



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía, Oftalmología,
Otorrinolaringología y Fisioterapia

TESIS DOCTORAL
REGENERACIÓN AXONAL DE LAS CÉLULAS
GANGLIONARES DE LA RETINA DE RATONES
ALBINOS EN INJERTO AUTÓLOGO DE NERVIO
PERIFÉRICO

Presentada por
Laura Patricia Zorrilla Matilla
para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Valladolid

Dirigida por
Marta Agudo Barriuso,
Manuel Vidal Sanz,
Juan Pablo Beltrán de Heredia y Rentería

Índice

Índice	i
Agradecimientos	vi
Resumen.....	vii
Summary.....	x
Relación de Ilustraciones	xiii
Figuras	xiii
Tablas	xv
Índice de Abreviaturas	xvi
Contribuciones originales de este Trabajo	xviii
INTRODUCCIÓN	1
1- INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Lesiones de las proyecciones axonales	2
1.2 Respuesta regenerativa en el SNC y SNP.....	2
1.3 Métodos de Reparación de las Proyecciones Axonales.	3
1.3.1 Reparación de Nervio Periférico.....	3
1.3.2 Reparación experimental del Sistema Nervioso Central	3
1.4 Empleo de adhesivos en la reparación axonal	4
1.5 El sistema visual	7
1.6 Anatomía del Ojo	8
1.6.1 Estructura del globo ocular	8
1.6.2 Retina: anatomía y fisiología	10
1.6.2.1 Fotorreceptores.	13
1.6.2.2 Células Ganglionares de la Retina (CGRs).....	14
1.6.2.3 Células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles. Papel de la melanopsina.....	17

1.6.3 Nervio y quiasma óptico	19
1.6.4 Proyecciones visuales	20
1.7 Sistema visual en ratón adulto	21
1.7.1 Sistema retino-colicular	21
1.8 Estudio de la población de células ganglionares de la retina en roedores	23
1.8.1 Identificación de las células ganglionares de la retina.....	23
1.8.1.1 Identificación por criterios morfológicos clásicos.....	23
1.8.1.2 Identificación por la aplicación de trazadores neuronales	23
1.8.1.3 Identificación mediante la detección de marcadores moleculares.....	24
1.8.1.4 Identificación mediante manipulación genética	26
1.8.2 Cuantificación de las células ganglionares de la retina	28
1.8.2.1 Cuantificación indirecta de las CGRs contando el número de axones en el nervio óptico.....	28
1.8.2.2 Cuantificación manual	28
1.8.2.3 Contaje automático	29
1.8.3 Distribución de las células ganglionares de la retina.....	30
1.9 Modelos de lesión de las células ganglionares de la retina.....	32
OBJETIVOS	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo General.....	37
2.2 Objetivos Específicos	37
2.2.1 Injerto de nervio periférico con Tissucol.	37
2.2.2 Injerto de nervio periférico con sutura.....	37
2.2.3 Comparación de ambos modelos de regeneración.....	37
MATERIAL Y MÉTODOS	38
3- MATERIAL Y MÉTODOS	39
3.1 Animales de Experimentación y anestesia.....	39
3.2 Manipulaciones Quirúrgicas	39
3.2.1 Abordaje y obtención del injerto autólogo de nervio periférico	39
3.2.2 Amputación intraorbitaria del nervio óptico	40
3.2.3 Aposición del segmento de nervio periférico al disco óptico	40

3.3 Preparación y Aplicación del adhesivo de fibrina Tissucol	42
3.4 Marcaje retrógrado de las células ganglionares de la retina	42
3.5 Procesado Histológico	43
3.5.1 Perfusión de animales	43
3.5.2 Disección y procesado histológico de las retinas.....	43
3.6 Inmunohistofluorescencia	44
3.7 Anticuerpos y diluciones de trabajo.....	45
3.8 Grupos experimentales	45
3.9 Análisis morfológico y morfométrico de las retinas.....	46
3.9.1 Procesado de imágenes	46
3.9.1.1 Contaje automático de Células ganglionares de la retina marcadas con OHSt	47
3.9.1.2 Contaje automático de células ganglionares de la retina detectadas con Brn3a.....	48
3.9.1.3 Contaje automático de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles.	50
3.9.2 Mapas de isodensidad	50
3.9.3 Mapa del vecino más próximo.....	51
3.10 Análisis estadístico.....	52
RESULTADOS.....	53
4- RESULTADOS.....	54
4.1 Supervivencia de las Células Ganglionares de la Retina inmunodetectadas con Brn3a.....	54
4.1.1 Supervivencia de las CGRs en retinas sometidas a axotomía	54
4.1.2 Supervivencia de CGRs en retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol.....	58
4.1.3 Supervivencia de CGRs en retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura	60
4.1.4 Estudio Topográfico de la Supervivencia de CGRs-Brn3a en los diferentes grupos experimentales.	65
4.1.4.1. Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs Brn3a ⁺ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía.....	66

4.1.4.2. Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs-Brn3a+ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol.	70
4.1.4.3. Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs-Brn3a+ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura.	73
4.2. Regeneración de las células ganglionares de la retina	77
4.2.1 Regeneración de las CGRs en retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol.	77
4.2.2. Regeneración de las CGRs en retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura.	79
4.2.3 Estudio Topográfico de las CGRs que regeneran en los diferentes grupos experimentales.	83
4.2.3.1 Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs-OHSt+ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissucol.	84
4.2.3.2. Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs-OHSt+ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Sutura.....	86
4.3 Población de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles.	89
4.3.1. Supervivencia de las CGRs intrínsecamente fotosensibles	91
4.3.2. Estudio Topográfico de las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles en los diferentes grupos experimentales.	91
4.4 Comparación de los distintos grupos experimentales.....	96
DISCUSIÓN	99
5- DISCUSIÓN.....	100
5.1 Identificación y supervivencia de las CGRs tras la axotomía	100
5.2 Comparación de la supervivencia de las CGRs tras axotomía vs axotomía e implante de injerto de nervio periférico en rata y ratón.....	103
5.3 Comparación de la regeneración de las CGRs tras axotomía vs axotomía e implante de injerto de nervio periférico en rata y ratón.....	105
5.4 Comparación de la supervivencia y regeneración de las ipCGRs tras axotomía vs axotomía e implante de injerto de nervio periférico en rata y ratón.	106
CONCLUSIONES	109
6- CONCLUSIONES.....	110

BIBLIOGRAFÍA.....	111
7-BIBLIOGRAFÍA.....	112

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría darle las gracias a mi maestro el Dr. Beltrán de Heredia y Rentería por haberme enseñado a ser cirujana y lo que aún es más importante lo que significa ser cirujano, por haber puesto a mi alcance todos los medios posibles para que mi formación tanto científica como humana fuese la mejor y por haberme ayudado a levantarme cada vez que me he tropezado a lo largo del camino. Todos los aprendizajes que he obtenido estos años siempre perdurarán en mí. Ahora ya sí que puedo decir “ LO HE HECHO”.

Al Dr. Manuel Vidal Sanz y la Dra. María Paz Villegas por acogerme en su laboratorio, dándome la oportunidad de conocer de cerca el mundo de la investigación, lo que me ha permitido ampliar mi visión y enriquecerme desde un punto de vista científico y humano. Sin vuestra ayuda indudablemente este trabajo no se habría podido desarrollar.

A la Dra. Marta Agudo Barriuso por su paciencia infinita, sus enseñanzas, por haber sido mi guía a lo largo de este recorrido y sobre todo por su amistad.

A mis padres José Manuel y Dolores Laura por haber estado a mi lado siempre que os he necesitado, por haber confiado siempre en mí y en mis posibilidades, por no haberme dejado tirar la toalla nunca y haberme enseñado que “ EL QUE AGUANTA GANA”. Todo lo que soy os lo debo a los dos.

A mis hermanos Arantxa y José Manuel por estar siempre apoyándome en todos mis proyectos.

A mis sobrinos Rodrigo y Jorge por sus sonrisas y dulzura que ha sido un incentivo para seguir adelante en todo momento.

A Raúl, ese compañero de viaje que encontré al final del camino, el cual me dio el cariño y la fuerza necesaria para llegar a mi meta y me hizo recordar cual capaz era de conseguirlo.

Por último me gustaría dar las gracias a todos los miembros del laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, haciendo especial mención a Manuel Salinas, Caridad Galindo, Fran Nadal y Manuel Jiménez por haber estado siempre ayudándome cuando les he necesitado.

A todos vosotros GRACIAS.

Resumen

Introducción

La población de células ganglionares de la retina (CGR) de roedores se ha utilizado frecuentemente para investigar las respuestas degenerativas y regenerativas de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) en diferentes modelos experimentales de neuropatías, así como para ensayar las propiedades neuroprotectoras de distintas sustancias. En este trabajo hemos analizado cuantitativa y topográficamente la población total de CGRs en ratones adultos albinos que sobreviven a las cuatro semanas de la axotomía simple (sección intraorbitaria del nervio óptico) o de la axotomía e implante de nervio periférico (NP) autólogo anastomosado mediante la utilización de microsuturas o pegamento biológico (Tissucol). Además hemos investigado estas mismas cuestiones en la subpoblación de CGRs que median las respuestas fisiológicas visuales no formadoras de imágenes y tienen un pigmento visual (la melanopsina) que las hace intrínsecamente fotosensibles (ipCGRs).

Objetivos

Estudiar el efecto neuroprotector de los implantes de injertos autólogos de nervio periférico, y la respuesta regenerativa de las CGRs e ipCGRs del ratón albino adulto. Comparar la respuesta regenerativa cuando se utilizan dos métodos diferentes de anastomosis del injerto al muñón ocular del nervio óptico seccionado intraorbitariamente: microsuturas o pegamento biológico.

Materiales y métodos

En este trabajo se han utilizado ratones hembras adultas albinas (Swiss), que se dividieron en los siguientes grupos: i) sección intraorbitaria del nervio óptico (NO) izquierdo (axotomía simple); ii) implante de injerto de nervio periférico (NP) (nervio tibial derecho) mediante sutura en el muñón ocular del nervio óptico izquierdo seccionado, y;iii) implante de injerto de nervio periférico mediante pegamento biológico (nervio tibial derecho) en el muñón ocular del nervio óptico seccionado. En todos los casos el ojo experimental fue el izquierdo y el ojo derecho se usó como control. Las retinas se analizaron 28 días después de la cirugía.

Para identificar la población CGRs que habían regenerado sus axones a lo largo del injerto de nervio periférico, tres días antes del procesado del animal se aplicó en el extremo distal del injerto el trazador neuronal fluorescente hidroxistilbamidina metanosulfonato (OHSt). Para identificar la población total de CGRs supervivientes se utilizaron técnicas de

inmunohistofluorescencia que revelan la presencia de marcadores moleculares (anticuerpos anti- Brn3a y anti-melanopsina).

Las poblaciones de CGRs así identificadas se analizaron cuantitativa y topográficamente con métodos modernos de análisis de imagen desarrollados recientemente. Todas las retinas se examinaron y fotografiaron en el microscopio de fluorescencia equipado con una platina motorizada controlada por un sistema de análisis de imagen: Image-Pro Plus® (IPP 5.1 para Windows®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Para hacer reconstrucciones de las retinas completas se capturaron imágenes individuales de forma secuencial y no solapada comprendiendo toda la superficie de la retina y posteriormente fueron unidas para formar el fotomontaje de la retina completa. Las imágenes digitales individuales, tanto de OHSt, como de Brn3a o melanopsina fueron procesadas por una serie de rutinas específicas para cada marcador, desarrolladas con el programa de análisis de imagen IPP para realizar el conteo automático. Los datos cuantitativos obtenidos de cada retina se utilizaron para generar los correspondientes mapas de vecinos o de isodensidad de las CGRs con los que se ilustra su distribución topográfica en la retina.

Resultados

Cuatro semanas después de la sección del nervio óptico, el número total medio de CGRs que sobreviven a la axotomía simple en las retinas experimentales (izquierdas) es de 5.818 ± 1.405 (n=12) mientras que en las retinas control (derechas) es de 44.899 ± 3.0265 (n=12). Estos resultados indican que aproximadamente un 13% de la población original de CGRs sobrevive a las cuatro semanas de la sección intraorbitaria del NO.

Cuatro semanas después de la sección del nervio óptico, el número total medio de CGRs que sobreviven a la axotomía en las retinas experimentales (izquierdas) en las que se apuso un injerto de nervio periférico con Tissucol o microsuturas es de 9.716 ± 3.452 (n=11) ó 8.575 ± 3.763 (n=11), respectivamente, mientras que en sus retinas control (derechas) es de 45.084 ± 4.440 (n=11) ó 47.975 ± 3.407 (n=11), respectivamente, lo que supone un 22% o 18%, respectivamente, de la población original de CGR. Estos resultados indican que la aposición de un injerto de nervio periférico tiene un efecto neuroprotector sobre la supervivencia de las CGRs axotomizadas.

El número total medio de CGRs marcadas retrógradamente con OHSt, que identifica las CGRs que han regenerado sus axones a lo largo de los injertos de nervio periférico, fue de 1.045 ± 485 (n=8) cuando se utilizó pegamento biológico (Tissucol) y de 1.887 ± 599 (n=12) cuando se utilizaron microsuturas, lo que supone una capacidad de regeneración axonal del 2,1% y 4%, respectivamente, de la población original de CGRs.

En los mapas de distribución espacial (mapas de vecinos más próximos) se observó que las CGRs que habían sobrevivido a la axotomía y que habían regenerado en los injertos de nervio periférico se distribuyeron de forma uniforme y difusa por la totalidad de la retina, sin mostrar patrones geográficos sugerentes de daño isquémico o de una especial predisposición espacial para la supervivencia y/o regeneración axonal de las CGR.

En relación con las ipCGRs, el número medio total en retinas control fue de 354 ± 75 ($n=2$), de 168 ± 62 ($n=11$) en el grupo de axotomía simple, de 110 ± 21 ($n=6$) en el grupo de axotomía y Tissucol, y de 198 ± 84 ($n=3$) en el grupo de la axotomía y sutura. Estos resultados indican que aproximadamente el 47% de las ipCGRs sobrevive a la axotomía simple y que la aposición de un injerto de NP (bien con microsuturas bien con Tissucol) no modifica esta supervivencia significativamente. Es decir, esta subpoblación de ipCGRs es más resistente a la axotomía, y su supervivencia no se influencia por la presencia de injertos de nervio periférico. Sin embargo, en estos grupos de ipCGRs no se observaron células marcadas retrógradamente con OHSt, lo que sugiere que esta subpoblación de ipCGRs no parece presentar capacidad de regeneración axonal.

Conclusiones.

En ratones adultos tipo Swiss la supervivencia de la población de CGRs a la sección del NO intraorbitario a las 4 semanas es de aproximadamente el 13%. Esta supervivencia se ve incrementada significativamente con el implante de un segmento autólogo de nervio periférico en el muñón ocular del NO seccionado, bien mediante la utilización de microsuturas ó de Tissucol.

Las CGRs del ratón Swiss adulto son capaces de regenerar sus axones a lo largo de injertos autólogos de NP apuestos al muñón ocular del NO seccionado. Esta capacidad de regeneración se observa en un 2,1% de la población original de CGRs en el caso de la utilización de Tissucol y es significativamente superior (4%) en el caso de la utilización de microsuturas.

La supervivencia a la axotomía de las CGRs intrínsecamente fotosensibles es significativamente superior a la del resto de la población de CGRs. Sin embargo esta población de ipCGRs carece de capacidad de regeneración axonal, y tampoco se ve influenciada (incrementada) su supervivencia con el implante de segmentos autólogos de nervio periférico. Se trata pues de una pequeña sub-población de CGRs que no parece responder a influencias extrínsecas (en cuanto a supervivencia y regeneración axonal se refiere) y sin embargo muestra una particular resistencia a la axotomía.

Summary

Introduction.

The rodent retinal ganglion cell (RGC) population is widely used to study the degenerative and regenerative responses of central nervous system (CNS) neurons to a variety of insults as well as to assess the neuroprotective effect of different therapies or drugs. In this work we have analyzed quantitatively and topographically the population of the adult albino mouse RGCs that survive four weeks after simple axotomy (intraorbital nerve transection) or four weeks after axotomy and an autologous peripheral nerve graft (PNG), anastomosed by microsuture or biological glue (Tissucol). In addition, we have investigated these same questions in the subpopulation of RGCs that mediate non-image visual responses (regulation of the circadian rhythm and the pupillary light reflex) and that express melanopsin, a pigment that renders them intrinsically photosensitive (ipRGCs).

Objectives.

To study the neuroprotective effect of autologous peripheral nerve grafts and the regenerative response of adult albino mouse RGCs and ipRGCs along these grafts. To compare the RGC/ipRGC regenerative responses when a peripheral nerve graft is anastomosed with microsutures or biological glue.

Material and Methods.

Adult female Swiss mice were divided into three groups, according to the experimental manipulations: i) intraorbital nerve transection of the left optic nerve; ii) intraorbital nerve transection of the left optic nerve and peripheral nerve graft (right tibial nerve) by microsuture, and iii) intraorbital nerve transection of the left optic nerve and peripheral nerve graft (right tibial nerve) anastomosed by biological glue. In all instances the left eye was the experimental one, while the right eye was kept as control. Retinas were analyzed 28 days after the surgery.

To identify the population of RGCs that regenerate their axons along the PNG, 3 days before sacrifice the fluorescent tracer hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) was applied onto the distal segment of the PNG. To identify the population of surviving RGCs or ipRGCs, Brn3a or melanopsin were immunodetected, respectively.

Surviving and regenerating RGCs/ipRGCs were quantitatively and topographically analyzed using state-of-the-art image analyses methods recently developed. All retinas were

dissected as flat mounts. Whole-mounted retinas were analyzed for OHSt, Brn3a and melanopsin signal. To make reconstructions of retinal wholemounts, retinal multiframe acquisitions were photographed in a raster scan pattern where the frames were captured contiguously side-by-side with no gap or overlap between them 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). The individual images (140 frames per retina) were processed with a specific cell-counting subroutine using the IPP macro language to quantify the total number of surviving and regeneration RGCs and ipRGCs. These quantitative data were translated into isodensity or neighbour maps to illustrate the topographical distribution of the RGCs.

Results.

Four weeks after axotomy, the total mean number \pm standard deviation of surviving RGCs in the left injured retinas was 5818 ± 1405 ($n=12$), while in the control (right) retinas was $44,899 \pm 3025$ ($n=12$). Thus, approximately a 13% of the original RGC population survives 4 weeks after intraorbital nerve transection.

After axotomy and peripheral nerve graft with Tissucol or microsuture, the mean total number \pm standard deviation of surviving RGCs in the left injured retinas was 9716 ± 3452 ($n=11$) or 8575 ± 3763 ($n=11$), respectively. This amounts for a 22% or a 18% of the original RGC population, respectively. These results indicate that apposing a peripheral nerve graft onto the optic nerve stump, has a neuroprotective effect on the axotomized RGCs.

The mean total number of OHSt-traced RGCs, i.e. RGCs that have regenerated their axons along the peripheral nerve graft, was 1045 ± 485 ($n=8$) when the graft was attached with biological glue (Tissucol) and 1887 ± 599 ($n=12$) when the graft was joined by microsuture. Thus, 2.1% and 4% of the original RGC population, respectively, regenerate their axons.

Surviving and regenerating RGCs were uniformly and diffusely observed throughout the retina, as illustrated by neighbour maps. Furthermore, RGCs were not distributed into geographical patterns suggestive of ischemic damage or spatial pre-disposition for enhanced survival or regeneration.

With respect to ipRGCs, their mean total number \pm standard deviation in control retinas was 354 ± 75 ($n=2$), while in the experimental groups was 168 ± 62 ($n=11$), 110 ± 21 ($n=6$) and 198 ± 84 ($n=3$) after axotomy, axotomy plus peripheral nerve graft with Tissucol, and axotomy plus peripheral nerve graft with microsuture, respectively. These data indicate that approximately 47% of the original ipRGCs survive 28 days after axotomy and that

grafting a peripheral nerve does not modify significantly this survival. In other words, the population of ipRGCs is more resilient to axotomy than the general RGC population and their survival is not altered by the presence of peripheral nerve grafts. However, these ipRGCs were not retrogradely traced with OHSt, suggesting that this subpopulation does not have a capacity for an axonal regeneration.

Conclusions.

In adult Swiss mice, approximately 13% of RGC survive 4 weeks after intraorbital nerve transection. This survival increases significantly if a segment of autologous peripheral nerve is grafted into the severed optic nerve stump, either by microsuture or by fibrin glue (Tissucol).

RGCs of adult Swiss mice are able to regenerate their axons along autologous peripheral nerve segments grafted to the transected optic nerve stump. This regenerative capacity is observed in a 2.1% of the original RGC population if the peripheral nerve is grafted with Tissucol, and it is significantly higher (4%) if the graft is joined with microsutures.

The survival of ipRGCs is significantly higher than the rest of RGCs. However this population lacks the capacity of regenerating their axons, and their survival is not ameliorated with peripheral nerve implants. Thus, this small sub-population of RGCs does not respond to extrinsic signals (in terms of survival and regeneration) but shows a particular tolerance to axotomy.

Relación de Ilustraciones

Figuras

Figura 1: Principales partes de las neuronas.	7
Figura 2: Esquema de la vía visual.	8
Figura 3: Esquema general del globo ocular.	9
Figura 4: Dibujo de las neuronas retinianas realizado por Santiago Ramón y Cajal	10
Figura 5: Organización laminar de la retina y los principales tipos de neuronas que la componen	12
Figura 6: Estructura de los fotorreceptores y sus conexiones sinápticas	15
Figura 7: Principales proyecciones neuronales de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en distintas áreas del cerebro de ratón	19
Figura 8: Localización de los colículos superiores (CS) en el cerebro del ratón (A) y sección coronal del CS en rata (B).	22
Figura 9: Identificación de CGRs	27
Figura 10: Población media de células ganglionares de la retina en ratón (A) y rata (B) trazadas desde los colículos superiores e inmunodetectadas con Brn3a en animales control albinos y pigmentados.	30
Figura 11: Distribución de CGRs en rata y ratón.	31
Figura 12: Curso temporal de la pérdida de las células ganglionares de la retina después de la axotomía intraorbitaria del nervio óptico en rata (A) y ratón (B)	33
Figura 13: La axotomía produce la muerte difusa de CGRs en rata y ratón.	34
Figura 14: Cirugía.	41
Figura 15: Esquema representativo del protocolo utilizado para detectar las células ganglionares de la retina por inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-Brn3a	45
Figura 16: Microfotografías realizadas para la reconstrucción de los fotomontajes	47
Figura 17: Reconstrucción de los fotomontajes	49
Figura 18: Comparativa gráfica de los Mapas de isodensidad de las CGRs inmunodetectadas con Brn3a entre los ojos derechos e izquierdos de los diferentes grupos experimentales	51

Figura 19: Identificación de CGRs en retinas control (A) y en retinas analizadas 28 días después de la axotomía (B).	55
Figura 20: Identificación de las CGRs que sobreviven 28 días después de la axotomía	56
Figura 21: Identificación de las CGRs que sobreviven 28 días después de axotomía e injerto de nervio periférico mediante Tissucol.	59
Figura 22: Identificación de las CGRs que sobreviven 28 días después de axotomía e injerto de nervio periférico mediante sutura.	62
Figura 23: Identificación de las CGRs que sobreviven 28 días después de axotomía e injerto de nervio periférico mediante sutura.	63
Figura 24: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en retinas control y tras axotomía	66
Figura 25: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en retinas analizadas 28 días tras la axotomía	67
Figura 26: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en retinas del grupo de axotomía.	68
Figura 27: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en retinas del grupo de axotomía	69
Figura 28: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en retinas del grupo de axotomía injerto con Tissucol	70
Figura 29: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en el grupo de axotomía en injerto con Tissucol	71
Figura 30: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en el grupo de axotomía en injerto con Tissucol.	72
Figura 31: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en retinas del grupo de axotomía e injerto con sutura	73
Figura 32: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en retinas del grupo de axotomía e injerto mediante sutura.	74
Figura 33: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en el grupo de axotomía e injerto mediante sutura	75
Figura 34: Distribución de CGRs-Brn3a ⁺ en el grupo de axotomía e injerto mediante sutura	76
Figura 35: Regeneración de las CGRs a través del injerto de nervio periférico mediante Tissucol	78
Figura 36: Regeneración de las CGRs a través del injerto de nervio periférico mediante sutura.	80
Figura 37: Regeneración de las CGRs a través del injerto de nervio periférico mediante sutura.	81
Figura 38: Distribución de CGRs OHSt ⁺ en retinas del grupo de injerto con Tissucol	84

Figura 39: Distribución de CGRs OHSt ⁺ en retinas del grupo de injerto con Tissuacol	85
Figura 40: Distribución de CGRs OHSt ⁺ en retinas del grupo de injerto con sutura	86
Figura 41: Distribución de CGRs OHSt ⁺ en retinas del grupo de injerto con sutura	87
Figura 42: Distribución de CGRs OHSt ⁺ en retinas del grupo de injerto con sutura.	88
Figura 43: Detección de ipCGRs en retinas derechas (control)	90
Figura 44: Distribución de ipCGRs en retinas control	92
Figura 45: Distribución de ipCGRs en retinas del grupo de axotomía	93
Figura 46: Distribución de ipCGRs en retinas del grupo de injerto con Tissuacol	94
Figura 47: Distribución de ipCGRs en retinas del grupo de injerto con sutura	95
Figura 48: Comparación de la supervivencia de las CGRs e ipCGRs en los distintos grupos experimentales	97
Figura 49: Comparación de la regeneración de las CGRs en los dos grupos que recibieron injerto de nervio periférico.	98

Tablas

Tabla 1: Grupos experimentales	46
Tabla 2: Número total de CGRs que sobreviven en el grupo de axotomía	57
Tabla 3: Número total de CGRs en el grupo de axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissuacol.	60
Tabla 4: Número total de CGRs que sobreviven en el grupo de axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura	64
Tabla 5: Número total de CGRs OHSt ⁺ en el grupo de axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissuacol	79
Tabla 6: Número de CGRs OHSt ⁺ en el grupo de axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura	82
Tabla 7: Número total de ipCGRs en los diferentes grupos experimentales	91

Índice de Abreviaturas

Ag HBs	Antígeno Hepatitis B
CCG	Capa de células ganglionares.
CFN	Capa de fibras nerviosas.
CG	Ganglio ciliar
CGRs	Células ganglionares de la retina
ipCGRs	Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles
CNE	Capa nuclear externa.
CNI	Capa nuclear interna.
CPE	Capa plexiforme externa.
CPI	Capa plexiforme interna.
CS	Colículo superior
DEM	Desviación estándar de la media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	DorsoNasal
dpl	días post-lesión
DT	DorsoTemporal
DTMR	Dextrano de tetrametil-rodamina
et al	y otros (del latín et alter)
EP	Epitelio pigmentario
EW	Núcleo de Edinger Westphal
FG	Fluorogold
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés horseradish peroxidase)
hpl	Horas post-lesión
IGL	Núcleo intergeniculado lateral
IML	Núcleo intermediolateral
i.p.	Intraperitoneal
MET	Microscopio electrónico de transmisión
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
MNO	Muñón nervio óptico

NGL	Nucleo geniculado lateral
NO	Nervio óptico
NP	Nervio periférico
NSQ	Núcleo supraquiasmático
OD	Ojo derecho
OHSt	Hidroxistilbamidina metano-sulfonato
OI	Ojo izquierdo
OPN	Núcleo de la oliva pretectal (del inglés optic pretectal nucleus)
PBS	Tampón fosfato-salino (del inglés phosphate buffered saline)
PF	Paraformaldehído
PNG	Peripheral nerve graft
PVG	Rata albina de la estirpe Piebald Virol Glaxo
PVN	Núcleo paraventricular (del inglés paraventricular nucleus)
S	Sutura
SCG	Ganglio cervical superior (del inglés superior cervical nucleus)
SD	Ratas albina de la estirpe Sprague- Dawley
SF	Segmentos externos de los fotorreceptores
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNO	Sección nervio óptico
T	Tissucol
Tx	Tritón
VHA	Virus Hepatitis A
VHB	Virus Hepatitis B
VHC	Virus Hepatitis C
VIH	Virus inmunodeficiencia humana
VN	VentroNasal
VT	VentroTemporal

Contribuciones originales de este Trabajo

Técnicas

Este es el primer estudio de regeneración axonal de las células ganglionares de la retina de ratón albino adulto en el que se utilizan las siguientes técnicas:

1. Aposición de nervio periférico al muñón de nervio óptico seccionado mediante microsuturas o con pegamento biológico de fibrina (Tissucol).
2. Cuantificación automática de la población total de las células ganglionares de la retina (CGR) en general y de la subpoblación de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipCGR) que sobreviven a la axotomía de nervio óptico simple y a la axotomía de nervio óptico con injerto de nervio periférico apuesto al muñón ocular por medio de sutura o pegamento de fibrina.
3. Cuantificación automática de la población total de las CGRs y de la subpoblación de ipCGRs que regeneran a través de un injerto de nervio periférico apuesto al muñón ocular del nervio óptico por medio de sutura o de pegamento de fibrina.
4. Evaluación de la distribución espacial de las CGRs e ipCGRs que sobreviven a la axotomía con o sin injerto de nervio periférico y de las CGRs que regeneran a través del injerto de nervio periférico utilizando métodos automáticos y mapas topográficos de las retinas completas.

Científicas

El desarrollo de este trabajo de regeneración axonal de las células ganglionares de la retina (CGR) de ratón albino adulto ha documentado los siguientes hallazgos originales:

1. La aposición de un injerto de nervio periférico (NP) sobre el muñón ocular del nervio óptico seccionado ejerce un efecto neuroprotector en la población de CGRs axotomizadas.
2. Las CGRs de ratón axotomizadas son capaces de regenerar sus axones a través del injerto de nervio periférico en distancias de aproximadamente dos centímetros.
3. El número de CGRs que regeneran sus axones en el injerto de NP es significativamente mayor cuando el injerto se apone mediante microsuturas que cuando se apone mediante pegamento de fibrina (Tissucol).
4. Las CGRs que sobreviven a la axotomía, con o sin injerto de nervio periférico, se encuentran distribuidas por toda la retina.

5. Las CGRs que regeneran a través del injerto de nervio periférico se encuentran distribuidas por toda la retina.
6. La subpoblación de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipCGRs) son más resistentes a la axotomía que la población general de CGRs.
7. La aposición de un injerto de nervio periférico al muñón ocular del nervio óptico seccionado no ejerce un efecto neuroprotector en la subpoblación de ipCGRs.
8. La subpoblación de ipCGRs no parece tener la capacidad de regeneración axonal a lo largo de injertos de nervio periférico.

INTRODUCCIÓN

1- INTRODUCCIÓN

1.1 Lesiones de las proyecciones axonales

La respuesta a las lesiones de las proyecciones nerviosas difiere si éstas afectan al Sistema Nervioso Central (SNC) o al sistema nervioso periférico (SNP). Ante una lesión del SNP existen recursos quirúrgicos dirigidos a corregir dicha lesión, lo cual no sucede cuando la lesión es del SNC. En las lesiones axonales del SNP, ambos cabos nerviosos pueden reaponerse quirúrgicamente, favoreciéndose así que los conos de crecimiento del cabo proximal de las neuronas axotomizadas busquen su camino a través del cabo distal y, de esta forma, puedan crecer para re-inervar y restablecer los contactos sinápticos.

A pesar de la reparación quirúrgica de las lesiones del SNP, la recuperación funcional no es siempre total (Archibald et al., 1995) lo cual puede ser debido a la desorganización de los fascículos y fibras nerviosas regeneradas (Ramón y Cajal, 1914) y por otro lado a las consecuencias de la respuesta neuronal a la axotomía.

A diferencia del SNP cuando se produce una lesión de una vía nerviosa central no existe recuperación funcional a pesar de la reaposición de los cabos nerviosos lesionados, pues desde el cabo proximal no se produce la regeneración espontánea de las fibras nerviosas lesionadas en distancia lo suficientemente largas como para alcanzar sus territorios de inervación originales.

Los fenómenos que se producen ante una lesión del SNC son: i) lesión axonal de la neurona con la consiguiente degeneración Walleriana de la parte distal del axón, y ii) lesión directa de las neuronas y muerte de las mismas (Perry y Gordon, 1988; Stall et al., 1989; Kreutzberg et al., 1996).

1.2 Respuesta regenerativa en el SNC y SNP

Uno de los pioneros en el estudio de la diferente respuesta de las fibras nerviosas lesionadas en el SNP ó SNC fue Santiago Ramón y Cajal, quien a comienzos del siglo XX y en colaboración con Tello, Leoz Ortín y Arcaute, observó los intentos y fracasos de los axones lesionados en el SNC en el mamífero para extenderse tras la lesión axonal. Estos investigadores estudiaron la regeneración y degeneración axonal en el nervio óptico (NO) seccionado del conejo al que injertaron un segmento de nervio periférico (Tello, 1907; 1911; Leoz Ortín y Arcaute; Ramón y Cajal, 1914). El fracaso en la elongación de los retoños que se forman en el muñón axonal se pensó que era la causa principal de la regeneración abortiva en el SNC de los mamíferos adultos. Este fracaso de la elongación de los axones lesionados se atribuyó a la incapacidad intrínseca de las neuronas del SNC para regenerar sus axones (Ramón y Cajal, 1914). Éstas y otras observaciones sirvieron para postular el dogma de la incapacidad de las fibras del SNC para regenerar y establecer de nuevo conexiones sinápticas funcionales.

Desde entonces la diferente respuesta regenerativa en el SNC y SNP trata de explicarse principalmente por:

- 1- Diferencias que existen en el medio glial que rodea los axones y su respuesta a la lesión (revisado en Yiu y Hez, 2006).
- 2- Diferencias en las moléculas de la matriz extracelular que en el caso del SNC son inhibitorias para el crecimiento axonal (revisado en Brazda y Müller, 2009).

1.3 Métodos de Reparación de las Proyecciones Axonales

Cuando se lesiona una proyección axonal se produce una interrupción de la conexión entre distintas poblaciones neuronales. Para conseguir la reconexión adecuada de dichas poblaciones se deben cumplir las siguientes premisas:

- 1- Supervivencia de las neuronas a la lesión.
- 2- La regeneración axonal debe realizarse en distancia suficiente para alcanzar sus dianas.
- 3- Los axones regenerados deben ser guiados hacia sus territorios de inervación.
- 4- Los axones una vez ubicados en su territorio de inervación deben extenderse, arborizar y formar conexiones sinápticas funcionales.

1.3.1 Reparación de Nervio Periférico

La primera referencia a una sutura nerviosa se remonta a la Italia Medieval del Siglo XIII. Sin embargo la primera evidencia de una sutura nerviosa realizada con éxito fue descrita por Hueter en 1873 en su libro “Die Allgemeine Chirurgie”. En el muñón axonal del cabo proximal de un nervio periférico lesionado, se producen conos de crecimiento que cuando encuentran un substrato adecuado, como el que proporciona el segmento distal del nervio periférico, se extienden de nuevo y crecen hacia sus territorios de inervación original (Ramón y Cajal, 1914).

1.3.2 Reparación experimental del Sistema Nervioso Central

De forma espontánea no se produce la regeneración axonal en el SNC en una distancia lo suficientemente extensa como para alcanzar sus territorios de inervación original. A continuación vamos a señalar las diferentes estrategias que incrementan esta regeneración axonal:

- 1- Utilización de sustancias que contrarrestan las moléculas inhibitorias del crecimiento axonal presentes en la membrana de oligodendrocitos maduros y de la mielina (Schwab et al., 1993).
- 2- Eliminación de oligodendrocitos productores de mielina utilizando rayos X: La radiación con rayos X al nervio óptico (NO) en roedores neonatales puede eliminar los oligodendrocitos y por lo tanto también la mielina (Weibel et al., 1994). Así se observó que axones retinianos axotomizados en el día 19 postnatal se extienden

durante varios milímetros en estos NO libres de oligodendrocitos (Weibel et al., 1994).

- 3- Trasplante de macrófagos activados en el NO: los macrófagos que invaden una lesión nerviosa central eliminan los restos de mielina y, por lo tanto, facilitan la extensión de los axones de CGRs lesionadas (Lazarov-Spiegler et al., 1996).
- 4- Trasplante de células envoltantes de la glía del bulbo olfatorio las cuales tienen unas propiedades que favorecen la regeneración axonal. (Raisman et al., 2012).
- 5- Transplante de segmentos autólogos de nervio periférico (Aguayo et al., 1987, 1991; Vidal-Sanz et al., 1993).
- 6- Incrementar el potencial intrínseco de crecimiento de las neuronas del SNC mediante aplicación de sustancias con efectos neurotróficos.

1.4 Empleo de adhesivos en la reparación axonal

Los adhesivos son sustancias que al aplicarlas en dos superficies diferentes, las unen y resisten su separación. Entre los diferentes tipos de adhesivos se encuentran los cianoacrilatos, los monómeros sintéticos, pegamentos de origen marino y los pegamentos biológicos entre los que se encuentran los de fibrina (Durham et al., 1987).

A principios del siglo XX comenzó a conocerse mejor la función de la fibrina y sus poderes adherentes (Morawitz, 1905) y en la Gran Guerra (1914) se utilizaban ya la fibrina y el fibrinógeno para el taponamiento de heridas.

Fueron Young y Medawar (1940) los primeros que idearon un método experimental de sutura nerviosa consistente en la coaptación de los cabos nerviosos del ciático del conejo y del perro, usando fibrinógeno obtenido de sangre de pollo que se agregaba a plasma humano. Estos autores observaron que el coágulo plasmático de los animales que probaron y de los mamíferos en general, no era lo suficientemente “fuerte” como para mantener la tensión de la sutura en el tiempo y resistir los movimientos de la pata del animal. Para solventar este problema aumentaron la concentración de fibrinógeno 6 a 10 veces hasta obtener un coágulo lo suficientemente estable y que se formaba rápidamente. La regeneración nerviosa a través de dicho coágulo era más rápida y se conseguía mejor orientación de las fibras que con la sutura convencional. Seddon y Medawar (1942), basados en estas experiencias previas, aplicaron por primera vez este método en la clínica humana.

En 1943 Tarlov y Benjamin realizaron experimentos similares en animales empleando plasma autólogo de mamífero concluyendo que la regeneración nerviosa era mejor que con la sutura y que existía regeneración nerviosa aún en el caso de que la coaptación no fuera perfecta.

Durante la década de los 60 y de los 70, dichos métodos de reparación nerviosa cayeron en el olvido hasta que Matras et al., (1972) utilizaron un crioprecipitado de fibrinógeno y un

poco más tarde Kuderna et al., (1976, 1979) concluyeron que el uso de adhesivos biológicos de fibrina era preferible a la sutura tradicional. En 1972 Matras et al., emplearon como adhesivo un crioprecipitado de plasma que contenía elevadas concentraciones de fibrinógeno; el refinamiento industrial de estos estudios trajo como resultado a finales de los años 70, la producción del Tissucol, el adhesivo empleado en esta tesis doctoral. El Tissucol está formado por dos componentes de origen humano, que al mezclarse reproducen los pasos finales de la coagulación sanguínea para formar un adhesivo viscoso que mantiene la coaptación y aproximación de superficies. El primer componente es fibrinógeno y contiene proteínas plasmáticas como la globulina y albúmina así como el factor XIII, el segundo compuesto es trombina y cloruro de calcio. A estos componentes se les añade un factor antifibrinolítico (la aprotinina) para retrasar su reabsorción. En este sistema el fibrinógeno, principal proteína estructural de la sangre responsable de la formación de coágulos, se degrada proteolíticamente y se convierte en monómero de fibrina por la trombina.

Los dos componentes del Tissucol, se ponen en contacto en la superficie del nervio mediante jeringas separadas (Duploject) produciéndose entonces la polimerización *in situ*.

Los estudios sobre la utilización del adhesivo de fibrina para la reparación de lesiones nerviosas arrojan resultados muy dispares. En ocasiones desaconsejan su utilización (Haase et al., 1986). En otras ocasiones preconizan su utilización (Ferreira y Miniti, 1989) y en otras son inconcluyentes (Becker et al., 1984; Moy et al., 1988).

Varios estudios como son los realizados por Cruz et al., (1986) y Moy et al., (1988) desaconsejan la utilización de fibrina debido a que no encuentran mejores resultados que con el empleo de sutura, además en algunos de sus estudios han observado un importante porcentaje de casos de dehiscencia en la coaptación de los cabos nerviosos así como un aumento de la reacción inflamatoria.

Otros estudios experimentales como son los de Smahel et al., (1987) ó los estudios realizados por Nishihira y McCaffrey (1989) aconsejan su utilización como método más eficaz en comparación con la sutura nerviosa tradicional, ya que con la fibrina se observó que el tiempo quirúrgico era considerablemente inferior, no se observaron dehiscencias, la fibrina desapareció al cabo de una semana de la aplicación, la regeneración axonal fue similar en ambos grupos y las mediciones electrofisiológicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de reparación nerviosa.

En la clínica humana también se han realizado múltiples ensayos con los adhesivos de fibrina para la reparación de lesiones nerviosas viéndose, en general, que los resultados obtenidos cuando se utilizaron las técnicas clásicas o las de reparación con adhesivos de fibrina fueron comparables, apreciándose que la principal ventaja de la utilización de los adhesivos de fibrina era la rapidez con la que se producía la coaptación de los cabos nerviosos, además de buena hemostasia y estabilización temprana de los pequeños injertos. En resumen, la bibliografía nos muestra que la reparación axonal con materiales

absorbibles e histocompatibles (adhesivos de fibrina) presenta una posible ventaja sobre la sutura clásica ya que el tiempo operatorio invertido es menor, la reparación nerviosa es menos traumática, más fácil y rápida. (Romano et al., 1991).

El gran problema de estos adhesivos ha sido la potencialidad de transmisión de enfermedades virales, sobre todo la hepatitis y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Sin embargo, el riesgo de transmisión se reduce por la selección de los donantes mediante un reconocimiento médico y el despistaje de AgHBs y anticuerpos frente a VIH y VHC en las donaciones individuales y en las mezclas de plasma.

Los procedimientos de inactivación / eliminación incluidos en el proceso de producción han sido validados utilizando virus modelo. Si bien estos métodos se consideran efectivos para VIH, VHC, VHA y VHB, pueden tener un valor limitado para virus no envueltos tales como el parvovirus B19. La infección por Parvovirus B19 puede ser grave para una mujer embarazada (infección fetal) y para sujetos con inmunodeficiencia o con una producción aumentada de hematíes (ej: anemia aplásica).

Narakas en 1988 sentó los principios generales de utilización de los adhesivos de fibrina en la sutura nerviosa que son:

- 1- Disección cuidadosa de los extremos fasciculares de los cabos nerviosos, seccionando el extremo distal de cada uno.
- 2- Limpieza cuidadosa de los cabos nerviosos y de todo el tejido circundante, resecaando el tejido perineural sobrante antes de su coaptación.
- 3- Los cabos deben coaptarse de forma que los fascículos estén alineados y en la dirección adecuada.
- 4- Una vez aplicado el adhesivo hay que estabilizar los cabos nerviosos hasta que el coágulo adquiera firmeza.
- 5- Se debe evitar la tensión de la sutura.
- 6- La cantidad de adhesivo a utilizar debe ser la necesaria para cubrir una superficie del nervio, tanto en sentido proximal como distal a la sutura.
- 7- Es conveniente asegurarse de que la sutura está bien vascularizada.
- 8- Como consideración a tener en cuenta no es conveniente que se interponga el adhesivo entre los cabos nerviosos aunque esto no produce resultados indeseables.

Las ventajas que presenta el empleo de los adhesivos de fibrina son las siguientes:

- 1- Disminución del tiempo operatorio.
- 2- La anastomosis se puede realizar con una manipulación mínima lo cual disminuye los traumatismos adicionales al nervio.

- 3- Fácil retirada del adhesivo en caso de incorrecta coaptación sin traumatismo adicional.
- 4- La fibrina aísla la anastomosis por lo que evita el crecimiento del tejido en el interior del epineuro.
- 5- Evita las reacciones de cuerpo extraño que se pueden producir al emplear hilos de microsutura.
- 6- El adhesivo de fibrina presenta una gran tolerancia.
- 7- Los adhesivos de fibrina pueden usarse en combinación con sustancias ó fármacos como por ejemplo antibióticos, ó factores neurotróficos.

1.5 El sistema visual

El sistema visual forma parte del SNC y percibe el entorno exterior en reposo y movimiento informando mediante imágenes de la posición y orientación del cuerpo. En el sistema visual encontramos una serie de estructuras como la retina, el nervio óptico y las regiones retinorecipientes encefálicas o zonas de proyección a nivel cerebral.

