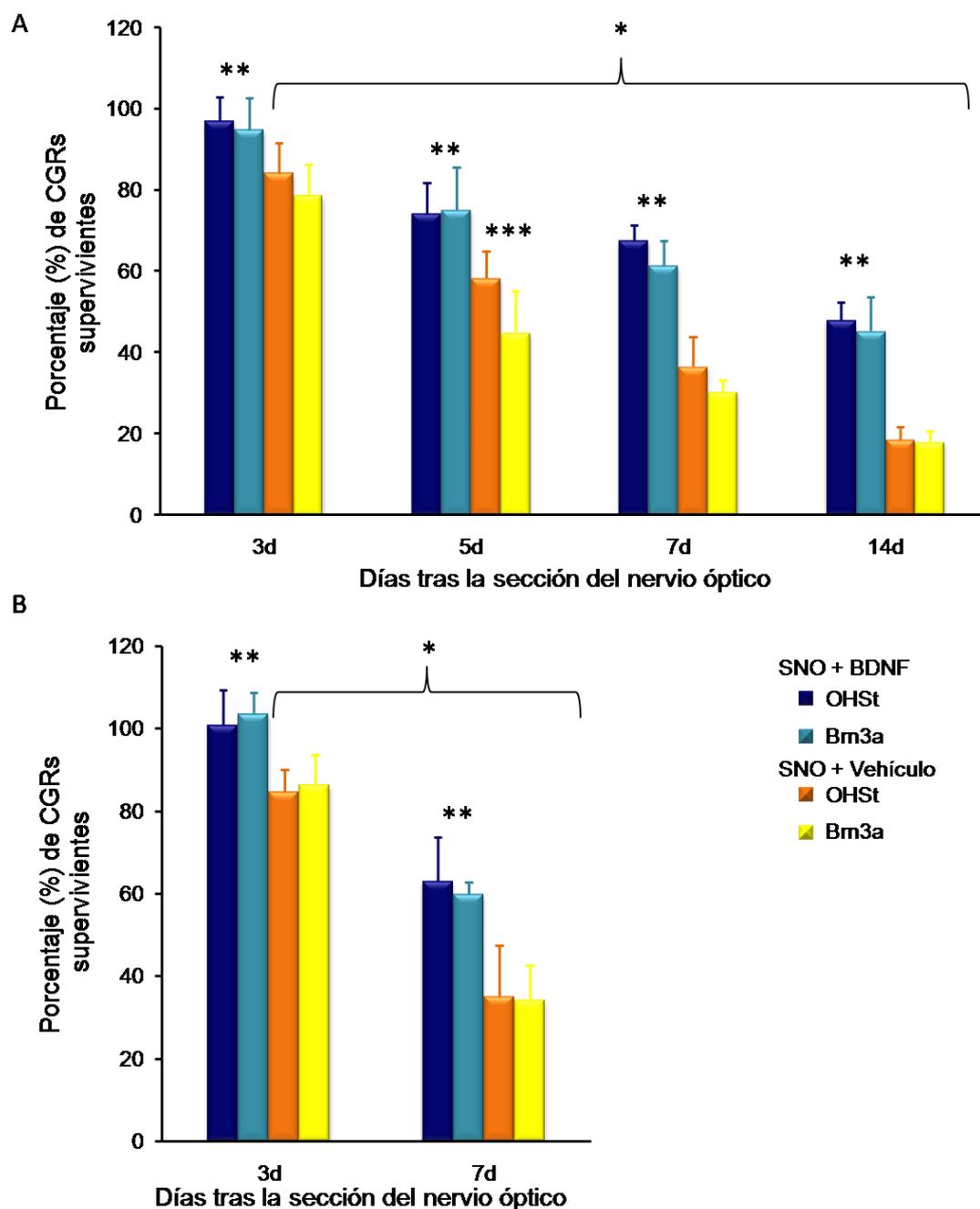


Figura 4.25. Porcentaje de CGR supervivientes a diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Porcentaje de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ supervivientes en las retinas izquierdas de los ratones C57BL/6 (A) y Swiss (B) a diferentes periodos de tiempo tras la SNO y el tratamiento con BDNF o vehículo, con respecto al número de CGR en retinas control que se ha considerado el 100%. d= días tras la SNO, *= diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con las retinas control (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). **= diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con BDNF y el grupo tratado con vehículo. ***=diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de CGR-OHSt⁺ y el el porcentaje de CGR-Brn3a⁺ del mismo grupo experimental (Test de Mann Whitney $p < 0,05$).

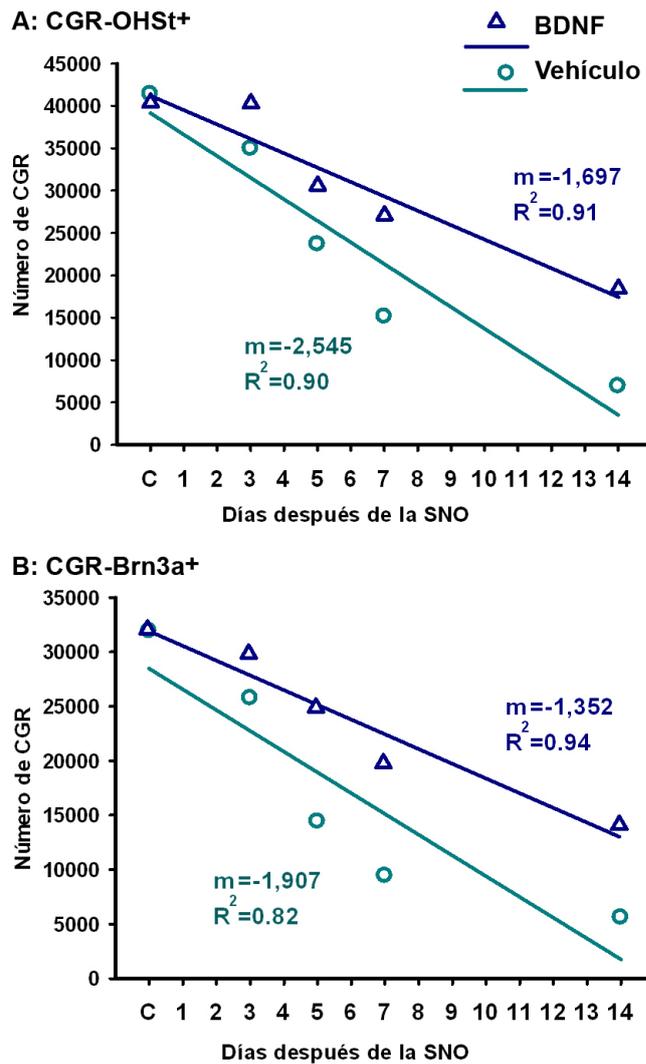


Figura 4.26. La pérdida de CGR tras la sección del nervio óptico sigue un curso lineal.

Las líneas de regresión (CI= 95%) se han calculado con el número total de CGR marcadas con OHSt (A) o con Brn3a (B) vs los diferentes tiempos después de la SNO y el tratamiento con BDNF (triángulos) o vehículo (círculos). El valor de la R^2 para cada línea muestra que la pérdida de CGR sigue un curso lineal. Se puede observar, además, que la pendiente de las líneas de regresión es mayor (valor neto) en el grupo tratado con vehículo que con BDNF, lo que indica una mayor velocidad de pérdida celular en el primero. Abreviaturas: m= pendiente, R^2 = coeficiente de correlación, C= control.

El análisis de la distribución topográfica de las CGR a los distintos tiempos post-lesion muestra, de acuerdo con los datos cuantitativos, que las retinas tratadas con BDNF tienen mayor densidad de CGR-Brn3a⁺ que las retinas tratadas con vehículo (figuras 4.27 y 4.28). Además se observa que el efecto neuroprotector que produce el BDNF no se produce únicamente en la zona de la inyección, sino que se extiende a toda la retina.

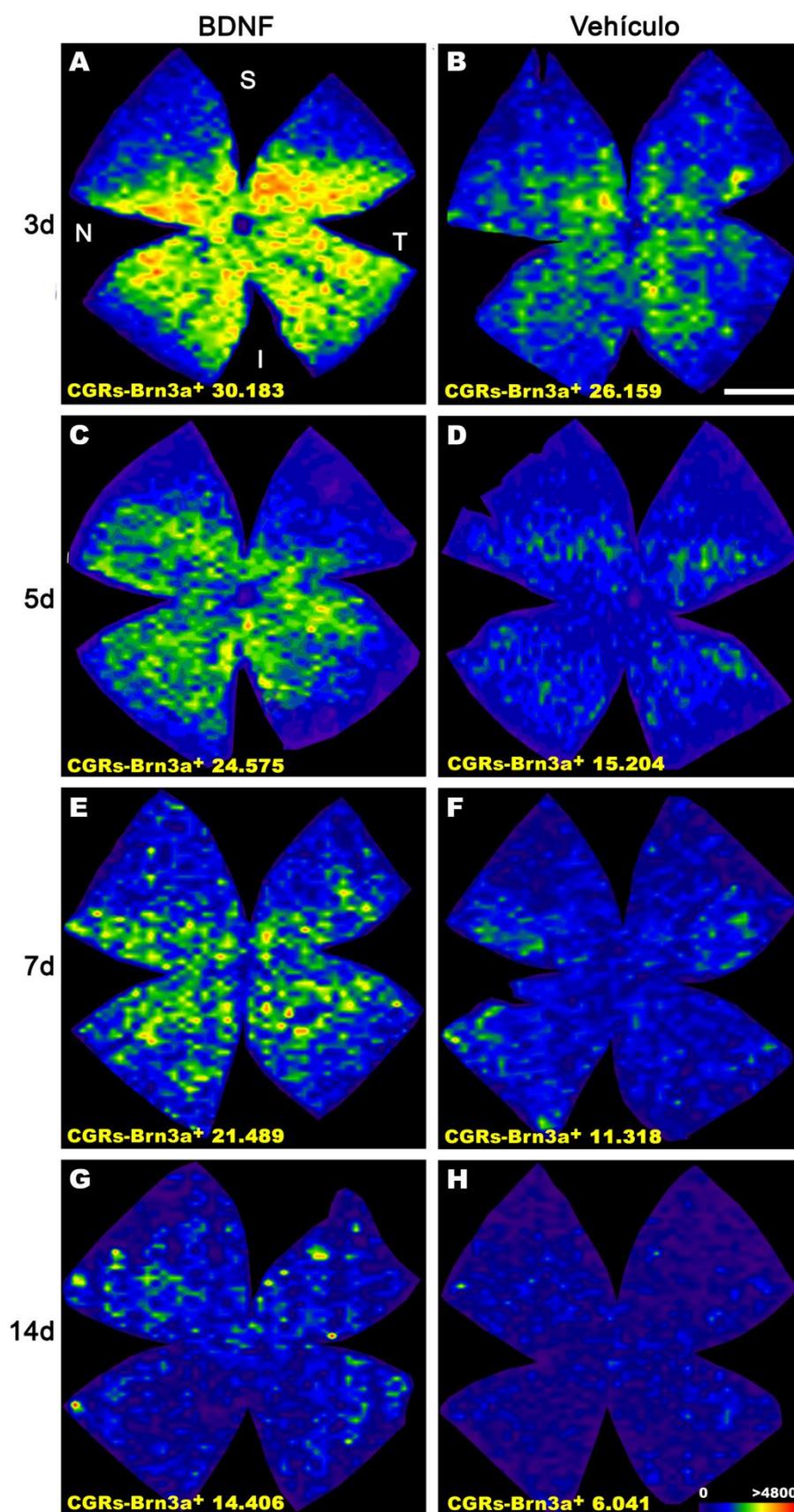


Figura 4.27. Distribución de las CGR de ratones C57BL/6 en los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Estos mapas de isodensidad muestran una mayor densidad de CGR-Brn3a⁺ en las retinas tratadas con BDNF que en las tratadas con vehículo a los diferentes tiempos después de la SNO. En la parte inferior de cada retina se muestra el número de CGR-Brn3a⁺ contado en cada retina, que son también siempre superiores en las retinas tratadas con BDNF. La escala de color está en la parte inferior derecha de H. Abreviaturas: d= días. S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

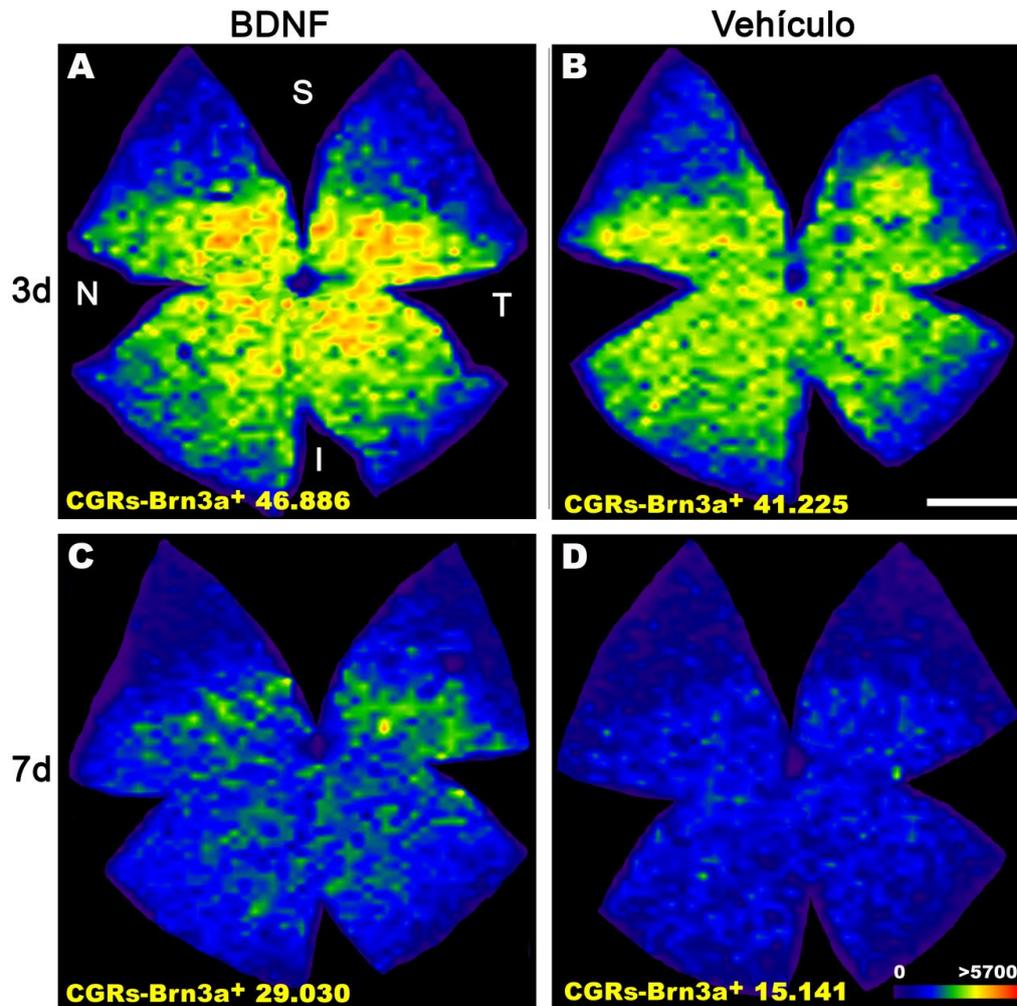


Figura 4.28. Distribución de las CGR de ratones Swiss en los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Estos mapas de isodensidad muestran una mayor densidad de CGR-Brn3a⁺ en las retinas tratadas con BDNF que en las tratadas con vehículo a los diferentes tiempos después de la SNO. En la parte inferior de cada retina se muestra el número de CGR-Brn3a⁺ contado en cada retina, que son también siempre superiores en las retinas tratadas con BDNF. La escala de color está en la parte inferior derecha de H. Abreviaturas: d= días. S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

4.2.3.2. Células de microglía fagocítica en las retinas de ratón tras la sección del nervio óptico

Una vez realizado el estudio de la población de CGR supervivientes en las retinas izquierdas después de la SNO, y evaluado el efecto que sobre éstas tiene la inyección intravítrea de BDNF, cuantificamos en las retinas de los animales control y en estas mismas retinas el número de células de microglía fagocítica. Para ello, de cada grupo experimental que había recibido una inyección intravítrea, bien de BDNF o bien de vehículo, y del grupo de retinas control, se seleccionaron cuatro retinas representativas y se realizó en ellas la inmunodetección de células de microglía con el anticuerpo contra el Iba-1. A continuación, se contaron las células de microglía fagocíticas que eran aquellas que se habían marcado transcelularmente con OHSt, proceso que ocurre cuando han fagocitado las CGR trazadas previamente con OHSt que han muerto. Como las células de la microglía marcadas con OHSt se distinguen de las CGR-OHSt⁺ por criterios morfológicos, para no cometer errores se contaron sólo aquellas células que por su morfología eran células de microglía OHSt⁺ que además expresaban el marcador específico de microglía Iba1. Encontramos que todas las células de microglía marcadas transcelularmente con OHSt estaban también marcadas con Iba-1.

En las retinas de los animales control C57BL/6 procesadas a 7, 10 y 30 días después de la aplicación de OHSt en el CS, el número medio de células de microglía fagocítica presentes en la retina fue de 31 ± 7 , 39 ± 5 y 51 ± 12 , respectivamente (tabla 4.7). El número de células de microglía presentes en retinas procesadas 30 días tras el marcaje fue significativamente mayor que el observado en los otros dos grupos. Estas células se distribuyen por toda la retina sin ningún patrón establecido (figura 4.29). En las retinas de los ratones Swiss control procesados 10 días después del marcaje con OHSt, el número medio de células de microglía presentes en la retina fue de 61 ± 11 .

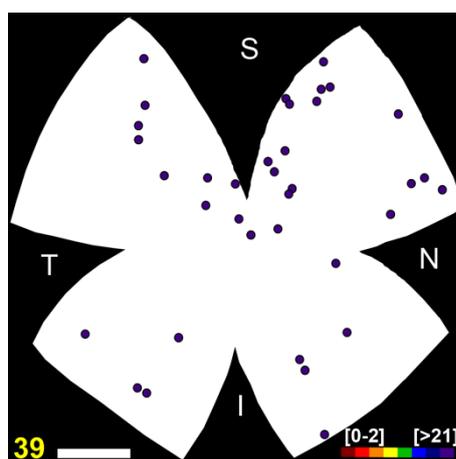


Figura 4.29. Distribución de las células de microglía fagocítica de ratones controles C57BL/6.

Mapa de vecinos de las células de microglía fagocítica OHSt⁺ e Iba1⁺ de una retina control representativa procesada 10 días después de la aplicación de OHSt en el CS. Se puede observar el número de células de microglía marcadas en esta retina en la esquina inferior izquierda. Abreviaturas: S= superior, T= temporal, I= inferior, N= nasal. Barra= 1 mm.

Días tras el marcaje con OHSt desde el CS

Retina	C57BL/6			Swiss
	7días	10días	30días ^a	10 días
1	25	35	45	50
2	28	39	69	70
3	26	23	37	66
4	36	32	49	51
5	40	28	54	70
Media	31	39	51	61
DEM	7	5	12	11

Tabla 4.7. Número de células de microglía fagocítica OHSt e Iba1 positivas en retinas control de ratones C57BL/6 y Swiss.

^a = estadísticamente significativo comparado con las retinas control procesadas 7 días y 10 días después de la aplicación del trazador en el CS (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). Abreviaturas: DEM= desviación estándar de la media.

En la tabla 4.8 se muestra el número de células de microglía fagocítica contadas en las retinas experimentales. Conforme aumenta el tiempo después de ésta, el número de células de microglía fagocítica aumenta (figura 4.30), siendo significativamente mayor que en retinas control a partir de 3 días post-SNO, tanto en el grupo tratado con BDNF como en el tratado con vehículo, en ambas estirpes de ratón (figura 4.31).

Comparando ambos grupos experimentales (BDNF y vehículo) de los ratones C57BL/6 con una regresión lineal, observamos que los grupos tratados con BDNF, la aparición de microglía se produjo más lentamente que en los grupos tratados con vehículo (figura 4.32).

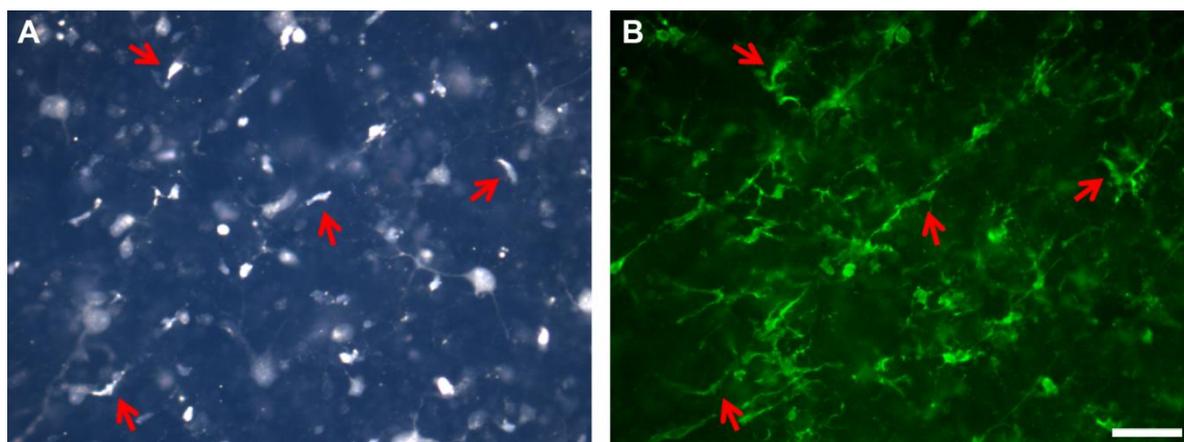


Figura 4.30. Identificación de las células de microglía fagocítica.

Estas microfotografías corresponden al mismo campo de una retina izquierda representativa del grupo de ratones C57BL/6 procesado 7 días tras la SNO e inyección intravítrea de vehículo. En ella se observan las células de microglía fagocítica transcelularmente marcadas con OHSt (A) e inmunodetectadas con Iba1 (B). Las flechas señalan las células de microglía fagocítica (OHSt e Iba1 positivas). Barra= 50 μ m.

Tratamiento	Días tras la sección del nervio óptico											
	C57BL/6								Swiss			
	BDNF				Vehículo				BDNF		Vehículo	
Retina	3 d ^a	5 d ^a	7 d ^a	14 d ^a	3 d ^{a,b}	5 d ^{a,b}	7 d ^{a,b}	14 d ^{a,b}	3 d ^a	7 d ^a	3 d ^{a,b}	7 d ^{a,b}
1	174	824	1.554	2.309	452	1.520	2.448	2.892	159	659	218	1.408
2	175	862	1.622	2.221	350	1.820	1.974	2.665	137	1.233	186	1.571
3	198	1.017	1.381	2.306	351	1.517	2.410	2.455	177	899	290	1.543
4	---	1.302	1.301	2.500	488	1.798	2.266	2.509	---	1.380	212	1.442
5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Media	182	1.001	1.465	2.334	410	1.664	2.275	2.630	158	1.043	227	1.491
DEM	14	217	149	118	71	168	215	196	20	326	45	78

Tabla 4.8. Número de células de microglía fagocítica OHSt e Iba1 positivas en retinas de ratones C57BL/6 y Swiss tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

^a= estadísticamente significativo cuando se compara con las retinas control (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). ^b= estadísticamente significativo cuando se comparan con las retinas tratadas con BDNF del mismo tiempo experimental (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). Abreviaturas: d= días después de la SNO. DEM= desviación estándar de la media.

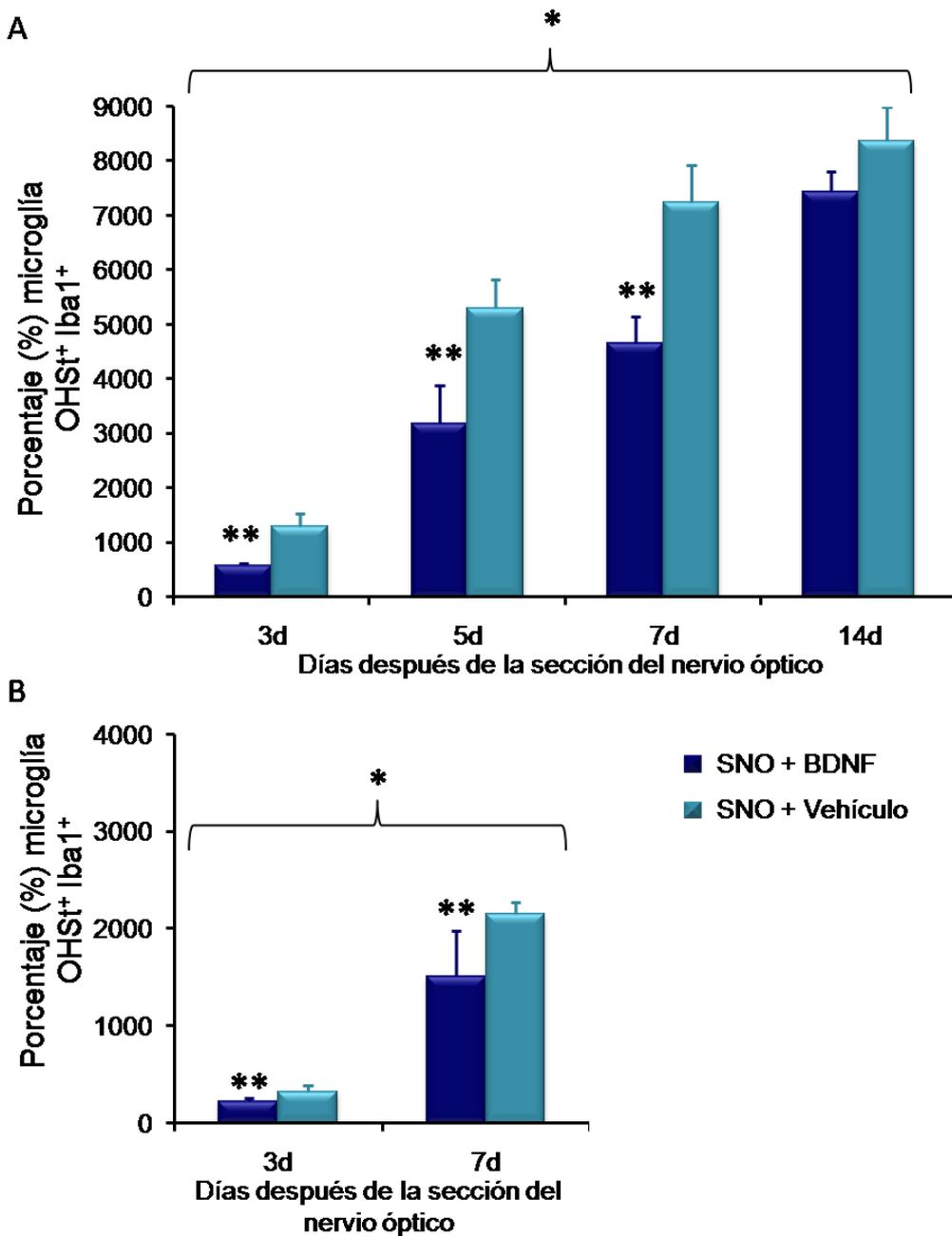


Figura 4.31. Porcentaje de las células de microglía fagocítica en retinas de ratones C57BL/6 y Swiss tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Porcentaje del aumento de las células de microglía fagocítica OHSt⁺ e Iba1⁺ tras la SNO, con respecto a las retinas control, que se han considerado el 100%. *= diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con las retinas control (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). **= diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con el grupo experimental del mismo tiempo tratado con vehículo (Test de Mann Whitney $p < 0,05$).

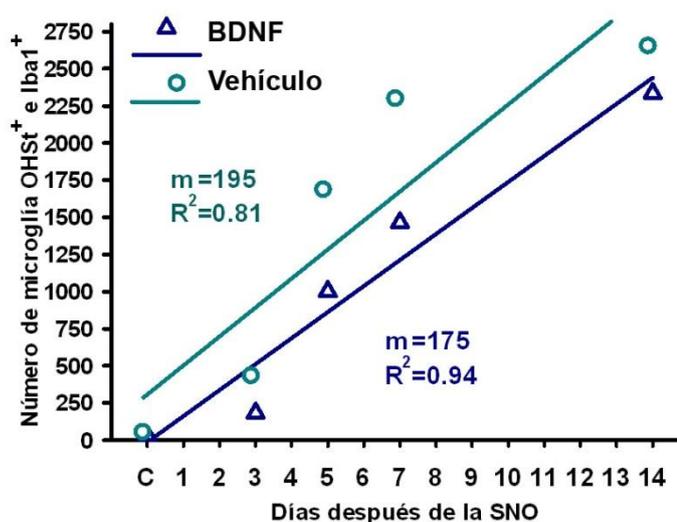


Figura 4.32. La aparición de microglía fagocítica tras la sección del nervio óptico sigue un curso lineal.

Las líneas de regresión (CI= 95%) se han calculado con el número total de células de microglía fagocíticas marcadas vs los diferentes tiempos después de la SNO y el tratamiento con BDNF (triángulos) o vehículo (círculos). El valor de la R^2 para cada línea muestra que la aparición de la microglía sigue un curso lineal. Se puede observar, además, que la pendiente de las líneas de regresión es mayor en el grupo tratado con vehículo que con BDNF, lo que indica que la aparición de la microglía es más rápida en el primero. Abreviaturas: m= pendiente, R^2 = coeficiente de correlación, C= control.

Con los números de células de microglía fagocíticas presentes en las retinas experimentales en los diferentes periodos de tiempo después de la SNO y el tratamiento con BDNF o vehículo construimos líneas de regresión para estudiar si el aumento del número de estas células vs. el tiempo tras la lesión era lineal. En la figura 4.33 se muestra este análisis, en el que se observa (R^2) que existe una relación lineal entre la aparición de la microglía fagocítica y el tiempo post lesión y además que la pendiente de la recta (m) es mayor en el grupo tratado con vehículo que en el grupo tratado con BDNF, indicando que la aparición de la microglía fagocítica es más rápida en las retinas tratadas con vehículo.

Atendiendo a esto construimos líneas de regresión correlacionando el número de CGR trazadas con OHSt o inmunodetectadas con Brn3a con el número de células de microglía fagocítica en las retinas izquierdas de los ratones C57BL/6 en los distintos periodos de tiempo después de la sección del nervio óptico (figura 4.33). Estos gráficos indican por una parte que hay una correlación entre el número de CGR que desaparecen y la aparición de células de la microglía, y por otra al ser el valor de R^2 ligeramente menor al comparar las células de microglía fagocítica con las CGR-Brn3a⁺ (figura 4.33B) que con las CGR-OHSt⁺, que el Brn3a desaparece cuando la CGR está muerta, mientras que la desaparición del OHSt del tejido ocurre cuando éste es fagocitado por las células de microglía.

La distribución de las células de microglía fagocítica OHSt⁺ e Iba1⁺ se podía observar claramente en los mapas de vecinos que construimos de las células de microglía presentes en las retinas de los ratones C57BL/6 (figura 4.34) y los ratones Swiss (figura 4.35). Como hemos visto anteriormente, las retinas de los animales control presentan muy pocas células de microglía fagocíticas distribuidas por toda la retina, sin un patrón aparente (figura 4.29). A partir de los 3 días después de la SNO y hasta los 14 días, el número de células de microglía aumenta conforme aumenta el tiempo tras la SNO. A los 3 días, el patrón de distribución de estas células continúa siendo homogéneo por toda la retina, A partir de los 5 días y hasta los 14 días, el número de células de microglía aumenta por toda la superficie de la retina, y se observa que en la zona central hay una mayor densidad de estas células. Estos resultados se observaron en ambas estirpes de ratones y en los dos grupos experimentales, en los tratados con BDNF o con vehículo. Sin embargo, podemos observar que en los grupos tratados con BDNF, el número de células de microglía es menor a todos los tiempos tras la SNO, en comparación con los grupos tratados con vehículo.

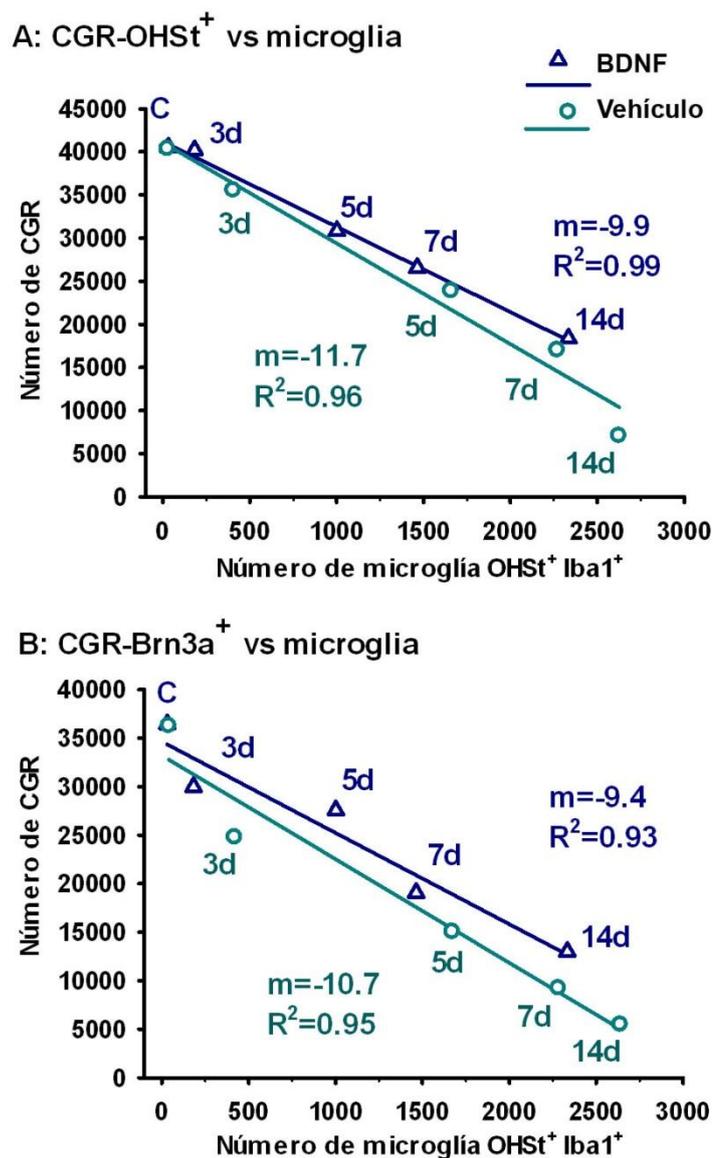


Figura 4.33. La aparición de microglía fagocítica y la muerte de CGR tras la sección del nervio óptico siguen un curso lineal.

Las líneas de regresión (CI= 95%) se han calculado con el número total de células de microglía fagocíticas marcadas vs el número total de CGROHSt⁺ (A) o Brn3a⁺ (B) para cada tiempo postlesión y el tratamiento con BDNF (triángulos) o vehículo (círculos). El valor de la R² para cada línea muestra que la pérdida de CGR y la aparición de la microglía sigue un curso lineal. Abreviaturas: m= pendiente, R²= coeficiente de correlación, C= control.

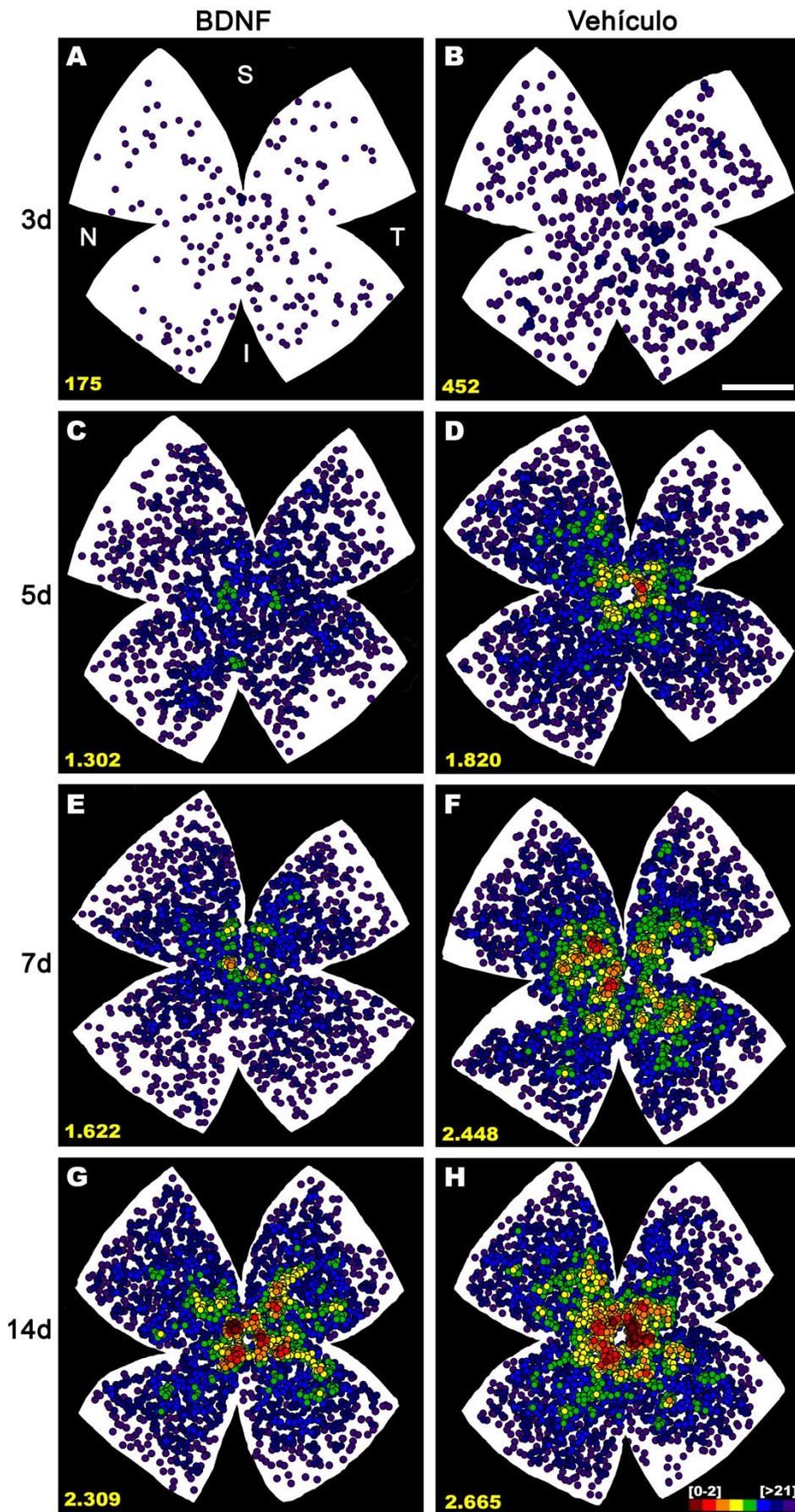


Figura 4.34. Distribución de la microglía fagocítica en ratones C57BL/6 a tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Estos mapas de vecinos muestran que el número de las células de microglía aumenta al aumentar el tiempo tras la lesión y este aumento es menor en las retinas tratadas con BDNF (A,C,E,G) que en las tratadas con vehículo (B,D,F,H). Siete días después de la SNO, la densidad de estas células es mayor en el centro de la retina y disminuye hacia la periferia. En la parte inferior izquierda de cada retina se muestra el número de células de microglía contadas en de cada retina. La escala de color está en la parte inferior derecha de H. Abreviaturas: d= días. S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

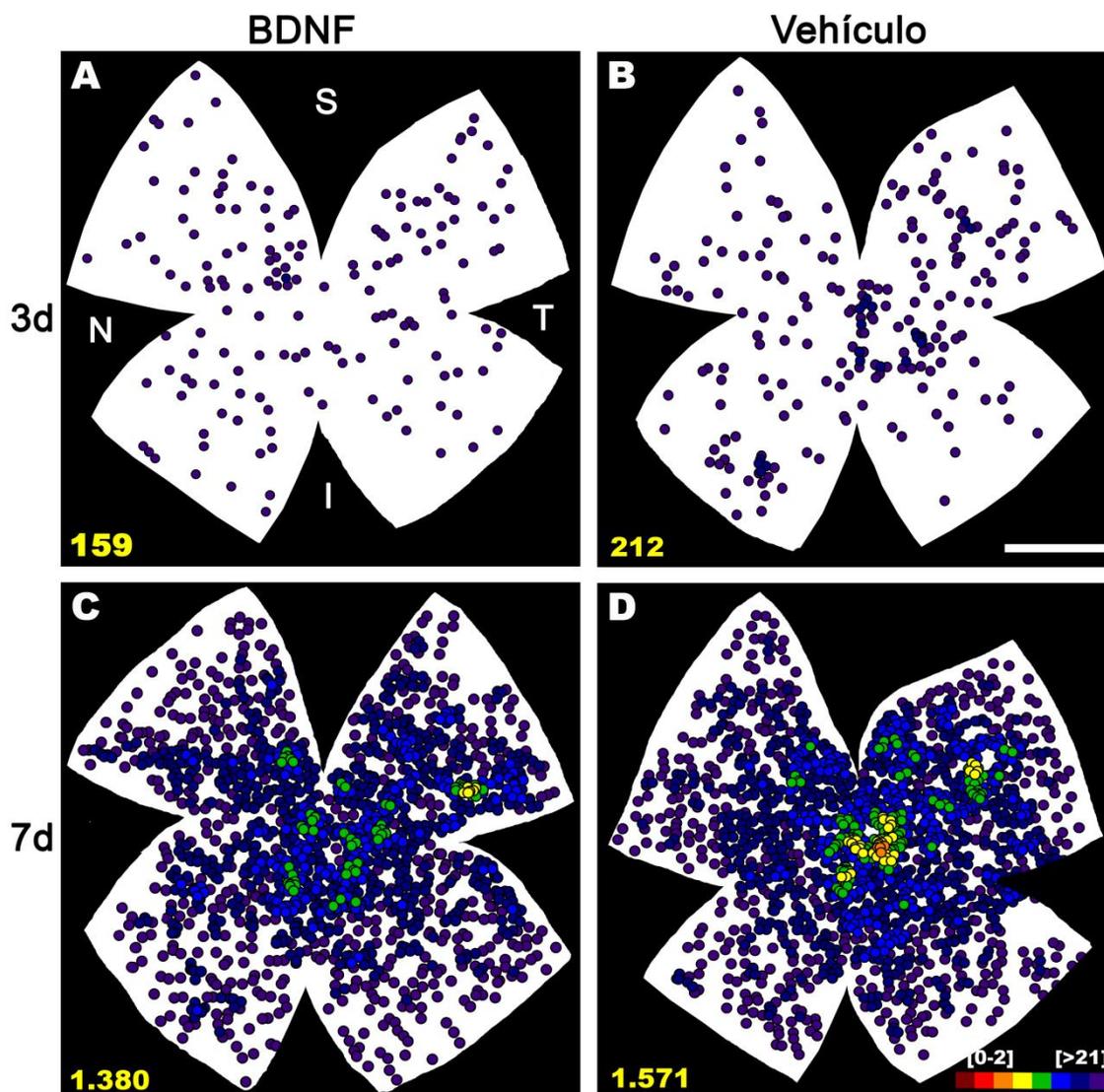


Figura 4.35. Distribución de la microglía fagocítica en ratones Swiss a tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

Estos mapas de vecinos muestran que el número de las células de microglía aumenta al aumentar el tiempo tras la lesión y este aumento es menor en las retinas tratadas con BDNF (A, C) que en las tratadas con vehículo (B, D). Siete días después de la SNO, la densidad de estas células es mayor en el centro de la retina y disminuye hacia la periferia. En la parte inferior izquierda de cada retina se muestra el número de células de microglía contadas en de cada retina. La escala de color está en la parte inferior derecha de D. Abreviaturas: d= días. S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

4.2.4. EFECTO DE LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO EN EL OJO CONTRALATERAL A LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

Durante el estudio de la degeneración de las CGR tras la SNO, observamos que en las retinas contralaterales a la SNO aparecían células de microglía fagocítica marcadas con OHSt. Por ello, analizamos si la SNO producía alguna alteración en la población de CGR o en la población de células de microglía fagocítica en las retinas derechas contralaterales a la lesión, y utilizamos siempre como grupo control aquel que no había sufrido ninguna manipulación previa.

