



Universidad de Valladolid



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

TRABAJO FIN DE MÁSTER:
**Minociclina y Células Mononucleadas
Derivadas de Médula Ósea para el
Tratamiento de Degeneraciones
Hereditarias de la Retina**

Presentado por Alba Videla Ristol

Dirigido por:
Johnny Di Pierdomenico Spitilli
Iván Fernández Bueno

Fecha:
26 de junio de 2023

Agradecimientos

Cuando hablamos hace un año sobre la posibilidad de realizar la parte experimental del trabajo fin de máster en la Universidad de Murcia, más de 3 meses de estancia ya me parecía mucho tiempo, dudé. Ahora, 9 meses después de llegar a esta ciudad, tengo la sensación que han pasado volando. Creo que puedo decir, sin lugar a dudas, que ha sido una muy buena decisión emprender esta aventura.

Todo empezó con Johnny cuando, desde la primera llamada, todo fueron “sin problemas” y facilidades. Esto ha seguido siendo así, día a día, con una predisposición y optimismo inagotables. No sé cómo agradecer el apoyo que has supuesto durante estos meses, gracias infinitas. Me llevo la capacidad de darle la vuelta a cualquier situación con el fin de encontrar siempre su lado positivo, y me quedo con algunos de los tantos *consejos más apropiados*.

Gracias M. Paz y M. Vidal, por dejarme descubrir la vida de vuestro laboratorio desde dentro. A Marcelino, por su cálida acogida y por abrirme las puertas de la investigación básica; gracias por la atención y paciencia que has tenido desde el primer día. A Lola y José, por poder contar siempre con vuestra ayuda y alegrar el *office*. A Marta, por tu vitalidad y entusiasmo. A Susana, por la compañía y sugerencias. A Jhoana, por crear ese punto de confesión mutua durante estos últimos meses. A Manu y Fer, por amenizar el día a día en el laboratorio y por las *playlists* de fondo. A Santi y su buen rollo. A Rosa, Ana, Belén, Alejandro y al resto del departamento.

Agradecer, también, la ayuda y explicaciones de David, entre células y cultivos, el animalario y la 3ª planta.

He tenido una suerte inmensa de cruzarme con gente muy *bonica* que han hecho de estos meses, una gran experiencia murciana. Gracias a Galahad y Carmen, por acogirme unas semanas en vuestra casita de campo y sentir vuestro afecto y cariño. Por poder contar con Susana y Mari Carmen. Por las escapadas revitalizadoras con Cris y Paula, disfrutando un poco más de pleno esta vivencia huertana. Especialmente a Fabián y, a través de él, a todos los *magnésicos*; por hacerme sentir parte de esta pequeña familia y recibir vuestra estima.

Ojalá el mundo entero pudiera empaparse de esta hospitalidad tan sincera que estoy viviendo aquí.

Gràcies a les de sempre, per fer que us senti tan a prop, tot i la distància. Alba, Geo, Maria, Ivet, Clara, Cris, Ana,.... Per reafirmar les amistats més valuoses que es poden tenir.

I, altra vegada, eternament agraïda als de casa, per ser-hi incondicionalment i per, després de tot, retrobar-nos i continuar estimant-nos. Sou el pilar fonamental d'aquesta aventura.

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	1
Visto Bueno de los tutores para la presentación del trabajo fin de máster	2
Resumen	5
Abstract.....	6
Lista de abreviaturas	7
Lista de figuras	8
Lista de gráficos	8
1. Introducción.....	9
1.1. Sistema visual.....	9
1.1.1. Anatomía del sistema visual.....	9
1.1.2. La retina.....	9
1.1.3.1. Fotorreceptores.....	11
1.1.3.2. Células gliales.....	13
1.1.3.2.1. Microglía	13
1.1.3.2.2. Macroglía	14
1.1.3.2.2.1. Astrocitos.....	14
1.1.3.2.2.2. Células de Müller	15
1.2. Enfermedades degenerativas hereditarias de la retina.....	16
1.2.1. Rata RCS.....	17
1.2.2. Tratamientos.....	17
1.2.2.1. Trasplante de CMMO.....	18
1.2.2.2. Minociclina	18
1.3. Justificación del trabajo	19
2. Objetivos e hipótesis	19
3. Material y métodos.....	19
3.1. Animales	19
3.2. Inyecciones	21
3.3. Tomas de imagen y cuantificación	22
3.3.1. Análisis <i>in vivo</i>	22
3.3.2. Análisis <i>ex vivo</i>	22
3.3.2.1. Procesado histológico de la retina e inmunohistofluorescencia	22
3.3.2.2. Adquisición de imágenes.....	23
3.3.2.3. Cuantificación	24
3.4. Variables de Estudio y Análisis Estadístico.....	24
4. Resultados	25