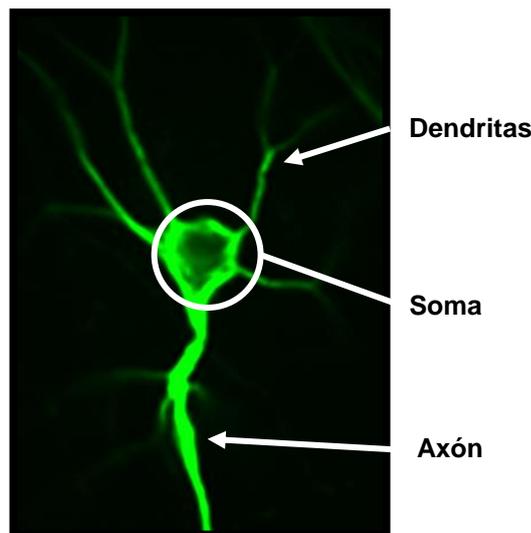


Figura 1: Principales partes de las neuronas.

Microfotografía de una célula ganglionar de retina en la que se observan sus distintas partes: cuerpo o soma celular que contiene el núcleo y otras organelas; el axón único, que conduce los impulsos desde el soma celular a sus regiones de sinapsis; y las dendritas que reciben impulsos de otras neuronas. Imagen cedida por Diego García Ayuso.

Los principales componentes del sistema nervioso son las células nerviosas o neuronas (**Figura. 1**). Las partes de la neurona son el cuerpo o soma celular que contiene el núcleo, mitocondrias y organelas. Del cuerpo celular sale el axón que es la fibra nerviosa principal cuya función es la transmisión de las señales, y las dendritas las cuales junto con el cuerpo celular se encargan de la recepción de la información procedente de otras células nerviosas. La información se transfiere de una neurona a otra a través de la sinapsis mediante un proceso denominado transmisión química y/o eléctrica. Tanto en humanos como en

roedores la vía visual es un sistema conectado en serie. Los fotorreceptores constituyen las primeras células de la vía visual cuya función es detectar y transformar el estímulo luminoso en una señal eléctrica que es procesada por las neuronas intermedias de la retina (bipolares, amacrinas, horizontales e interplexiformes) hasta llegar a las células ganglionares de la retina (CGRs). Éstas, a través de sus axones que forman el nervio óptico, envían la información luminosa a diversas regiones retinorecipientes del cerebro que procesan la información procedente de diversos tipos de CGRs. Desde el núcleo geniculado lateral, la región retinoreciciente más importante para nuestra percepción visual consciente, se envía de nuevo a la región cortical visual primaria donde se analiza y transforma la información que a su vez se envía a zonas corticales visuales de orden superior en las que finalmente se percibe el mundo exterior (Figura 2). En roedores (rata y ratón) la información visual que llega a la corteza también procede de los núcleos geniculados laterales correspondientes. Lo que ocurre es que el mayor núcleo retinoreciciente subcortical es el colículo superior; pero la información relacionada con la formación de imágenes visuales de las que el animal es consciente procede de los cuerpos geniculados laterales.

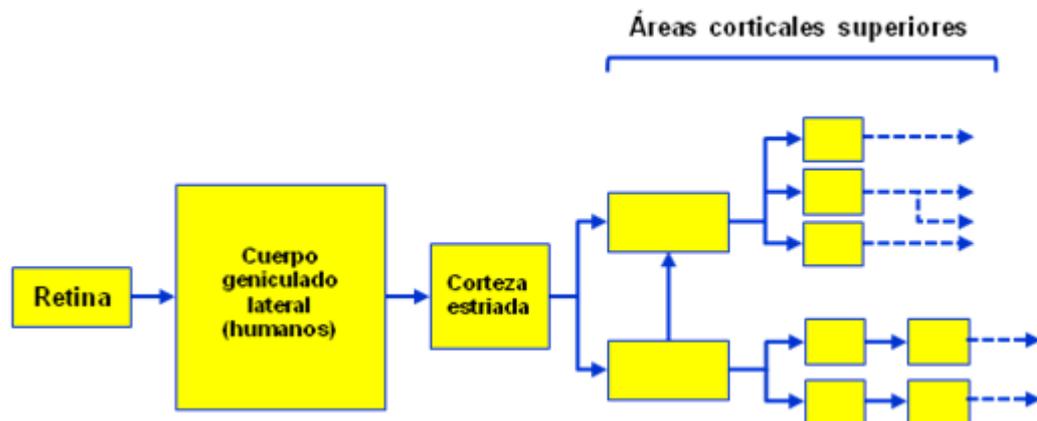


Figura 2: Esquema de la vía visual.

Cada estructura ilustrada en forma de cuadrado se compone de millones de células, agrupadas en láminas. Cada una recibe información de entrada de una ó más estructuras de los niveles inferiores de la vía y envía información de salida a varias estructuras de los niveles superiores. La vía se ha trazado solamente para cuatro ó cinco niveles más allá de la corteza visual primaria. Ilustración modificada de "Ojo, cerebro y visión", D. Hubel. 1999.

1.6 Anatomía del Ojo

1.6.1 Estructura del globo ocular

El globo ocular de estructura esférica es el órgano de la visión, que se encuentra localizado en la región anterior de la órbita y está constituido por tres capas concéntricas (Figura 3):

- 1 **Capa Fibrosa:** es la capa más externa y se encuentra formada por tejido conectivo denso avascular. Consta de dos regiones: la esclerótica que presenta terminaciones nerviosas sensibles al dolor y carece de vasos sanguíneos, su función es primordialmente de protección; y la córnea que es transparente y a través de ella penetra la luz al interior del ojo.
- 2 **Capa vascular o úvea:** es la capa intermedia, vascular y pigmentada, compuesta por tres partes que son: la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. El cuerpo ciliar consta de musculo liso del cual se extienden los ligamentos suspensorios cuya función consiste en el mantenimiento de la posición del cristalino. El iris es la región pigmentada del ojo, las fibras musculares que la constituyen se encargan de regular la constricción y dilatación de la pupila que es la zona localizada en su región central.
- 3 **Capa sensorial o retina:** es la capa más interna de todas. En ella se encuentran dos tipos de fotorreceptores, los conos y los bastones de los que hablaremos más adelante. Cabe recalcar que los conos se localizan principalmente en la fovea, depresión localizada en el polo posterior del globo ocular especializada para ser la zona de mayor precisión en la visión. A diferencia de ellos, los bastones se localizan principalmente en la región más periférica de la retina. El punto ciego es como se denomina a la región de la retina por donde se produce la salida del nervio óptico, zona carente de conos y bastones y por tanto insensible a la luz.

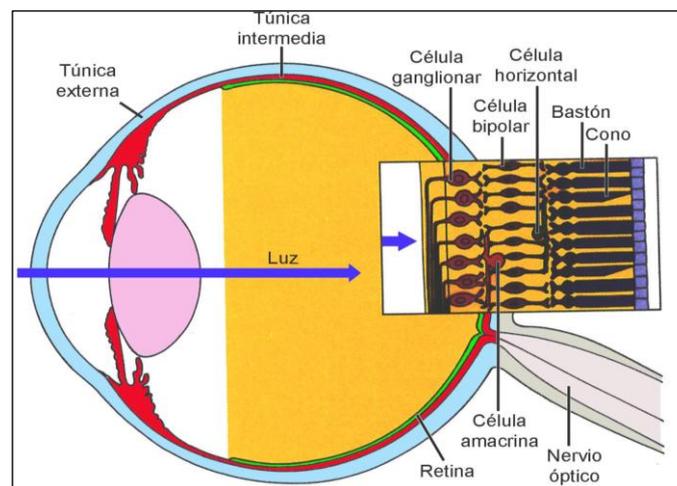


Figura 3: Esquema general del globo ocular.

Sección sagital del ojo humano, donde se aprecian sus estructuras. La retina agrandada a la derecha muestra las posiciones relativas de las 3 capas nucleares de la retina. La luz tiene que pasar a través de las capas de las células ganglionares de la retina y de las células bipolares antes de alcanzar los bastones y los conos. Ilustración tomada de "Ojo, cerebro y visión", D. Hubel, 1999.

Podemos dividir el globo ocular en dos zonas fundamentalmente. La zona anterior que se subdivide en una cámara anterior delimitada entre la cornea y el iris y una cámara posterior delimitada entre el iris y el cristalino, ambas cámaras se encuentran bañadas en humor acuoso. Posterior al cristalino podemos encontrar la cámara vítrea que contiene el humor vítreo responsable del mantenimiento de la presión intraocular frente a posibles presiones externas.

1.6.2 Retina: anatomía y fisiología

El estudio de la organización de la retina de los vertebrados ha interesado a muchos investigadores a lo largo de los últimos 100 años. Santiago Ramón y Cajal (1892) fue uno de los pioneros en este campo y la mayoría de sus descripciones y clasificaciones todavía continúan siendo válidas y se mantienen vigentes (Figura 4). Cada especie de vertebrado tiene algún tipo de especialización topográfica en la retina que la hace única, pero la laminación básica que a continuación describimos es constante en todos ellos. La estructura laminar y la gran variedad celular hacen de la retina un centro nervioso altamente complejo, estructurado y organizado (Caminos, 1998).

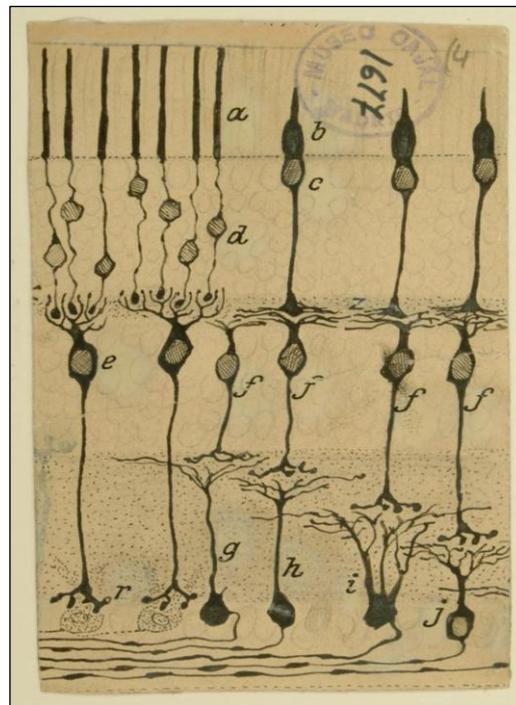


Figura 4: Dibujo de las neuronas retinianas realizado por Santiago Ramón y Cajal

Podemos observar los segmentos externos (a, b) y los núcleos (c, d) de los fotorreceptores, las células bipolares (e, f) y las células ganglionares de la retina (g, h, i, j).

La retina de todos los vertebrados está formada por 6 tipos de células neuronales (fotorreceptores –conos y bastones-, células horizontales, amacrinas, bipolares, interplexiformes y ganglionares de retina) y otras células no neuronales (células de Müller, astrocitos y microglía) las cuales se disponen formando una serie de capas bien definidas y enormemente organizadas (Figura 5) La citoarquitectura normal de la retina es crucial para su correcto funcionamiento. Por tanto, los cambios en la integridad de sus capas pueden servir como índice de la función retiniana tras el desarrollo de una patología o de la

aplicación de un agente externo que lesione sus componentes celulares (Michon et al., 1991).

El epitelio pigmentario (EP) de la retina es la porción más escleral de la misma, embriológicamente no deriva de la retina neural y está formado por una lamina de células epiteliales fuertemente pigmentadas. Tiene múltiples funciones que en general sirven de apoyo al fotorreceptor. Entre otras cabría mencionar la función de absorber las radiaciones luminosas, proporcionar el intercambio metabólico entre coriocapilar y neuroepitelio y contribuir a la renovación constante de los segmentos externos de los fotorreceptores. En los animales albinos este epitelio no contiene gránulos de melanina y por lo tanto es transparente lo que permite ver la vascularización coroidea.

El neuroepitelio está constituido por nueve capas que son las siguientes (**Figura 5**) :

1 **Capa de los segmentos externos de los fotorreceptores:** constituido por los segmentos externos de éstos.

2 **Membrana Limitante externa:** es una hilera de zonulas adherents donde las células fotorreceptoras están unidas a las células de Müller que rodean y dan apoyo a los elementos nerviosos (Camino, 1998).

3 **Capa nuclear externa (CNE):** capa de los núcleos de los fotorreceptores.

La capa de las fibras de Henle sólo se ve en la región de la mácula y está formada por axones de fotorreceptores que se elongan para permitir una gran concentración de segmentos externos de la fovea. Esta capa se sitúa entre los fotorreceptores y la sináptica o plexiforme externa.

4 **Capa plexiforme externa (CPE):** donde se efectúan las sinapsis entre las células bipolares, horizontales y fotorreceptores.

5 **Capa nuclear interna (CNI):** capa de núcleos de las células bipolares, células amacrinas, células interplexiformes, células de Müller y células horizontales.

6 **Capa Plexiforme interna (CPI):** es la región del intercambio sináptico entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares.

7 **Capa de células ganglionares (CCG):** está constituida, en roedores, en igual proporción por las células ganglionares de la retina y las células amacrinas desplazadas (Dragner y Olsen, 1981, Perry, 1981, Jeon et al., 1988).

8 **Capa de fibras de las células ganglionares de la retina (CGRs):** constituida por los axones de las células ganglionares en su trayecto hacia la papila óptica.

9 **Membrana limitante interna (MLI)** es la lámina basal de las células de Müller.

Las características de las neuronas que constituyen las capas de la retina son las siguientes:

Células fotorreceptoras: constituyen la primera neurona de la vía óptica y son de dos tipos, los conos y los bastones. Se encargan de la absorción de las radiaciones luminosas y

su transformación en impulso eléctrico. Los bastones son importantes en situaciones de luz escasa (escotópicas) mientras que los conos son los responsables de la visión diurna (fotópica) y son sensibles también a los colores.

Células horizontales: son neuronas típicas cuyos cuerpos se encuentran en la capa nuclear interna y sus ramas dendríticas se encuentran en la capa plexiforme externa donde las hay que hacen conexión con los conos y las hay que hacen conexión con los bastones. Su principal función es la de regular la información que pasa de los fotorreceptores a las células bipolares en circuitos de retroalimentación.

Células bipolares: constituyen la segunda neurona de la vía óptica, estas neuronas se extienden desde la capa plexiforme externa hasta la interna, están situadas de modo vertical con respecto a las capas de la retina. Su cuerpo está en la capa nuclear interna y tienen dendritas que ascienden por la capa plexiforme externa donde hacen conexión con las células fotorreceptoras y el axón se ramifica en la capa plexiforme interna donde hacen sinapsis con las células ganglionares y las amacrinas. Su función es transmitir la información desde la capa plexiforme externa a la interna.

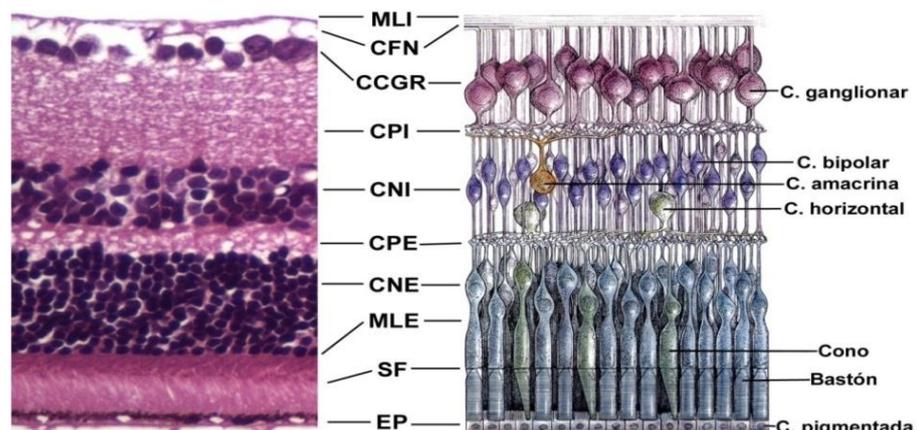


Figura 5: Organización laminar de la retina y los principales tipos de neuronas que la componen

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

Células Amacrinas: Estas neuronas tienen numerosas dendritas pero carecen de axón. Su cuerpo se encuentra en la capa nuclear interna y sus dendritas se extienden a la capa plexiforme interna conectándose entre sí y con los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares. Su principal función, al igual que las células horizontales en la plexiforme externa, es la de regular y elaborar la información que procede de bipolares y pasa a las ganglionares.

Células interplexiformes: proporcionan una vía centrífuga para transportar señales desde la capa plexiforme interna a la externa.

Células ganglionares: constituyen la tercera neurona de la vía óptica. Sus cuerpos están localizados en el estrato de células ganglionares, con sus dendritas conectan con las células bipolares y con las células amacrinas de la capa plexiforme interna. Sus axones abandonan la retina y se convierten en fibras del nervio óptico.

Las células no neuronales más importantes de la retina son: las células de Müller, los astrocitos y las células de microglía. Las células de Müller se extienden a lo ancho de toda la retina dando soporte a las neuronas de la retina. Los astrocitos se sitúan en la capa de las fibras nerviosas, rodeando a éstas y a los vasos sanguíneos (Ramírez et al., 1996; Triviño et al., 1996). Las células de microglía tienen pequeño tamaño y morfología variable; son parte del sistema inmune y su función es fundamentalmente fagocítica (Sobrado et al., 2007; Galindo-Romero et al., 2013).

1.6.2.1 Fotorreceptores

El proceso de recepción de la señal luminosa, su conversión en señal eléctrica (Fototransducción) y su transmisión al circuito de la retina es llevado a cabo por los fotorreceptores. Estas células contienen en sus segmentos externos (ver abajo) los pigmentos visuales formados por una parte proteica (rodopsina en los bastones y opsinas en los conos) y un cromóforo derivado de la vitamina A, el 11-cis retinaldehído. Los fotones, o unidades simples de luz visible, son absorbidos por el cromóforo que cambia su conformación a 11-trans retinaldehído. Este cambio de conformación inicia, a su vez, una serie de cambios conformacionales en la parte proteica del pigmento, cambios que dan lugar en última instancia a un cambio del potencial de la membrana plasmática que provoca la hiperpolarización de los fotorreceptores y un cambio (disminución) en la cantidad de liberación del neurotransmisor glutamato en el pie sináptico del fotorreceptor.

Existen en la retina de los mamíferos 2 tipos de fotorreceptores: los conos y los bastones, que se distinguen entre sí por su forma, el tipo de fotopigmento que contienen, su distribución en la retina y el patrón de sus conexiones sinápticas.

La morfología de los fotorreceptores es alargada y su estructura está polarizada para poder realizar sus dos funciones principales: por un extremo (el externo) reciben y procesan la energía luminosa y por el otro (el interno) la transmiten.

La estructura general de los fotorreceptores es constante en la mayoría de los vertebrados (**Figura 6**), aunque existen diferencias morfológicas y funcionales entre las distintas especies. Podríamos describir como fotorreceptor tipo aquel que tiene, desde las capas más externas a las más internas de la retina (**Figura 6, derecha**) las siguientes estructuras: segmento externo, pedúnculo de conexión, segmento interno, soma, axón o fibra interna y terminal sináptico.

En las retinas de los mamíferos, los conos son sensibles a mayor intensidad de luz por lo que son los responsables de la visión diurna (fotópica) y de la discriminación de los colores. En la retina humana existen tres tipos diferentes de conos: **conos S** (del inglés short wavelength), **conos M** (del inglés medium wavelength) y **conos L** (del inglés long wavelength). Éstos son sensibles a tres regiones distintas del espectro luminoso. Sus máximos de absorción se encuentran a 420 (azul; S), 531 (verde; M) y 588 (rojo; L) nm. En los mamíferos no primates, como el ratón, la discriminación del color es llevada a cabo solamente por dos tipos de conos llamados S y M/L. Al igual que en la retina humana, estos conos se distinguen principalmente por la porción del espectro a que son más sensibles: las longitudes de onda cortas estimulan a los conos S; las longitudes de onda media y larga estimulan a los conos M/L. Esta sensibilidad espectral se debe a la opsina, proteína que forma el pigmento visual. Cada tipo de cono contiene una opsina específica y por ello un espectro de absorción. En los bastones, el pigmento visual se denomina rodopsina (opsina de los bastones).

Los conos y los bastones están especializados para diferentes aspectos de la visión. Los bastones tienen una resolución espacial y temporal baja pero son extremadamente sensibles a la luz y por ello intervienen en la visión nocturna (escotópica). Los conos presentan una resolución espacial y temporal alta e intervienen en la visión diurna (fotópica) y cromática (Dowling, 1987). Los circuitos que unen a los conos y los bastones con las CGRs también contribuyen al proceso del estímulo eléctrico en la retina. Una de las principales diferencias entre ambos circuitos es su grado de convergencia. Cada célula bipolar de bastón contacta con varios bastones y diferentes células bipolares de bastón contactan con varias células amacrinas. En contraste, el circuito de los conos es mucho menos convergente, sobre todo en la mácula. Este tipo de relación menos convergente es la necesaria para que la agudeza visual sea máxima en la mácula. Sin embargo, el hecho de que el circuito de los bastones sea más convergente lo convierte en un mejor detector de luz, ya que la unión de pequeñas señales provenientes de diferentes bastones genera una respuesta mayor en la célula bipolar. Además, existen diferencias en los mecanismos de transducción utilizados por los conos y los bastones, lo que hace que respondan de diferente forma a una intensidad determinada de luz; así, un bastón responde de forma clara al estímulo provocado por un único fotón, mientras que para provocar una respuesta similar en un cono necesitaríamos más de 100 fotones (Mustafi et al., 2009). Otro aspecto a tener en cuenta es que la convergencia reduce la resolución espacial en el sistema de los bastones.

1.6.2.2 Células Ganglionares de la Retina (CGRs)

Las CGRs son neuronas que recogen toda la información visual procesada en la retina y la envían al encéfalo. Sus axones formarán el nervio óptico siendo las únicas neuronas de la retina que proyectan sus axones al cerebro, que en ratón es predominantemente sobre los colículos superiores (Salinas Navarro et al., 2009a, 2009b). (Figura 7)

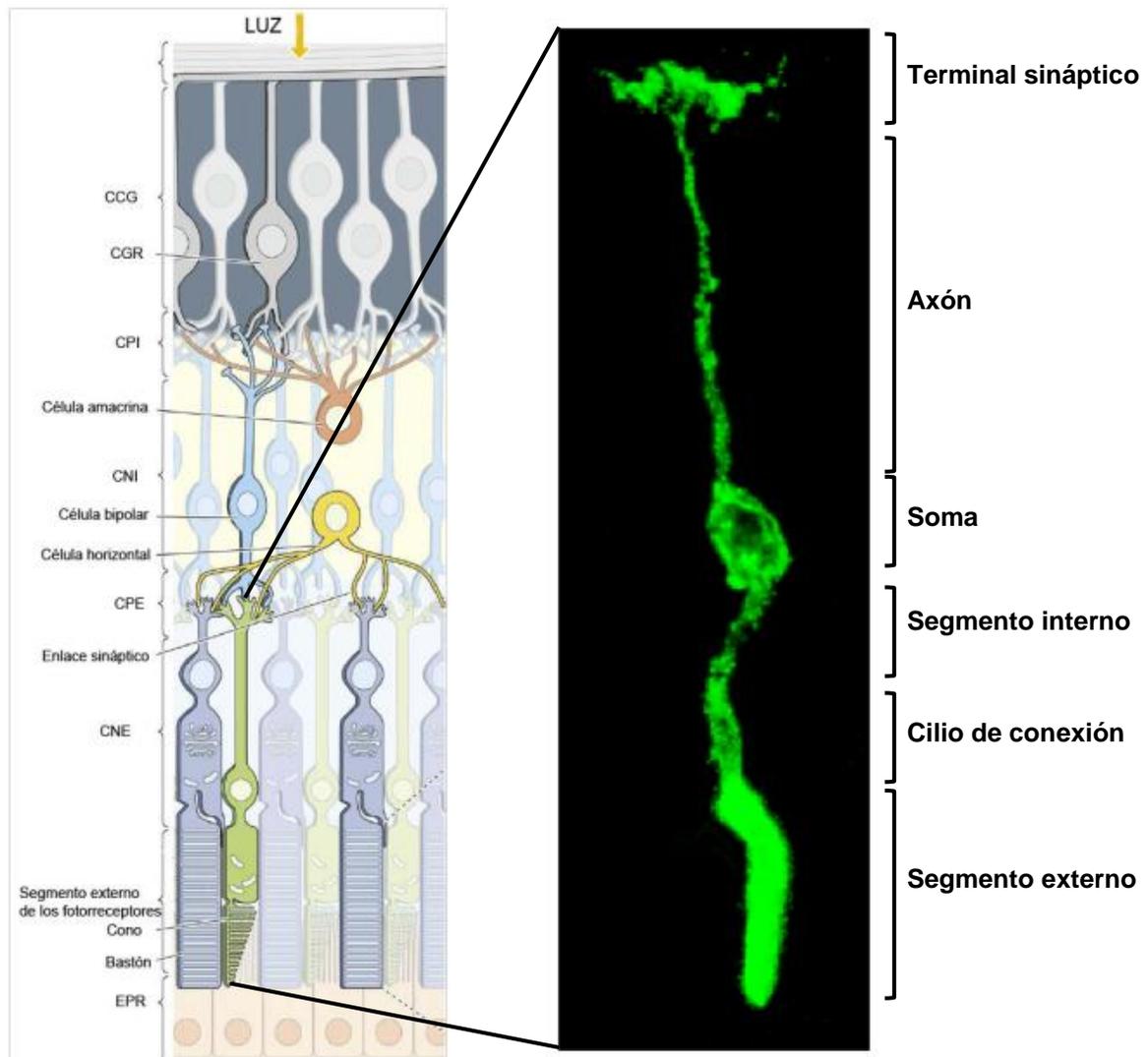


Figura 6: Estructura de los fotorreceptores y sus conexiones sinápticas

Izquierda: dibujo esquemático de un corte radial de la retina en el que se observan las conexiones sinápticas de los fotorreceptores, conos y bastones. Modificada de Mustafi et al., (2009). Derecha: fotografía confocal de un cono S de retina de rata (cedida por Arturo Ortín)

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

Desde entonces, las CGRs en roedores se han seguido clasificando en función del tamaño de su soma y la morfología de sus dendritas (Fukuda, 1977; Perry, 1979; Perry et al., 1983; Ni y Dreher, 1981; Dreher et al., 1985; Dann y Buhl, 1987; Peichl, 1989; Tauchi et al., 1992). Fukuda (1977) fue el primero en clasificar las CGRs de rata en tres grandes grupos según el tamaño del soma. Las CGRs grandes tienen diámetros mayores a 14.5 μm , se distribuyen de forma regular por toda la retina, y constituyen el 5% del total de CGR. Las CGRs medianas tienen diámetros entre 11.5 y 14.5 μm , predominan en la zona central de la retina, y representan aproximadamente un 30% del total de CGR. Y las CGRs pequeñas tienen un diámetro entre 6 μm y 11,5 μm , se distribuyen regularmente por la retina y constituyen aproximadamente un 65% del total de CGR. Estos tres tipos de tamaño se han correlacionado también con axones de diferente grosor y velocidad de conducción y, recientemente, con la expresión de los factores de transcripción Pou4f (Nadal-Nicolás et al., 2012). Más tarde, siguiendo también criterios morfológicos y utilizando la tinción de Golgi, Perry (1979) dividió las CGRs en tipos I, II, y III, aunque esta técnica presentaba el problema de que en ocasiones las células teñidas no podían distinguirse como CGRs de forma inequívoca, porque los axones no se visualizaban siempre. Posteriormente, Ni y Dreher (1981) y Dreher et al., (1985), marcando retrógradamente con peroxidasa las CGR, subdividieron los tipos II y III de Perry en dos subclases cada uno, con la dificultad de que esta técnica tampoco permitía en ocasiones el marcaje completo de los árboles dendríticos de las CGR. Utilizando técnicas de inyección intracelular (Tauchi et al., 1992) identificaron nuevos tipos morfológicos de CGRs no descritos hasta entonces y subdividieron el tipo I de Perry en otras dos subclases que llamaron alfa y delta por su parecido a las células alfa y delta del gato (Boycott y Wassle, 1974).

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

Existen CGRs “desplazadas”, que se localizan en la capa plexiforme y nuclear interna (Dreher et al., 1985, Linden, 1986). Se les llama células de Dogiel (Dogiel, 1888) y suponen aproximadamente el 0.35% de la población total de CGRs de la rata y el 1-2% en ratón (Dräger y Olsen, 1981). Tienen características morfológicas similares a las CGRs no desplazadas, se localizan frecuentemente en la periferia del cuadrante temporal inferior, y

proyectan contralateralmente. También existen CGRs de asociación, cuyos axones no proyectan fuera de la retina, fueron descritas inicialmente en retinas humanas y de perro (Gallego y Cruz, 1965), y posteriormente se han observado en rata y ratón (Dräger y Hofbauer, 1984).

La vía visual primaria en el roedor adulto ha sido ampliamente utilizada para el estudio de diferentes neuropatías por su fácil observación y accesibilidad a la manipulación experimental, y al gran conocimiento que se tiene de su organización estructural, funcional y molecular (Dowling, 1979; 1987; DeVries y Baylor, 1993; Hubel, 1995). Lo que ha permitido investigar aspectos anatómicos, funcionales y del comportamiento de la degeneración (Villegas-Pérez et al., 1988a; 1993; 1996; 1998; Sellés-Navarro et al., 1996; Wang et al., 2000; Lafuente et al., 2002a; Chidlow et al., 2005; Marco-Gomariz et al., 2006; Lund et al., 2007; Agudo et al., 2008, 2009; García-Ayuso et al., 2010), neuroprotección (Vidal-Sanz et al., 2000, 2007; Lafuente et al., 2002b; Lafuente López-Herrera et al., 2002; Áviles-Trigueros et al., 2003; Mayor-Torroglosa et al., 2005; Lund et al., 2007; Schnebelen et al., 2009) y de la regeneración en el SNC en mamíferos (Vidal-Sanz et al., 1987, 1993, 2002; Villegas-Pérez et al., 1988a; Sasaki et al., 1996; Whiteley et al., 1998; Avilés-Trigueros et al., 2000).

1.6.2.3 Células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles. Papel de la melanopsina

Durante muchos años se pensó que en mamíferos las únicas células fotosensibles eran los fotorreceptores 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 (reflejo pupilar y la sincronización del ritmo circadiano); mientras que en vertebrados más “primitivos” seguían existiendo fotorreceptores extraoculares.

Sin embargo en 1928 Clyde Keeler observó que en ratones que habían sufrido una gran degeneración de las capas externas de la retina y por lo tanto de la mayor parte de los fotorreceptores, es decir ciegos funcionalmente, seguían presentando reflejos visuales como la constricción de las pupilas en respuesta a la luz (Keeler et al., 1928). En 2002 Foster et al., mostraron que estos ratones modificaban sus ritmos biológicos conforme variaban los ciclos de luz y oscuridad, sin embargo si los animales eran enucleados o sufrían degeneración de las CGRs (Van Gelder, 2003) este proceso desaparecía, lo cual sugería la existencia de un nuevo fotorreceptor. Por tanto en estos animales mamíferos tanto los fotorreceptores encargados de la función visual como los del sistema visual no formadores de imágenes se encuentran en el ojo en vías paralelas, actuando como sensores de luz para el sistema visual formador y no formador de imágenes respectivamente (Graham 1998).

De modo que el descubrimiento de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipCGR) sienta las bases anatómicas del sistema visual no formador de imágenes (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002), una vía paralela a la vía visual. Éstas ipCGRs median en la

regulación de los ritmos circadianos, contribuyen al reflejo pupilar y otra serie de respuestas fisiológicas y de comportamiento a la iluminación ambiental (Hankins et al., 2008).

Los ritmos circadianos son ciclos biológicos endógenos de 24 h que permiten sincronizar funciones fisiológicas de nuestro organismo 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 mantiene por la actividad de un reloj endógeno. El sistema permite acompañar los ciclos luz-oscuridad a nuestro reloj endógeno, es decir lo pone en hora, 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 et al., 2008).

Las ipCGRs proyectan sus axones a núcleos diferentes que la población de CGR, éstas los proyectan al núcleo supraquiasmático (NSQ) que es el centro principal de la regulación de los ritmos circadianos (Gooley et al., 2001; Hannibal et al., 2002) a través del tracto retinohipotalámico (Moore et al., 1995) que posee menos del 1% de los axones de la población total de las CGRs (Provencio et al., 1998). Además estas células también envían proyecciones a la lámina intergeniculada y al núcleo de la oliva pretectal, responsable del reflejo pupilar (**Figura 7A**). Recientemente, se ha descrito la participación de otras regiones del cerebro como el área preóptico, la zona hipotalámica subparaventricular, el núcleo geniculado ventral- lateral y el colículo superior (Hattar et al., 2006; Galindo-Romero et al., 2013).

La melanopsina es la opsina que se expresa selectivamente en las ipCGRs (Provencio et al., 2000) y gracias a la cual estas células tienen la capacidad de responder directamente a la luz. Además, la existencia de anticuerpos específicos que reconocen esta opsina, permite inmunodetectar específicamente las ipCGRs (**Figura 7B**).

El gen de la melanopsina se llama OPN4. La proteína para la que codifica tiene una estructura de 7 dominios transmembrana y está unida a una proteína G que transduce la señal, al igual que las opsinas de los fotorreceptores. Sin embargo, el proceso de fototransducción 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. La melanopsina se detecta a partir del día 18 del desarrollo embrionario de rata y comienza a responder a la luz en las CGRs en el momento del nacimiento, a diferencia de los conos y bastones que comienzan a ser fotosensibles al décimo día, lo cual podría deberse a la necesidad de adaptarse a los ritmos circadianos incluso antes de poseer visión (Nayak et al., 2007).

En roedores las ipCGRs suponen un 1-3% de la población total de CGRs y se distribuyen por toda la retina, presentando mayor densidad en la zona superior. Sus núcleos se

encuentran en la capa de células ganglionares (Hattar et al., 2002; Galindo-Romero C. et al., 2013). La melanopsina se expresa en el soma, axones y dendritas de estas neuronas y sus dendritas forman un extenso plexo dentro de la capa plexiforme interna (Berson 2003; Hattar et al., 2002; Provencio et al., 2002).

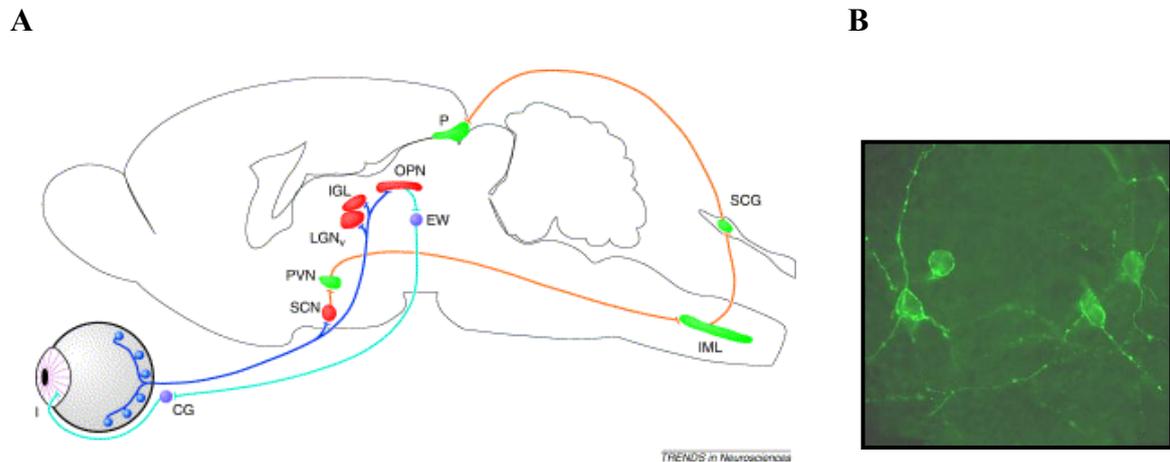


Figura 7: Principales proyecciones neuronales de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en distintas áreas del cerebro de ratón

A: Los axones de las ipCGRs (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 que se originan en el SCN (naranja) hacia el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo intermedio lateral (IML), y el ganglio ciliar 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). Imagen tomada de Berson, 2003. **B:** Magnificación de una retina de rata montada a plano en la que se muestra la inmunodetección de ipCGRs por su expresión de melanopsina. Imagen tomada de Nadal-Nicolás et al., 2012.

Las ipCGRs son mucho menos sensibles a la luz y su señal es más lenta y la longitud de onda a la que son sensibles es menor que la longitud de onda a la que responden las opsinas de los conos.

1.6.3 Nervio y quiasma óptico

El nervio óptico es el II par craneal, el único axón de cada CGRs se reúne con los axones restantes en la papila óptica de una forma muy ordenada manteniendo la relación que mantenían las CGRs en la retina (retinotópica), formando dicho nervio que, tras salir del globo ocular por el polo posterior, se mieliniza y se dirige hacia el vértice de la órbita, que abandona por la hendidura esfenoidea para penetrar en el cráneo. El nervio óptico (NO) es parte del SNC. Como tal, sus axones son mielinizados por oligodendrocitos (mientras que en los nervios periféricos la mielina la generan las células de Schwann), se encuentra envuelto por las meninges (piamadre, aracnoides y duramadre) y, a diferencia de lo que sucede con los nervios periféricos, no regenera una vez lesionado.

A lo largo de su trayecto se distinguen cuatro porciones: porción intraocular, intraorbitaria, canalicular e intracraneal donde los NO de ambos ojos se reúnen en el quiasma óptico, situado en la región supraselar, donde las fibras de cada ojo destinadas al hemisferio contralateral decusan. En humanos y primates, el 50% de todos los axones decusan, las fibras de la hemirretina nasal se cruzan mientras que las fibras de la hemirretina temporal permanecen ipsilaterales. Las fibras de la retina temporal ipsilateral y la retina nasal contralateral de cada lado se reúnen para formar las cintillas o tractos ópticos, que por tanto conducen a cada hemisferio cerebral la información del hemimundo visual contralateral.

Hay estudios que muestran que el porcentaje de CGRs que se proyectan ipsilateralmente en ratones y ratas es del 2,6% y 5% respectivamente, por lo que se decusan alrededor del 97-95% de las mismas (Irons y Frost 1995; Cusick y Lund 1982; Lund et al., 1980, Salinas-Navarro et al., 2009a, 2009b, Nadal-Nicolas et al., 2012).

1.6.4 Proyecciones visuales

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

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

En el ser humano y primates, la corteza visual primaria se encuentra en la superficie medial de los polos posteriores de los hemisferios cerebrales, en diferentes áreas cada una de las cuales está dedicada a partes específicas del campo visual (Hubel y Wiesel, 1959, 1962; Lund, 1988). En esta corteza visual primaria las imágenes provenientes del geniculado se procesan inicialmente. Posteriormente, esta información recogida en la corteza visual primaria alcanza múltiples centros superiores del procesamiento visual, que están situados fuera de la corteza primaria, y que son los encargados de la percepción del movimiento, la profundidad, la forma y el color. Además de estas tres estructuras subcorticales, las cintillas ópticas proyectan también, como en todos los mamíferos, a los núcleos supraquiasmáticos, al geniculado y a los núcleos que componen el sistema visual accesorio.

1.7 Sistema visual en ratón adulto

1.7.1 Sistema retino-colicular

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

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

Los axones de las CGRs proyectan a regiones subcorticales que son el núcleo supraquiasmático, núcleo óptico accesorio, núcleo pretectal, núcleo geniculado ventral lateral, núcleo geniculado lateral dorsal, y el colículo superior (Rodiek, 1979). Alrededor del 98% de las CGRs en roedores proyectan su axón a los CS (Lund et al., 1965; Perry, 1981; Linden y Perry, 1983; Salinas- Navarro et al., 2009a, 2009b) y tal como se ha dicho, más del 95% de estos axones decusan a nivel del quiasma óptico (Lund, 1965; Perry, 1979; Drager y Olsen., 1981; Linden y Perry, 1983; Nadal-Nicolás et al., 2012).

Los CS son el principal territorio subcortical donde proyectan de una manera topográfica muy precisa los axones de las CGRs de los roedores. (Linden y Perry, 1983; Sauvé et al., 2001; 2002). Son dos protuberancias situadas en la parte dorsal del mesencéfalo, rostrales al colículo inferior (**Figura 8A**). 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 (**Figura 8B**). Las tres primeras capas, llamadas capas superficiales o visuales, reciben aferencias retinianas y se encargan de procesar los estímulos visuales (Hofbauer y Draguer, 1985; Sefton y Dreher, 1985), mientras que las cuatro restantes procesan la información auditiva y somatosensorial (Stein, 1984).

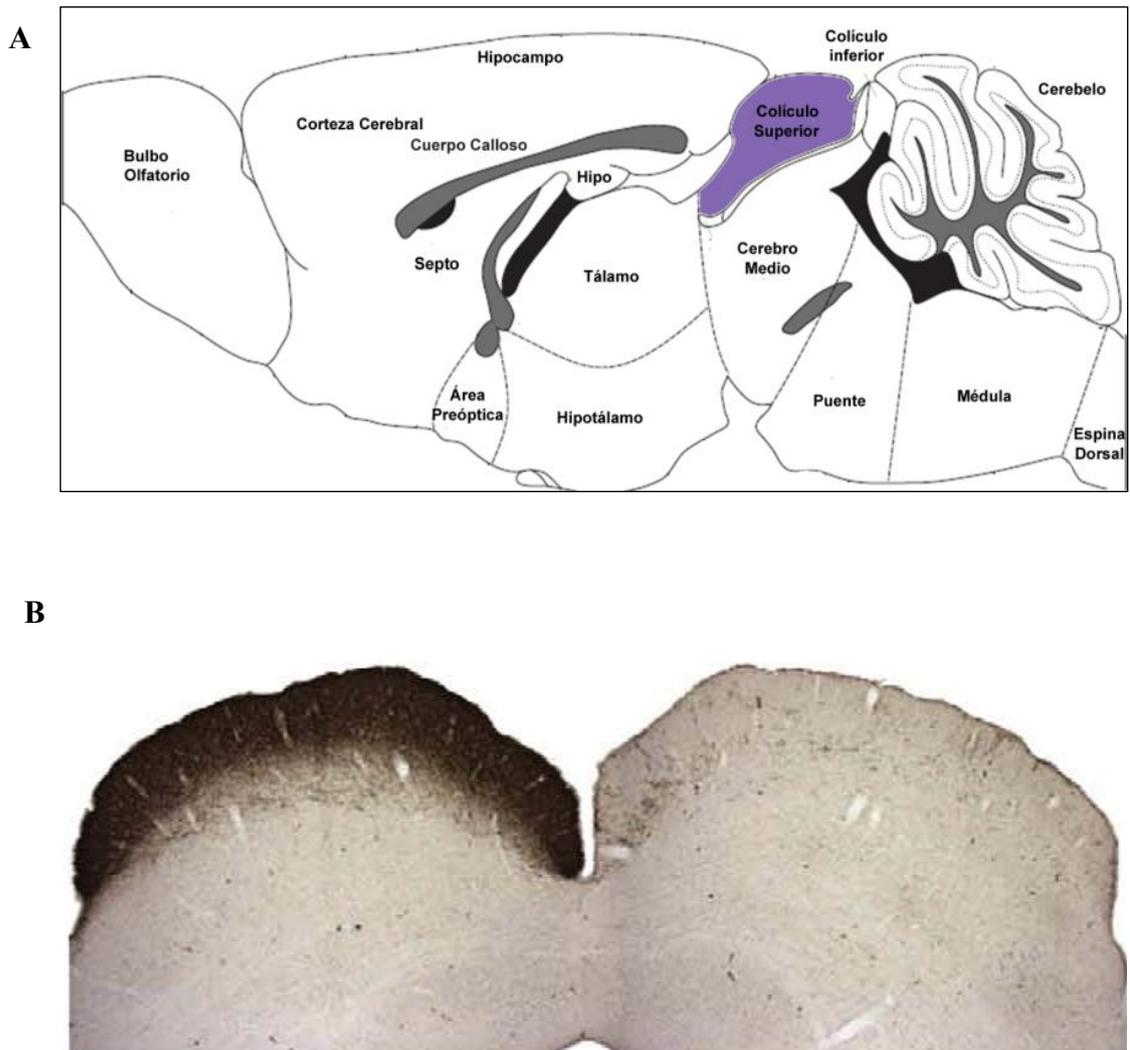


Figura 8: Localización de los colículos superiores (CS) en el cerebro del ratón (A) y sección coronal del CS en rata (B).

A. Esquema sagital del cerebro de ratón donde se aprecia el CS como una protuberancia situada en la parte dorsal del mesencéfalo, rostral al colículo inferior (Esquema modificado de “The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates”, Paxinos y Franklin, 2001). **B.** Imagen de una sección frontal de 40 μm de espesor del cerebro medio de rata albina SD que muestra las aferencias retinianas marcadas en las capas visuales de los CS 4 días después de inyectar la subunidad B de la toxina colérica en el ojo izquierdo (OI) de una rata control. Las capas visuales del CS están formadas por: Stratum Zonale, Stratum Griseum Superficiales y el Stratum Opticum. En el CS derecho (a la izquierda de la imagen) contralateral al OI se aprecia una muy densa distribución de las aferencias retinianas intensamente marcadas que llenan por completo las capas visuales. Por el contrario, en el CS ipsilateral (izquierdo) se aprecia unas pocas aferencias retinianas en la región más profunda del Stratum Griseum superficial y el Stratum opticum (Williams et al., 1996), como corresponde a la pequeña proporción de aferentes retinianos que proyectan ipsilateralmente en la rata albina (Linden y Perry, 1983). B: imagen tomada de Parrilla- Reverter et al., 2009 a.