4.2.4.1. Población de células ganglionares de la retina en el ojo contralateral a la sección del nervio óptico

En primer lugar, estudiamos el número de CGR en las retinas derechas contralaterales a la SNO de los grupos de ratones C57BL/6 a los que se realizó la SNO. Los resultados se muestran en la tabla 4.9. En comparación con las retinas control, el número total de CGR en las retinas contralaterales tiende a disminuir conforme aumenta el tiempo tras la SNO. De 2 a 14 días tras la SNO, esta disminución no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, 21 días después de la SNO, observamos que el número de CGR-OHSt⁺ y Brn3a⁺ era significativamente menor (figura 4.36). Para confirmar que esta disminución de CGR no se debía a un efecto del marcaje con OHSt, sino que fuera una consecuencia de la SNO en el ojo experimental izquierdo, se compararon los resultados con el grupo de retinas control procesadas 30 días después del marcaje con OHSt en el CS. Como vimos en la tabla 4.2, el número de CGR en este grupo es similar a las retinas procesadas 7 y 10 días después del marcaje. Esto significa que el marcaje con OHSt no produce una disminución de CGR, por lo que concluimos que la SNO producía una muerte de CGR en el ojo contralateral a la SNO, que era significativa 21 días después de la misma.

Retina	Días tras la sección del nervio óptico								
	2 días			5 días			7 días		
	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área
1	43.494	37.662	13,3	37.174	33.916	14,5	39.478	38.029	14,5
2	40.860	35.560	13,8	35.439	32.236	13,6	40.305	33.682	14,3
3	37.447	39.497	14,9	35.159	29.441	13,6	38.172	26.219	13,2
4	38.596	39.420	13,9	53.253	31.794	14,1	37.881	33.591	13,5
5	39.139	34.722	13,8	49.756	33.760	13,8	44.394	34.418	13,8
6	45.649	35.980	15,0	35.421	36.932	13,5	34.656	36.903	13,1
7	48.986	39.901	13,7	39.152	27.657	12,8	35.450	37.470	13,9
8	---	---	---	---	---	---	37.798	22.515	12,3

Media	42.024	37.535	14,0	40.765	32.248	13,7	38.517	32.853	13,4
DEM	4.206	2.131	0,6	7.535	3.060	0,5	3.024	5.594	0,6

d (cel/mm²)	2.997	2.675	---	2.974	2.353	---	2.841	2.411	---
DEM	347	191	---	521	199	---	219	343	---

Retina	Días tras la sección del nervio óptico								
	9 días			14 días			21 días		
	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt ^a	Brn3a ^a	Área
1	45.330	35.044	15,5	37.345	33.930	13,8	29.988	27.758	12,9
2	34.561	27.810	14,1	34.591	28.591	13,8	32.383	30.059	13,9
3	33.836	28.645	14,0	42.437	32.358	14,2	37.364	28.884	14,6
4	35.955	31.644	13,1	37.016	25.205	12,2	28.458	20.633	13,7
5	37.126	34.725	15,0	39.676	34.006	13,8	34.770	24.826	14,0
6	35.624	31.779	13,3	40.569	35.720	13,8	39.731	29.907	14,1
7	---	---	---	39.886	36.462	13,6	24.478	28.127	12,3
8	---	---	---	32.356	25.861	12,3	30.807	24.372	12,8

Media	37.072	31.608	13,9	37.985	31.517	13,4	32.247	26.821	13,6
SD	4.203	2.992	1,2	3.328	4.395	0,8	4.935	3.276	0,8

d (cel/mm²)	2.615	2.233	---	2.827	2.339	---	2.374	1.985	---
SD	201	183	---	189	243	---	263	253	---

Tabla 4.9. Número de CGR en las retinas de ratones C57BL/6 contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.

Número total de CGR cuantificadas en cada una de las retinas analizadas a los distintos tiempos, así como el área de cada retina. Debajo de cada tabla se ha calculado el número medio de CGR y la densidad media (d) de CGR en cada tiempo postlesion y sus correspondientes desviaciones estandar de la media (DEM). ^a= estadísticamente significativo comparado con las retinas control y con todos los tiempos experimentales anteriores (Test de Mann Whitney p<0,05). Abreviaturas: d= densidad, DEM= desviación estándar de la media.

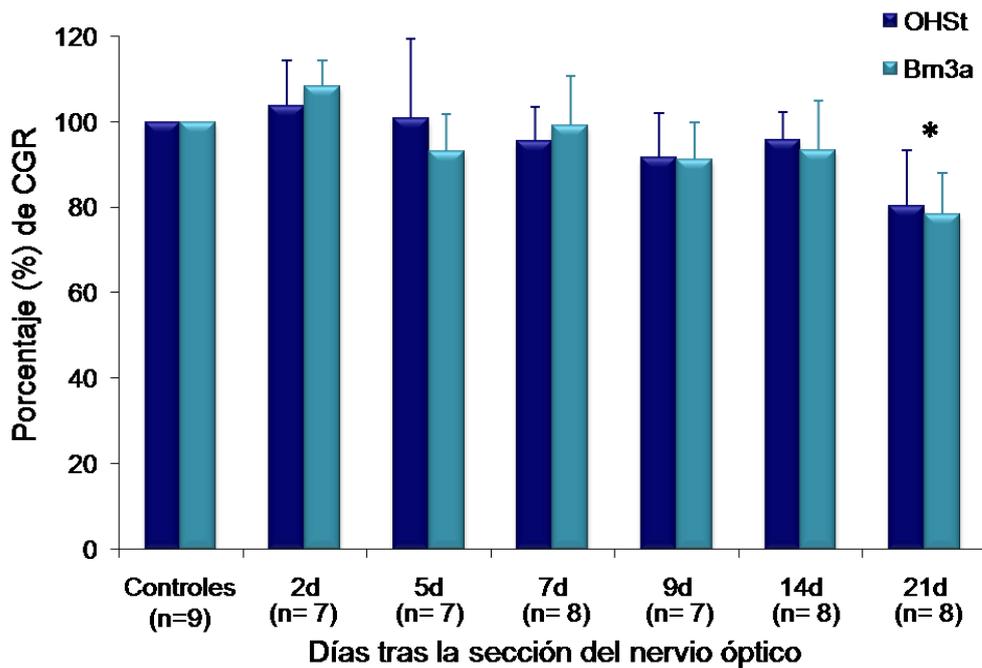


Figura 4.36. Porcentaje de CGR en retinas de ratones C57BL/6 contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico.

Porcentaje de CGR-OHSt⁺ y CGR-Bm3a⁺ en las retinas derechas contralaterales a la SNO con respecto a las retinas control, que se han considerado el 100% de la población. *= diferencia estadísticamente significativa en comparación con las retinas control y con los tiempos experimentales anteriores (Test de Mann Whitney $p < 0,05$).

La población de las CGR en los ojos contralaterales a la lesión también se cuantificó en los grupos tratados con BDNF o vehículo. En este estudio, el tiempo más largo que se analizó tras la SNO fue de 14 días en ratón pigmentado y 7 en albino, por lo que, en concordancia con los datos anteriores, no se encontró disminución de la población de CGR (tablas 4.10 y 4.11)

Tratamiento	Días tras la sección del nervio óptico											
	3 días						5 días					
	BDNF			Vehículo			BDNF			Vehículo		
Retina	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área
1	43.713	32.229	13,7	40.332	33.853	13,9	39.110	30.884	14,1	44.857	35.567	14,2
2	44.907	28.443	14,4	39.286	34.368	13,8	42.539	33.861	15,0	39.756	32.268	13,8
3	39.568	32.325	14,3	42.255	32.379	13,7	39.975	33.912	14,4	39.451	32.517	13,6
4	41.005	33.589	15,3	44.302	30.730	14,5	41.894	31.375	14,8	40.359	31.766	15,1
5	42.587	31.555	15,0	42.158	33.475	15,5	44.808	33.476	13,4	40.877	31.291	13,9
6	40.058	30.257	14,5	43.114	32.151	15,0	38.973	34.934	13,9	39.448	29.424	14,3
7	39.154	32.154	15,6	39.987	34.212	15,1	41.040	32.586	13,6	---	---	---
8	---	---	---	41.158	31.200	14,5	---	---	---	---	---	---

Media	41.570	31.507	14,7	41.574	32796	14,5	41.191	33.004	14,2	40.791	32.139	14,1
SD	2.207	1.678	0,6	1694	1387	0,7	2.087	1.462	0,6	2.070	2.007	0,5

d(cel/mm²)	2.844	2.152	---	2.869	2.195	---	2.914	2.335	---	2.889	2.277	---
DEM	238	130	---	146	263	---	209	152	---	167	172	---

Tratamiento	Días tras la sección del nervio óptico											
	7 días						14 días					
	BDNF			Vehículo			BDNF			Vehículo		
Retina	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área
1	42.120	32.563	14,1	44.810	30.009	15,4	40.618	28.976	13,6	36.313	34.158	15,3
2	44.290	36.745	14,4	40.892	35.105	13,6	39.689	33.049	15,6	39.657	31.882	15,8
3	43.459	32.232	12,8	43.699	34.816	13,0	38.565	32.183	13,4	35.526	29.359	14,4
4	40.455	35.367	14,3	38.491	29.045	14,2	37.781	35.250	14,5	38.713	30.336	14,8
5	39.174	30.823	13,9	36.321	29.319	14,3	39.476	34.819	14,9	36.545	28.413	14,3
6	38.718	29.824	14,4	40.718	30.398	14,7	37.895	29.135	14,4	37.056	28.956	14,5
7	38.332	29.505	14,6	44.804	28.265	15,3	35.968	29.788	13,9	38.444	39.757	14,6
8	---	---	---	---	---	---	36.271	28.719	12,8	39.875	30.145	15,4

Media	40.076	32.076	14,0	41.391	30.994	14,4	38.283	31.490	14,1	37.766	31.626	14,9
SD	2.790	2.680	0,6	3.253	2.795	0,9	1.636	2.688	0,9	1.626	3.761	0,6

d(cel/mm²)	2.879	2.302	---	2.889	2.174	---	2.717	2.230	---	2.540	2.127	---
DEM	251	201	---	265	322	---	160	149	---	89	256	---

Tabla 4.10. Número de CGR en las retinas de ratones C57BL/6 contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y tratadas con BDNF o vehículo.

Número total de CGR cuantificadas en cada una de las retinas analizadas a los distintos tiempos y tratamientos, así como el área de cada retina. Debajo de cada tabla se ha calculado el número medio de CGR y la densidad media (d) de CGR en cada tiempo postlesion y sus correspondientes desviaciones estándar de la media (DEM). No se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos experimentales, en comparación con las retinas control. Abreviaturas: d= densidad, DEM= desviación estándar de la media.

Tratamiento	Días tras la sección del nervio óptico											
	3 días						7 días					
	BDNF			Vehículo			BDNF			Vehículo		
Retina	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área	OHSt	Brn3a	Área
1	48.035	48.439	11,3	50.962	48.756	12,9	48.080	43.920	14,3	49.880	43.096	12,8
2	54.966	45.346	17,1	46.573	47.117	11,8	52.140	42.208	12,8	49.101	41.874	13,4
3	47.307	45.627	15,2	52.270	47.001	12,1	49.348	42.470	14,4	45.471	43.805	12,4
4	45.490	44.675	16,1	52.314	42.734	11,7	47.879	42.920	14,4	48.078	41.839	13,8
5	53.973	43.728	14,5	51.766	52.532	12,4	44.989	46.690	13,0	45.227	45.317	12,9
6	46.111	45.348	15,9	53.814	43.978	14,7	49.405	44.378	13,2	49.871	45.323	13,2
7	46.184	43.502	15,4	---	---	---	---	---	---	49.605	47.750	14,0
8	53.009	46.029	14,7	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Media	49.877	45.186	14,9	50.777	47.628	12,2	48.487	43.642	13,8	48.330	44.173	13,2
DEM	3954	1509	1,6	2412	3532	0,5	2.591	1.825	0,8	1.928	1.982	0,5
d (cel/mm²)	3.363	3.056	---	4.168	3.905	---	3.524	3.173	---	3.678	3.369	---
DEM	470	481	---	232	222	---	303	266	---	348	375	---

Tabla 4.11. Número de CGR en las retinas de ratones Swiss contralaterales a la lesión a los diferentes tiempos tras la sección del nervio óptico y tratadas con BDNF o vehículo.

Número total de CGR cuantificadas en cada una de las retinas analizadas a los distintos tiempos y tratamientos, así como el área de cada retina. Debajo de cada tabla se ha calculado el número medio de CGR y la densidad media (d) de CGR en cada tiempo postlesion y sus correspondientes desviaciones estandar de la media (DEM). No se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos experimentales, en comparación con las retinas control. Abreviaturas: d= densidad, DEM= desviación estándar de la media.

4.2.4.2. Población de microglía fagocítica en el ojo contralateral a la lesión

A continuación, cuantificamos el número de células de microglía fagocítica en las retinas derechas contralaterales a la SNO en los ratones C57BL/6 y Swiss. Para comprobar si el aumento de células de microglía fagocítica en las retinas contralaterales era consecuencia de la SNO en el ojo izquierdo, o se debía al marcaje con OHSt desde los CS, usamos como controles las retinas de animales que habían sido trazadas con OHSt aplicado en los CS 7 días, 10 días y 30 días (cepa pigmentada) y 10 días (cepa albina) antes de la eutanasia (ver tabla 4.2), ya que estos tiempos de trazado se equiparan con los tiempos de trazado en las retinas contralaterales a la lesión (7 días de trazado más el tiempo post-SNO y tratamiento) En la tabla 4.12 se muestra que, en ambas cepas de ratón, en las retinas contralaterales a la lesión el número de células de microglía fagocítica comienza a ser significativamente mayor a 3 días después de la SNO, en comparación con las retinas control (ver tabla 4.12 y tabla 4.2).

Este efecto no se vio atenuado con el tratamiento de BDNF y se mantuvo constante en todos los tiempos experimentales (figura 4.37A, pigmentado; 4.37B, albino). A los 7 días después de la SNO, se puede apreciar un pico máximo de células de microglía fagocítica en el ojo contralateral, aunque no es estadísticamente significativo con respecto a los demás grupos experimentales (figura 4.37A, pigmentado; 4.37B, albino). Con estos resultados concluimos con que el aumento de células de microglía fagocítica en el ojo contralateral a la SNO, no se debe al marcaje con OHSt, sino a un efecto de la retina por el daño producido en el ojo contrario.

A	Días tras la sección del nervio óptico								
	Tratamiento	BDNF				Vehículo			
		Retina	3 días ^a	5 días ^a	7 días ^a	14 días ^a	3 días ^a	5 días ^a	7 días ^a
1	201	252	565	422	292	150	453	164	
2	313	183	378	310	260	273	266	201	
3	122	149	279	234	200	396	554	259	
4	---	258	254	157	182	171	220	248	
5	---	---	---	---	---	---	---	---	
Media	212	211	369	281	234	248	373	218	
DEM	96	53	141	113	51	113	157	44	

B	Días tras la sección del nervio óptico				
	Tratamiento	BDNF		Vehículo	
		Retina	3 días ^a	7 días ^a	3 días ^a
1	254	464	82	175	
2	160	197	181	141	
3	149	261	216	169	
4	100	159	147	358	
5	---	---	---	---	
Media	166	270	157	211	
DEM	64	136	57	99	

Tabla 4.12. Número total de células de microglía fagocítica OHSt e Iba1 positivas en retinas de ratones C57BL/6 y Swiss contralaterales a la lesión a los distintos tiempos tras la sección del nervio óptico y tratamiento con BDNF o vehículo.

^a= estadísticamente significativo comparado con las retinas control y con todos los tiempos experimentales anteriores (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos experimentales ni entre los grupos tratados con BDNF o vehículo. Abreviaturas: DEM= desviación estándar de la media.

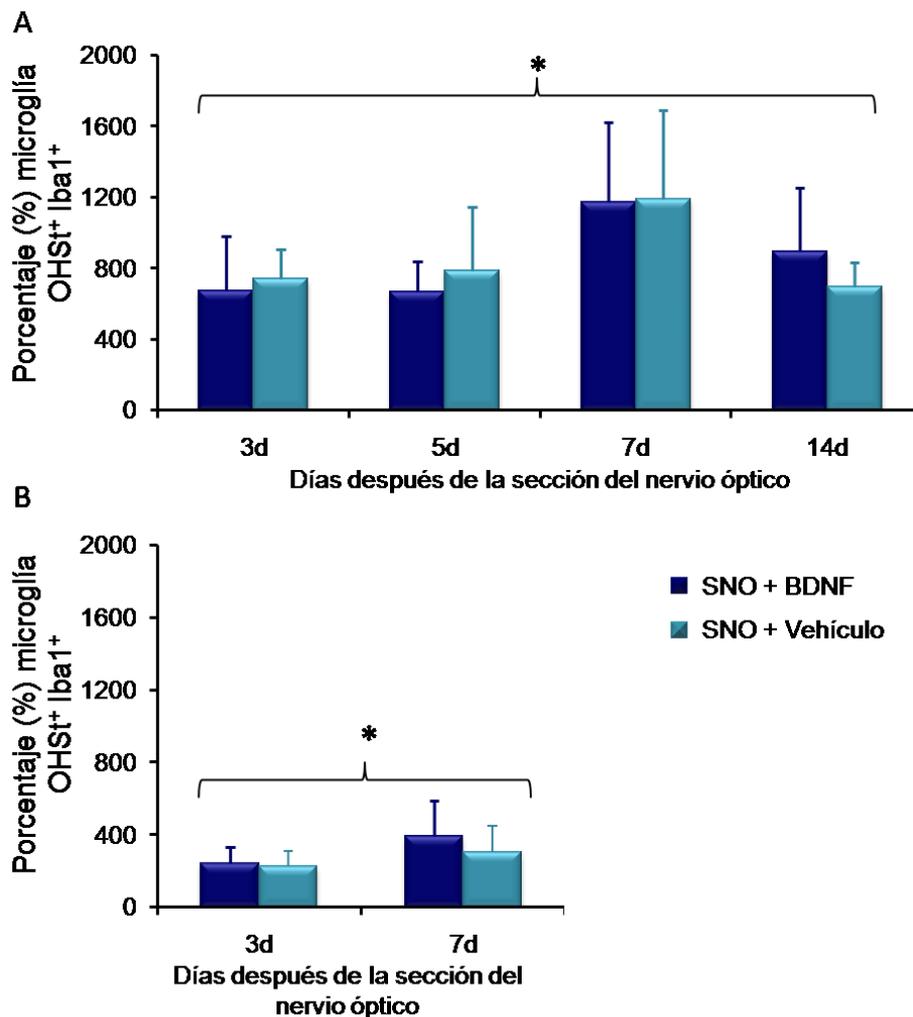


Figura 4.37. Porcentaje de células de microglía fagocítica OHSt e Iba1 positivas en retinas de ratones C57BL/6 y Swiss contralaterales a la lesión a los distintos tiempos tras la sección del nervio óptico y tratamiento con BDNF o vehículo.

Porcentaje de células de microglía fagocítica OHSt⁺ e Iba1⁺ en las retinas contralaterales a la lesión, en ratones C57BL/6 (A) y Swiss (B), con respecto a las retinas control, que se han considerado el 100%. *= diferencia estadísticamente significativa en comparación con las retinas control (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). En todos los grupos experimentales, el porcentaje es estadísticamente mayor en comparación con las retinas control (Test de Mann Whitney $p < 0,05$). Entre los grupos tratados con BDNF o vehículo no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

La distribución de las células de microglía fagocítica en las retinas contralaterales se muestra en las figuras 4.38 y 4.39, correspondientes a los ratones C57BL/6 y Swiss, respectivamente. Como se puede observar que se encuentran distribuidas por toda la retina y que son más abundantes que en las retinas control (figura 4.29). Finalmente, tanto su número como su distribución se mantiene constante en todos los tiempos después de la SNO y con ambos tratamientos.

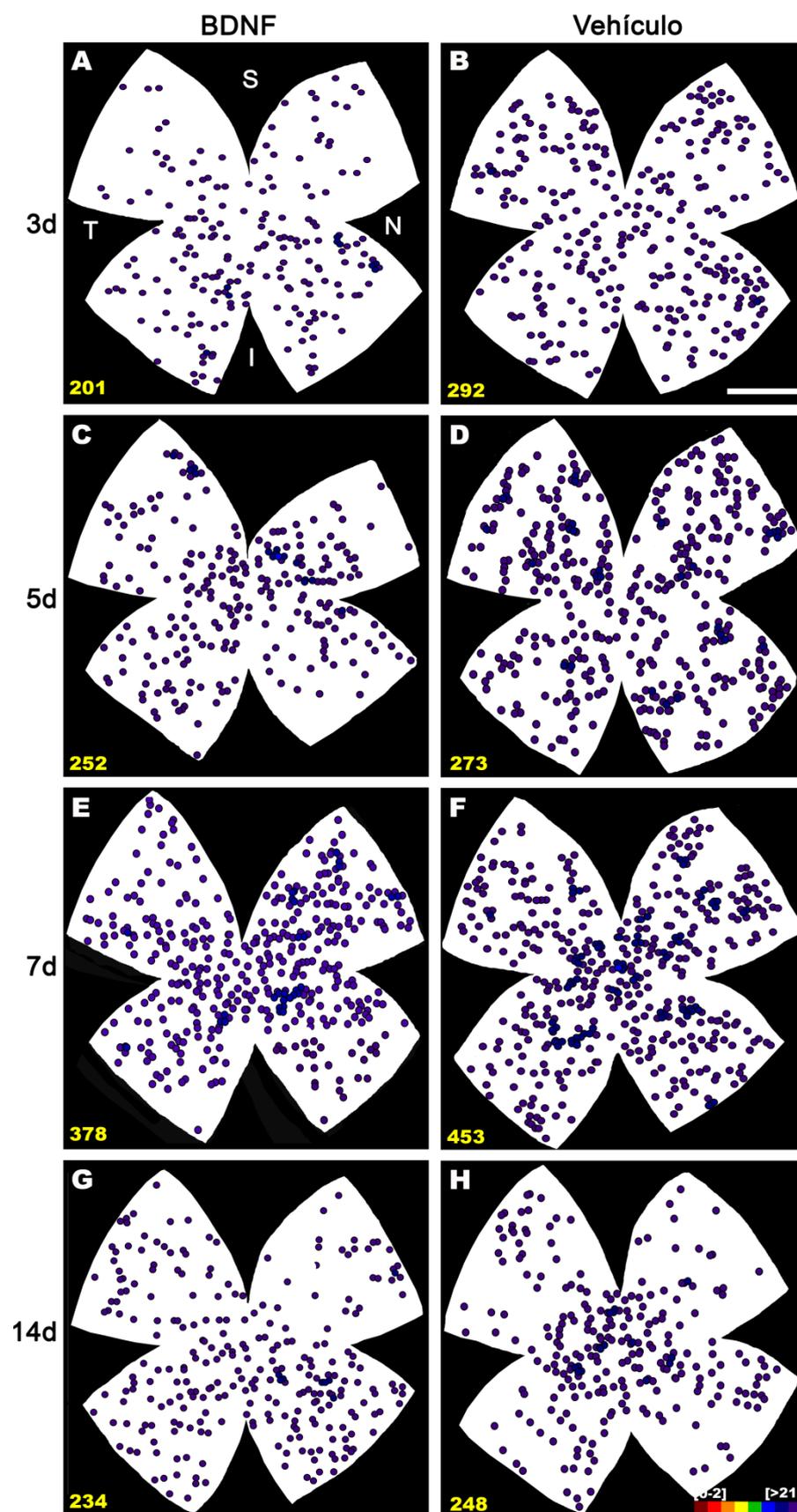


Figura 4.38. Distribución de la microglía fagocítica en las retinas de ratones C57BL/6 contralaterales a la lesión a tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

En estos mapas de vecinos se muestra la distribución de la microglía fagocítica que aparece en la retina contralateral a la lesión a 3, 5, 7 y 14 días tras SNO y la administración de BDNF (A,C,E,G) o vehículo (B,D,F,H). A los 3 días tras la lesión aparecen estas células que se distribuyen por toda la retina y su número y distribución se mantiene hasta 14 días después de la SNO. No se encontraron diferencias entre las retinas tratadas con BDNF (columna izquierda) y las tratadas con vehículo (columna derecha). En la parte inferior de cada retina se muestra el número de células de microglía contadas en cada retina. La escala de color está en la parte inferior derecha de D. Abreviaturas: d= días. S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

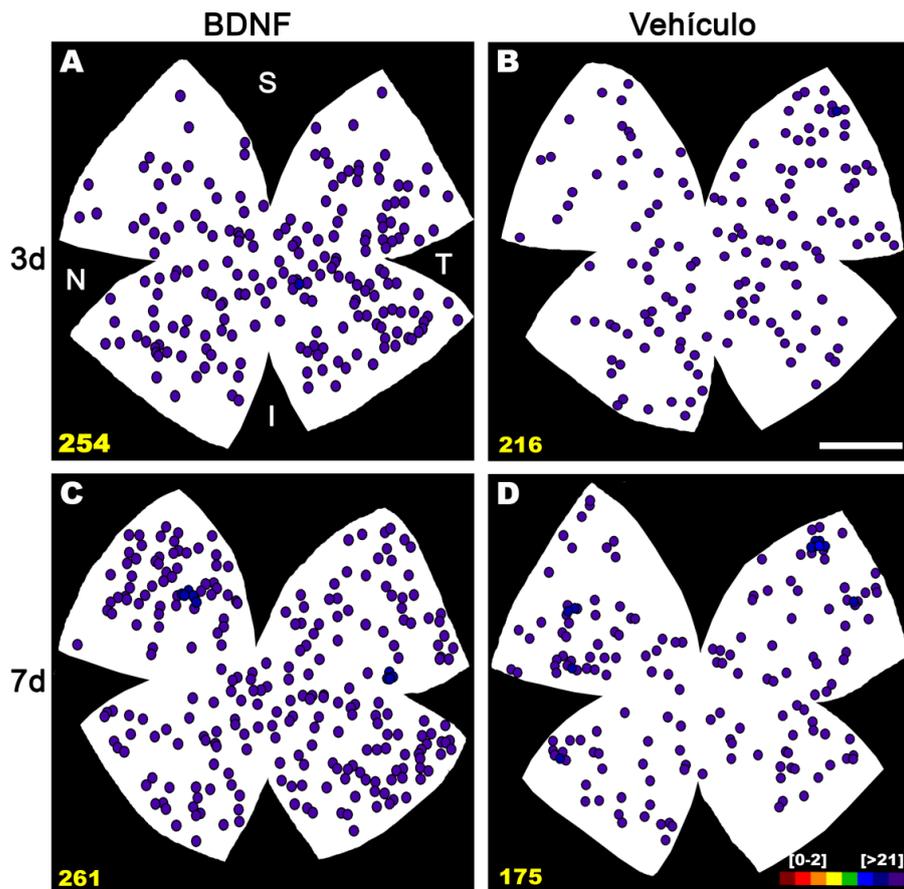


Figura 4.39. Distribución de la microglía fagocítica en las retinas de ratones Swiss contralaterales a la lesión a tiempos crecientes tras la sección del nervio óptico y el tratamiento con BDNF o vehículo.

En estos mapas de vecinos se muestra la distribución de la microglía fagocítica que aparece en la retina contralateral a la lesión a 3 y 7 días tras SNO y la administración de BDNF (A,C columna izquierda) o vehículo (B,D columna derecha). A los 3 días tras la lesión aparecen estas células que se distribuyen por toda la retina y su número y distribución se mantiene hasta 7 días después de la SNO. No se encontraron diferencias entre las retinas tratadas con BDNF (columna izquierda) y las tratadas con vehículo (columna derecha). En la parte inferior izquierda de cada retina se muestra el número de células de microglía contadas en de cada retina. La escala de color está en la parte inferior derecha de D. Abreviaturas: d= días. S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA MELANOPSÍNICAS EN LA RETINA DE RATA ADULTA

En este trabajo hemos desarrollado un método fiable, objetivo y preciso para cuantificar de manera automática la población celular de células ganglionares melanopsínicas de la retina (CGRm) en la rata albina adulta SD. Además hemos caracterizado esta población: hemos descrito sus proyecciones axonales y su distribución en montajes globales de la retina, mediante mapas de vecinos realizados a partir del algoritmo K-Vecinos.

Las CGRm son una subpoblación de CGR descubierta recientemente que, gracias a que contienen un pigmento llamado melanopsina, son intrínsecamente fotosensibles (Hattar y cols., 2002; Provencio y cols., 2000). Hasta hace pocos años se pensaba que, en mamíferos, las únicas células sensibles a la luz eran los fotorreceptores (FR) clásicos, los conos y bastones (Graham, 2008). Los FR reciben la luz procedente del exterior y la transforman en impulsos eléctricos; que se transmiten por el circuito retiniano hasta llegar a las células ganglionares de retina (CGR) y éstas a su vez, envían la información luminosa al cerebro, que es donde se forma la imagen. Sin embargo, además de la función visual, existen otras funciones fisiológicas que están reguladas por la luz, cuyo mecanismo vamos conociendo poco a poco. En animales invertebrados o vertebrados no mamíferos, existen verdaderos órganos fotosensibles cuyas funciones no son visuales, sino “extravisuales”. Estos órganos fotosensibles hacen que estos animales se adapten a los ciclos de luz y oscuridad (ritmos circadianos), además de regular la temperatura corporal, el color de la piel, etc. Durante la evolución, los animales se han ido adaptando a sus necesidades. Era lógico pensar que los mamíferos hubieran suprimido el resto de órganos fotosensibles y que, mediante sus FR oculares, conos y bastones, pudiesen regular tanto la función visual como la no visual. Sin embargo, la intensidad e irradiancia necesaria para ambas funciones es diferente: mientras los conos y los bastones requieren una gran sensibilidad, para discernir así detalles en profundidad, la regulación de los ritmos circadianos no requiere tanta sensibilidad. Desde que hace una década se descubriese la existencia de otras células fotosensibles en mamíferos, las CGRm, el estudio de la regulación de los ritmos circadianos, el control del tamaño pupilar y otras variables fisiológicas, regulado mediante estas células fotosensibles, ha permitido entender aspectos que hasta ahora eran desconocidos, como la alteración de los ritmos circadianos en un modelo de glaucoma (Drouyer y cols., 2008).

En la rata albina SD, el número medio de CGRm por retina es de 2.046 ± 309 células. Comparando estos resultados con la población total de CGR inmunodetectadas con Brn3a, que es de 78.423 ± 2.957 , la población de CGRm supone el 2,6% de las CGR, un resultado similar a otros estudios realizados en ratón (Hattar y cols., 2002). Para llevar a cabo esta cuantificación, se utilizó el grupo experimental cuyas CGR estaban marcadas con Brn3a, ya que era el único grupo que no había

sufrido previamente ninguna manipulación. Esto es importante ya que hemos observado que la expresión de melanopsina disminuye en las retinas que han sido marcadas con FG (datos no mostrados) y, por lo tanto, estos animales no pudieron utilizarse para cuantificar el número total de CGRm.

Las CGR constituyen la única población retinofugal de la retina, es decir, son las únicas neuronas que proyectan sus axones fuera de la retina. El conjunto de axones de las CGR al salir del ojo forma el NO. Por lo tanto, si las neuronas retinianas que expresan melanopsina fueran verdaderas CGR, sus axones deberían formar parte del NO. Para estudiar esto, en un grupo de animales se trazaron las CGR aplicando el trazador neuronal FG en el MNO. Aplicado en el MNO, el FG es captado por los axones que forman el NO y transportado retrógrada y activamente hasta en el soma de todas las neuronas que proyecten fuera del ojo. En otras palabras, aplicando el FG en el MNO se marca la población completa de CGR. En las retinas de este grupo experimental se cuantificó el número de CGRm que, a su vez, se marcaron con FG y se documentó que el 99,06% de las CGRm eran CGR-FG⁺. Estos datos confirman las CGRm proyectan sus axones en el NO.

Estudios previos realizados en *Xenopus Laevis* habían documentado que las CGRm son CGR por su localización, ya que se encuentran en la CCG, porque sus axones convergen hacia el NO (Provencio y cols., 2000) y además, que estas células proyectaban en su mayor parte al NSQ (Gooley y cols., 2001; Hattar y cols., 2002). Sin embargo, éste es el primer estudio que demuestra que las CGRm se puede marcar con FG desde el MNO.

En la rata, la vasta mayoría de las CGR proyectan al CS contralateral (96,5%, Salinas-Navarro y cols., 2009b). Sin embargo, se ha descrito que las CGRm proyectan sobre todo al NSQ (Gooley y cols., 2001), centro responsable de la sincronización circadiana, al núcleo intergeniculado, y al núcleo de la oliva pretectal, entre otros (Hattar y cols., 2002). Si bien se ha documentado que las CGRm en roedores proyectan principalmente al NSQ, estudios previos realizados en ratón muestran que una minoría de las CGRm proyectan a los CS (Hattar y cols., 2006; Brown y cols., 2010; Ecker y cols., 2010). Para conocer qué porcentaje de la población de CGRm de la rata adulta proyecta a los CS, en un grupo de animales de este estudio se aplicó FG en los CS y se contaron el número de CGRm trazadas con FG. Observamos que el 90,36% de las CGRm se encontraba marcada con FG, lo que nos indica que una gran parte de las CGRm proyectan al CS. Como se ha dicho anteriormente, en las retinas de los animales en los que se aplicó FG en el CS observamos que existía una disminución en la expresión de la melanopsina. Por ello, es posible que el alto porcentaje de co-localización que observamos en este estudio se deba a que únicamente podemos estudiar aquellas CGRm que siguen expresando melanopsina tras el marcaje, puesto que no fue posible cuantificar en la población total de CGRm.

¿Qué función desempeñan las CGRm que proyectan a los CS?. Los resultados presentados en este estudio no son suficientes para responder a esta cuestión, pero es posible que las CGRm que proyectan a los CS jueguen un papel importante en la percepción luminosa, ya que recientes estudios

muestran que, en neonatos, la implicación de las CGRm en la percepción luminosa es mayor que en adultos y que esta respuesta envuelve, al menos, a la corteza visual (Semo y cols., 2010; Brown y cols., 2012), además de que la coliculectomía en ratas neonatas previene la fototaxia negativa, observada en neonatos (Routtenberg y cols., 1978).

Finalmente, cuantificamos cuántas CGRm expresan Brn3a. El Brn3a es un factor de transcripción, de la familia de Brn3, que se expresa en retina en un 91,6% de las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2009). Tras la cuantificación, se observó que las CGRm no expresan Brn3a, en concordancia con el trabajo de Nadal-Nicolás y cols. (2012).

Estudios previos realizados en ratón han documentado que las CGRm también se inmunodetectan con un anticuerpo que detecta los tres miembros de la familia Brn3 (Brn3a, b y c), y el número de CGRm que expresan Brn3 aumenta cuando los ratones tienen degeneración de FR (Dhingra y cols., 2011), sugiriendo que el hecho de que en los ratones sin ningún tipo de degeneración haya una menor expresión de Brn3 en las CGRm puede deberse a que los FR clásicos inhiben la expresión de alguno de los factores de transcripción Brn3. Se ha documentado que, en rata y ratón adultos, las CGRm no expresan Brn3c (Jain y cols., 2012; Nadal-Nicolás y cols., 2012) y un 10-13% y 63% de ellas expresan Brn3b, en rata y ratón, respectivamente (Chen y cols., 2011; Schmidt y cols., 2011; Jain y cols., 2012; Nadal-Nicolás y cols.; 2012).

En cuanto a la localización de las CGRm en la retina, ésta fue estudiada mediante mapas de vecindad a partir de los datos cuantitativos obtenidos del contaje automático de las retinas. Estudios previos realizados en ratón habían realizado una representación manual de la distribución de las CGRm (Hattar y cols., 2002; Hattar y cols., 2006) y habían observado un mayor número de CGRm en la periferia de la retina y, más concretamente en la región supero-temporal. Con el programa de contaje automático desarrollado para este estudio, se obtuvo una representación de cada CGRm de la retina, con un color diferente en función del número de vecinos que tuviera en un radio de 0,22 mm. En la escala de colores utilizada en este estudio, los colores más fríos (azul-lila) se corresponden con las células con menor número de vecinos, y los colores más cálidos (rojo-granate) con un mayor número de vecinos.