4.1.	Resultados <i>in vivo</i>	25
4.1.1.	Estudio cuantitativo del espesor de la retina total y externa.....	25
4.2.	Resultados <i>ex vivo</i>	26
4.2.1.	Fotorreceptores	26
4.2.2.1.	Estudio cuantitativo de los núcleos de los FR	27
4.2.2.2.	Estudio cualitativo de la morfología de los fotorreceptores.....	28
4.2.2.	Estudio cuantitativo de la expresión de Iba-1 en las células de microglía	29
4.2.3.	Estudio cuantitativo de la expresión de GFAP en las células de macroglía	30
4.2.4.	Estudio cuantitativo de las conexiones sinápticas entre células bipolares y FR....	32
5.	Discusión.....	34
6.	Conclusiones.....	36
7.	Bibliografía	37
Anexos.....		40
Anexo I. <i>Currículum Vitae</i> Breve		40
Anexo II. Autorización de la Prórroga de Procedimientos		41
Anexo III. Informe del Comité Ético de Investigación.....		43
Anexo IV. Aislamiento y cultivo de CMMO.....		44
Anexo V. Procesado histológico.....		45
a.	Sacrificio y perfusión del animal.....	45
b.	Enucleación	45
c.	Procesado histológico – Secciones retinianas.....	46
d.	Inmunohistomarcajes en secciones de retina.....	46
Anexo VI. Adquisición de imágenes.....		47
a.	Microscopía de fluorescencia y confocal	47
b.	Fotomontajes.....	48
Anexo VII. Resultados		48
a.	Resultados <i>in vivo</i>	48
b.	Resultados <i>ex vivo</i>	48

Resumen

Introducción: las degeneraciones hereditarias de la retina representan la primera causa de ceguera irreversible en los países desarrollados, y actualmente no existe un tratamiento *gold standard* definido. Una de las terapias más prometedoras es el trasplante de células para aumentar la supervivencia y funcionalidad de las neuronas retinianas. Paralelamente, la administración de minociclina parece contribuir en la reducción de la activación y migración microglial, preservando la retina externa mediante sus propiedades antiinflamatorias y efectos antipapoptóticos.

Hipótesis: la administración de minociclina y células mononucleadas derivadas de médula ósea (CMMO) puede tener un efecto neuroprotector en degeneraciones hereditarias de la retina.

Objetivo: investigar los efectos de la administración sistémica de minociclina y el trasplante intravítreo de CMMO, por separado y en combinación, en un modelo animal de degeneración hereditaria de la retina.

Material y métodos: treinta y dos ratas *Royal College of Surgeons* (RCS) se han dividido en tres grupos experimentales, según el tipo de tratamiento que se les ha administrado: (1) inyecciones intraperitoneales diarias de minociclina, (2) un único trasplante de CMMO o (3) la combinación de ambas. Además, se han incluido ratas RCS *naive* y una rata *Piebald Viral Glaxo* (PVG) como control sano. Cada grupo experimental se ha subdividido en dos tiempos de análisis, siendo procesado el día 35 o 51 post nacimiento (P35 o P51).

Se ha realizado un análisis *in vivo* a través de una Tomografía de Coherencia Óptica espectral (OCT) para medir los espesores de la retina y un análisis *ex vivo* para estudiar la población y morfología de los fotorreceptores (FR), la población de las células gliales retinianas y las conexiones sinápticas de las capas externas de la retina.

Resultados: el análisis *in vivo* muestra una disminución progresiva significativa del espesor retiniano total y externo conforme avanza la degeneración, sin embargo, no hay una diferencia significativa de variación del espesor entre animales controles y experimentales.

El análisis *ex vivo* muestra, en comparación a los animales controles degenerados: una preservación de la morfología y cantidad de FR en los ojos tratados con minociclina, CMMO o la combinación de ambos tratamientos, siendo este último significativamente mayor; una reducción del número de células microgliales en los ojos tratados con minociclina; una disminución de la expresión de GFAP en la macroglía en los ojos trasplantados con CMMO y un aumento de la expresión de Bassoon en las conexiones sinápticas de la capa plexiforme externa de la retina en los ojos tratados con minociclina, CMMO o la combinación de ambos tratamientos, siendo este último significativamente mayor.

Discusión y conclusiones: la administración de minociclina y/o CMMO tiene un efecto neuroprotector en la degeneración hereditaria de la retina de la rata RCS, siendo este impacto mayor a corto plazo (P35) y perdiendo efectividad a largo término (P51).

La combinación de ambos tratamientos tiene un efecto significativamente mayor que los dos por separado.

Abstract

Introduction: inherited retinal degenerations represent the leading cause of irreversible blindness in high-income countries, and there is currently no defined *gold standard* treatment. One of the most promising therapies is cell transplantation to increase the survival and functionality of retinal neurons. At the same time, the administration of minocycline seems to contribute to the reduction of microglial activation and migration, preserving the outer retina through its anti-inflammatory properties and antiapoptotic effects.

Hypothesis: the administration of minocycline and bone marrow-derived mononuclear cells (BM-MNCs) may have a neuroprotective effect in hereditary retinal degenerations.

Objective: to investigate the effects of systemic administration of minocycline and intravitreal transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells (BM-MNCs), separately and in combination, in an animal model of inherited retinal degeneration.

Material and Methods: thirty-two *Royal of College Surgeons* (RCS) rats have been divided into three experimental groups, according to the type of treatment they have been administered: (1) daily intraperitoneal injections of minocycline, (2) a single BM-MNCs transplant or (3) the combination of both. In addition, *naïve* RCS rats have been included as dystrophic age-matched control, and also a *Piebald Viral Glaxo* (PVG) rat as healthy control. Each experimental group has been subdivided into two analysis times, being processed on post-natal day 35 or 51 (P35 or P51).

An *in vivo* analysis has been carried out through a spectral Optical Coherence Tomography (OCT) to measure the thickness of the retina and also an *ex vivo* analysis to study the population and morphology of the photoreceptors, the population of retinal glial cells and the synaptic connections of the outer retinal layers.