Los axones de las CGRs llegan al Stratum Opticum, arborizan, y forman terminales sinápticas que terminan sobre todo en el Stratum Griseum Superficiales (Beckstead y Frankfurter, 1983) y en el Stratum Zonale. Los axones de las CGRs se distribuyen en el CS siguiendo un orden retinotópico muy preciso, 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 et al., 1966; Linden y Perry, 1983; O'Leary et al., 1986a; Simon y O'Leary, 1990; Sauvé et al., 2001, 2002).

1.8 Estudio de la población de células ganglionares de la retina en roedores

1.8.1 Identificación de las células ganglionares de la retina

Puesto que las CGRs se utilizan como modelo para estudiar los cambios degenerativos asociados a una lesión de Sistema Nervioso Central y las propiedades neuroprotectoras de diversas sustancias, es importante identificarlas para diferenciarlas de las células amacrinas desplazadas que están en igual proporción en la capa de CGRs de roedores (Cowey y Perry, 1979; Perry, 1979, 1981; Perry et al., 1983; Dräger y Olsen, 1981; Jeon et al., 1998) y posteriormente cuantificarlas para poder conocer con exactitud tanto la proporción de CGRs que mueren tras un insulto, como la que sobrevive tras un tratamiento. Existen varios protocolos de identificación de CGRs (trazado e inmunodetección) y técnicas para contar el número de CGRs identificadas (manuales y automáticas). También se puede estimar de manera indirecta el número de CGRs contando el número de axones que hay en el nervio óptico. Se han utilizado varios métodos para su identificación:

1.8.1.1 Identificación por criterios morfológicos clásicos

Se identifican las diferentes células por criterio morfológicos tras ser teñidas mediante tinciones celulares inespecíficas (Fukuda et al., 1977; Schober y Gruschka., 1977). Este método es imperfecto ya que no podemos diferenciar inequívocamente las CGRs pequeñas de las células amacrinas desplazadas (Dräger y Olsen, 1981; Perry, 1981; Perry et al., 1983; Jeon et al., 1998) pues ambas poblaciones se superponen en tamaño (Villegas-Pérez et al., 1988a; 1993), y las células amacrinas desplazadas suponen casi el 50% de las células que se localizan en la capa de CGRs (Perry, 1981) por lo que esta metodología se utiliza poco en la actualidad.

1.8.1.2 Identificación por la aplicación de trazadores neuronales

Las células nerviosas transportan a través de sus axones múltiples moléculas fundamentales para su metabolismo y mantenimiento. Este transporte se realiza a través del transporte axonal en ambas direcciones desde el soma celular hasta la periferia de los terminales axonales (transporte axonal anterógrado) y desde los terminales axonales hasta el soma neuronal (transporte axonal retrógrado).

Las técnicas de trazado axonal se basan en este transporte del flujo axoplásmico y determinadas sustancias se pueden aplicar de forma anterógrada o retrógrada para identificar la proyección axonal ó el soma neuronal respectivamente.

Para la identificación de las CGRs se han usado distintos trazadores retrógrados aplicados de distintas formas y en distintos lugares dependiendo del estudio a desarrollar (revisado en Köbbert et al., 2000). Estos trazadores se pueden aplicar en el muñón del nervio óptico (MNO) o en las principales regiones dianas de proyección de los axones de las CGRs en el cerebro (CS y NGL) y se transportan retrógradamente por los axones retinofugales de las CGRs acumulándose en el soma celular y sus proyecciones (Vidal-Sanz et al., 1988, 1993, 2002; Peinado-Ramón et al., 1996; Sellés-Navarro et al., 1996; Wang et al., 2000; Lafuente López-Herrera et al., 2002). El método más utilizado es la aplicación del trazador bien en los CS, identificándose así el 98,4% de las CGRs en rata y ratón albinos (Salinas-Navarro et al., 2009a, b), o bien en el MNO lo que permite la identificación de todas las CGRs ya que son las únicas células de la retina que emiten un único axón retinofugal (Salinas-Navarro et al., 2009a, b). Para que sea fidedigno el neurotrazador debe aplicarse eficientemente para marcar uniforme todos los terminales axonales. Se han utilizado distintos tipos de trazadores con diferentes propiedades, se distinguen:

1. Peroxidasa de rábano (HRP) (Perry, 1981; Vidal-Sanz et al., 1987)
2. Carbocianinas: DiI (carbocianina dye) (Vidal-Sanz et al., 1988) y el 4Di-10ASP (Thanos et al., 1993; Lafuente et al., 2002a)
3. Fast Blue (Vidal-Sanz et al., 1988; Villegas-Perez et al., 1988)
4. Rodaminas (Thanos et al., 1987) principalmente el dextrano de tetrametil-rodamina (DTMR) (Woldemussie et al., 2001; Salinas-Navarro et al., 2009c, 2010)
5. Fluorogold (FG) y su análogo Hidroxistilbamidina metano-sulfonato (OHSt) son los neurotrazadores de elección por la mayoría de los grupos que trabajan en este campo. (Peinado-Ramón et al., 1996; Sellés-Navarro et al., 1996; Wang et al., 2000; Vidal-Sanz et al., 2000, 2007, 2012; Lafuente et al., 2002a; Danias et al., 2002). Se ha estudiado ampliamente el contaje y distribución de las CGRs trazadas retrógradamente con FG u OHSt aplicado en los CS o en el MNO, tanto en rata como en ratón (Salinas-Navarro et al., 2009a, b).

Los trazadores neuronales pueden transportarse activamente por medio de vesículas como en el caso del FG (Schmued et al., 1986, 1989; Wessendorf, 1991) u OHSt (Köbbert et al., 2000; Cheunsuang y Morris, 2005; Salinas-Navarro et al., 2009b) marcándose únicamente el soma y las dendritas primarias, o por difusión pasiva a través de la membrana como ocurre con las rodaminas y carbocianinas, acumulándose en el soma celular, en las dendritas y en el axón.

1.8.1.3 Identificación mediante la detección de marcadores moleculares

Estos marcadores han de cumplir ciertas condiciones: ser expresados específicamente por una gran proporción de la población de las CGR, y no por otros tipos neuronales de la

retina, y es necesario que no cambie su patrón de expresión después de la lesión retiniana. Se han identificado varias proteínas específicas de las CGRs:

1. **Thy1:** es un antígeno específico de las CGRs (Barnstable y Drager, 1984; Perry et al., 1984) localizado en la membrana plasmática, pero no reconoce a todos los subtipos de las CGRs (Dabin y Barnstable, 1995; Schlamp et al., 2001; Huang et al., 2006) y cambia su patrón de expresión después de lesionar la retina (Dabin y Barnstable, 1995; Chidlow et al., 2005; Schlamp et al., 2001) sin que ocurra la muerte o desaparición de las CGR. Esto invalida su uso en situaciones patológicas.
2. **Bex1/2:** reconoce los somas de las CGRs y sus proyecciones (Bernstein et al., 2006) pero al expresarse en el axón no es favorable para el análisis cuantitativo automático.
3. **γ -sinucleína:** esta proteína se expresa en casi toda la población de CGRs de ratón (Sugurcheva et al., 2008, Soto et al., 2008, 2010; Nguyen et al., 2011). En este caso, como la proteína se localiza en las dendritas y axones, y esto perjudica la cuantificación automática, se detecta su ARNm por medio de hibridación *in situ*.
4. **Brn3b:** factor de transcripción de la familia POU4F. Se ha empleado en la identificación de las CGRs en ratones (Buckingham et al., 2008), en rata se expresa en un 64% de esta población (Nadal-Nicolas et al., 2012).
5. **Brn3a:** es otro miembro de la familia POU4F (Eng et al., 2004). Presenta dos efectos funcionales diferentes, por un lado induce la expresión de diferentes genes implicados en la diferenciación neuronal y crecimiento axonal (Latchman, 1998), y por otro lado tiene una función antiapoptótica ya que induce la expresión de Bcl-2 y Bcl-X_L por lo que promueve la protección de las CGRs frente a esta forma de muerte (Smith et al., 1998; Smith et al., 2001). El Brn3a se expresa predominantemente en células neuronales tanto en el sistema nervioso central como periférico. En retina de rata y ratón el Brn3a se expresa en la mayoría de las CGRs. Estudios recientes han demostrado que el Brn3a se expresa en el 85,5% y el 92,6% de la población total de CGRs de ratón pigmentado y albino respectivamente (Galindo-Romero et al., 2011, 2013b) y en el 92,2% y 96,4% de las CGRs de ratas albinas y pigmentadas, respectivamente (Nadal-Nicolas et al., 2009). Las CGRs que expresan Brn3a en ratón son las que proyectan contralateralmente tanto a los colículos superiores como al núcleo geniculado lateral aunque estas últimas son una minoría en ratones adultos (Quina et al., 2005). Se ha descrito (Agudo et al., 2008, y Nadal-Nicolás et al., 2009, 2012), que tanto el ARNm como el nivel de proteína de Brn3a disminuyen con el tiempo post-lesión, tanto después de cortar como de aplastar el NO, manteniéndose siempre y cuando las CGRs estén vivas. Por lo que la inmunodetección del Brn3a es un método fidedigno para la identificación y cuantificación de las CGRs en condiciones normales y después de la lesión en rata y ratón albino siendo además fiable en la evaluación de una posible terapia neuroprotectora. (Nadal-Nicolas et al., 2009, 2012; Galindo-Romero et al., 2011,2013; Sanchez- Migallón et al., 2011,

Salinas-Navarro et al., 2010, García-Ayuso et al., 2010). Como en la actualidad el Brn3a es el mejor marcador para detectar por medio de inmunohistofluorescencia las CGRs en rata y ratón, es el que vamos a usar en este trabajo.

6. **Melanopsina:** es un pigmento visual presente en una subpoblación de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles o melanopsínicas (véase apartado 1.6.2.3). Los anticuerpos contra la melanopsina permiten identificar y caracterizar una subpoblación de CGR que, aunque es pequeña pues representa aproximadamente el 1-2% de la población total, sin embargo crucial para la fisiología del sistema visual no relacionada con la formación de imágenes. La existencia de anticuerpos específicos contra este pigmento permite identificar, caracterizar e investigar la respuesta de estas ipCGRs a la lesión axonal y su capacidad de regeneración axonal.

1.8.1.4 Identificación mediante manipulación genética

También mediante manipulación genética se han identificado las CGRs añadiendo un gen chivato bajo la expresión de un promotor de un gen específico de las CGRs usando ratones transgénicos (Feng et al., 2000; Bernstein et al., 2006, 2007; Murata et al., 2008; Raymond et al., 2008), esta tecnología no está disponible en rata.

En conclusión, las técnicas más utilizadas para identificar las CGRs son el trazado (**Figura 9A, C**) y la inmunodetección de Brn3a (**Figura 9B, D**). Ambas tienen sus ventajas e inconvenientes. El trazado nos informa tanto de las CGRs que están vivas como de aquellas que mantienen su transporte axonal, ya que el FG se transporta activamente, sin embargo, si las retinas se marcan antes de que ocurra la pérdida de CGRs, aparecen en la retina células de microglia transcelularmente marcadas con el trazador (Thanos et al., 1992a; Köbbert et al., 2000) lo que impide el conteo automático y éste ha de realizarse manualmente (Peinado-Ramón et al., 1996; Salvador-Silva et al., 2000; Sobrado-Calvo et al., 2007; Nadal-Nicolás et al., 2009). Esto sucede porque las células de microglía fagocitan los cadáveres de las CGRs marcadas y que han muerto a causa de la lesión. El trazador fagocitado se acumula en sus fagolisosomas y aparecen en el tejido células de microglía marcadas.

En cuanto al Brn3a, la posibilidad de detectar las CGRs usando técnicas inmunohistofluorescentes tiene ciertas ventajas sobre la utilización de neurotrazadores ya que no hay que manipular el sistema antes de la disección de la retina evitando una posible alteración del sistema, además de reducir el tiempo experimental. Además, la expresión de Brn3a se mantiene en las CGRs que aun estando lesionadas, siguen vivas.

Por otra parte al inmunodetectar las CGRs, no se produce interferencia con las células de microglía transcelularmente marcadas (Nadal-Nicolás et al., 2009; Galindo-Romero et al., 2011). Por lo tanto, si bien la inmunodetección de Brn3a no nos informa del transporte axonal, como su expresión está limitada a las CGRs vivas, permite la cuantificación automática de éstas en situaciones patológicas y por tanto la realización de mapas de isodensidad. La combinación de ambos marcadores ha permitido por ejemplo describir que

en modelos de hipertensión ocular hay primero una pérdida de transporte axonal seguida de muerte de CGRs (Salinas-Navarro et al., 2010).

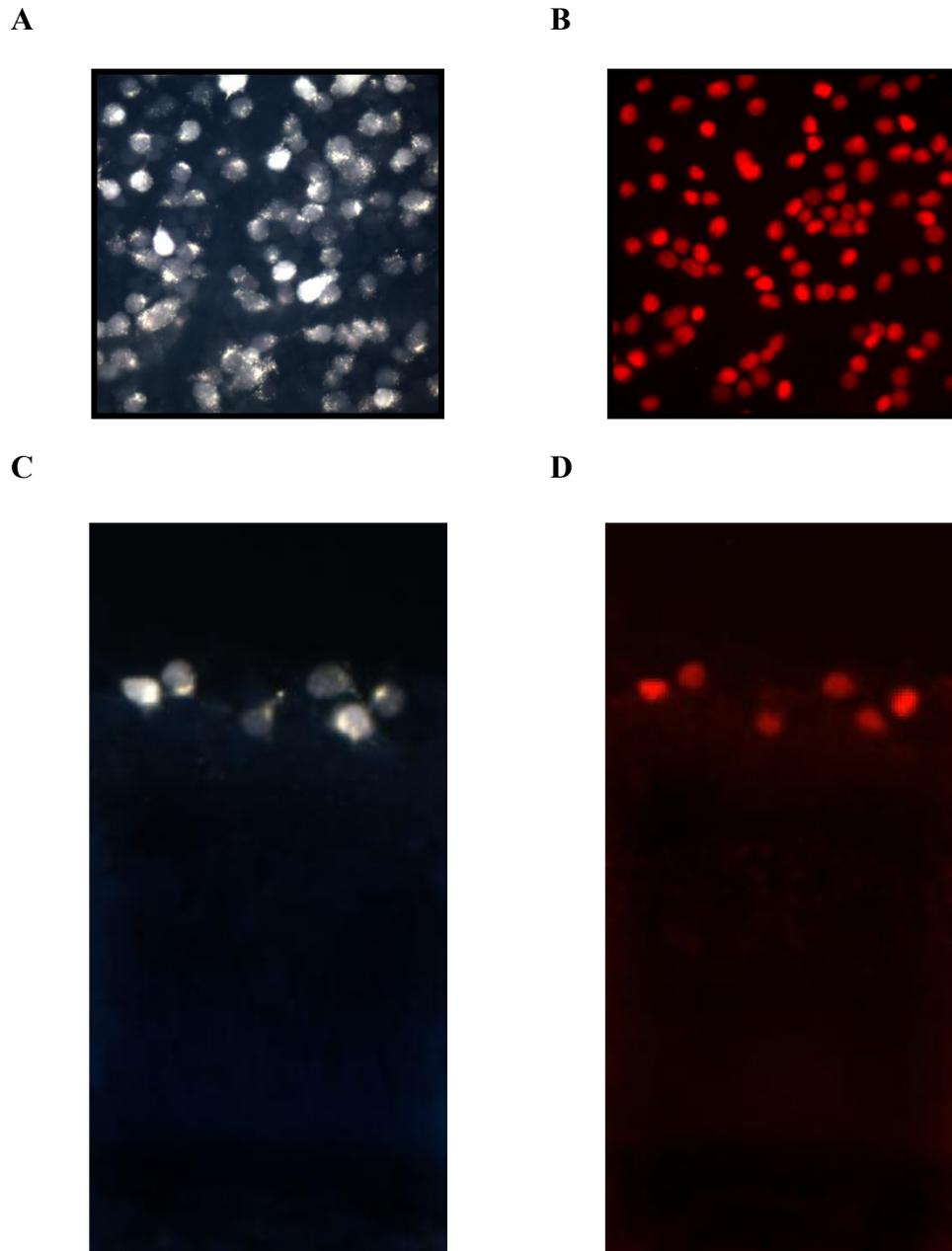


Figura 9: Identificación de CGRs

A-B: microfotografías de una retina de rata a plano en la que se ha trazado las CGRs con FG (**A**) e inmunodetectado con Brn3a (**B**). **C-D:** sección radial de una retina de rata en la que se ha trazado las CGRs con FG (**C**) e inmunodetectado con Brn3a (**D**). Tomadas de Nadal Nicolás et al., 2009

1.8.2 Cuantificación de las células ganglionares de la retina

La cuantificación del número de CGRs previamente identificadas es una herramienta esencial para evaluar los daños patológicos, los efectos farmacológicos y la neuroprotección, así como una mejor comprensión de los mecanismos de actuación de la enfermedad en el ojo y el nervio óptico.

La cuantificación de las CGRs se ha aplicado en roedores a diferentes modelos experimentales de enfermedades de retina, como: isquemia-reperfusión (Sellés-Navarro et al., 1996; Lam et al., 1997; Lafuente et al., 2001, 2002; Vidal-Sanz et al., 2007), aplastamiento parcial o total del nervio óptico (Yoles et al., 1999; Parrilla-Reverter et al., 2009a, b; Nadal-Nicolas 2009, 2012), axotomía de nervio óptico (Vidal-Sanz et al., 1988, Peinado-Ramón et al., 1996, Nadal-Nicolas et al., 2009, 2012, Galindo-Romero et al., 2011, Sánchez-Migallón, et al., 2011), inyección citotóxica (Vorwerk et al., 1996) o elevación crónica de la presión intraocular (Laquis et al., 1988, Sawada y Nevfeld 1999; Salinas-Navarro et al., 2009c, 2010, Vidal-Sanz et al., 2012).

1.8.2.1 Cuantificación indirecta de las CGRs contando el número de axones en el nervio óptico

En el NO de mamíferos se acepta que la totalidad de las fibras nerviosas pertenecen a los axones de las CGRs es decir, se asume que cada axón se corresponde con una CGR. De esta forma contando los axones en el NO, se estima la población de estas células en la retina, lo cual se puede realizar bajo el microscopio de luz mediante áreas de muestreo (Forrester y Peters, 1967; De Juan et al., 1978; Levkovitch-Verbin et al., 2002a, 2003; Aihara et al., 2003c) o cuantificando el número total de axones por métodos semiautomáticos de análisis de imagen (Quigley et al., 1987), o bajo el microscopio electrónico de transmisión (MET) donde se cuenta manualmente los axones de las áreas muestreadas (Chauhan et al., 2002) (como máximo se cuenta el 20% de los axones), a este nivel los axones pueden ser identificados por las vainas de mielina y microtúbulos. El número total de axones se obtiene por extrapolación. Estudios realizados muestran que los valores obtenidos por la MET son mayores que los obtenidos por microscopía de luz, esto puede ser debido a que hay axones que están o son más pequeños que el límite de resolución del microscopio de luz, además de que los axones no mielinizados son difíciles de distinguir. Este método requiere una gran experiencia del investigador en la identificación de los axones recubiertos de la vaina de mielina y es tedioso, además de ser indirecto y de no suministrar información del tamaño de los somas que pueden cambiar en condiciones patológicas. En los estudios realizados por Forrester et al., (1967) y De Juan et al., (1978) las estimaciones realizadas determinan que el número de CGRs por retina en rata, oscila entre 96.000 y 118.300 CGRs/retina

1.8.2.2 Cuantificación manual

La cuantificación del número de las CGRs se realiza por la extrapolación del conteo manual de una serie de áreas de muestreo establecidas previamente y que son estándar.

Estas áreas son representativas de la retina y engloban áreas de baja densidad y áreas de alta densidad para poder promediar el número de CGRs por unidad de superficie. El número de CGRs detectadas varía según el marcador utilizado y el grupo que lo ha realizado. Este método es más complicado y menos fidedigno en secciones transversales, aunque recientemente se han hecho aproximaciones estereológicas con buenos resultados (Fileta et al., 2008). En el estudio realizado por Selles-Navarro et al., 1996 el número medio de CGRs por mm^2 marcadas con Fluorogold en retinas control de ratas albinas Sprague-Dawley (SD) es alrededor de 2081 células. El método de contaje manual en retinas a plano se sigue usando para cuantificar el número de CGRs trazadas que sobreviven a una lesión axonal, ya que como hemos comentado más arriba, las células de microglía se marcan transcelularmente impidiendo la cuantificación automática.

1.8.2.3 Contaje automático

Mediante el contaje automático obtenemos el valor exacto de la población total de las CGRs (Dantias et al., 2002; Marco-Gomariz et al., 2006; Vidal-sanz et al., 2007; Nadal-Nicolás et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009a, b; García-Ayuso et al., 2010; Galindo-Romero et al., 2011). El contaje automático es un procedimiento reproducible, rápido y objetivo que permite el análisis de un gran número de retinas, evita la pérdida de información y sesgo en la estimación que se genera por el método de muestreo ya que el área muestreada normalmente es una pequeña porción de la retina (como máximo el 15% del total). A este sesgo del muestreo hay que sumar el hecho de que las CGRs se distribuyen heterogéneamente y que los efectos de algunas lesiones no son homogéneas en la retina, y por lo tanto el grado de supervivencia de las CGRs va a depender de la región de la retina analizada (Laquis et al., 1998, Woldemussie et al., 2001; Dantias et al., 2003b, Soto et al., 2008, Salinas-Navarro et al., 2009c, 2010). Por lo tanto, la cuantificación automática permite conocer con exactitud tanto el número de CGRs que mueren tras un insulto como que sobreviven tras un tratamiento. Esta metodología se usa para contar CGRs trazadas con FG ó su homólogo el OHSt ó inmunodetectadas con Brn3a. Los neurotrazadores transportados por difusión pasiva como el DTMR, además de acumularse en el soma y dendritas también lo hacen en los axones. En la zona central de la retina se agrupan los haces de axones impidiendo la visualización de los somas de las CGRs que hay debajo, imposibilitándose el contaje automático de las CGRs trazadas con DTMR.

En la **Figura 10** se muestra la población total de CGRs trazadas desde los CS o inmunodetectadas en rata y ratón albinos y pigmentados (Salinas-Navarro et al., 2009a, b, Galindo-Romero et al., 2011, 2013b, Nadal Nicolás et al., 2009, 2012)

También se ha realizado el contaje *in vivo* con el oftalmoscopio de escaneado láser (Higashide et al., 2006; Kawaguchi et al., 2006) pero las CGRs deben estar previamente marcadas, y este método también es aproximativo pues únicamente estudia la región central.

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

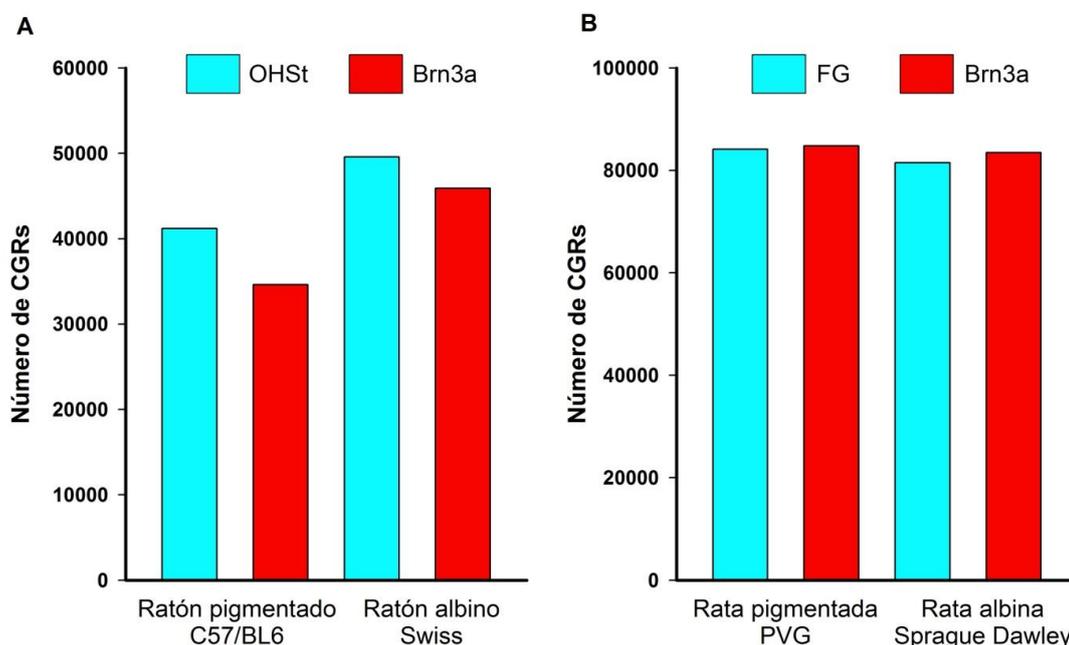


Figura 10: Población media de células ganglionares de la retina en ratón (A) y rata (B) trazadas desde los colículos superiores e inmunodetectadas con Brn3a en animales control albinos y pigmentados.

En ratón (A), el trazador utilizado es el metanosulfonato de Hidroxistilbamidina (OHSt) y en rata (B) su análogo fluorogold (FG). En ratón, la población de CGRs detectada por trazado desde los CS es mayor que la que expresa Brn3a, mientras en rata ambas poblaciones son similares. Esto es así porque en ratón el Brn3a se expresa en un 85,5% de la población total de CGRs mientras que en rata en un 92,2%. Además, estos datos muestran que en ratón albino la población de CGRs es mayor que en ratón pigmentado mientras que en rata es al revés. Datos tomados de Salinas-Navarro et al., 2009a, b; Nadal-Nicolás et al., 2009, 2102; Galindo-Romero et al., 2011,2013b.

1.8.3 Distribución de las células ganglionares de la retina

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

Para la construcción de mapas de densidad a partir de contajes manuales, se calcula la densidad de las áreas de muestreo con posición conocida dentro de la retina, situadas en regiones centrales, medias y periféricas, ya que la distribución de las CGRs no es homogénea en toda la retina sino que responde a un gradiente centro periferia, y estos valores se representan en un mapa de densidad. Pero este método es lento y aproximativo ya que sólo se muestrea una pequeña porción de la retina, además en muchas lesiones la pérdida de CGRs no es uniforme por toda la retina, por lo que el muestreo genera una pérdida de información. Cuanto mayor es el número de las áreas de muestreo y menor es su tamaño, más preciso es el mapa de densidad.

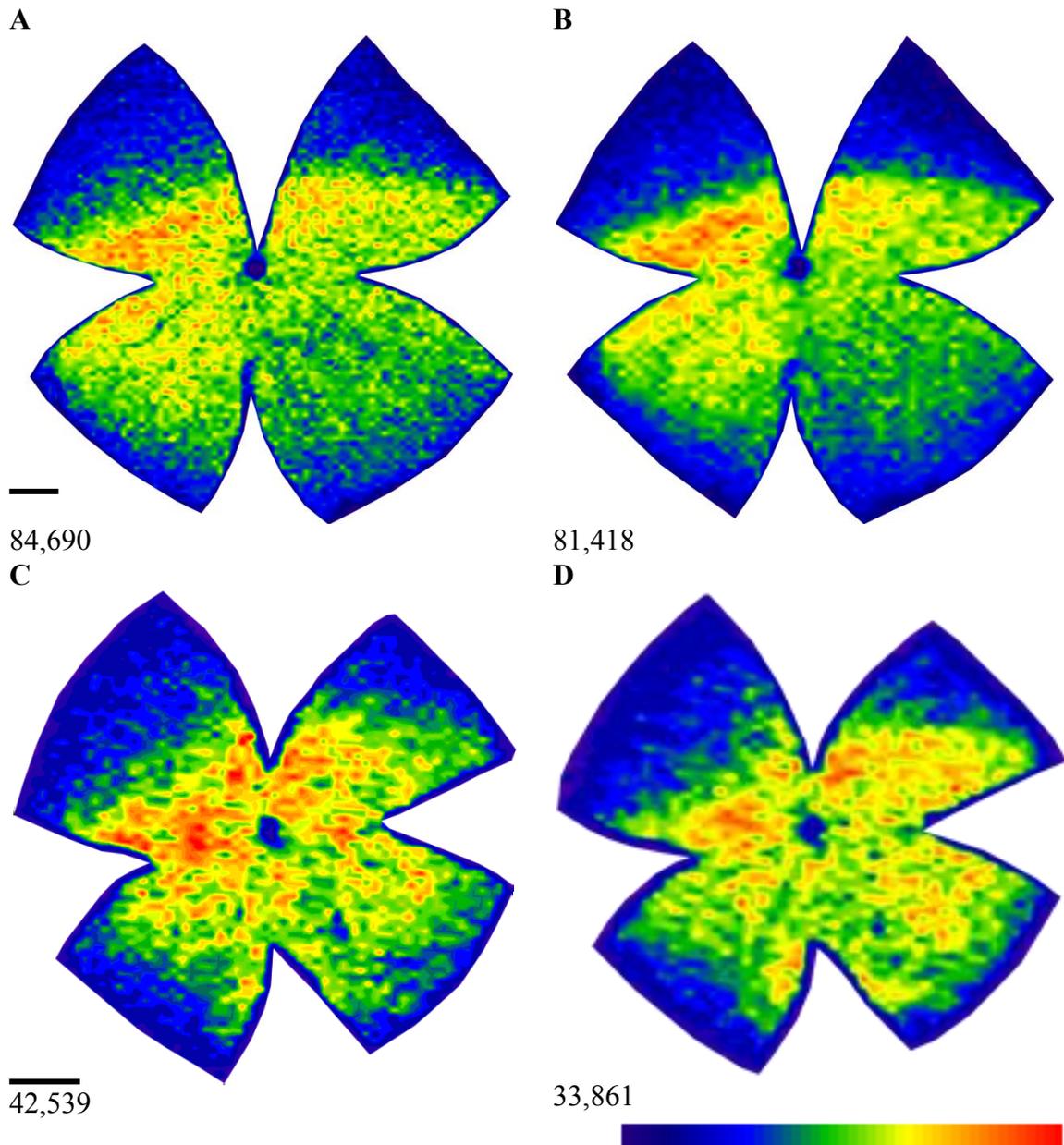


Figura 11: Distribución de CGRs en rata y ratón.

A-B: Mapas de isodensidad correspondientes a la misma retina de rata albina en la que se representa la distribución de las CGRs trazadas con FG desde los CS (**A**) o inmunodetectadas con Brn3a (**B**). **C-D** Mapas de isodensidad correspondientes a la misma retina de ratón pigmentado en la que se representa la distribución de las CGRs trazadas con OHSt desde los CS (**C**) o inmunodetectadas con Brn3a (**D**). Debajo de cada mapa se muestra el número de CGRs representadas en cada uno de ellos. Podemos ver que en ambas especies e identificando las CGRs usando trazadores o inmunodetección de Brn3a, las CGRs no se distribuyen homogéneamente por toda la retina. La densidad de CGRs es mayor en la hemirretina superior, a lo largo del eje naso temporal. Estos mapas se generan en base a la densidad de CGRs en cada una de las divisiones de cada fotografía individual que compone el fotomontaje (154 fotos en ratón, 144 en rata), y se asigna a cada densidad un código de color que va desde 0 (azul) a 3.500 –rata- o 4.800 –ratón- o más (rojo) CGRs/mm² (**D**). Polo superior arriba y temporal a la izquierda en todos los mapas. Barras de tamaño: 1 mm. Imágenes cedidas por F. Nadal-Nicolás (**A,B**) y C. Galindo Romero (**C-D**).

El método automático proporciona una distribución detallada y precisa de todas las CGR, representada por mapas de isodensidad (**Figura 11**), ya que trabajamos con muchas áreas de pequeño tamaño que cubren toda la superficie de la retina calculando automáticamente su densidad, con este método podemos detectar pequeñas variaciones en la densidad. Es un método exacto y rápido que permite el análisis de un número grande de retinas y así valorar la variabilidad entre individuos. Podemos estudiar detalladamente la distribución de las CGRs en retinas control (**Figura 11**) y después de diferentes patologías, así como de las que sobreviven después de un tratamiento. (Salinas-Navarro et al., 2009c, 2010; Nadal-Nicolás et al., 2009; Galindo-Romero et al., 2011, 2013b; García-Ayuso et al., 2010; Sánchez-Migallón et al., 2011). Hay que señalar que en los estudios de distribución de las CGRs es muy importante la orientación correcta de la retina ya que si no obtendremos datos erróneos.

1.9 Modelos de lesión de las células ganglionares de la retina.

Los modelos más frecuentemente utilizados y caracterizados de muerte de CGRs son:

1. **Isquemia transitoria de la retina:** se puede inducir bien por un aumento de la presión intraocular por encima de valores sistólicos (Selles-Navarro et al., 1996) o bien mediante la ligadura selectiva de los vasos oftálmicos (Lafuente et al., 1996, 2002). En ambos casos la muerte de las células ganglionares está relacionada tanto con el período de isquemia transitoria como con el intervalo de supervivencia.
2. **Elevación transitoria de la presión intraocular:** se realiza el sellado de la vía de drenaje del humor acuoso cauterizando con láser las venas episclerales y perilimbaires y la malla trabecular. La presión elevada se mantiene unas tres semanas, con un pico a las 12 horas y después desciende a niveles normales. Se ha visto que esta lesión induce muerte de tipo sectorial en las CGRs (Salinas-Navarro et al., 2009c, 2010, Vidal-Sanz, et al., 2012; Agudo-Barriuso et al., 2013)
3. **Axotomía:** el corte o aplastamiento del nervio óptico produce una axotomía en la CGRs. Esta lesión (Beerkelar et al., 1994) produce una interrupción de los axones de las CGR, provocando una degeneración retrograda axonal e induciendo la muerte de las CGRs que es homogénea en toda la retina (Villegas-Pérez et al., 1993; Berkelar et al., 1994; García-Valenzuela et al., 1994; Manssour-Robaey et al., 1994; Peinado-Ramón et al., 1996; Nadal-Nicolás et al., 2009; Parrilla-Reverter et al., 2009a; Galindo-Romero et al., 2011). Se realiza cortando o aplastando el nervio óptico habiendo abierto previamente la vaina que contiene los vasos sanguíneos para evitar la isquemia. La muerte de las CGR es mayor y más rápida cuanto más cerca del globo ocular se realiza la axotomía (Villegas- Pérez 1993). Así la sección a 0,5 mm del ojo induce mayor porcentaje de muerte que la sección a 3mm, cuando se comparan periodos de supervivencia iguales. (Villegas-Pérez et al., 1988; Villegas-Pérez et al., 1993). Los estudios de dicho modelo en la rata adulta han permitido conocer que dicha lesión induce una fase de muerte rápida durante las dos semanas

siguientes a la sección del NO, en la que se pierde el 80% de la población de las células ganglionares y posteriormente una fase de muerte más lenta que afecta a las neuronas que sobreviven en la primera fase. En estudios realizados en rata y ratón adultos seccionando el NO a 0,5 mm del globo ocular, se ha observado que la muerte de CGRs aparece antes cuando éstas se identifican por su expresión de Brn3a que cuando se marcan con Fluorogold (Nadal-Nicolás et al., 2009, Galindo-Romero et al., 2011), esto creemos que se debe a la distinta naturaleza de ambos marcadores, ya que el primero es un marcador endógeno cuya expresión desaparece al morir la neurona y el segundo es un marcador exógeno que sólo desaparece del tejido cuando la CGRs es fagocitada por la microglía (Figura 12).

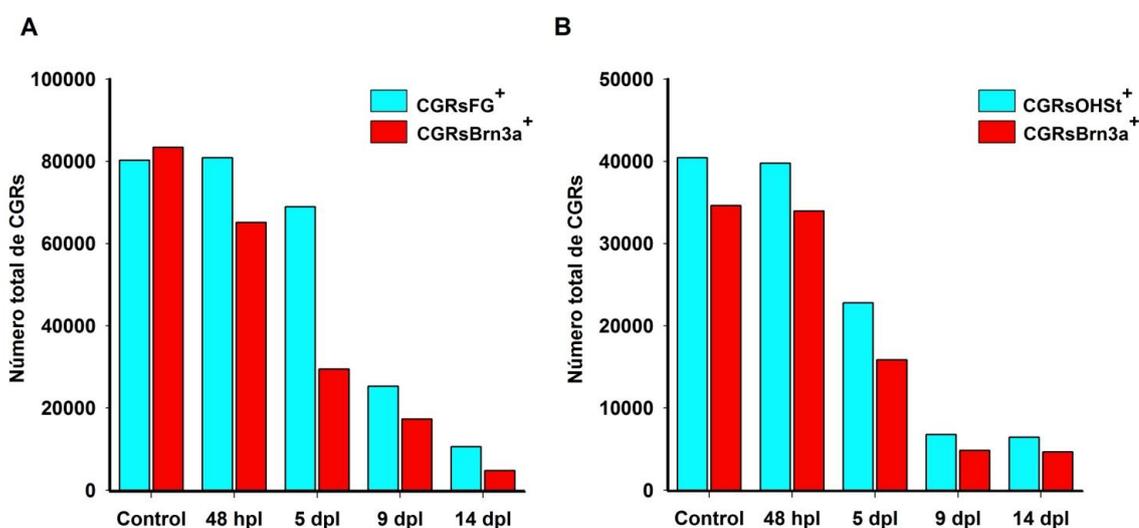


Figura 12: Curso temporal de la pérdida de las células ganglionares de la retina después de la axotomía intraorbitaria del nervio óptico en rata (A) y ratón (B)

Número total de células ganglionares de la retina trazadas (FG u OHSt) e inmunodetectadas (Brn3a) que sobreviven a diferentes tiempos tras la axotomía del nervio óptico en rata (A) y ratón (B). hpl: horas post-lesión, dpl: días post-lesión. Datos tomados de Nadal-Nicolás et al., 2009 y Galindo-Romero et al., 2011.

Como se ha explicado anteriormente, la cuantificación automática permite la realización de mapas de isodensidad que representan la distribución de las CGRs. Esta metodología también puede aplicarse a retinas lesionadas en las que las CGRs han sido inmunodetectadas y así conocer la topografía de las CGRs supervivientes (Figura 13).

Como hemos visto, el curso temporal de la degeneración de las CGRs inducido por lesión axonal se ha caracterizado en profundidad en rata (Nadal et al., 2009; Sanchez-Migallón et al., 2011) y en ratón (Galindo-Romero et al., 2011, 2013b). Una de las ventajas del ratón, frente a la rata, es que para éste existen muchos animales transgénicos (que expresan una proteína exógena) y knock-outs (que no expresan una determinada proteína) lo que permite analizar la función que el exceso o la pérdida de una proteína tiene en una determinada patología. Este hecho hace que sea de gran interés trabajar en ratones.

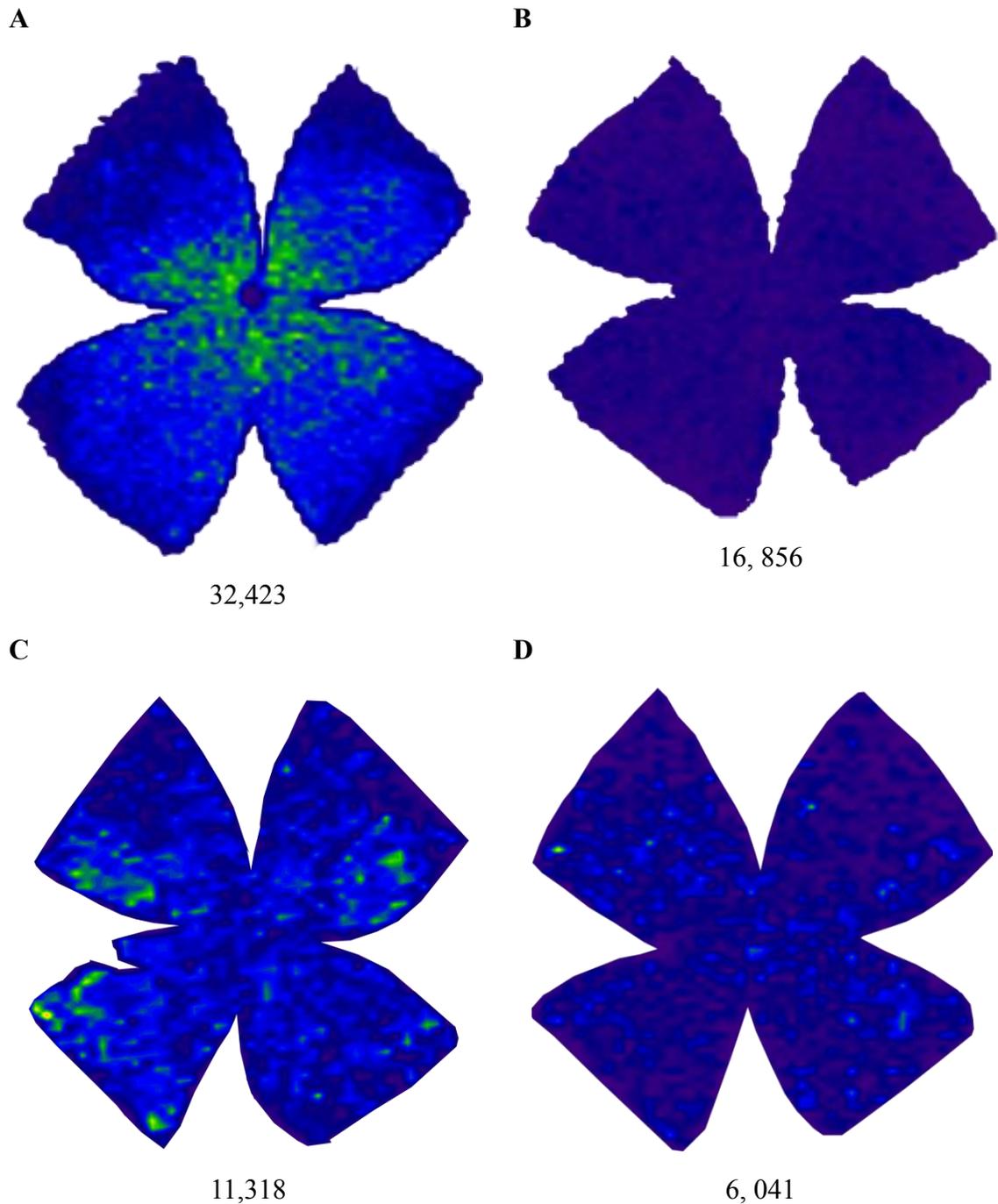


Figura 13: La axotomía produce la muerte difusa de CGRs en rata y ratón.

A-B: Mapas de isodensidad en los que se observa la distribución de las CGRs que sobreviven a 7 (**A**) y 14 (**B**) días tras la axotomía en rata. **C-D:** Mapas de isodensidad en los que se observa la distribución de las CGRs que sobreviven a 7 (**C**) y 14 (**D**) días tras la axotomía en ratón.

Debajo de cada mapa se muestra el número de CGRs-Brn3a⁺ contadas en la retina desde la cual se generó el mismo. La escala de color y la barra de tamaño son las mismas que en la figura 11. **A-B:** Imágenes cedidas por F. Nadal-Nicolás. **C-D:** imágenes cedidas por C. Galindo Romero.

En el trabajo experimental de esta tesis, hemos utilizado técnicas neuroanatómicas modernas que nos permiten identificar, cuantificar y mapear células ganglionares de la retina del ratón albino adulto. Hemos utilizado un modelo de lesión conocido (la sección intraorbitaria del nervio óptico en ratones albinos adultos) para investigar por una parte las respuestas de la población de CGRs a la atoxomía simple y a la axotomía e implante de injerto de nervio periférico. Esto permite examinar si los injertos de nervio periférico tienen un efecto neuroprotector sobre la población de CGRs axotomizadas.

Además hemos examinado también la capacidad de regeneración axonal de las CGRs en estos injertos de nervio periférico apuestos al muñón ocular del nervio óptico seccionado intraorbitalmente, bien mediante la utilización de microsuturas clásicas o bien mediante la utilización de un pegamento de fibrina (Tissucol). La supervivencia (Robinson y Madison, 2004; Galindo-Romero et al., 2013b) y la capacidad de regeneración axonal se había investigado en ratones pigmentados (Robinson y Madison, 2004) pero no había sido estudiada previamente con detalle utilizando las técnicas modernas de cuantificación y distribución espacial en la retina (mapeo) con las que contamos en la actualidad en ratones albinos. Por último la existencia de marcadores moleculares fiables (anticuerpos antimelanopsina) que identifican una de las subpoblaciones de las CGR, nos permite investigar en detalle las mismas preguntas formuladas anteriormente en esta pequeña población de CGRs melanopsínicas en el ratón albino.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es analizar el efecto que tiene el implante de un injerto de nervio periférico (mediante sutura o aposición con Tissucol) en el muñón ocular del nervio óptico seccionado, para investigar en ratones albinos adultos la supervivencia y regeneración de las células ganglionares de la retina en general y de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipCGRs) en particular.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Injerto de nervio periférico con Tissucol.