La distribución de CGRm obtenida en este estudio es similar a la observada en estudios previos realizados en retinas de ratón (Hattar y cols., 2002; Hattar y cols., 2006). Así, la densidad de CGRm aumentaba conforme nos alejamos desde el centro a la periferia, y el mayor número de CGRm se localiza en la región supero-temporal de la retina. En este trabajo hemos comparado por primera vez la distribución de las CGRm con la distribución de la población total de CGR-Brn3a⁺. Nuestros datos muestran que la distribución de ambas poblaciones de CGR es complementaria. Esta complementariedad topográfica puede ser explicada por el papel funcional de cada población. Mientras que las CGR se concentran en la estría visual, proporcionando así una mejor visión en el horizonte del campo visual, las CGRm son sensibles a la luz para sincronizar los ritmos circadianos y controlar el reflejo pupilar.

5.2. CARACTERIZACIÓN DEL BRN3A COMO MARCADOR DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN RATÓN ADULTO

La identificación y cuantificación de las CGR es esencial para conocer la respuesta de éstas a la SNO y para valorar con rigor la efectividad de las terapias neuroprotectoras sobre ellas.

Durante los últimos años se han descrito numerosas técnicas de identificación de las CGR. Uno de los métodos de marcaje de estas células más utilizado en roedores es la aplicación del trazador neuronal retrógrado FG, o su análogo OHSt, en la superficie de ambos CS (Mansour-Robaey y cols., 1994; Sellés-Navarro y cols., 1996; Vidal-Sanz y cols., 2001b; Lafuente y cols., 2002), principal territorio de proyección de las CGR (Perry, 1981). Con este método se identifican la práctica totalidad de las CGR tanto de rata (FG) como de ratón (OHSt) (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b). Recientemente, se han desarrollado metodologías de cuantificación automatizada que permiten contar automáticamente las CGR trazadas en rata y ratón y representar gráficamente su distribución espacial (Danias y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b).

La cuantificación automática de las CGR no puede utilizarse para contar el número de células trazadas que sobreviven tras la SNO si el trazador se aplica antes de realizar la misma, porque a partir de los 3 días después de la SNO parte de la población de CGR trazadas degenera y muere, y las células de microglía fagocitan las células muertas, por lo que el trazador de éstas se acumula en sus fagolisosomas, apareciendo las células de microglía marcadas con el trazador por vía transcelular. Si bien las células de microglía se distinguen de las CGR por características morfológicas, la rutina automática de contaje celular no es capaz de discriminar entre ambas poblaciones.

Debido al marcaje transcelular de las células de microglía de la retina tras la SNO, en este estudio hemos desarrollado un método de contaje semiautomático de las CGR-OHSt⁺ que nos permite realizar una estimación de su número total, teniendo en cuenta el área total de cada una de las retinas y el área de cada una de las regiones de la retina (central, media o periférica). Este método o aplicación informática obtiene automáticamente 12 microfotografías de la retina en las que realizamos un contaje manual de las CGR trazadas. Una vez realizada la cuantificación manual de estos 12 campos microscópicos, se pueden inferir con precisión las densidades celulares (nº de CGR/mm²) en diferentes zonas de la retina y el número total de CGR trazadas presentes en la retina.

Desde hace varias décadas existe un gran interés en la búsqueda de anticuerpos que permitan el marcaje selectivo de CGR para evitar la manipulación quirúrgica que supone el marcaje con trazadores neuronales y también el marcaje transcelular de la microglía. Sin embargo, para que una proteína pueda ser utilizada como marcador, debe expresarse específicamente por la mayoría de las CGR (Perry y cols., 1984; Dabin y Barnstable, 1995) y la pérdida de dicha proteína después de una lesión debe correlacionarse con la muerte de CGR, es decir, el nivel de expresión del marcador

debe mantenerse en las CGR dañadas que sobreviven después de la lesión o después de la lesión y su correspondiente tratamiento neuroprotector.

Se han utilizado para la detección de las CGR anticuerpos contra Thy-1, proteína que se expresa selectivamente en las CGR (Chidlow y cols., 2005; Huang y cols., 2006). El marcaje de las CGR con este anticuerpo no se puede considerar un buen método porque la expresión de esta proteína desciende rápidamente en las CGR lesionadas, sin que este descenso coincida con la muerte de las mismas, por lo que no es un buen marcador para determinar la supervivencia (Schlamp y cols., 2001). Por otra parte, tras la SNO, el Thy-1 comienza a expresarse en las células de Müller de la retina, por lo que deja de ser un marcador específico de CGR (Dabin y cols., 1995).

Otra técnica desarrollada para marcar específicamente CGR es la detección del ARNm de la sinucleína en las CGR (Soto y cols., 2008). La sinucleína es una proteína que se expresa sólo en las CGR, sin embargo no se puede detectar con anticuerpos (inmunodetección) porque esta proteína se expresa, además de en el cuerpo neuronal, en los axones y dendritas de las CGR y esto dificulta la cuantificación automática.

Recientemente se ha comenzado a utilizar los factores de transcripción Brn3 para inmunodetectar las CGR, ya que estos factores se expresan en la retina únicamente en las CGR. Dentro de esta familia de factores de transcripción, se encuentran el Brn3a, Brn3b y Brn3c. Nadal-Nicolás y cols. (2009), han demostrado que el factor de transcripción Brn3a se expresa en la mayoría de las CGR de rata adulta, tanto en retinas control como después de la lesión en el NO, ya sea por sección o por aplastamiento. Un 92,2% de las CGR identificadas con el trazador neuronal FG aplicado en los CS expresan Brn3a. El 7,8% restante corresponde a la mitad de las CGR que proyectan ipsilateralmente y a las CGRm (Nadal-Nicolás y cols., 2012). Finalmente, Sanchez-Migallón y cols. (2011) demostraron que la expresión del Brn3a se mantiene en las CGR que aun estando lesionadas, se mantienen vivas tras un tratamiento neuroprotector. Por todo ello, el Brn3a ha sido descrito como un buen marcador de CGR en rata.

En ratón, se había descrito que el Brn3a se expresaba en la retina únicamente en las CGR (Quina y cols., 2005) aunque, hasta el presente estudio, no había sido utilizado como marcador para estas células. El Brn3b ha sido utilizado como marcador de las CGR en algunos estudios, tanto en ratón (Leahy y cols., 2004; Buckingham y cols., 2008), como en rata (Leahy y cols., 2004; Bernstein y cols., 2006). En la rata se ha descrito que, el Brn3b marca un 65% de las CGR-Brn3a⁺ (Nadal-Nicolás y cols., 2012), mientras que en el ratón se ha descrito que identifica la mayoría de las CGR (Leahy y cols., 2004). Sin embargo, estos trabajos previos al nuestro hay que tomarlos con cautela ya que usaban un anticuerpo comercial anti-Brn3b que detecta indistintamente las tres miembros de la familia Brn3, no solamente el Brn3b. Finalmente, se ha descrito que el Brn3c solamente se expresa en un 51% de las CGR-Brn3a⁺ de la retina de la rata (Nadal-Nicolás y cols., 2012).

Nuestros resultados confirman y corroboran resultados preliminares (Quina y cols., 2005) que indican que en la retina de ratón la expresión de Brn3a se realiza de forma selectiva en CGR. En este trabajo, además, cuantificamos el porcentaje de CGR-Brn3a⁺ respecto a las trazadas con OHSt desde el CS en secciones transversales de retina y observamos que un 92,3% de las CGR-Brn3a⁺ se trazaban con OHSt, lo que indicaba que la mayoría de las CGR-Brn3a⁺ proyectaban a los CS. Cuando se hizo el mismo estudio pero trazando las CGR con OHSt desde el MNO, se observó que todas las células Brn3a⁺ se trazaban. Esto nos indicaba que en la retina de ratón las células que expresan Brn3a son CGR, confirmando los datos de Quina y cols. (2005), y un 92,3% de ellas proyectan a los CS.

El número de de CGR-OHSt⁺ y CGR-Brn3a⁺ en ratones pigmentados, fue de de 40.437±3.196 y 34.627±1.821 células, respectivamente. Estos resultados muestran que el porcentaje de CGR identificadas mediante inmunodetección con Brn3a en ratón pigmentado es de 84,5%. Sin embargo, en ratones albinos el número de CGR trazadas con OHSt desde el CS o inmunodetectadas con Brn3a era de 51.025±1.425 y 47.211±1.346 células, respectivamente. Esto nos indica que, en esta estirpe, el Brn3a identifica un 92,5%, de la población total de CGR, un porcentaje mayor que en el ratón pigmentado. Además estos resultados corroboran el trabajo de Salinas-Navarro y cols. (2009) en el que describen que la población de CGR (identificadas por trazado) es mayor en el ratón albino que en el pigmentado.

Los mapas de isodensidad de CGR Brn3a⁺ y OHSt⁺ en ambas estirpes de ratón muestran que la distribución de las CGR detectadas con ambos marcadores es similar, observándose en ambos casos un área de alta densidad celular en un área alargada horizontalmente en la retina superior, justo por encima del NO en la región de la hemirretina superior. Este área de alta densidad ha sido descrita previamente utilizando el trazado de las CGR con FG en retinas de ratas albinas y pigmentadas, o con OHSt en ratón (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b). Este área de la retina con la densidad máxima de CGR hemos postulado que podría ser la estría visual en estos animales. La estría visual, que en primates, algunos reptiles y aves es redonda y se llama area centralis, es la zona de la retina especializada en la visión más fina. Anatómicamente, la estría visual contiene una alta densidad de CGR, conos L, y células bipolares y una densidad baja de conos S y de bastones. El hecho de que en rata sea esta zona donde se encuentra la densidad más alta de conos L y CGR (Ortín-Martínez y cols., 2010) y la más baja de conos S, apoya esta hipótesis.

Investigamos también en este estudio si el patrón de expresión de Brn3a en las CGR de ratón se altera tras la SNO, como ocurre con la proteína Thy-1 (Chidlow y cols., 2005). Basándonos en estudios previos que han demostrado que el patrón de expresión del Brn3a no se modifica después de la lesión del NO en rata (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Sánchez-Migallón y cols., 2011), estudiamos la expresión de Brn3a en la retina de ratón en tres tiempos tras la SNO: 2, 7 y 14 días. Documentamos en este estudio que el patrón de expresión del Brn3a no varía después de la SNO en el ratón ya que tras la lesión, esta proteína continúa siendo expresada sólo en las CGR.

Por lo tanto, hemos documentado en este estudio que el factor de transcripción Brn3a se expresa en la mayoría de las CGR de ratón adulto y esto nos ha permitido determinar la distribución de estas células tanto en las retinas control como tras la SNO. Estos resultados sientan las bases para la utilización del Brn3a como marcador de CGR de ratón adulto tanto controles, como lesionadas.

5.3. CURSO TEMPORAL DE MUERTE DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA TRAS SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

Los modelos de estudio de la degeneración de las CGR se utilizan a menudo para el estudio de la degeneración neuronal en el SNC. En este estudio hemos caracterizado el curso temporal de la muerte de las CGR en el ratón adulto usando un modelo traumático de daño axonal, la SNO. Este modelo puede servir también como modelo de estudio de patologías como el glaucoma (Vidal-Sanz y cols., 2012).

El uso conjunto de los dos marcadores neuronales que hemos utilizado, trazado con OHSt e inmunodetección del Brn3a, nos ha permitido caracterizar la muerte de las CGR tras la SNO en el ratón. Tres días tras la SNO ya se produce en el ratón una disminución estadísticamente significativa del número de CGR y a los 5 días sólo sobreviven un 50% de estas células. La pérdida de CGR continúa progresivamente hasta los 9 días, momento en que sólo queda un 15% de la población original y a partir del cual, la supervivencia se estabiliza, al menos hasta los 21 días post-SNO. El porcentaje de supervivencia de CGR observado en este estudio a los 7 días tras la SNO (33%) es inferior al descrito previamente por Murphy y cols. (2007) y Lebru-Julien y cols. (2009) en el ratón, ya que estos autores observaron un 54% y 50% de supervivencia, respectivamente. La diferencia entre estos autores y nosotros puede deberse a que, mientras nosotros cuantificamos toda la población de CGR, en estos dos estudios cuantifican por áreas de muestreo. Sin embargo, 14 días después de la SNO encontramos que sobrevive aproximadamente un 15% de la población y en este periodo de tiempo, los otros estudios también han encontrado porcentajes similares de supervivencia (Kilic y cols., 2002; Lebrun-Julien y cols., 2009; Alarcón-Martínez y cols., 2010).

En los distintos periodos de tiempo después de la SNO, el número de CGR trazadas con OHSt desde el CS es muy diferente al número de CGR inmunodetectadas con Brn3a. Esto se debe a que el Brn3a no se expresa en la totalidad de las CGR. Sin embargo, cuando comparamos el porcentaje de muerte de CGR OHSt⁺ o Brn3a⁺ (considerando el 100% su población respectiva en retinas control), observamos que les similar con ambos marcadores a todos los tiempos estudiados.

Estudios previos realizados en rata (Peinado-Ramón y cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009) en los que se ha analizado el curso temporal de muerte de las CGR tras la SNO, documentaron que la pérdida de CGR-Brn3a⁺ era significativa 2 días después de la SNO, mientras que la pérdida de CGR-FG⁺ era significativa solamente a los 7 días después de la SNO. Esto puede deberse a que el

Brn3a es un marcador intrínseco de CGR que desaparece cuando la neurona ha iniciado el proceso de muerte celular, mientras que el FG es un marcador extrínseco que sólo desaparece cuando una célula de microglía fagocita y elimina la CGR muerta. Estas observaciones concuerdan también con datos moleculares que han descrito que las señales pro-muerte en retinas de rata axotomizadas (Agudo y cols., 2008, 2009) comienzan a sobreregularse (regulación por incremento) muy pronto, a 12 horas post-SNO, con un pico de expresión a las 48 horas que se mantiene hasta 3 ó 7 días post-SNO; por lo que las CGR axotomizadas comienzan las cascadas de señalización que terminan en apoptosis antes de que la pérdida anatómica de CGR-FG⁺ sea observable, pero es concomitante con la pérdida de la expresión de Brn3a.

En ratón, la pérdida de CGR comienza a ser significativa a los 3 días después de la SNO con ambos marcadores, antes que en la rata, en cuanto a las CGR-OHSt⁺ se refiere. Esto podría deberse a que en nuestro estudio en ratón, la microglía fagocítica aparece a los 3 días después de la SNO mientras que en rata, aparece a los 7 días tras la SNO. Como la pérdida de CGR-Brn3a⁺ cuando se secciona el nervio óptico a 0,5 mm del globo ocular es significativa casi al mismo tiempo post-SNO en rata y ratón, y teniendo en cuenta que entre ambas especies existe un desfase en la aparición de microglía fagocítica, el retraso observado en la pérdida de CGR marcadas con trazadores neuronales entre ambas especies podría deberse a que las células de microglía en ratones presentan una respuesta más rápida frente a la SNO que en rata.

Finalmente, los mapas de isodensidad de CGR documentaron que la muerte de CGR es difusa y afecta a toda la retina, como otros autores también habían descrito (Surgucheva y cols., 2008; Galindo-Romero y cols., 2011).

5.4. EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE BDNF EN LA SUPERVIVENCIA DE CGR Y LA APARICIÓN DE MICROGLÍA FAGOCÍTICA TRAS LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO

El efecto neuroprotector del BDNF, sólo o en combinación con otros factores tróficos, ha sido estudiado en el modelo de degeneración de CGR tras la SNO en ratas (Peinado-Ramón y cols., 1996; Yan y cols., 1999; Vidal-Sanz y cols., 2000; Cheng y cols., 2002; Nakazawa y cols., 2002; Krueger-Naug y cols., 2003; Lindqvist y cols., 2004; Leaver y cols., 2006a, 2006b; Bai y cols., 2010; Ma y cols., 2010) y gatos (Chen y Weber, 2001; Weber y cols., 2008, 2010). En ratón, el BDNF ha sido utilizado para aumentar la supervivencia de FR en ratones rd, que sufren degeneración de FR (Azadi y cols., 2007; Wilson y cols., 2007; Chen y cols., 2012). Sin embargo, éste es el primer trabajo que estudia su efecto sobre la supervivencia de CGR tras la SNO.

En este estudio hemos analizado el efecto del BDNF sobre la supervivencia de las CGR después de la SNO en dos estirpes de ratones: pigmentados (C57BL/6) y albinos (Swiss). Nuestros resultados demuestran que la respuesta al tratamiento con BDNF tras la SNO fue similar en ambas

estirpes, tanto en cuanto a la degeneración de las CGR como a la activación microglial que se produce.

En el grupo de animales tratados con vehículo, la pérdida de CGR comienza a ser estadísticamente significativa a los 3 días después de la SNO. Estos resultados son similares a los obtenidos en los animales en los que no se realizaron inyecciones intravítreas, El número de CGR continuó disminuyendo en los animales tratados con vehículo desde los 3 días hasta los 14 días después de la SNO, tiempo en el que el porcentaje CGR supervivientes fue del 15% aproximadamente. Esta curva temporal de muerte de CGR era muy similar a la observada e los animales en los que no se realizó ninguna inyección (Galindo-Romero y cols., 2011).

En los grupos tratados con BDNF, la muerte de CGR tras la SNO comenzó a ser estadísticamente significativa 5 días después de la SNO. Y, aunque el número de CGR disminuyó progresivamente desde este momento, conforme aumentaba el tiempo tras SNO, el porcentaje de supervivencia fue mayor en todos los periodos de supervivencia en los grupos tratados con BDNF en comparación con los grupos tratados con vehículo (Galindo-Romero y cols., 2013b). Además, documentamos que la inyección intravítrea de BDNF protege de la muerte a las CGR de toda la retina, y no únicamente a las situadas en la zona, tal y como se ha descrito previamente en rata (Peinado-Ramón y cols., 1996; Di Polo y cols., 1998; Sánchez-Migallón y cols., 2011). Esto se pudo observar en los mapas de isodensidad de CGR, en los que se observaba que la densidad de CGR en las retinas tratadas con BDNF era mayor en toda la extensión de la retina cuando se comparaba con las retinas tratadas con vehículo o no tratadas.

El efecto neuroprotector del BDNF fue muy similar en las dos estirpes de ratón utilizados, C57BL/6 y Swiss. Sin embargo, los porcentajes de supervivencia obtenidos fueron diferentes a los descritos previamente en rata (Peinado-Ramón y cols., 1996; Sánchez-Migallón y cols., 2011). El efecto que el BDNF produce en rata es más duradero que en ratón, ya que retrasa la muerte de las CGR hasta 7 días tras la SNO (Mansour-Robaey y cols., 1994; Di Polo y cols., 1998; Sanchez-Migallón y cols., 2011). Este hallazgo puede deberse a que, en ratón, la muerte de CGR tras la SNO es más rápida que en rata (Mansour-Robaey y cols., 1994; Peinado-Ramón y cols., 1996; Bodeutsch y Thanos, 2000; Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2012; Galindo-Romero y cols., 2011) aunque, en términos generales, ambos modelos son comparables entre sí, puesto que la pérdida del 50% de las CGR ocurre en rata a los 7 días y en ratón a los 5 días, y es en este momento cuando el BDNF deja de tener efecto neuroprotector en cada especie.

Si bien es cierto que la SNO induce una respuesta microglial no solamente en las capas de la retina en las que se encuentran los somas y los procesos de las CGR: CFN, CCG y CPI, sino también en la CPE (Sobrado-Calvo y cols., 2007), en este estudio hemos analizado solamente las células de microglia transcelularmente marcadas con OHSt (fagocíticas) que, a su vez, expresaban Iba1 y que se encontraban en la capa de las células ganglionares.

En la retina de rata la microglía fagocítica aparece (Sobrado-Calvo y cols., 2007) a los 7 días después de la SNO y aumenta en número hasta 14 días después de la SNO. En las retinas de ratón C57BL/6 la microglía comienza a aparecer y alcanza un número máximo a los 7 días después de la SNO (Wohl y cols., 2010).

En ratones controles C57BL/6 y Swiss, cuyas retinas se trazaron con OHSt desde los CS pero a las que no se les realizó la SNO, se encontró un promedio de 39 ± 5 y 61 ± 11 células de microglía fagocítica. Este número no dependía del tiempo en el que la retina había estado trazada, ya que realizamos grupos que se analizaron a 7, 10 y 30 días tras el trazado. En estas retinas control la microglía fagocítica se encontraba distribuida por toda la retina. La presencia de células de microglía fagocítica en retinas control nos sugiere las siguientes posibilidades: las células de microglía fagocitan el OHSt excretado por CGR vivas marcadas, las células de la microglía realizan funciones de "poda" fisiológica de las neuritas de las CGR, o finalmente, la aplicación de OHSt produce una pequeña muerte celular en la retina o una combinación de ellas. Sin embargo, el estudio realizado no nos permite discriminar entre estas posibilidades.

En las retinas axotomizadas, se observó una correlación inversa entre la muerte de CGR y la aparición de células de microglía fagocítica, como se describió previamente en rata (Sobrado-Calvo y cols., 2007) y más recientemente en ratón (Liu y cols., 2012). En concordancia con los resultados anteriores, todos los grupos tratados con BDNF muestran un menor número de células de microglía fagocítica en comparación a los grupos tratados con vehículo, igual que en rata (Sobrado-Calvo y cols., 2007).

Ha sido demostrado que el BDNF activa las células de microglía (Elkabes y cols., 1996), por lo que probablemente, el menor número de células de microglía fagocítica en los grupos tratados con BDNF se deba al menor porcentaje de muerte de CGR, más a que el BDNF inhiba su activación.

La distribución de las células de microglía fagocítica en la retina lesionada cambia conforme aumenta el tiempo post-SNO. Inicialmente, a 3 días post-SNO, las células de microglía fagocítica se distribuyen homogéneamente por toda la retina. Conforme aumenta el tiempo post-SNO, se observa un gradiente de densidad decreciente en el número de células de microglía fagocítica, desde la zona central a la periferia de la retina.

El papel de las células de microglía en enfermedades neurodegenerativas no está del todo claro. Sí se sabe que restauran la homeostasis del tejido y que una sobreactivación de las células de microglía podría ser peligroso (Chen y cols., 2002; Marín-Teva y cols., 2011). Otros estudios han demostrado que la supresión de células de microglía mejora la regeneración axonal y la supervivencia de las CGR después de una SNO en el nervio óptico (Thanos y cols., 1993) y se ha sugerido que las células gliales podrían tener un papel en la disfunción de las CGR (Ramirez y cols., 2010).

5.5. EFECTO DE LA SECCIÓN DEL NERVIÓ ÓPTICO SOBRE LA RETINA CONTRALATERAL A LA LESIÓN

En el ojo contralateral a la SNO, se observó un aumento del número de células de microglía fagocítica en comparación con las retinas control. En otros modelos de daño en el nervio óptico en rata se ha descrito una respuesta en el ojo contralateral a la SNO (Ito y cols., 1998; Bodeutsch y cols., 1999; Sobrado-Calvo y cols., 2007), y en modelos de glaucoma en rata y ratón (Ramírez y cols., 2010; Gallego y cols., 2012). En otras enfermedades oculares como la oftalmia simpática y uveítis experimental en ratón se agravan tras la afectación traumática o infecciosa del ojo contralateral (revisado en Bodeutsch y cols., 1999). Recientemente Liu y cols., (2012) han descrito una respuesta microglial en retinas de ratón tras aplastamiento del NO y glaucoma, pero ellos no observaron una respuesta microglial en el ojo contralateral a la SNO. Esta discrepancia con nuestros datos y los de Gallego y cols., (2012) podría deberse a la metodología utilizada, ya que Liu y cols. (2012) sólo analizaron cuatro áreas representativas de toda la retina.

Existen dos teorías fundamentales sobre por qué se produce este efecto contralateral (Bodeutsch y cols., 1999; Sobrado-Calvo y cols., 2007; Ramírez y cols., 2010; Gallego y cols., 2012). La primera de ellas, las células de microglía fagocitan las pocas CGR de proyección retino-retinianas que existen en roedores (Müller y Holländer, 1988) y podrían estar dañadas por la SNO. En nuestro laboratorio se ha visto que en ratón adulto sólo hay 6 o 7 CGR de proyección retino-retinianas (Valiente-Soriano y cols., sin publicar). La segunda teoría, que puede ser complementaria con la primera, se basa en el papel de las células de microglía como sistema de vigilancia, y que se activa a través del SNC ante un insulto. Es decir, el hecho de que fagociten las CGR de proyección retino-retiniana no explicaría la aparición de las células de microglía fagocítica por su pequeño número, pero el daño de estas pocas células podría ser suficiente para mandar una señal de peligro. Curiosamente, en todas las retinas contralaterales a la SNO, tanto las tratadas con BDNF como con vehículo, se observó un aumento de la activación microglial, similar en ambos grupos, y su número no varió significativamente con el tiempo, por lo que, las células de microglía fagocítica que aparecen 3 días después de la SNO continúan hasta, al menos, 14 días después.

Tras cuantificar el número total de CGR en el ojo contralateral a la SNO, observamos una leve tendencia a la disminución del número en comparación con las retinas control y 21 días después de la SNO, existe diferencia estadísticamente significativa en el número de CGR, lo cual indica que, conforme avanza el tiempo post-SNO, se produce una pérdida de CGR en el ojo contralateral. Para cerciorarnos de que esta disminución no se debiera al marcaje con OHSt, ya que al procesar al animal 21 días después de la SNO, el OHSt se había aplicado 30 días antes, realizamos el grupo control que se procesó 30 días después del marcaje, y comprobamos que el número de CGR no era significativamente menor. En cuanto a la microglía de estas retinas, se observó un aumento significativo con respecto a las procesadas 7 y 10 días tras el marcaje, pero siguió siendo significativamente menor que todas las retinas experimentales, tanto las izquierdas como las contralaterales. Esto significa que la pérdida de CGR que se produjo en el ojo contralateral a la SNO

21 días después del marcaje se debe al efecto que la SNO produce sobre éstos. Si bien es cierto que las CGR que proyectan retino-retinariamente podrían haber muerto, esto no explicaría esta diferencia significativa en el número total de CGR.

En conclusión, podemos afirmar que en el ojo contralateral a la SNO se está produciendo una reacción a la SNO del ojo experimental, que cursa con una reacción microglial sostenida, al menos hasta los 14 días, y a tiempos largos con muerte de CGR. Así, la retina contralateral no debe usarse como control interno porque, si bien a tiempos tempranos el efecto contralateral en la población de CGR es insignificante, la reacción glial observada puede afectar en los estudios de respuesta inflamatoria.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los estudios de la caracterización de la población de CGRm en la retina de rata albina SD adulta nos permiten concluir que:

1. La práctica totalidad de esta población de CGRm proyecta fuera de la retina. Además, un 90,6% de las mismas proyectan a los colículos superiores.
2. Las CGRm no expresan el factor de transcripción Brn3a.
3. Las CGRm suponen aproximadamente un 2,6% de la población total de CGR, se distribuyen por toda la retina y su densidad aumenta desde el centro a la periferia, con un mayor número de estas células en el cuadrante superotemporal. Esta distribución de las CGRm es complementaria a la distribución de la población total de CGR-Brn3a⁺.

Los estudios para caracterizar: i) La utilización del factor de transcripción Brn3a como marcador específico de las CGR de ratón; ii) El curso temporal y topografía de la muerte de CGR ratón adulto tras la SNO, y ; iii) El efecto neuroprotector del BDNF en la supervivencia de las CGR axotomizadas, nos permiten concluir que:

1. En la retina del ratón pigmentado C57BL/6 y albino Swiss, el Brn3a se expresa únicamente en CGR, identificando un 85,6% y un 92,6%, respectivamente, de la población total de CGR-OHSt⁺. La distribución de las CGR-Brn3a⁺ es igual a la descrita previamente para las CGR identificadas mediante trazado axonal retrógrado desde los colículos superiores, encontrándose la máxima densidad de CGR en un área horizontal de la retina superior, por encima del nervio óptico.
2. Aunque el Brn3a no se expresa en todas las CGR de la retina de ratón, el porcentaje de supervivencia de las CGR es similar al observado con el trazador retrógrado OHSt. Así pues, Brn3a es un buen marcador para identificar las CGR del ratón y se puede utilizar para analizar su supervivencia tras la lesión.
3. En el ratón, la muerte de CGR después de la SNO a 0,5 mm del ojo comienza a ser estadísticamente significativa a los 3 días de la lesión. Esta muerte continúa hasta los 9 días después de la lesión, y es difusa por toda la retina. A los 9 días sólo sobrevive un 15% de la población original de CGR. Desde los 9 días hasta los 21 días después de la SNO no se produce pérdida adicional significativa. El tratamiento con una inyección intraocular de BDNF retrasa la muerte de las CGR en toda la retina y a todos los tiempos tras la SNO estudiados.

4. Las células de microglía fagocítica aparecen 3 días después de la SNO de manera homogénea por toda la retina en ratones pigmentados C57/BL6 y albinos Swiss. El número de células de microglía fagocítica aumenta conforme aumenta el tiempo después de la SNO y se observa una mayor proporción de estas células en el centro que en la periferia de la retina. En ambas cepas, pigmentada y albina, la inyección intravítrea de BDNF tras la SNO produce una disminución del número de células de microglía fagocítica en todos los tiempos experimentales analizados, probablemente debido a una menor muerte de CGR.

5. La SNO unilateral produce una fuerte respuesta contralateral. En las retinas contralaterales a la lesión se observan, a los tres días de la lesión, células de microglía dispersas por toda la retina. El número de estas células, que es menor que en las retinas lesionadas pero significativamente mayor que en retinas control, se mantiene constante en todos los tiempos post lesión analizados y no se afecta por el tratamiento con BDNF en la retina axotomizada. Estos resultados deberían ser tenidos en cuenta cuando se utilicen las retinas contralaterales como control.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

The studies to characterize the melanopsin retinal ganglion cell (mRGC) population in the albino adult rat allow us to conclude that:

1. Practically all mRGC project out of the retina. Moreover, 90.6% of the mRGC project to the superior colliculi.
2. mRGC do not express the Brn3a transcription factor.
3. mRGC constitute approximately 2.6% of the total RGC population, they are distributed across the entire retina and their densities increase from the centre to the periphery of the retina with their highest numbers in the superior-temporal quadrant. The distribution of mRGC and Brn3a⁺RGC is complementary.

The studies to characterize: i) Brn3a as a specific RGC marker in mouse; ii) The time course and topography of RGC death induced by ONT, and; iii) The neuroprotective effect of BDNF on the survival of axotomized RGC, allow us to conclude that:

1. In the retina of pigmented C57BL/6 and albino Swiss mice, Brn3a is only expressed in RGC, by 85.6% and 92.6% of the total population of OHSt⁺RGC, respectively. The distribution of RGC that express Brn3a is similar to that described previously for RGC retrogradely labelled from the superior coliculli. The highest RGC density is found in a horizontal region of the superior retina above the optic nerve.
2. Although Brn3a is not expressed by all RGC, the percentage of RGC survival is similar to that observed with the retrograde tracer OHSt. Thus, Brn3a is a good marker to detect mouse RGC and can be used to analyze the percentage of survival after a lesion.
3. In mice, RGC death after ONT at 0.5 mm from the optic disk is first statistically significant 3 days after injury. The number of RGC decrease up to 9 days post-lesion, affecting the whole retina. At 9 days, only 15 % of the original RGC population survive. From 9 to 21 days after ONT there is no significant loss of RGC. Treatment with an intravitreal injection of BDNF delays RGC death after ONT across the whole retina and at all time-intervals studied.
4. Phagocytic microglial cells in C57BL/6 and Swiss mice appear homogeneously across the retina 3 days after IONT. The number of these cells increases as the time post-lesion increases, and the density is higher in the centre than in the periphery. In both mouse strains,

the number of phagocytic microglial cells after ONT and administration of BDNF is, at all times post-lesion, significantly lower than after vehicle administration, probably due to the delayed RGC death.

5. Unilateral ONT produces a strong contralateral response. In the contralateral to the lesion retinas scattered phagocytic microglial cells are observed 3 days after ONT. Their number, which is lower than in the injured retinas but significantly higher than in control ones, is maintained constant at all times post-lesion analysed and are not affected by BDNF treatment in the axotomized retina. These results should be taken into account when using the contralateral retina as control.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM, Cory S (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 19(5): 488-96.
- Aguayo AJ, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez, MP, Bray GM (1987). Growth and connectivity of axotomized retinal neurons in adult rats with optic nerves substituted by PNS grafts linking the eye and the midbrain. *Ann NY Acad. Sci.* 495, 1e9.
- Agudo 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-Nicolás FM, Miralles-Imperial J, Hallbook F, Vidal-Sanz M (2009). Immediate upregulation of proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 424-31.
- Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, de Imperial JM, Vidal-Sanz M (2013). Anatomical and functional damage in experimental glaucoma. *Curr Opin Pharmacol.* 13(1): 5-11.
- Alarcón-Martínez L, de la Villa P, Avilés-Trigueros M, Blanco R, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009). Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats. *Mol Vis.* 15: 2373-83.
- Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, Valiente-Soriano J, Agudo-Barriuso M, Villa Pde L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010). ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection. *Vision Res.* 50(21): 2176-87.
- Allendoerfer KL, Cabelli RJ, Escandón E, Kaplan DR, Nikolics K, Shatz CJ (1994). Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system. *J Neurosci.* 14(3 Pt 2): 1795-811.
- Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A (2012). The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 31(2):152-81.
- Arendt D (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol.* 47: 563-571.
- Ashwell KW, Holländer H, Streit W, Stone J (1989). The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci.* 2(5): 437-48.
- Azadi S, Johnson LE, Paquet-Durand F, Perez MT, Zhang Y, Ekström PA, Van Veen T (2007). CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res.* 1129: 116-129.
- Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S, Nathans J (2009). Distinct roles of transcription factors brn3a and brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron.* 61(6): 852-64.
- Badea TC, Nathans J (2011). Morphologies of mouse retinal ganglion cells expressing transcription factors Brn3a, Brn3b, and Brn3c: analysis of wild type and mutant cells using genetically-directed sparse labeling. *Vision Res.* 51(2): 269-79.
- Badea TC, Williams J, Smallwood P, Shi M, Motajo O, Nathans J (2012). Combinatorial expression of Brn3 transcription factors in somatosensory neurons: genetic and morphologic analysis. *J Neurosci.* 32(3): 995-1007.
- Bai Y, Xu J, Brahimi F, Zhuo Y, Sarunic MV, Saragovi HU (2010). An agonistic TrkB mAb causes sustained TrkB activation, delays RGC death, and protects the retinal structure in optic nerve axotomy and in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 4722-4731.

- Baird A, Esch F, Gospodarowicz D, Guillemin R (1985). Retina- and eye-derived endothelial cell growth factors: partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry*. 24(27): 7855-60.
- Barnstable CJ, Dräger UC (1984). Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neurosci*. 11: 847- 55.
- Barron KD, Dentinger MP, Krohel G, Easton SK, Mankes R (1986). Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital optic nerve crush. *J Neurocytol*. 15: 345-62.
- 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.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*. 14(7): 4368-4374.
- Bernstein SL, Koo JH, Slater BJ, Guo Y, Margolis FL (2006). Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol Vis*. 12:47-55.
- Berson DM (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci*. 26: 314-320.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070-1073.
- Bodeutsch N, Siebert H, Dermon C, Thanos S (1999). Unilateral injury to the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. *J Neurobiol*. 38: 116-28.
- Bodeutsch N, Thanos S (2000). Migration of phagocytotic cells and development of the murine intraretinal microglial network: an in vivo study using fluorescent dyes. *Glia*. 32: 91-101.
- Boonman Z, Isacson O (1999). Apoptosis in neuronal development and transplantation: role of caspases and trophic factors. *Exp Neurol*. 156(1): 1-15.
- Bowmaker JK, Hunt DM (2006). Evolution of vertebrate visual pigments. *Curr Biol*. 16(13): R484-9.
- Bray GM, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ (1987). Regeneration of axons from the central nervous system of adult rats. *Prog Brain Res*. 71, 373e379.
- Brown TM, Gias C, Hatori M, Keding SR, Semo M, Coffey PJ, Gigg J, Piggins HD, Panda S, Lucas RJ (2010). Melanopsin contributions to irradiance coding in the thalamo-cortical visual system. *PLoS Biol*. 8, e1000558.
- 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(11): 2735-44.
- Cabelli RJ, Allendoerfer KL, Radeke MJ, Welcher AA, Feinstein SC, Shatz CJ (1996). Changing patterns of expression and subcellular localization of TrkB in the developing visual system. *J Neurosci*. 16(24): 7965-80.
- Caminos ME (1998). Localización de las Neurotrofinas y sus receptores en el sistema visual: efecto de la regeneración del nervio óptico de la tenca. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Vidal-Sanz M, Osborne NN (2004). The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45(2): 685-93.

- Castellano B, González B, Jensen MB, Pedersen EB, Finsen BR, Zimmer J (1991). A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. *J Histochem Cytochem* 39:561–568.
- Castillo B Jr, del Cerro M, Breakefield XO, Frim DM, Barnstable CJ, Dean DO, Bohn MC (1994). Retinal ganglion cell survival is promoted by genetically modified astrocytes designed to secrete brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Brain Res.* 647(1): 30-6.
- Chen H, Weber AJ (2001). BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 966-974.
- Chen H, Wei X, Cho KS, Chen G, Sappington R, Calkins DJ, Chen DF (2011). Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(1): 36-44.
- Cheng L, Sapieha P, Kittlerova P, Hauswirth WW, Di Polo A (2002). TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci.* 22: 3977-3968.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A (2002). Distribution, markers and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm.* 10: 27-39.
- Chen R, Yin XB, Peng CX, Li GL (2012). Effect of brain-derived neurotrophic factor on c-jun expression in the rd mouse retina. *Int J Ophthalmol.* 5: 266-271.
- Chidlow G, Melena J, Osborne NN (2000). Betaxolol, a beta(1)-adrenoceptor antagonist, reduces Na(+) influx into cortical synaptosomes by direct interaction with Na(+) channels: comparison with other beta-adrenoceptor antagonists. *Br J Pharmacol.* 130(4): 759-66.
- 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.
- Cohen A, Bray GM, Aguayo AJ (1994). Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth in vitro. *J Neurobiol.* 25(8): 953-9.
- Cohen-Cory S, Fraser SE (1994). BDNF in the development of the visual system of *Xenopus*. *Neuron.* 12(4): 747-61.
- 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(2): 273-85.
- Dabin I, Barnstable CJ (1995). Rat retinal Muller 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.
- Davies WL, Hankins MW, Foster RG (2010). Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors. *Photochem Photobiol Sci.* 9:1444-1457.
- De Hoz R, Rojas B, Ramirez AI, Gallego BI, Salazar JJ, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros, M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM (2013). Rod-like microglia are restricted to eyes with laser-induced ocular hypertension but absent from the microglial changes in the contralateral untreated eye. *Exp Eye Res.* In press
- De Juan J, Iñiguez C, Carreres J (1978). Number, diameter and distribution of the rat optic nerve fibers. *Acta Anat (Basel).* 102: 294-9.

- Del Río-Hortega P (1932). Microglia. En: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, edited by Penfield W. New York: Hoeber. p. 482–534.
- Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognised by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3, *Immunology* 54: 589–599.
- Dhingra NK, Jain V, Guruswamy R (2011). M1 type of intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells express Brn3 transcription factors in rd1 mouse. ARVO. E-abstract 3458.
- Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ (1998). Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporally rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 91: 1632–1636.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, Billson FA (1995). Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol.* 363: 53-68.
- Dodd J, Solter D, Jessel MT (1984). Monoclonal antibodies against carbohydrate differentiation antigens identify subsets of primary sensory neurons. *Nature* 311: 469-472.
- Domenici L, Gravina A, Berardi N, Maffei L (1991). Different effects of intracranial and intraorbital section of the optic nerve on the functional responses of rat retinal ganglion cells. *Exp Brain Res.* 86: 579-84.
- Dong CJ, Guo Y, Agey P, Wheeler L, Hare WA (2008). Alpha-2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4515e4522.
- Dowling JE (2012). *The retina. An approachable part of the brain.* The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge (Massachusetts) and London (England).
- Dräger UC, Olsen JF (1981). Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 20: 285–293.
- 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, e3931.
- Ecker JL, Dumitrescu ON, Wong KY, Alam NM, Chen SK, LeGates T, Renna JM, Prusky GT, Berson DM, Hattar S (2010). Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron* 67, 49e60.
- Ehinger B DJ (1987). Retinal neurocircuitry and transmission. En: *Handbook of chemical neuroanatomy. Vol. Vol 5: Integrated System of the CNS, Part I.* A Björklund, T. Hökfelt y L.W. Swanson (eds.). Elsevier Science Publishers B. V., p. P 389.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci.* 16: 2508-2521.
- Ellis-Behnke RG, Jonas RA, Jonas JB (2013). The microglial system in the eye and brain in response to stimuli in vivo. *J Glaucoma.* 22 Suppl 5:S32-5.
- Eng SR, Lanier J, Fedtsova N, Turner EE (2004). Coordinated regulation of gene expression by BRN3A in developing sensory ganglia. *Development.* 131: 3859-70.