Results: *in vivo* analysis shows a significant progressive decrease in total and outer retinal thickness as degeneration progresses, however, there is no significant difference in thickness variation between control and experimental animals.

The *ex vivo* analysis shows, in comparison to the degenerated control animals: a preservation of the morphology and quantity of photoreceptors in the eyes treated with minocycline, BM-MNCs or the combination of both treatments, the latter being significantly higher; a reduction in the number of microglial cells in eyes treated with minocycline; decreased GFAP expression in macroglia in BM-MNCs transplanted eyes and increased Bassoon expression in synaptic junctions in the outer plexiform layer of the retina in eyes treated with minocycline, BM-MNCs, or the combination of both treatments, the latter being significantly higher.

Discussion and conclusions: the administration of minocycline and/or BM-MNCs has a neuroprotective effect on inherited retinal degenerations in the RCS rat, being this impact greater in the short term (P35) and losing effectiveness in the long term (P51).

The combination of both treatments has a significantly greater effect than the two treatments alone.

Lista de abreviaturas

- CCG** Capa de Células Ganglionares
CFN Capa de Fibras Nerviosas
CFR Capa de los FR
CGR Células Ganglionares de la Retina
CM Células Microgliales
CMMO Células Mononucleadas derivadas de Médula Ósea
CNE Capa Nuclear Externa
CNI Capa Nuclear Interna
CPE Capa Plexiforme Externa
CPI Capa Plexiforme Interna
CSEF Capa de Segmentos Externos de los Fotorreceptores
CSIF Capa de Segmentos Internos de los Fotorreceptores
EPR Epitelio Pigmentario de la Retina
FR Fotorreceptores
Iba-1 del inglés *ionized calcium binding adaptor molecule-1*
IIP Inyección IntraPeritoneal
IIV Inyección IntraVítrea
MLE Membrana Limitante Externa
MLI Membrana Limitante Interna
OCT del inglés *Optical Coherence Tomography* (Tomografía de Coherencia Óptica)
OD Ojo Derecho
OI Ojo Izquierdo
PBS del inglés *Phosphate Buffered Saline*
PFA ParaFormAldehído
PVG rata *Piebald Viral Glaxo*
RCS rata *Royal College of Surgeons*
RP Retinosis Pigmentaria
SNC Sistema Nervioso Central

Lista de figuras

1. Figura 1 Representación de las capas de la retina	10
2. Figura 2 Representación de los FR de la retina	12
3. Figura 3 Células microgliales en retinas a plano de un modelo murino de degeneración hereditaria de la retina	14
4. Figura 4 Distribución de la macroglía en un animal sano y en un animal degenerado en secciones retinianas inmunohistomarcadas con GFAP	16
5. Figura 5 Diseño experimental	21
6. Figura 6 División de la retina para el análisis <i>ex vivo</i>	23
7. Figura 7 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS contrateñidas con DAPI, mostrando los núcleos celulares	28
8. Figura 8 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS inmunomarcadas con Arrestina, mostrando los conos	28
9. Figura 9 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS inmunomarcadas con Iba-1, mostrando las células microgliales	30
10. Figura 10 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS inmunomarcadas con GFAP, mostrando las células macrogliales	31
11. Figura 11 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS inmunomarcadas con Bassoon, mostrando las conexiones sinápticas en la CPE.....	33

Lista de gráficos

1. Gráfico 1 Diagrama de barras representando la variación del espesor total y externo de la retina a P35 y P51	25
2. Gráfico 2 Diagrama de barras del promedio de filas de núcleos en la CNE en los dos tiempos analizados.....	27
3. Gráfico 3 Diagrama de barras representando el promedio del número de células microgliales en los dos tiempos de análisis.....	29
4. Gráfico 4 Gráfico de columnas mostrando el valor promedio de la expresión de GFAP (intensidad de señal bajo la curva, RFU) de las secciones examinadas, en cada “condición experimental”	30
5. Gráfico 5 Diagrama de barras presentando el valor promedio de la intensidad de señal bajo la curva de la expresión de Bassoon en la CPE (medido en RFU) de las secciones examinadas, según el tratamiento recibido.	32

1. Introducción

1.1. Sistema visual

El sistema visual es el encargado del sentido de la visión, es decir, de la percepción de cualquier estímulo lumínico que nos llega del mundo que nos rodea.

El órgano que actúa de fotorreceptor es el ojo, quien capta la luz y la transforma en impulso eléctrico; el nervio óptico se encarga de transmitir estos impulsos desde el globo ocular al cerebro quien, finalmente, procesa la información para que podamos percibir imágenes.

1.1.1. Anatomía del sistema visual

El globo ocular, órgano principal del sistema visual, se puede dividir en tres capas: la túnica externa, intermedia e interna.

La capa externa o fibrosa está constituida, en su polo anterior, por la córnea (primera “lente” del sistema óptico), que es la encargada de refractar los rayos de luz hacia el cristalino (segunda “lente”, de geometría biconvexa y potencia variable). En el resto del ojo, la túnica externa está formada por la esclera, membrana que otorga rigidez al globo ocular. La zona de transición entre ambas partes es el limbo esclerocorneal.

La túnica intermedia o uveal se caracteriza por su alta pigmentación y vascularización. En la región anterior se distingue el iris, quien regula la cantidad de luz que entra en el ojo, y el cuerpo ciliar, encargado de la modificación dióptrica del cristalino y de la secreción del humor acuoso. La porción posterior está formada por la coroides, cuya función principal es suministrar nutrientes y oxígeno a la retina.