1. Cuantificación y distribución espacial de células ganglionares de la retina que regeneran y sobreviven tras injerto de nervio periférico con Tissucol.
2. Cuantificación y distribución espacial de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles que regeneran y sobreviven tras injerto de nervio periférico con Tissucol.

2.2.2 Injerto de nervio periférico con sutura.

1. Cuantificación y distribución espacial de células ganglionares de la retina que regeneran y sobreviven tras injerto de nervio periférico con sutura.
2. Cuantificación y distribución espacial de células ganglionares intrínsecamente fotosensibles que regeneran y sobreviven tras injerto de nervio periférico con sutura.

2.2.3 Comparación de ambos modelos de regeneración.

Se realizará una comparación entre los 2 tipos de aposición del injerto que a su vez serán comparados con los controles (sección del nervio óptico sin injerto) para determinar si:

1. El injerto de nervio periférico tiene un efecto en la supervivencia de las células ganglionares y células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (comparación grupo injerto Tissucol con grupo axotomía, grupo injerto sutura con grupo axotomía).
2. Existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células ganglionares de la retina que regeneran y que sobreviven cuando se emplean adhesivos biológicos cuando se utilizan microsuturas clásicas.
3. Existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles que regeneran y que sobreviven en ambos modelos de aposición del injerto (adhesivos biológico vs microsutura).

MATERIAL Y MÉTODOS

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales de Experimentación y anestesia

Los animales fueron tratados según la normativa Europea (Directiva 86/609/CEE) y nacional (RD 1201 /2005) vigente sobre la protección de los animales que son utilizados para la experimentación y otros fines científicos y la Ley 32/2007 para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; además, se siguieron las directrices de la asociación para la investigación en visión y oftalmología (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO). Para este estudio se han utilizado 35 ratones machos adultos albinos de la estirpe Swiss (Charles River, Lleida, Spain), de un peso aproximado de 35-40 gramos. Los animales se alimentaban “ad libitum” y fueron mantenidos en el Servicio de animales de experimentación de la Universidad de Murcia, en habitaciones con control de temperatura ambiente (23-24°C) y con ciclos de luz oscuridad de 12 horas.

Todas las manipulaciones quirúrgicas se efectuaron bajo anestesia general, inducida por la inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla de Ketamina (70 mg/kg de peso corporal; Ketolar 5% Pfizer, Alcobendas. Madrid, España) y Xilacina (10 mg/kg de peso corporal; Rompur 2%, Bayer, Kiel, Alemania) en 0,1 ml de suero salino estéril al 0,9%. Las manipulaciones experimentales se realizaron en condiciones no estériles, pero sí de minuciosa limpieza, especialmente de todo el instrumental microquirúrgico. 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.

En el postoperatorio inmediato a los animales se les aplicó por vía tópica en la cornea un ungüento oftalmológico con Tobramicina (Tobrex, Alcon-Cusí, S.A. El Mosnou, Barcelona, España) para prevenir la desecación y lesión corneal. Los animales fueron devueltos a la 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 durante un período de 28 días, tras el cual se realizó el marcaje retrógrado de las células ganglionares de la retina, siendo sacrificados al tercer día del marcaje.

Los animales se sacrificaron con una sobredosis letal de una solución de pentobarbital sódico al 20% (Dolethol, Vetoquinol, S.A., Especialidades Veterinarias, Alcobendas, Madrid. España) inyectado ip (0,5- 1 ml).

3.2 Manipulaciones Quirúrgicas

3.2.1 Abordaje y obtención del injerto autólogo de nervio periférico

Con el animal en posición decúbito prono, y previo rasurado del área posterior del muslo, se realizó una incisión longitudinal desde la articulación de la cadera hasta la articulación

de la rodilla, identificando, mediante disección roma el músculo bíceps femoral. Se seccionó la inserción de dicho músculo en la articulación de la rodilla derecha y se rechazó lateralmente, con lo que se obtuvo una perfecta visualización del nervio ciático y de sus ramas desde la escotadura ciática hasta el hueco poplíteo.

En el ratón, el nervio ciático común sale de la pelvis como un tronco único el cual a lo largo de su trayecto se irá dividiendo en sus tres ramas: nervio peroneo, nervio sural y el nervio tibial. En nuestros grupos experimentales se ha empleado el nervio tibial como segmento autólogo.

Tras la identificación del nervio, se procedía a su disección roma lo cual nos proporcionaba un injerto en una extensión de 2 cm. Una vez obtenido el injerto se reinsertaba el músculo bíceps femoral y se suturaba la piel con seda de 6/0. El injerto extraído, se colocaba en una placa de Petri con suero salino estéril (CINa al 0,9%) hasta su posterior aposición al muñón del nervio óptico izquierdo.

3.2.2 Amputación intraorbitaria del nervio óptico

Los ratones se colocaron en decúbito prono con la zona apical de la cabeza rasurada y sujeta mediante un sujetacabezas diseñada al efecto. Se realizó una incisión longitudinal en la línea media de la cabeza, desde la región nasal hasta la inserción de los músculos occipitales. Posteriormente se realizó la disección del plano subcutáneo hasta visualizar el reborde orbitario superior. A continuación se realizó una incisión siguiendo la dirección del reborde orbitario superior de la órbita izquierda hasta la fascia del músculo temporal. La tracción con punto de sutura de seda 6/0 del reborde supraorbitario facilita la exposición de la zona superior de la órbita, siempre con precaución de que no se lleve a cabo una isquemia de la retina a consecuencia de la compresión de los vasos retinianos. Posteriormente se realizó la desinserción de los músculos recto y oblicuo superior, se tracciona de los mismos mediante un punto de sutura de seda 6/0 con el fin de obtener una adecuada exposición de la región posterior del globo ocular y fundamentalmente de la salida del nervio óptico izquierdo.

Acto seguido se realizó la apertura longitudinal de la vaina dural que recubre el nervio óptico en su región superior con el fin de evitar lesionar los vasos retinianos que en el ratón discurren en la región inferonasal de la misma (Janes y Bounds, 1955; Forrester y Peters, 1967). Finalmente se seccionaba el NO lo más cerca posible del globo ocular izquierdo (**Figura 14**).

3.2.3 Aposición del segmento de nervio periférico al disco óptico

La aposición de uno de los extremos del injerto de nervio periférico al muñón del nervio óptico. Se realizó de dos formas diferentes, según los diferentes grupos experimentales (**Figura 14**).

En uno de los grupos experimentales, se utilizaron tres hilos de sutura monofilamento irreabsorbible de 10/0 (Dafilon, Braun, Germany) que se anclaron por un lado en el

perineuro del injerto y por otro lado en el tejido periescleral alrededor del disco óptico en tres puntos equidistantes con precaución de no lesionar la vascularización retiniana localizada en la región inferonasal.

En el otro grupo experimental se empleó el adhesivo de fibrina, y se procedió de la siguiente manera. Se colocó el extremo del injerto encima del muñón del nervio óptico, de modo que ambas superficies quedasen enfrentadas sin que se interpusiera el perineuro entre ellas, y con una micropipeta se aplicó una gota del adhesivo de fibrina para que ambas superficies quedasen apuestas.

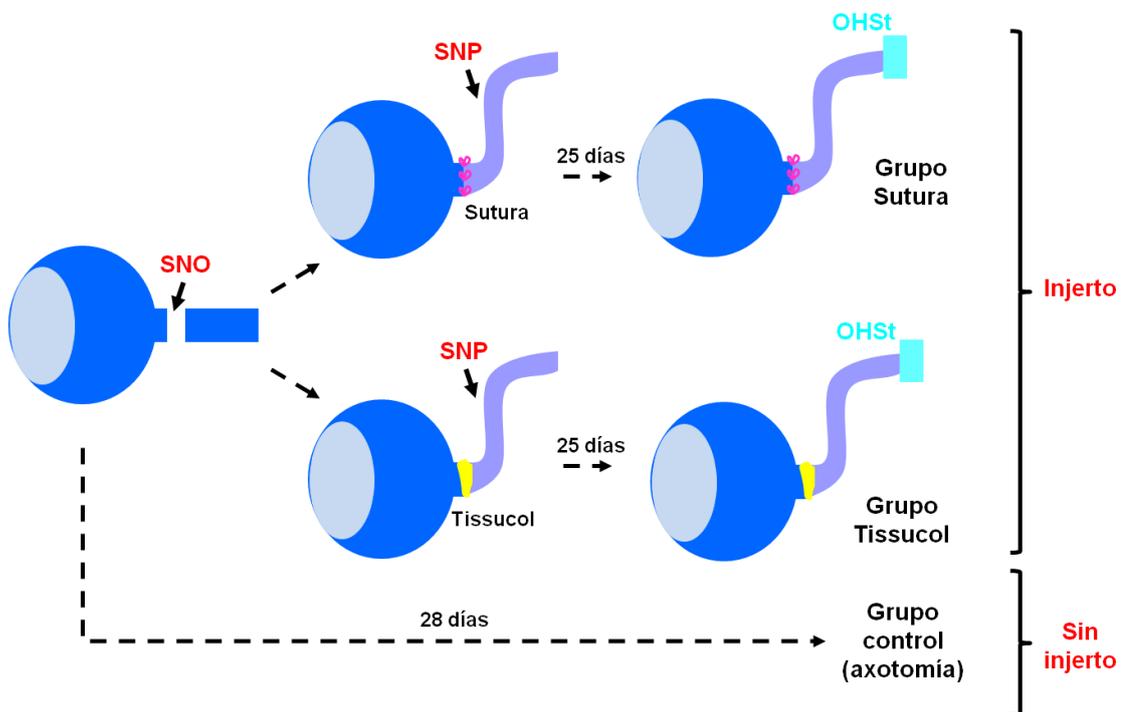


Figura 14: Cirugía.

Esquema que ilustra la sección intraorbitaria del NO (SNO) y la aposición al muñón ocular del NO a uno de los cabos de un segmento de nervio periférico (SNP). Esta aposición se aseguró en unos animales con puntos de sutura (arriba) y en otros con adhesivos de fibrina (Tissucol, abajo). A los 25 días se trazaron las CGRs que habían regenerado en los grupos injertados aplicando OHSt al extremo distal del SNP. En todos los grupos, los animales se sacrificaron 28 días después de haber realizado la SNO.

El extremo libre del injerto de nervio periférico se protegía colocándolo en un canal formado a lo largo del músculo temporal. Se debía prestar especial atención a la zona de inflexión del injerto a su salida de la órbita para que no quedase angulado o presionado lo cual podía dificultar la regeneración y alterar los resultados. Finalmente se reconstruía la órbita y se suturaba la piel con sutura continua de seda 6/0.

Una vez finalizada la manipulación quirúrgica se procedía a examinar el fondo de ojo para descartar la lesión de la circulación retiniana. Se colocaba un portaobjetos de vidrio sobre

la córnea del ojo operado para evaluar el fondo de ojo (funduscopia directa) con el microscopio operatorio. En caso de que hubiese una lesión de la circulación retiniana o que tras producirse un vasoespasma no se recuperara la circulación tras un período de 20 minutos desde la intervención, se desechaba el animal y no se incluía en los grupos experimentales.

3.3 Preparación y Aplicación del adhesivo de fibrina Tissucol

El Tissucol es un sistema adhesivo de fibrina de dos componentes congelado, tratado por vapor. Cada estuche de Tissucol contiene los siguientes componentes:

- Solución de Tissucol: 1 ml de solución contiene: Proteína total (100-130 mg), Proteína coagulable (75-115 mg); compuesta de fibrinógeno (70-110mg) y Plasmafibronectina(2-9 mg Factor XIII, Plasminógeno, Aprotinina Bovina).
- Solución de Trombina: 1 ml de solución contiene: trombina humana, cloruro cálcico.

La conservación del Tissucol se debe realizar en congelador a -18°C , por lo que aproximadamente media hora antes de comenzar las manipulaciones quirúrgicas se extraía del congelador para que se realizase el proceso de descongelación del mismo y pudiese ser empleado como método de aposición del nervio periférico sobre el muñón del nervio óptico.

Para su aplicación se empleó una micropipeta de 2-20 μl , de tal manera que se cargaba la micropipeta con el Tissucol y a través de ella se aplicaba una gota de 2 μl de Tissucol una vez que este había adquirido una consistencia adecuada, se esperaba un par de minutos a que se produjese la solidificación del producto y posteriormente se procedía a la protección del injerto por medio del músculo temporal y cierre de la órbita y piel tal y como hemos descrito en el apartado anterior.

3.4 Marcaje retrógrado de las células ganglionares de la retina

El trazado de la población de células ganglionares de la retina (CGR) es necesario para poder identificar y cuantificar posteriormente las CGRs que tienen un axón competente después de una lesión. Para identificar las CGRs en ratón hemos aplicado el trazador neuronal fluorescente hidroxistilbamidina metano-sulfonato (OHSt, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) disuelto al 10% en 10% dimetil-sulfóxido (DMSO)-suero salino en el extremo distal del nervio tibial unido al nervio óptico a través de sutura o pegamento Tissucol de acuerdo con las técnicas previamente descritas (Vidal-Sanz et al., 1988; Villegas-Perez et al., 1988; Marco-Gomariz et al., 2006; Nadal-Nicolas et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009) (**Figura 14**). Este trazador produce un marcaje fiable y reproducible y es muy eficaz para su utilización en el sistema visual (Salinas-Navarro et al., 2009). El OHSt es captado por los terminales axonales de las CGRs y transportado activa (Schumed et al., 1986, 1989; Wessendorf 1991) y retrógradamente hasta el soma celular, donde se acumula, no difundiendo transcelularmente (Schumed et al., 1986). El OHSt acumulado en el soma de las CGRs se puede observar en el microscopio de

fluorescencia con el filtro de luz adecuada y permite diferenciar las CGRs de otros tipos de neuronas que están presentes en la misma capa de la retina y que no se trazan con OHSt como son las células amacrinas desplazadas y en nuestro diseño experimental, identificar las CGRs que hayan regenerado a través del injerto de nervio periférico. Para la aplicación del trazador se realizó la extirpación de los puntos de sutura localizados en la región superior del cráneo, se accedió al implante de nervio tibial y se aplicó en el muñón del extremo distal (opuesto al muñón ocular) de dichos nervios una pequeña porción de gel (Espingostan Film; Ferrosan A/S, Denmark) previamente empapado con el OHSt al 10%. Finalmente se sutura la piel del animal con seda 6/0. Tres días después del marcaje el OHSt ya ha llegado a las CGRs y el animal es procesado.

3.5 Procesado Histológico

3.5.1 Perfusión de animales

Se administra por vía i.p. una sobredosis de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal, Vetoquinol S. A., Lure, Francia) y se comprueba que los ratones son insensibles a estímulos dolorosos. Tras esta comprobación se realizó una esternotomía media para exponer corazón y grandes vasos y se introdujo una aguja de insulina en la aorta ascendente a través del ventrículo izquierdo, para perfundir con aproximadamente unos 50 mL de suero salino y lavar el contenido hemático de los vasos; simultáneamente a la inserción de la aguja, se practicó un corte en la orejuela de la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y del líquido de perfusión. A continuación se perfundió con aproximadamente 70 mL de solución de paraformaldehído (PF) al 4% en tampón fosfato 0,1 M a 4°C de temperatura.

3.5.2 Disección y procesado histológico de las retinas

Tras la perfusión del animal se extrajeron ambos globos oculares, colocándose un punto de sutura en el polo superior de los ojos del animal para poder identificar posteriormente la región superior de la retina. Para diferenciar los ojos derechos de los izquierdos la longitud del hilo de sutura era siempre mayor en los ojos izquierdos.

Una vez se enuclearon los globos oculares fueron post-fijados durante una hora en PF al 4%, a continuación se lavaron en tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M y se procedió a la disección de las retinas: En primer lugar se sujetaron los globos oculares con alfileres entomológicos a una base de cera de abeja en placas de Petri, posteriormente se realizó una incisión circular siguiendo el borde esclerocorneal y se retiró el casquete corneal, el cristalino y el iris quedando la “copa” oftálmica, constituida por tres capas: esclera, coroides y retina. Para la extracción de la retina se realizaron cuatro cortes radiales de todas las capas de la copa oftálmica, separados entre ellos 90°, siendo el más profundo de los cortes el que indicaba el polo superior de la retina, quedando de esta manera divididos en cuatro cuadrantes (temporal superior, temporal inferior, nasal superior y nasal inferior). Una vez llegado a este punto se puede comenzar a realizar la disección atraumática de la retina y separarla de la coroides y de la esclera quedando la retina unida a la copa oftálmica

exclusivamente por los axones que abandonan la retina por el disco óptico. Esta unión se corta con unas microtijeras y a continuación, con la ayuda de un pincel, se coloca la retina a plano sobre un papel de filtro Whatman nº1 (Whatman Internacional Ltd. Maidstone, England) al que quedaba adherida por su superficie vítrea por espacio de una hora inmersa en la misma solución fijadora de paraformaldehído al 4%. Posteriormente, la retina se separaba del papel de filtro, se lavaba en PBS y se reaccionaba con diferentes técnicas de inmunohistofluorescencia (ver apartado 3.6). Por último, la retina se montaba colocando su cara vítrea hacia arriba sobre un portaobjetos y se limpiaba cuidadosamente de nuevo. Finalmente se cubría con medio de montaje (glicerol al 50% y p- fenilendiamina al 0,04% en tampón carbonato sódico 0,1M pH=9,0; Dodd et al., 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 Inmunohistofluorescencia

Para la detección del Brn3a y de la melanopsina, llevamos a cabo un protocolo de inmunohistofluorescencia que incluye tres etapas: permeabilización de la retina, incubación con el anticuerpo primario e incubación con el anticuerpo secundario.

En nuestro estudio se realizó la inmunodetección doble de Brn3a y melanopsina en todos los grupos experimentales por lo que se siguió el protocolo siguiente incubando a la vez los dos anticuerpos primarios y los dos anticuerpos secundarios.

1. **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 Tritón 100 (Tx; Tritón 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.
2. **Incubación con los anticuerpos primarios:** las retinas se incubaron en tampón de bloqueo (PBS conteniendo un 2% de Tx y un 10% de suero normal de burro- Normal Donkey Serum, NDS; Jackson ImmunoResearch Inc, Cambridge, Reino Unido) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo (2% Tx, 2% NDS en PBS) 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.
3. **Incubación con los anticuerpos secundarios:** Primero se incubaron las retinas en el tampón de bloqueo (2% Tx, 10% NDS en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó la incubación con el anticuerpo secundario diluido en 0,5% 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 sobre un portaobjetos, colocando su cara vítrea hacia arriba, la solución de montaje y un cubreobjetos.

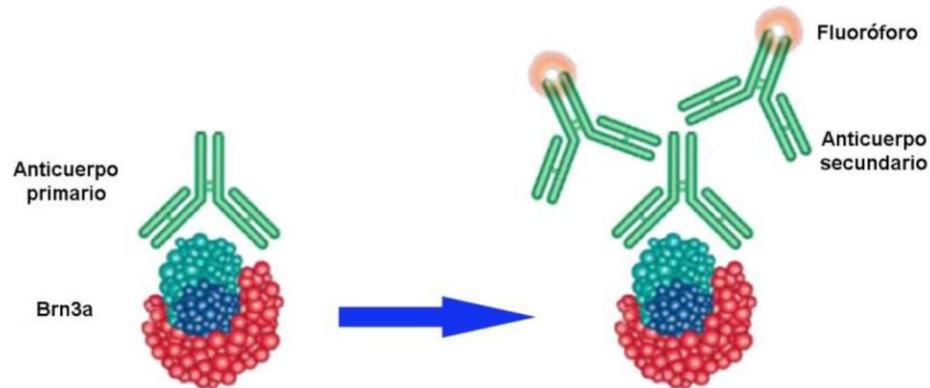


Figura 15: Esquema representativo del protocolo utilizado para detectar las células ganglionares de la retina por inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-Brn3a

El anticuerpo primario de cabra anti-Brn3a reconoce y se une de manera específica al antígeno (Brn3a) presente en los núcleos de las células ganglionares de la retina. En un segundo paso se detecta la parte conservada del anticuerpo primario con un anticuerpo secundario de burro que está acoplado a un fluoróforo que al excitarse emite fluorescencia roja o verde (Alexa 594 o alexa 488).

3.7 Anticuerpos y diluciones de trabajo

1. **Anticuerpos primarios:** Para la inmunodetección de las CGRs se utilizó un anticuerpo de cabra anti-Brn3a (goat anti-Brn3a, C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Alemania) que se diluyó 1:750 (Galindo-Romero et al., 2011). Las CGRs de estos animales ya habían sido trazados retrógradamente mediante el trazador neuronal OHSt. Para la inmunodetección de las ipCGRs se utilizó un anticuerpo de conejo anti-melanopsina (UF 006, Advanced Targeting Systems, UK) a una dilución de 1:5000.
2. **Anticuerpos secundarios:** Los anticuerpos secundarios (Molecular Probes, Invitrogen Inc, Madrid, España) fueron: i) para detectar el primario anti-Brn3a: burro anti-cabra Alexa Fluor 594 (donkey anti-goat Alexa 594) que emite fluorescencia roja ó burro anti-cabra Alexa Fluor 488 (donkey anti-goat Alexa 488) que emite fluorescencia verde, y ii) para detectar el primario anti-melanopsina: burro anti-conejo Alexa Fluor 594 (donkey anti-rabbit Alexa 594) que emite fluorescencia roja ó burro anti-conejo Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit Alexa 488) que emite fluorescencia verde. Todos se usaron a una dilución de 1:500.

3.8 Grupos experimentales

En la tabla 1 se muestran los diferentes grupos experimentales que realizamos para los dos modelos de regeneración axonal. En todos los animales se realizó la cirugía en el ojo izquierdo y se usaron los ojos derechos como controles.

	Grupos experimentales		
	SNO	Tissucol	Sutura
Cirugía	Sección nervio óptico	Sección nervio óptico e injerto segmento nervio periférico mediante Tissucol	Sección nervio óptico e injerto segmento nervio periférico mediante sutura
Trazado de CGRs	No	Si	
Detección de CGRs	Inmunodetección de Brn3a Inmunodetección de melanopsina		
Tamaño muestral	n=12	n=11	n=12

Tabla 1: Grupos experimentales

3.9 Análisis morfológico y morfométrico de las retinas

3.9.1 Procesado de imágenes

Todas las retinas montadas a plano se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico y de fluorescencia (Axioscop 2 plus, Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con tres filtros: el ultravioleta (BP 365/12, LP 397) que permite la observación de la fluorescencia blanca dorada del OHSt y del DAPI, el de rodamina (BP 546/12, LP 590) para observar la fluorescencia roja de los anticuerpos conjugados con Alexa-594 (Brn3a y RECA), y el de fluoresceína (BP 450/490, LP 515-565) que permite la observación de los anticuerpos conjugados con Alexa-488 (pNFH y NFH). El microscopio estaba también equipado con una cámara digital de alta resolución (ProgResTM c10, Jenoptik, Jena, Alemania) y una platina motorizada (ProScanTM H128 Series Motor Controller; Prior Scientific Instruments Ltd., Cambridge, Reino Unido) conectada a un sistema de análisis de imagen que permite capturar y grabar las imágenes (Image-Pro Plus 5.1 for Windows[®] Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EEUU) con un módulo de control de microscopio controlado por ordenador (Scope-Pro[®] 5.0 for Windows[®]; Media Cybernetics, Inc., Silver Springs, MD, EEUU).

Para realizar la reconstrucción y fotomontaje de las retinas montadas a plano, se realizó la adquisición secuencial de campos microscópicos contiguos, sin uniones ni solapamientos entre campos, siguiendo un patrón de muestreo en matriz de celdas regulares con un área total de muestreo preestablecida que cubría la superficie de la retina, usando un objetivo de

20 aumentos (Plan-Neofluar, 10x/0.30; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania), siguiendo métodos descritos previamente en el laboratorio y que son de uso rutinario (Marco-Gomariz et al., 2006; Nadal-Nicolás et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009a). Cada microfotografía fue enfocada manualmente antes de ser capturada y almacenada digitalmente dentro del programa de análisis de imagen Image-Pro Plus 5.1 for Windows®. Dependiendo del tamaño y orientación de cada retina en el portaobjetos se establecía un área de escaneo que cubriese completamente cada retina. Este área consistía en una matriz de m campos microscópicos verticales y n horizontales (m x n). El tamaño de cada campo de captura fue de 0,627 mm², y normalmente se tomaban 154 imágenes de cada retina. Todas las imágenes que componen una retina se guardaron en un archivo como imágenes de color de 24 bit, tras esto, las imágenes eran combinadas automáticamente en una sola imagen de alta resolución que reconstruye la retina montada a plano usando el programa IPP® para Windows® para su posterior estudio y análisis. En el fotografiado de retinas completas primero se adquirió la señal de OHSt (azul), después el Brn3a (rojo para el grupo de Tissucol y verde para el grupo de sutura) y por último la melanopsina (verde para el grupo de Tissucol y rojo para el grupo de sutura).

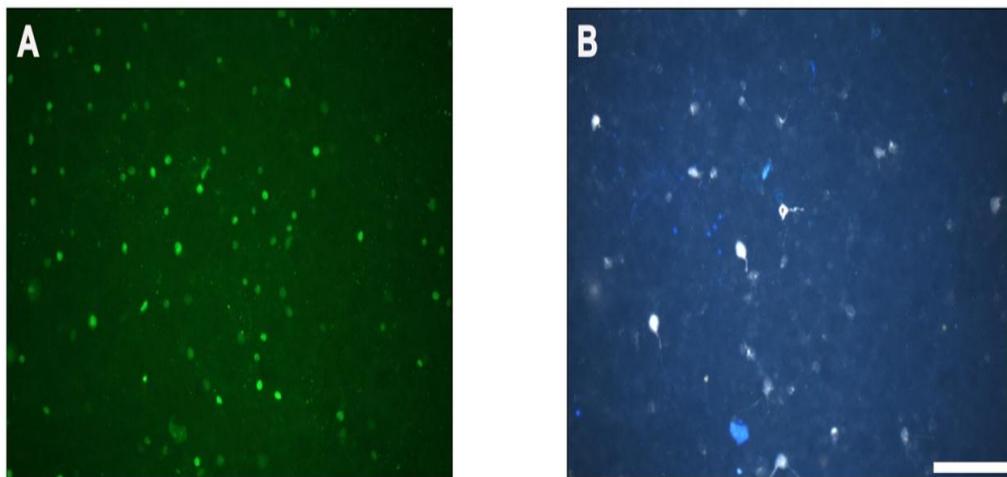


Figura 16: Microfotografías realizadas para la reconstrucción de los fotomontajes

Microfotografías de la misma área del mismo montaje global de una retina del grupo de axotomía adquiridas a 20x en las que podemos observar la señal del Brn3a (A) y OHSt (B). La adquisición secuencial de estas microfotografías y su posterior combinación automática nos permitía la reconstrucción de los fotomontajes de los montajes globales de las retinas. Barra: 150 μ m

3.9.1.1 Contaje automático de células ganglionares de la retina marcadas con OHSt

Las microfotografías tomadas de cada retina fueron procesadas individualmente por medio de una subrutina informática específica para el contaje de las CGRs en retinas a plano marcadas con FG (Salinas-Navarro et al., 2009a), desarrollada en el laboratorio, que automatiza tareas repetitivas mediante la programación del lenguaje de macros IPBasic del programa de análisis de imagen Image-Pro® Plus (IPP; Media Cybernetics, Inc., Silver

Spring, MD, EEUU). Así, aplicando una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada microfotografía se logra separar cada célula individualmente, de modo que el programa puede contar automáticamente las células de cada fotografía.

El proceso de transformación de las imágenes para el conteo de las CGRs se realizaba siguiendo varios pasos. En primer lugar, las imágenes fueron convertidas a escala de grises de 8-bit para descartar el exceso de información del color. En segundo lugar se eliminaron las aberraciones de iluminación causadas por la óptica del microscopio mediante el filtro de mejora del aplanado del programa IPP que elimina las variaciones de iluminación de fondo. Seguidamente se aumentó los bordes de las células utilizando el filtro espectro grande, el cual resalta las células teñidas de fluorescencia brillantes del fondo oscuro. Los pequeños artefactos y el ruido se quitaron mediante tres pasos del filtro de mejora de la mediana. Por último, los agrupamientos de células fueron separados con dos pasos por medio del filtro de separación del IPP, que primero erosiona los bordes de las células que se están tocando hasta que se separan y luego los vuelve a dilatar pero sin llegar a tocarse. Las células fueron contadas utilizando unos parámetros predeterminados para excluir objetos que fueran mayores de $300 \mu\text{m}^2$ ó menores de $7 \mu\text{m}^2$. Finalmente, el número de células contadas en cada fotografía se exportó a una hoja de cálculo de Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA), donde se guardaron para su análisis posterior.

3.9.1.2 Contaje automático de células ganglionares de la retina detectadas con Brn3a.

Al igual que para contar las CGRs marcadas con OHSt, las imágenes fueron procesadas por medio de un macro informático específico para el conteo de los núcleos de CGRs inmunodetectados con Brn3a en retinas completas, que ha sido puesto a punto recientemente en el laboratorio (Nadal-Nicolas et al., 2009; Galindo-Romero et al., 2011).

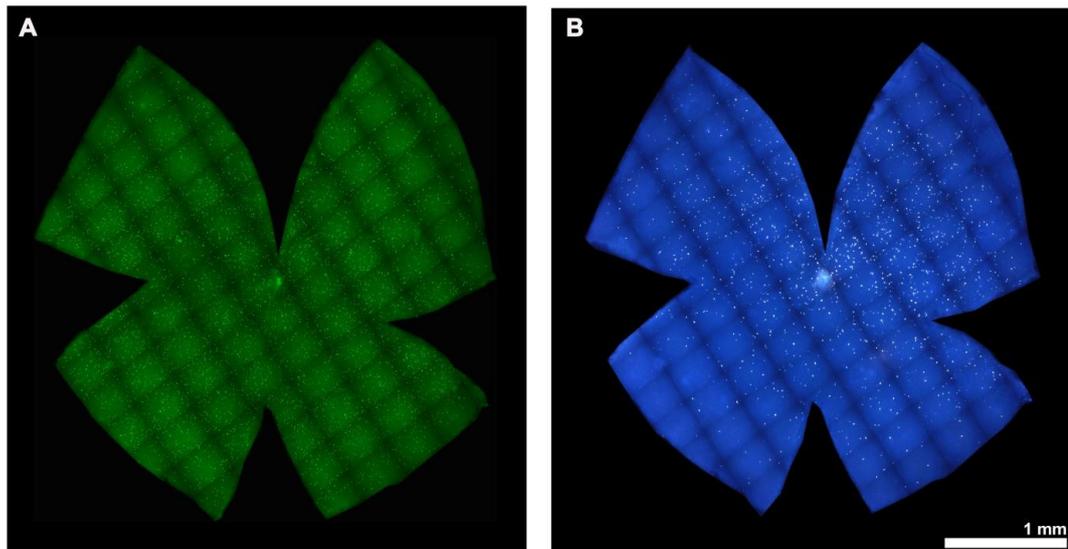


Figura 17: Reconstrucción de los fotomontajes

Fotomontaje de una retina lesionada en la que se ha inmunodetectado las células ganglionares de la retina con Brn3a (A) y trazado con OHSt (B). Barra =1 mm.

Las imágenes fueron procesadas usando una subrutina informática específica, automatizando las tareas repetitivas mediante la programación en IPBasic, 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, EEUU) para su análisis. Para contar el número de CGRs 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 el conteo de núcleos, 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 conteo (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 salvan para análisis posteriores. Ambas subrutinas han sido descritas en detalle recientemente (Nadal-Nicolás et al., 2009; Salinas-Navarro et al., 2009a).

3.9.1.3 Contaje automático de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles.

En primer lugar se colocó un punto en el centro del nervio óptico (NO), y dicha coordenada fue almacenada a fin de realizar una translación del origen al nervio óptico; Las imágenes son almacenadas como una matriz, donde el pixel (0, 0) corresponde al primer pixel del margen superior-izquierdo. Así, mediante la translación, las coordenadas de todas las células del estudio son desplazadas con respecto al nervio óptico.

En segundo lugar, se trazó 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 aplicó el filtro Flatten, que reduce las variaciones de fondo presentes en la imagen; posteriormente se aplicó el filtro Hipass (5x5), que resalta la información de alta frecuencia, aumentando de esta forma el contraste; después se aplicó el filtro Median (5x5), que reduce el ruido y homogeniza la imagen mediante un suavizado, eliminando las aberraciones que se pudiesen producir por el filtro anterior; por último se aplicó el filtro Sharpen, con el fin de resaltar los detalles y se procedió a contar y medir las células intrínsecamente fotosensibles, cuantificación aquellas que cumplen con nuestros criterios de tamaño e intensidad de marcaje.

Una vez aplicados dichos filtros se exportaron 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 las distintas mediciones de cada célula, en concreto el área, coordenada X y coordenada Y. Esta hoja es almacenada con el fin de realizar análisis posteriores.

3.9.2 Mapas de isodensidad

Los fotomontajes fueron procesados automáticamente usando una rutina informática previamente desarrollada al efecto en el programa de imagen IPP (Nadal-Nicolás et al., 2009; Salinas Navarro et al., 2009a). Para estudiar el patrón de distribución de las CGRs sobre toda la retina, la densidad celular obtenida en cada microfotografía se intentó representar gráficamente como mapas de isodensidad usando el programa de representación gráfica SigmaPlot® 9.0 for Windows® (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU). Dada la baja densidad celular dichos mapas no permitían obtener una idea de la distribución celular de las retinas (**Figura 18**) por lo que se decidió representar su distribución mediante mapas de vecinos.

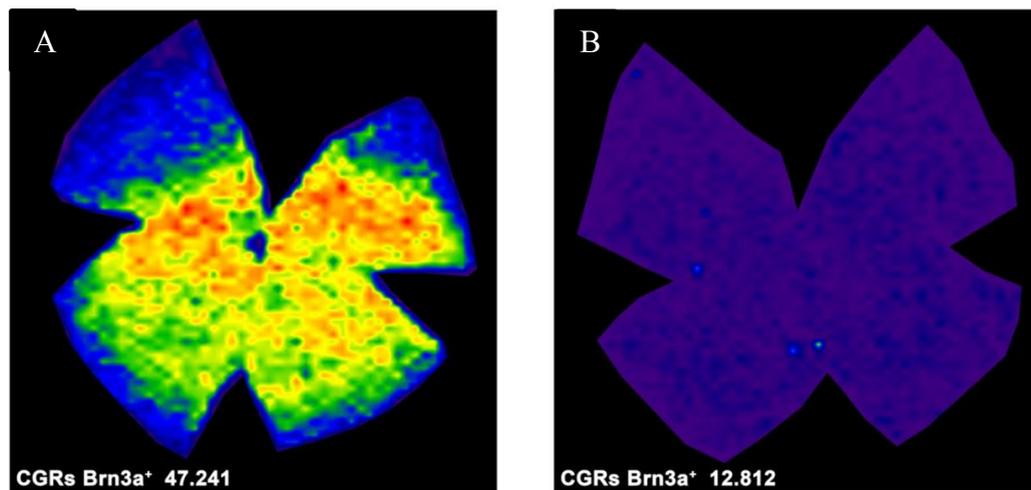


Figura 18: Comparativa gráfica de los mapas de isodensidad entre retinas intactas y retinas lesionadas

Mapa de isodensidad en el que se observa la distribución de las CGR en una retina derecha control (A) y en una retina izquierda del grupo axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol (B). El bajo número total de CGRs que sobreviven en B, no permite apreciar su distribución usando los mapas de isodensidad.

3.9.3 Mapa del vecino más próximo

El mapa de vecinos se basa en colorear cada célula según un código de colores según el número de vecinos que tiene dicha célula en un radio determinado, que en este caso ha sido $55\mu\text{m}$ en el estudio de la supervivencia y regeneración y de $82\mu\text{m}$ en el estudio de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles, de esta manera se ilustra la densidad relativa de poblaciones pequeñas. Para realizar este estudio se desarrolló una aplicación en Java que carga el fichero resultante del conteo y medición anteriormente descrito, y 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 euclídea al NO y, en tercer lugar, se aplica el algoritmo de los K-vecinos con radio fijo. Así mediante este algoritmo se contará para cada célula cuántas células se encuentran a una distancia menor o igual al radio dado, en nuestro caso de 100 ó 150 respectivamente. 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 11.0 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, mediante una escala de color, de manera que los colores más fríos corresponden a las células con menor número de vecinos y los colores más cálidos a las que poseen mayor número de vecinos. Esta escala ha sido ajustada a los resultados obtenidos, por lo que ha

sido fijada de 0 a >21 vecinos en el estudio de la supervivencia y de 0 a > 14 vecinos en el estudio de la regeneración de CGRs y de supervivencia de ipCGRs. Finalmente, los datos obtenidos de este análisis pueden ser trasladados a gráficos de barras en los que se representan en el eje de ordenadas el número de CGRs y en el eje de abscisas la distancia al nervio óptico a la que se encuentran.

3.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaStat® 3.1 para Windows® (Systat Software, Inc, Richmond, CA, EEUU). Previamente todos los datos a comparar de cada grupo se almacenaron en hojas de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU). La significación estadística se situó en $p < 0,05$ para todos los test estadísticos.

Para comparar los datos cuantitativos de número total de CGRs entre ojos derechos e izquierdos se utilizó el test de Mann-Whitney y el t-test. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (DEM).

RESULTADOS

4- RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del análisis de las retinas de los tres grupos experimentales a estudio. En general nuestros estudios muestran que la supervivencia de las CGRs es significativamente superior en los grupos experimentales en los que se implantó un injerto de nervio periférico autólogo, cuando se compara con la supervivencia obtenida tras la axotomía simple del nervio óptico. La regeneración axonal de las CGRs fue significativamente mayor cuando el injerto se implantó mediante microsuturas que cuando se utilizó Tissucol para su implante. Las ipCGRs axotomizadas no mostraron mayor supervivencia ni regeneración axonal cuando se implantaron segmentos de nervio periférico autólogo.

4.1 Supervivencia de las Células Ganglionares de la Retina inmunodetectadas con Brn3a

En los siguientes apartados se exponen los resultados obtenidos de las retinas de los ratones albinos Swiss sometidos a axotomía y axotomía más implante de nervio periférico mediante la aplicación del adhesivo biológico Tissucol y mediante sutura. Compararemos los resultados obtenidos de los diferentes grupos experimentales y mostraremos la tendencia de la distribución de las mismas en las diferentes regiones de la retina empleando para ello los mapas de número de vecinos y el gráfico cuantitativo resultante de los mismos.

4.1.1 Supervivencia de las CGRs en retinas sometidas a axotomía

Se realizó un grupo de animales (n=12) a los que se les realizó axotomía simple en el NO izquierdo y las retinas se analizaron 28 días después. En la **Figuras 19 y 20** se muestran fotomontajes representativos de una retina derecha control (**Figura 19A**) y tres retinas izquierdas, es decir lesionadas (**Figura 19B y 20**) en las que se observan las CGRs-Brn3a⁺ junto a imágenes al detalle de las mismas.

Los resultados de la cuantificación automática del número de CGRs-Brn3a⁺ en las retinas derechas y en las axotomizadas se muestran en la **Tabla 2**. Así, en las retinas control, el número medio de CGRs-Brn3a⁺ fue de 44.899±3.025 (media±desviación estándar de la media), y en las retinas lesionadas, el número medio de CGRs-Brn3a⁺ de 5.818±1.405. De esta manera el porcentaje de CGRs-Brn3a⁺ que sobrevive a 28 días tras la axotomía con respecto a la población total de CGRs-Brn3a⁺ es del 13%.

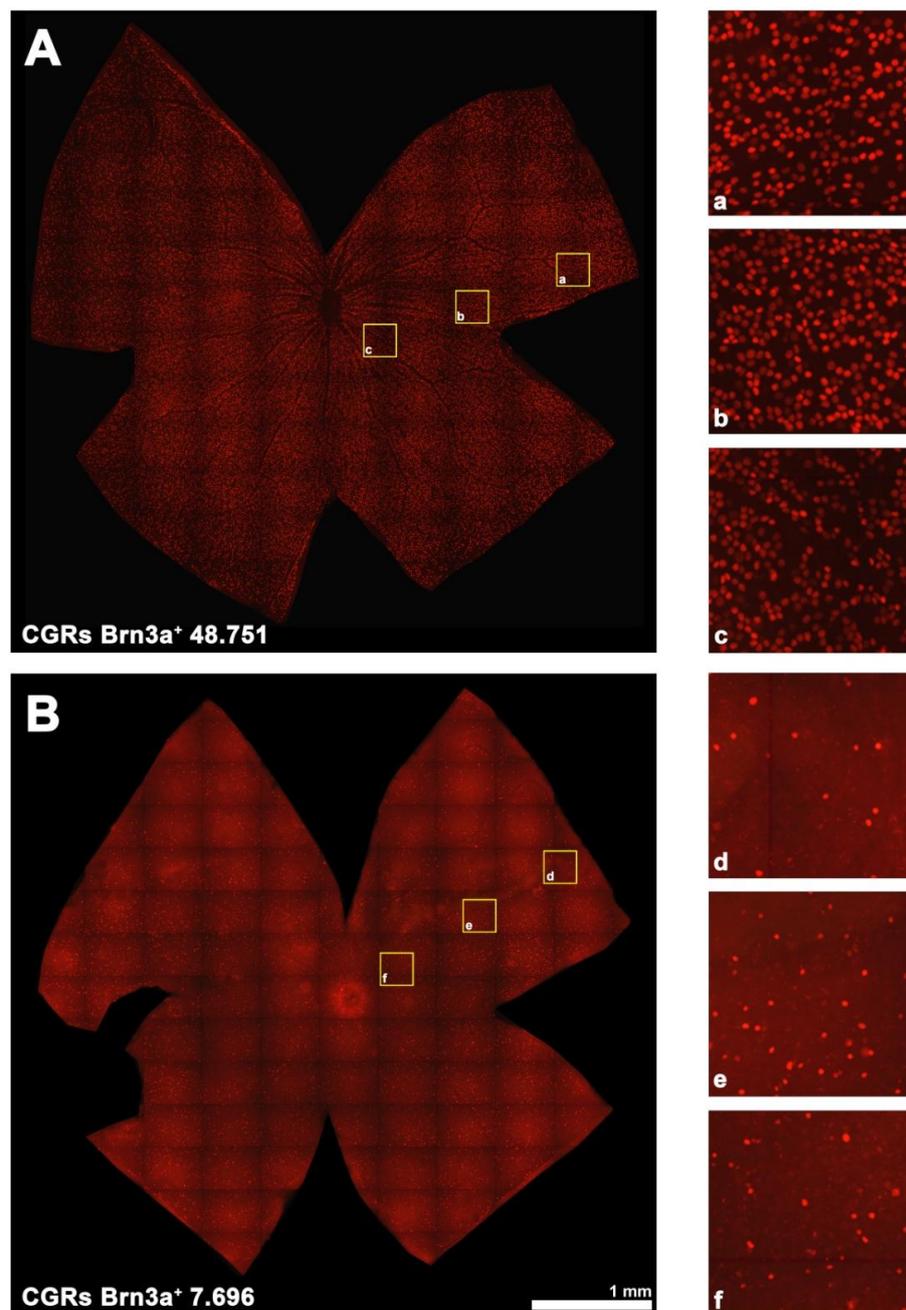


Figura 19: Identificación de CGRs en retinas control (A) y en retinas analizadas 28 días después de la axotomía (B).

Fotomontaje representativo de una retina ojo derecho no lesionada (A) y de un ojo izquierdo del grupo de axotomía (B) en las que se observan las CGRs-Brn3a⁺. En las magnificaciones a, d; b, e; c, f se observan a mayor detalle las CGRs Brn3a⁺ en las regiones periférica, media y central de la retina respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de CGRs contadas en esa retina.