- Escandón E, Soppet D, Rosenthal A, Mendoza-Ramírez JL, Szönyi E, Burton LE, Henderson CE, Parada LF, Nikolics K (1994). Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development. *J Neurosci.* 14(4): 2054-68.
- 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.
- Fitzgibbon T, Taylor SF (1996). Retinotopy of the human retinal nerve fibre layer and optic nerve head. *J Comp Neurol.* 375, 238e251.
- Forrester J, Peters A (1967). Nerve fibres in optic nerve of rat. *Nature.* 214: 245-7.
- Foster RG, Hankins MW (2002). Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res* 21: 507-527.
- Funakoshi H, Frisén J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, Persson H (1993). Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 123(2): 455-65.
- Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011). Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res.* 92(5): 377-87.
- Galindo-Romero C, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M (2013a). Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp Eye Res.* 108: 84-93.
- Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2013b). Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(2): 974-85.
- Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM (2012). IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *Neuroinflammation.* 9:92.
- Ganesh BS, Chintala SK (2011). Inhibition of reactive gliosis attenuates excitotoxicity-mediated death of retinal ganglion cells. *PLoS One* 6: e18305.
- Gao H, Qiao X, Hefti F, Hollyfield JG, Knusel B (1997). Elevated mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in retinal ganglion cell layer after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38(9): 1840-7.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2010). Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res.* 91(6): 800-10.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo-Barriuso M, Alarcón-Martínez L, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2011). Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis.* 17: 1716-33.
- García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Agudo-Barriuso M, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2013). Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-dependent survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(8): 5888-900.
- García-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC (1995). Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 61(1): 33-44.

- García-Valenzuela E, Sharma SC (1999). Laminar restriction of retinal macrophagic response to optic nerve axotomy in the rat. *J Neurobiol.* 40(1): 55-66.
- García-Valenzuela E, Sharma SC, Piña AL (2005). Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Mol Vis.* 11: 225-31.
- Gómez-Ramírez AM, Villegas-Pérez MP, 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: 414-24.
- Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci.* 4: 1165.
- Graham D (1995). Melanopsin Ganglion Cells: A Bit of Fly in the Mammalian Eye. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Guillery RW, Mason CA, Taylor JSH (1995). Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J Neurosci.* 15, 4727e4737.
- Guo Y, Johnson EC, Cepurna WO, Dyck JA, Doser T, Morrison JC (2011). Early gene expression changes in the retinal ganglion cell layer of a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(3): 1460-73.
- Hankins MW, Peirson SN, Foster RG (2008). Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci* 31: 27-36.
- Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B, Fahrenkrug J (2002). The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci.* 22: RC191.
- Harvey AR, Hu Y, Leaver SG, Mellough CB, Park K, Verhaagen J, Plant GW, Cui Q (2006). Gene therapy and transplantation in CNS repair: the visual system. *Prog Retin Eye Res.* 25(5): 449-89.
- Harvey AR, Hellström M, Rodger J (2009). Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway. *Prog Brain Res.* 175: 151-61.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 295: 1065-1070.
- Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau KW (2003). Melanopsin and rodcone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76e81.
- Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, Berson DM (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 497: 326-349.
- Herzog KH, Von Bartheld CS (1998). Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J Neurosci.* 18(8): 2891-906.
- Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, Uchino S, Kohsaka S (2005). Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res.* 81: 357–362.

- Hofbauer A, Dräger UC (1985). Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J Comp Neurol.* 234: 465-74.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9(8): 2459-64.
- Honjin R, Sakato S, Yamashita T (1977). Electron microscopy of the mouse optic nerve: a quantitative study of the total optic nerve fibers. *Arch Histol Jpn.* 40(4):321-32.
- Huang W, Fileta J, Guo Y, Grosskreutz CL (2006). Downregulation of Thy-1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Curr Eye Res.* 31: 265-71.
- Hubel D (2000). *Ojo, cerebro y visión.* Universidad de Murcia. ISBN: 84-8371-143-5.
- Huberman AD, Niell CN (2011). What can mice tell us about how vision works?. *Trends in Neurosci.* 34: 464-73
- Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996). A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 855–862.
- Imai Y, Kohsaka S (2002). Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of *Iba1*. *Glia* 40: 164–174.
- Inman DM, Horner PJ (2007). Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia.* 55(9): 942-53.
- Isenmann S, Klöcker N, Gravel C, Bähr M (1998). Short communication: protection of axotomized retinal ganglion cells by adenovirally delivered BDNF in vivo. *Eur J Neurosci.* 10(8): 2751-6.
- Isenmann S, Schmeer C, Kretz A (2004). How to keep injured CNS neurons viable--strategies for neuroprotection and gene transfer to retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci.* 26(1):1-16.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Brain Res Mol Brain Res.* 57(1): 1-9.
- Jacobs GH, Fenwick JA, Williams GA (2001). Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol.* 204:2439–2446.
- Jain V, Ravindran E, Dhingra NK (2012). Differential expression of *Brn3* transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J. Comp. Neurol.* 520, 742e755.
- Janes RG, Bounds GW, Jr (1955). The blood vessels of the rat's eye. *Am J Anat.* 96: 357-73.
- Jeffery G (2001). Architecture of the optic chiasm and the mechanisms that sculpt its development. *Physiol Rev.* 81, 1393e1414.
- Jeffery G, Levitt JB, Cooper HM (2008). Segregated hemispheric pathways through the optic chiasm distinguish primates from rodents. *Neurosci.* 157, 637e643.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998). The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci.* 18: 8936-46.
- Johnson EC, Morrison JC (2009). Friend or Foe? Resolving the Impact of Glial Responses in Glaucoma. *J Glaucoma.* 18(5): 341–353.

- Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H (1986). Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci.* 6(10): 3031-8.
- Kanamori A, Nakamura M, Nakanishi Y, Yamada Y, Negi A (2005). Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 81: 48-56.
- Keeler CE, Sutcliffe E, Chaffee EL (1928). Normal and "Rodless" Retinae of the House Mouse with Respect to the Electromotive Force Generated through Stimulation by Light. *Proc Natl Acad Sci USA.* 14: 477-484.
- Kermer P, Klöcker N, Labes M, Bähr M (1998). Inhibition of CPP32-like proteases rescues axotomized retinal ganglion cells from secondary cell death in vivo. *J Neurosci* 18: 4656–4662.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 91(2): 461-553.
- Kido N, Tanihara H, Honjo M, Inatani M, Tatsuno T, Nakayama C, Honda Y (2000). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in eyes with NMDA-induced neuronal death. *Brain Res.* 884(1-2): 59-67.
- Kilic E, Hermann DM, Isenmann S, Bähr M (2002). Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. *J Pineal Res.* 32(2): 106-11.
- Kim IJ, Zhang Y, Yamagata M, Meister M, Sanes JR (2008). Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. *Nature.* 452(7186): 478-82.
- Klöcker N, Cellierino A, Bähr M (1998). Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells in vivo. *J Neurosci.* 18(3): 1038-46.
- Klöcker N, Kermer P, Weishaupt JH, Labes M, Ankerhold R, Bähr M (2000). Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. *J Neurosci.* 20(18): 6962-7.
- Kobbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000). Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol.* 62: 327-5.
- Kolb H, Nelson R, Mariani A (1981). Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Res.* 21(7): 1081-1114.
- Kolb H, Linberg KA, Fisher SK (1992). Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol.* 318(2): 147-87.
- Kolb H (1994). The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35: 2385-404.
- Kohno T, Inomata H, Taniguchi Y (1982). Identification of microglia cell of the rat retina by light and electron microscopy. *Jpn J Ophthalmol.* 26(1): 53-68.
- Kurimoto T, Miyoshi T, Suzuki A, Yakura T, Watanabe M, Mimura O, Fukuda Y (2003). Apoptotic death of beta cells after optic nerve transection in adult cats. *J Neurosci.* 23(10): 4023-8.
- Kwong JM, Caprioli J, Piri N (2010). RNA binding protein with multiple splicing: A new marker for retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 1052- 58.

- Kwong JMK, Quan A, Kyung H, Piri N, Caprioli J (2011). Quantitative analysis of retinal ganglion cell survival with Rbpm immunolabeling in animal models of optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 9694-9702.
- Kwong JM, Vo N, Quan A, Nam M, Kyung H, Yu F, Piri N, Caprioli J (2013). The dark phase intraocular pressure elevation and retinal ganglion cell degeneration in a rat model of experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 1052- 58.
- Krueger-Naug AM, Emsley JG, Myers TL, Currie RW, Clarke DB (2003). Administration of brain-derived neurotrophic factor suppresses the expression of heat shock protein 27 in rat retinal ganglion cells following axotomy. *Neuroscience.* 116: 49-58.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sobrado-Calvo P, García-Avilés A, Miralles d, I, Vidal-Sanz M (2001). Neuroprotective effects of alpha(2)-selective adrenergic agonists against ischemia-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 2074-84.
- 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.
- Lam TT, Siew E, Chu R, Tso MO (1997). Ameliorative effect of MK-801 on retinal ischemia. *J Ocul Pharmacol Ther.* 13: 129-37.
- Lam TT, Abler AS, Kwong JM, Tso MO (1999). N-methyl-D-aspartate (NMDA) induced apoptosis in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(10): 2391-7.
- Lamballe F, Klein R, Barbacid M (1991). TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell.* 66(5): 967-79.
- Lambert W, Agarwal R, Howe W, Clark AF, Wordinger RJ (2001). Neurotrophin and neurotrophin receptor expression by cells of the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(10): 2315-23.
- Laquis S, Chaudhary P, Sharma SC (1998). The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res.* 784: 100-4.
- Latchman DS (1998). The Brn-3a transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 30: 1153-7.
- 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 Brn-3b. *Exp Eye Res.* 79(1): 131-40.
- Leaver SG, Cui Q, Plant GW, Arulpragasam A, Hisheh S, Verhaagen J, Harvey AR (2006a). AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Gene Ther.* 13: 1328-1341. Comprobar a y b en el texto
- Leaver SG, Cui Q, Bernard O, Harvey AR (2006b). Cooperative effects of bcl-2 and AAV-mediated expression of CNTF on retinal ganglion cell survival and axonal regeneration in adult transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 24(12): 3323-32.
- Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A (2008). Inhibition of p75(NTR) in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci.* 40(4): 410-20.

- Leung CK, Lindsey JD, Crowston JG, Ju WK, Liu Q, Bartsch DU, Weinreb RN (2008). In vivo imaging of murine retinal ganglion cells. *J Neurosci Methods*. 168: 475-8.
- Levin LA, Gordon LK (2002). Retinal ganglion cell disorders: types and treatments. *Prog Retin Eye Res*. 21(5): 465-84.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME (2002). Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43(2): 402-10.
- Li Y, Semaan SJ, Schlamp CL, Nickells RW (2007). Dominant inheritance of retinal ganglion cell resistance to optic nerve crush in mice. *BMC Neurosci*. 8:19.
- Linden R, Perry VH (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res*. 272: 145-149.
- Lindqvist N, Peinado-Ramón P, Vidal-Sanz M, Hallböök F (2004). GDNF, Ret, GFRalpha1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection. *Exp Neurol*. 187(2): 487-99.
- Liu S, Li ZW, Weinreb RN, Xu G, Lindsey JD, Ye C, Yung WH, Pang CP, Lam DS, Leung CK (2012). Tracking retinal microglia density in models of retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53: 6254-6262.
- Lönngren U, Näpänkangas U, Lafuente M, Mayor S, Lindqvist N, Vidal-Sanz M, Hallböök F (2006). The growth factor response in ischemic rat retina and superior colliculus after brimonidine pre-treatment. *Brain Res Bull*. 71: 208-18.
- Lund RD (1965). Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science*. 149: 1506-1507.
- Ma CH, Bampton ET, Evans MJ, Taylor JS (2010). Synergist effects of osteonectin and brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells neurite outgrowth via the mitogen-activated protein kinase-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways. *Neurosci*. 165: 463-474.
- Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, Johnson JE, Frost DO (1998). BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. *J Neurosci*. 18(6): 2097-107.
- Macharadze T, Goldschmidt J, Marunde M, Wanger T, Scheich H, Zuschratter W, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2009). Interretinal transduction of injury signals after unilateral optic nerve crush. *Neuroreport*. 20: 301-5.
- Madison R, Moore MR, Sidman RL (1984). Retinal ganglion cells and axons survive optic nerve transection. *Int J Neurosci*. 23: 15-32.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*. 5(4): 501-9.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994). Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 1632-6.
- Manthorpe M, Skaper SD, Williams LR, Varon S (1986). Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor. *Brain Res*. 367(1-2): 282-6.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J (2011). Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol*. 7: 25-40.

- Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C, Huarte J (1994). Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*. 13(4): 1017-30.
- Masland RH (2001). The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*. 4: 877-86.
- Mey J, Thanos S (1993). Development of the visual system of the chick. A review. *J Hirnforsch*. 33(6): 673-702.
- Michon JJ, Li ZL, Shioura N, Anderson RJ, Tso MO (1991). A comparative study of methods of photoreceptor morphometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 32: 280-4.
- Moore RY, Speh JC, Card JP (1995). The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*. 352: 351-366.
- Morrison JC, Farrell S, Johnson E, Deppmeier L, Moore CG, Grossmann E (1995a). Structure and composition of the rodent lamina cribrosa. *Exp. Eye Res*. 60, 127e135.
- Morrison JC, Fraunfelder FW, Milne ST, Moore CG (1995b). Limbal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 36, 751e756.
- 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(1): 85-96.
- Morrison JC, Cepurna WO, Johnson EC (1999). Modeling glaucomatous optic nerve damage. *Int Ophthalmol Clin*. 39: 29-41.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 116: 201-211.
- Müller M, Holländer H (1988). A small population of retinal ganglion cells projecting to the retina of the other eye. An experimental study in the rat and the rabbit. *Exp Brain Res*. 71(3): 611-7.
- Murabe Y, Iyata Y, Sano Y (1981). Morphological studies on neuroglia. III. Macrophage response and "microgliocytosis" in kainic acid-induced lesions. *Cell Tissue Res* 218:75–86.
- Murabe Y, Sano Y (1982). Morphological studies in neuroglia. V. Microglial cells in the cerebral cortex of the rat, with special references to their possible involvement in synaptic function. *Cell Tissue Res*. 223:498–506.
- Murphy JA, Franklin TB, Rafuse VF, Clarke DB (2007). The neural cell adhesion molecule is necessary for normal adult retinal ganglion cell number and survival. *Mol Cell Neurosci*. 36(2): 280-92.
- 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 control and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50: 3860-8.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Albuquerque-Béjar JJ, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2012). Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One*. 7: e49830.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Nieto-López L, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2013). Displaced Retinal Ganglion Cells in the Adult Albino and Pigmented Rats. *Ophthalmic Res*. 50:27–53. 50, pp. 40.
- Nakazawa T, Tamai M, Mori N (2002). Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 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- 98.
- Naskar R, Wissing M, Thanos S (2002). Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43(9): 2962-8.
- Nayak SK, Jegla T, Panda S (2007). Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cell Mol Life Sci.* 64: 144-154.
- Neufeld AH (1999). Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 117(8): 1050-6.
- 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.
- O'Steen WK, Anderson KV, Shear CR (1974). Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 13, 334e339.
- Ogilvie JM, Deckwerth TL, Knudson CM, Korsmeyer SJ (1998). Suppression of developmental retinal cell death but not of photoreceptor degeneration in Bax-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39: 1713–1720.
- Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barruso 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.
- Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barruso M (2013). Total number and spatial distribution of mouse cones. *Ophthalmic Res.* 50:27–53. 50, pp. 40.
- Osborne NN, Cazeville C, Carvalho AL, Larsen AK, DeSantis L (1997). In vivo and in vitro experiments show that betaxolol is a retinal neuroprotective agent. *Brain Res.* 751(1): 113-23.
- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, Nash MS (1999). Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 43 Suppl 1:S102-28.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J (2004). Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 23(1): 91-147.
- 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.
- Paxinos G, Franklin KB (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Formato digital.
- Peinado-Ramón P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, 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.

- Peirson SN, Halford S, Foster RG (2009). The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364: 2849-2865.
- Pérez MT, Caminos E (1995). Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett.* 183(1-2): 96-9.
- Perry VH (1979). The ganglion cell layer of the retina of the rat: A Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 204(1156): 363-75.
- Perry VH (1981). Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience.* 6: 931-44.
- 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.
- Polyak S, Willmer EN (1946). Retinal structure and colour vision. *Doc Ophthalmol.* 3: 24-56.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 340-345.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci.* 20: 600-605.
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature.* 415: 493.
- Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, Velasquez T, O'Leary DD, Goulding M, Turner EE (2005). BRN3A-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci.* 25: 11595-604.
- 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.
- Ramón y Cajal S (1972) *The Structure of the retina.* Charles C. Thomas, Springfield Illinois.
- Robinson AP, White TM, Mason DW (1986). Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRS OX-42, the latter recognising complement receptor type 3. *Immunology.* 57: 239-247.
- Rodieck RW (1979). Visual pathways. *Annu Rev Neurosci.* 2: 193-225.
- Rodríguez-Tébar A, Jeffrey PL, Thoenen H, Barde YA (1989). The survival of chick retinal ganglion cells in response to brain-derived neurotrophic factor depends on their embryonic age. *Dev Biol.* 136(2): 296-303.
- Rodríguez-Tébar A, de la Rosa EJ, Arribas A (1993). Neurotrophin-3 receptors in the developing chicken retina. *Eur J Biochem.* 211(3): 789-94.
- Rudzinski M, Wong TP, Saragovi HU (2004). Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol.* 58(3): 341-54.
- Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009a). A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49: 115-26.

- 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 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 (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: 431-447.
- Sánchez-Migallón MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011). Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res.* 92(4): 260-7.
- 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(1): 207-16.
- Sauvé Y, Girman SV, Wang S, Lawrence JM, Lund RD (2001). Progressive visual sensitivity loss in the Royal College of Surgeons rat: perimetric study in the superior colliculus. *Neurosci.* 1: 51-63.
- Sauvé Y, Girman SV, Wang S, Keegan DJ, Lund RD (2002). Preservation of visual responsiveness in the superior colliculus of RCS rats after retinal pigment epithelium cell transplantation. *Neurosci.* 114: 389-401.
- Sawada A, Neufeld AH (1999). Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res.* 69: 525-31.
- Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW (2001). Changes in Thy-1 gene expression associated with damage ganglion cells. *Mol. Vis.* 7: 192-201,
- Schmidt TM, Kofuji P (2009). Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 29, 476e482.
- Schnitzer J (1989). Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol.* 282(2):249-63.
- Schnitzer J, Scherer J (1990). Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *J Comp Neurol.* 302(4): 779-91.
- 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-Pérez 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. A quantitative *in vivo* study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37(10):2002-14.
- Sharma RK EBE (2004). Fisiología del ojo. Ampliación clínica. En: *Desarrollo y estructura de la retina*. Madrid, España, p. 319-347.

- Silver MA, Stryker MP (2001). TrkB-like immunoreactivity is present on geniculocortical afferents in layer IV of kitten primary visual cortex. *J Comp Neurol.* 436(4): 391-8.
- 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.
- Simon DK, O'Leary DDM (1990). Limited topographic specificity in the targeting and ching of mammalian retinal axons. *Dev Biol.* 137: 125-134.
- Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (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: 866-78.
- 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, Qugley HA, Marsh-Armstrong N (2011). Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 435-441.
- Stein BE (1984). Development of the superior colliculus. *Ann Rev Neurosci.* 7: 95-125.
- Stöckli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Götz R, Lindholm D, Thoenen H (1989). Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature.* 342(6252): 920-3.
- Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y (1999). Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40: 3084-3090.
- 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.
- Szel A, Röhlich P (1992). Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Exp Eye Res.* 55(1): 47-52.
- Szel A, Röhlich P, van Veen T (1993). Short-wave sensitive cones in the rodent retinas. *Exp Eye Res.* 57:503-505.
- Takano M, Horie H, Iijima Y, Dezawa M, Sawada H, Ishikawa Y (2002). Brain-derived neurotrophic factor enhances neurite regeneration from retinal ganglion cells in aged human retina in vitro. *Exp Eye Res.* 74(2): 319-23.
- Tezel G, Chauhan BC, LeBlanc RP, Wax MB (2003). Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(7): 3025-33.
- 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.* 406: 317-21.
- Thanos S (1988). Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites in the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments. *Cell Tissue Res.* 254: 599-609.
- 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: 144-9.
- Thanos S (1991a). 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: 1189-1209.

- Thanos S (1991b). Specific transcelular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neurosci Lett.* 127: 108-112.
- Thanos S (1993). Function-dependent labelling of microglial cells by means of carbocyanine dyes in vivo. *Clin Neuropathol.* 12: 298-301.
- Thanos S, Pavlidis C, Mey J, Thiel HJ (1992). Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp Eye Res.* 55: 101-117.
- Theil T, McLean-Hunter S, Zornig M, Moroy T (1993). Mouse Brn-3 family of POU transcription factors: a new aminoterminal domain is crucial for the oncogenic activity of Brn-3a. *Nucleic Acids Res.* 21: 5921-9.
- Thomas WE (1992). Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions, *Brain Res. Rev.* 17: 61-74.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science.* 281(5381): 1312-6.
- Van Gelder RN (2003). Making (a) sense of non-visual ocular photoreception. *Trends Neurosci.* 26: 458-461.
- Vecino E, Caminos E, Ugarte M, Martín-Zanca D, Osborne NN (1998). Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptors in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion. *Gen Pharmacol.* 30(3): 305-14.
- Vela JM, Dalmau I, González B, Castellano B (1995). Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 361:602-616.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Pérez MP, Thanos S, Aguayo AJ (1987). Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci.* 7: 2894-909.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ (1988). Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp Neurol.* 102: 92-101.
- Vidal SM (1990). Regeneration of the visual system in the rat. Essay rewarded by the Premio de la Academia Curso 1989. *An R Acad Nac Med (Madr)* 107: 17-49.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1991). Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol* 20, 940e952.
- Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Selles-Navarro I, Rodriguez E, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Perez 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 (2001a). Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol.* 45 Suppl 3:S261-7; discussion S273-6.
- Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor-Torroglosa S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP (2001b). Brimonidine's neuroprotective effects against transient ischaemia-induced retinal ganglion cell death. *Eur J Ophthalmol. Suppl* 2: S36-S40.
- Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Selles-Navarro I, Rodriguez ME, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Pérez MP (2003). Retinal Ischemia. In: Levin LA, Di Polo A, eds. *Ocular neuroprotection.* New York: p. 129-152.
- Vidal-Sanz M (2006). La vía visual como modelo para el estudio de la degeneración, regeneración y neuroprotección en el sistema nervioso central. *Academia de Ciencias de la Región de Murcia Ed. Murcia.*

- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, de Imperial JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP (2012). Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res.* 31(1): 1-27.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1988). Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci.* 8: 265-80.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ (1993). Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol.* 24: 23-36.
- Volgyi B, Chheda S, Bloomfield SA (2009). Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol.* 512(5): 664–87.
- 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: 1618-24.
- Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R (2000). Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Müller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41(3): 927-36.
- Wang DY, Ray A, Rodgers K, Ergorul C, Hyman BT, Huang W, Grosskreutz CL (2010). Global gene expression changes in rat retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51(8): 4084-95.
- Wang X, Tay SS, Ng YK (2000). An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res.* 132(4): 476-84.
- Watanabe M, Fukuda Y (2002). Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats. *Prog Retin Eye Res.* 21(6): 529-53.
- Watson FL, Heerssen HM, Moheban DB, Lin MZ, Sauvageot CM, Bhattacharyya A, Pomeroy SL, Segal RA (1999). Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci.* 19(18): 7889-900.
- Weber AJ, Harman CD (2008). BDNF preserves the dendritic morphology of alpha and beta ganglion cells in the cat retina after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 2456-2463.
- Weber AJ, Viswanathan S, Ramanathan C, Harman CD (2010). Combined application of BDNF to the eye and brain enhances ganglion cell survival and function in the cat after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 327-334.
- Weibel D, Kreutzberg GW, Schwab ME (1995). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve. *Brain Res.* 679(2): 249-54.
- Wetmore C, Ernfors P, Persson H, Olson L (1990). Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp Neurol.* 109(2): 141-52.
- WilsonRB, Kunchithapautham K, Rohrer B (2007). Paradoxical role of BDNF: BDNF+/- retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 2877-2886.
- Wohl SG, Schmeer CW, Witte OW, Isenmann S (2010). Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51: 2686-96.
- WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA (2001). Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42: 2849-55.

- Xiang M, Zhou L, Peng YW, Eddy RL, Shows TB, Nathans J (1993). Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells. *Neuron*. 11(4): 689-701.
- Xiang M, Zhou L, Macke JP, Yoshioka T, Hendry SH, Eddy RL, Shows TB, Nathans J (1995). The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci*. 15: 4762-85.
- Yan Q, Wang J, Matheson CR, Urich JL (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol*. 38: 382-390.
- Yokoyama S (2000). Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog Retin Eye Res*. 19:385-419.
- Yoles E, & Schwartz M (1998). Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: Implications for optic nerve neuropathies. *Experimental Neurology*. 153: 1–7.
- Yoles E, Wheeler LA, Schwartz M (1999). Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40: 65-73.
- Zhang C, Tso MOM (2003). Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy. *J Neurosci Res* 73:840–845.
- Zhang GX, Li J, Ventura E, Rostami A (2002). Parenchymal microglia of naive adult C57BL/6J mice express high levels of B7.1, B7.2, and MHC class II. *Exp Mol Pathol*. 73: 35–45.
- Zhang PP, Yang XL, Zhong YM (2012). Cellular localization of P2Y(6) receptor in rat retina. *Neurosci*. 220: 62–69.

9. ANEXO I

9. ANEXO I

Experimental Eye Research 108 (2013) 84–93



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Experimental Eye Research

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

Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat

C. Galindo-Romero^{a,1}, M. Jiménez-López^{a,1}, D. García-Ayuso^a, M. Salinas-Navarro^a, F.M. Nadal-Nicolás^{a,b}, M. Agudo-Barriuso^{a,b}, M.P. Villegas-Pérez^a, M. Avilés-Trigueros^{a,*,2}, M. Vidal-Sanz^{a,*,2}

^a Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias, Campus de Espinardo Universidad de Murcia, E-30100 Espinardo, Murcia, Spain

^b Unidad de Investigación, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2012

Accepted in revised form 14 December 2012

Available online 4 January 2013

Keywords:

melanopsin

Brn3a

retrograde axonal tracing

neighbour map

automated quantification

retinal ganglion cells

adult albino rat

ABSTRACT

Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) respond directly to light and are responsible of the synchronization of the circadian rhythm with the photic stimulus and for the pupillary light reflex. To quantify the total population of rat-ipRGCs and to assess their spatial distribution we have developed an automated routine and used neighbour maps. Moreover, in all analysed retinas we have studied the general population of RGCs – identified by their Brn3a expression – and the population of ipRGCs – identified by melanopsin immunodetection – thus allowing the co-analysis of their topography. Our results show that the total mean number \pm standard deviation of ipRGCs in the albino rat is 2047 ± 309 . Their distribution in the retina seems to be complementary to that of Brn3a⁺RGCs, being denser in the periphery, especially in the superior retina where their highest densities are found in the temporal quadrant, above the visual streak. In addition, by tracing the retinas from both superior colliculi, we have also determined that 90.62% of the ipRGC project to these central targets.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGC) are a subtype of retinal ganglion cells (RGC) that express melanopsin, an opsin that responds directly to light (Berson et al., 2002; Kumbalasisiri and Provencio, 2005; Provencio et al., 2000, 2002). ipRGCs are responsible for non-image forming visual functions such as the regulation of the circadian rhythm and the pupillary light reflex (Berson et al., 2002; Hankins et al., 2008; Hattar et al., 2002, 2003; Lucas et al., 2003; Panda et al., 2003). Recently, however, it has been suggested that they also play a role in image forming vision (Schmidt et al., 2011) and may contribute to signal brightness discrimination (Brown et al., 2012; Semo et al., 2010).

ipRGCs that drive the circadian rhythm project mainly to the suprachiasmatic nucleus (Berson et al., 2002; Gooley et al., 2001), while those that are responsible for the pupillary reflex project to

the intergeniculate leaflet and pretectal olivary nucleus (reviewed in Berson, 2003). In mice, it has been shown that ipRGCs project as well to the superior colliculi (SCi) (reviewed in Hattar et al., 2006).

In the adult rat, ipRGCs represent around 1–3% of the population of RGCs and are distributed throughout the entire retina, being denser in the supero-temporal pole (Hannibal and Fahrenkrug, 2002; Hattar et al., 2002). In rats and mice, RGCs project mainly to the SCi (Lund, 1965; Perry, 1981), reviewed in Sefton et al. (2005), thus, by applying retrogradely transported neuronal tracers such as fluorogold (FG) to these target regions, approximately 98.4% of the RGC can be identified (Salinas-Navarro et al., 2009a, 2009b). To identify the entire retinofugal population retrogradely transported neuronal tracers may be applied to the optic nerve stump and this method also allows identification of the small percentage of rodent RGCs that do not project to the SCi (Salinas-Navarro et al., 2009a, 2009b). RGCs may also be identified by their expression of specific proteins, such as Brn3a (Nadal-Nicolás et al., 2009) or mRNAs, such as γ -synuclein (Nguyen et al., 2011; Soto et al., 2008; Surgucheva et al., 2008). In rat, Brn3a is expressed by approximately 92.2% of the RGC population (Nadal-Nicolás et al., 2009), leaving aside half of the RGCs that project ipsilaterally and most of the ipRGCs (Nadal-Nicolás et al., 2012).

* Corresponding author. Tel.: +34 868 883961; fax: +34 868 883962.

** Corresponding author. Tel.: +34 868 887572; fax: +34 868 883962.

E-mail addresses: marcelin@um.es (M. Avilés-Trigueros), manuel.vidal@um.es

(M. Vidal-Sanz).

¹ Joint first authors.

² Joint last authors.

In our laboratory we have developed several automated methods to quantify different retinal populations, such as photoreceptors (Ortin-Martinez et al., 2010) and RGCs, either traced (Galindo-Romero et al., 2011; Salinas-Navarro et al., 2009a, 2009b) or immunodetected by their expression of Brn3a (Galindo-Romero et al., 2011; Nadal-Nicolas et al., 2009). Automated quantification in whole-mounted retinas allows the analysis of their spatial distribution using isodensity maps and to assess objectively their survival after different injuries, pathologies or neuroprotective strategies (Garcia-Ayuso et al., 2010, 2011; Nadal-Nicolas et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2010; Sanchez-Migallon et al., 2011).

The total population of ipRGCs in rat and their detailed distribution, and relationship with the distribution of the entire RGC population has not been yet fully characterized, nor has it been assessed whether they project to the SCi and if so, in what proportion. Thus, in the present study we: i) develop an automated method to quantify the total population of rat ipRGCs; ii) analyse their spatial distribution using neighbour maps, and iii) compare it with the distribution of Brn3a⁺RGCs.

2. Material and methods

2.1. Animal handling and anaesthesia

Two month old female (180–200 g) albino Sprague–Dawley (SD) rats from the breeding colony of Janvier (Le Genest-St-Isle, France) 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.

Animals groups subjected to surgery: for anaesthesia a mixture of xylazine (10 mg/kg body weight; Rompun[®]; Bayer, Kiel, Germany) and ketamine (60 mg/kg body weight; Ketolar[®]; Pfizer, Alcobendas, Madrid, Spain) was used intraperitoneally (i.p.). After surgery, an ointment containing tobramycin (Tobrex; Alcon S. A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent its desiccation. All animals were sacrificed with an i.p. injection of an overdose of pentobarbital (Dolethal, Vetoquinol[®], Especialidades Veterinarias, S. A., Alcobendas, Madrid, Spain).

2.2. Experimental design

Animals were divided in three experimental groups: i) Tracing from the ocular stump of the intraorbitally transected optic nerve (ON). This group was used to investigate whether all retinal neurons immunodetected with melanopsin antibodies send their axons through the ON ($n = 8$ retinas); ii) Tracing from both superior colliculi (SCi), to assess the proportion of ipRGCs that project their axons to the SCi ($n = 10$ retinas); iii) Brn3a immunodetection, this latter group was used to quantify and compare the spatial distribution of the total population of ipRGCs and Brn3a⁺RGCs in the same retinas ($n = 10$, 5 right and 5 left retinas); iv) untouched retinas processed for vertical sections ($n = 2$).

2.3. Retinal ganglion cell tracing

2.3.1. Fluorogold tracing from the optic nerve stump

Three days before processing, a small piece of gelatine sponge (Espongostan Film, Ferrosan A/S, Denmark) soaked in 6% Fluorogold (Fluorochrome Inc., Englewood, CO, USA) diluted in 10% dimethyl sulphoxide–saline, was applied to the ocular stump of the left transected optic nerve, approximately at 3 mm from the optic

disc, following previously described methods (Salinas-Navarro et al., 2009b).

2.3.2. Fluorogold tracing from both superior colliculi

One week before processing, FG was applied onto both SCi following previously described methods (Salinas-Navarro et al., 2009a, 2009b; Vidal-Sanz et al., 1988; Villegas-Perez et al., 1996; Wang et al., 2003).

2.4. Tissue processing

After euthanasia, animals were perfused transcardially first with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Eyes were enucleated and the retinas dissected as whole-mounts as previously reported (Salinas-Navarro et al., 2009b). To maintain eye orientation, a suture was placed on the dorsal (superior) pole of each eye and when dissecting the retina four radial cuts were done: nasal, temporal, ventral (inferior), and dorsal (superior); this was the deepest one.

For cryostat sectioning, 2 dissected eyes were cryoprotected in 30% sucrose (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) before embedding them in optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek, Torrance, CA).

2.5. Immunohistochemistry

Flat mounted retinas were permeated in phosphate buffer saline (PBS) with 0.5% Triton X-100 by freezing them during 15 min at -70 °C, rinsed in new PBS-0.5% Triton X-100 and incubated overnight at 4 °C with the primary antibody diluted in blocking buffer (PBS, 2% normal donkey serum, 2% Triton X-100). Then, retinas were washed three times in PBS and incubated 2 h at room temperature with the secondary antibody diluted in PBS-2% Triton X-100. Finally, retinas were thoroughly washed in PBS and mounted vitreal side up on subbed slides and covered with anti-fading solution.

Vertical sections obtained by cryostat sectioning (15 μ m) were washed 3 times with PBS to eliminate the OCT; then, sections were incubated overnight at 4 °C with the appropriate antibodies diluted in blocking buffer (PBS, 2% donkey normal serum, 0.1% Triton X-100). Next day, sections were washed with PBS-0.1% Triton and incubated 1 h at room temperature with fluorescence conjugated-secondary antibodies diluted in the same blocking buffer. Finally, after thorough washing in PBS-0.1% Triton, sections were rinsed in PBS and mounted with anti-fading Vecta-Shield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Alicante, Spain) to counterstain all retinal nuclei.

2.6. Antibodies and working dilutions

2.6.1. Primary antibodies

Rabbit anti-melanopsin (1:500, PAI-780 Cultek, Spain) to detect M1–M3 ipRGCs, since M4 and M5 subtypes are not stained with melanopsin antibodies (reviewed in Schmidt et al., 2011). Goat anti-Brn3a (1:500, C-20, Santa Cruz Biotechnologies Heidelberg, Germany) to detect the RGC population (Nadal-Nicolas et al., 2009, 2012). Mouse anti-rhodopsin (1:10,000, Sigma–Aldrich, Alcobendas, Spain) to detect rod photoreceptors.

2.6.2. Secondary antibodies

Donkey anti-goat Alexa-594, donkey anti-rabbit Alexa-488, donkey anti-mouse Alexa 594, and donkey anti-rabbit Alexa-594 (Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) diluted each 1:500.

2.7. Manual quantification

This analysis was done to determine the percentage of ipRGCs that were traced from the ON, from the SCi or that expressed Brn3a. Microphotographs of different representative areas spanning the whole the retina were taken to assess the co-localization between ipRGCs and FG or ipRGC and Brn3a. To do this, melanopsin and FG or Brn3a signal for each image was acquired. Images of melanopsin and FG or melanopsin and Brn3a of the same area were overlapped with Adobe Photoshop and the percentage of ipRGCs that co-localized with FG or Brn3a was calculated, considering 100% the total number of ipRGCs.

2.8. Whole-mounts retinal analysis

Whole-mounted retinas were photographed for Brn3a and melanopsin signal 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 IPP (IPP 5.1 for Windows; Media Cybernetics, Silver Spring, MD), as previously described (Salinas-Navarro et al., 2009b). Reconstructed photomontages were analysed as detailed in 2.8. Vertical sections were photographed using the same microscope, acquiring for the same frame Brn3a, melanopsin and DAPI or rhodopsin, melanopsin and DAPI signal.

2.9. Image analyses

In the retinal photomontages from group iii, where Brn3a⁺RGCs and ipRGCs were double detected, the total number of these cells and their spatial distribution was studied as follows:

2.9.1. Automated quantification of the total population of Brn3a⁺RGCs

The individual Brn3a images taken for each retinal wholemount were processed after a specific cell-counting routines developed by

our group. Briefly, we used the IPP macro language to apply a sequence of filters and transformations to each image to clarify cell limits and to separate individual cells for automated cell counting previously reported in detail for Brn3a (Nadal-Nicolas et al., 2009).

2.9.2. Spatial distribution of Brn3a⁺RGCs

Isodensity maps were constructed through a quadrant analysis as previously described (Nadal-Nicolas et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009b).

2.9.3. Automated quantification of the total population of ipRGCs

In a first step, the user was asked to mark the ON as a reference point in the retina, and draw the retina contour in order to measure the total area. Next, image was passed through the Flatten filter, which evens out background variations, reducing intensity variations in the background pixels. The resultant image data were converted 16-bit grey scale to discard the colour information. This step was followed by the application of the HiPass (kernel size 5×5) filter to enhance high-frequency information, replacing central pixel with a value that increases contrast from its neighbours. Then, Median (5×5) filter was applied to remove impulse noise. Finally, the resultant images were passed through the Sharpen (5×5) filter to enhance fine detail, using the un-sharp masking technique. Cell clusters were separated using the IPP watershed split morphologic filter, which erodes and dilates objects separating overlapping ones. For each ipRGC its centre mass position coordinates (x, y) was measured. Finally, the data of each count including optic nerve spatial coordinates, total number of cells, and centre mass position of each cell, were displayed and exported by dynamic data exchange to a spreadsheet (Office Excel 2000; Microsoft Corp., Redmond, WA) where the data were filed and saved for further analysis.