En la túnica interna o nerviosa se encuentra la retina, la responsable de recibir la luz y enviarla al cerebro a través de impulsos nerviosos.

1.1.2. La retina

La retina forma parte del sistema nervioso central (SNC) y se podría definir como una “porción móvil del cerebro” que se mueve junto con el ojo.

La retina de los mamíferos está compuesta por distintos tipos de células neuronales (fotorreceptores (FR), horizontales, bipolares, interplexiformes, amacrinas y ganglionares) y de células no neuronales, las células gliales (de Müller, astrocitos y microgliales). La retina está organizada en capas dispuestas perpendicularmente a la superficie del globo ocular (**Figura 1**), las cuales son, desde la capa más interna hasta la más externa:

- la **Membrana Limitante Interna (MLI)**, una lámina basal que contacta con el cuerpo vítreo y está compuesta por los procesos de las células de Müller;
- la **Capa de Fibras Nerviosas (CFN)**, formada por los axones de las Células Ganglionares de la Retina (CGR),
- la **Capa de Células Ganglionares (CCG)**, donde se encuentran los cuerpos celulares de las CGR y de algunas células amacrinas,

- la **Capa Plexiforme Interna (CPI)**, zona de sinapsis entre las CGR, amacrinas, bipolares e interplexiformes,
- la **Capa Nuclear Interna (CNI)**, la cual contiene los somas de las células bipolares, horizontales, amacrinas, interplexiformes, células de Müller y de algunas CGR desplazadas,
- la **Capa Plexiforme Externa (CPE)**, donde “sinaptan” las células bipolares, horizontales e interplexiformes con las terminaciones sinápticas de los FR,
- la **Capa Nuclear Externa (CNE)**, quien contiene los núcleos de los FR,
- la **Membrana Limitante Externa (MLE)**, constituida por la unión entre los artículos internos de los FR y las expansiones terminales de las células de Müller a través de desmosomas. Esta asegura que los rayos puedan incidir en los discos membranosos del artículo externo, en
- la **Capa de los FR (CFR)**, diferenciándose la **Capa de Segmentos Internos (CSIF)** y **Externos (CSEF)**, los que contactan con las *microvilli* del
- Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR)**, un epitelio monoestratificado de células cúbicas que contiene gránulos de melanina. Se encarga de aportar nutrientes y oxígeno a los FR, almacenar vitamina A y colaborar en la formación del pigmento visual de los FR y en la renovación de sus discos membranosos.

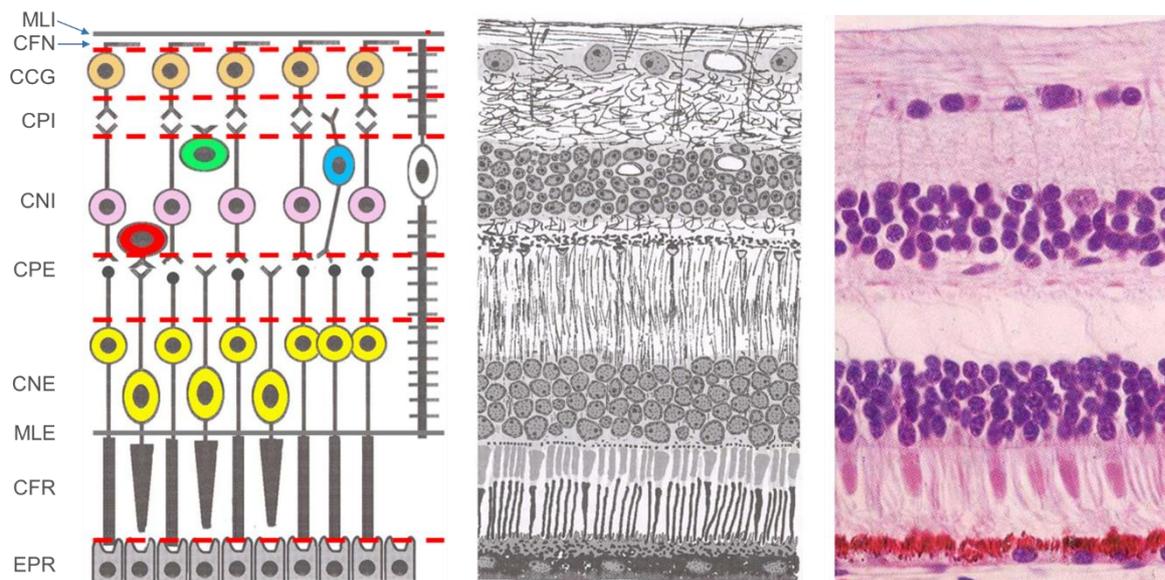


Figura 1 Representación esquemática (izquierda y centro) e imagen con microscopio óptico (derecha) de las capas de la retina.

Los discos membranosos se forman continuamente en el segmento interno y desplazan los discos ya formados hacia el otro extremo del segmento externo. Es allí donde las *microvilli* del EPR los envuelven, siendo fagocitados y degradados por el EPR, apareciendo los fagosomas.

1.1.3. Sistema visual de la rata

La alta homología morfológica y funcional entre el sistema visual humano y el de roedor permite emplear modelos animales para la experimentación del ámbito oftalmológico. En investigación básica, dos de los más frecuentes son el de ratón y rata, por su fácil reproducibilidad, manipulación y bajo coste.