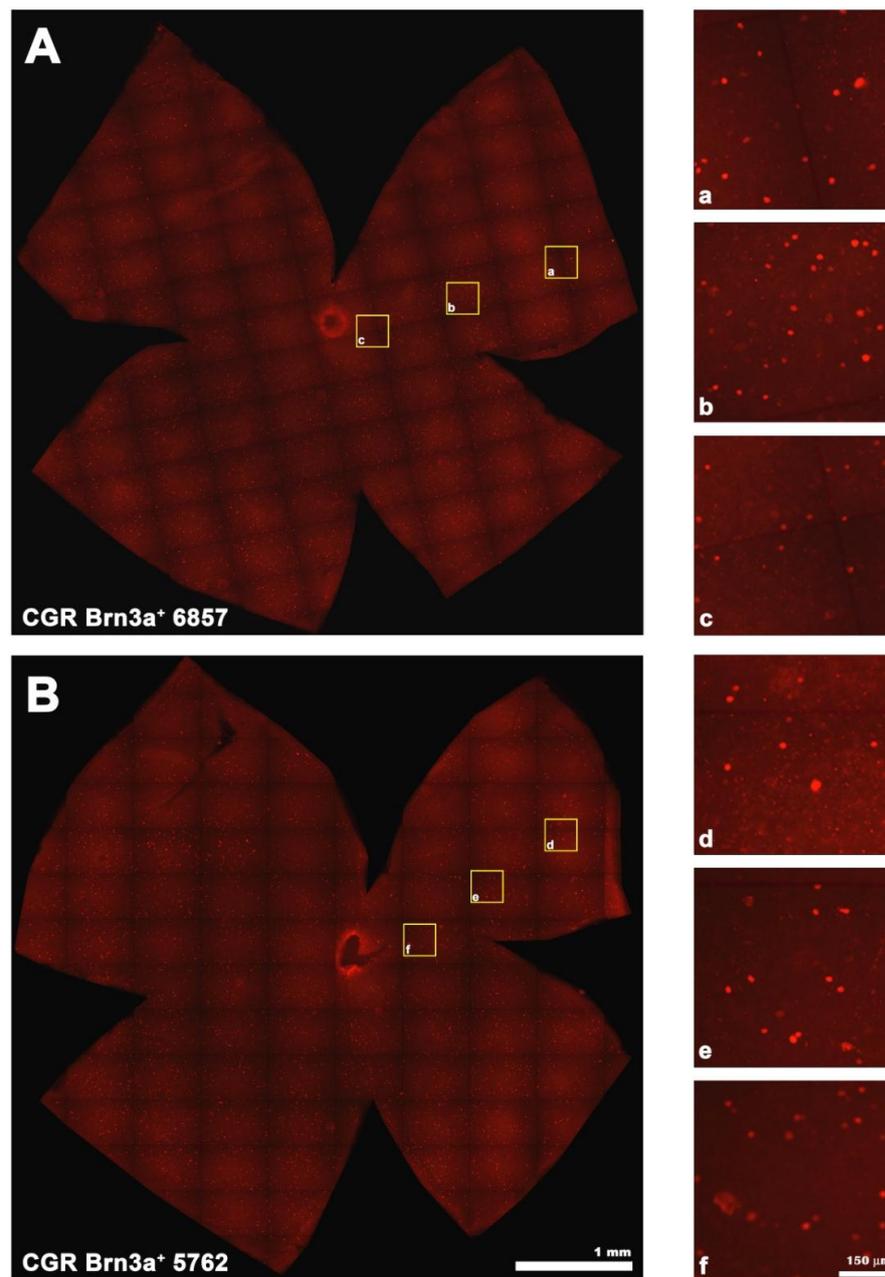


Figura 20: Identificación de las CGRs que sobreviven 28 días después de la axotomía

A-B: Fotomontajes representativos de dos retinas del grupo de axotomía en las que se observan las CGRs-Brn3a⁺. En las magnificaciones a, d; b, e; c, f se observan a mayor detalle las CGRs Brn3a⁺ en las regiones periférica, media y central de la retina respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de CGRs contadas en esa retina.

Ratón	Retinas derechas	Retinas izquierdas
1	44.006	6.224
2	44.998	6.000
3	45.727	5.618
4	49.079	7.696
5	44.550	6.857
6	38.225	8.397
7	47.876	3.920
8	47.657	5.762
9	40.663	3.577
10	41.537	5.286
11	46.279	5.826
12	45.305	4.664
Media ± desviación estándar	44.899±3.025	5.818±1.405

Tabla 2: Número total de CGRs que sobreviven en el grupo de axotomía

Número total de CGRs-Brn3a⁺ contadas en las retina derechas (control) e izquierdas (lesionadas) 28 días después de realizar la axotomía en los 12 animales estudiados. En la última fila se muestra la media±la desviación estándar.

4.1.2 Supervivencia de CGRs en retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol.

En el grupo de animales experimentales a los que se les realizó axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissucol (n=11), también fueron identificadas las CGR-Brn3a⁺ (Figura 21). Los resultados de la cuantificación automática del número de CGR-Brn3a⁺ se muestran en la Tabla 3. El número medio de CGRs-Brn3a⁺ en los ojos derechos fue de 45.084±4.440, mientras que los ojos izquierdos poseían un número medio de CGRs-Brn3a⁺ de 9.716±3.452. De tal forma que el porcentaje de supervivencia de las CGRs-Brn3a⁺ tras axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissucol con respecto a la población total de CGRs-Brn3a⁺ es del 22%.

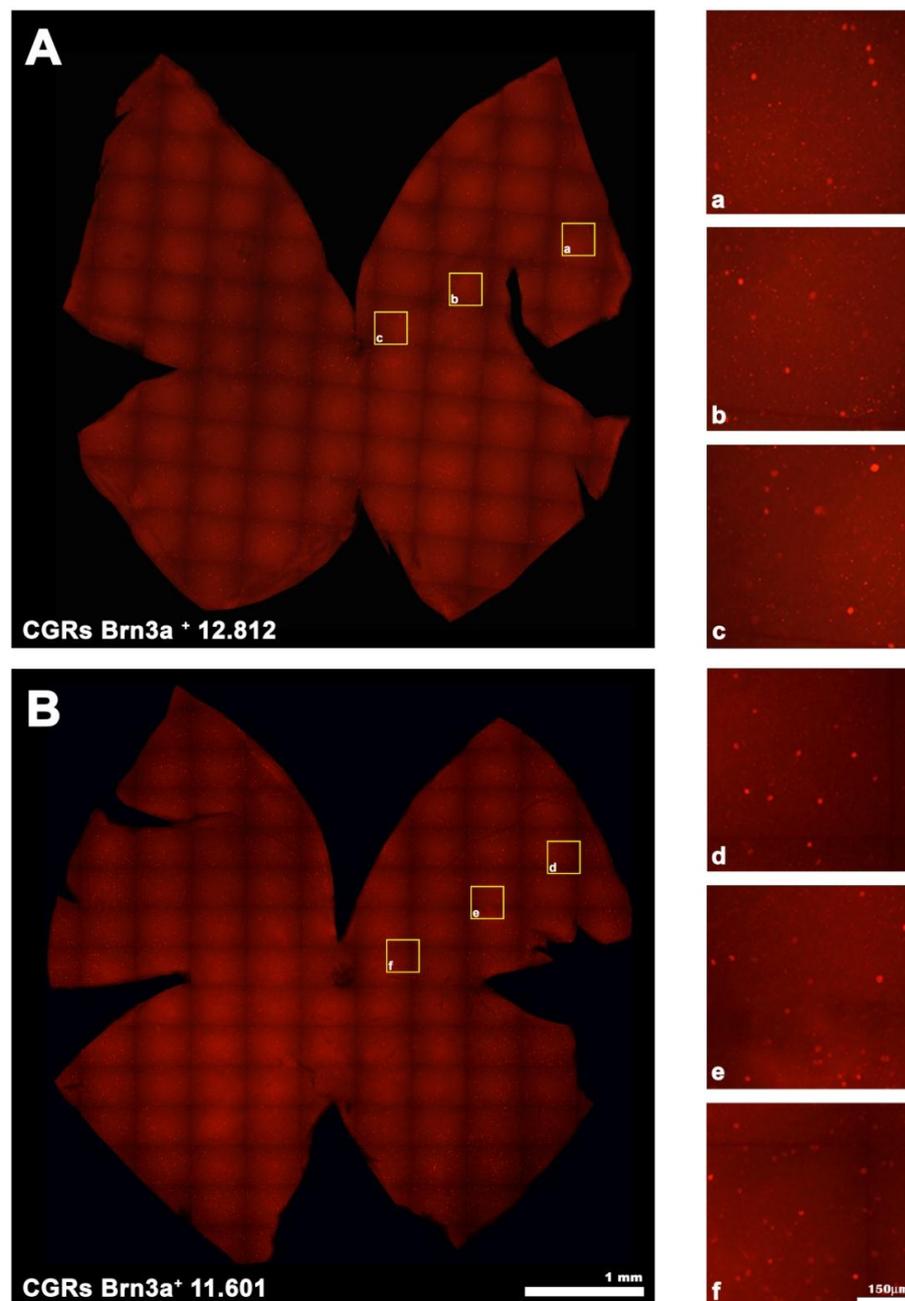


Figura 21: Identificación de las CGRs que sobreviven 28 días después de axotomía e injerto de nervio periférico mediante Tissucol.

A, B: Fotomontajes representativos de dos retinas del grupo de axotomía e injerto de nervio periférico mediante Tissucol en las que se observan las CGRs-Brn3a⁺. En las magnificaciones a, d; b, e; c, f se observan a mayor detalle las CGRs Brn3a⁺ en las regiones periférica, media y central de la retina, respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de CGRs contadas en esa retina.

Ratón	Retinas derechas	Retinas izquierdas
1	45.884	11.601
2	44.974	5.698
3	47.109	7.034
4	49.716	7.640
5	50.657	10.058
6	43.824	6.959
7	47.241	12.812
8	34.557	7.231
9	44.182	14.352
10	50.450	15.916
11	43.940	7.579
Media ± desviación estándar	45.084±4.440	9.716±3452

Tabla 3: Número total de CGRs en el grupo de axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol.

Número total de CGRs-Brn3a⁺ contadas en las retina derechas (control) e izquierdas (lesionadas) 28 días después de realizar la axotomía y realizar el injerto de nervio periférico mediante Tissucol en los 11 animales estudiados. En la última fila se muestra la media±la desviación estándar

4.1.3 Supervivencia de CGRs en retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura

Al igual que en los grupos anteriores se identificaron las CGRs-Brn3a⁺ en los animales experimentales a los que se les realizó axotomía e implante de injerto de nervio periférico

mediante sutura (n=11). En las **figuras 22 y 23** se muestran 4 fotomontajes representativos y sus correspondientes magnificaciones. Los resultados de la cuantificación automática del número de CGRs-Brn3a⁺ se muestran en la **Tabla 4**. Obteniéndose en este caso para los ojos derechos un número medio de CGRs-Brn3a⁺ de 47.975 ± 3.407 y para los ojos izquierdos un número medio de 8.575 ± 3.763 . Así, el porcentaje de supervivencia de las CGRs-Brn3a⁺ en este grupo experimental la población total en las retinas derechas es de aproximadamente un 18%.

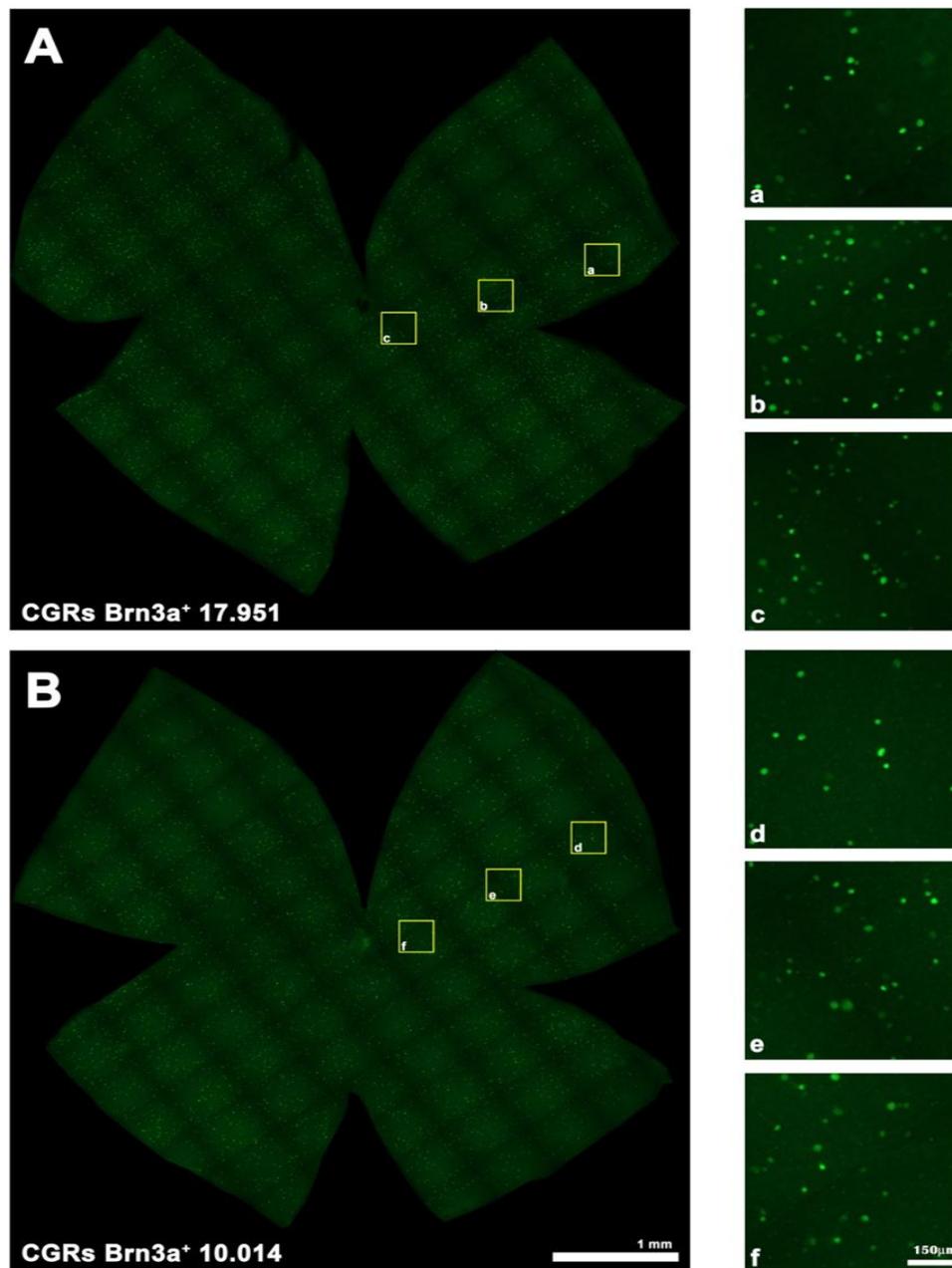


Figura 22: Identificación de las CGRs que sobreviven 28 días después de axotomía e injerto de nervio periférico mediante sutura.

A, B: Fotomontajes representativos de dos retinas izquierdas a las que se les ha realizado axotomía e injerto de nervio periférico mediante sutura, en las que se observan las células ganglionares de la retina inmunodetectadas con Brn3a. En las magnificaciones a, d; b, e; c, f se observan a mayor detalle las CGRs Brn3a⁺ en las regiones periférica, media y central de la retina, respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de CGRs contadas en esa retina.

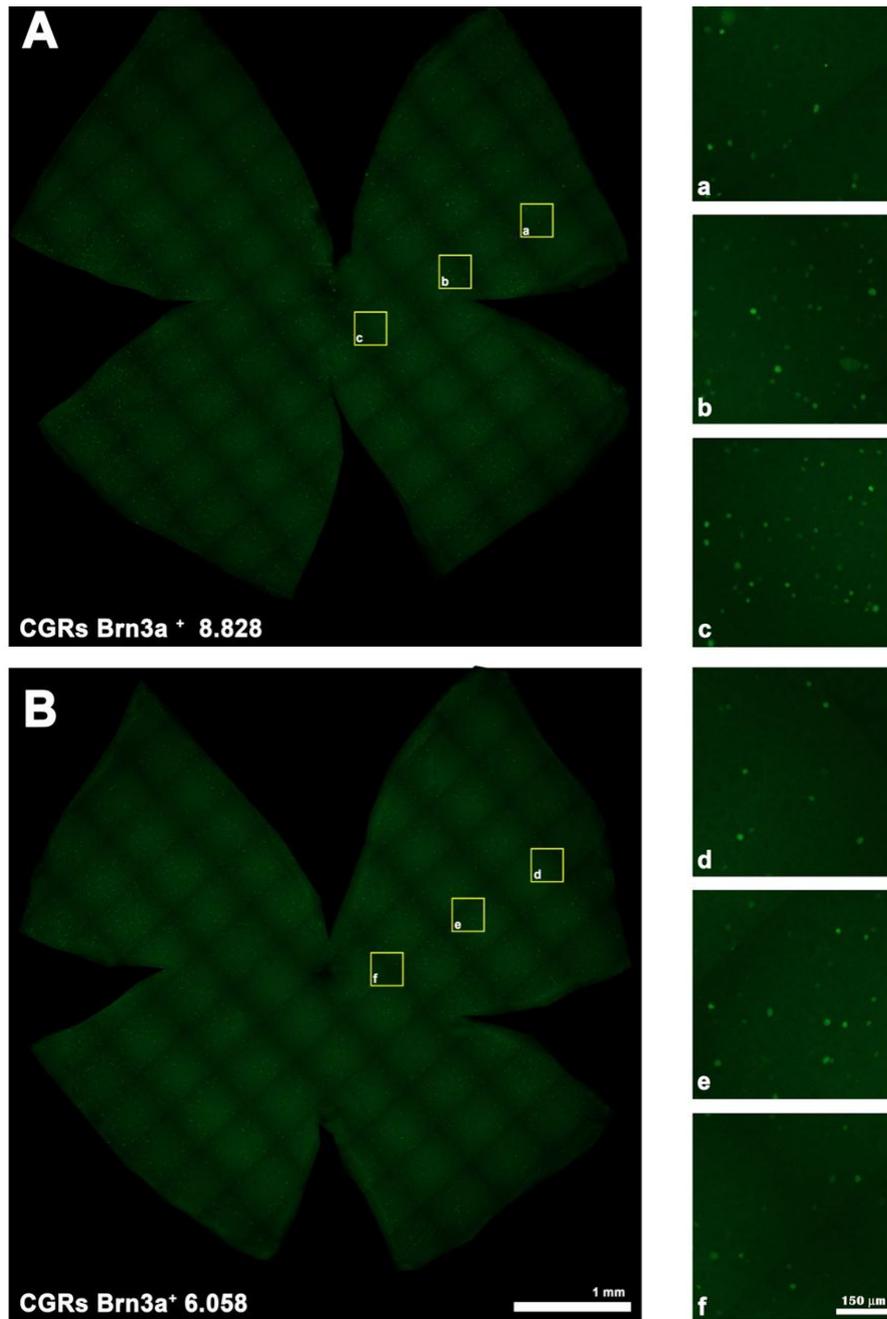


Figura 23: Identificación de las CGRs que sobreviven 28 días después de axotomía e injerto de nervio periférico mediante sutura.

A, B: Fotomontajes representativos de dos retinas izquierdas a las que se les ha realizado axotomía e injerto de nervio periférico mediante sutura, en las que se observan las células ganglionares de la retina inmunodetectadas con Brn3a. En las magnificaciones a, d; b, e; c, f se observan a mayor detalle las CGRs Brn3a⁺ en las regiones periférica, media y central de la retina, respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de CGRs contadas en esa retina.

Ratón	Retinas derechas	Retinas izquierdas
1	49.472	8.766
2	44.153	8.017
3	55.436	8.828
4	46.045	5.299
5	52.458	17.951
6	45.757	7.281
7	47.249	6.058
8	48.231	10.014
9	46.059	5.532
10	44.731	5.496
11	48.134	6.332
Media ± desviación estándar	47.975±3.407	8.575±3.763

Tabla 4: Número total de CGRs que sobreviven en el grupo de axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura

Número total de CGRs-Brn3a⁺ contadas en las retina derechas (control) e izquierdas (lesionadas) 28 días después de realizar la axotomía y realizar el injerto de nervio periférico mediante sutura en los 11 animales estudiados. En la última fila se muestra la media±la desviación estándar.

Si comparamos el grupo de axotomía con los grupos que además recibieron injerto de nervio periférico (axotomía +Tissucol) y (axotomía + sutura) comprobamos que en el grupo de axotomía la supervivencia es significativamente menor que en los grupos en los que se realizó el injerto (Ttest, p=0,003 y p=0,024; Tissucol y sutura, respectivamente). Por el contrario si comparamos la supervivencia entre ambos grupos con injerto, comprobamos

que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0,451$); Es decir, la metodología para injertar el nervio periférico en el muñón del nervio óptico no influye de manera significativa en la supervivencia de las CGRs

4.1.4 Estudio Topográfico de la Supervivencia de CGRs-Brn3a en los diferentes grupos experimentales.

En retinas control, la distribución topográfica de las CGRs se muestra con mapas de isodensidad (**Figura 24A-B**). Se observa que la distribución de las CGRs no es homogénea, se encuentran en mayor densidad en la zona central de la retina, disminuyendo hacia la periferia. Las densidades mayores se encuentran en la zona superior por encima del nervio óptico, con un pico en la zona temporal (**Figura 24B**) del mismo modo como se han descrito en estudios previos que han documentado que la distribución de las CGRs en el ratón adulto presentan un patrón de estría visual (Salinas-Navarro et al.,; 2009b). Para el estudio topográfico de las CGRs que sobreviven en los distintos grupos experimentales, los mapas de isodensidad no eran válidos por el bajo número de células supervivientes y por lo tanto se realizaron mapas de vecinos. Estos se muestran en las siguientes figuras: grupo de axotomía (sub-apartado 4.1.4.1, **Figuras 24C, 25-27**), grupo de axotomía e injerto de nervio periférico con Tissucol (sub-apartado 4.1.4.2, **Figuras 28, 30**) y grupo de axotomía e injerto de nervio periférico con sutura (sub-apartado 4.1.4.3, **Figuras 31-34**). Los mapas de las figuras 24C y 25 corresponden a los fotomontajes mostrados en la figuras 19B y 20, respectivamente, los de la figura 28 a los fotomontajes de la figura 21 y los de las figuras 31 y 32 a los fotomontajes de las figuras 22 y 23 ,respectivamente. En todos los mapas y gráficos correspondientes, independientemente del grupo experimental, se observa que la supervivencia de las CGRs ocurre por toda la retina. Es decir, en el caso de la axotomía simple estos mapas demuestran que la lesión induce una muerte difusa; en los grupos que han recibido el injerto de nervio periférico, estos datos indican además que la aposición del nervio periférico en el nervio óptico ha cubierto todo el muñón. Finalmente, en concordancia con los datos cuantitativos (**tablas 2 a 4**) en las retinas que han recibido injerto se observa una mayor densidad de CGRs.

4.1.4.1. Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs *Brn3a*⁺ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía.

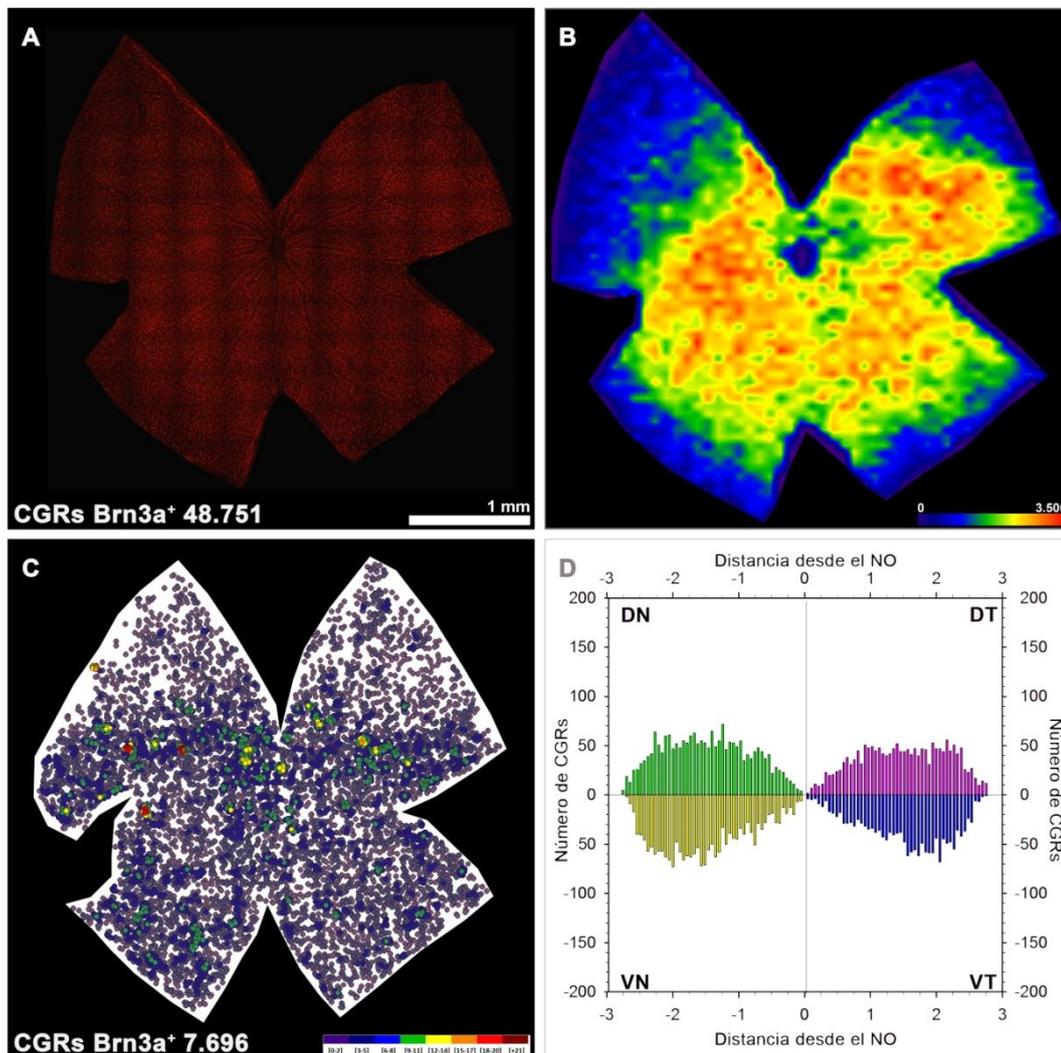


Figura 24: Distribución de CGRs-*Brn3a*⁺ en retinas control y tras axotomía

Fotomontaje representativo de CGRs-*Brn3a*⁺ de retina derecha control (A) junto con su mapa de isodensidad correspondiente (B). En las retinas lesionadas, los mapas de isodensidad no eran factibles y por eso las CGRs supervivientes o que han regenerado se ha representado por medio de mapas de vecinos. En C se muestra un ejemplo de la distribución de las CGRs-*Brn3a*⁺ (supervivientes) a 28 días tras la axotomía, este mapa corresponde al fotomontaje de la figura 19B. En D se muestran los datos del mapa de vecinos trasladados a un gráfico en el que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes desde nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. En A y B, el polo temporal está a la derecha, y en C a la izquierda. En la parte inferior izquierda del fotomontaje y del mapa se muestra el número total de CGRs contadas y representadas, respectivamente.

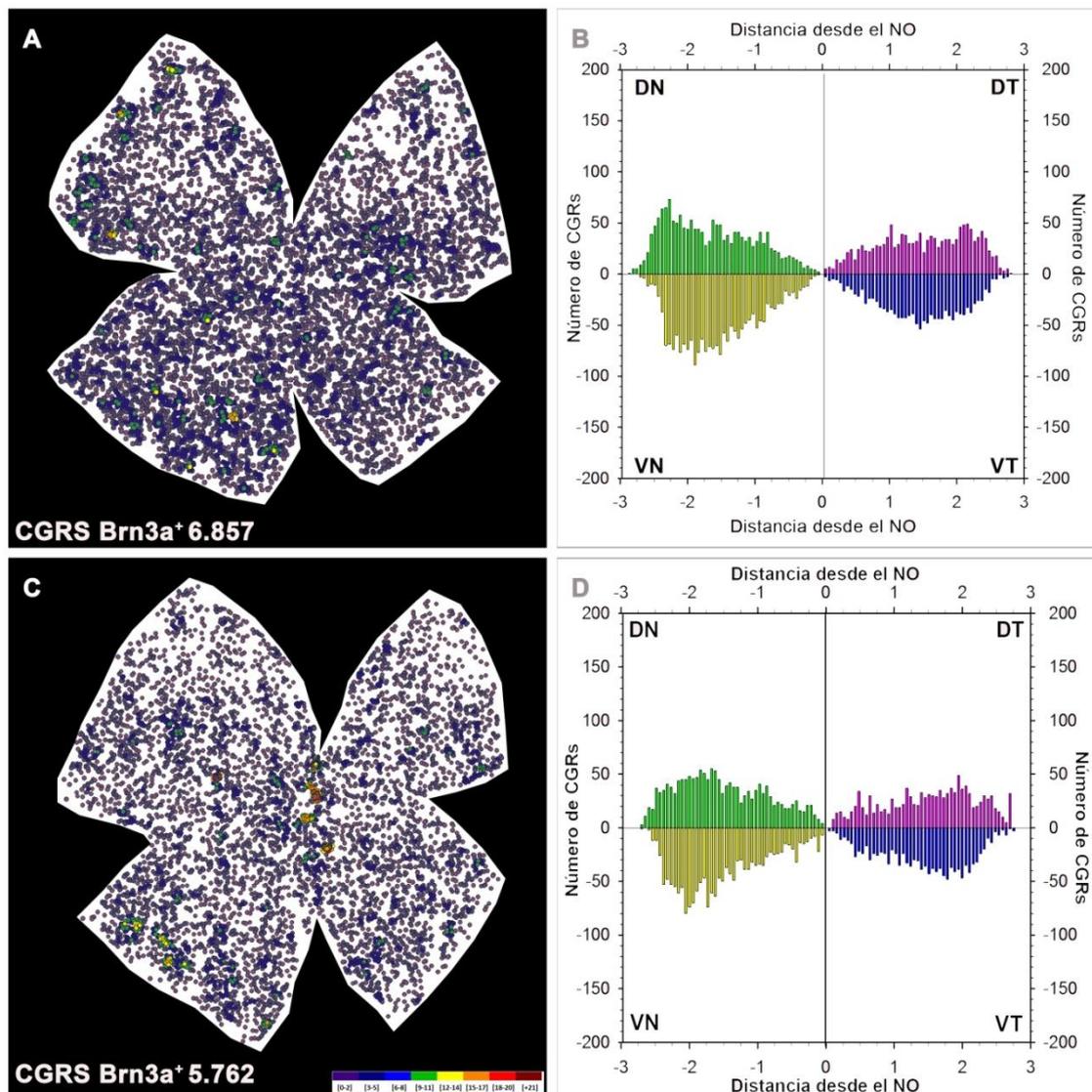


Figura 25: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en retinas analizadas 28 días tras la axotomía

A, C: Distribución de las CGRs-Brn3a⁺ (supervivientes) a 28 días tras la axotomía, estos mapas corresponden a los fotomontajes de la figura 20. **B, D:** se muestran los datos de los mapas de vecinos trasladados a un gráfico en el que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes desde nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal, En A y C el polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas

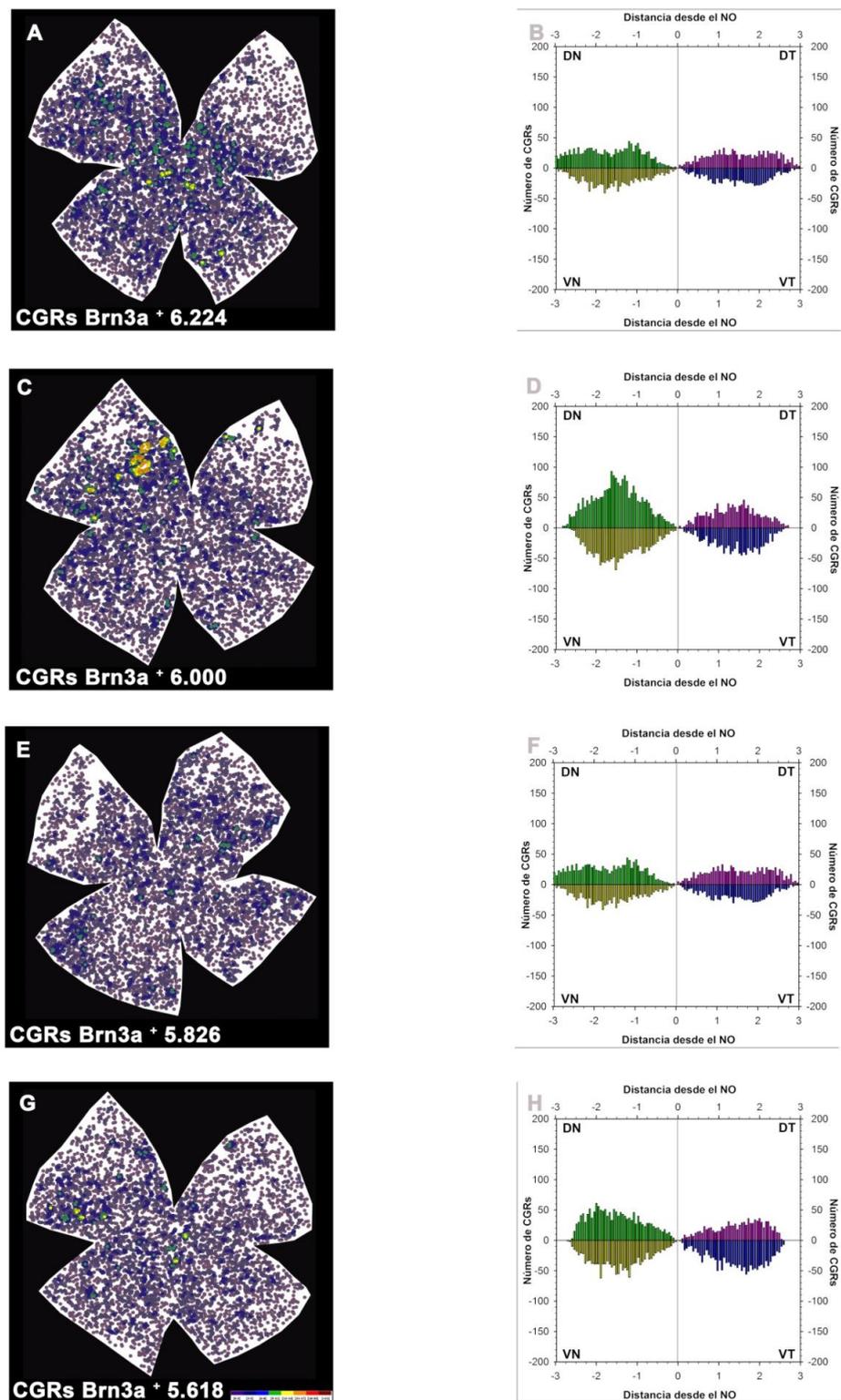


Figura 26: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en retinas del grupo de axotomía.

A, C, E y G: mapas de vecinos de 4 retinas sometidas a axotomía. En B, D, F y H se muestran los datos de cada mapa de vecinos trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior número total de CGRs representadas

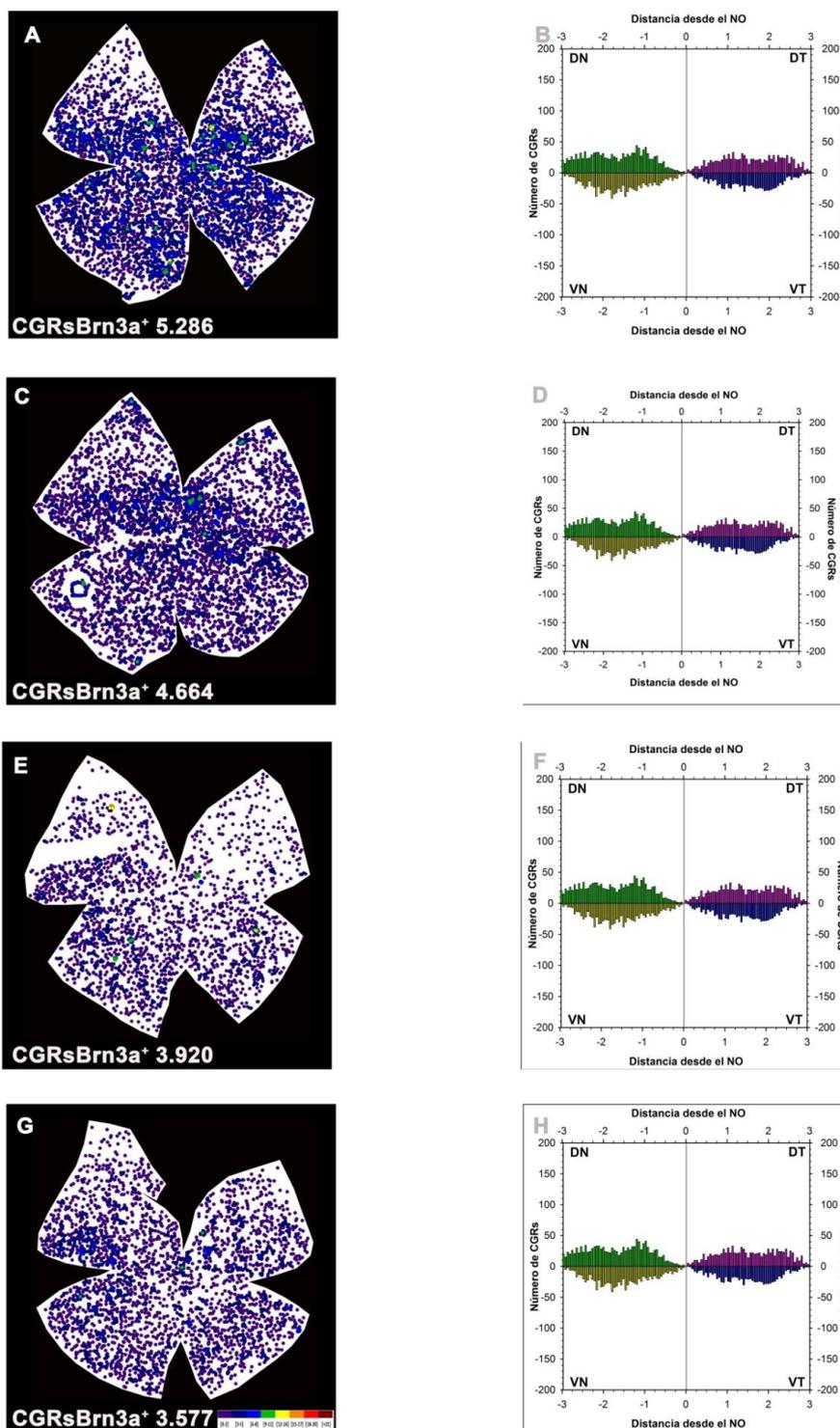


Figura 27: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en retinas del grupo de axotomía

A, C, E y G: mapas de vecinos de 4 retinas sometidas a axotomía. En B, D, F y H se muestran los datos de cada mapa de vecinos trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas

4.1.4.2. Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs-Brn3a+ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol.

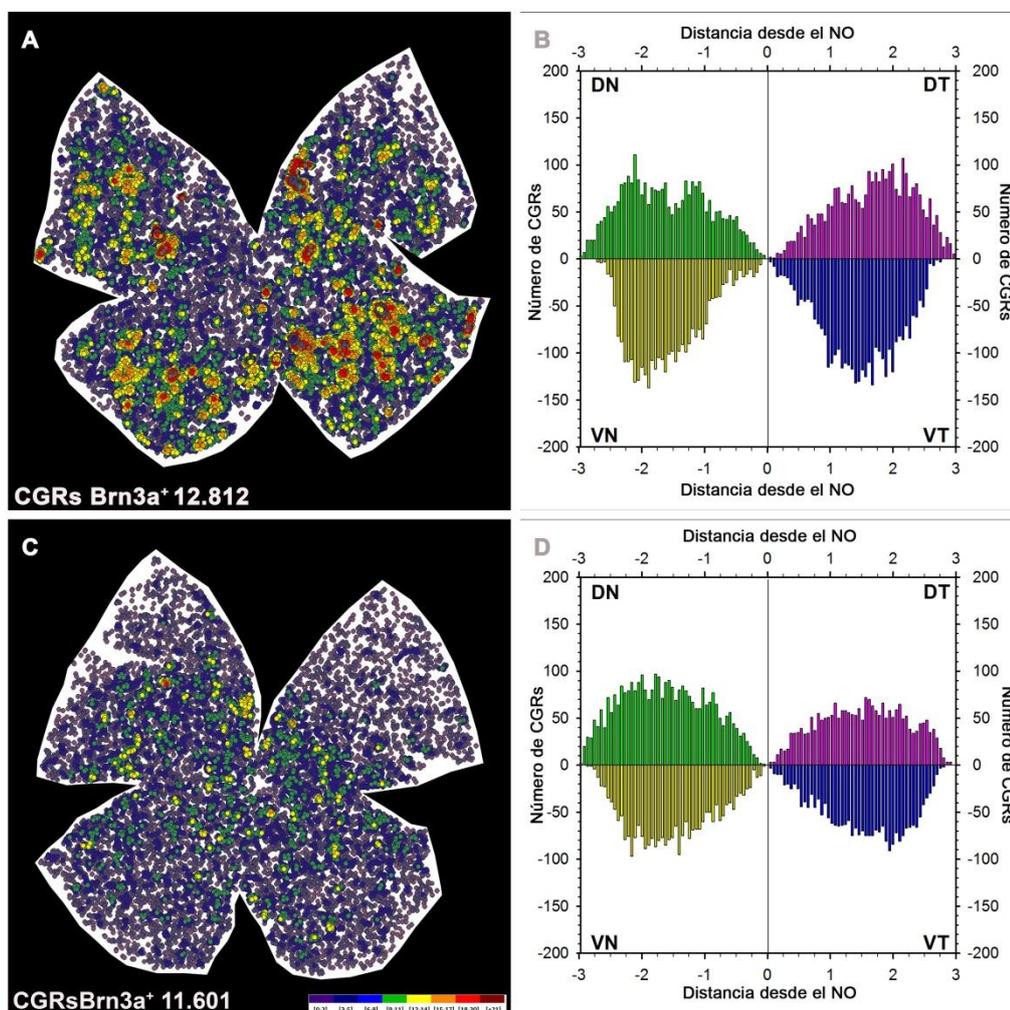


Figura 28: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en retinas del grupo de axotomía injerto con Tissucol

A, C: mapas de vecinos de retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol correspondientes a los fotomontajes de la figura 21. B, D: gráficos en los que se muestran los datos de cada mapa de vecinos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. En A y C el polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas

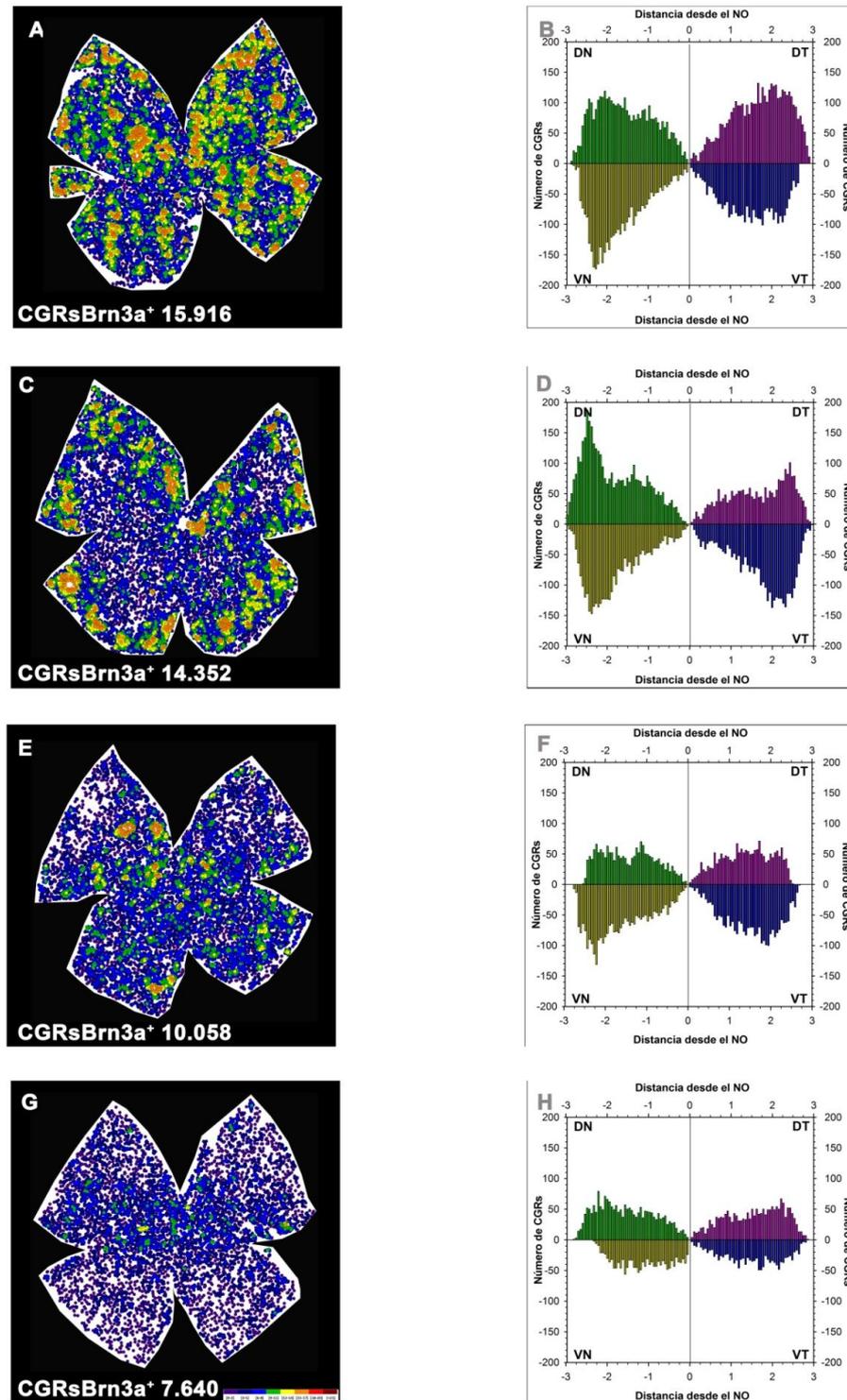


Figura 29: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en el grupo de axotomía en injerto con Tissuecol
A, C, E y G: mapas de vecinos de 4 retinas sometidas a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissuecol. En **B, D, F y H** se muestran los datos de cada mapa de vecino trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas

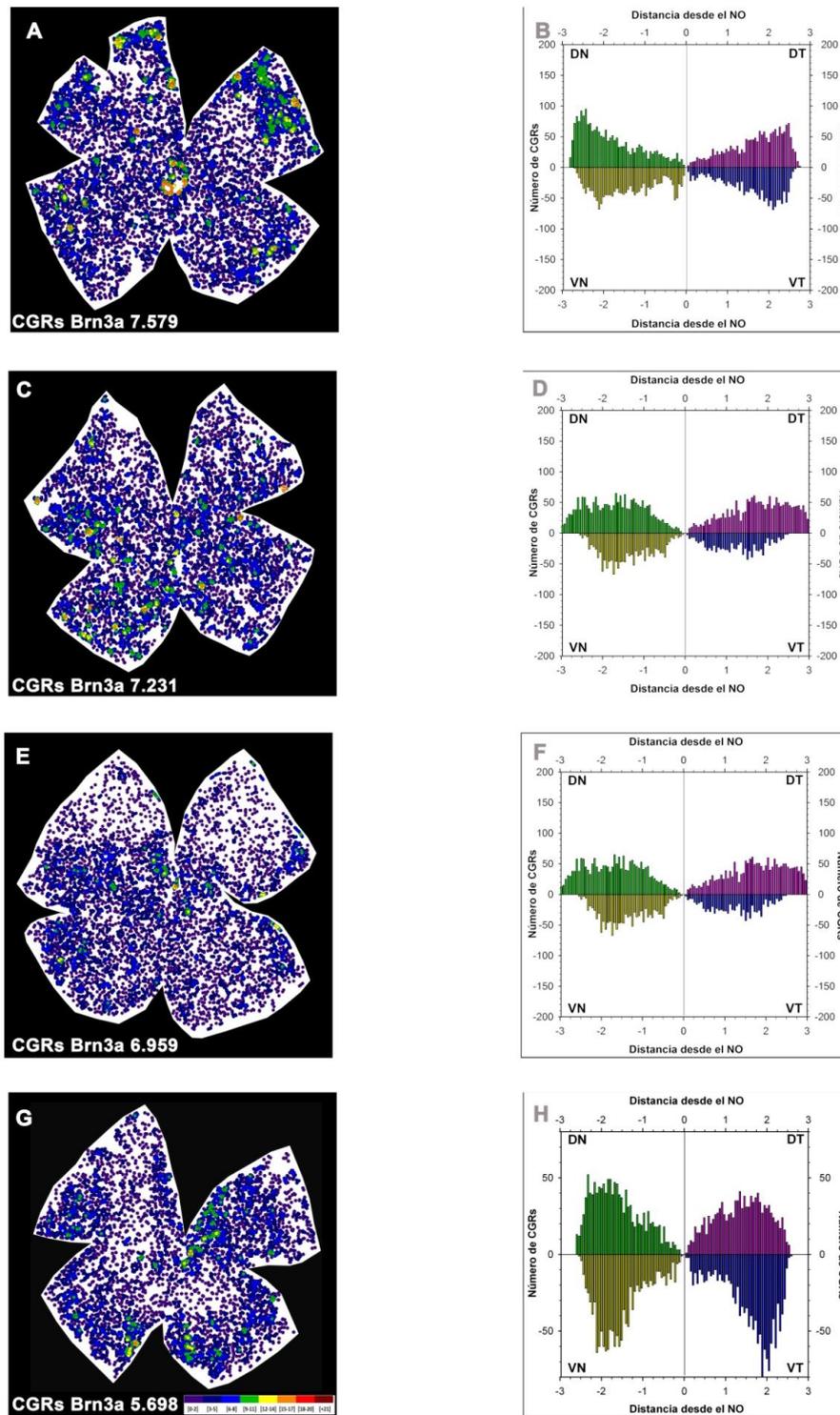


Figura 30: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en el grupo de axotomía en injerto con Tissuecol.