2.9.4. Validation of the ipRGCs automated counting method

Three different experienced investigators counted manually, in a masked fashion a total of 685 ipRGCs present in 15 frames

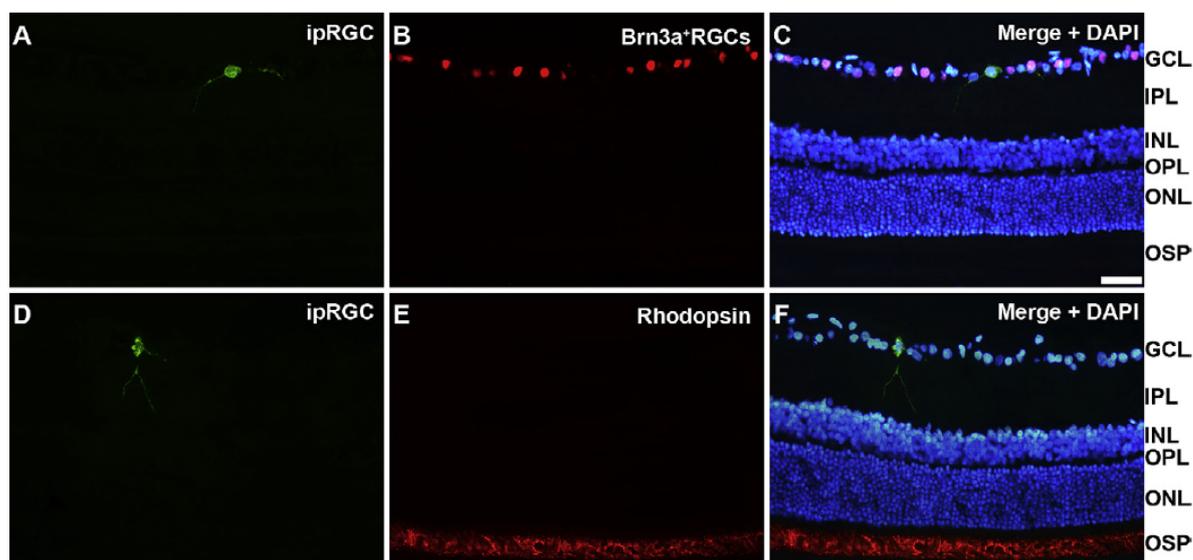


Fig. 1. Retinal integrity in the adult albino rat retina. A–C: Vertical sections showing double immunodetection of melanopsin (A, ipRGCs) and Brn3a (B, RGCs) and the merged image with DAPI nuclear counterstaining (C). D–F: Vertical sections showing double immunodetection of melanopsin (D, ipRGCs) and rhodopsin (E, rods) and the merged image with DAPI nuclear counterstaining (F). The retinal layers are shown at the right: GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer, OSP: outer segments of photoreceptors. Bar: 50 μ m.

representing different ipRGC density regions which were randomly selected from 5 retinas. These results were plotted against the counts obtained automatically 688 ipRGCs, and there was a strong correlation between both methods (Pearson correlation test, $R^2 = 0.96$) that validates this automated routine.

2.9.5. Spatial distribution of ipRGCs

The use of the isodensity maps to analyse the distribution of ipRGC was not employed because of the low density of these neurons. Instead, we have used the k -nearest neighbour algorithm

with a fixed radius technique. For this, a new Java (Oracle Corporation, Redwood Shores, California, USA) application was developed. In a first step, the user fixed the radius of the study (0.22 mm) and imported the spreadsheet obtained as result of the previously described automated ipRGCs counting routine. In a second step the total number of cells, ON spatial coordinates, cell set and its attributes were loaded from the provided file. This step was followed by the shift of the coordinate system to the ON, producing as result a complete translation of all cell coordinates. Then, for each cell the number of neighbours was calculated measuring the

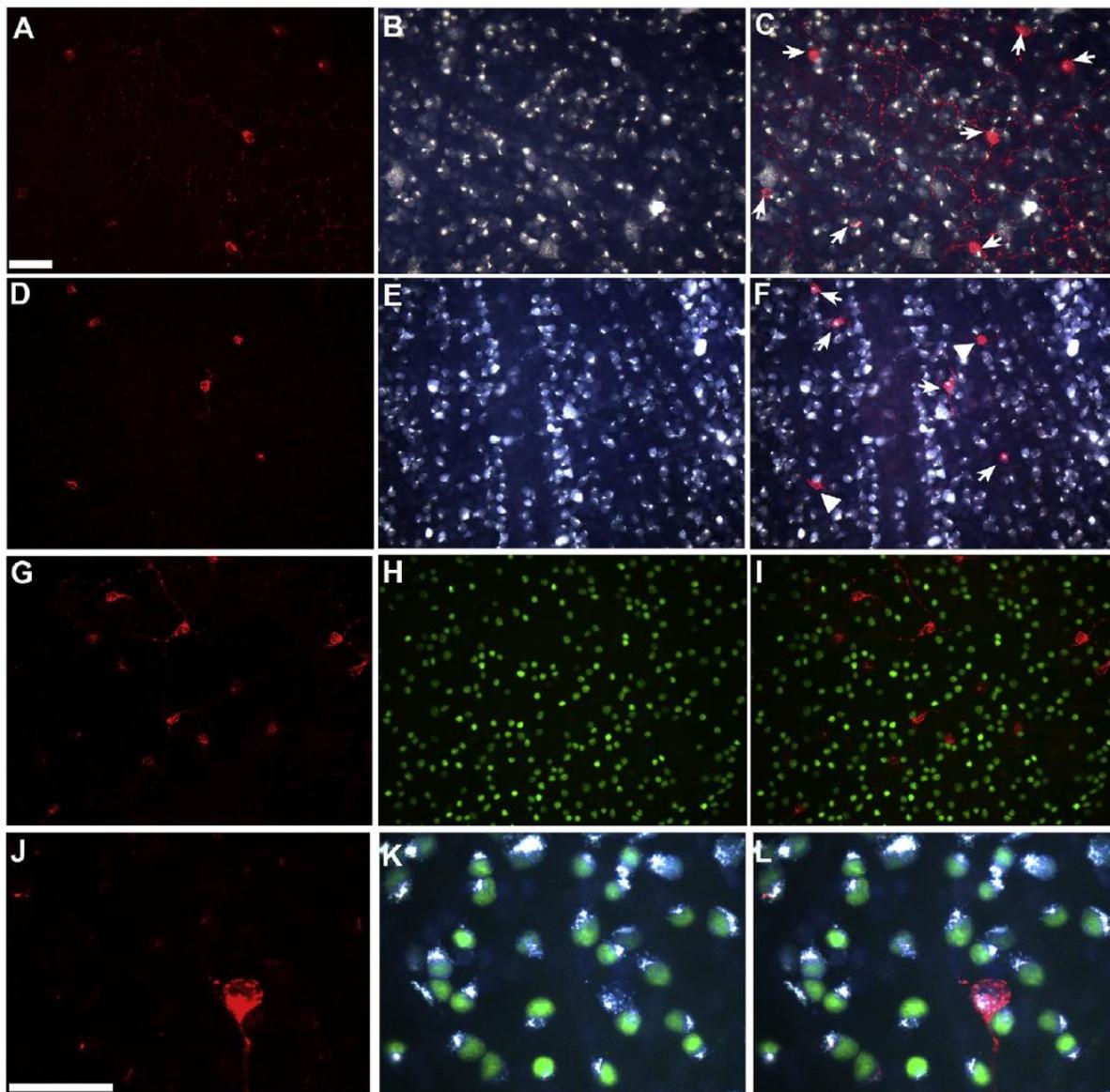


Fig. 2. Identification of ipRGCs on retinal flat-mounts. A–C: Melanopsin immunodetection (A) in flat mounted retinas traced from the optic nerve (B). C: merged image where is observed that all ipRGCs are traced (arrows). D–F: Melanopsin immunodetection (D) in flat mounted retinas traced from both superior colliculi (E). F: merged image where is observed that while some ipRGCs are traced (arrows), some of them are not; hence they do not project to the SCI (arrowheads). G–I: Double immunodetection of melanopsin (G) and Brn3a (H) in flat mounted retinas. In the merged image (I) is observed that ipRGCs do not express this transcription factor. J–L: melanopsin immunodetection (J) in FG-traced retinas (K) immunodetected as well for Brn3a (green). In L both images have been merged. Bar in A and J = 50 μ m.

euclidean distance to the rest of cells, those cells closer than the fixed radius were counted. Finally, spatial study data was saved as plain text file with rows separated by tab characters, this data is easily readable by excel and included for each cell the mass position coordinates, total number of neighbours, distance to the ON and cartesian quadrant. Spatial information was used to spatially plot every ipRGC, and the number of neighbours served to colour each ipRGCs with a colour scale representing the number of neighbours for each one. Data gathered after this analysis, allowed the extraction of the number of ipRGCs at a given distance from the optic nerve in the whole retina and in each retinal quadrant. These data were subsequently represented in bar graphs (number of cells against distance from the optic nerve). All plots were performed using SigmaPlot (SigmaPlot® 9.0 for Windows®; Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU).

3. Results

3.1. Retinal integrity in the albino rat

It has been described that there is a progressive degeneration of the outer photoreceptors (rods and cones) in albino rats with ageing (O'Steen et al., 1974). To check the retinal integrity of the animals used in this study, retinal vertical sections were analysed. Fig. 1 shows magnifications from retinal sections in which melanopsin (A, D) and Brn3a (B) or rhodopsin (E) have been double immunodetected. In C and F is shown the merged image where all the retinal nuclei have been counter-stained with DAPI. In these images is observed that in the albino rats used in this work there is no apparent degeneration of the outer photoreceptors since the number of nuclei rows in the outer nuclear layer is between normal numbers (12–16 nuclei). In addition rhodopsin signal (circumscribed to the outer segment of rods photoreceptors) is strong and homogeneous.

3.2. ipRGCs tracing and Brn3a expression

To investigate whether ipRGCs send their axons through the ON, retinas traced with FG applied to the ocular stump of the intra-orbitally transected ON were used. Out of the 734 ipRGCs counted, 727 were FG positive (Fig. 2A–C). To investigate whether ipRGCs project their axons to SCI, retinas retrogradely traced from both SCI were used. Out of 671 ipRGCs counted, 611 were FG positive (Fig. 2D–F). Finally, Brn3a and melanopsin were doubly immunodetected to assess whether ipRGCs express this transcription factor. Out of 1439 ipRGCs, only 3 expressed Brn3a (Fig. 2G–I). Thus, as expected, almost all (99.05%) of the ipRGCs were traced from the ON stump, 90.62% from both SCI, and only a minute proportion of them (0.20%) were Brn3a⁺, and these results are in agreement with recent observations (Nadal-Nicolas et al., 2012).

3.3. Total number and spatial distribution of ipRGCs and Brn3a⁺RGCs

In order to compare the total number and the topography of RGCs and ipRGCs, Brn3a and melanopsin signal was analysed in the same retinas. Brn3a⁺RGCs were automatically counted using previously described methods (Nadal-Nicolas et al., 2009) while to quantify ipRGCs a new routine was developed and validated (see

Table 1

Total number of ipRGCs and Brn3a⁺RGCs. Total number of ipRGCs and Brn3a⁺RGCs automatically quantified in the 5 right and 5 left retinas analysed in this work. The last row shows the mean ± standard deviation.

Rat	Retina	Brn3a ⁺ RGCs	ipRGCs
1	Right	80,914	1966
	Left	82,564	1745
2	Right	75,627	2496
	Left	78,689	2265
3	Right	79,558	1704
	Left	78,640	1989
4	Right	77,864	2360
	Left	75,900	2412
5	Right	81,518	1776
	Left	77,956	1752
Mean ± SD		78,923	2047
		2274	±309

point 2.8.4). Quantitative results are shown in Table 1. To analyse the distribution of both neuronal populations, isodensity maps were constructed for the Brn3a⁺RGCs and neighbour maps for the ipRGCs (Fig. 3A, B, E–F). Brn3a is not expressed by ipRGCs, thus in the isodensity maps the ipRGCs are not represented and vice versa.

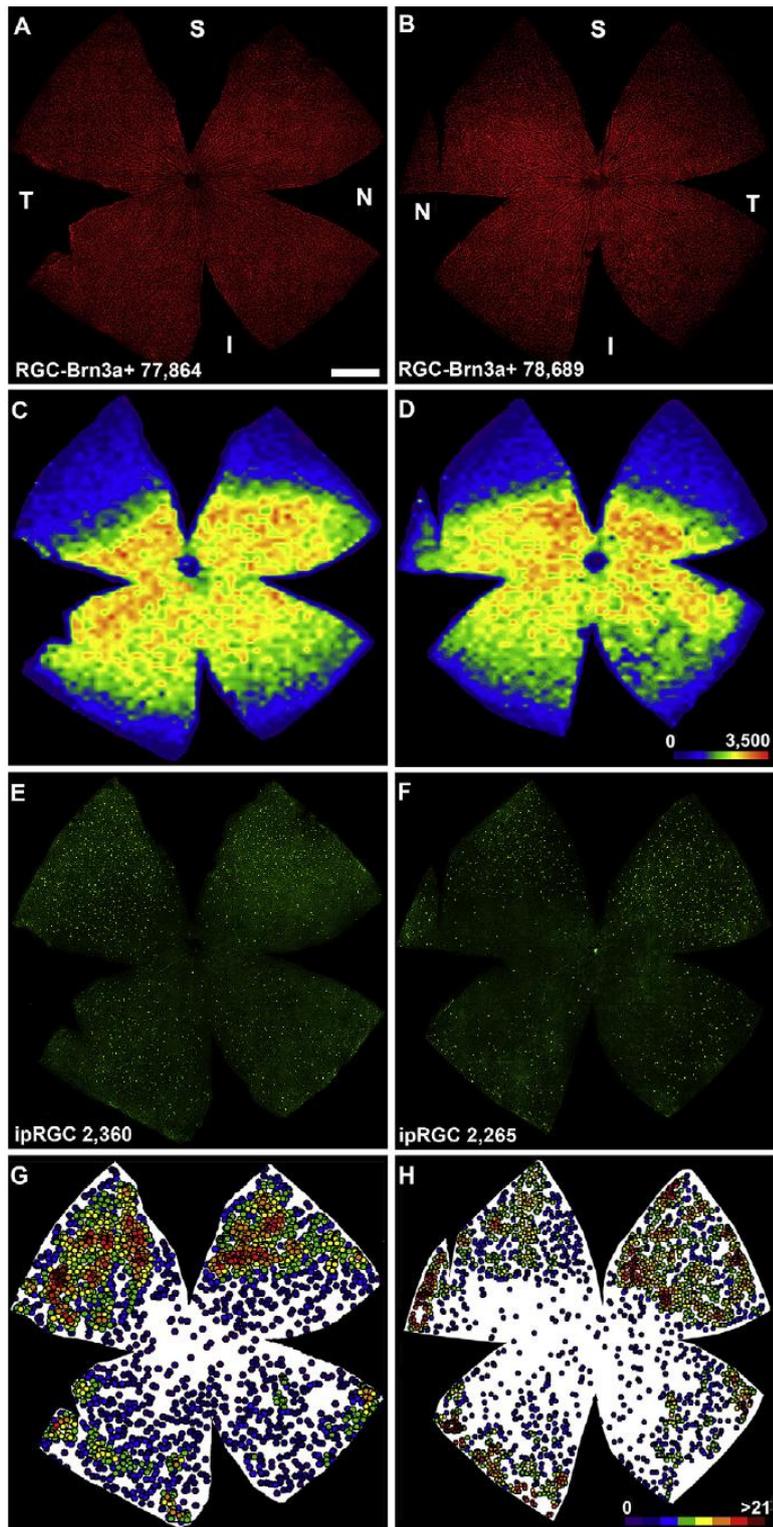
As previously described (Nadal-Nicolas et al., 2009, 2012), Brn3a⁺RGCs are denser in the superior retina, peaking along the naso-temporal axis above the optic nerve (Fig. 3C, D), wherein the highest density is found in the temporal quadrant. Likewise, ipRGCs were more abundant in the supero-temporal retina (Fig. 3G, H) but they are shifted to the periphery, populating the retinal region with lower RGC densities. In other words, Brn3a⁺RGCs and ipRGCs seem to distribute in complementary regions of the retina (Fig. 4).

To determine quantitatively the retinal location of ipRGCs, data from the neighbour maps in Fig. 3 were translated into graphs (Fig. 5). Here is shown that on average, i.e. plotting data from the whole retina, ipRGCs are more abundant between 3.3 and 4.4 mm from the optic nerve (Fig. 5B, E). However, when looking at each quadrant it is observed, in addition of that clearly seen in the neighbour maps, that: i) in the infero-nasal quadrant their distribution is homogeneous from 2.2 mm of the optic nerve till the periphery, and ii) in the infero-temporal quadrant they are denser in the periphery (Fig. 5C, F).

4. Discussion

Intrinsically photosensitive RGCs have been the subject of intense research since their discovery by Provencio et al., 2000. They are responsible for driving the circadian photoentrainment and pupillary reflex. Thus, explaining the alteration of the circadian system in rodent models of glaucoma (Drouyer et al., 2008). In addition, they play a role in migraine photophobia, sleep and alertness and neonatal avoidance of light (Schmidt et al., 2011). Together with RGCs, they are involved in mood control (Roeklein and Rohan, 2005), and might contribute to higher cognitive functions, pattern and colour vision (Brown et al., 2010; Zaidi et al., 2007). They are activated directly by light (Berson et al., 2002) and also by input from rod and cones, and their population decreases with age (Semo et al., 2003; Vugler et al., 2008). Furthermore, in a rat model of retinal degeneration it has been shown that, although their population decreases, the remaining ipRGCs show signs of remodelling (Vugler et al., 2008).

Fig. 3. Distribution of ipRGCs and Brn3a⁺RGCs. Photomontages of the same right (A, E) and left (B, F) retina showing Brn3a⁺RGCs (A, B) and ipRGCs (E, F). At the bottom of each one is shown its number of Brn3a⁺RGCs or ipRGCs. C, D: isodensity maps generated from A and B respectively, showing the spatial distribution of Brn3a⁺RGCs. Isodensity maps are filled contour plots generated by assigning a colour code to each one of the 64 subdivisions of each individual frame according to its RGC density within a 28-step colour scale ranging from 0 (purple) to 3500 or higher (red) RGCs/mm². G–H neighbour maps created from E and F showing the spatial distribution of ipRGCs. Colour scale ranges from 0 (purple) to 21 or more neighbours (shown in more detail in Fig. 3). S: superior; T: temporal; I: inferior; N: nasal. Bar = 1 mm.



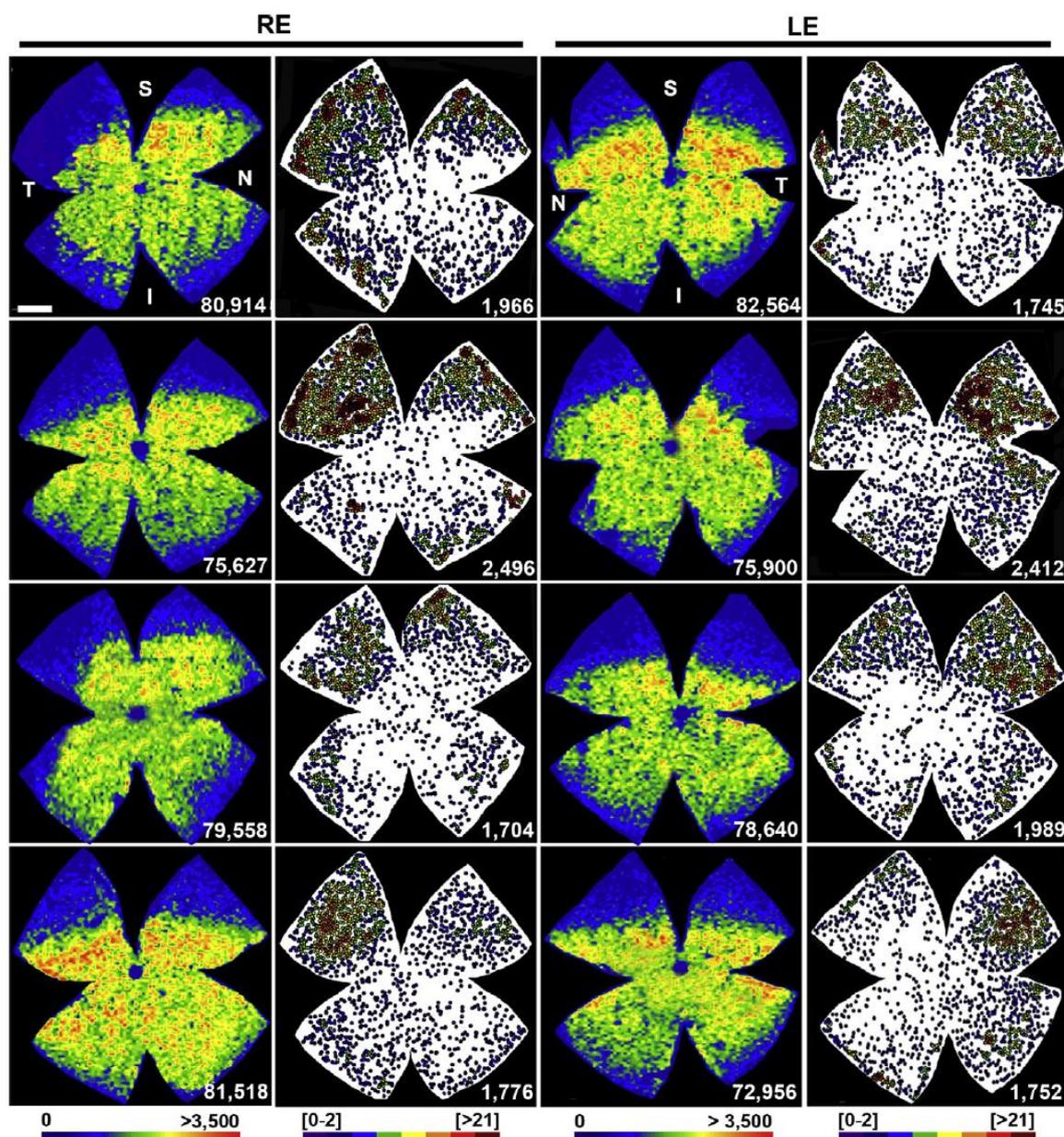


Fig. 4. ipRGCs distribution in individual retinas. First and third columns: isodensity maps showing the distribution of Brn3a⁺RGCs in the rest of the retinas analysed in this work. Second and fourth columns: their corresponding neighbour maps showing the distribution of ipRGCs. At the bottom-right of each map is shown the number of RGCs represented. Colour scale bars are shown at the bottom of the figure. RE: right eyes, LE: left eyes. S: superior; T: temporal; I: inferior; N: nasal.

Anatomically, they are diverse, and at least 5 subtypes have been found, depending on their dendritic stratification in the inner plexiform layer (IPL) (Schmidt et al., 2011). Most of them are placed in the ganglion cell layer but some are displaced to the inner nuclear layer (reviewed in Sand et al., 2012; Schmidt et al., 2011; Schmidt and Kofuji, 2009). Here we have analysed the population of ipRGCs present in the ganglion cell layer.

Most of rat and mouse RGCs express one, two or the three members of Brn3 family of class IV POU-domain transcription

factors in the adulthood (Galindo-Romero et al., 2011; Nadal-Nicolas et al., 2009, 2012). These factors play essential roles in the development, differentiation, morphology and function of RGCs (Badea et al., 2009; Badea and Nathans, 2011; Isenmann et al., 2003; Kiyama et al., 2011; Wang et al., 2002; Xiang et al., 1996). In adult rats and mice ipRGCs do not express Brn3c (Jain et al., 2012; Nadal-Nicolas et al., 2012), a minute proportion express Brn3a in rat (this work and Nadal-Nicolas et al., 2012) and close to 10% in rat and 63% in mouse express Brn3b (Chen et al., 2011; Jain et al., 2012;

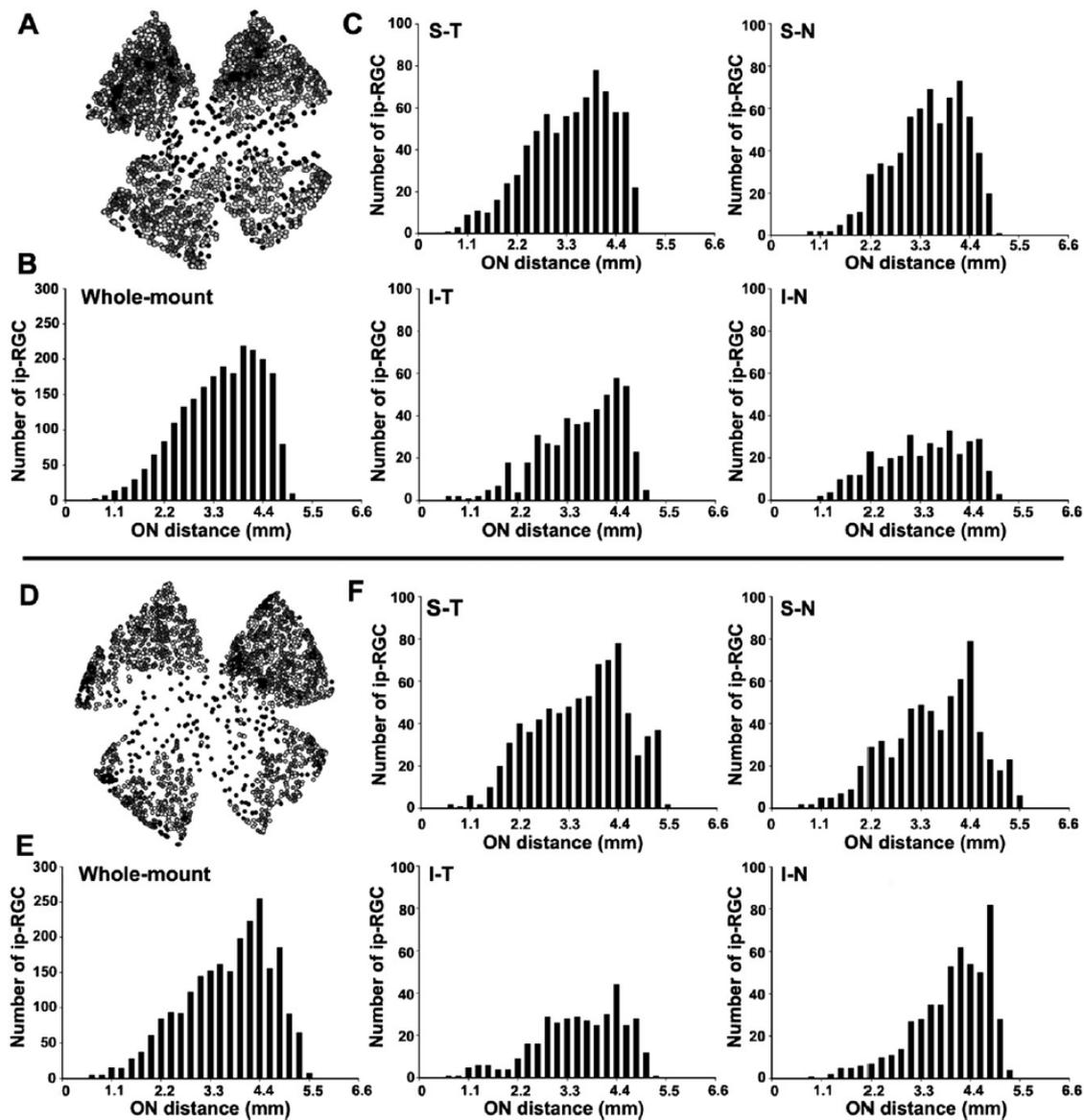


Fig. 5. Analysis of ipRGCs distribution: retinal quadrants and distance from the optic nerve. A, D: neighbour maps shown in Fig. 2G, H respectively. From the data gathered in the neighbour analysis, the number of ipRGCs at a given distance from the optic nerve was extracted and plotted for these retinas (B, E). In addition, these data can be divided into retinal quadrants (C, F) to show the number of ipRGCs per distance from the optic nerve in the supero-temporal (ST), supero-nasal (SN), infero-temporal (IT) and infero-nasal (IN) quadrants.

Schmidt et al., 2011). Interestingly, Dhingra et al. (2011) showed that in the *rd1* mouse, a strain that loses its photoreceptors with age, around 93% of the ipRGCs expressed Brn3b, while in the wild type mouse this percentage is around 63%. Thus suggesting that Brn3 expression by ipRGCs may be inhibited by photoreceptors.

Here we have assessed the total number of ipRGCs in rat, characterized the proportion of them that project to the superior colliculi, and analysed their spatial distribution. By analysing in the same retinas the population of Brn3a⁺RGCs and ipRGCs we show, for the first time, the retinal co-distribution of both RGC populations.

The automated routine developed in this work allows the objective quantification of all the ipRGCs in the rat retina and sets their normal values in albino rats. In this rat strain, the population of RGCs traced from the optic nerve amounts to $85,063 \pm 1330$ (Salinas-Navarro et al., 2009b) thus ipRGCs represent for 2.4% of the total RGC population, in accordance with previous reports where it has been reported that this percentage ranges from 1 to 3% (Hattar et al., 2002).

In mouse, it has been shown that, in addition to other central targets, ipRGCs project as well to the SCi (Brown et al., 2010; Ecker et al., 2010; Hattar et al., 2006). Here we show that, in rat, 90.62% of

ipRGCs are traced when FG is applied to both SCI, thus most of them send co-laterals to these brain areas. We have not assessed here the proportion of ipRGCs that project to the ipsilateral or contralateral SC; however having in mind the spatial distribution of the ipsilateral population (Nadal-Nicolas et al., 2012) and the topography of ipRGCs, it is likely that most of the ipRGCs projecting to the SCI do so contralaterally.

What is the role of this massive ipRGC projection to the SCI? Data presented here are not enough to answer this question, but it is possible that they play a role in the response to light stimuli i.e. brightness perception. The involvement of ipRGCs in brightness perception may be more significant in neonatal than in adults. This is based on recent reports showing that in adult mice this response involves at least the visual cortex (Brown et al., 2012; Semo et al., 2010), and in the fact that in neonatal rats colliculectomy prevents the negative phototaxis observed in untouched pups (Routtenberg et al., 1978).

With respect to their retinal distribution, we show here, in agreement with (Hattar et al., 2002) and (Hannibal and Fahrenkrug, 2002) that they are more abundant in the supero-temporal quadrant. Because the neighbour maps illustrate the number of ipRGCs around a given ipRGC within a fixed radius, it is observed as well that they are clustered forming a C-like shape that goes from the superior-temporal to the supero-nasal retina above the visual streak, defined by the area of Brn3a⁺RGC higher densities (Nadal-Nicolas et al., 2009; Ortin-Martinez et al., 2010; Salinas-Navarro et al., 2009b). Thus ipRGCs and Brn3a⁺RGCs have a complementary distribution which can be explained by the main functional role of each population. While RGCs concentrate in the visual streak provided the best vision at the horizon of visual field, ipRGCs sense the light to synchronize the circadian rhythm and trigger the pupillary reflex.

Acknowledgements

This work has been funded by: Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and ISCIII-FEDER “Una manera de hacer Europa”: PI10/00187, PI10/01496, Fundación Séneca 04446/GERM/07; Spanish Ministry of Education and Science SAF-22010-10385 and Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología RD07/0062/0001.

References

- Badea, T.C., Cahill, H., Ecker, J., Hattar, S., Nathans, J., 2009. Distinct roles of transcription factors *brn3a* and *brn3b* in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron* 61, 852–864.
- Badea, T.C., Nathans, J., 2011. Morphologies of mouse retinal ganglion cells expressing transcription factors *Brn3a*, *Brn3b*, and *Brn3c*: analysis of wild type and mutant cells using genetically-directed sparse labeling. *Vis. Res.* 51, 269–279.
- Berson, D.M., 2003. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.* 26, 314–320.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M., 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070–1073.
- Brown, T.M., Gias, C., Hatori, M., Keding, S.R., Semo, M., Coffey, P.J., Gigg, J., Piggins, H.D., Panda, S., Lucas, R.J., 2010. Melanopsin contributions to irradiance coding in the thalamo-cortical visual system. *PLoS Biol.* 8, e1000558.
- Brown, T.M., Tsujimura, S., Allen, A.E., Wynne, J., Bedford, R., Vickery, G., Vugler, A., Lucas, R.J., 2012. Melanopsin-based brightness discrimination in mice and humans. *Curr. Biol.* 22, 1134–1141.
- Chen, S.K., Badea, T.C., Hattar, S., 2011. Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature* 476, 92–95.
- Dhingra, N.K., Jain, V., Guruswamy, R., 2011. M1 type of intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells express *Brn3* transcription factors in rd1 mouse. *ARVO e-abstract* 3458.
- Drouyer, E., Dkhissi-Benyahya, O., Chiquet, C., WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wheeler, L.A., Denis, P., Cooper, H.M., 2008. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One* 3, e3931.
- Ecker, J.L., Dumitrescu, O.N., Wong, K.Y., Alam, N.M., Chen, S.K., LeGates, T., Renna, J.M., Prusky, G.T., Berson, D.M., Hattar, S., 2010. Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron* 67, 49–60.
- Galindo-Romero, C., Aviles-Trigueros, M., Jimenez-Lopez, M., Valiente-Soriano, F.J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolas, F., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriso, M., 2011. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp. Eye Res.* 92, 377–387.
- Garcia-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Agudo, M., Cuenca, N., Pinilla, I., Vidal-Sanz, M., Villegas-Perez, M.P., 2010. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp. Eye Res.* 91, 800–810.
- Garcia-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Agudo-Barriso, M., Alarcon-Martinez, L., Vidal-Sanz, M., Villegas-Perez, M.P., 2011. Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. *Mol. Vis.* 17, 1716–1733.
- Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E., Saper, C.B., 2001. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* 4, 1165.
- Hankins, M.W., Peirson, S.N., Foster, R.G., 2008. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci.* 31, 27–36.
- Hannibal, J., Fahrenkrug, J., 2002. Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock? *Ann. Med.* 34, 401–407.
- Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.W., Berson, D.M., 2006. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326–349.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.W., 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070.
- Hattar, S., Lucas, R.J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R.H., Hankins, M.W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F., Foster, R.G., Yau, K.W., 2003. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76–81.
- Isemann, S., Kretz, A., Cellerino, A., 2003. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 483–543.
- Jain, V., Ravindran, E., Dhingra, N.K., 2012. Differential expression of *Brn3* transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J. Comp. Neurol.* 520, 742–755.
- Kiyama, T., Mao, C.A., Cho, J.H., Fu, X., Pan, P., Mu, X., Klein, W.H., 2011. Overlapping spatiotemporal patterns of regulatory gene expression are required for neuronal progenitors to specify retinal ganglion cell fate. *Vis. Res.* 51, 251–259.
- Kumbalasingi, T., Provencio, I., 2005. Melanopsin and other novel mammalian opsins. *Exp. Eye Res.* 81, 368–375.
- Lucas, R.J., Hattar, S., Takao, M., Berson, D.M., Foster, R.G., Yau, K.W., 2003. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299, 245–247.
- Lund, R.D., 1965. Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science* 149, 1506–1507.
- Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-Lopez, L., Canovas-Martinez, I., Salinas-Navarro, M., Vidal-Sanz, M., Agudo, M., 2009. *Brn3a* as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3860–3868.
- Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Albuquerque-Béjar, J.J., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriso, M., 2012. Whole number, distribution and co-expression of *Brn3* transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One* 7, e49830.
- Nguyen, J.V., Soto, I., Kim, K.Y., Bushong, E.A., Oglesby, E., Valiente-Soriano, F.J., Yang, Z., Davis, C.H., Bedont, J.L., Son, J.L., Wei, J.O., Buchman, V.L., Zack, D.J., Vidal-Sanz, M., Ellisman, M.H., Marsh-Armstrong, N., 2011. Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1176–1181.
- O'Steen, W.K., Anderson, K.V., Shear, C.R., 1974. Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 13, 334–339.
- Ortin-Martinez, A., Jimenez-Lopez, M., Nadal-Nicolas, F.M., Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Sauve, Y., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriso, M., 2010. Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 3171–3183.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay, S.A., Van Gelder, R.N., Hogenesch, J.B., 2003. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301, 525–527.
- Perry, V.H., 1981. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience* 6, 931–944.
- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F., Rollag, M.D., 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20, 600–605.
- Provencio, I., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., 2002. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415, 493.
- Roecklein, K.A., Rohan, K.J., 2005. Seasonal affective disorder: an overview and update. *Psychiatry (Edgmont.)* 2, 20–26.
- Routtenberg, A., Strop, M., Jerdan, J., 1978. Response of the infant rat to light prior to eyelid opening: mediation by the superior colliculus. *Dev. Psychobiol.* 11, 469–478.
- Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Valiente-Soriano, F.J., Jimenez-Lopez, M., Mayor-Torrogosa, S., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp. Eye Res.* 90, 168–183.

- Salinas-Navarro, M., Jimenez-Lopez, M., Valiente-Soriano, F.J., Alarcon-Martinez, L., Aviles-Trigueros, M., Mayor, S., Holmes, T., Lund, R.D., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009a. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vis. Res.* 49, 637–647.
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jimenez-Lopez, M., Aviles-Trigueros, M., Holmes, T.M., Lund, R.D., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009b. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vis. Res.* 49, 115–126.
- Sanchez-Migallon, M.C., Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2011. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.* 92, 260–267.
- Sand, A., Schmidt, T.M., Kofuji, P., 2012. Diverse types of ganglion cell photoreceptors in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 287–302.
- Schmidt, T.M., Chen, S.K., Hattar, S., 2011. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* 34, 572–580.
- Schmidt, T.M., Kofuji, P., 2009. Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 29, 476–482.
- Sefton, A.J., Dreher, B., Hattar, S., 2005. The rat nervous system. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*. Elsevier, San Diego, pp. 1083–1165.
- Semo, M., Gias, C., Ahmado, A., Sugano, E., Allen, A.E., Lawrence, J.M., Tomita, H., Coffey, P.J., Vugler, A.A., 2010. Dissecting a role for melanopsin in behavioural light aversion reveals a response independent of conventional photoreception. *PLoS One* 5, e15009.
- Semo, M., Peirson, S., Lupi, D., Lucas, R.J., Jeffery, G., Foster, R.G., 2003. Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1793–1801.
- Soto, I., Oglesby, E., Buckingham, B.P., Son, J.L., Roberson, E.D., Steele, M.R., Inman, D.M., Vetter, M.L., Horner, 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.
- Surgucheva, I., Weisman, A.D., Goldberg, J.L., Shnyra, A., Surguchov, A., 2008. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* 14, 1540–1548.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Perez, M.P., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1988. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp. Neurol.* 102, 92–101.
- Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., 1996. Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport* 7, 1995–1999.
- Vugler, A.A., Semo, M., Joseph, A., Jeffery, G., 2008. Survival and remodeling of melanopsin cells during retinal dystrophy. *Vis. Neurosci.* 25, 125–138.
- Wang, S., Villegas-Perez, 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.
- Wang, S.W., Mu, X., Bowers, W.J., Kim, D.S., Plas, D.J., Crair, M.C., Federoff, H.J., Gan, L., Klein, W.H., 2002. Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development* 129, 467–477.
- Xiang, M., Zhou, H., Nathans, J., 1996. Molecular biology of retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 596–601.
- Zaidi, F.H., Hull, J.T., Peirson, S.N., Wulff, K., Aeschbach, D., Cooley, J.J., Brainard, G.C., Gregory-Evans, K., Rizzo III, J.F., Czeisler, C.A., Foster, R.G., Moseley, M.J., Lockley, S.W., 2007. Short-wavelength light sensitivity of circadian, pupillary, and visual awareness in humans lacking an outer retina. *Curr. Biol.* 17, 2122–2128.