Las diferencias anatómico-funcionales principales del ojo de rata respecto al humano son las siguientes:

El cristalino de rata, además de la “luz visible”, también transmite gran parte de la luz ultravioleta (hasta un 50%) (Rat Behavior and Biology, 2004). Este, en cambio, no es flexible como el humano, lo que no le otorga la capacidad de acomodar para enfocar a distintas distancias.

La retina de rata, al igual que la retina humana, contiene células fotorreceptoras (FR), los conos y los bastones; sin embargo, estos roedores presentan solo dos subtipos de cono, insensibles a las longitudes de onda largas (rojos) [ver 1.1.3.1. Fotorreceptores].

La proporción de conos es menor en la retina de rata, siendo aproximadamente de un 1% del total de FR de la retina en comparación con el 5% en la retina humana. Su distribución también varía, ya que las ratas no disponen de fovea, con lo que estas células se reparten uniformemente a lo largo de la retina.

La distribución de las células ganglionares en la retina de rata no es homogénea, sino que existe una zona de máxima densidad de éstas células en la región supero-temporal (Salinas *et al.*, 2009). A diferencia del sistema visual humano, un 95% de los axones de las CGR de rata se decusan a nivel del quiasma óptico, conduciendo la mayor parte de la información visual a la zona contralateral del cerebro (Nadal-Nicolás *et al.*, 2012).

El sistema visual de los roedores es mucho menos “fino” que el humano, ya que no existe una estructura retino-topográfica; cada célula ganglionar de rata recibe información de un número elevado de FR. Esto, junto a la incapacidad de enfocar a distintas distancias, le confiere una agudeza visual más deficiente.

1.1.3.1. Fotorreceptores

Los FR son células sensibles a ciertos rayos luminosos encargadas de convertir estos en una señal eléctrica y transmitirla al cerebro.

Existen dos tipos principales de FR, los bastones y los conos, de morfología muy similar, pero con unas diferencias fisiológicas importantes. En humanos, los bastones son mucho más abundantes que los conos, superándolos cinco veces en número, y se encargan de la visión escotópica. De respuesta lenta y alta sensibilidad, se ubican principalmente en la retina periférica y proporcionan una baja agudeza visual.

Los conos, en cambio, de respuesta rápida y baja sensibilidad, se encuentran mayoritariamente en la retina central y son los encargados de la visión fotópica, detallada (alta agudeza visual) y cromática.

Estas neuronas son de configuración alargada, más estrechas en el caso de los bastones y más gruesas y cortas comparativamente, en el caso de los conos. Se puede diferenciar la expansión interna, el cuerpo celular y la expansión externa (**Figura 2**):

El soma o cuerpo celular [ubicado en la CNE] contiene el núcleo del FR y de aquí se originan las expansiones citoplasmáticas interna y externa: la interna está formada por la fibra conductora y la terminación sináptica (en forma de esférula, en los bastones, o pedículo, en los conos) [la cual se encuentra en la CPE]. La expansión externa es la prolongación orientada hacia el EPR; esta, a su vez, se puede dividir en el segmento interno y externo. El segmento interno contiene la mayor parte de mitocondrias y el resto de orgánulos celulares; es aquí donde se halla la MLE, formada por desmosomas o uniones adherentes entre el artículo interno y las células de Müller.

A través del cilio de conexión, éste contacta con el segmento externo, formado por discos membranosos apilados. En la membrana de los discos se encuentra el pigmento visual como una proteína intrínseca, cada una sensible a rayos luminosos de distinta longitud de onda: la rodopsina o *púrpura visual* (sensible a los $\approx 500\text{nm}$, en los bastones) y la yodopsina (en los conos).

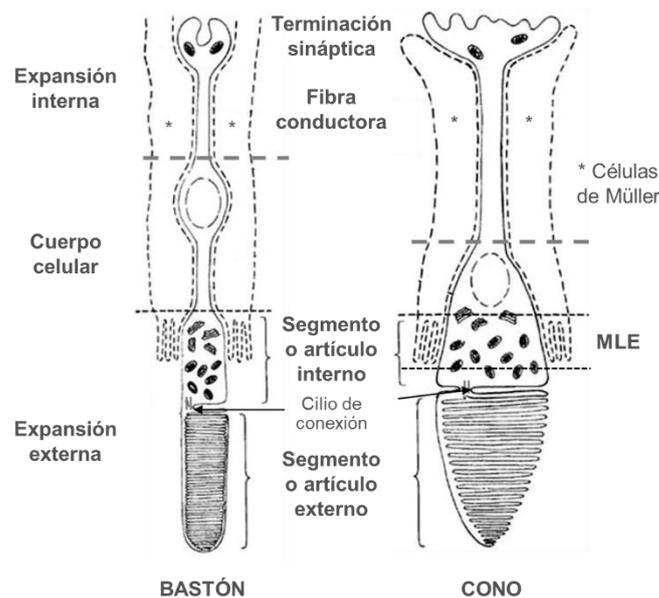


Figura 2 Representación de los FR de la retina.

En la retina humana se distinguen tres tipos de cono según los máximos de absorción de la opsina, la parte proteica del pigmento: 450nm-azul (conos S, del inglés *short-wavelength*), 530nm-verde (conos M, *medium wavelength*) y 565nm-rojo (conos L, *long wavelength*). Gracias a esta diversidad en la sensibilidad espectral, el sistema visual adquiere una visión cromática.