A, C, E y G: mapas de vecinos de 4 retinas sometidas a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissuecol. En B, D, F y H se muestran los datos de cada mapa de vecino trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas

4.1.4.3. Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs-Brn3a⁺ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura.

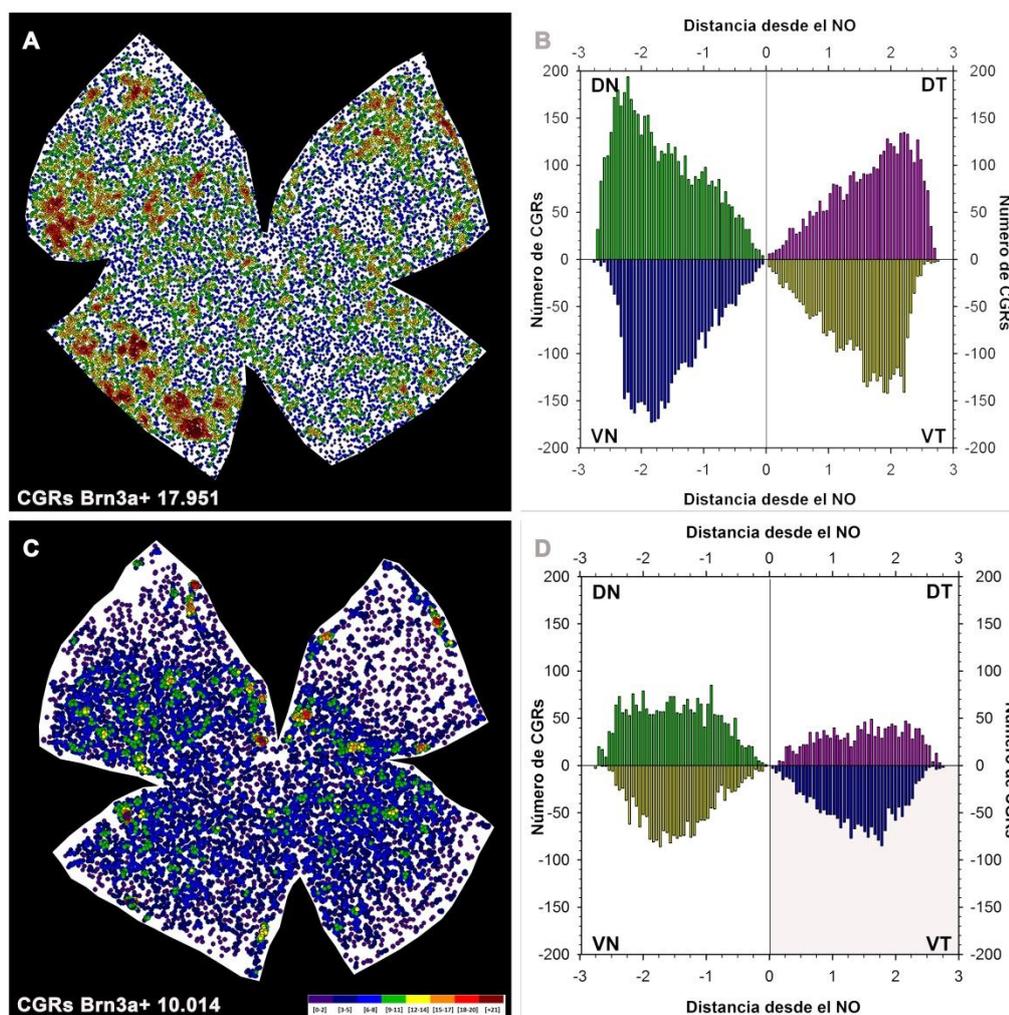


Figura 31: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en retinas del grupo de axotomía e injerto con sutura

A y C: mapas de vecinos de las retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura correspondientes a los fotomontajes de la figura 22. En B y D se muestran los datos de los mapas de vecino trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. En A y C el polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas

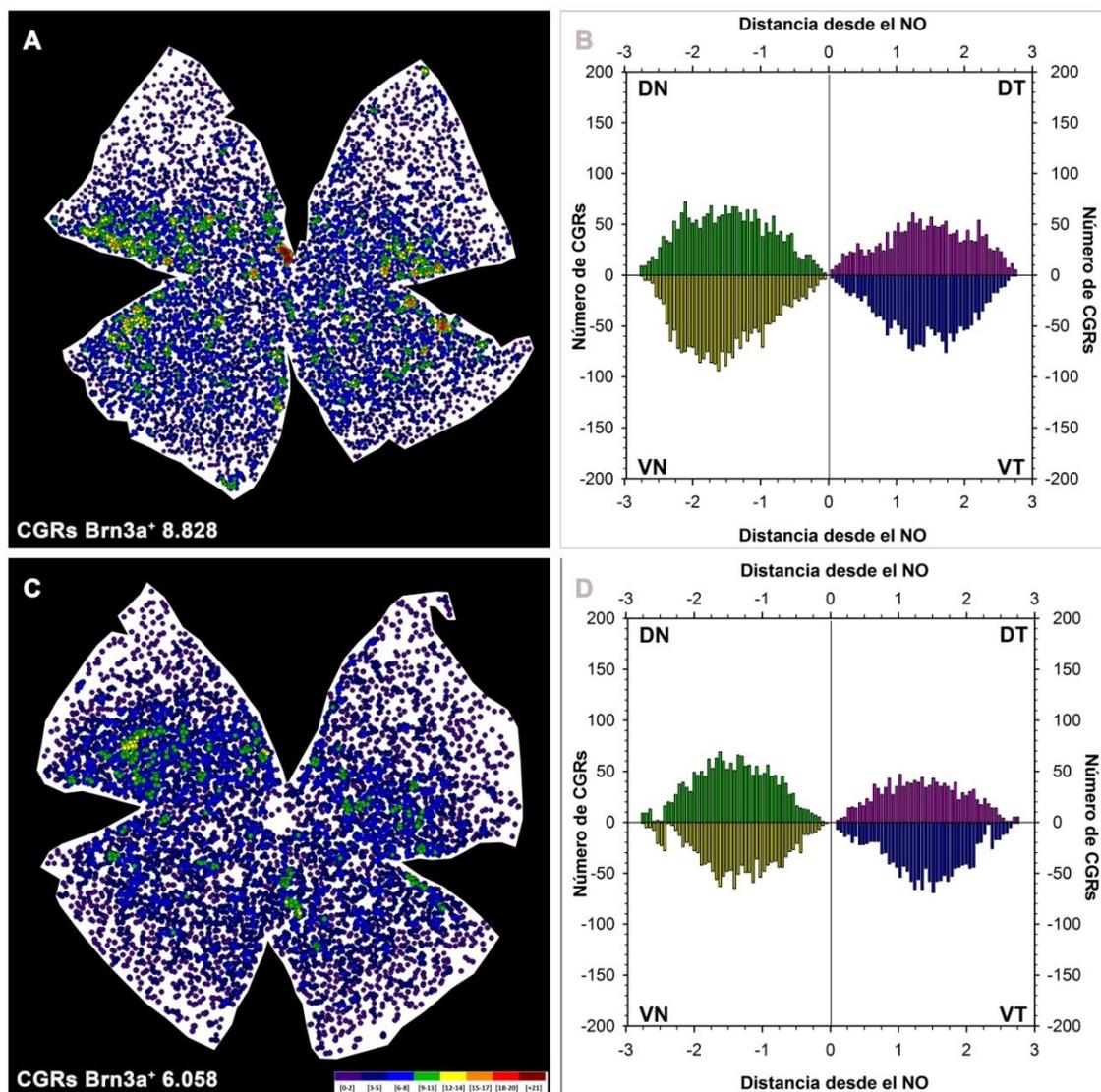


Figura 32: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en retinas del grupo de axotomía e injerto con sutura.

A y C: mapas de vecinos de las retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura correspondientes a los fotomontajes de la figura 23. En B y D se muestran los datos de los mapas de vecino trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN cuadrante ventro nasal. En A y C el polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas.

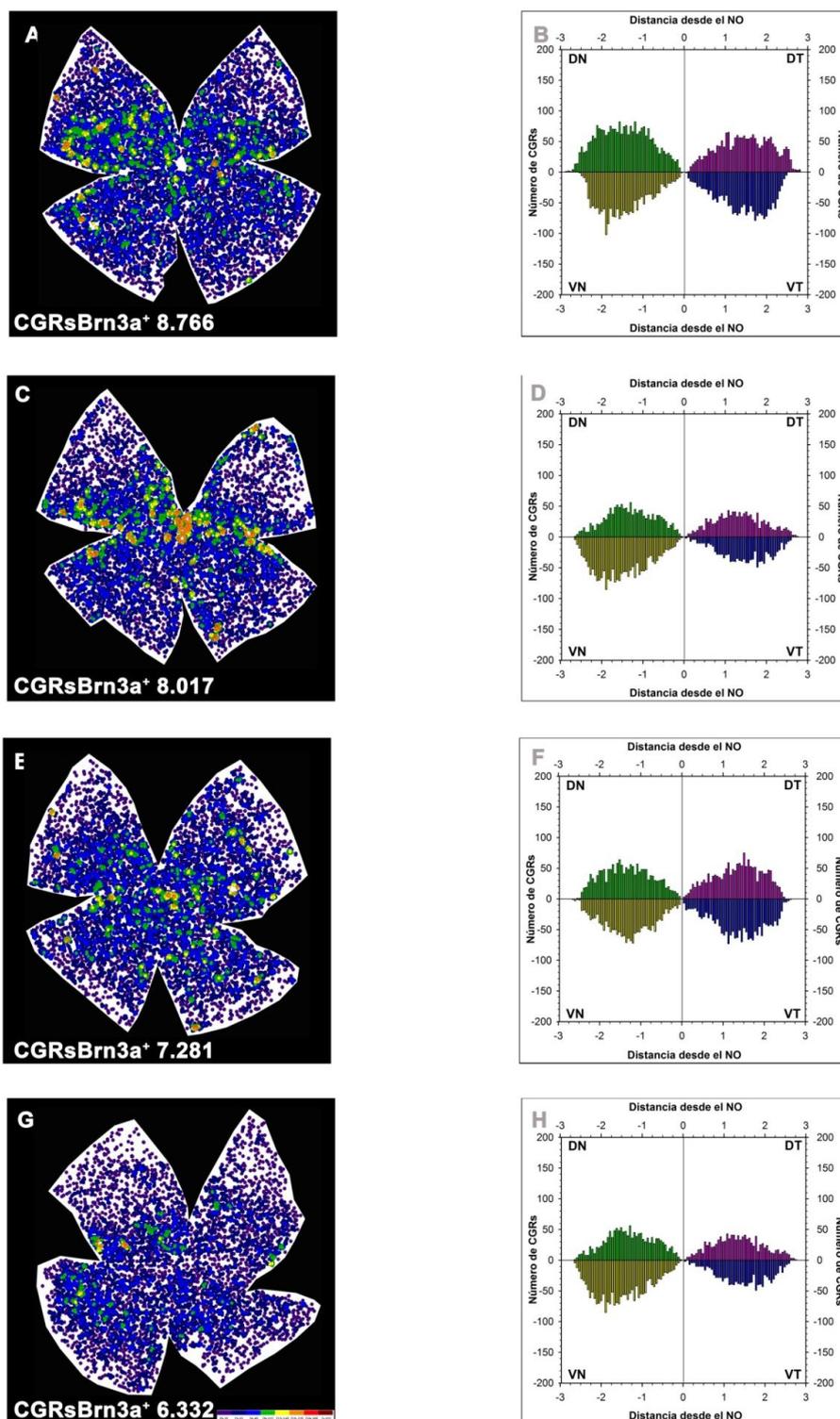


Figura 33: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en el grupo de axotomía e injerto mediante sutura

A, C, E y G: mapas de vecinos de 4 retinas sometidas a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante sutura. En B, D, F y H se muestran los datos de cada mapa de vecinos trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda el número total de CGRs representadas.

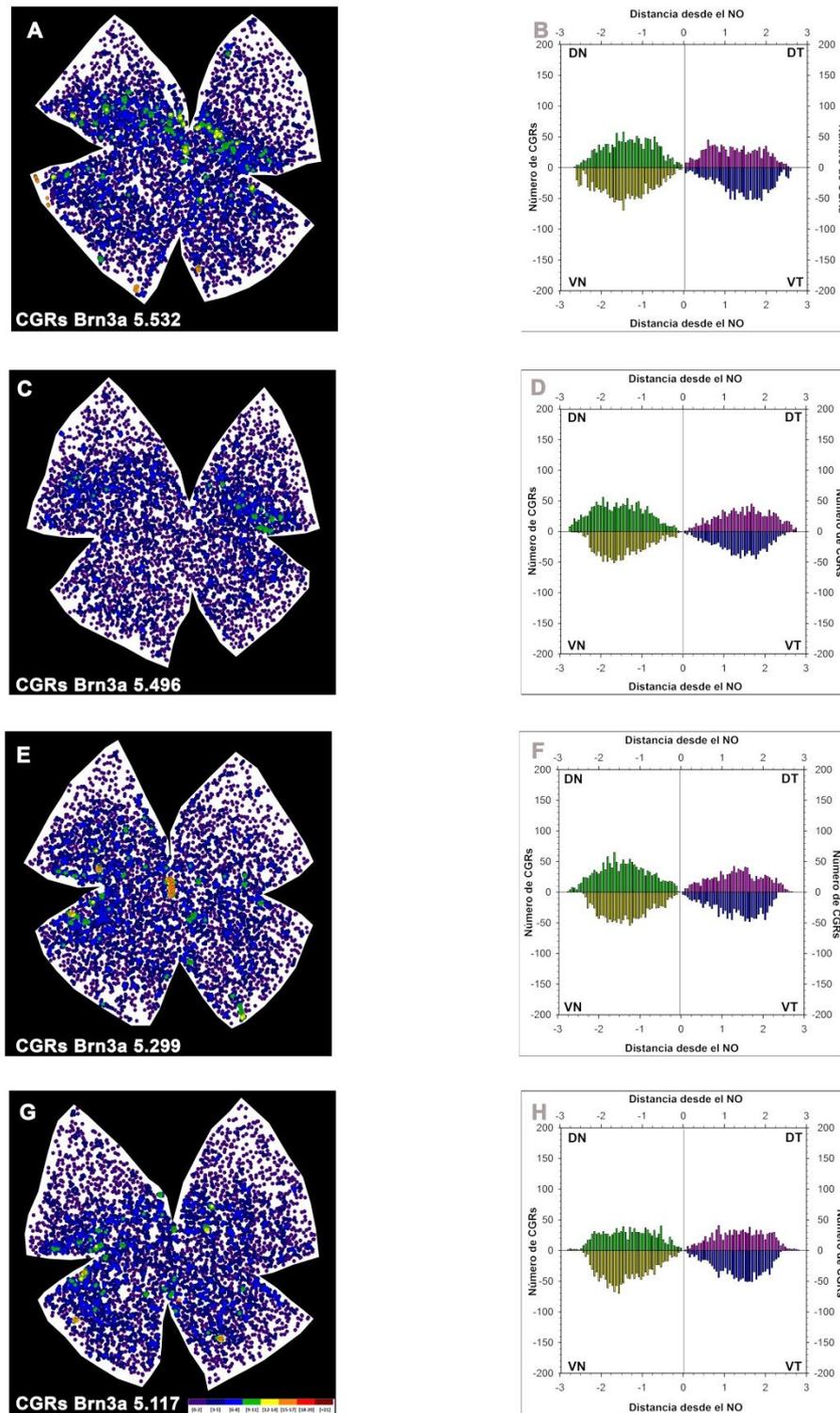


Figura 34: Distribución de CGRs-Brn3a⁺ en el grupo de axotomía e injerto mediante sutura

A, C, E y G: mapas de vecinos de 4 retinas sometidas a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante sutura. En B, D, F y H se muestran los datos de cada mapa de vecinos trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda se muestra el número de CGRs representadas.

4.2. Regeneración de las células ganglionares de la retina

En los siguientes apartados se exponen los resultados obtenidos de las retinas pertenecientes a los grupos experimentales en los que se realizó axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante la aplicación del adhesivo biológico Tissucol ó mediante sutura. En estos grupos se aplicó 25 días después de la lesión y el injerto el neurotrazador OHSt en la parte distal del injerto de nervio periférico para detectar en la retina las CGRs que habían regenerado sus axones a través del injerto. Compararemos los resultados obtenidos de ambos grupos experimentales y mostraremos la tendencia de la distribución de los mismos en las diferentes regiones de la retina empleando para ello los mapas de números de vecinos y el histograma cuantitativo resultante de los mismos.

4.2.1 Regeneración de las CGRs en retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol.

En la **Figura 35** se muestran 2 fotomontajes de dos retinas representativas de este grupo de experimentos en el que se aplicó el injerto mediante Tissucol. En esta figura se pueden apreciar las CGRs marcadas retrógradamente con el trazador OHSt aplicado en el extremo del injerto, es decir aproximadamente a unos dos centímetros de la retina. Interpretamos estas CGRs-OHSt⁺ como células que se han marcado porque su axón regeneró a lo largo del los injertos hasta el extremo distal en el que se aplicó el marcador. En la **Tabla 5** se muestra el número total de CGRs-OHSt⁺ cuantificadas en este grupo experimental. El número medio±desviación estándar de CGRs que regeneran fue de 1.045±485.

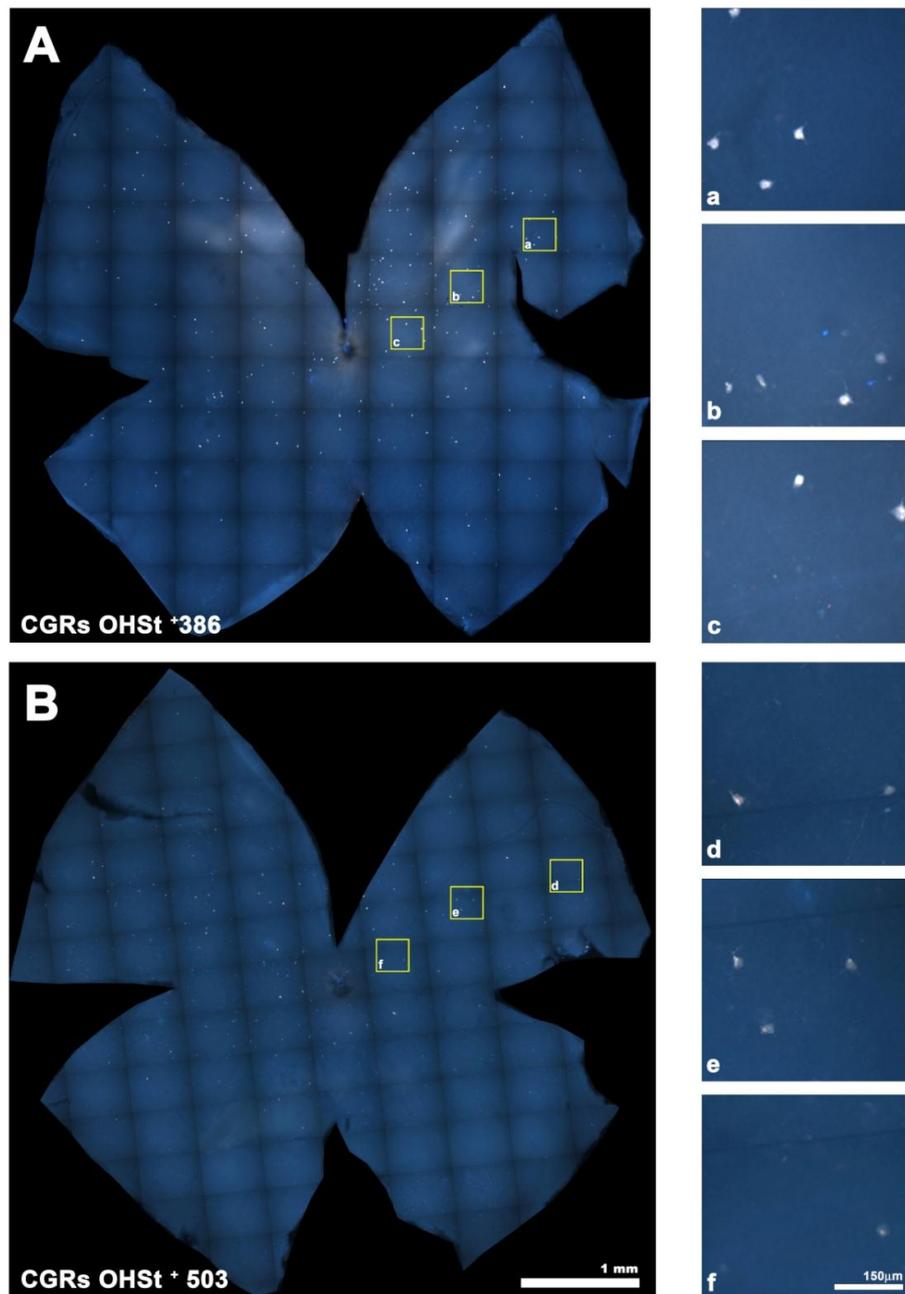


Figura 35: Regeneración de las CGRs a través del injerto de nervio periférico mediante Tissucol

A, B: Fotomontajes representativos de dos retinas izquierdas a las que se les ha realizado axotomía e injerto de nervio periférico mediante Tissucol y en las que se observan las CGRs que regeneran a través del injerto trazadas con OHSt. En las magnificaciones a, d; b, e; c, f se observan a mayor detalle las CGRs Brn3a⁺ en las regiones periférica, media y central de la retina respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de CGRs contadas en esa retina.

Grupo Tissucol	
Retina	Número de CGRs-OHSt⁺
1	882
2	503
3	1.268
4	742
5	1.694
6	386
7	1.347
8	1.353
Media ± Desviación estándar	1.045±485

Tabla 5: Número total de CGRs OHSt⁺ en el grupo de axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol

Número total de CGRs-OHSt⁺ contadas en las retinas izquierdas (lesionadas) 28 días después de realizar la axotomía y realizar el injerto de nervio periférico mediante Tissucol en los animales estudiados. En la última fila se muestra la media±la desviación estándar.

4.2.2. Regeneración de las CGRs en retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura.

En las **Figuras 36 y 37** se muestran 4 fotomontajes de retinas representativas de este grupo de experimentos en el que se aplicó el segmento de nervio periférico al muñón ocular del nervio óptico mediante microsuturas. En estas figuras, como en las mostradas en el grupo anterior, se pueden apreciar las CGRs marcadas retrógradamente con el trazador OHSt aplicado en el extremo del injerto, es decir aproximadamente a unos dos centímetros de la retina. Interpretamos estas CGRs-OHSt⁺ como células que se han marcado porque su axón regeneró a lo largo de los injertos hasta el extremo distal en el que se aplicó el marcador. En la **Tabla 6** se muestra el número total de CGRs-OHSt⁺ cuantificadas en este grupo experimental. El número medio±desviación estándar de CGRs que regeneran fue de 1.887±599.

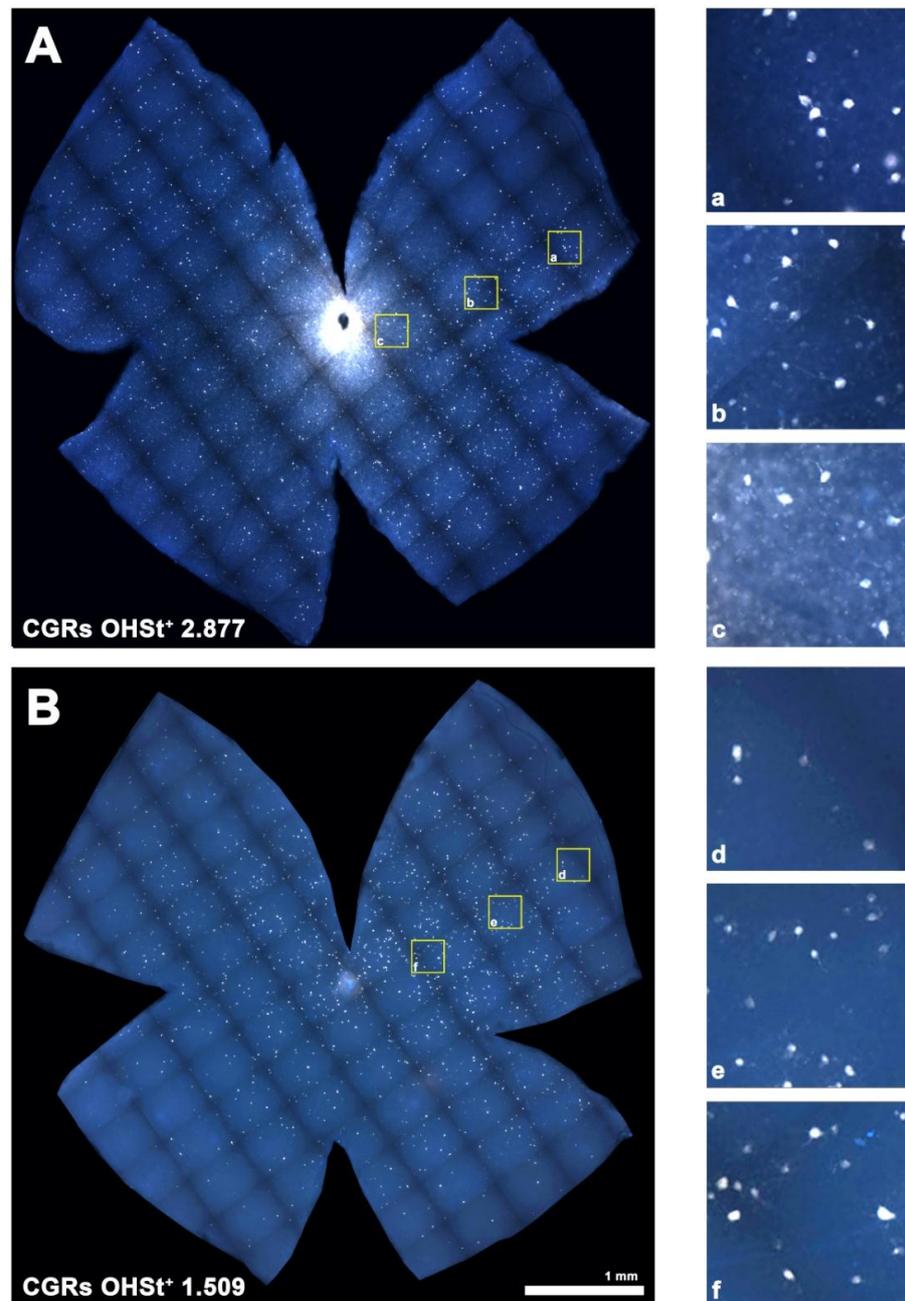


Figura 36: Regeneración de las CGRs a través del injerto de nervio periférico mediante sutura.

A, B: Fotomontajes representativos de dos retinas izquierdas a las que se les ha realizado axotomía e injerto de nervio periférico mediante sutura, en las que se observan las CGRs que regeneran a través del injerto trazadas con OHSt. En las magnificaciones a, d; b, e; c, f se observan a mayor detalle las CGRs Brn3a⁺ en las regiones periférica, media y central de la retina, respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de CGRs contadas en esa retina.

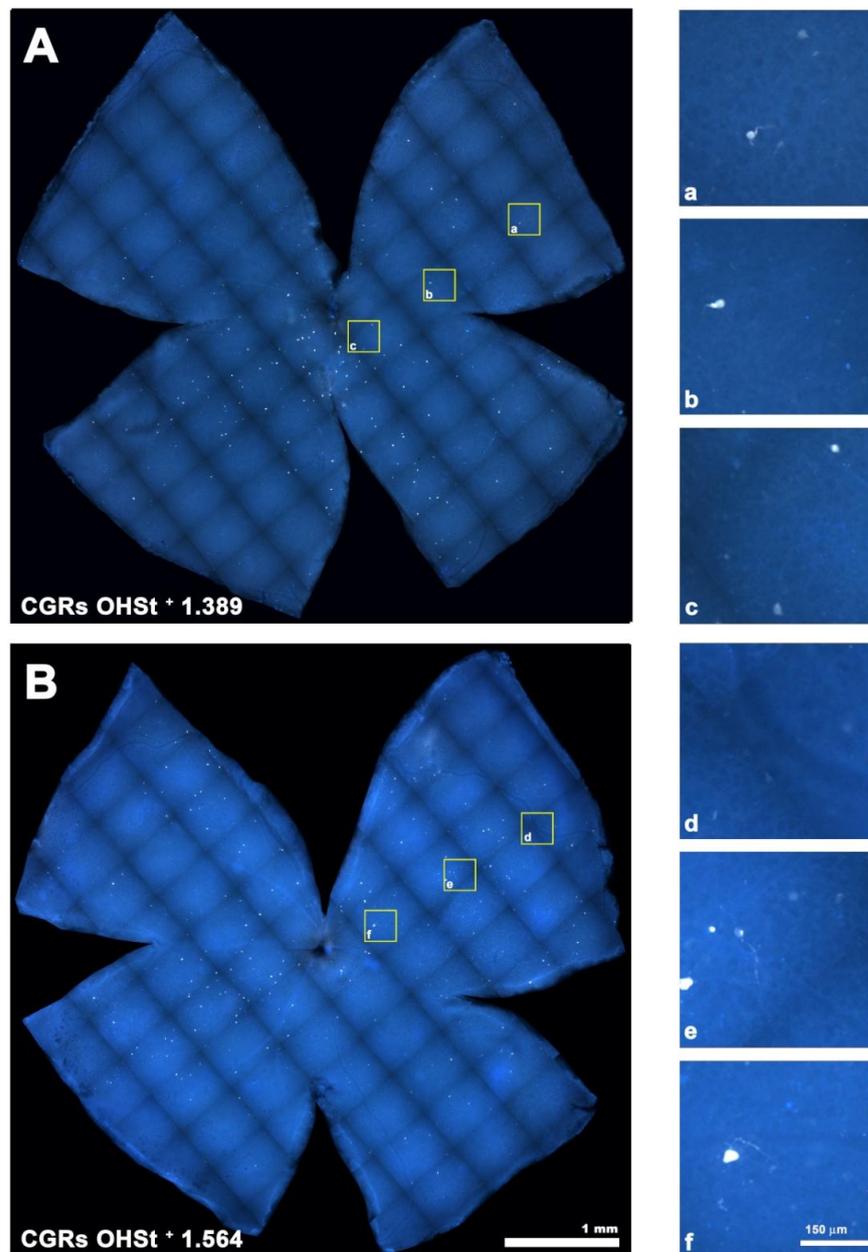


Figura 37: Regeneración de las CGRs a través del injerto de nervio periférico mediante sutura

A, B: Fotomontajes representativos de dos retinas izquierdas a las que se les ha realizado axotomía e injerto de nervio periférico mediante sutura, en las que se observan las CGRs que regeneran a través del injerto trazadas con OHSt. En las magnificaciones a, d; b, e; c, f se observan a mayor detalle las CGRs Brn3a⁺ en las regiones periférica, media y central de la retina, respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de CGRs contadas en esa retina.

Grupo Sutura	
Retina	Número de CGRs-OHSt⁺
1	1.678
2	1.995
3	1.389
4	2.327
5	2.877
6	1.537
7	1.564
8	1.509
9	2.919
10	1.271
11	1.844
12	1.732
Media ± desviación estándar	1.887±599

Tabla 6: Número de CGRs OHSt⁺ en el grupo de axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura

Número total de CGRs-OHSt⁺ contadas en las retinas izquierdas (lesionadas) 28 días después de realizar la axotomía y realizar el injerto de nervio periférico mediante Sutura en los animales estudiados. En la última fila se muestra la media±la desviación estándar.

Si comparamos ambos grupos experimentales (axotomía+Tissucol y axotomía+sutura) comprobamos que existe diferencia estadísticamente significativa (T-test, p=0,002) a favor del grupo experimental que empleó la sutura como medio para realizar el implante del

injerto de nervio periférico, siendo por lo tanto la regeneración de las CGRs mayor en dicho grupo.

Finalmente, estos datos muestran que no todas las CGRs que sobreviven (**tablas 3 y 4**) regeneran (**tablas 5 y 6**) sino que sólo lo hace un porcentaje de las mismas, que es del 10,75% en el grupo tratado con Tissucol y de un 22% en el grupo tratado con sutura.

4.2.3 Estudio Topográfico de las CGRs que regeneran en los diferentes grupos experimentales.

Para el estudio topográfico de las CGRs que regeneran en ambos modelos de injerto, se usaron los mapas de vecinos, por las razones ya expuestas. Estos se muestran en las siguientes figuras: grupo de axotomía e injerto de nervio periférico con Tissucol (sub-apartado 4.2.3.1, **Figuras 38 y 39**) y grupo de axotomía e injerto de nervio periférico con sutura (sub-apartado 4.2.3.2, **Figuras 40 a 42**). Los mapas de las figuras 38, 40 y 41 corresponden a los fotomontajes mostrados en las figuras 35, 36 y 37, respectivamente. En todos los mapas y gráficos correspondientes, independientemente del grupo experimental, se observa que las CGRs que han regenerado sus axones en los injertos de nervio periférico se distribuyen por toda la retina. Es decir, al igual que lo observado en el estudio de supervivencia, estos datos indican además que la aposición del nervio periférico en el nervio óptico ha cubierto todo el muñón. En concordancia con los datos cuantitativos (**Tablas 5 y 6**) en las retinas que han recibido injerto mediante sutura se observa una mayor densidad de CGRs.

4.2.3.1 Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs-OHSt⁺ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissucol.

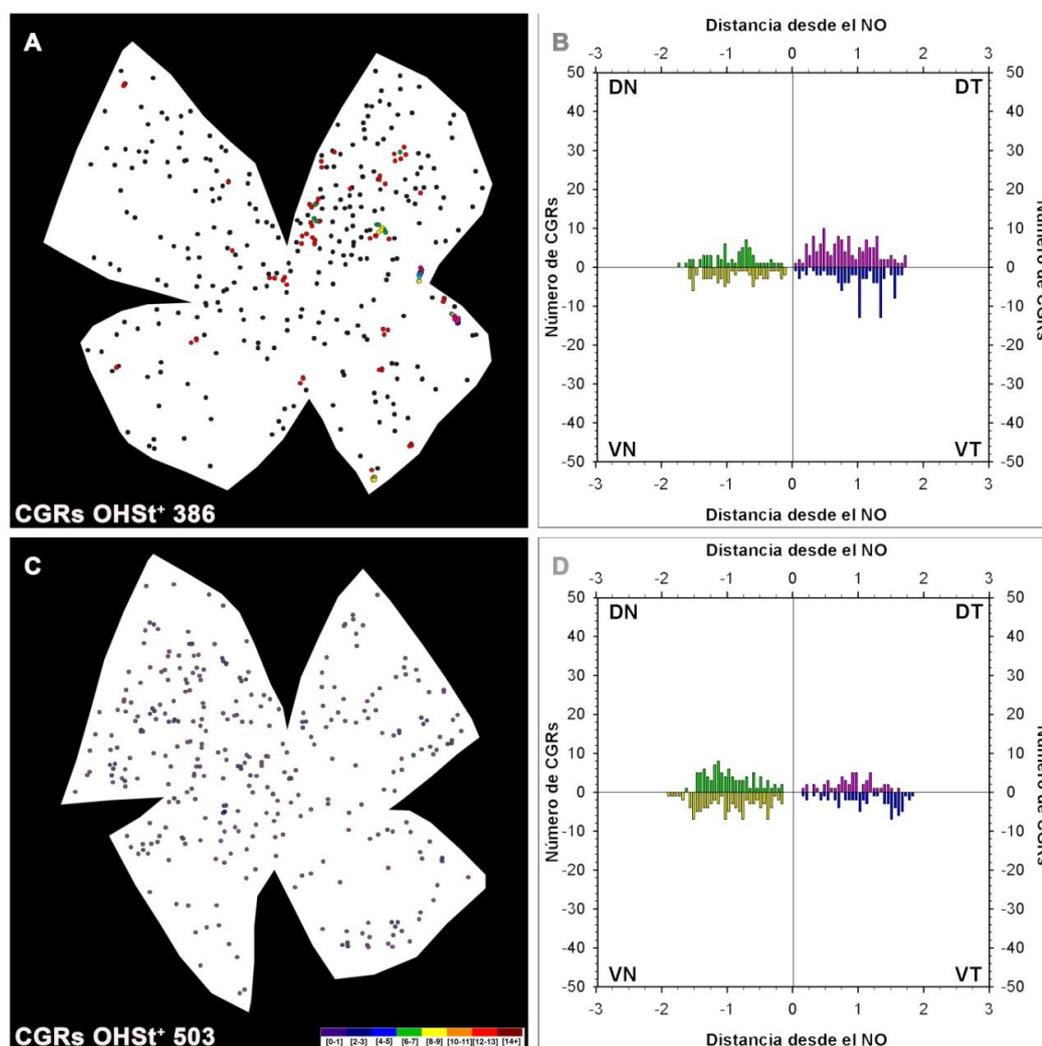


Figura 38: Distribución de CGRs OHSt⁺ en retinas del grupo de injerto con Tissucol

A y C: mapas de vecinos de las retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante Tissucol correspondientes a los fotomontajes de la figura 35. En **B y D** se muestran los datos de los mapas de vecino trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas en esa retina.

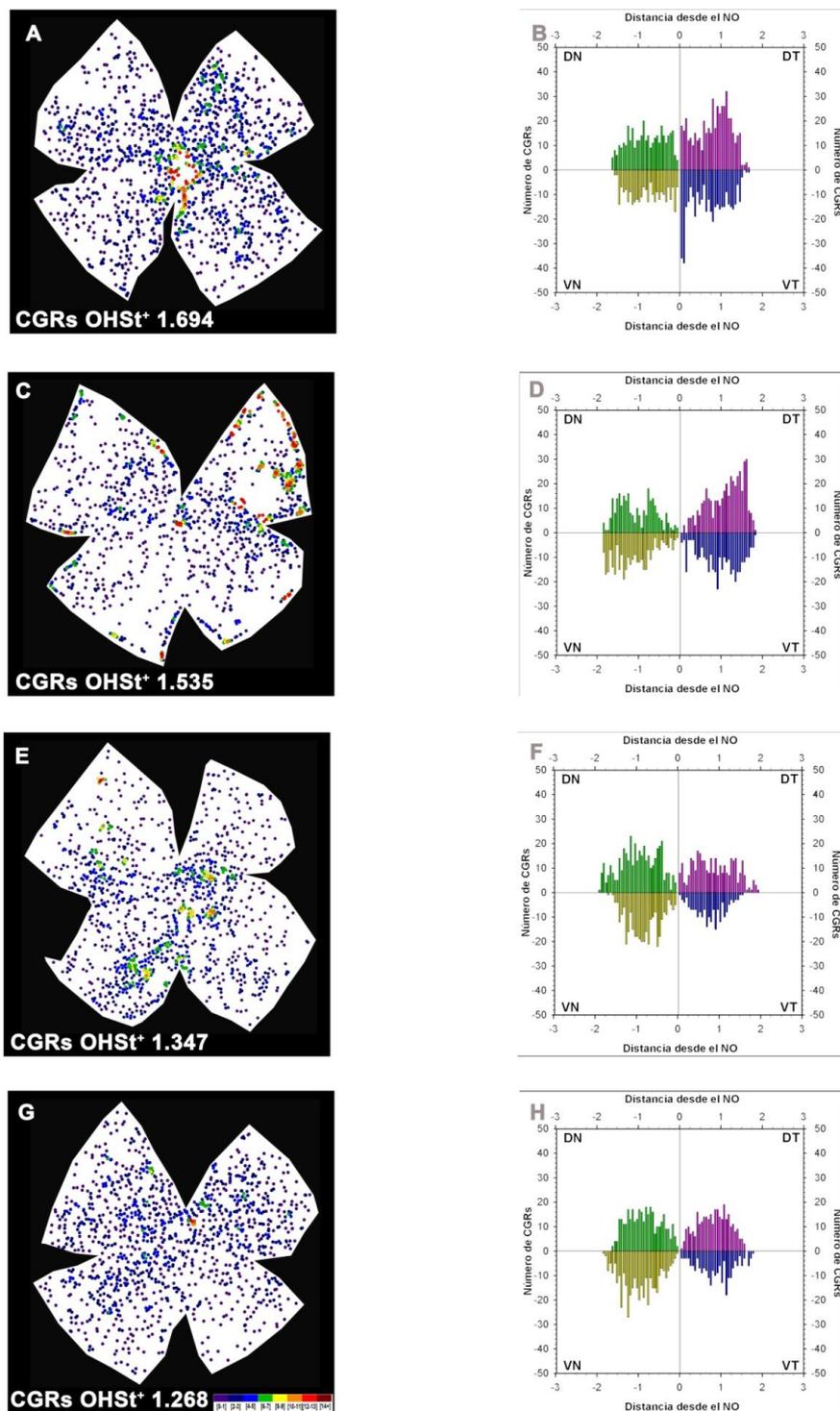


Figura 39: Distribución de CGRs OHSt⁺ en retinas del grupo de injerto con Tissuecol

A, C, E y G: mapas de vecinos de 4 retinas sometidas a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissuecol. En B, D, F y H se muestran los datos de cada mapa de vecinos trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas en esa retina.