10. ANEXO II

10. ANEXO II

Experimental Eye Research 92 (2011) 377–387



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

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

Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: Quantitative and topographic time course analyses

C. Galindo-Romero^{a,1}, M. Avilés-Trigueros^{a,1}, M. Jiménez-López^a, F.J. Valiente-Soriano^a,
M. Salinas-Navarro^a, F. Nadal-Nicolás^{a,b}, M.P. Villegas-Pérez^a, M. Vidal-Sanz^{a,2}, M. Agudo-Barriuso^{b,*,2}

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

^b Unidad de Investigación, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Servicio Murciano de Salud, Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, 30120 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2011

Accepted in revised form 16 February 2011

Available online 24 February 2011

Keywords:

tracing

BRN3A

spatial distribution

automated quantification

transection

optic nerve

ABSTRACT

The fate of retinal ganglion cells after optic nerve injury has been thoroughly described in rat, but not in mice, despite the fact that this species is amply used as a model to study different experimental paradigms that affect retinal ganglion cell population. Here we have analyzed, quantitatively and topographically, the course of mice retinal ganglion cells loss induced by intraorbital nerve transection. To do this, we have doubly identified retinal ganglion cells in all retinas by tracing them from their main retinorecipient area, the superior colliculi, and by their expression of BRN3A (product of *Pou4f1* gene). In rat, this transcription factor is expressed by a majority of retinal ganglion cells; however in mice it is not known how many out of the whole population of these neurons express it. Thus, in this work we have assessed, as well, the total population of BRN3A positive retinal ganglion cells. These were automatically quantified in all whole-mounted retinas using a newly developed routine. In control retinas, traced-retinal ganglion cells were automatically quantified, using the previously reported method (Salinas-Navarro et al., 2009b). After optic nerve injury, though, traced-retinal ganglion cells had to be manually quantified by retinal sampling and their total population was afterwards inferred. In naïve whole-mounts, the mean (\pm standard deviation) total number of traced-retinal ganglion cells was 40,437 (\pm 3196) and of BRN3A positive ones was 34,697 (\pm 1821). Retinal ganglion cell loss was first significant for both markers 5 days post-axotomy and by day 21, the last time point analyzed, only 15% or 12% of traced or BRN3A positive retinal ganglion cells respectively, survived. Isodensity maps showed that, in control retinas, BRN3A and traced-retinal ganglion cells were distributed similarly, being densest in the dorsal retina along the naso-temporal axis. After axotomy the progressive loss of BRN3A positive retinal ganglion cells was diffuse and affected the entire retina. In conclusion, this is the first study assessing the values, in terms of total number and density, of the retinal ganglion cells surviving axotomy from 2 till 21 days post-lesion. Besides, we have demonstrated that BRN3A is expressed by 85.6% of the total retinal ganglion cell population, and because BRN3A positive retinal ganglion cells show the same spatial distribution and temporal course of degeneration than traced ones, BRN3A is a reliable marker to identify, quantify and assess, ex-vivo, retinal ganglion cell loss in this species.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Rodent retinal ganglion cells (RGCs) are widely used to understand the degenerative events underlying injury-induced neuronal death in the central nervous system (CNS) (Salvador-Silva et al., 2000; Lafuente et al., 2002a; Mayor-Torroglosa et al., 2005; Agudo

et al., 2008, 2009; Nadal-Nicolás et al., 2009; Parrilla-Reverter et al., 2009b). RGCs are located in the innermost layer of the retina where they share location with a similarly numerous population of displaced amacrine cells (Perry, 1981). Classic morphological criteria do not distinguish reliably RGCs from the many displaced amacrine cells within the RGC layer (Drager and Olsen, 1981; Perry, 1981; Perry et al., 1983; Jeon et al., 1998). Indeed, displaced amacrine cells and small RGCs overlap in size, making it difficult to discriminate between them (Villegas-Pérez et al., 1988, 1993). Thus, to study RGCs it is necessary to label them specifically (Thanos et al., 1987; Vidal-Sanz et al., 1988). A well established method to label RGCs consists on the use of neuronal tracers applied to the optic nerves,

* Corresponding author. Tel.: +34 968363996; fax: +34 968363962.

E-mail address: martabar@um.es (M. Agudo-Barriuso).

¹ Joint first authors.

² Joint last authors.

tracts or their main target regions in the brain which, in rats and mice, are the superior colliculi (SCi) (Lund, 1965; Perry, 1981; Linden and Perry, 1983). Fluorogold, or its analogue hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) are the tracers of choice for many laboratories (Peinado-Ramon et al., 1996; Selles-Navarro et al., 1996; Villegas-Perez et al., 1996; Wang et al., 2000, 2003; Salvador-Silva et al., 2000; Danias et al., 2006; Reichstein et al., 2007; Murphy et al., 2007; Sobrado-Calvo et al., 2007; Lebrun-Julien et al., 2009). In fact, application of these tracers on both SCI results one week later in the labelling of 98.4% or 96.5% of the RGC population in rats (Salinas-Navarro et al., 2009c) or mice (Salinas-Navarro et al., 2009b), respectively. This tracing, using automated methods accounts, in pigmented mice, for $41,192 \pm 3395$ RGCs (Salinas-Navarro et al., 2009b). An alternative to trace RGCs is to detect proteins or transcripts specifically expressed by them (Barnstable and Drager, 1984; Casson et al., 2004; Chidlow et al., 2005; Bernstein et al., 2006; Soto et al., 2008; Surgucheva et al., 2008; Nadal-Nicolas et al., 2009; Nguyen et al., 2011). Recently, our group reported that BRN3A is a specific and reliable marker to detect and quantify the whole population of adult rat RGCs (Nadal-Nicolas et al., 2009), and that BRN3A is a useful tool to quantify the RGC population in various models of retinal injury, including axotomy (Nadal-Nicolas et al., 2009; Sanchez-Migallón et al., 2011), ocular hypertension (Salinas-Navarro et al., 2009a, 2010; Cuenca et al., 2010) and photoreceptor degeneration (García-Ayuso et al., 2010).

Pou4f1, 2 and 3 genes, members of the Brn3 family of POU-domain transcription factors, were cloned in the early nineties and it was shown that, in the retina, their products (BRN3A, B and C, respectively) were specifically expressed by RGCs (Xiang et al., 1993, 1995). These transcription factors play important roles in the differentiation, survival, and axonal re-growth of mice RGCs (Theil et al., 1993; Latchman, 1998; Gan et al., 1999; Budram-Mahadeo et al., 2002; Hudson et al., 2005). In adult mice, BRN3A is expressed by RGCs that project mainly to the contralateral SCi and, to a minor extent, to the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) (Quina et al., 2005). However, it is not known which proportion of the entire RGC population expresses this transcription factor, neither their spatial distribution within the adult mice retina nor whether its expression is affected by axonal injury.

In adult rats the temporal loss of RGCs that follows optic nerve injury has been studied by many groups (Berkelaar et al., 1994; Mansour-Robaey et al., 1994) including our own laboratory (Villegas-Perez et al., 1988, 1993; Peinado-Ramon et al., 1996; Vidal-Sanz et al., 2000; Lindqvist et al., 2004) where using modern automated routines we have quantified the whole population of rat RGCs, fluorogold and BRN3A positive, that survive at different times post-lesion after two types of axonal injury, transection or crush (Nadal-Nicolas et al., 2009). In addition, the quantitative data thus obtained allowed for the generation of detailed maps showing RGC distribution within the retina in control as well as after such insults (Nadal-Nicolas et al., 2009).

Transgenic and knockout mice have become an important tool to study a number of relevant questions in the adult mammalian central nervous system. Moreover, albino or pigmented mice are usually animals of choice for many experimental paradigms that affect the RGC population (Grozdanic et al., 2003; Holcombe et al., 2008; Salinas-Navarro et al., 2009a, 2010; Alarcón-Martínez et al., 2010; Cuenca et al., 2010; Fu and Sretavan, 2010).

Axotomy-induced RGC death in mice is a model used to test the role of different molecules or genes in RGC degeneration. In these studies, RGCs are generally identified by retrograde tracing and, because of the appearance of transcellularly traced microglial cells, the quantification analyses are carried out by sampling and manual-counting (Murphy et al., 2007; Lebrun-Julien et al., 2009). Thus, in the present work we propose to investigate whether

immunodetection of BRNA in mice retinas is a good tool to identify and quantify RGCs. In addition, we propose to study in detail the temporal loss of mice RGCs after intraorbital optic nerve transection, and specifically to: i) assess whether BRN3A is a reliable tool to identify mice RGCs, naïve and injured, using as baseline criterion OHSt-tracing; ii) develop an automated routine to quantify the whole population of BRN3A⁺RGCs, iii) compare the population of BRN3A⁺RGCs with the population of OHSt⁺RGCs which will be quantified, in the same retinas, using the automated routine previously described by our group (Salinas-Navarro et al., 2009b); iv) analyze and compare the temporal loss of IONT-injured RGCs identified by OHSt-tracing and BRN3A expression in the same retinas, and; v) characterize the spatial distribution of surviving RGCs after axotomy. Finally the data will be compared with that obtained for the adult rat, and the resemblances and differences will be discussed.

2. Material and methods

2.1. Animal handling and surgery

Experiments were performed on adult female pigmented C57BL/6N mice, (25 g of body weight) 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. 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 anaesthesia induced with an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (70 mg/kg, Ketolar[®]; Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompún[®]; Bayer, S.A., Barcelona, Spain). While recovering from anaesthesia, mice were placed in their cages, and an ocular ointment containing antibiotic (Tobrex; Alcon S.A., Barcelona, Spain) was applied.

To identify the RGCs, these were retrogradely traced by applying hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) to both superior colliculi (SCi) one week before surgery or processing, as previously described (Wang et al., 2000; Salinas-Navarro et al., 2009b; Alarcón-Martínez et al., 2010). In brief, after exposing the midbrain, a small pledget of gel foam (Espongostan Film; Ferrosan A/S, Denmark) soaked in saline containing 10% OHSt in 0.9% NaCl and 10% dimethylsulfoxide (DMSO), was applied over the entire surface of both SCi.

The left ON was intraorbitally transected (IONT) at 0.5 mm from the optic disc sparing the blood supply, according to procedures that are standard in our laboratory (Wang et al., 2000; Salinas-Navarro et al., 2009b; Alarcón-Martínez et al., 2010). After surgery, the eye fundus of each animal was checked to verify that the retinal vessels were intact.

Retinas traced with OHSt from de SCi were divided into two groups one control naïve ($n = 14$ retinas) and one experimental undergoing IONT. IONT-injured animals were analyzed at 2 ($n = 10$), 5 ($n = 7$), 7 ($n = 11$), 9 ($n = 7$), 14 ($n = 11$) or 21 ($n = 8$) days post-lesion (dpl). These groups were analyzed to determine the percentage of BRN3A⁺RGCs that project to the SCi, to quantify the whole population of RGCs BRN3A⁺ and OHSt⁺ and to assess their temporal loss after IONT.

In a third group of animals, retinas ($n = 5$) were traced by applying OHSt to the ocular stump of the intraorbitally transected ON, as previously reported (Wang et al., 2000; Salinas-Navarro et al., 2009b). This was done to verify that BRN3A expressing cells were indeed RGCs projecting their axons through the ON, as a small population of BRN3A⁺RGCs project to the dLGN and will not be traced from the SCI (Quina et al., 2005).

For means of clarity, unless otherwise stated, retinas and RGCs traced from the SCI will be referred throughout the text as OHSt-traced retinas or OHSt⁺RGCs, respectively.

2.2. Immunohistochemistry

All animals were euthanized with an i.p. overdose of 20% sodium pentobarbital (Dolethal; Vetoquinol, Especialidades Veterinarias, S.A., San Fernando de Henares, Madrid, Spain) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer after a saline rinse.

2.2.1. Radial sections

This analysis was done to investigate first the expression pattern of BRN3A in control ($n = 5$ traced from SCI) and injured retinas (2, 7, or 14 dpl, $n = 3$ per time point, also traced from the SCI) and second the population of BRN3A⁺RGCs that project to the SCI, (control retinas, $n = 5$ traced from SCI and $n = 5$ traced from the ON stump, for details see below). Retinas were prepared for cryostat sectioning as previously reported (Agudo et al., 2009; Nadal-Nicolas et al., 2009; Ortin-Martinez et al., 2010). Sections (15 μ m thick) were blocked in 2% donkey serum in phosphate buffered saline (PBS) with 0.1% Triton X-100 (PBST) and incubated overnight at 4 °C with goat anti-BRN3A (C-20) antibody (Santa Cruz Biotechnologies Heidelberg, Germany) diluted 1:100 in PBST. Immunoreactivity was detected using Alexa Fluor-568 donkey anti-goat IgG (H + L) antibody (Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) diluted 1:500 in PBST. Finally, retinas were thoroughly washed in PBS and mounted with anti-fading solution.

2.2.2. Flat mounted retinas

This study was carried out to quantify the whole population of BRN3A⁺RGCs in naïve retinas and the temporal loss of BRN3A⁺RGCs or OHSt⁺RGCs induced by IONT. Retinas ($n = 7–9$ per group, for details see results) were dissected as flattened whole-mounts as previously reported (Salinas-Navarro et al., 2009a, 2009b). Retinas were then permeated in PBS 0.5% Triton X-100 by freezing them during 15 min at -70 °C, rinsed in new PBS 0.5% Triton and incubated overnight at 4 °C with goat anti-BRN3A antibody diluted 1:100 in blocking buffer (PBS, 2% bovine serum albumin, 2% Triton). Then, retinas were washed three times in PBS and incubated 2 h at room temperature with the secondary antibody diluted 1:500 in blocking buffer. Finally, retinas were thoroughly washed in PBS and mounted vitreal side up on subbed slides and covered with anti-fading solution.

2.3. Whole-mount retinal analyses

2.3.1. Image acquisition

All whole-mounted retinas were analyzed for OHSt and BRN3A signal, acquiring first the OHSt and then the BRN3A signal. To make reconstructions of retinal whole-mounts, the retinas were 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) as previously described (Salinas-Navarro et al., 2009b). Reconstructed

whole-mounts, made up from 140 individual frames, were further processed when required using Adobe Photoshop® CS 8.0.1 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA).

2.3.2. Automated quantification of the total population of RGCs

2.3.2.1. OHSt⁺RGCs. The individual OHSt-fluorescent images taken for each retinal whole-mount were processed with a specific cell-counting subroutine previously developed by our group (Salinas-Navarro et al., 2009b, 2009c) to automatically quantify OHSt-RGCs in control and injured retinas at 2 dpl. Briefly, we used the IPP macro language to apply a sequence of filters and transformations to each image to clarify cell limits and to separate individual cells for automated cell counting as previously reported in detail (Salinas-Navarro et al., 2009b, 2009c).

2.3.2.2. BRN3A⁺RGCs. BRN3A⁺RGCs were automatically counted in all flat mounted retinas. In a first step image background intensity variation was reduced by using the Flatten filter, this was followed by the impulse noise remove using the Median filter. Images were then converted to 16-bit gray scale to discard the colour information. In order to stand out positive cells, large spectral filter Edge+ was applied. Cell clusters were separated by two passes of the IPP watershed split morphologic filter, which erodes and dilates objects separating overlapping ones. The nuclei were counted within predetermined parameters to exclude objects that are too large and too small to be RGCs nuclei. Finally, the data of each count were displayed and exported by dynamic data exchange to a spreadsheet (Microsoft® Office Excel 2003; Microsoft Corporation, Redmond, WA) where the data were filed and saved for further analysis. The population of RGCs in the mice retina that express BRN3A was assessed by comparing the total number of RGCs (those OHSt-traced from the SCI) to the total number of BRN3A⁺RGCs counted in the same flat mounted retinas.

2.3.3. Validation of the BRN3A automated counting method

To validate the BRN3A automated counting method, three different experienced investigators counted manually and in a masked fashion a total of 12,834 BRN3A⁺RGCs present in 19 frames, representing different RGC density regions which were randomly selected from six whole-mounted naïve retinas. These results were plotted against the counts obtained automatically (13,057 cells). There was a strong correlation between both methods (Pearson correlation test, $R^2 = 0.977$) that validates the automated quantification of these cells.

2.3.4. Isodensity maps

Detailed spatial distribution OHSt⁺RGCs over the entire retinas was obtained through quadrant analysis, and demonstrated with isodensity maps constructed as previously described (Salinas-Navarro et al., 2009b, 2009c). BRN3A⁺RGCs distribution was done following the same protocol, with the exception that each original frame was divided into 25 sampling areas instead of 36.

2.3.5. Retinal area measurement, sample creation, and total population inference of OHSt positive RGCs

After RGC death, microglial cells phagocytose them and in doing so they became transcellularly labelled (Kobbert et al., 2000). This impairs automated quantification of OHSt⁺RGCs at times post-lesion longer than 2 days. The fusiform body and the dot-like OHSt accumulations in microglial cells make it possible to distinguish them from the typical morphology of OHSt-labelled RGCs (Peinado-Ramon et al., 1996; Gomez-Ramirez et al., 1999; Salvador-Silva et al., 2000; Sobrado-Calvo et al., 2007; Nadal-Nicolas et al., 2009; Parrilla-Reverter et al., 2009b). Thus, the

number of surviving OHSt⁺RGCs present in left retinas 5–21 dpl was manually quantified by sampling the retina and afterwards their total number inferred. The user was requested to draw the retina perimeter in order to clean and measure its total area; this was followed by the request of pointing the optic nerve (ON) and the tips of each retinal quadrant. Then 3 equidistant frame samples of 0.05 mm² each were cropped between the ON and each quadrant tip (Fig. 1). Those samples were saved with an identifying name for further manual count. Because it has been reported that RGC density on the mice retina differs from centre to periphery (Salinas-Navarro et al., 2009b), inferring the RGC population was done taking this into account, as follows: the retina was divided in 3 areas, periphery, medium and centre as previously described (Parrilla-Reverter et al., 2009a), those measured areas contained, each, four samples, one per quadrant (see Fig. 1). The total population of OHSt⁺RGCs was inferred by extrapolating the manual counts of the samples (averaged density of the 4 samples per area, i.e.: RGCs/0.05 mm²) to the total periphery, medium and centre areas. To validate the OHSt⁺RGCs population inference, the number of these cells in 5 naïve retinas was both, automatically (Salinas-Navarro et al., 2009b) and manually counted and inferred. Both results were compared giving a correlation coefficient of 0.96.

2.4. Percentage of BRN3A⁺RGCs projecting to the SCI or to the dorsal lateral geniculate nuclei

Sections from naïve retinas previously traced with OHSt from the superior colliculi ($n = 5$ retinas) were used to assess the percentage of BRN3A⁺RGCs that project to the SCI. Sections from retinas traced by applying OHSt on the optic nerve stump ($n = 5$) were used to investigate whether all BRN3A⁺ cells projected their axons through the optic nerve. Images (from a minimum of 6 sections per retina) were taken randomly from different areas of the retina, acquiring OHSt and BRN3A signal for each image. Then, BRN3A⁺RGCs were counted and afterwards it was quantified how many out of them were also OHSt⁺.

2.5. Statistical analyses

To compare values from retinas of different mice and the number of OHSt or BRN3A positive RGCs, we used the ANOVA test and the Tukey posthoc test (SigmaStat[®] for Windows[™] Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA). Cell counts obtained by the automated method were compared with those obtained with the manual method using the Pearson correlation test (SigmaStat[®]

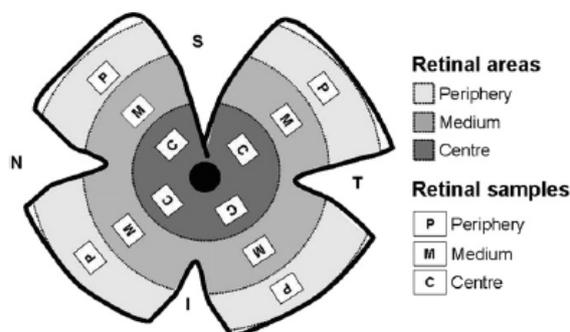


Fig. 1. Drawing depicting the retinal areas and samples used to quantify and infer the total number of OHSt⁺RGCs in IONT-injured retinas from 5 days post-lesion onwards.

for Windows[™] Version 3.11). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. BRN3A expression pattern in naïve and injured retinas

It has been reported that BRN3A is exclusively expressed by RGCs in the mice retina and that the majority of these cells project to the SCI while a small population only projects to the dLGN (Quina et al., 2005). However, it is not known whether BRN3A expression pattern is affected by IONT, nor is known the proportion of BRN3A⁺RGCs that project to each brain area. In cross-sections of retinas traced with OHSt from the SCI (Fig. 2) it was observed that BRN3A expression is nuclear, circumscribed to RGCs and expressed by a majority of OHSt⁺RGCs. Importantly, optic nerve injury does not induce an ectopic expression of BRN3A, such as that described for Thy-1 in rat (Dabin and Barnstable, 1995). As expected, the number of RGCs decreases with time post-injury (Fig. 2D–L) and this is observed with both markers. In the OHSt-images microglial cells transcellularly labelled with the tracer were clearly distinguished (Fig. 2, arrows). Quantification of RGC loss with both markers is analyzed in detail below. In these images is also noticed that not all BRN3A⁺RGCs were also doubly labelled with OHSt and vice versa. As above mentioned not all BRN3A⁺RGCs project to the SCI, and thus the population of RGCs BRN3A⁺ and OHSt⁺ may belong to this group. To estimate the proportion of BRN3A⁺RGCs that project to the SCI, a total of 2651 BRN3A⁺RGCs were counted in these naïve cross-sections, and we assessed how many out of them were also retrogradely labelled with OHSt (Table 1). This experiment showed that 92.3% of the RGCs that express BRN3A project to the SCI, while the rest would project to other areas. This was verified by doing the same quantification analysis in sections from retinas traced from the ocular stump of the intraorbitally transected ON (Table 1). This experiment showed that 99.5% of BRN3A⁺RGCs were also OHSt⁺. In conclusion, in the mouse retina, BRN3A is only expressed by RGCs and its expression pattern is not affected by axonal injury.

3.2. Total number and spatial distribution of BRN3A⁺RGCs and of OHSt⁺RGCs in naïve retinas

A photomontage of a representative whole-mounted OHSt-traced naïve retina immunodetected for BRN3A is shown in Fig. 3A (OHSt) and C (BRN3A), while magnifications can be seen in Fig. 4A–C. These images show that BRN3A signal is clear, leading us to develop an automated method to quantify the whole number of these cells (Table 2A and Fig. 3A,C bottom). In these retinas, the mean \pm SD number of OHSt⁺RGCs was $40,437 \pm 3196$ while the number of BRN3A⁺RGCs was significantly lower, $34,627 \pm 1821$.

These quantitative data were used to generate density maps to demonstrate the topographic distribution of RGCs throughout the retina. Fig. 3B shows the typical topography of OHSt⁺RGCs in naïve retinas, as recently described by our group (Salinas-Navarro et al., 2009b). Distribution of BRN3A⁺RGCs (Fig. 3D) follows the same pattern than that of OHSt⁺RGCs, though as they are fewer, their peak densities are narrower. Thus, these data show that, in spite of BRN3A being expressed by a smaller population of RGCs than those identified with OHSt, BRN3A⁺RGCs topography falls within the normality, making this marker a suitable one to study RGCs in mice.

3.3. Temporal course of axotomy-induced RGC death in adult mice

Fig. 4 illustrates magnifications from OHSt-traced flat mounted retinas immunodetected for BRN3A in naïve (A–C) or injured (D–L)

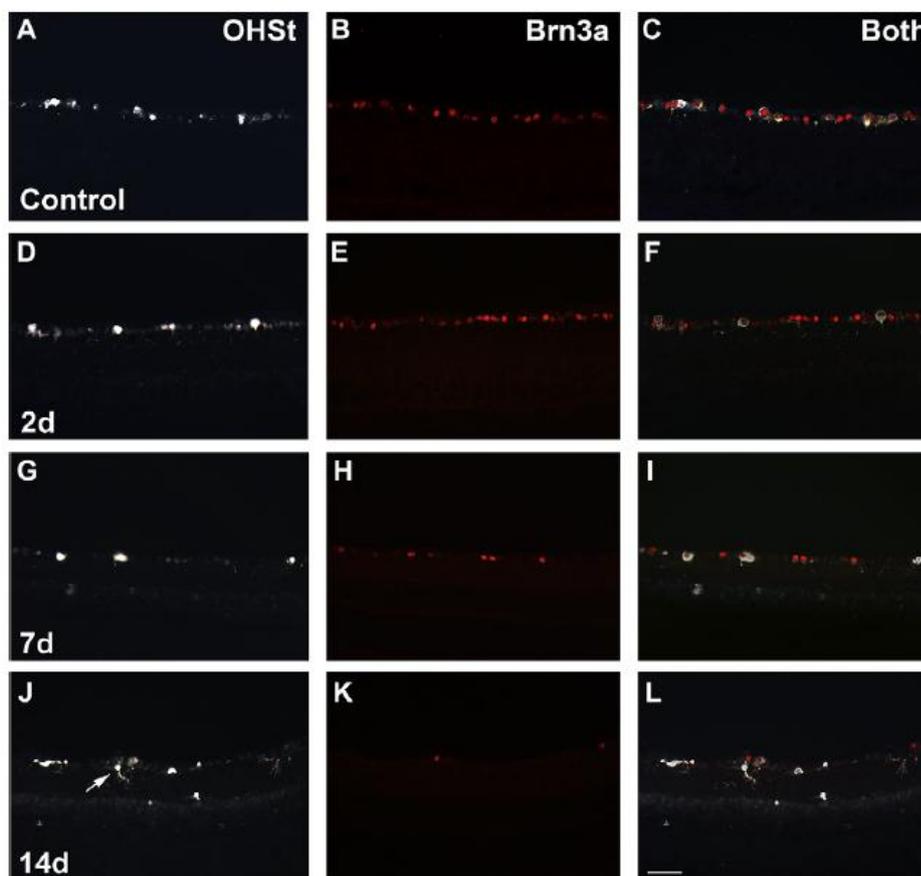


Fig. 2. BRN3A expression pattern in mice naive and injured retinas. Cross-section analyses. Sagittal sections of OHSt-traced retinas on which BRN3A has been immunodetected. A–C naive retinas, D–L IONT-injured retinas analyzed at 2, 7 or 14 d post-injury. A–D–G and J correspond to OHSt signal and B–E–H and K to BRN3A signal, C–F–I and L are the coupled images. Arrow points to a transcellularly labelled microglial cell, notice that these cells do not express BRN3A. Bar: 50 μ m.

retinas at increasing times after IONT. In these images it is observed that the number of RGCs decrease along time post-lesion, in agreement with the cross-section analyses. Next, we quantified automatically the total number of OHSt⁺RGCs in the left (injured) eyes at 2 dpi and of BRN3A⁺RGCs at all times post-IONT. Because in the OHSt-images from the injured eyes at times post-lesion longer than 2 days microglial cells become transcellularly labelled with OHSt (Figs. 2 and 4), OHSt⁺RGCs in these retinas were counted manually from selected areas (see Methods) and the total population of OHSt⁺RGCs inferred. Compared to naive retinas, the loss

of RGCs is first significant, for both markers, at day 5 (Tukey test, $p < 0.001$) when the mean total numbers \pm SD of OHSt⁺ or BRN3A⁺RGCs was $22,772 \pm 4316$ or $15,867 \pm 2656$, respectively (Table 2A). RGC death progresses significantly till day 9 post-injury, and though there is a trend for RGC loss from this time point till 21 dpi, this is not statistically significant (Table 2A).

The retinal areas were measured for all analyzed retinas, thus, it was possible to calculate the mean densities of surviving RGCs in all groups (Table 2B). It is worth highlighting that at least during the first 21 days post-axotomy the retinal area does not change as a result of the injury.

In all groups, the total number of OHSt⁺RGCs was always significantly higher than the total number of BRN3A⁺RGCs, but if the percentage of surviving cells is calculated (being 100% the control values of each marker), RGC survival is comparable (Fig. 5A). In conclusion, axotomy-induced RGC loss in mice starts soon after the lesion and by day 5 post-lesion approximately one half of their population has disappeared, this death progresses rapidly up to day 9 dpi and thereafter slows down till 21 dpi.

3.4. RGC loss after IONT is diffuse and affects the whole retina

It was important to determine not only the temporal course of axotomy-induced RGC death but also if RGCs located in any

Table 1

Percentage of BRN3A⁺RGCs traced with OHSt from the SCI or from the ON stump. Number of RGCs BRN3A⁺ quantified in sections from retinas traced from the SCI ($n = 5$ retinas) and in sections from retinas traced from the ON stump ($n = 5$ retinas). In the middle column is shown the number of these cells that were also traced with OHSt and in the right column their percentages, considering 100% the total number of BRN3A⁺RGCs counted in each tracing experiment (2651 and 2706, respectively).

	Total number of counted BRN3A ⁺ RGCs	Number of OHSt-traced BRN3A ⁺ RGCs	% of traced BRN3A ⁺ RGCs
OHSt from SCI	2651	2446	92.3
OHSt from ON stump	2706	2693	99.5

SCI: superior colliculi, ON: optic nerve.

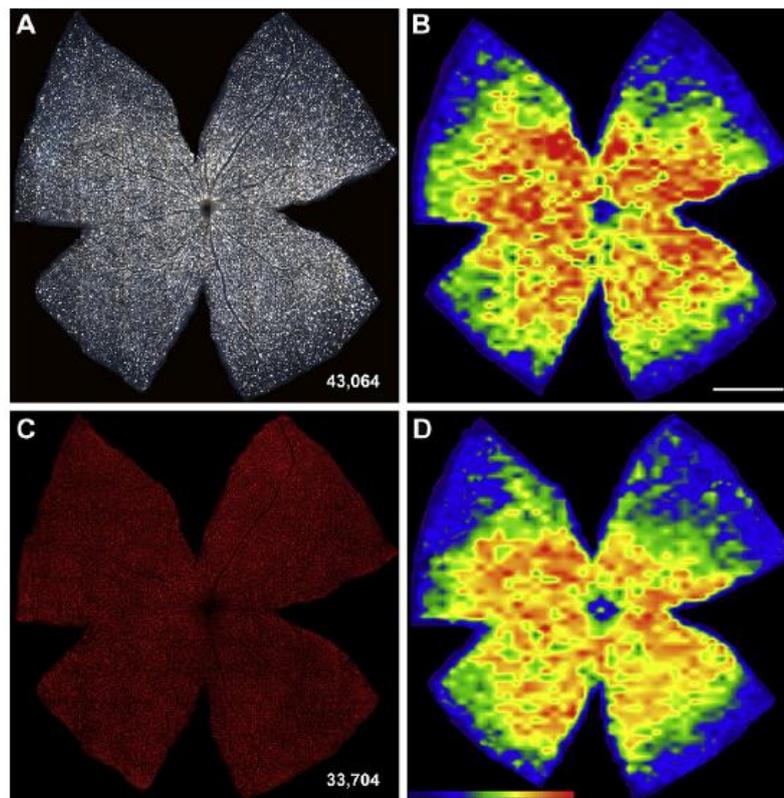


Fig. 3. Total numbers and spatial distribution of OHSt-traced and BRN3A immunopositive RGCs in naive retinas. Photomontage of a whole-mount representative naive retina traced with OHSt (A) in which BRN3A has been immunodetected (C). These photomontages are the result of 140 individual frames (see Methods). The total number of RGCs either OHSt or BRN3A positive was automatically quantified (bottom of each retina and Table 1). In agreement with the results obtained in the cross-sections analysis, the number of OHSt⁺ RGCs is higher than the number of BRN3A⁺ RGCs. B and D are isodensity maps created from the quantitative data obtained from images A and C, respectively. These maps show the spatial distribution of OHSt⁺ RGCs (B) and of BRN3A⁺ RGCs (C) and are filled contour plots generated by assigning to each of the 25 (BRN3A) or 36 (OHSt) subdivisions of each individual frame a colour code according to its RGC density within a 28-step scale ranging from 0–500 (purple) to 4800 or more (red) RGCs/mm² (scale in D bottom). As it is observed OHSt⁺ and BRN3A⁺ RGCs are similarly distributed in the retina, being densest in the superior pole, along the naso-temporal axis. Bar: 1 mm.

specific region of the retina were susceptible to die earlier. To answer this question we prepared density maps of BRN3A⁺ RGCs from IONT-injured retinas at all times post-lesion studied. By 2 dpl (Fig. 6A) the topographic distribution of RGCs resembles that observed in control maps (compare Fig. 6A with Fig. 3D), in agreement with the quantitative data. By 5 dpl (Fig. 6B), when approximately half of the RGC population is already lost, there is a clear decrease of warm colours (higher densities) through the entire retina. The temporal loss of RGCs is graphically observed at increasing times post-lesion, and so the colours representing higher densities further disappear (Fig. 6C–F), without any evidence of focal or sectorial loss. In conclusion, these data, demonstrate that axotomy triggers RGC death simultaneous and diffusely through the whole retina.

4. Discussion

Using two different methods to identify RGCs, retrograde axonal tracing of ganglion cells from their main targets in the brain and immunodetection of BRN3A, we have characterized the temporal course of axotomy-induced RGC loss in adult mice.

Detection of proteins or transcripts specifically expressed by RGCs is a relatively easy approach to identify and quantify RGCs as

well as to assess their fate after a given insult or therapy. In the rodent retina γ -synuclein, Bex1/2, Thy-1, NeuN or Brn3a have been described to be exclusively expressed by these neurons (Barnstable and Drager, 1984; Quina et al., 2005; Weishaupt et al., 2005; Bernstein et al., 2006; Soto et al., 2008; Surgucheva et al., 2008; Buckingham et al., 2008; Nadal-Nicolas et al., 2009; Nguyen et al., 2011). Thy-1 is not a good marker to study the fate of injured RGCs as its expression is down-regulated by the lesion without coinciding with RGC death (Barnstable and Drager, 1984; Schlamp et al., 2001). Besides, Thy-1 is ectopically expressed by Müller cells after RGC loss (Dabin and Barnstable, 1995). Bex1/2 immunoreactivity has been shown to be useful to evaluate the distribution of RGCs in control retinas and after optic nerve stroke. However, its axonal and somatic expression pattern impairs the implementation of automated quantification routines (Bernstein et al., 2006). Detection of γ -synuclein RNA (Soto et al., 2008; Surgucheva et al., 2008; Nguyen et al., 2011) allows launching automated routines to quantify the whole population of positive RGCs, and has been used to investigate the fate of mice RGCs after ocular hypertension. Immunodetection of Brn3a is a reliable method to identify and automatically quantify the whole population of rat RGCs in control retinas and after different insults (Nadal-Nicolas et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2010; García-Ayuso

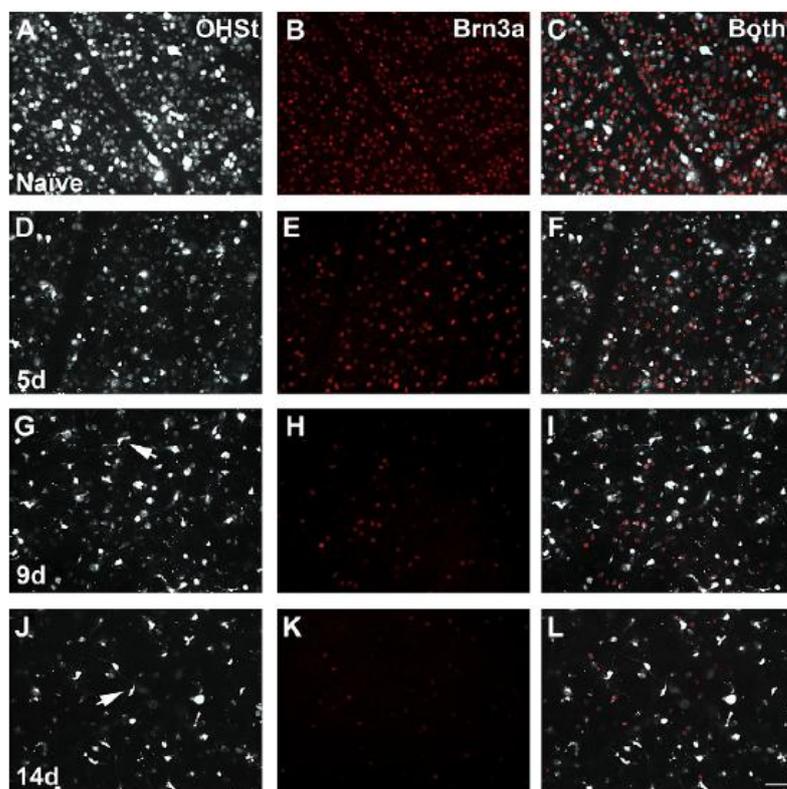


Fig. 4 IONT triggers retinal ganglion cell death in the mouse retina. Magnifications from flat mounted OHSt-traced retinas immunoreacted for BRN3A. A–C naive retinas, D–L IONT-injured retinas analyzed at 5, 9 or 14 d post-injury. A–D–G and J correspond to OHSt signal; B–E–H and K to BRN3A signal and C–F–I and L are the coupled images. At 5 dpl there is a decrease in the number of RGCs, which is more clearly observed in the BRN3A image. Arrows point to transcellularly labelled microglial cells, which phagocytose RGCs corpses and became OHSt positive, hence impairing the automated quantification of these images. However, they do not appear in the BRN3A images, enabling the automated quantification of the total population of surviving BRN3A⁺RGCs, as well as the generation of isodensity maps (see below). Bar: 50 μ m.

et al., 2010) and to test the efficacy of neuroprotective therapies (Sanchez-Migallón et al., 2011).

We first assessed the proportion of BRN3A⁺RGCs that were traced from the SCI, which was 92.3%. Thus, there was a small percentage of BRN3A⁺RGCs that did not project to these targets

but that were traced from the optic nerve. These data are in agreement with a previous report from Quina et al. (2005) in which they demonstrated that in mice, the majority of RGCs that express BRN3A project to the SCI, while the rest projects to the dLGN.

Table 2

Population and density of OHSt and BRN3A⁺RGCs in naive and IONT-injured mice retinas. Mean numbers (A) and mean densities (B, RGCs/mm²) of RGCs labelled with OHSt or immunodetected with Brn3a in naive or injured retinas at increasing times post-IONT. The number and densities of OHSt⁺ RGCs is significantly higher than the number of BRN3A⁺RGCs in all groups. Independently of the marker, RGC lost is first statistically significant at 5 days post-lesion, progressing significantly till 9 dpl. From this time point till 21 days post-lesion, the number of RGCs did not decrease. Notice that the retinal areas (B, bottom in mm²) did not vary after IONT.

	Naive		IONT 2 d		IONT 5 d		IONT 7 d		IONT 9 d		IONT 14 d		IONT 21 d	
	OHSt	BRN3A	OHSt	BRN3A	OHSt	BRN3A	OHSt	BRN3A	OHSt	BRN3A	OHSt	BRN3A	OHSt	BRN3A
A														
Mean number	n = 9 40,437	34,627	n = 7 39,764	33,957	n = 7 ^{a,b} 22,772	15,867	n = 8 ^{a,b} 13,739	11,249	n = 7 ^{a,b} 6,779	4,661	n = 8 ^a 6,444	4,831	n = 8 ^a 5,905	3,994
SD	3,196	1,821	1,717	3,663	4,316	2,656	2,081	1,381	1,742	1,615	856	1,018	1,422	1,264
B														
Mean density	n = 9 2,944	2,522	n = 7 2,916	2,490	n = 7 1,613	1,120	n = 8 955	777	n = 7 489	346	n = 8 454	341	n = 8 436	292
SD	262	193	218	309	296	162	187	90	102	103	78	77	97	77
Area	13.76		13.68		14.15		14.50		13.71		14.31		13.54	
SD	0.64		0.74		1.05		0.85		0.83		1.34		1.48	

d: Days post-lesion. Asterisks indicate those groups where the number of OHSt-RGCs were manually quantified and inferred.

^a Significantly different compared to naive retinas.

^b Significantly different compared to the previous time point. (Tukey test $p < 0.05$).

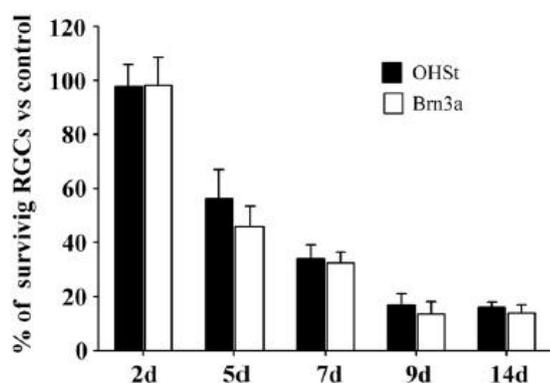


Fig. 5. Graph depicting the percentage of RGC survival after IONT in the adult mice retina. Percentage of surviving OHSt⁺RGCs (black bars) or BRN3A⁺RGCs (white bars) at increasing times post-lesion, referred to their values in naive retinas which was considered 100%.

Automated quantification is an objective routine that allows counting the whole population of a given cell (Danas et al., 2002, 2003; Nadal-Nicolas et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009b, 2009c; Ortín-Martínez et al., 2010) while avoiding the tedious and time consuming effort of sampling and manual-counting. This routine can be applied to control or injured BRN3A immunodetected retinas (Nadal-Nicolas et al., 2009) and to control or injured OHSt-traced retinas provided that the tracer is applied after the lesion (Salinas-Navarro et al., 2010). If the tracer is applied before the lesion, then phagocytic microglia becomes labelled (Peinado-Ramon et al., 1996; Vidal-Sanz et al., 2001; Sobrado-Calvo et al., 2007; Parrilla-Reverter et al., 2009b) distorting the automated quantification procedure (Nadal-Nicolas et al., 2009). Since IONT severs the ON, it is not possible to apply the tracer after the injury, thus for the present studies there was no alternative but to count OHSt⁺RGCs after axotomy by sampling and manual-counting. Yet, to avoid as much as possible the potential error of sampling, we have developed a semi-automatic method to estimate the whole OHSt⁺RGC population, which, in control retinas, had a high correlation coefficient compared to the automatic quantification.