En los roedores, en cambio, los conos se disponen a lo largo de toda la retina y solo se diferencian dos tipos: los sensibles a ondas cortas (conos S) y los sensibles a ondas medias/largas (conos M/L), los cuales no llegan a percibir las longitudes de onda "más largas" (luz roja).

Según investigaciones previas en ratas *Sprague-Dawley* (SD), se ha demostrado que los conos M/L son los más numerosos (siendo seis veces mayor, en número, que los conos S) y tienden a localizarse en la retina supero-temporal (Ortín-Martínez *et al.*, 2010). En esta especie, se ha evidenciado que un 3% de sus conos son duales: son sensibles tanto a las longitudes de onda cortas como a las medias/largas.

Además de los conos y los bastones, existen otras células sensibles a la luz: las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles o melanopsínicas (CGRm) que, gracias a la presencia de melanopsina en su citoplasma, tienen capacidad de responder a la luz.

1.1.3.2. Células gliales

Las células gliales son el tipo celular más abundante del SN; su número excede entre 10-50 veces el de las neuronas. A diferencia de éstas, las células gliales carecen de la propiedad de generar activamente señales eléctricas. Actúan realizando tareas auxiliares y complementando a las neuronas.

Sus funciones principales son: de soporte (similar al tejido conectivo) y trófica (nutren a las neuronas y eliminan productos de desecho del metabolismo celular). También participan en la formación de las vainas de mielina y en la regulación del microambiente celular (ajustando el paso de iones y de neurotransmisores a través de su membrana).

En casos de daño tisular, éstas células se activan para tratar de repararlo normalizando los niveles de nutrientes y neurotransmisores y fagocitando *debris* (Di Pierdomenico, 2017).

Las células gliales se pueden dividir en dos grandes grupos: la microglía y la macroglía, los cuales se describen a continuación.

1.1.3.2.1. Microglía

Las Células Microgliales (CM) desempeñan un papel esencial en la respuesta inmunitaria innata (Murenu *et al.*, 2022). También ayudan a mantener la homeostasis de la retina a través del intercambio iónico, la glucosa y el transporte de neurotransmisores (Murenu *et al.*, 2022). Responden rápidamente a lesiones neuronales fagocitando desechos nocivos, secretando mediadores inflamatorios locales y comunicándose con otros posibles componentes del sistema inmunitario (Murenu *et al.*, 2022).

En reposo, las CM se localizan en la CFN, CCG, CPI y CPE y tienen un soma celular pequeño con múltiples ramificaciones largas y tortuosas, y no son capaces de realizar desplazamientos largos (Lucas, 2019).

La población de CM en la CFN se concentra mayoritariamente en la retina central, donde sus procesos se alargan paralelos a los axones de las CGR. En la CCG y CPI se distribuyen en forma de mosaico a lo largo de toda la retina, sin solaparse entre ellas.

No obstante, tras una lesión en el SNC, éstas células se vuelven reactivas y modifican su morfología: aumentan su cuerpo celular hasta adoptar un aspecto ameboide y acortan sus ramificaciones (**Figura 3**), lo que les permite desplazarse y proliferar con el fin de preservar la zona dañada (Lucas, 2019). Cuando su respuesta es insuficiente, monocitos provenientes del torrente sanguíneo pueden penetrar en el tejido nervioso para transformarse en macrófagos y actuar de forma conjunta con las CM. Una vez el estímulo pernicioso cede, estas células retoman su estado inactivo basal (Wohl *et al.*, 2010).

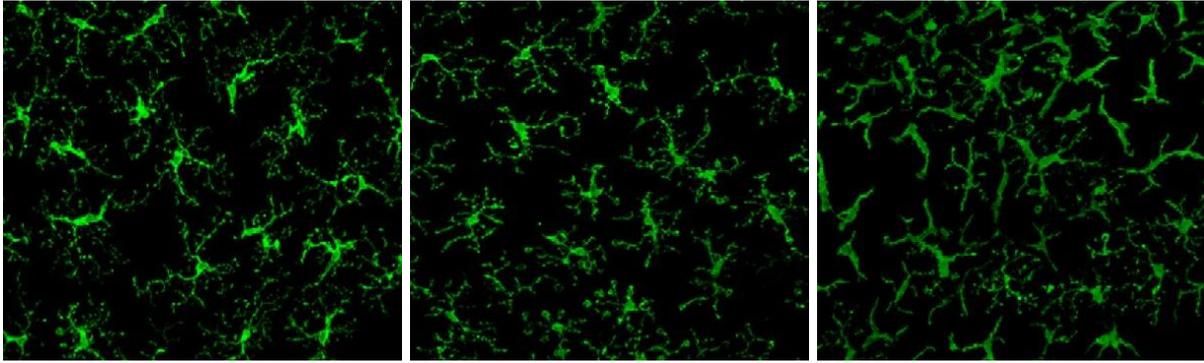


Figura 3 Células microgliales en retinas a plano de un modelo murino de degeneración hereditaria de la retina (ratón *r10*). Proceso de activación de la microglía con sus respectivos cambios morfológicos durante el transcurso del tiempo. Ilustraciones modificadas de Peng *et al.*, 2014.