4.2.3.2 Representaciones gráficas de la distribución de las CGRs-OHSt⁺ en las retinas de los ojos izquierdos sometidos a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Sutura.

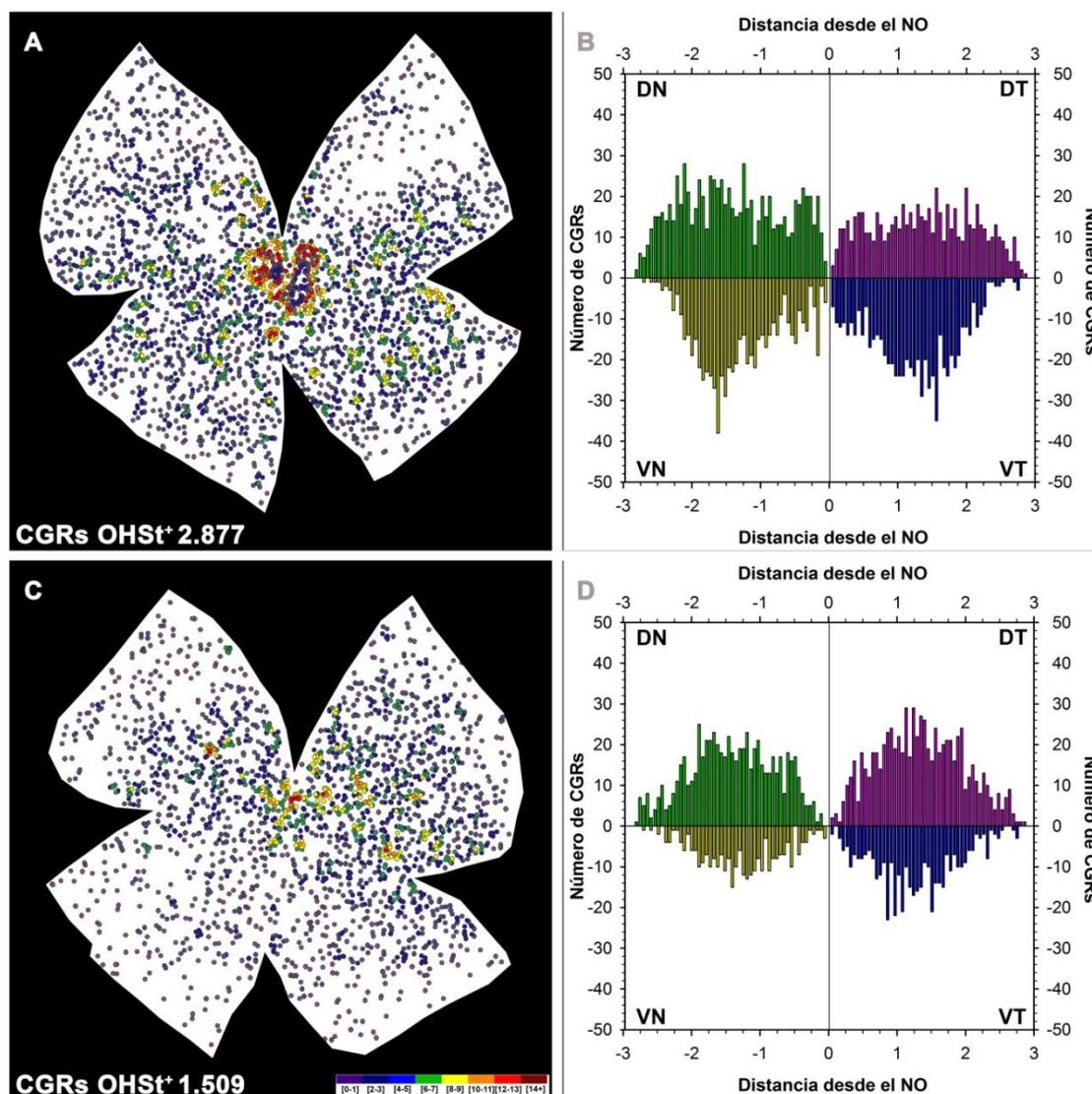


Figura 40: Distribución de CGRs OHSt⁺ en retinas del grupo de injerto con sutura

A y C: mapas de vecinos de las retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura correspondientes a los fotomontajes de la figura 36. En B y D se muestran los datos de los mapas de vecino trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas en esa retina.

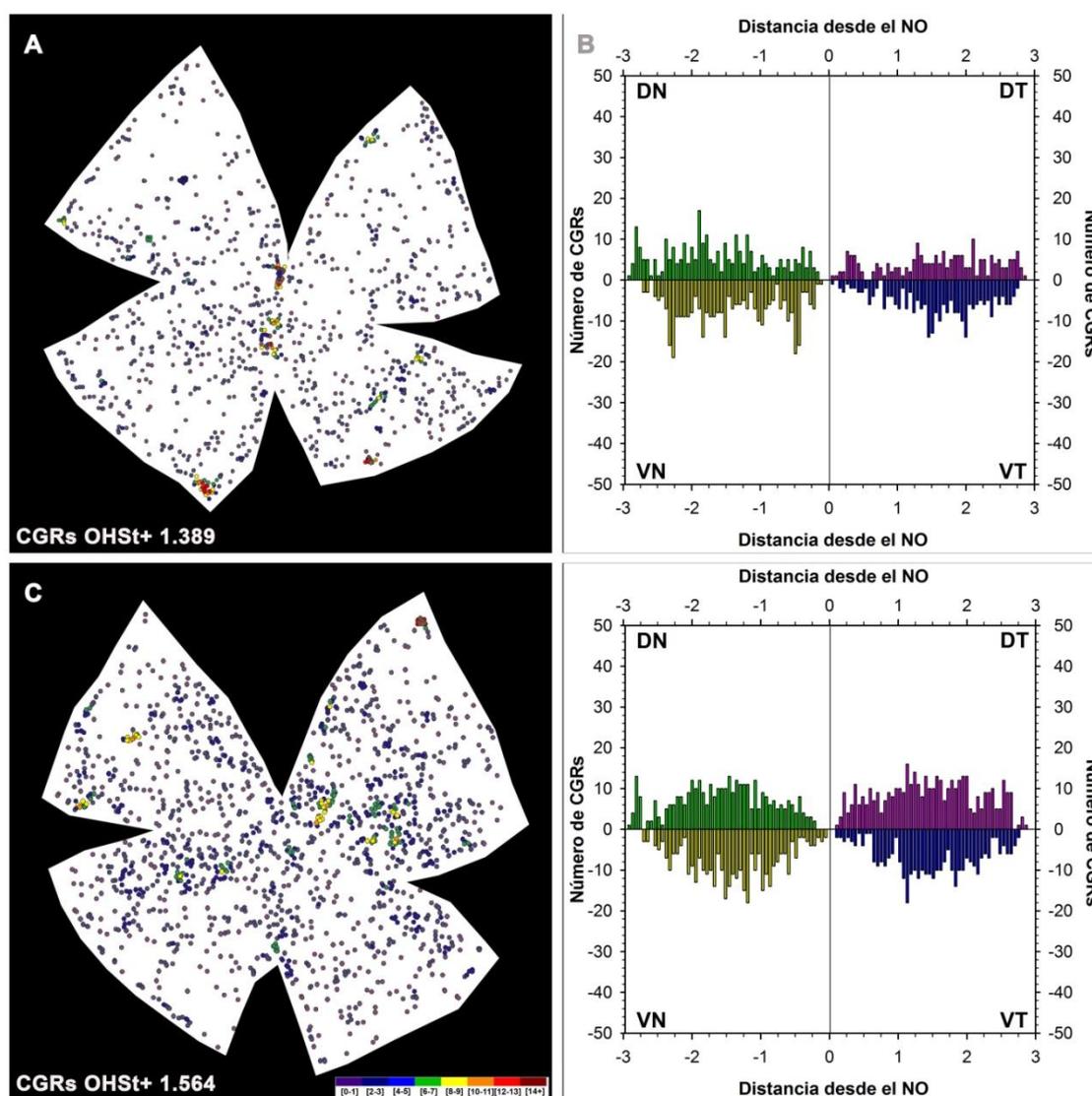


Figura 41: Distribución de CGRs OHSt⁺ en retinas del grupo de injerto con sutura

A y C: mapas de vecinos de las retinas sometidas a axotomía e implante de nervio periférico mediante sutura correspondientes a los fotomontajes de la figura 37. En B y D se muestran los datos de los mapas de vecino trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de CGRs representadas en esa retina.

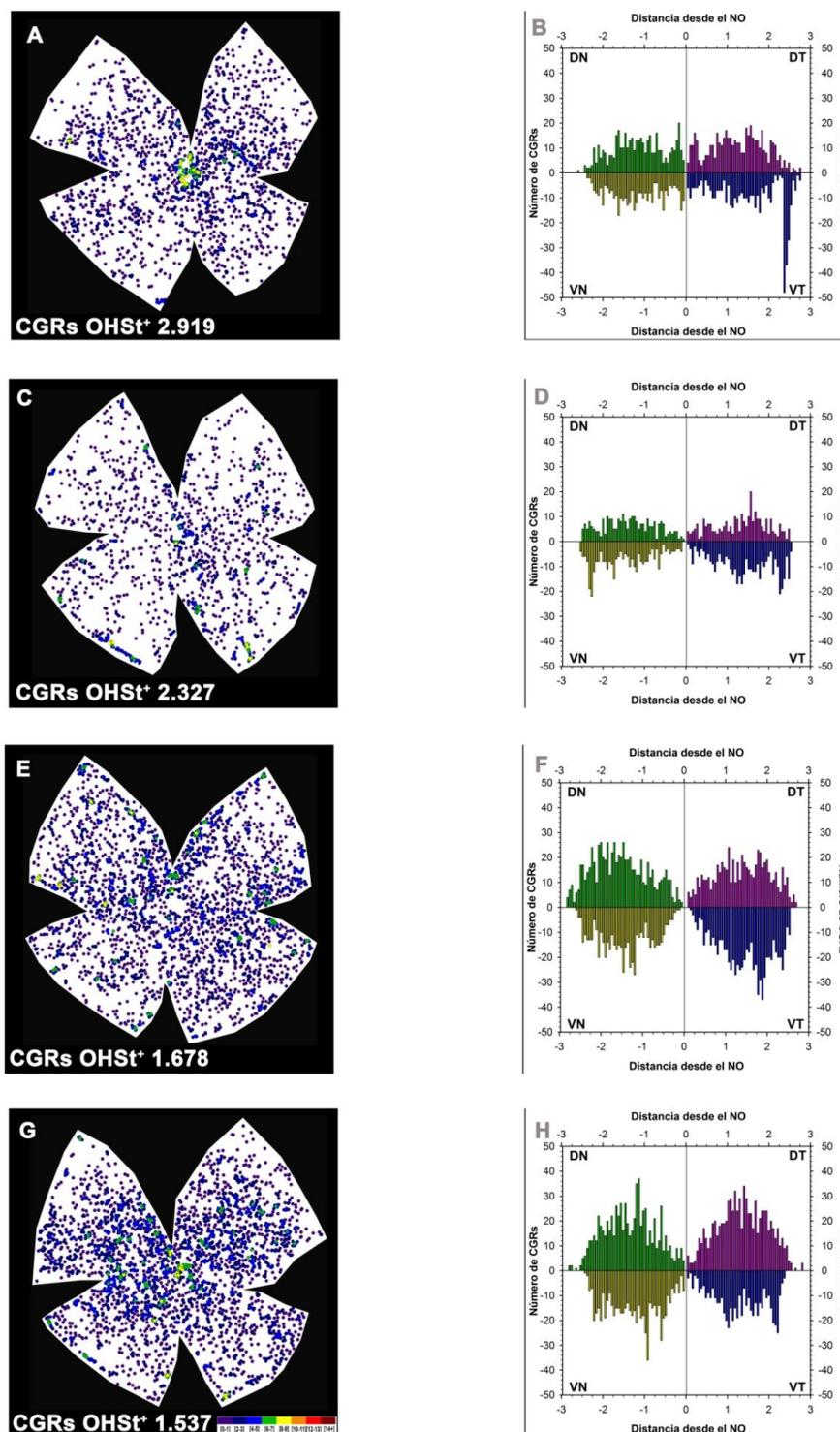


Figura 42: Distribución de CGRs OHSt⁺ en retinas del grupo de injerto con sutura.

A, C, E y G: mapas de vecinos de 4 retinas axotomizadas e implante de injerto de nervio periférico con sutura. En B, D, F y H se muestran los datos de cada mapa de vecinos trasladados a gráficos en los que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN: cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda del mapa se muestra el número total de CGRs representadas en esa retina.

4.3 Población de células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles.

El siguiente objetivo fue determinar cómo la sub-población de CGRs intrínsecamente fotosensibles (ipCGRs) respondía a la axotomía y a los injertos, tanto en supervivencia como en regeneración.

Para determinar esto se inmunodetectó la melanopsina, proteína que se expresa específicamente en esta sub-población de CGRs en retinas de los 3 grupos experimentales. Por motivos técnicos en los grupos de injerto sólo se pudieron cuantificar un número limitado de retinas (ver [Tabla 7](#)), por lo que estos resultados si bien son orientativos, no son determinantes.

Primero se estudió la población de ipCGRs, y después se estudió si las ipCGRs habían regenerado o no, a través del injerto, es decir si estaban trazadas con OHSt.

En la [Figura 43](#) se muestran dos fotomontajes representativos de dos retinas derechas control en las que se ha detectado las ipCGRs junto a imágenes al detalle de las mismas. En los ojos derechos el número medio de ipCGRs fue de 354 ± 75 (n=2).

Los resultados de la cuantificación del número de ipCGRs se muestran en la [Tabla 7](#). En los grupos experimentales el número medio de ipCGRs fue: 168 ± 62 (n=11) en el grupo de axotomía, 110 ± 21 (n=6) en el grupo axotomía+Tissucol y de 198 ± 84 (n=3) en el grupo axotomía+sutura. De modo que el porcentaje de supervivencia de ipCGRs con respecto a la población total de ipCGRs fue de 47% en el grupo de axotomía, de 31% en el grupo axotomía+Tissucol y del 56% en el grupo axotomía+sutura. Fue sorprendente comprobar que el porcentaje de ipCGRs que sobrevive a la axotomía, con o sin injerto de nervio periférico, era muy superior al que se observa para la población de CGRs en general. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre ninguno de los grupos, lo que indica que el injerto de nervio periférico no incrementa la supervivencia de las ipCGRs axotomizadas. Sin embargo, dado que en los grupos con injerto se analizaron pocas retinas, estos datos hay que tomarlos con cautela.

Para nuestra sorpresa, no se observó ninguna ipCGRs trazada retrógradamente con OHSt, por lo que estos datos indican que las ipCGRs no tienen la capacidad de regenerar sus axones a través del injerto de nervio periférico.

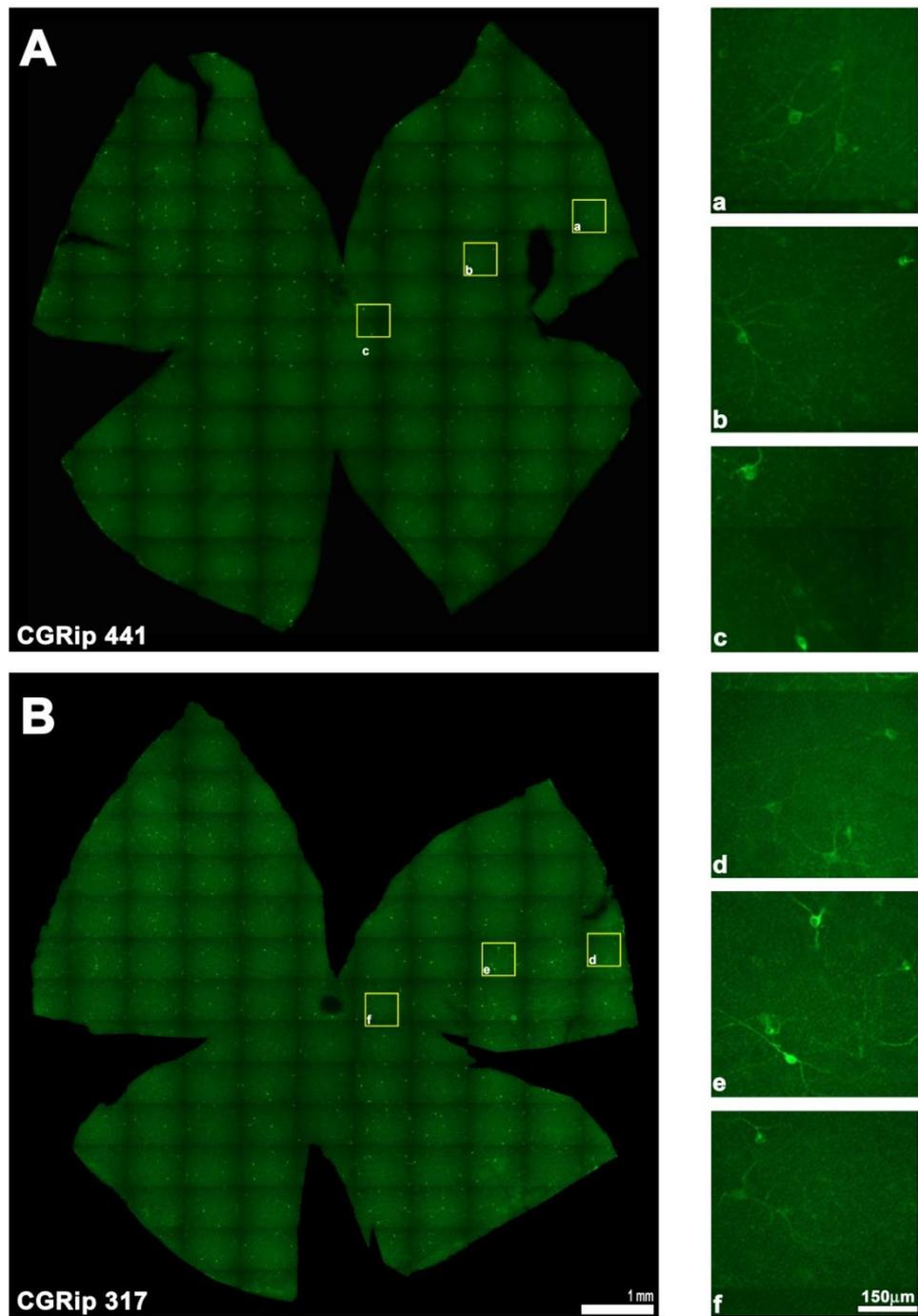


Figura 43: Detección de ipCGRs en retinas derechas (control)

A, B: Fotomontajes representativo de retinas derechas en las que se observan las células ganglionares de la retina inmunodetectadas con melanopsina. Las imágenes a, d; b, e, y c, f son magnificaciones de las regiones periférica, media y central de la retina, respectivamente. En la parte inferior izquierda de cada fotomontaje se muestra el número total de ipCGRs contadas en esa retina.

4.3.1. Supervivencia de las CGRs intrínsecamente fotosensibles

Retina	Axotomía	Tissucol	Sutura
1	101	90	103
2	108	87	230
3	153	101	262
4	256	142	
5	170	115	
6	194	124	
7	267		
8	140		
9	94		
10	206		
11	106		
Media ± desviación estándar	168±62	110± 21	198±84

Tabla 7: Número total de ipCGRs en los diferentes grupos experimentales

Número total de ipCGRs contadas en las retinas izquierdas (lesionadas) 28 días después de realizar la axotomía y el implante de injerto de nervio periférico mediante Tissucol o sutura respectivamente. En la última fila se muestra la media±la desviación estándar.

4.3.2. Estudio Topográfico de las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles en los diferentes grupos experimentales.

Para el estudio topográfico de las ipCGRs que sobreviven en los tres grupos experimentales, se usaron los mapas de vecinos, por las razones ya expuestas. Estos se muestran en las siguientes figuras: retinas control (**Figura 44**), grupo de axotomía (**Figura 45**), injerto de nervio periférico con Tissucol (**Figura 46**) y grupo de axotomía e injerto de

nervio periférico con sutura (Figura 47). Los mapas de las figura 44 corresponden a los fotomontajes mostrados en la figura 43. En todos los mapas y gráficos correspondientes, independientemente del grupo experimental, se observa que la supervivencia de las ipCGRs ocurre por toda la retina. En concordancia con los datos cuantitativos (Tabla 7) no existen diferencias en cuanto al número de ipCGRs que sobreviven en los tres grupos experimentales

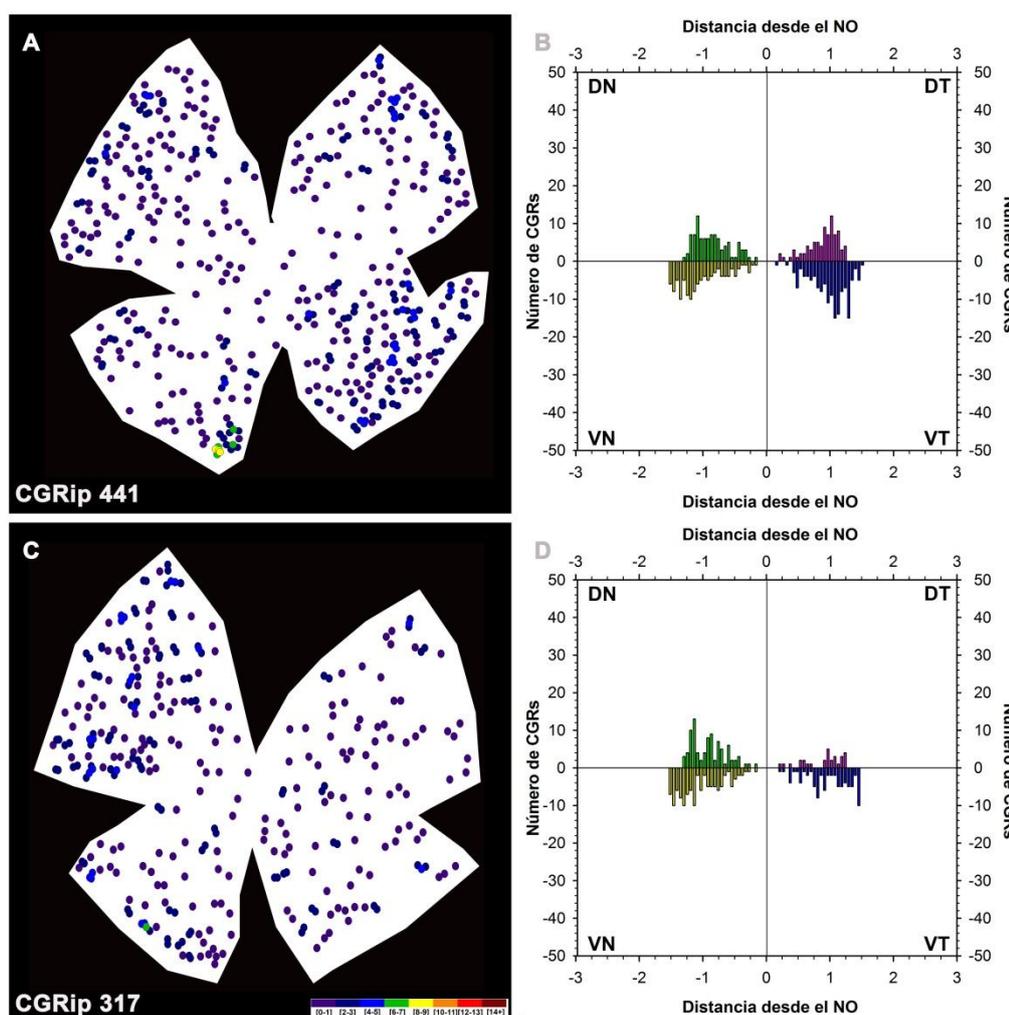


Figura 44: Distribución de ipCGRs en retinas control

Distribución de las ipCGRs en retinas derechas control. En **A**, y **C** se representa los mapas de vecinos de 2 retinas control. En **B**, **D** se muestran los datos del mapa de vecino trasladados a un gráfico en el que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra la derecha. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de ipCGRs representadas.

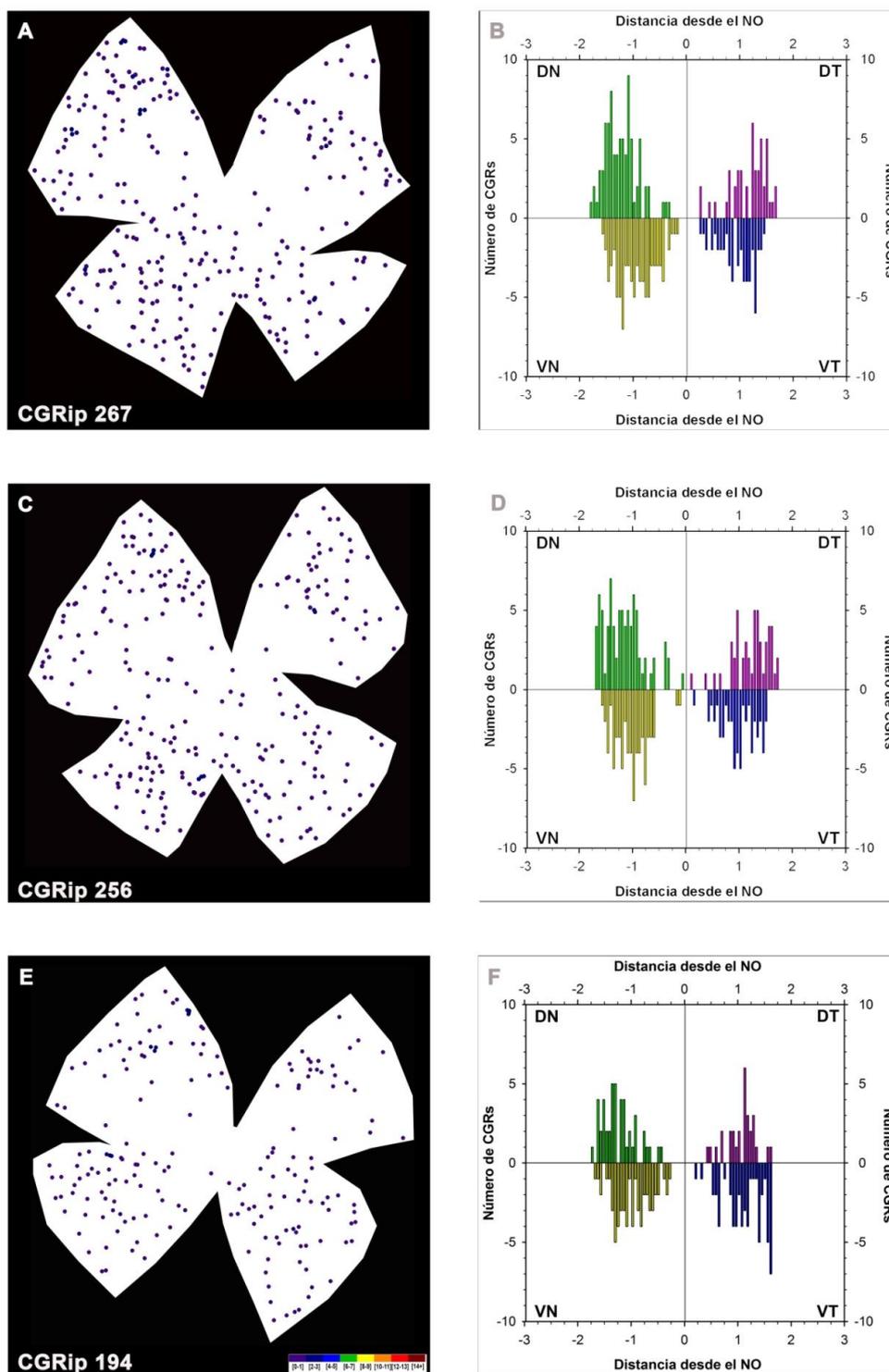


Figura 45: Distribución de ipCGRs en retinas del grupo de axotomía

Distribución de las ipCGRs a 28 días tras la axotomía. En **A**, **C** y **E** se representa los mapas de vecinos de retinas sometidas a axotomía. En **B**, **D** y **F** se muestran los datos del mapa de vecino trasladados a un gráfico en el que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra la izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de ipCGRs representadas.

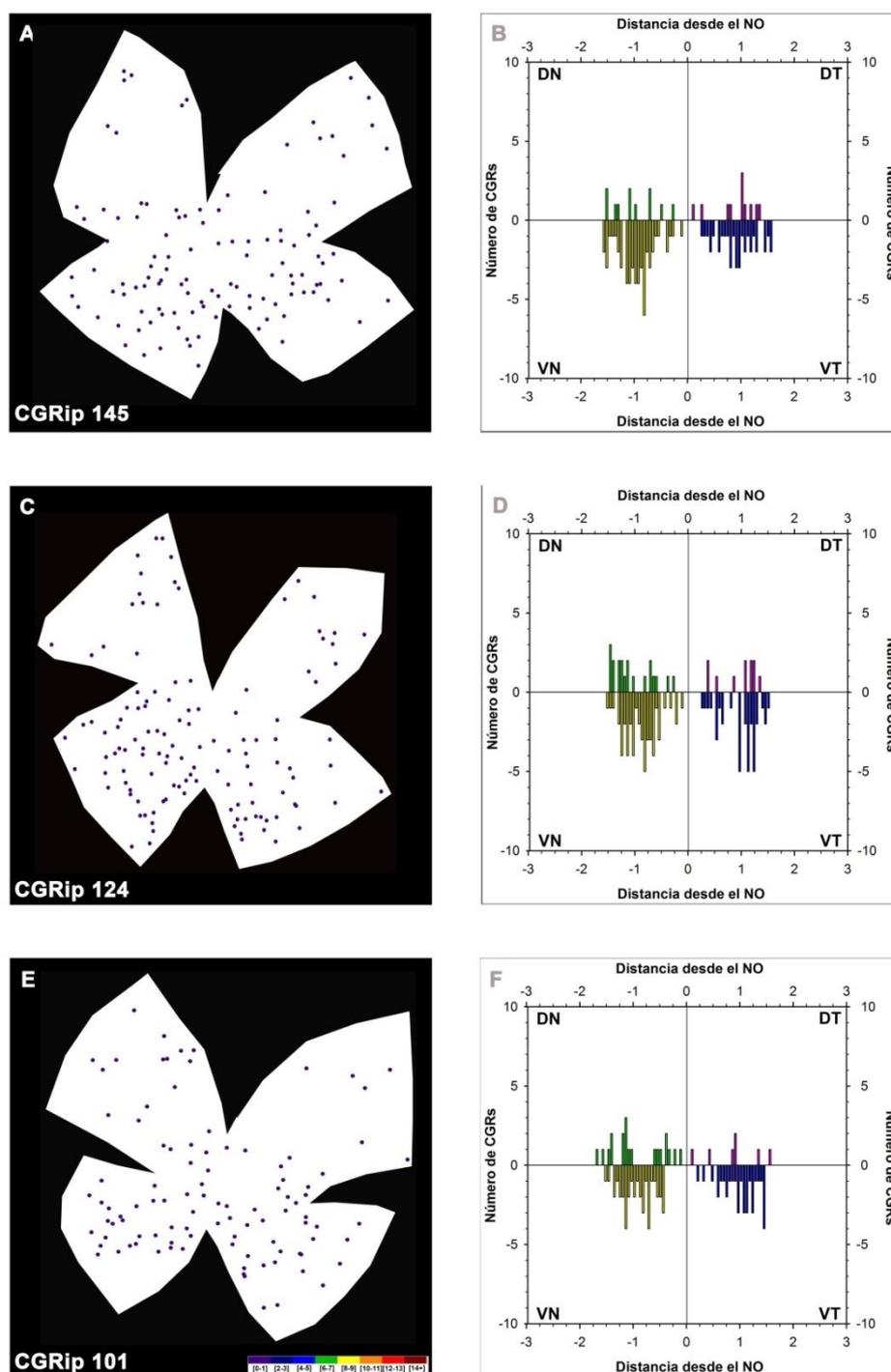


Figura 46: Distribución de ipCGRs en retinas del grupo de injerto con Tissucol

Distribución de las ipCGRs a 28 días tras la axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissucol. En **A**, **C** y **E** se representa los mapas de vecinos de retinas sometidas a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante Tissucol. En **B**, **D** y **F** se muestran los datos del mapa de vecino trasladados a un gráfico en el que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN cuadrante ventro nasal Polo temporal: izquierda. En la parte inferior izquierda de cada mapa se muestra el número total de ipCGRs representadas.

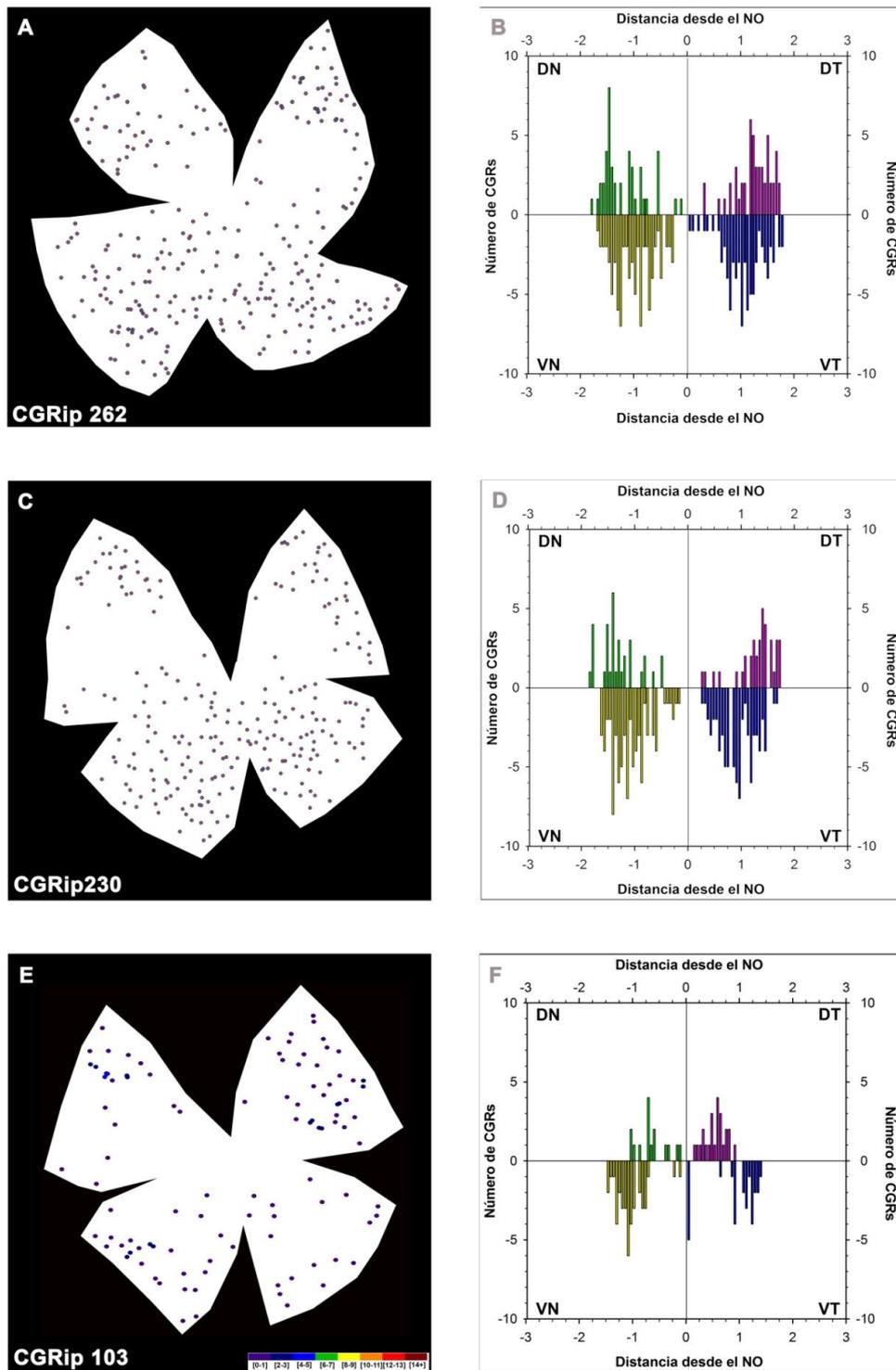


Figura 47: Distribución de ipCGRs en retinas del grupo de injerto con sutura

Distribución de las ipCGRs a 28 días tras la axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante sutura. En A, C y E se representa los mapas de vecinos de retinas sometidas a axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante sutura. En B, D y F se muestran los datos del mapa de vecino trasladados a un gráfico en el que se ha representado el número de CGRs (eje de ordenadas) que hay en cada cuadrante retiniano a distancias crecientes del nervio óptico (eje abscisas). DT: cuadrante dorso temporal, VT: cuadrante ventro temporal, DN: cuadrante dorso nasal, VN cuadrante ventro nasal. El polo temporal se encuentra a la izquierda. En la parte inferior izquierda el número total de ipCGRs representadas.

4.4 Comparación de los distintos grupos experimentales

En este apartado se presenta un resumen de los resultados obtenidos en cuanto a la supervivencia, y regeneración de las CGRs e ipCGRs en los distintos grupos experimentales.

La supervivencia de las CGRs a los 28 días de la axotomía simple es de un 13% de la población original (**figura 48A**). Sin embargo, la presencia de un injerto de nervio periférico apuesto al muñón ocular aumenta significativamente la supervivencia de las CGRs: 22% si el injerto se realiza con Tissucol ($p=0,003$) y un 18% si es con sutura ($p=0,029$). Aunque el injerto mediante Tissucol induce una mayor supervivencia que mediante sutura la diferencia entre ambos métodos de aposición de nervio periférico, no es estadísticamente significativa.

Con respecto a la supervivencia de las ipCGRs (**figura 48B**), se observa que no existen diferencias significativas entre los tres grupos experimentales. Sin embargo es de resaltar que el porcentaje de ipCGRs que sobreviven con respecto a su población original (49%) es significativamente más alto que el de la supervivencia del resto de las CGRs (13%), lo que sugiere que esta sub-población de CGRs es más resistente al daño axonal.

En los gráficos presentados en la **figura 49** se ha calculado el porcentaje de regeneración de CGRs con respecto a población total de CGRs identificadas por trazado axonal retrógrado en esta estirpe de ratón, que es de 48.733 ± 3.954 (datos tomados de Salinas-Navarro y col., 2009b). Se observa que un 2,1% y un 4% de la población original regenera cuando se apone el nervio periférico con Tissucol o con sutura, respectivamente.

En relación con la capacidad de regeneración axonal de las ipCGRs y tal como se mencionó en el apartado 4.3, en esta sub-población de CGRs no hemos observado regeneración de sus axones a través del nervio periférico.

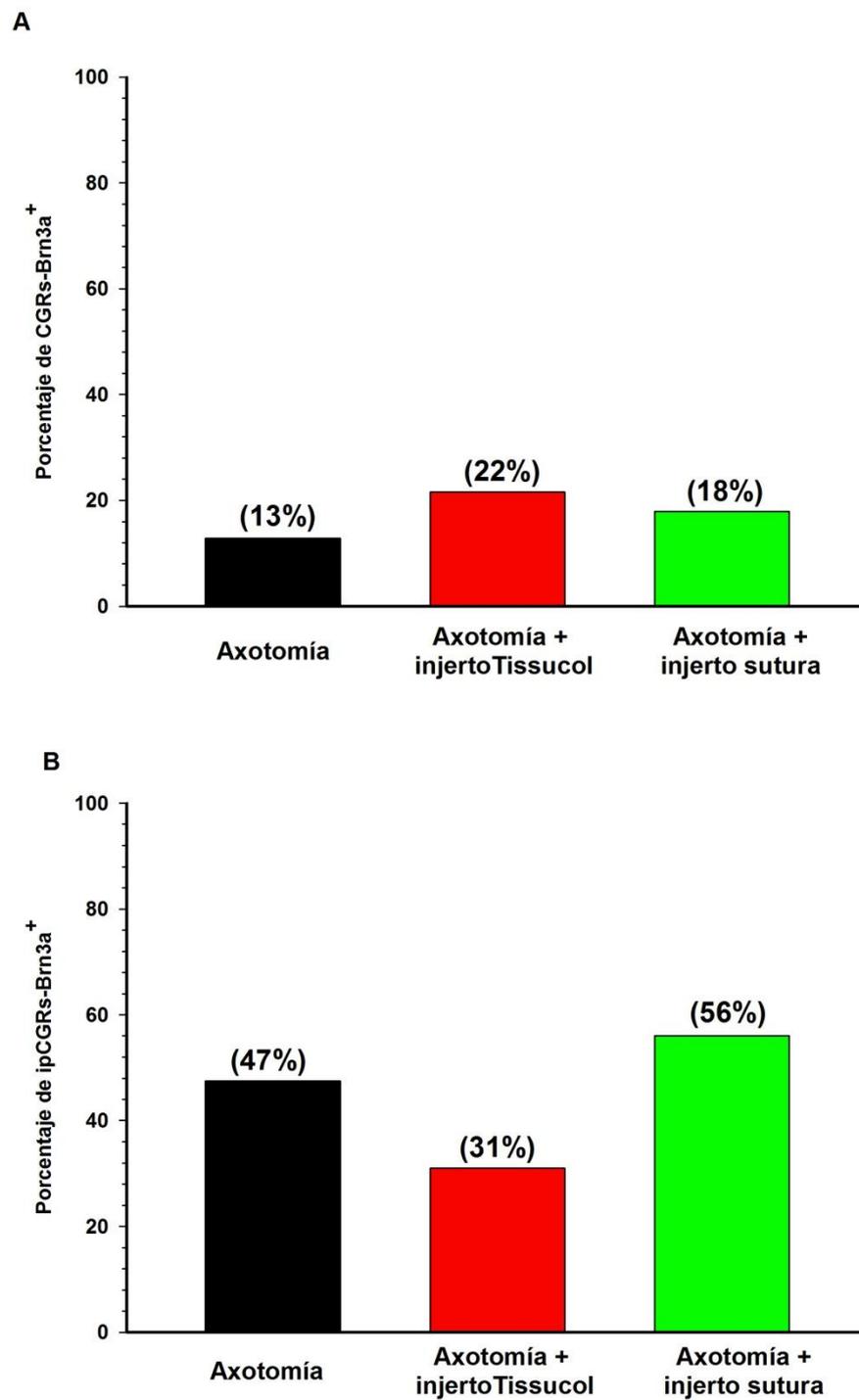


Figura 48: Comparación de la supervivencia de las CGRs e ipCGRs en los distintos grupos experimentales

A: porcentaje de CGRs-Brn3a⁺ que sobreviven en los distintos grupos experimentales. Se ha considerado 100% el número total de CGRs-Brn3a⁺ en los ojos derechos. **B:** porcentaje de ipCGRs que sobreviven en los distintos grupos experimentales. Se ha considerado 100% el número total de ipCGRs en los ojos derechos.