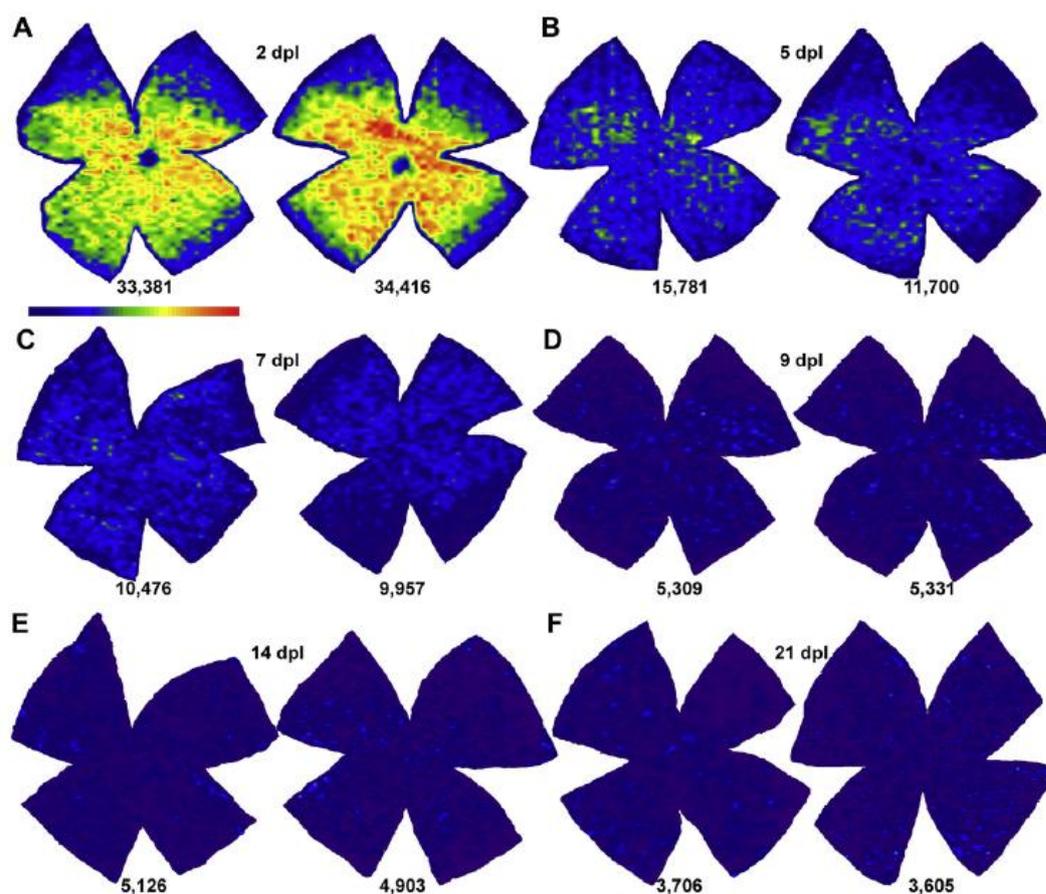


Fig. 6. IONT-induced RGC loss in mice is diffuse and affects the whole retina. Isodensity maps showing the distribution of surviving BRN3A⁺RGCs at 2 (A) 5 (B), 7 (C) 9 (D) 14 (E) and 21 (F) days post-IONT. This analysis shows that the loss of RGCs induced by IONT is diffuse and affects the whole retina, as warm colours (red–orange) are replaced by colder ones (green–blue). At the bottom of each map is shown the number of BRN3A⁺RGCs quantified in the retina wherefrom the map is generated (for details see Fig. 3 legend). Bar: 50 μ m.

In naive flat mounted retinas, the total number of BRN3A⁺RGCs was $34,627 \pm 1821$ and that of OHSt⁺RGCs was $40,437 \pm 3196$, in agreement with previous reports (Salinas-Navarro et al., 2009b). If we consider that when tracing from the SCI almost the whole RGC population is counted, then BRN3A immunolabelling detects in whole-mounts an 85.6% of the RGC population. These results are similar to those described by Xiang et al. (1995). They showed that 36% of the cells located in the ganglion cell layer were BRN3A positive. Because in this layer almost half of the neurons are displaced amacrine cells, the percentage of BRN3A⁺RGCs accounts, approximately, to 80% of the RGC population.

Our results show that IONT triggers a rapid RGC degeneration which is quantifiable with both markers. Furthermore, the percentages of surviving RGCs detected with BRN3A immunohistochemistry or with OHSt-tracing were similar, indicating that BRN3A⁺RGCs are equally vulnerable to the injury as the rest of the population. The loss of RGCs was first significant 5 dpl and by day 7 only 33% of the original population survived. This survival is lower than the 50% and 54% reported by Murphy et al. (2007) and Lebrun-Julien et al. (2009), respectively. In these two reports, RGCs were identified by fluorogold tracing and quantified manually by sampling the retina. Their quantification data were given as the mean densities of the sampled areas, while in this work we have inferred the whole population of surviving traced-RGCs. This could explain the differences observed in the survival percentage. Nevertheless, at 14 dpl the percentages of survival reported by Lebrun-Julien et al. (2009) and herein are similar as they report an 11% of survival, while in the present studies the percentage of surviving RGCs is 15%.

Earlier work (Villegas-Perez et al., 1993) described in the adult rat two phases of IONT-induced RGC degeneration, a rapid one that was already over within the first two weeks after injury and another more protracted that lasted several months. Our data indicate that in adult pigmented mice, RGC fate after axotomy follows a similar pattern. Indeed, between day 2 and day 9 there is a loss of approximately 85% of the RGC population. Afterwards, RGC loss slows down, and the number of surviving RGCs is almost the same at 9 and 14 dpl, decreasing slightly further, but not significantly, at 21 dpl.

Here are also shown the mean RGC density values in naive retinas and after injury. While these data should be taken having in mind that RGC density is not homogeneous thorough the retina, are nevertheless of interest as a baseline for further experiments in which RGC quantification is done by sampling and averaging.

When the whole retina is automatically quantified, detailed iso-density maps showing the retinal topography of RGCs and other neurons such as S or L cones (Salinas-Navarro et al., 2009b, 2009c; Ortín-Martínez et al., 2010) can be generated. Among the uses of these maps is to know not only the distribution of a given cell type in a healthy retina, but also how they are lost after a given injury or insult (Danas et al., 2003; Nadal-Nicolas et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009a, 2010) or whether a neuroprotective therapy rescues the whole retina or only part of it (Sanchez-Migallón et al., 2011).

In healthy mice retinas the topography of OHSt⁺RGC has been already described by our group (Salinas-Navarro et al., 2009b). In mice, as in rat, RGCs are not homogeneously distributed rather, their highest densities are located in the superior pole along the naso-temporal axis forming what has been proposed to be the visual streak of rodents (Nadal-Nicolas et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009b, 2009c; Ortín-Martínez et al., 2010). In this work we show, in addition, that BRN3A⁺RGCs follow the same distribution. This is important because automated quantification of BRN3A⁺RGCs after IONT allowed visualizing the spatial pattern of RGCs loss which in mice, as has been already shown in rat, is diffuse and affects the whole retina without any evidence of the focal or sectorial RGC loss that has been described after other types of injury such

as transient ischemia of the retina (Lafuente et al., 2002a; Lafuente López-Herrera et al., 2002b; Avilés-Trigueros et al., 2003; Mayor-Torroglosa et al., 2005) or ocular hypertension (Salinas-Navarro et al., 2009a; Cuenca et al., 2010).

5. Conclusions

In this work we have described the temporal course of RGC loss induced by intraorbital nerve transection in mice, and assessed for the first time the values in terms of total number or density of the RGCs surviving the injury from 2 to 21 dpl. Besides we have demonstrated that BRN3A is expressed by 85.6% of the total RGC population, and because BRN3A⁺RGCs show the same spatial distribution and temporal course of degeneration than OHSt⁺RGCs, BRN3A may be used as a reliable marker to identify, quantify and assess RGC loss in this species.

Funding

This work was supported by research grants from Fundación Séneca 04446/GERM/07; Spanish Ministry of Education and Science SAF-22010-10385; Spanish Ministry of Science and Innovation and ISCIII-FEDER: P10/70225; P110/00187, P1006/0780 and Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología RD07/0062/0001.

Acknowledgements

We would like to thank Leticia Nieto López for her expert technical support.

References

- Agudo, M., Perez-Marin, M.C., Lonngren, U., Sobrado, P., Conesa, A., Canovas, I., Salinas-Navarro, M., Miralles-Imperial, J., Hallbook, 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., Perez-Marin, M.C., Sobrado-Calvo, P., Lonngren, U., Salinas-Navarro, M., Canovas, I., Nadal-Nicolas, F.M., Miralles-Imperial, J., Hallbook, F., Vidal-Sanz, M., 2009. Immediate upregulation of proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50 (1), 424–431.
- Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., Galindo-Romero, C., Valiente-Soriano, J., Agudo-Barriuso, M., Villa, P.D., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2010. ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection. *Vision Res.* 50 (21), 2176–2187.
- 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 retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp. Neurol.*
- Barnstable, C.J., Drager, U.C., 1984. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 11 (4), 847–855.
- Berkelaar, M., Clarke, D.B., Wang, Y.C., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1994. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J. Neurosci.* 14 (7), 4368–4374.
- Bernstein, S.L., Koo, J.H., Slater, B.J., Guo, Y., Margolis, F.L., 2006. Analysis of optic nerve stroke by retinal Bax expression. *Mol. Vis.* 12, 147–155.
- Buckingham, B.P., Inman, D.M., Lambert, W., Oglesby, E., Calkins, D.J., Steele, M.R., Vetter, M.L., Marsh-Armstrong, N., Horner, P.J., 2008. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J. Neurosci.* 28 (11), 2735–2744.
- Budram-Mahadeo, V., Morris, P.J., Latchman, D.S., 2002. The Brn-3a transcription factor inhibits the pro-apoptotic effect of p53 and enhances cell cycle arrest by differentially regulating the activity of the p53 target genes encoding Bax and p21(CIP1/Waf1). *Oncogene* 21 (39), 6123–6131.
- Casson, R.J., Chidlow, G., Wood, J.P., Vidal-Sanz, M., Osborne, N.N., 2004. The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (2), 685–693.
- 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.
- Cuenca, N., Pinilla, L., Fernandez-Sanchez, L., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., de I, V., Miralles, L., Villegas-Pérez, M.P., 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 (2), 273–285.

- Dabin, I., Barnstable, C.J., 1995. Rat retinal Muller cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia* 14 (1), 23–32.
- 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/2NnJ glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/Bl6 mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (12), 5151–5162.
- Danias, J., Shen, F., Goldblum, D., Chen, B., Ramos-Esteban, J., Podos, S.M., Mittag, T., 2002. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (3), 587–594.
- Danias, J., Shen, F., Kavalarakis, 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 (2), 219–228.
- Drager, U.C., Olsen, J.F., 1981. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20 (3), 285–293.
- Fu, C.T., Sretavan, D., 2010. Laser-induced ocular hypertension in albino CD-1 mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 (2), 980–990.
- Gan, L., Wang, S.W., Huang, Z., Klein, W.H., 1999. POU domain factor Brn-3b is essential for retinal ganglion cell differentiation and survival but not for initial cell fate specification. *Dev. Biol.* 210 (2), 469–480.
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Agudo, M., Cuenca, N., Pinilla, I., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P., 2010. Dec. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp. Eye Res.* 91 (6), 800–810.
- Gomez-Ramirez, A.M., Villegas-Perez, M.P., Miralles d, I., Salvador-Silva, M., Vidal-Sanz, M., 1999. Effects of intramuscular injection of botulinum toxin and dexamethasone on the survival of abducens motoneurons. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 (2), 414–424.
- Grozdanic, S.D., Betts, D.M., Sakaguchi, D.S., Allbaugh, R.A., Kwon, Y.H., Kardon, R.H., 2003. Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (10), 4337–4346.
- Holcombe, D.J., Lengefeld, N., Cole, G.A., Barnett, N.L., 2008. Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model. *Br. J. Ophthalmol.* 92 (5), 683–688.
- Hudson, C.D., Morris, P.J., Latchman, D.S., Budhram-Mahadeo, V.S., 2005. Brn-3a transcription factor blocks p53-mediated activation of proapoptotic target genes Noxa and Bax in vitro and in vivo to determine cell fate. *J. Biol. Chem.* 280 (12), 11851–11858.
- Jeon, C.J., Strettoi, E., Masland, R.H., 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci.* 18 (21), 8936–8946.
- Kobbert, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J.L., Mey, J., Thanos, S., 2000. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog. Neurobiol.* 62 (4), 327–351.
- Lafuente, M.P., Villegas-Perez, M.P., Selles-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., Miralles d, I., 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 (1), 157–168.
- Lafuente López-Herrera, M.P., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2002b. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp. Neurol.* 178 (2), 243–258.
- Latchman, D.S., 1998. The Brn-3a transcription factor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (11), 1153–1157.
- Lebrun-Julien, F., Morquette, B., Douillette, A., Saragovi, H.U., Di Polo, A., 2009. Inhibition of p75(NTR) in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol. Cell Neurosci.* 40 (4), 410–420.
- Linden, R., Perry, V.H., 1983. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.* 272 (1), 145–149.
- Lindqvist, N., Peinado-Ramón, P., Vidal-Sanz, M., Hallbook, F., 2004. GDNF, Ret, GFR α 1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection. *Exp. Neurol.* 187 (2), 487–499.
- Lund, R.D., 1965. Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science* 149 (3691), 1506–1507.
- Mansour-Robaey, S., Clarke, D.B., Wang, Y.C., Bray, G.M., Aguayo, A.J., 1994. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91 (5), 1632–1636.
- Mayor-Torroglosa, S., De I, V., Rodríguez, M.E., Lopez-Herrera, M.P., Aviles-Trigueros, M., García-Aviles, A., de Imperial, J.M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2005. Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (10), 3825–3835.
- Murphy, J.A., Franklin, T.B., Rafuse, V.F., Clarke, D.B., Oct 2007. The neural cell adhesion molecule is necessary for normal adult retinal ganglion cell number and survival. *Mol. Cell Neurosci.* 36 (2), 280–292.
- Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-Lopez, L., Canovas-Martinez, 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 (8), 3860–3868.
- Nguyen, J.V., Soto, I., Kim, K.Y., Bushong, E.A., Oglesby, E., Valiente-Soriano, F.J., Yang, Z., Davis, C.H., Bedont, J.L., Son, J.L., Wei, J.O., Buchman, V.L., Zack, D.J., Vidal-Sanz, M., Ellisman, M.H., Marsh-Armstrong, N., 18 Jan 2011. Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108 (3), 1176–1181.
- Ortin-Martinez, A., Jimenez-Lopez, M., Nadal-Nicolas, F.M., Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Sauve, Y., Villegas-Perez, M.P., 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), 3171–3183.
- Parrilla-Reverter, G., Agudo, M., Nadal-Nicolas, F., Alarcon-Martinez, L., Jimenez-Lopez, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Bernal-Garro, J.M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009a. Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vision Res.* 49 (23), 2808–2825.
- Parrilla-Reverter, G., Agudo, M., Sobrado-Calvo, P., Salinas-Navarro, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009b. 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 (1), 32–41.
- 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. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37 (4), 489–500.
- Perry, V.H., 1981. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience* 6 (5), 931–944.
- Perry, V.H., Henderson, Z., Linden, R., 1983. Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J. Comp. Neurol.* 219 (3), 356–368.
- Quina, L.A., Pak, W., Lanier, J., Banwait, P., Gratwick, K., Liu, Y., Velasquez, T., O'Leary, D.D., Goulding, M., Turner, E.E., 2005. BRN3A-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J. Neurosci.* 25 (50), 11595–11604.
- Reichstein, D., Ren, L., Filippopoulos, T., Mittag, T., Danias, J., Jan 2007. Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Exp. Eye Res.* 84 (1), 13–21.
- Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Valiente-Soriano, F.J., Jimenez-Lopez, M., Mayor-Torroglosa, S., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp. Eye Res.* 90 (1), 168–183.
- Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Valiente-Soriano, F.J., Ortin-Martinez, A., Jimenez-Lopez, M., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., de I, V., Vidal-Sanz, M., 2009a. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol. Vis.* 15, 2578–2598.
- Salinas-Navarro, M., Jimenez-Lopez, M., Valiente-Soriano, F.J., Alarcon-Martinez, L., Aviles-Trigueros, M., Mayor, S., Holmes, T., Lund, R.D., Villegas-Perez, 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. *Vision Res.* 49 (6), 637–647.
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jimenez-Lopez, M., Aviles-Trigueros, M., Holmes, T.M., Lund, R.D., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009c. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49 (1), 115–126.
- Salvador-Silva, M., Vidal-Sanz, M., Villegas-Perez, M.P., 2000. Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J. Comp. Neurol.* 417 (4), 431–447.
- Sanchez-Migallón, M.C., Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2011. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.* 92 (4), 260–267.
- 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.* 15 (7), 192–201.
- Selles-Navarro, I., Villegas-Perez, 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. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37 (10), 2002–2014.
- Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Villegas-Perez, 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 (6), 866–878.
- Soto, I., Oglesby, E., Buckingham, B.P., Son, J.L., Roberson, E.D., Steele, M.R., Inman, D.M., Vetter, M.L., Horner, 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 (2), 548–561.
- Surgucheva, I., Weisman, A.D., Goldberg, J.L., Shnyra, A., Surguchov, A., 2008. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* 14, 1540–1548.
- Thanos, S., Vidal-Sanz, M., Aguayo, A.J., 1987. The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res.* 406 (1–2), 317–321.
- Theil, T., McLean-Hunter, S., Zornig, M., Moroy, T., 1993. Mouse Brn-3 family of POU transcription factors: a new aminoterminal domain is crucial for the oncogenic activity of Brn-3a. *Nucleic Acids Res.* 21 (25), 5921–5929.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., Sobrado-Calvo, P., Selles-Navarro, I., Rodríguez, E., Mayor-Torroglosa, S., Villegas-Perez, M.P., 2000. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox. Res.* 2 (2–3), 215–227.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M.P., Mayor, S., de Imperial, J.M., Villegas-Perez, M.P., 2001. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. Neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv. Ophthalmol.* 45 (Suppl. 3), S261–S267.
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Perez, 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 (1), 92–101.

- Villegas-Perez, 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. *J. Neurosci.* 8 (1), 265–280.
- Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., 1996. Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport* 7 (12), 1995–1999.
- Villegas-Perez, 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 (1), 23–36.
- Wang, S., Villegas-Perez, 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 (3), 183–196.
- Wang, S., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Lund, R.D., 2000. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2), 537–545.
- Weishaupt, J.H., Klocker, N., Bahr, M., 2005. Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells. *J. Mol. Neurosci.* 26 (1), 17–25.
- Xiang, M., Zhou, L., Peng, Y.W., Eddy, R.L., Shows, T.B., Nathans, J., 1993. Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells. *Neuron* 11 (4), 689–701.
- Xiang, M., Zhou, L., Macke, J.P., Yoshioka, T., Hendry, S.H., Eddy, R.L., Shows, T.B., Nathans, J., Jul 1995. The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J. Neurosci.* 15 (7 Pt 1), 4762–4785.

11. ANEXO III

11. ANEXO III.

Retina

Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on Mouse Axotomized Retinal Ganglion Cells and Phagocytic Microglia

Caridad Galindo-Romero,^{1,3} F. Javier Valiente-Soriano,^{1,3} M. Jiménez-López,¹ Diego García-Ayuso,¹ María P. Villegas-Pérez,¹ Manuel Vidal-Sanz,^{*,1,4} and Marta Agudo-Barriuso^{*,1,2,4}

PURPOSE. To assess the effect of a single intravitreal injection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the survival of mouse retinal ganglion cells (RGCs) and on phagocytic microglia after intraorbital optic nerve transection (IONT).

METHODS. One week before IONT or processing, RGCs from pigmented C57/BL6 and albino Swiss mice were traced by applying hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) to both superior colliculi. Right afterward unilateral IONT, BDNF or vehicle were intravitreally administered. At increasing time intervals postlesion retinas were dissected as flat-mounts and subjected to BRN3A and Iba1 immunodetection. BRN3A⁺RGCs were automatically quantified in all retinas and their distribution was assessed using isodensity maps. In all retinas, the Iba1-positive and OHSt-filled microglial cells present in the ganglion cell layer were manually quantified. Their distribution was observed by neighbor maps.

RESULTS. When vehicle was administered, IONT-induced RGC death was significant at 3 days, while BDNF treatment delayed it to 5 days. At 14 days after BDNF or vehicle injection, 45% and 18% of RGCs had survived, respectively. There was a significant increase in OHSt-filled microglial cells in the right (contralat-

eral) retinas after both treatments, without concurring with quantifiable RGC death. In the injured eye, the number of OHSt-filled microglial cells increased as the population of RGCs decreased and spread from central to peripheral areas.

CONCLUSIONS. In axotomized mouse retinas, a single intravitreal injection of BDNF protects RGCs throughout the whole retina. There is a strong contralateral response that involves microglial activation and OHSt phagocytosis. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:974-985) DOI:10.1167/iov.12-11207

Axonal damage to central nervous system (CNS) neurons leads to their degeneration and death causing an irreversible loss of function. The retina is probably the most extensively studied part of the CNS in mammals. As a result, the visual system of rodents is widely used in developmental studies^{1,2} as a model of traumatic injury to the CNS,³⁻⁶ regeneration,^{7,8} transient ischemia,^{9,10} glaucoma,¹¹⁻¹³ and retinal degeneration.^{14,15}

Retinal ganglion cells (RGCs) are the only output neurons of the retina. Since their axons form the optic nerve, damage to the optic nerve primarily affects RGCs. These cells are found in the innermost layer of the retina, sharing a location with the equally numerous population of displaced amacrine cells.¹⁶⁻¹⁸ In order to investigate the response of RGCs to trauma or disease as well as elucidating the effect of neuroprotective treatments, it is essential to clearly identify them. RGCs can be either traced from their retinorecipient targets in the brain, which in mice and rats are mainly the superior colliculi^{16,19-22} or by immunodetection of RGC-specific proteins such as BRN3A,^{4,23} or by in situ hybridization of RGC-specific mRNAs such as γ -synuclein.²⁴⁻²⁶ Tracers will identify the RGCs with a competent axon upon tracing, while BRN3A or γ -synuclein detection will identify living RGCs.

Microglial cells are the resident macrophages in the CNS that originate from hemopoietic cells.²⁷ During neurodegeneration, activated microglial cells engulf cell carcasses and debris to eliminate them from the tissue.²⁸ When the dead cells are labeled with exogenous compounds, these are incorporated into the microglial phagosomes, resulting in the transcellular labeling of the phagocytotic microglial cell.²⁹⁻³⁵ Therefore, when traced-RGCs are phagocytosed, the phagocytotic microglial cells in the retina can be identified by their amoeboid morphology,^{35,36} by the expression of specific markers such as Iba1³⁷ and by transcellular labeling.

Since the late 1990s it has been known that after unilateral optic nerve injury in rats, there is a microglial response in the eye contralateral to the lesion.³⁸ This response has also been reported in rodent models of glaucoma^{39,40} and transient ischemia.⁴¹ In the injured retina, the microglial response

From the ¹Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum," Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias, Universidad de Murcia, Murcia, Spain; and the ²Unidad de Investigación, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, Instituto Murciano de Investigaciones Biosanitarias, Murcia, Spain.

³These authors are joint first authors.

⁴These authors are joint last authors.

Supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and ISCIII-FEDER "Una manera de hacer Europa": PI10/00187, PI10/01496; Fundación Séneca 04446/GERM/07; Spanish Ministry of Education and Science SAF-2009-10385, SAF-2012-38328, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología RD07/0062/0001.

Submitted for publication October 25, 2012; revised December 28, 2012; accepted December 29, 2012.

Disclosure: C. Galindo-Romero, None; F.J. Valiente-Soriano, None; M. Jiménez-López, None; D. García-Ayuso, None; M.P. Villegas-Pérez, None; M. Vidal-Sanz, None; M. Agudo-Barriuso, None

*Each of the following is a corresponding author: Marta Agudo-Barriuso, Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus Espinardo, 30100 Murcia, Spain; martabar@um.es.

Manuel Vidal-Sanz, Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus Espinardo, 30100 Murcia, Spain; manuel.vidal@um.es.

increases as the RGCs die^{36,42} and, in rats, this response is attenuated by neuroprotective trophic factors.³⁶

The temporal course of RGC death following IONT in mice and rats has been extensively studied by our group.^{4,23,30,43} This acute insult causes a significant RGC loss at 3 days in both species. At 14 days only 12% to 15% of the original population of RGCs survive. Extensive work has been devoted to rescue axotomized RGCs.⁴⁴ In rats, a single intravitreal injection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protects the whole RGC population up to 7 days after IONT.^{30,45–47} However, to the best of our knowledge, there are no reports of the effect of BDNF on RGC survival after axotomy in mice or its effect on phagocytic microglia.

In this study, two commonly used mouse strains—an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain—were employed to investigate the effect of a single intravitreal injection of BDNF on the survival of RGCs, and to assess the appearance of transcellularly labeled microglial cells (phagocytic) in the ganglion cell layer of the injured and uninjured contralateral eyes after unilateral IONT.

MATERIALS AND METHODS

Anesthesia and Analgesia

Adult female albino Swiss (30–35 g body weight) and pigmented C57/BL6 (20–25 g body weight) mice were obtained from the University of Murcia breeding colony. All animals were treated in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

For anesthesia, a mixture of xylazine (10 mg/kg body weight) (Rompun; Bayer, Kiel, Germany) and ketamine (60 mg/kg body weight) (Ketalar; Pfizer, Alcobendas, Madrid, Spain) was used intraperitoneally (IP). After surgery, an ointment containing tobramycin (Tobrex; Alcon S.A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent desiccation. Mice were given oral analgesia (buprenorphine 0.3 mg/mL) (Buprex; Schering-Plough, Madrid, Spain) at 0.8 mg/kg (prepared in strawberry-flavored gelatin) the day of the surgery and for the next 3 days.

All animals were sacrificed with an IP injection of an overdose of pentobarbital (Dolethal; Vetoquinol, Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

Surgery

Retinal Ganglion Cell Tracing. Hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) diluted at 10% in 0.9% NaCl and 10% dimethylsulfoxide was applied to both superior colliculi (SCi) 1 week before surgery or 10 days before processing (intact animals), as previously described.^{21,48,49} In brief, after exposing the midbrain, a small pledge of gel foam (Espongostan Film; Ferrosan A/S, Soeborg, Denmark) soaked in OHSt was applied over the entire surface of both SCi.

Intraorbital Nerve Transection. The left optic nerve was severed at 0.5 mm from the optic disc while sparing the blood supply, according to standard procedures in our laboratory.⁴ After surgery, the eye fundus of each animal was checked to verify that retinal vessels were intact.

Brain-Derived Neurotrophic Factor Delivery. After the IONT procedure, a group of pigmented ($n = 30$) and albino ($n = 14$) mice received in the left eye an intravitreal injection of 2.5 μ L of BDNF (Peprotech Laboratories, London, UK) diluted at 1 μ g/ μ L in 1% bovine serum albumin-phosphate buffer saline. A second group of pigmented ($n = 29$) and albino ($n = 13$) mice received an intravitreal injection of 2.5 μ L of vehicle.

Animals were sacrificed at increasing time intervals postlesion (see Results).

In both groups, the injured retinas were the left ones, while the right retinas were the contralateral ones. Since we observed a microglial response in the contralateral retinas, the RGC population and the appearance of phagocytic microglial cells were also analyzed in intact retinas dissected 10 days after retrograde tracing with OHSt (6 or 12 retinas from pigmented or albino strain, respectively). These intact retinas were used as controls.

Immunohistofluorescence

After euthanasia, all animals were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer after a saline rinse.

Retinas were dissected as flattened whole-mounts by the method described in previous studies.^{4,21,22} Then, all retinas were permeated in PBS 0.5% Triton X100 by freezing them at -70°C for 15 minutes, rinsed in new PBS 0.5% Triton X100 and incubated overnight at 4°C with goat anti-BRN3A (C-20; Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted 1:500 in blocking buffer (PBS, 2% bovine serum albumin, 2% Triton X100). Afterward, retinas were washed three times in PBS and incubated at room temperature for 2 hours with donkey anti-goat dye (Dylight 594; Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK) (1:500 dilution in PBS 0.5% Triton X100). In 4 retinas per group, Iba1 was detected as well using rabbit anti-Iba1 antibody (1:500) (Dako; Rafer, Zaragoza, Spain), which was developed with donkey anti-rabbit dye (1:500) (Dylight 468; Jackson ImmunoResearch). Finally, the retinas were thoroughly washed in PBS and mounted vitreal side up on subbed slides and covered with antifading solution. Unless otherwise stated, all reagents were from Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain).

Image Acquisition

Whole mounted retinas were analyzed for OHSt, BRN3A, and Iba1 signals. To reconstruct retinal whole-mounts, retinal photographs were taken 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 analysis software (Image-Pro Plus, IPP 5.1 for Windows; Media Cybernetics, Silver Spring, MD) by the method described in previous studies.^{4,21} Reconstructed whole-mounts made up of 140 individual frames were further processed using a graphics editing program, when required (Adobe Photoshop CS 8.0.1; Adobe Systems, Inc., San Jose, CA).

Automated Quantification of the Total RGC Population

OHSt⁺ and BRN3A⁺RGCs were automatically quantified by the method described in previous studies.^{4,21} Briefly, the individual fluorescent images taken of each retinal whole-mount were processed by a specific cell-counting subroutine using the IPP macro language. A sequence of filters and transformations was applied to each image to identify cell limits and separate individual cells for automated cell counting. Quantitative data were exported to a spreadsheet application (Microsoft Office Excel 2003; Microsoft Corporation, Redmond, WA) for further analyses.

BRN3A⁺RGCs were automatically quantified in all the retinas, while OHSt⁺RGCs were automatically quantified only in the control intact eyes, because at 3 days post-IONT the appearance of OHSt-filled microglial cells in the retina impaired the automated routine. Thus, traced-RGCs were manually counted in 12 retinal locations and their total number was inferred as previously described.⁴

RGC Spatial Distribution

The detailed spatial distribution of BRN3A⁺RGCs in all retinas was obtained through quadrant analysis and demonstrated on isodensity maps constructed as previously described.^{4,21}

Quantification of OHSt-Filled Microglia

The OHSt-filled microglial cells (i.e., phagocytic) present in the ganglion cell layer of 6 (pigmented) and 12 (albino) intact retinas and 8 experimental retinas (4 right and 4 left) per strain, group, and time point, were identified by their morphology^{30,36,50} and their expression of Iba1 (see Fig. 5A). These cells were dotted on the retinal photomontage by an experienced researcher using a graphics editing program (Adobe Photoshop CS 8.0.1; Adobe Systems, Inc.). An automatic IPP routine was developed to quantify the total number of dots in each flat-mount: first, the user was asked to mark the ON as a reference point in the retina and draw the outline of the retina to measure its total area. Then, we calculated the coordinates of the center of mass, (x, y) of each dot. Finally, all data, including the spatial coordinates of the ON, the number of dots, and the coordinates of their center of mass, were displayed and exported to a spreadsheet by dynamic data exchange (Microsoft Office Excel 2000; Microsoft Corporation) for further analysis.

Spatial Distribution of OHSt-Filled Microglial Cells: Neighborhood Maps

To study the spatial distribution of the OHSt-filled microglial cells a new Java application (Oracle Corporation, Redwood Shores, CA) was developed. This routine was based on the *k*-nearest neighbor algorithm and the fixed-radius method. In a first step, the user set the radius of the study to $r = 0.1023$ mm and imported the spreadsheet with all the data previously recorded. Then, we converted all cell coordinates into the ON system. Next, we calculated the number of neighbors of each cell by measuring their Euclidean distance to the rest of cells. The cells within the fixed radius were counted as neighbor cells. Finally, the location of each cell with respect to the ON and their number of neighbors were recorded in a plain text file. Spatial information was used to plot every cell in the retina. Each cell was colored according to the number of neighbor cells around it. The scale ranged from purple (0–2 neighbors) to red (≥ 21 neighbors). Therefore, the warmer the color the more microglial cells in a given retinal location. All plots were performed using a software package for scientific graphing and data analysis (SigmaPlot 9.0 for Windows; Systat Software, Inc., Richmond, CA).

Statistical Analysis

To compare values for retinas of different groups, the number of OHSt or BRN3A positive RGCs and the number of OHSt-filled microglial cells we used a statistical software package (SigmaStat for Windows Version 3.11 program; Systat Software, Inc., Richmond, CA). Differences were considered significant when $P < 0.05$. Test results are detailed in the Results section. Data are presented as mean \pm standard deviation.

RESULTS

Response of Mouse Retinal Ganglion Cells to Axotomy and Vehicle or BDNF Treatment

After optic nerve axotomy, RGCs undergo progressive degeneration (Figs. 1A–C). This loss is delayed by BDNF treatment (compare left versus right columns in Figs. 1B, 1C).

The presence of OHSt-filled microglial cells in the injured retinas and the contralateral retinas (see below) hindered the automated counting routine of OHSt⁺RGCs. Consequently, traced-RGCs were manually quantified in the injured and contralateral retinas, and their number was inferred as previously published.⁴ The number of OHSt⁺RGCs in intact retinas and of BRN3A⁺RGCs in all retinas was automatically quantified.

The number of BRN3A⁺RGCs in the intact retinas of the pigmented mice amounted to 83.4% of the RGCs traced from the SCi (Table 1A). This value is slightly lower, but not significantly different than the 85.5% reported in our previous work.⁴ In the albino strain, the population of RGCs was higher than that in the pigmented strain, which was in agreement with previous reports.²¹ Interestingly, in the albino strain, BRN3A detects 92.6% of the traced RGCs (Table 1A). The numbers of OHSt⁺RGCs or BRN3A⁺RGCs in the contralateral retinas decreased with time postlesion although not significantly. Thus data from these retinas were averaged (Table 1B). However, because of this decrease, we used the number of RGCs in the intact retinas as the control for the RGC population.

The number of RGCs was significantly higher in the BDNF than in the vehicle-treated group at all post-IONT times, in both mice strains, and with both markers (Table 1B). In fact, the number of RGCs in the BDNF group did not differ from that of the control group at 3 days postlesion (dpl), while it was significantly lower in the vehicle group.

Another observation was that, regardless of the treatment, there was a significant decrease in the RGC population from 3 to 5, 5 to 7, and 7 to 14 dpl ($P < 0.001$). However, the RGC loss was more dramatic in the vehicle-treated retinas, as compared to that in the BDNF-treated retinas (Figs. 2A, 2B). As shown in the figures, the slope of the regression line between the surviving RGCs and postlesion time is greater in absolute terms (with a minus sign as the RGC population decreases with time) in the vehicle than in the BDNF group. This is observed both in the OHSt and in the BRN3A quantification. Moreover, Figures 2A and 2B show that after IONT+vehicle treatment, there was a daily loss of 2545 OHSt⁺RGCs and 1907 BRN3A⁺RGCs, while after BDNF treatment this loss was lower amounting to 1697 OHSt⁺RGCs and 1352 BRN3A⁺RGCs. This means that, regardless of the method used to identify the RGCs, survival is 1.5 times higher after treatment with BDNF than after treatment with vehicle.

However, BRN3A⁺RGC loss was lower than OHSt⁺RGC loss since the total number of BRN3A⁺RGCs was lower than the total number of OHSt⁺RGCs. The survival rates after BDNF and vehicle application showed that the RGC loss with respect to the original population was similar for both markers at all times, except at 5 dpl after vehicle application, when the percentage of BRN3A⁺RGC loss was significantly greater than that of OHSt⁺RGC loss (Figs. 2C, 2D). Finally, the percentage of RGC loss was similar for both mice strains, indicating that eye pigmentation does not have any effect after this type of lesion and BDNF treatment.

Spatial RGC Loss after IONT and Vehicle or BDNF Treatment

Figure 3 shows the isodensity maps illustrating the distribution of OHSt⁺RGCs and BRN3A⁺RGCs in intact retinas from both mice strains (Figs. 3A, 3D) and the distribution of the surviving BRN3A⁺RGCs after IONT and BDNF (Figs. 3B, 3E) or vehicle (Figs. 3C, 3F) treatment. In the injured retinas and irrespective of the treatment, the RGC loss was diffuse and affected the whole retina, as the color distribution changes homogeneously from warm (yellow, orange, red: higher densities) to cold (purple, blue, green: lower densities). In agreement with the quantitative data obtained, the distribution of BRN3A⁺RGCs at 3 dpl after BDNF administration is similar to that found in intact retinas, while after vehicle administration there was a substantial decrease in these neurons (Figs. 3A, 3B, 3D, 3E). Although the protection provided to RGCs by BDNF is transitory, RGC density was higher at all postlesion times after the BDNF application, as

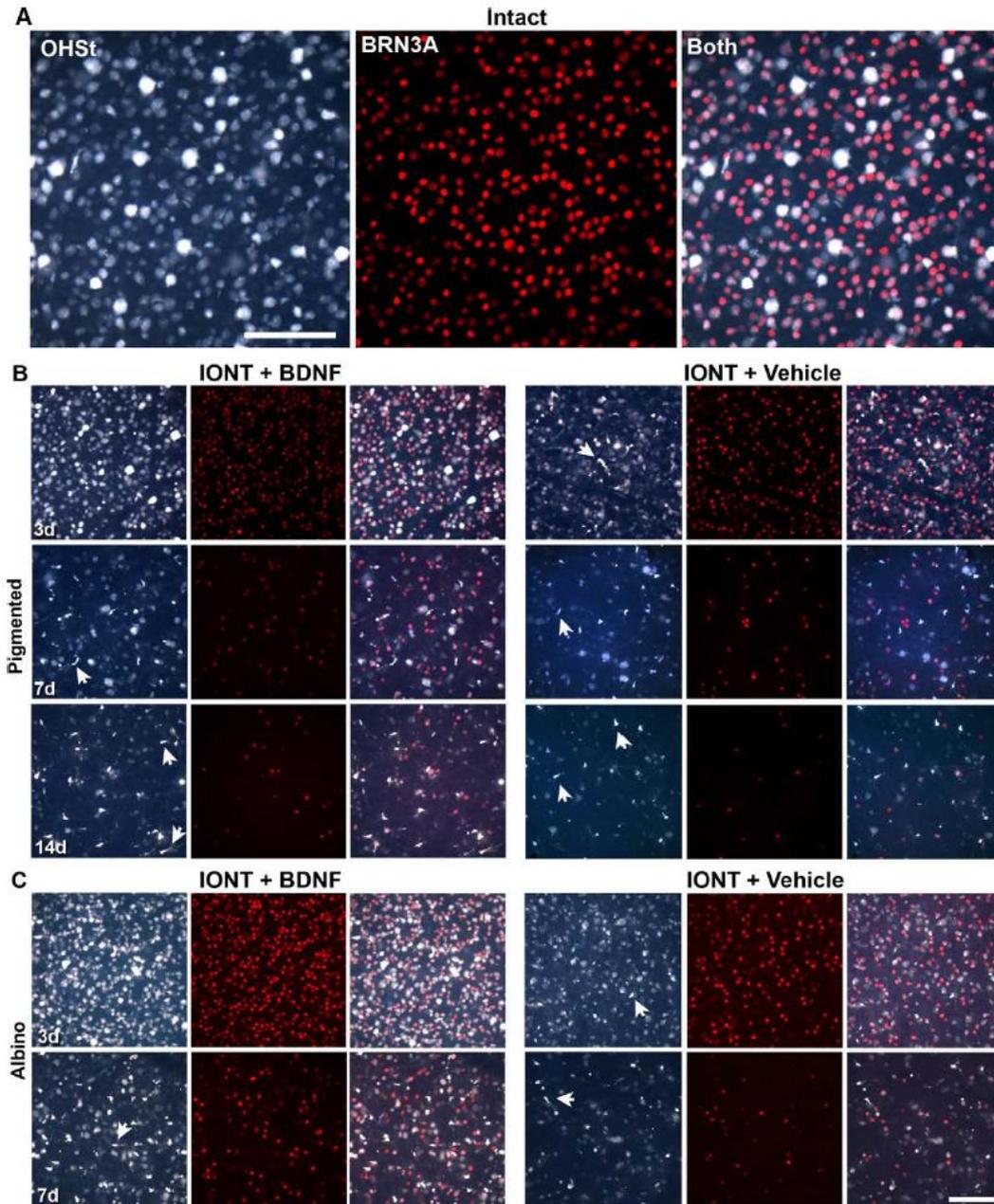


FIGURE 1. RGC loss in albino and pigmented mice after IONT and vehicle or BDNF treatment. Magnifications from flat mounted retinas showing BRN3A⁺ and OHSt⁺ RGCs in intact (A) and injured retinas (B, C) at increasing times post-IONT. (B) Pigmented; (C) albino. Arrows point to OHSt-filled microglial cells, which do not express BRN3A. Scale bar: 100 μm.

compared to that after vehicle treatment (Fig. 3: compare maps in 3B with those in 3C, and maps in 3E with those in 3F).