En algunas ocasiones, esta activación celular puede llevarse a cabo de forma descontrolada hasta llegar a desempeñar un papel perjudicial sobre las neuronas, mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, Factores de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y especies reactivas de oxígeno (Hanisch y Kettenmann, 2007).

La activación de las CM en la retina es común en lesiones que provocan la muerte de CGR o en distrofias retinianas que producen una degeneración de los FR. Según estudios recientes, su inhibición puede atenuar la muerte de FR en dichas distrofias (Di Pierdomenico *et al.*, 2019).

Para identificar este tipo celular en la retina, la técnica más utilizada es el marcaje por inmunohistofluorescencia. Este se realiza con unos anticuerpos contra las proteínas específicas de las CM, como la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado-1 (*iba-1*, del inglés *ionized calcium binding adaptor molecule-1*).

1.1.3.2.2. Macroglía

Las células macrogliales actúan como reguladoras de neurotransmisores, participando en la transmisión sináptica neural y permitiendo, a su vez, la comunicación entre las redes neuronales.

Su función más importante es la de sostén y nutrición de las neuronas. Pero, a su vez, contribuyen en: la formación de las vainas de mielina que recubren los axones neuronales, la regulación homeostática y metabólica del tejido nervioso, como también en la reparación y regeneración del mismo, gracias a su capacidad mitótica (Di Pierdomenico, 2017).

En la retina de los mamíferos se encuentran dos células macrogliales: los astrocitos y las células de Müller.

1.1.3.2.2.1. Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más frecuentes y suelen presentar una morfología estrellada con múltiples prolongaciones citoplasmáticas largas y prolíficas. Estas prolongaciones se pueden entrelazar con axones de las neuronas vecinas o bien disponerse encima de las membranas de los capilares adyacentes, lo que confiere un sostén mecánico del tejido.

En la retina, los astrocitos se ubican únicamente en las capas más internas, la CFN y la CCG (Di Pierdomenico, 2017, **Figura 4**).

Originalmente, se les atribuía la función de transferencia de sustancias desde los vasos sanguíneos hasta las neuronas; este hecho, aunque no se ha demostrado, hoy en día se acepta la existencia de un intercambio de productos metabólicos entre los astrocitos y las neuronas.

Además, se ha postulado que los astrocitos impiden la difusión de neurotransmisores fuera de la hendidura sináptica, ayudando a mantener la individualidad de los impulsos nerviosos de los circuitos neuronales (Di Pierdomenico, 2017).

Durante procesos de reparación posterior a una lesión retiniana, los astrocitos producen moléculas necesarias para el posible desarrollo de prolongaciones neuronales. Asimismo, estas células sintetizan factores neurotróficos para propiciar la supervivencia de las neuronas y la diferenciación de otras células de la glía (Di Pierdomenico, 2017).

En casos de lesión, se produce una astrogliosis reactiva: los astrocitos se hipertrofian y proliferan para rellenar los espacios del tejido que han quedado dañados y así formar una cicatriz glial. Delante condiciones patológicas, los astrocitos también pueden actuar como fagocitos y como células presentadoras de antígenos a los linfocitos.

En su citoplasma se hallan gliofibrillas compuestas, principalmente, de Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), la cual se emplea para su identificación en inmunohistofluorescencia.

1.1.3.2.2.2. Células de Müller

Las células de Müller se disponen radialmente ocupando todo el espesor de la retina, desde la MLI hasta la MLE, representando la mayor parte de la población glial retiniana.

Sus prolongaciones rodean los capilares sanguíneos, lo que les permite actuar como sistema de comunicación entre ellos y las neuronas de la retina, participando en la regulación del metabolismo celular y mantenimiento de la homeostasis retiniana (Di Pierdomenico, 2017). También ejercen de “carcasa” en la que se sitúan las células nerviosas, manteniendo así, una citoarquitectura neuroretiniana. La unión entre las prolongaciones terminales de las células de Müller y los segmentos internos de los FR confieren la MLI.

En condiciones patológicas, estas células sobre-expresan GFAP en su citoesqueleto (**Figura 4**), indicador de activación glial y de alteración de la homeostasis de la retina. También es, en estas circunstancias, cuando las células de Müller pueden secretar factores neurotróficos.

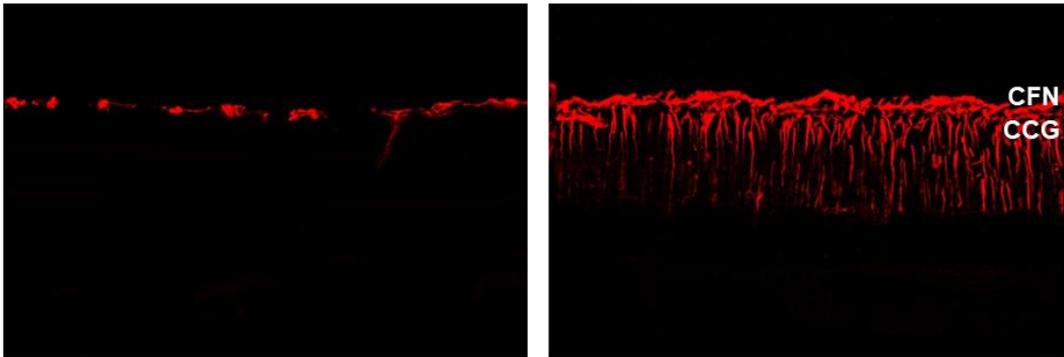


Figura 4 Distribución de la macroglía en un animal sano (izquierda) y en un animal degenerado (derecha) en secciones retinianas inmunohistomarcadas con GFAP.