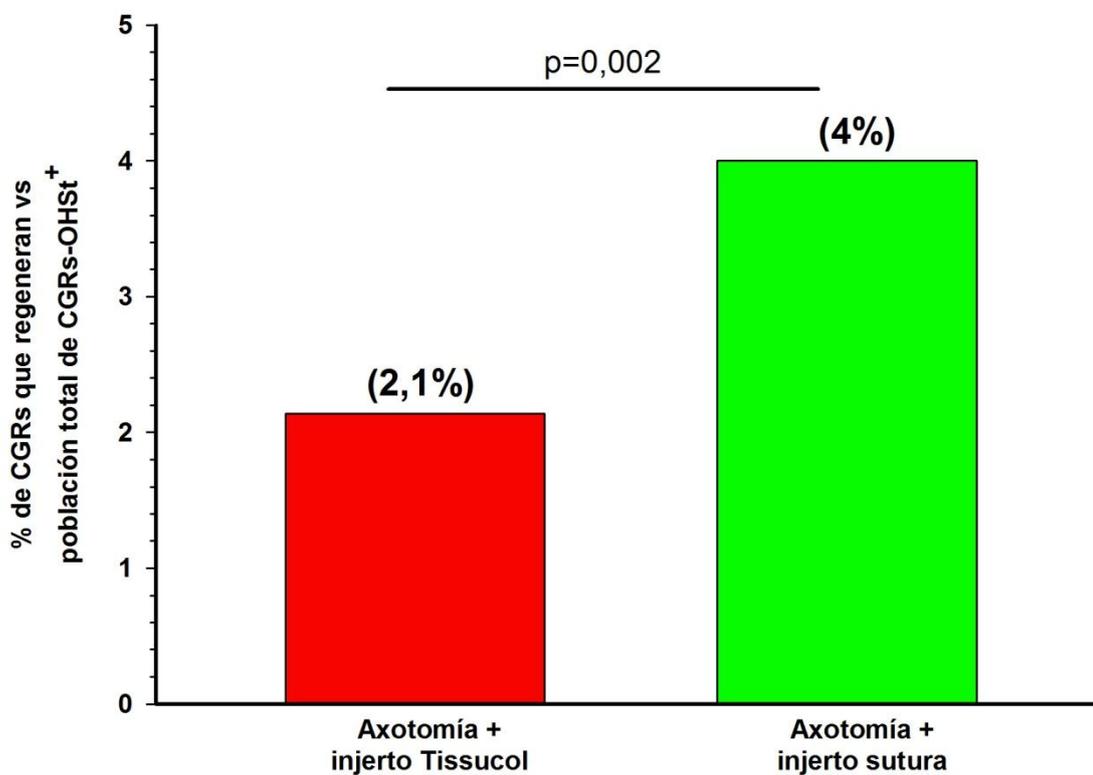


Figura 49: Comparación de la regeneración de las CGRs en los dos grupos que recibieron injerto de nervio periférico.

Porcentaje de CGRs que regeneran en los dos grupos injertados considerando 100% el número total de CGRs-OHSt⁺ en retinas control (datos tomados de Salinas-Navarro et al., 2009b)

DISCUSIÓN

5- DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral hemos estudiado en ratones albinos adultos la supervivencia y regeneración de la población de las células ganglionares de la retina (CGRs) en general y de la subpoblación de las células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipCGRs) en particular, tras la amputación intraorbitaria del nervio óptico y la aposición de un injerto de nervio periférico (nervio tibial) al muñón ocular del nervio óptico seccionado. El injerto se apuso con dos métodos diferentes, utilizando microsuturas o un pegamento biológico.

Los resultados de los experimentos realizados documentan que el implante del injerto de nervio periférico autólogo en el muñón ocular del nervio óptico favorece la supervivencia de las CGRs independientemente del método empleado para la aposición de dicho implante.

La regeneración de las CGRs es significativamente mayor cuando el implante de nervio periférico se ha realiza mediante la utilización de tres puntos de microsutura que cuando se utiliza el pegamento biológico de fibrina. Tanto las CGRs que sobreviven como aquellas que regeneran se encuentran distribuidas de forma difusa por la retina y no se concentran en ninguna región especial ni se distribuyen siguiendo un patrón geográfico especial.

La subpoblación de ipCGRs es especialmente resistente a la axotomía, y su supervivencia no se ve incrementada con el implante de injerto de nervio periférico. Las ipCGRs que sobreviven están distribuidas de forma difusa por la retina. En cuanto a la regeneración, no hemos observado ipCGRs que regeneren a través del injerto de nervio periférico.

5.1 Identificación y supervivencia de las CGRs tras la axotomía

Tal y como se expone en detalle en la introducción, para poder analizar la respuesta de las CGRs a lesión y/o tratamientos es necesario identificarlas y distinguirlas de la población de células amacrinas desplazadas que se encuentran en la misma capa que las CGRs. Los métodos clásicos de tinción no permiten distinguir la población de CGRs de la población de células amacrinas desplazadas a la capa de CGRs pues tienen rangos de tamaños celulares que se solapan. Esta dificultad hizo que se buscaran métodos alternativos de identificación de las CGR. Clásicamente las CGRs se han identificado trazándolas desde sus regiones de proyección (Vidal-Sanz et al., 1988; Thanos et al., 1987), de entre estos métodos el más usado es el trazado con fluorogold o su análogo OHSt (Peinado-Ramón et al., 1996; Salinas-Navarro et al., 2009a,b). Recientemente, se han descrito marcadores

moleculares, proteínas y/o sus ARN mensajeros, que en retina se expresan sólo en las CGRs (ver apartado 1.8 de la introducción) o en subpoblaciones de las mismas, como la melanopsina que se expresa únicamente en las CGRs intrínsecamente fotosensibles (Provenzio et al., 2002; Galindo-Romero et al., 2013) o la proteína de conectividad de adhesión B (JAM-B, del inglés *junctional adhesion molecule B*) que se expresa específicamente en CGRs que responden selectivamente al movimiento hacia arriba (Kim et al., 2008). La combinación de ambas metodologías (trazado axonal retrógrado e identificación inmunohistofluorescente de marcadores moleculares) permite conocer cuántas CGRs mantienen un axón competente en el momento del trazado y cuántas están vivas aunque el transporte axonal esté dañado (Salinas-Navarro et al., 2009c, 2010; Vidal-Sanz et al., 2012, Agudo-Barriuso et al., 2013).

En este trabajo, y por primera vez, hemos combinado ambas metodologías de identificación de CGRs en la retina del ratón albino. Así, la supervivencia de la población general de CGRs se determinó inmunodetectando el *Brn3a* ya que este factor de transcripción se expresa en un 92,6% de las CGRs de ratón albino (Galindo-Romero et al., 2013), y la de las ipCGRs inmunodetectando la melanopsina. De éstas, aquellas que se marcaron retrógradamente y por tanto resultaron trazadas con OHSt son las que regeneraron a través del injerto. De esta manera documentamos que el injerto de nervio periférico tiene un efecto neuroprotector sobre la población general de CGRs, ya que tras el injerto sobreviven más CGRs que en el caso en el que sencillamente se secciona el nervio óptico y no se hace nada más (axotomía simple), y que sólo una parte de las CGRs que sobreviven regeneran sus axones. La subpoblación de ipCGRs sin embargo, se comporta de una manera bastante diferente, puesto que si bien es más resistente a la axotomía que el resto de las CGRs, no responde al injerto ni en términos de neuroprotección ni en términos de regeneración. Nuestros resultados en retinas de ratón albinas son concordantes con estudios previos en los que se investigó la respuesta a la axotomía de las ipCGRs en retinas de ratones pigmentados, en los que también se observó que ésta subpoblación era más resistente a la axotomía (Robinson y Madison 2004).

La degeneración de las células ganglionares de la retina que se produce tras la axotomía en ratas se lleva a cabo en dos fases. Una fase rápida que se produce en las dos primeras semanas después de la lesión, perdiéndose más del 90% de las CGRs entre los días 2 y 9, y una fase más prolongada que dura varios meses (Villegas-Pérez et al., 1993). El curso temporal de muerte de las CGRs por axotomía simple es similar entre la rata y el ratón (Peinado-Ramón et al., 1996, Parrilla-Reverter et al., 2009, Nadal-Nicolás et al., 2010, Galindo-Romero et al., 2011). En ambas especies, a los 15 días de la lesión sobrevive alrededor de un 15% de la población original de CGR. En el estudio de Galindo Romero y colaboradores (2011) se observa una supervivencia del 33% de las CGRs a 7 días post-

lesión, tanto si las CGRs se han identificado trazándolas con OHSt como inmunodetectándolas con Brn3a. Este porcentaje de supervivencia es inferior al 50 y 54% descrito en los estudios de Murphy et al., (2007) y Lebrun Julien et al., (2009) respectivamente al mismo tiempo post-lesión. Sin embargo, en el decimocuarto día tras la lesión tanto en los estudios de Lebrun Julien et al., (2009) como en el estudio de Galindo Romero et al., (2011) se observa una supervivencia entre el 11-15% de las CGRs. Las diferencias observadas a los 7 días post-lesión se podrían explicar en base a la diferente metodología empleada, pues en el trabajo de Galindo-Romero et al., (2011) se cuantificó la población total de CGRs supervivientes, mientras que en los de Murphy et al., (2007) y Lebrun Julien et al., (2009) se contó manualmente las CGRs que sobrevivían en muestras tomadas de la retina. Otra explicación posible sería el efecto que tiene la distancia de la cabeza del nervio óptico a la cual se realizó la axotomía, pues se sabe que la degeneración retrógrada de las CGRs es mas lenta si esta distancia es mayor (Villegas-Pérez et al.,; 1993). Nuestros datos en ratones albinos muestran que a los 28 días de la axotomía simple, la supervivencia es de aproximadamente el 13% de la población de CGRs-Brn3a⁺ originales, un valor que es comparable al encontrado en en ratones pigmentados a los 21 (11%, Galindo-Romero et al., 2011) y a los 30 (Robinson y Madison, 2004) días de la sección intraorbitaria del nervio óptico.

La utilización de mapas de isodensidad o de vecinos permite determinar de manera objetiva la distribución de la población de CGRs y compararla con su distribución normal en la retina. En este trabajo se muestra que la axotomía induce una muerte difusa de CGRs que afecta por igual a toda la retina. Esto indica que no se induce un daño específico sectorial o regional en la retina, sino que la degeneración de las CGRs que sucede a la sección del nervio óptico ocurre por toda la retina y sigue un patrón difuso similar al observado previamente en la rata (Nadal-Nicolás et al., 2010; Sánchez-Migallón et al., 2011; Nadal-Nicolás et al., 2012). Nuestros datos concuerdan con publicaciones previas en ratón en las que, usando mapas de isodensidad, se observó que la axotomía del nervio óptico, bien por sección bien por aplastamiento, induce la muerte generalizada por toda la retina (Galindo-Romero et al., 2011). Sin embargo en este trabajo de Tesis, nosotros no hemos usado los mapas de isodensidad para determinar la topografía de las CGRs supervivientes o que han regenerado, sino mapas del vecino más próximo. Esta técnica es una mejora a los mapas de isodensidad cuando se quiere analizar la distribución de poblaciones pequeñas.

La distribución de CGRs que habían regenerado o sobrevivido a la axotomía en la retina, que hemos observado en este trabajo indica que no se produjeron daños vasculares a la retina en el momento de realizar la sección del NO y la aposición del injerto de nervio periférico. Una lesión vascular importante de los vasos retinianos antes de su entrada en la

retina, en la región inferonasal de las cubiertas durales del nervio óptico, habría resultado en la degeneración masiva de la población de CGR, mientras que la lesión de alguna de las ramas vasculares intrarretinianas habría resultado en un característico patrón de degeneración sectorial con base en la periferia y vértice en el disco óptico, y una isquemia generalizada de la retina habría resultado en un patrón geográfico típico de degeneración difusa y focal en la retina (Lafuente et al., 2002).

5.2 Comparación de la supervivencia de las CGRs tras axotomía vs axotomía e implante de injerto de nervio periférico en rata y ratón.

En ratas adultas se ha documentado que el implante de un injerto de nervio periférico (Villegas-Pérez et al., 1988) resulta en un incremento de la supervivencia de las CGRs de estos animales. Los datos de nuestro estudio documentan que en ratones Swiss también se produce un importante efecto rescate de los injertos de nervio periférico sobre la población de CGRs axotomizadas del ratón a las 4 semanas de la lesión. Este efecto neuroprotector se observó tanto cuando el injerto se apuso con Tissucol como con microsuturas, sin que la diferencia entre ambos métodos resultara significativa. Se ha postulado que este efecto neuroprotector del injerto de nervio periférico se debe a la producción de múltiples factores neurotróficos por las células de Schwann denervadas del injerto de nervio periférico (Vidal-Sanz et al., 1993, Villegas-Pérez et al., 1988). En efecto, la inyección intraocular de un buen número factores tróficos y sustancias producidas por las células de Schwann denervadas, como el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) o la neurotrofina 4 (NT-4) han demostrado tener un efecto neuroprotector en la supervivencia de las CGR axotomizadas (Vidal-Sanz et al., 2000; Peinado-Ramón et al., 1996; Sanchez-Migallón et al., 2011; Galindo-Romero et al., 2013b).

El rescate de las CGRs tras axotomía es un área de intenso estudio. Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado terapias que resulten en la prevención total de la degeneración de las CGRs inducida por este tipo de lesión. Los mejores tratamientos consiguen ralentizar el curso de la muerte de las CGRs y retrasar su inicio. Entre ellos el mejor es la administración de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain derived neurotrophic factor*) o la neurotrofina 4 (NT4) que consigue rescatar al 100% de la población de CGRs a los 7 días de la axotomía en rata albina adulta (Peinado-Ramón et al., 1996, Parrilla-Reverter et al., 2009a; Sánchez-Migallón et al., 2011). En el ratón la administración de BDNF induce la supervivencia del 75% de las CGRs de ratón albino o pigmentado a los 5 días tras la lesión (Galindo-Romero et al., 2013b). En ambas especies la supervivencia es significativamente mayor a los 15 días tras la axotomía cuando la retina se trata con BDNF que cuando se trata con vehículo, pero en ambas especies se observa

también que el curso temporal de muerte tiene la misma tendencia que en animales sin tratamiento, sólo que en el caso de los animales tratados con BDNF se retrasa el comienzo de la degeneración en unos 3-5 días.

Aunque se pensó que incrementar la supervivencia de las CGR a la axotomía resultaría en una capacidad de regeneración mayor, eso no se ha demostrado que sea así ni cuando se emplean factores neurotróficos (Mansour-Robaey et al., 1994) ni cuando se analizan ratones transgénicos que sobreexpresan el gen antiapoptótico bcl-2 (Inoue et al., 2002). En el ratón bcl-2 (que sobreexpresa el gen que codifica la proteína antiapoptótica bcl-2), la supervivencia de las CGR a las cuatro semanas de la axotomía fue del 65% de la población original de CGR mientras que en el ratón silvestre la supervivencia fue del 6% de la población original de CGR. Sin embargo el porcentaje de CGR que regeneraban en injertos de nervio periférico, en relación con la población normal de CGR y a la población de CGR que sobrevivía a la axotomía, era muy inferior para el ratón bcl-2 en comparación con el ratón silvestre. Por ejemplo, en el ratón silvestre regeneraba el 7,7% de la población de CGR supervivientes mientras que en el ratón bcl-2 regeneraba el 0,5% de la población de CGR supervivientes (Inoue et al., 2002). Estos resultados documentan que la inmensa mayoría de las CGR que sobreviven a la amputación del NO en el ratón bcl-2 son incapaces de regenerar sus axones en injertos de nervio periférico y que por tanto un incremento de la supervivencia no garantiza un incremento en el número de células que regeneran sus axones.

Nuestros estudios en ratones albinos confirman pues que no todas las CGRs que sobreviven a la axotomía son capaces de regenerar sus axones a lo largo del injerto de nervio periférico. ¿Por qué no regeneran todas las CGRs que sobreviven? Sigue siendo un tema de estudio y una cuestión sin resolver, comprender porqué la capacidad de regeneración axonal se ve reducida a un pequeño porcentaje de la población normal de células ganglionares de la retina. A fecha de hoy no tenemos datos para contestar a esta pregunta, pero teniendo en cuenta que existen más de 20 subtipos de CGRs y las diferencias que hemos encontrado en este estudio entre las CGRs y las ipCGRs, pudiera ser que cada subtipo de CGRs tuviera una resistencia a la axotomía y una capacidad regenerativa distinta. Es posible, de hecho, que las CGRs que sobreviven y regeneran sean de un subtipo, y las que sobreviven de otro. Sin embargo la carencia de marcadores específicos para cada subtipo impide determinar si esto es así y sería un tema de trabajo interesante para el futuro a medida que se vayan identificando marcadores moleculares específicos de las subpoblaciones de CGR.

5.3 Comparación de la regeneración de las CGRs tras axotomía vs axotomía e implante de injerto de nervio periférico en rata y ratón.

Se ha demostrado que la regeneración axonal en el SNC es posible bajo condiciones experimentales como la colocación en el lugar de la lesión axonal de un segmento de nervio periférico (David y Aguayo 1981), células de Schwann (Xu et al., 1999), precursores de las células de Schwann (Agudo et al., 2008b), trasplante de células de la glía envolvente del bulbo olfatorio (Li et al., 1997; Moreno-Flores et al., 2006), los macrófagos activados (Lazarov- Spiegler et al., 1996, 1998) y la administración de factores tróficos (Cheng et al., 1996; Menei et al., 1998; Peinado-Ramón et al., 1996; Parrilla-Reverter et al., 2009), de agonistas del receptor del ácido retinoico (Agudo et al., 2010), de anticuerpos contra las moléculas inhibitoras del crecimiento (Schnell y Schwab 1990) o de enzimas que degradan la matriz extracelular (Bradbury et al., 2002).

Uno de los modelos, ya clásicos y mejor documentados, para investigar la capacidad de regeneración axonal en el sistema nervioso central del mamífero adulto consiste en implantar un segmento autólogo de nervio periférico en el muñón ocular del nervio óptico seccionado intraorbitariamente (Vidal-Sanz et al., 1987; 1991; 1993; 2002). En estudios previos realizados en ratas se ha demostrado que una pequeña proporción de las CGRs que sobreviven regeneran extendiéndose a lo largo de los injertos, pudiendo incluso restablecerse una simple función visual como es el reflejo pupilar a la luz (Whiteley et al., 1998; Avilés-Trigueros et al., 2000; Vidal-Sanz et al., 2002). En nuestro estudio mostramos como en ratones Swiss entre un 2 y un 4% de las CGRs originales regeneran en función de si el implante del injerto de nervio periférico se realizó con Tissucol o microsuturas, respectivamente. Estos porcentajes de regeneración axonal, en relación con la población de CGRs original, indican que la capacidad de regeneración axonal está presente en el ratón albino, de modo similar a como ocurre en el ratón pigmentado (Inoue et al., 2002; Robinson y Madison, 2004), la rata albina (Vidal-Sanz et al., 1987) y el hámster sirio (Carter et al., 1989).

En nuestros estudios en el ratón albino hemos observado que cuando la aposición del injerto se realiza con microsuturas la capacidad de regeneración axonal oscila alrededor del 4% de la población original de CGR, una cifra similar al 4% que se obtiene en ratas adultas (Vidal-Sanz et al., 1987). Desconocemos porqué en nuestros estudios la regeneración a través del injerto apuesto mediante sutura es casi el doble que cuando la aposición del injerto se realiza con el pegamento de fibrina Tissucol. Es posible que la aposición del injerto mediante microsutura resulte en una mejor coaptación de ambos extremos nerviosos y esto facilite la regeneración porque con las microsuturas ambos cabos (nervio óptico y nervio periférico) conectan directamente mientras que al aponer los dos nervios con

Tissucol es este compuesto el que está en contacto directo con ambos nervios. Es decir, es posible que el contacto directo con el nervio periférico presente un sustrato más atractivo para los conos de crecimiento de los axones del muñón ocular, que el coágulo de fibrina ofrecido por el Tissucol. Alternativamente se podría pensar que la técnica de anastomosis con sutura es más eficiente que la técnica que emplea el pegamento de fibrina, aunque estudios previos por otros autores son contradictorios, pues argumentan que el pegamento de fibrina es más eficaz que las microsuturas en el implante de injertos de nervio periférico al muñón ocular del nervio óptico seccionado intraorbitariamente de la rata adulta (Robinson y Madison, 2000). En cualquier caso, la regeneración, al igual que la supervivencia, también ocurre de forma difusa por toda la retina. Esto indica por una parte una buena coaptación del cabo proximal del injerto sobre el muñón ocular, y por otra indica que no hay ninguna región de la retina que muestre una mayor predisposición a la regeneración axonal, sino que este efecto es generalizado entre la población de CGRs supervivientes.

Nuestros resultados de regeneración axonal de la población de CGR del ratón albino utilizando microsuturas para el implante del injerto (4% de la población original del CGR) parecen mucho mayores que los que se han reportado en ratones pigmentados (0,5% de la población original del CGR) (Robinson y Madison 2004). Es posible que esto se deba a una diferencia en la capacidad de regeneración de animales albinos frente a pigmentados, pues se han observado diferencias similares en la capacidad de regeneración de las ratas albinas y pigmentadas (Salinas-Navarro M, observaciones no publicadas) con una mayor capacidad regenerativa en las retinas de ratas albinas.

5.4 Comparación de la supervivencia y regeneración de las ipCGRs tras axotomía vs axotomía e implante de injerto de nervio periférico en rata y ratón.

Las ipCGRs son una subpoblación de las células ganglionares de la retina que gracias a su pigmento, la melanopsina, son capaces de detectar directamente el nivel de luz ambiental (Hattar et al., 2002; Provencio et al., 2000). En rata, las CGRs proyectan principalmente y de forma masiva a los colículos superiores (Salinas-Navarro et al., 2009b). Las ipCGRs proyectan, entre otros, principalmente al núcleo supraquiasmático (Gooley et al., 2001) centro responsable de la sincronización circadiana, y al núcleo intergeniculado y núcleo de la oliva pretectal donde contribuyen al reflejo pupilar a la luz (Hattar et al., 2002). Recientemente se ha demostrado que, en la rata, la mayor parte de esta población proyecta también a los colículos superiores (Galindo-Romero et al., 2013). Aunque el número de retinas analizadas es bajo, los resultados de nuestros grupos experimentales son

consistentes en mostrar que esta subpoblación de ipCGRs es particularmente resistente a la axotomía, y sin embargo no presenta capacidad de regeneración axonal.

En diferentes trabajos se ha observado que la población de ipCGRs supone el 2,5% de las CGRs en rata y aproximadamente el 1% en ratón (Hattar et al., 2002; Galindo Romero et al., 2013) siendo en nuestro estudio del 0,78%. Para llevar a cabo esta cuantificación se emplearon las retinas de los ojos derechos que estaban marcadas con Brn3a y no habían sufrido ninguna manipulación. Tanto en rata como en ratón se ha observado que la densidad de ipCGRs aumenta conforme nos alejamos a la periferia siendo mayor en la región supero-temporal (Hattar et al., 2002, Hattar et al., 2006). En nuestro estudio hemos observado que las ipCGRs que sobreviven tras axotomía vs axotomía e implante de nervio periférico se distribuyen de forma difusa por toda la retina no presentando preferencia por ninguna región en concreto.

Los resultados de este grupo de experimentos se han basado en la identificación de la subpoblación de ipRGCs con anticuerpos que reconocen la melanopsina, el fotopigmento característico de estas células intrínsecamente fotosensibles. La axotomía modula la expresión de múltiples genes (Agudo et al., 2008, 2009) y podría resultar en la represión del gen que codifica la melanopsina, como ocurre con otras proteínas específicas de las CGR, como por ejemplo el Thy-1 (Schlamp et al., 2001). Sin embargo, la observación de las células ipCGRs en retinas analizadas a los 28 días de la axotomía indica que al menos en una proporción importante de las ipCGRs la expresión de la melanopsina se mantiene largos períodos de tiempo tras la axotomía.

Este estudio es el primero que se realiza para valorar en el ratón albino la supervivencia y regeneración de las ipCGRs tras axotomía. Nuestros resultados indican que comparativamente esta subpoblación de células melanopsínicas son especialmente resistentes a la axotomía simple, pues cuando se comparan con el resto de las CGRs no melanopsínicas, la supervivencia de las ipCGRs es aproximadamente cuatro veces mayor (**Figura. 48**). Estos resultados son concordantes con observaciones previas realizadas en ratones pigmentados (Robinson y Madison, 2004).

Nuestro estudio también compara la supervivencia de las ipCGRs tras la axotomía e implante de injerto de nervio periférico mediante la aplicación de Tissucol o microsuturas. Tras el análisis de dicho estudio podemos concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia entre la realización de axotomía y la realización de axotomía e implante de injerto de nervio periférico. Es decir, que si bien las ipCGRs son una subpoblación especialmente resistente a la axotomía, al contrario que el resto de las CGRs no melanopsínicas, la supervivencia de las

melanopsínicas no se ve modulada por la presencia de injertos de nervio periférico, pues no resulta en un incremento de su supervivencia.

En nuestros experimentos no hemos observado regeneración de las ipCGRs a través del injerto de nervio periférico. En estudios recientes (Galindo-Romero et al., 2013) se ha documentado que las ipCGRs pueden identificarse con OHSt aplicado en ambos colículos superiores y con anticuerpos antimelanopsina, lo que sugiere que estas células pueden ser doblemente marcadas. Esto nos hace pensar que la ausencia de ipCGR marcadas retrógradamente con OHSt en los experimentos en los que se injertó un segmento de nervio periférico al muñón ocular del nervio óptico se debe a una incapacidad de estas células para regenerar sus axones más que a una imposibilidad técnica para identificarlas con ambos marcadores. Es más, del resto de la población de CGR no melanopsínicas se pudieron identificar las células que habían regenerado sus axones a lo largo de los injertos de nervio periférico. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Robinson y Madison (2004), pues ellos sí que observaron en ratones adultos pigmentados regeneración axonal de las ipCGRs en injertos de nervio periférico, si bien esta regeneración axonal era muy excasa con un valor medio de 12 células melanopsínicas por retina. La diferencia entre el bajo número de ipCGRs con axones regenerados observado en el estudio de Robinson y Madison (2004) en ratones pigmentados y la ausencia de regeneración de esta subpoblación en ratones albinos observada en nuestro estudio podría deberse a una diferencia entre estas especies pigmentada y no pigmentada, respectivamente.

La utilización de anticuerpos antimelanopsina ha permitido estudiar las respuestas de una subpoblación de CGR a la axotomía e implante de un injerto de nervio periférico. La población de CGR está compuesta a su vez por múltiples subpoblaciones con características morfológicas y funcionales diferentes, de las que hasta la fecha se han descrito hasta veinte tipos diferentes de CGR. Diseñar nuevas estrategias para analizar el comportamiento de estas diversas poblaciones de CGR nos permitirá identificar qué subpoblaciones tienen mayor resistencia a la lesión y cuales tienen mayor capacidad regenerativa. La identificación de estas subpoblaciones permitirá también en un futuro diseñar nuevos experimentos para analizar sus características moleculares e identificar los genes responsables tanto de la supervivencia como de la regeneración axonal.

CONCLUSIONES

6- CONCLUSIONES

- 1.** En ratones adultos tipo Swiss la supervivencia de la población de CGRs a la sección del NO intraorbitario a las 4 semanas es de aproximadamente el 13%. Esta supervivencia se ve incrementada significativamente con el implante de un segmento autólogo de nervio periférico en el muñón ocular del NO seccionado, bien mediante la utilización de microsuturas ó de Tissucol.
- 2.** Las CGRs del ratón Swiss adulto son capaces de regenerar sus axones a lo largo de injertos autólogos de nervio periférico apuestos al muñón ocular del NO seccionado. Esta capacidad de regeneración se observa en un 2,1% de la población original de CGRs en el caso de la utilización de Tissucol y es significativamente superior en un 4% en el caso de la utilización de microsuturas.
- 3.** La supervivencia a la axotomía de CGRs intrínsecamente fotosensibles es significativamente superior a la del resto de la población de CGR. Sin embargo esta población de ipCGRs carece de capacidad de regeneración axonal, y tampoco se ve influenciada (incrementada) su supervivencia con el implante de segmentos autólogos de nervio periférico. Se trata pues de una pequeña sub-población de CGRs que no parece responder a influencias extrínsecas (en cuanto a supervivencia y regeneración axonal se refiere) y sin embargo muestra una particular resistencia a la axotomía.

BIBLIOGRAFÍA

7-BIBLIOGRAFÍA

- 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.*495:1-9.
- Aguayo AJ, Rasminsky M, Bray GM, Carbonetto S, Mckerracher L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Carter DA, (1991). Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 331: 337-43.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Lönnngren U, Sobrado P, Conesa A, Cánovas I, Salinas-Navarro M, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M, (2008). Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis.* 3: 1050-63.
- Agudo M, Woodhoo A, Webber D, Mirsky R, Jessen KR, McMahon SB, (2008b). Schwann cell precursors transplanted into the injured spinal cord multiply, integrate and are permissive for axon growth. *Glia.* 56: 1263-70.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado P, Lönnngren U, Cánovas I, Nadal-Nicolás F, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M, (2009). Proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade are immediately up-regulated in the retina after optic nerve transection or optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50: 424-31.
- Agudo M, Yip P, Davies M, Bradbury E, Doherty P, McMahon S, Maden M, Corcoran JP, (2010). A retinoic acid receptor beta agonist (CD2019) overcomes inhibition of axonal outgrowth via phosphoinositide 3-kinase signalling in the injured adult spinal cord. *Neurobiol Dis.* 37: 147-55.
- Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez M, de Imperial JM, Vidal-Sanz M, (2013). Anatomical and functional damage in experimental glaucoma. *Curr Opin Pharmacol.* 13: 5-11.
- Archibald SJ, Shefner J, Krarup C, Madison RD, (1995). Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube. *J. Neurosci.* 15: 4109-23.
- Avilés-Trigueros M, Sauvé Y, Lund RD, Vidal-Sanz M, (2000). Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *J. Neurosci.* 20: 361-74.
- Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, García-Avilés A, La fuente MP, Rodríguez ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, (2003). Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Neurol.* 184: 767-77.

- Badea TC, Nathans J, (2004). Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J Comp Neurol.* 480: 331-51.
- Barnstable CJ, Dräger UC, (1984). Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience.* 11: 847-55.
- Becker CM, Gueuning CO, Graft GL, (1984). Sutures of fibrin glue for divided rat nerves. Schwann cell and muscle metabolism. *J. Reconstr Microsurg.* 1: 139-45.
- Beckstead RM, Frankfurter A, (1983). A direct projection from the retina to the intermediate gray layer of the superior colliculus demonstrated by anterograde transport of horseradish peroxidase in monkey, cat and rat. *Exp Brain Res.* 52: 261-8.
- Bernstein SL, Koo JH, Slater BJ, Guo Y, Margolis FL, (2006). Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol Vis.* 12: 147-55.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M, (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070-1073.
- Berson DM, (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 26: 314-320.
- Boycott BB, Wässle H, (1974). The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol.* 240: 397-419.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB, (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature.* 416: 636-40
- Brazda N, Müller HW, (2009). Pharmacological modification of the extracellular matrix to promote regeneration of the injured brain and spinal cord. *Prog Brain Res.* 175:269-81.
- .Bunt AH, Hendrickson AE, Lund JS, Lund RD, Fuchs AF, (1975). Monkey retinal ganglion cells: morphometric analysis and tracing of axonal projections, with a consideration of the peroxidase technique. *J Comp Neurol.* 164: 265-85.
- Camino ME, (1998). Localización de neurotrofinas y sus receptores en el sistema visual: Efecto de la regeneración del nervio óptico de la tenca. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca.
- Carter DA, Bray GM, Aguayo AJ, (1989). Regenerated retinal ganglion cell axons can form well-differentiated synapses in the superior colliculus of adult hamsters. *J. Neurosci.* 9: 4042-50.
- Cheung O, Morris R, (2005). Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia.* 52: 228-33.

- 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.* 2 : 387-96.
- Cowey A, Perry VH, (1979). The projection of the temporal retina in rats, studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res.* 35: 457-64.
- Cruz NI, Debs N, Fiol RE, (1986). Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plast Reconstr Surg.* 78: 369-73.
- Cusick CG, Lund RD, (1982). Modification of visual callosal projections in rats. *J Comp Neurol.* 212: 385-98.
- Dabin I, Barnstable CJ, (1995). Rat retina Müller cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia.* 14: 23-32.
- Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos- Esteban J, Podos SM, Mittag T, (2002). Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol vis Sci.* 43 (3): 587-94.
- Dann JF, Buhl EH, (1987). Retinal ganglion cells projecting to the accessory optic system in the rat. *J Comp Neurol.* 262: 141-58.
- Dowling JE, (1987). The retina. An approachable part of the brain. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge (Massachusetts) and London (England).
- Drager UC, Olsen JF, (1981). Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 20: 285-293.
- Drager UC, Hofbauer A, (1984). Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina. *Nature.* 309: 624-626.
- Dreher B, Sefton AJ, Ni SY, Nisbett G, (1985). The morphology, number, distribution and central projections of class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behavioural Evolution.* 26: 10-48.
- Durham LH, Willatt DJ, Yung MW, Jones I, Stevenson PA, Ramadan MF, (1987). A method for preparation of fibrin glue. *J Laryngol Otol.* 101: 1182-6.
- Eng SR, Lanier J, Fedtsova N, Turner EE, (2004). Coordinated regulation of gene expression by Brn3a in developing sensory ganglia. *Development.* 131: 3859-70.
- Ferster D, (1992). The synaptic inputs to simple cells of the cat visual cortex. *Prog Brain Res.* 90:423-41.
- Fitzgibbon T, Reese BE, (1996). Organization of retinal ganglion cell axons in the optic fiber layer and nerve of fetal ferrets. *Vis Neurosci.* 13: 847-61.
- Foster RG, Hankins MW, (2002). Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res.* 21: 507-527.

- Fukuda Y, (1977). A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies. *Brain Res.* 119: 327-34.
- 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: 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. (2013 a). 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, Jimenez-Lopez M, Garcia-Ayuso D, Villegas-Perez 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: 974-985.
- Gallego A, Cruz J, (1965). Mammalian retina: Associational nerve cells in ganglion cell layer. *Science.* 150: 1314.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, (2010). Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res.* 91: 800-810.
- Gilbert CD, Wiesel TN, (1979). Morphology and intracortical projections of functionally characterized neurons in the cat visual cortex. *Nature* .280: 120-5.
- Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB, (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci.* 4: 1165.
- Guillery RW, Mason CA, Taylor JS, (1995). Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J Neurosci.* 15: 4727-37.
- 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: RC 191.
- 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, 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.

- Hofbauer A, Dräger UC, (1985). Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J Comp Neurol.* 234: 465-74.
- Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, Barbay JM, Marchant JK, Mahesh N, Porciatti V, Whitmore AV, Masland RH, John SW, (2007). Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol.* 179: 1523-37.
- Hubel DH, Wiesel TN, (1959). Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex. *J Physiol.* 148: 574-91.
- Hubel DH, Wiesel TN, (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol.* 160: 106-54.
- Hubel DH, (1999). *Ojo, cerebro y visión.* Universidad de Murcia
- Huxlin KR, Goodchild AK, (1997). Retinal ganglion cells in the albino rat: revised morphological classification. *J Comp Neurol.* 385: 309-23.
- Inoue T, Hosokawa M, Morigiwa K, Ohashi Y, Fukuda Y. (2002) Bcl-2 overexpression does not enhance in vivo axonal regeneration of retinal ganglion cells after peripheral nerve transplantation in adult mice. *J. Neurosci.* 22: 4468-4477.
- Jeffery G, (2001). Architecture of the optic chiasm and the mechanisms that sculpt its development. *Physiol Rev.* 81: 1393-414.
- Jeffery G, Levitt JB, Cooper HM, (2008). Segregated hemispheric pathways through the optic chiasm distinguish primates from rodents. *Neuroscience.* 157: 637-43.
- Jeon, CJ, Strettoi E, Masland RH, (1998). The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci.* 18: 8936-8946.
- 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.* 14: 477-484.
- 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: 478-482.
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S, (2000). Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol.* 62: 327-51.
- Kong JH, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH, (2005). Diversity of ganglion cells in the mouse retina: unsupervised morphological classification and its limits. *J Comp Neurol.* 489: 293-310.
- Kreutzberg GW, (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19: 312-8.

- Kuderna H, (1976). Clinical application of nerve-anastomoses adhesión using fibrinogen. *Fortschr Kiefer Gesichtschir.* 21: 135.
- Lafuente López-Herrera MP, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, (2002). Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Experimental Neurology.* 178: 243–258.
- Latchman DS, (1998). The Brn3a transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 30: 1153-7.
- Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwartz M, (1996). Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *Faseb J.* 10 : 1296-302.
- Linden R, Perry VH, (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.* 272: 145-9.
- Linden R, Cavalcante LA, Barradas PC, (1986). Mononuclear phagocytes in the retina of developing rats. *Histochemistry.* 85: 335-9.
- Lund JS, (1988). Anatomical organization of macaque monkey striate visual cortex. *Annu Rev Neurosci* 11: 253-88.
- Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauvé Y, Messina DJ, Harris JR, Kihm AJ, Harmon AM, Chin FY, Gosiewska A, Mistry SK, (2007). Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem cells.* 25 : 602-11.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Gray GM, Aguayo AJ (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91: 1632-1636
- Marco-Gomariz MA, Hurtado-Montalbán N, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP, (2006). Phototoxic induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J Comp Neurol.* 498: 163-179.
- Marco-Gomariz MA, Aguilera-Meseguer ME, Cánovas-Martínez I, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Pérez MP, (2006b). The Sensitive Region Of The Rat Retina Is Due To Differential Light Exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47, ARVO E-abstract 4567.
- Matras H, Dinges HP, Lassmann H, Mamoli B, (1972). Suture free interfascicular nerve transplantation in animal experiments. *Wien Med Wochenschr.* 122: 517-23.
- May CA, Lütjen-Drecoll E, (2002). Morphology of the murine optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43: 2206-12.
- Mayor-Torroglosa S, De la villa P, Rodríguez ME, López-Herrera MP, Avilés-Trigueros M, García-Avilés A, de Imperial JM, Villegas-Pérez MP, 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 : 3825-35.
- Michon JJ, Li ZL, Shioura N, Anderson RJ, Tso MO, (1991). A comparative study of methods of photoreceptor morphometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32: 280-284.
- 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.
- Moreno-Flores MT, Bradbury EJ, Martín-Bermejo MJ, Agudo M, Lim F, Pastrana E, Avila J, Díaz-Nido J, McMahon SB, Wandosell F, (2006). A clonal cell line from immortalized olfactory ensheathing glia promotes functional recovery in the injured spinal cord. *Mol Ther.* 13: 598-608
- Moy OJ, Peimer CA, Koniuch MP, Howard C, Zielezny M, Katikaneni PR, (1988). Fibrin seal adhesive versus nonabsorbable microsuture in peripheral nerve repair. *J. Hand Surg Am.* 13: 273-8.
- Mustafi D, Engel AH, Palczewski K, (2009). Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res.* 28: 289-302.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Alburquerque-Béjar J, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, (2012). Whole number, distribution and co-expression of Brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PlosOne.* 7: e49830.
- 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.
- Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, Valiente-Soriano FJ, Yang Z, Davis CH, Bedont JL, Son JL, Wei JO, Buchman VL, Zack DJ, Vidal-Sanz M, Ellisman MH, Marsh-Armstrong N, (2011). Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl AcadSci U S A.* 108: 1176-81.
- Nishihira S, McCaffrey TV, (1989). Repair of motor nerve defects: comparison of suture and fibrin adhesive techniques. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 100 : 17-21.
- 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.

- 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.
- Perry VH, (1979). The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc R Soc Land B Biol Sci.* 204: 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, Henderson Z, Linder R, (1983). Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J. Comp Neurol.* 219: 356-68.
- Perry VH, Gordon S, (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends. Neurosci.* 11: 273-7.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD, (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 340-345.
- Provencio I, Rodríguez 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.
- Raisman G, Barnett SC, Ramón – Cueto A, (2012). Repair of central nervous system lesions by transplantation of olfactory ensheathing cells. *Handb clin Neurol.* 109: 541-9.
- Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J, (1996). Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res.* 36: 2029-2036.
- Ramón y Cajal S, (1892). La rétine des vertèbres. La cellule, T. IX, Fasc. 1: 121-225.
- Robinson GA, Madison RD, (2000). Survival of adult rat retinal ganglion cells with regrown axons in peripheral nerve grafts: a comparison of graft attachment using suture or fibrin glue. *J. Neurosurg.* 93: 275-278.
- Robinson GA, Madison RD, (2004). Axotomized mouse retinal ganglion cells containing melanopsin show enhanced survival, but not enhanced axon regrowth into a peripheral nerve graft. *Vision Res.* 44: 2667-2674.

- Romano VM, Blair SJ, Kerns JM, Wurster RD, (1991). Comparison of fibrin glue bioresorbable tubing and sutures in peripheral nerve repair. *Restor Neurol Neurosci.* 3 : 75-80.
- Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, (2009^a). A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49: 115-126.
- Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, (2009^b). 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, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M, (2009^c). 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.
- Sasaki H, Coffey P, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Young MJ, Lund RD, Fukuda Y, (1996). Light induced EEG desynchronization and behavioural arousal in rats with restored retinocollicular projection by peripheral nerve graft. *Neurosci Lett.* 218: 45-8.
- Sauvé Y, Sawai H, Rasminsky M, (2001). Topological specificity in reinnervation of the superior colliculus by regenerated retinal ganglion cell axons in adult hamsters. *J Neurosci.* 21: 951-60.
- 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. *Neuroscience.* 114: 389-401.
- Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW. (2001). Changes in Thy-1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* 7: 192-201.
- Schmued LC, Fallon JH, (1986). Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 377: 147-54.
- Schmued LC, Kyriakidis K, Fallon JH, Ribak CE, (1989). Neurons containing retrogradely transported Fluoro-Gold exhibit a variety of lysosomal profiles: a combined brightfield, fluorescence, and electron microscopic study. *J Neurocytol.* 18: 333-43.

- Schnebelen C, Pasquis B, Salinas-Navarro M, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Vidal-Sanz M, Bran AM, Bretillon L, Acar N, (2009). A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of intraocular pressure in rats. *Graefes Arch clin Exp Ophthalmol.* 247 : 1191-203.
- Schober W, Gruschka H, (1977). Retinal ganglion cells of the albino rat: a qualitative and quantitative study. *Z Mikrosk Anat Forsch.* 91: 397-414.
- Schwab ME, (1993). Experimental aspects of spinal cord regeneration. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 6: 549- 53.
- Sefton AJ, Dreher B, Harvey A, (2004). Visual system. In: Paxinos G, editors. *The rat nervous system.* USA: Elsevier. pp. 1083-1165..
- 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: 2002-2014.
- Siminoff R, Schwassmann HO, Kruger L, (1966). An electrophysiological study of the visual projection to the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol.* 127: 435-44.
- Simon Dk, O'Leary DD, (1990). Limited topographic specificity in the targeting and branching of mammalian retinal axons. *Dev Biol.* 137: 125-34.
- Smahel J, Meyer VE, Bachem V, (1987). Glueing of peripheral nerves with fibrin experimental studies. *J. Reconstr Microsurg.* 3 : 211-20.
- 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: 866-878.
- Stall G, Griffin JW, Licy, Trapp BD, (1989). Wallerian degeneration in the peripheral nervous system participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* 18 : 671-83.
- Stein BE, (1984). Development of the superior colliculus. *Annu Rev Neurosci.* 7: 95-125.
- Tauchi M, Morigiwa K, Fukuda Y, (1992). Morphological comparisons between outer and inner ramifying alpha cells of the albino rat retina. *Exp Brain Res.* 88: 67-77.
- Thanos S, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ, (1987). The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res.* 406: 317-321.

- Triviño A, Ramírez JM, Salazar JJ, Ramírez AI, García-Sánchez J, (1996). Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vis Res.* 36: 2015-2028.
- Van Gelder RN, (2003). Making (a) sense of non-visual ocular photoreception. *Trends Neurosci.* 26: 458-461.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Perez 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: 2894-2909.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ, (1988). Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye diI. *Exp Neurol.* 102: 92-101.
- 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: 940-52.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez M P, Bray GM, Aguayo A J, (1993). Use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols.* 3: 29-33.
- Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Sellés-Navarro I, Rodríguez E, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Pérez MP, (2000). Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res.* 2: 215–227.
- Vidal-Sanz M, Avilés-Trigueros M, Whiteley SJ, Sauvé Y, Lund RD, (2002). Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Prog Brain Res.* 137: 443-52.
- Vidal-Sanz M, De la Villa P, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Villegas-Pérez MP, (2007). Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye.* 21: S42–S45.
- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Miralles de Imperial J, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez M P, (2012). Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Progress in Retinal and Eye Research.* 31: 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: 265-280.
- 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.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD, (1996). Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport.* 7: 1995-1999.

- Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, LaVail MM, Lund RD, (1998). Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol.* 392: 58-77.
- Wang S, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD, (2000). Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41: 537-545.
- Weibel D, Cadelli D, Schwab ME, (1994). Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res.* 642: 259-66.
- Wessendorf MW, (1991). Fluoro-Gold: composition and mechanism of uptake. *Brain Res.* 553: 135-48.
- Whiteley SJ, Sauvé Y, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Lund RD, (1998). Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Exp Neurol.* 154 : 560-72.
- Yiu G, He Z, (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 7(8): 617-27.