Number of OHSt-Filled Microglial Cells in Control, Injured, and Contralateral Retinas

After BDNF/vehicle treatment, OHSt-filled microglial cells were counted in the injured and in the contralateral retinas at different postlesion times in both mice strains (Table 2). In the

contralateral retinas, the appearance of OHSt-filled microglial cells was observed as early as at 3 dpl (Table 2). The reason for such early response in the right retina might have been that the appearance of OHSt-filled microglial cells was a normal reaction to OHSt-tracing, rather than a response to the contralateral injury. To further explore this issue, we quantified the number of OHSt-filled microglial cells (Table 2) and RGCs (Table 1A) in retinas from intact eyes processed 10 days after OHSt-tracing (7 days of tracing + 3 days, to make this group comparable to the 3 days IONT group). These data show that

TABLE 1. Total Number and Density of Surviving RGCs in Albino and Pigmented Mice after IONT and Vehicle or BDNF Treatment

	Pigmented (C57/BL6), n = 6; Mean (SD)				Albino (Swiss), n = 12; Mean (SD)			
	Contra Lateral	3d	5d	Injured 7d	14d	Contra Lateral	3d	Injured 7d
A: Intact								
BRN3A			33,769 (1,210)				47,211 (1,346)	
OHSt			41,011 (2,174)				51,025 (1,425)	
B: Experimental								
Total numbers								
IONT+VEHI								
BRN3A	31,889 (765)	25,725 (1,809)	14,413 (3,488)	9,404 (1,397)	5,588 (773)	45,900 (2,443)	40,903 (2,031)	15,073 (3,858)
OHSt	40,317 (2,656)	34,937 (2,589)	23,661 (1,874)	15,121 (3,255)	6,900 (1,158)	49,553 (1,730)	42,232 (3,250)	19,599 (6,066)
IONT+BDNF								
BRN3A	32,019 (711)	29,813 (1,805)	24,864 (4,129)	19,750 (3,192)	14,084 (1,870)	44,414 (1,092)	46,697 (1,846)	26,097 (3,392)
OHSt	40,274 (2,477)	40,222 (1,160)	30,496 (3,001)	26,981 (1,543)	18,315 (1,226)	49,182 (982)	49,972 (1,511)	30,364 (3,687)
Area (mm²)								
IONT+VEHI	14.5 (0.3)	13.6 (1.6)	13.9 (0.5)	14.5 (1.1)	15.0 (1.0)	12.7 (0.7)	12.6 (1.3)	13.9 (1.1)
IONT+BDNF	14.1 (0.3)	13.3 (0.5)	13.6 (0.4)	14.3 (0.9)	15.0 (0.8)	14.4 (0.8)	13.5 (0.6)	13.1 (1.0)
Density (RGCs/mm²)								
IONT+VEHI								
BRN3A	2,193 (63)	1,916 (213)	1,043 (267)	655 (134)	375 (58)	3,625 (396)	3,273 (436)	1,102 (326)
OHSt	2,797 (172)	2,620 (446)	1,708 (150)	1,038 (192)	585 (48)	3,913 (361)	3,418 (322)	1,128 (556)
IONT+BDNF								
BRN3A	2,255 (81)	2,240 (203)	1,835 (349)	1,381 (229)	938 (131)	3,115 (82)	3,458 (211)	2,000 (331)
OHSt	2,838 (86)	2,594 (1146)	2,245 (249)	1,888 (164)	1,222 (124)	3,444 (114)	3,702 (242)	2,317 (304)
Number of analyzed retinas								
IONT + VEHI	29	8	6	7	8	13	8	6
IONT + BDNF	30	7	7	7	8	14	7	7

The whole population of BRN3A+RGCs was automatically quantified in all retinas (intact, contralateral, and experimental). OHSt-traced RGCs in the intact retinas were automatically quantified and their number in the contralateral and experimental retinas inferred from the manual counting (see Methods for further explanation).

(A) Number of RGCs in intact retinas. (B) Number and density of RGCs in the experimental groups. Compared to intact retinas, RGC loss became significant at 3 dpl in the vehicle treated animals (Mann-Whitney test, $P < 0.001$), and at 5 dpl in the BDNF-group (Mann-Whitney test, $P < 0.001$). After IONT the number of RGCs in both strains with both markers at all time points was significantly higher in the BDNF than in the vehicle-treated group (Mann-Whitney test, $P < 0.001$), d, days postIONT; SD, standard deviation.

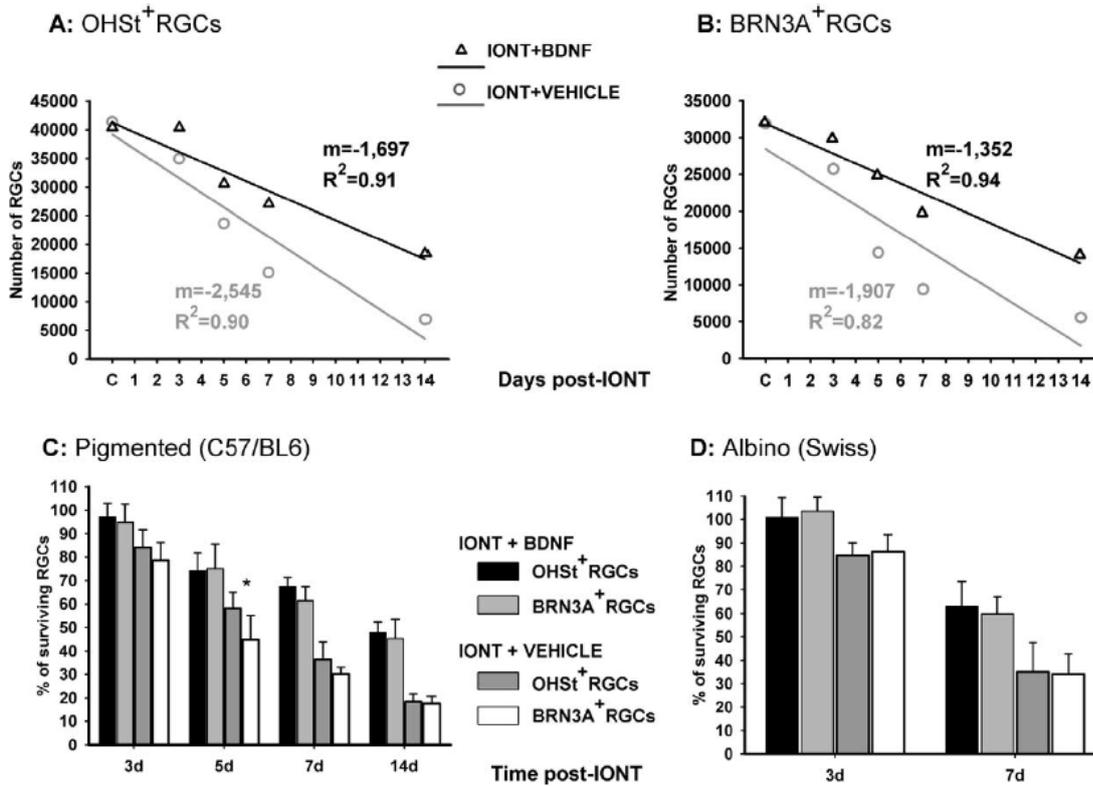


FIGURE 2. BDNF delays axotomy-induced RGC death in mouse retinas. (A, B) The temporal RGC loss after IONT and vehicle or BDNF treatment adjusts to an order 1 regression line (95% CI) for OHSt (A) and BRN3A (B). The slope (*m*) and the correlation coefficient (*R*²) of each *straight line* are shown. Data are taken from the experiment on pigmented mice. (C, D) Histograms showing the percentage of surviving OHSt-traced or BRN3A⁺ RGCs after IONT and BDNF or vehicle treatment in pigmented (C) and albino (D) mice. The percentages were calculated considering 100% of the number of OHSt⁺ or BRN3A⁺ RGCs in the intact retinas. Notice that the percentage of RGC survival is similar for both markers, except at 5 dpl after IONT+vehicle ([C], *asterisk*), when the percentage of BRN3A⁺RGCs is significantly smaller than that of OHSt⁺RGCs (ANOVA, Bonferoni *t*-test, *P* = 0.023). C, control retinas.

in the intact eyes the number of OHSt-filled microglial cells was significantly smaller than in the contralateral retinas at any time point. This suggested that the appearance of OHSt-filled microglial cells in the fellow retinas of axotomized retinas occurred as a consequence of the contralateral injury. Their number remained quite constant in both treatments and both

strains, and did not vary significantly with time, though at 7 dpl their population was higher (Table 2, Fig. 4A).

As expected, in the injured eyes there was an increase of OHSt-filled microglial cells as the survival interval increased and at all time points, the number of OHSt-filled microglial cells was significantly lower after BDNF treatment (Table 2,

TABLE 2. Number of OHSt-Filled Microglial Cells in the Injured and Contralateral Retinas after Vehicle or BDNF Treatment

	Pigmented (C57/BL6); Mean (SD)					Albino (SWISS); Mean (SD)				
	IONT+VEHI		IONT+BDNF			IONT+VEHI		IONT+BDNF		
	Intact	Contralateral	Injured	Contralateral	Injured	Intact	Contralateral	Injured	Contralateral	Injured
Intact	39 (5)					69 (11)				
3d		234 (51)	410 (71)	212 (96)	182 (14)		181 (34)	227 (45)	166 (64)	158 (20)
5d		248 (113)	1664 (168)	211 (53)	1001 (217)					
7d		373 (157)	2275 (215)	369 (141)	1465 (149)		211 (99)	1491 (78)	270 (136)	1043 (326)
14d		218 (44)	2630 (196)	281 (113)	2334 (118)					

Data from intact retinas were obtained from animals analyzed 10 days after OHSt-tracing but otherwise untouched. Pigmented mice: the number of OHSt-filled microglial cells in the right contralateral retinas was significantly higher at all time points as compared to control intact retinas (ANOVA, Bonferoni *t*-test, *P* < 0.05). In these contralateral retinas there were no differences between vehicle- and BDNF-treated animals or between the different time points during each treatment. There was a significant increase in OHSt-filled microglial cells from 3 to 5 days and from 5 to 7 days in the injured retina in both groups (ANOVA, Bonferoni *t*-test, *P* < 0.001), and from 7 to 14 days in the BDNF-treated group (ANOVA, Bonferoni *t*-test, *P* = 0.007). The number of OHSt-filled microglial cells was significantly higher after vehicle than after BDNF treatment at all time points (*P* < 0.001). The same occurs in the albino mice, with the exception that there was no difference between both treatments in the injured eye at 3 dpl.

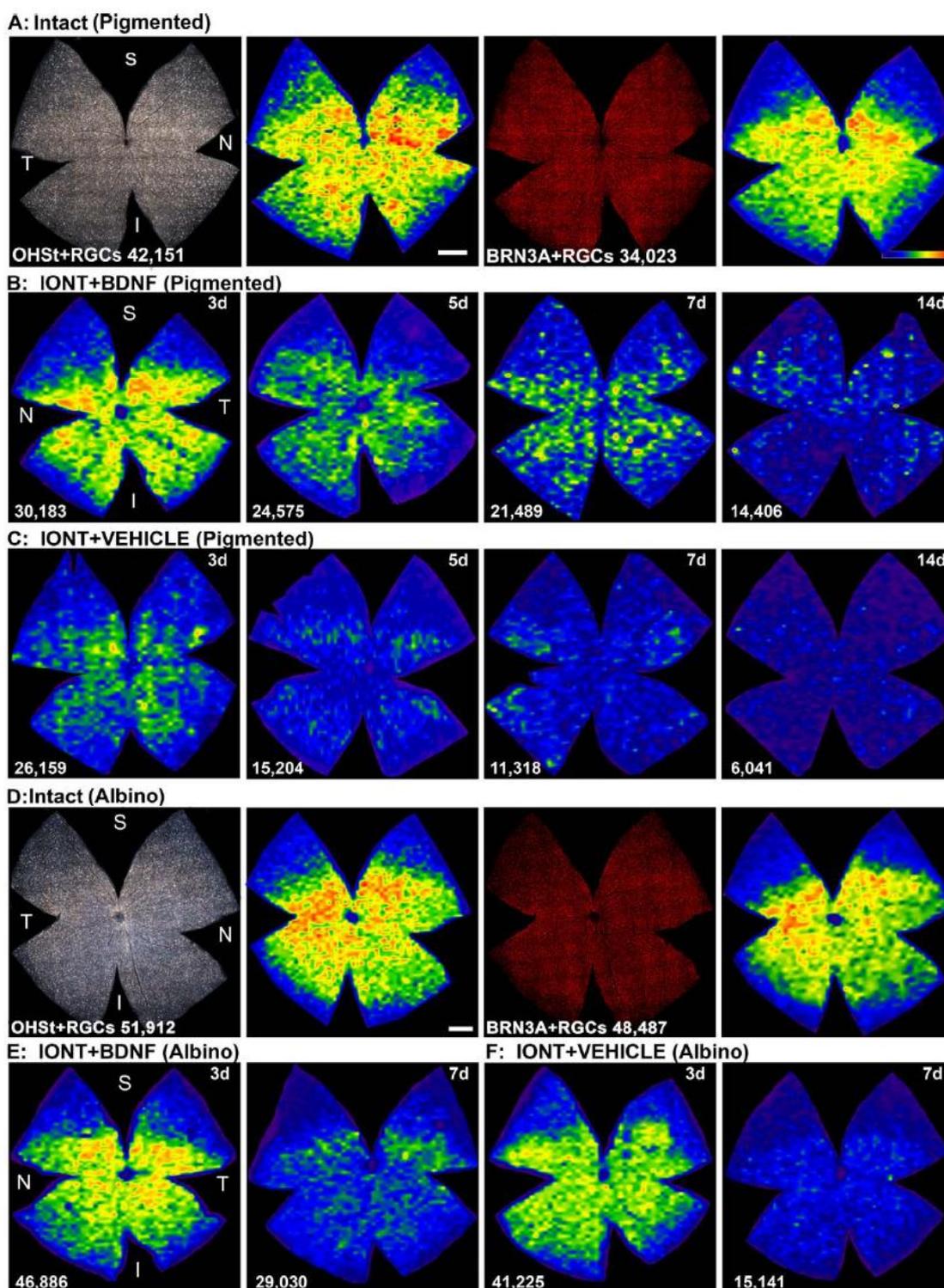


FIGURE 3. After IONT, a single injection of BDNF protects RGCs throughout the retina. (A, D) Flat-mounted intact retina from a pigmented (A) and an albino (D) mouse showing OHSt-traced (*first image*) and BRN3A⁺ (*third image*) RGCs and their corresponding isodensity maps (*second and fourth images*, respectively). (B, E) Isodensity maps from pigmented (B) and albino (E) mice retinas showing the distribution of the surviving BRN3A⁺RGCs after BDNF treatment at increasing time intervals post-IONT. (C, F) Isodensity maps from pigmented (C) and albino (F) mice retinas showing the distribution of the surviving BRN3A⁺RGCs after vehicle treatment at increasing interval times post-IONT. The number of BRN3A⁺RGCs

counted in the retina from which the maps have been generated is shown at the *bottom* of each map. Isodensity maps are filled contour plots generated by assigning to each of the 25 subdivisions of each individual frame a color code according to its RGC density within a 28-step scale ranging from 0 to 500 (*purple*) to 4800 (pigmented) and 5700 (albino) or more (*red*) RGCs/mm² (scale in [A] *bottom right*). S, superior; N, nasal; T, temporal; I, inferior. Scale bar: 1 mm.

Fig. 4A). This is graphically observed in Figure 4B. In these regression plots of OHSt-filled microglial cells versus time postlesion is shown that the slope of the straight line was more pronounced after the vehicle than after the BDNF treatment. The slope also shows that, each day, 195 and 175 new OHSt-filled microglial cells appeared in the retina after vehicle and BDNF treatment, respectively.

Furthermore, there was an inverse correlation between the number of OHSt⁺RGCs or BRN3A⁺RGCs and the number of OHSt-filled microglial cells (Figs. 4C, 4D). This correlation is slightly weaker in BRN3A⁺RGCs. One possible explanation for this finding is that BRN3A expression disappeared as soon as the RGC died, while the OHSt⁺RGC carcass only disappeared from the tissue when it was phagocytosed. In addition, at the same postlesion times the increase in OHSt-filled microglial cells and decrease in RGCs was more significant after vehicle than after BDNF treatment. In fact, BDNF-treated retinas showed the same pattern at 7 dpl than vehicle-treated retinas at 14 dpl. Finally, the slope of the straight lines in Figures 4C and 4D indicated a ratio of OHSt-filled microglial cell and

OHSt⁺RGC of approximately 1:10 or 1:12 when BDNF and vehicle were administered, respectively. Again, while these values were slightly lower for BRN3A⁺RGCs, the differences between vehicle and BDNF treatment are maintained.

Distribution of OHSt-Filled Microglial Cells

Figure 5A shows OHSt-filled and Iba1 positive microglial cells. In control intact retinas, there were a few OHSt-filled microglial cells scattered without apparent pattern (Fig. 5B). Figures 5C and 5D show the distribution of OHSt-filled microglial cells in the contralateral retinas at 3 and 7 dpl. These two time points were chosen to show their early appearance (3d) and their peak (7d). In these retinas, OHSt-filled microglial cells were not clustered in any specific region, but they rather were distributed over the whole retinal area. The same distribution was observed in both strains, after both treatments, and at all the survival time intervals examined. The distribution of microglial cells in the injured retinas at 3 days postlesion was similar to that found in the contralateral retinas

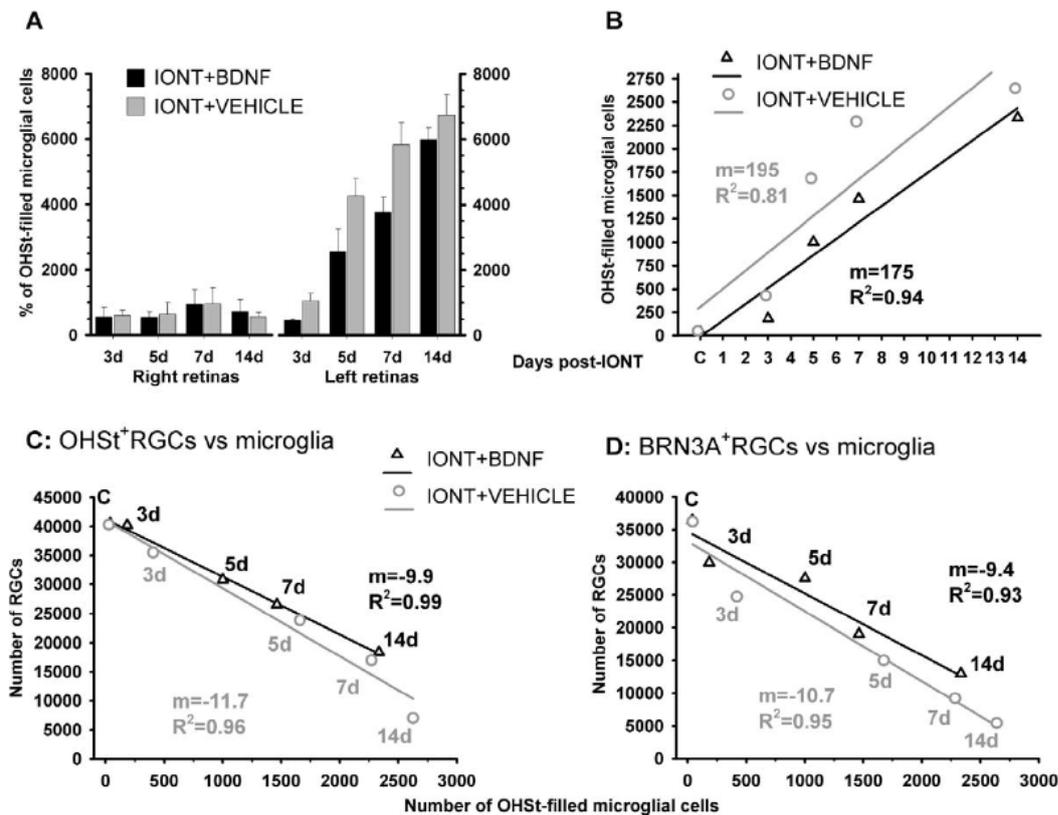


FIGURE 4. As the population of RGCs decreases, the number of OHSt-filled microglial cells increases. (A) Percentage of OHSt-filled microglial cells in contralateral (*right*) and injured (*left*) retinas after vehicle or BDNF treatment with respect to intact untouched retinas, which were considered 100%. (B) The temporal increase in OHSt-filled microglial cells after IONT and vehicle or BDNF treatment in the injured retina adjusts to an order 1 regression line (95% CI). The slope (m) and the correlation coefficient (R^2) of each *straight line* are shown. (C, D) Correlation between the temporal loss of OHSt⁺RGCs (C) or BRN3A⁺RGCs (D) and the appearance of OHSt-filled microglial cells. Data are taken from the pigmented mice experiment. C, control intact retinas.

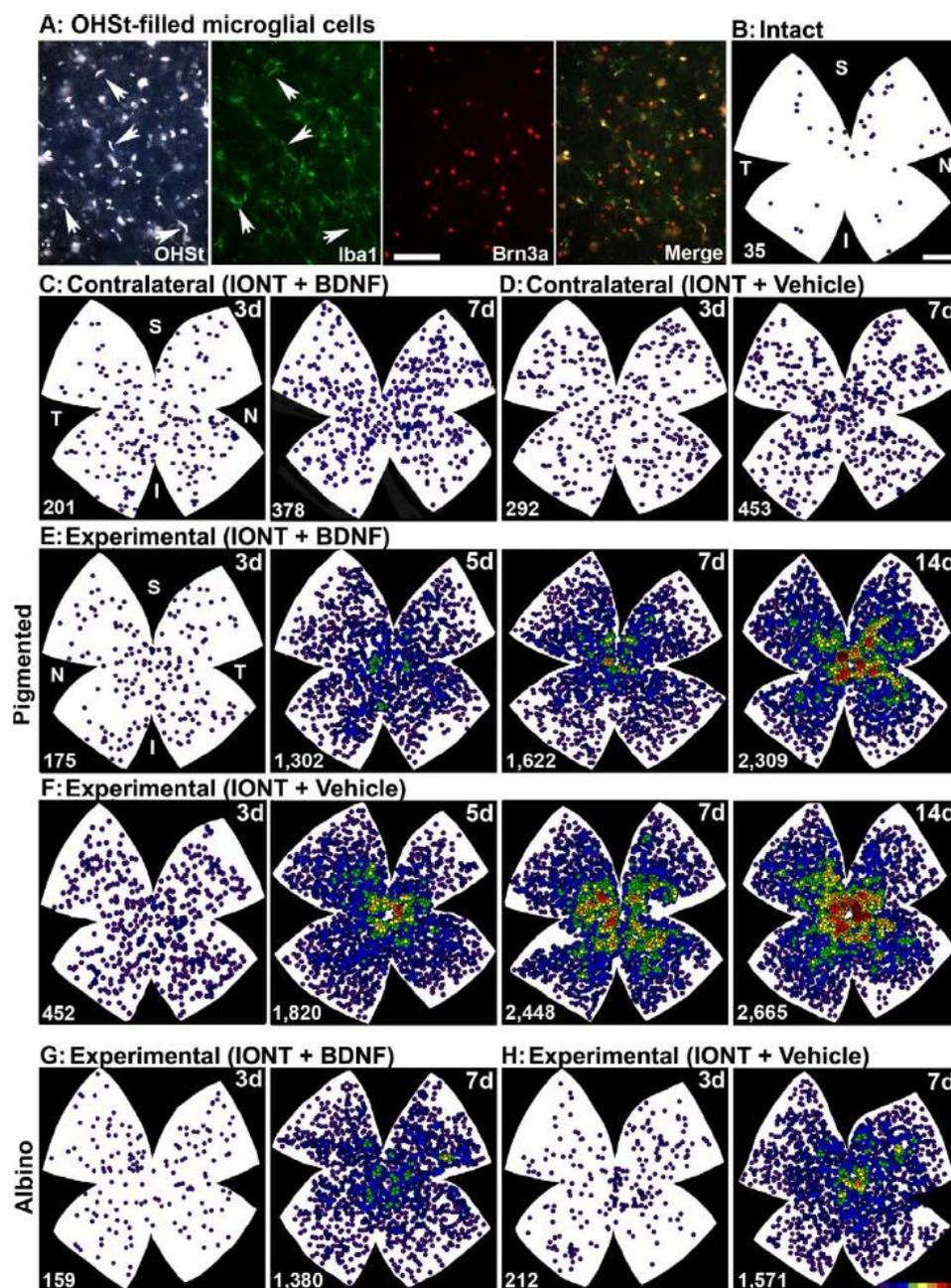


FIGURE 5. Retinal distribution of OHSt-filled microglial cells. (A) Magnifications from a flat-mounted retina analyzed 7 days after IONT+vehicle shown from *left to right*: OHSt, Iba1, and BRN3A signal; the *rightmost image* corresponds to the *merge image*. The *arrows* point to some OHSt and Iba1 positive microglial cells. *Scale bar*: 50 μ m. (B) Neighbor map showing the distribution of OHSt-filled microglial cells in an intact retina. (C, D) Neighbor maps showing the distribution of OHSt-filled microglial cells in representative contralateral retinas from pigmented mice at 3 and 7 days post IONT+BDNF (C) or IONT+vehicle (D). (E, F) Neighbor maps showing the distribution of OHSt-filled microglial cells in the injured retinas of pigmented mice at increasing time intervals post- IONT+BDNF (E) or IONT+vehicle (F). (G, H) Neighbor maps showing the distribution of OHSt-filled microglial cells in the injured retinas of albino mice at 3 and 7 days post- IONT+BDNF (G) or IONT+vehicle (H). The number of OHSt-filled microglial cells counted in the retina from which the map has been generated is shown at the *bottom-left* of each map. Color scale ranges from 0 to 21 neighbors (*purple*) to 21 neighbors or more (*red*), so the warmer the color the more OHSt-filled microglial cells in a given location. S, superior; T, nasal; I, inferior. *Scale bar*: 1 mm (in [B] *bottom right*).

(Figs. 5E-H), and from 5 days onward the number of microglial cell increased from the center to the periphery.

DISCUSSION

The neuroprotective effect of BDNF alone or in combination with other trophic factors on axotomized RGCs has been thoroughly studied in rats^{4,30,51-59} and cats.⁶⁰⁻⁶² In mice, the effect of BDNF has been mainly analyzed in models of photoreceptor degeneration,⁶³⁻⁶⁵ but its effect on RGC survival after optic nerve injury is unknown. We studied two mouse strains, a pigmented and an albino strain, and found that in both strains the response to IONT and BDNF or vehicle treatment was similar in terms of RGC survival and microglial activation. Thus, eye pigmentation had no effect on this kind of lesion, neither in the injured nor in the contralateral retina.

RGC Survival

The number of RGCs traced from the superior colliculi in pigmented and albino mice has been previously assessed,²² while the number of BRN3A⁺RGCs has only been reported in pigmented mice.⁴ In this study, we examined the total number of BRN3A⁺RGCs in albino mice and found that the percentage of BRN3A⁺RGCs in this strain amounts to 92.6% of the RGCs traced from the superior colliculi. Because RGC tracing from the SCi in albino mice amounts to 98.4% of the total RGC population,²² we concluded that BRN3A detected approximately 94% of RGCs in albino mice.

After IONT+vehicle administration, RGC loss became significant at day 3. Afterward, there was a continuous and significant loss of RGCs similar to that induced by IONT alone.⁴ This suggests that eye puncture and vehicle administration do not have a deleterious or a beneficial effect on RGC survival. Isodensity maps show that RGC loss is diffuse and affects the whole retina, which is consistent with previous reports.^{4,23,66}

After IONT+BDNF treatment, the onset of RGC death was delayed until day 5. Although from this time onward the RGC population decreased substantially, the survival of RGCs was significantly higher at every time interval as compared to that after vehicle administration. Furthermore, a single BDNF injection protected the whole retina, as it has been previously shown in rats.^{45,47} However, there is a difference between species: the effect of BDNF is longer in rats. Indeed, a single injection of this factor protects the whole RGC population up to 7 days after the injury.^{30,45-47} This might be related to the fact that, after axotomy, RGCs die faster in mice than in rats.^{4,23,30,46,66,67} Thus, in relative terms, the neuroprotective effect of BDNF might be comparable in both species.

Microglial Response

In mammalian retina, resident microglial cells are found in four retinal layers: the nerve fiber layer, the ganglion cell layer, the inner plexiform layer, and the outer plexiform layer.³⁶ Microglial cells are activated after injury,⁶⁸ and they clear RGC debris when these cells degenerate after IONT.^{31,34-36} While there is no agreement on the role of microglial cells after injury or in neurodegenerative disease, they are known to restore tissue homeostasis, and their overactivation is known to be harmful.^{27,28} Indeed, some studies have shown that the suppression of microglial cells improves axonal regeneration and RGC survival after optic nerve injury.³⁵

In this study, we only examined the microglial cells in the ganglion cell layer that were transcellularly labeled (i.e., microglial cells that had phagocytosed debris from OHSt-

traced retinas). This means that, although optic nerve injury triggers a microglial response in other retinal layers,³⁶ this response was not studied in the present experiments.

In control naïve animals subjected to OHSt-tracing alone, there were few phagocytotic microglial cells (<70), which were distributed over the whole retina. The presence of microglial cells in untouched retinas poses several questions: Do microglial cells phagocytose alive and traced-RGCs? Do they prune traced dendrites or axons? Do they phagocytose OHSt excreted from RGCs? Unfortunately, the data presented in this study cannot provide an answer to these questions.

In the injured retina, there is a negative association between the microglial response and the number of surviving RGCs, as previously shown in rats³⁶ and more recently in mice.⁴² Accordingly, the appearance of OHSt-filled microglial cells is more pronounced after vehicle than after BDNF treatment, an effect also observed in rat.³⁶ The lower number of microglial cells after BDNF-treatment is probably due to a slower RGC death rather than to BDNF inhibiting their activation, because it has been shown that BDNF activates these glial cells.⁶⁹

The microglial distribution over the injured retina changes with time. Thus, they initially are scattered at 3 dpl and, as postlesion time increases and more RGCs die, they proliferate throughout the retina with an increasing gradient from the center to the periphery and a peak density around the optic nerve.

In the contralateral to the injured retina, OHSt-filled microglial cells were distributed over the whole retina without any apparent pattern. A contralateral response has been observed in rat models of optic nerve injury³⁶⁻³⁸ and in mouse and rat models of glaucoma.^{39,40} Liu and colleagues⁴² reported recently the microglial response in mice injured retinas after IONT and glaucoma, but they did not observe any microglial proliferation in the contralateral retinas. This apparent discrepancy might be explained by the methodologic approach because, in the work of Gallego and colleagues³⁹ as well as in the present study, the whole retina was analyzed while Liu and colleagues⁴² only analyzed four representative areas.

Why is there a contralateral response? Two main theories have been considered.^{36,38-40} In the first theory, microglial cells phagocytose the few retino-retinally projecting RGCs that will be injured and induced to death by unilateral axotomy. In rats, these RGCs are approximately 130 in number and, since they project to the superior colliculus,⁷⁰ they become traced by OHSt. Thus, their removal from the retina would explain the appearance of OHSt-filled microglial cells in the contralateral retina. The second theory, which might be complementary to the first, is based on the role of microglial cells as a surveillance system, which is activated throughout the CNS as a result of a local insult.^{35,36}

The number of OHSt-filled microglial cells in the contralateral retina was the same after vehicle than after BDNF treatment of the left injured eye, and their number did not change with time. RGCs or microglial cells labeled with fluorogold (analogous to OHSt)^{34,67} remain labeled up to 3 months. This indicates that OHSt-filled microglial cells in the right eye appeared 3 days after the lesion and stayed there up to at least 14 days. After quantifying the whole number of RGCs in the right eye, we did not observe a decrease in the RGC population. This does not imply that the retino-retinally projecting RGCs have not died but, rather, because in rats they represent less than 0.01% of the total RGC population (similar values are expected to be found in mice) their loss would not have any statistical significance.

In conclusion, this is the first study in mice to demonstrate the neuroprotective effect of BDNF on the axotomized RGCs and to show that after IONT there was a strong and constant contra-lateral microglial response. Therefore, the contralateral

retina should not be used as internal control since, while changes in RGC survival in the contralateral retina may be insignificant, they may obscure the results of glial response analyses.

References

- Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S, Nathans J. Distinct roles of transcription factors *brn3a* and *brn3b* in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron*. 2009;61:852–864.
- Reese BE. Development of the retina and optic pathway. *Vision Res*. 2011;51:613–632.
- Berry M, Ahmed Z, Lorber B, Douglas M, Logan A. Regeneration of axons in the visual system. *Restor Neurol Neurosci*. 2008;26:147–174.
- Galindo-Romero C, Aviles-Trigueros M, Jimenez-Lopez M, et al. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res*. 2011;92:377–387.
- Harvey AR, Hellstrom M, Rodger J. Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway. *Prog Brain Res*. 2009;175:151–161.
- Lindqvist N, Vidal-Sanz M, Hallbook F. Single cell RT-PCR analysis of tyrosine kinase receptor expression in adult rat retinal ganglion cells isolated by retinal sandwiching. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2002;10:75–83.
- Aviles-Trigueros M, Sauve Y, Lund RD, Vidal-Sanz M. Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *J Neurosci*. 2000;20:361–374.
- Vidal-Sanz M, Aviles-Trigueros M, Whiteley SJ, Sauve Y, Lund RD. Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Prog Brain Res*. 2002;137:443–452.
- Aviles-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Garcia-Aviles A, et al. Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol*. 2003;184:767–777.
- Mayor-Torroglosa S, De la Villa P, Rodriguez ME, et al. Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:3825–3835.
- Agudo-Barriuso M, Villegas-Perez M, de Imperial JM, Vidal-Sanz M. Anatomical and functional damage in experimental glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;13:1–7.
- Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, et al. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res*. 2010;90:168–183.
- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolas FM, et al. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res*. 2012;31:1–27.
- Garcia-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, et al. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res*. 2010;91:800–810.
- Montalban-Soler L, Alarcon-Martinez L, Jimenez-Lopez M, et al. Retinal compensatory changes after light damage in albino mice. *Mol Vis*. 2012;18:675–693.
- Drager UC, Olsen JE. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;20:285–293.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci*. 1998;18:8936–8946.
- Perry VH. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience*. 1981;6:931–944.
- Linden R, Perry VH. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res*. 1983;272:145–149.
- Lund RD. Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science*. 1965;149:1506–1507.
- Salinas-Navarro M, Jimenez-Lopez M, Valiente-Soriano FJ, et al. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res*. 2009;49:637–647.
- Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jimenez-Lopez M, et al. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res*. 2009;49:115–126.
- Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, et al. *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;50:3860–3868.
- Nguyen JV, Soto I, Kim KY, et al. Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:1176–1181.
- Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, et al. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci*. 2008;28:548–561.
- Surgucheva I, Weisman AD, Goldberg JL, Shnyra A, Surguchov A. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 2008;14:1540–1548.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm*. 2002;10:27–39.
- Marin-Teva JL, Cuadros MA, Martin-Oliva D, Navascues J. Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol*. 2011;7:25–40.
- Gomez-Ramirez AM, Villegas-Perez MP, Miralles de Imperial J, Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M. Effects of intramuscular injection of botulinum toxin and doxorubicin on the survival of abducens motoneurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:414–424.
- Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M. 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*. 1996;37:489–500.
- Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP. Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol*. 2000;417:431–447.
- Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:2002–2014.
- Thanos S. Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neurosci Lett*. 1991;127:108–112.
- Thanos S, Pavlidis C, Mey J, Thiel HJ. Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp Eye Res*. 1992;55:101–117.
- Thanos S, Mey J, Wild M. Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *J Neurosci*. 1993;13:455–466.
- Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez 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;501:866–878.

37. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;57:1-9.
38. Bodeutsch N, Siebert H, Dermon C, Thanos S. Unilateral injury to the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. *J Neurobiol*. 1999;38:116-128.
39. Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation*. 2012;9:92.
40. Ramirez AI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. 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*. 2010;51:5690-5696.
41. Lonngren U, Napankangas U, Lafuente M, et al. The growth factor response in ischemic rat retina and superior colliculus after brimonidine pre-treatment. *Brain Res Bull*. 2006;71:208-218.
42. Liu S, Li ZW, Weinreb RN, et al. Tracking retinal microglia density in models of retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:6254-6262.
43. Villegas-Perez 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.
44. Almasich M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 2012;31:152-181.
45. Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3978-3983.
46. Mansour-Robacy S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:1632-1636.
47. Sanchez-Migallon MC, Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res*. 2011;92:260-267.
48. Alarcon-Martinez L, Aviles-Trigueros M, Galindo-Romero C, et al. ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection. *Vision Res*. 2010;50:2176-2187.
49. Wang S, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:537-545.
50. Parrilla-Reverter G, Agudo M, Nadal-Nicolas F, et al. Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vision Res*. 2009;49:2808-2825.
51. Bai Y, Xu J, Brahimi F, Zhuo Y, Sarunic MV, Saragovi HU. An agonistic TrkB mAb causes sustained TrkB activation, delays RGC death, and protects the retinal structure in optic nerve axotomy and in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4722-4731.
52. Cheng L, Sapienza P, Kittlerova P, Hauswirth WW, Di Polo A. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci*. 2002;22:3977-3986.
53. Krueger-Naug AM, Emsley JG, Myers TL, Currie RW, Clarke DB. Administration of brain-derived neurotrophic factor suppresses the expression of heat shock protein 27 in rat retinal ganglion cells following axotomy. *Neuroscience*. 2003;116:49-58.
54. Leaver SG, Cui Q, Plant GW, et al. AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Gene Ther*. 2006;13:1328-1341.
55. Lindqvist N, Peinado-Ramonn P, Vidal-Sanz M, Hallbook FGDNE Ret, GFRalpha1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection. *Exp Neurol*. 2004;187:487-499.
56. Ma CH, Bampton ET, Evans MJ, Taylor JS. Synergistic effects of osteonectin and brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion cells neurite outgrowth via the mitogen-activated protein kinase-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways. *Neuroscience*. 2010;165:463-474.
57. Nakazawa T, Tamai M, Mori N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:3319-3326.
58. Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, et al. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res*. 2000;2:215-227.
59. Yan Q, Wang J, Matheson CR, Ulrich JL. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol*. 1999;38:382-390.
60. Chen H, Weber AJ. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:966-974.
61. Weber AJ, Harman CD. BDNF preserves the dendritic morphology of alpha and beta ganglion cells in the cat retina after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:2456-2463.
62. Weber AJ, Viswanathan S, Ramanathan C, Harman CD. Combined application of BDNF to the eye and brain enhances ganglion cell survival and function in the cat after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:327-334.
63. Azadi S, Johnson LE, Paquet-Durand F, et al. CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res*. 2007;1129:116-129.
64. Chen R, Yin XB, Peng CX, Li GL. Effect of brain-derived neurotrophic factor on c-jun expression in the rd mouse retina. *Int J Ophthalmol*. 2012;5:266-271.
65. Wilson RB, Kunchithapatham K, Rohrer B. Paradoxical role of BDNF: BDNF+/- retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:2877-2886.
66. Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Salinas-Navarro M, et al. Whole number, distribution and co-expression of Brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *Plos One*. 2012;7(11):e49830.
67. Bodeutsch N, Thanos S. Migration of phagocytotic cells and development of the murine intraretinal microglial network: an in vivo study using fluorescent dyes. *Glia*. 2000;32:91-101.
68. Barron KD, Dentinger MP, Krohel G, Easton SK, Mankes R. Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital optic nerve crush. *J Neurocytol*. 1986;15:345-362.
69. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci*. 1996;16:2508-2521.
70. Muller M, Hollander H. A small population of retinal ganglion cells projecting to the retina of the other eye. An experimental study in the rat and the rabbit. *Exp Brain Res*. 1988;71:611-617.