En la retina sana se aprecian principalmente astrocitos en las capas más internas de la retina (CFN y CCG), mientras que, en la retina degenerada se observa, además de astrocitos, la expresión de las células de Müller ocupando gran parte del espesor total retiniano (imágenes de Di Pierdomenico *et al.*, 2017).

1.2. Enfermedades degenerativas hereditarias de la retina

Las degeneraciones hereditarias de la retina son un grupo de enfermedades genéticas que presentan una gran variedad geno- y fenotípica. Sin embargo, todas ellas tienen una característica común: están producidas por defectos genéticos que suelen afectar a genes codificadores de proteínas implicadas en la fototransducción o en el ciclo de los pigmentos visuales (García-Ayuso, 2014).

Este grupo de enfermedades abarca más de 80 patologías con más de 200 genes involucrados, y se pueden diferenciar según su patrón de herencia, siendo autosómica recesiva (50-60%), autosómica dominante (30-40%) o ligada al cromosoma X (5-15%) (García-Ayuso, 2022).

La Retinosis Pigmentaria (RP) es la degeneración hereditaria de los FR más común y representa una de las causas principales de discapacidad visual y ceguera irreversible en “edades laborales” (Bourne *et al.*, 2018).

Está causada por diferentes mutaciones de las proteínas de los bastones, las que provocan la muerte progresiva de los FR, inicialmente de los bastones (provocando ceguera nocturna y pérdida de visión periférica), seguida de la de los conos (disminuyendo la agudeza visual y la visión central).

Las mutaciones de un mismo gen pueden causar distintos fenotipos clínicos, mientras que fenotipos clínicos similares pueden ser el resultado de mutaciones de distintos genes (García-Ayuso, 2022).

Por detrás de la DR y considerada, en términos de incidencia, la segunda distrofia hereditaria retiniana, está la enfermedad de Stargardt. Ésta se presenta durante la segunda década de vida en forma de exceso de lipofuscina en el EPR, con una consiguiente muerte celular del EPR y los FR. Otro ejemplo sería la Amaurosis Congénita de Leber, caracterizada por un desarrollo anómalo de los dos FR, provocando una disfunción de conos y bastones, ambos desde el nacimiento.

Para facilitar la comprensión de la fisiopatología de esta y otras enfermedades, se han empleado modelos animales que las reproducen de forma rigurosa.

1.2.1. Rata RCS

Un ejemplo de modelo animal de degeneración hereditaria de la retina es la rata pigmentada RCS (del inglés *Royal College of Surgeons*), descrita por primera vez el año 1938 por Bourne y colaboradores.

La rata RCS se podría considerar la cepa degenerada de la rata pigmentada sana *Piebald Viral Glaxo* (PVG), hecho por el cual se la utiliza como control sano en ensayos con estos modelos animales.

La RCS presenta una mutación recesiva del gen MERTK que imposibilita la fagocitación de los segmentos externos de los FR por parte del EPR, proceso crucial para la supervivencia de estas células.

La degeneración de los FR y del conjunto de la retina en este modelo animal es muy rápida, ya que sufre una pérdida relevante tanto de bastones como de conos durante los tres primeros meses de vida (Di Pierdomenico, 2017). Estos cambios conllevan un deterioro significativo de la función electroretinográfica escotópica y fotópica, como también una expansión progresiva de un escotoma relativo y una pérdida de agudeza visual (Di Pierdomenico, 2017).

Además, también hay alteraciones a nivel vascular, ocurriendo: estrechamiento del lecho vascular retiniano, neovascularización en el EPR y desplazamiento de los vasos más internos de la retina, lo que puede acabar produciendo, más tardíamente, la muerte de las CGR por estrangulación de sus axones (García-Ayuso, 2014).

En la fisiopatología retiniana de la rata RCS juegan un papel muy importante las células de la microglía. Esto es debido a que, durante el proceso de deterioro del tejido, existe una gran acumulación de detritus en la CSEF la cual el EPR no es capaz de fagocitar. Consecuentemente, hay una migración de células microgliales desde las capas más internas hacia la CSEF para tratar de remediarlo (Di Pierdomenico, 2017). Sin embargo, estas células acaban liberando citoquinas que provocan un aumento de la inflamación de la retina y empeoran la degeneración de la misma (Liu *et al.*, 2013).

1.2.2. Tratamientos

Para suministrar medicamentos con el fin de tratar enfermedades oftalmológicas, se pueden emplear distintos métodos, bien sean invasivos o no invasivos.

Los métodos no invasivos se administran por vía tópica u oral. Oftalmológicamente, por vía tópica el medicamento se aplica directamente en la superficie ocular en forma de gotas o pomadas. Por vía oral se ingiere el fármaco y éste llega al ojo a través del torrente sanguíneo.

A veces no hay suficiente con los métodos no invasivos, teniendo que recurrir a otros procedimientos invasivos, tales como las inyecciones. En patologías del polo posterior del ojo es una opción bastante frecuente, ya que permite administrar el medicamento de una forma más precisa y cercana a la zona afectada.

1.2.2.1. Trasplante de CMMO

Hoy en día han tomado una gran relevancia como estrategia terapéutica para muchas enfermedades retinianas las Inyecciones IntraVítreas (IIV).

Una IIV consiste en la administración de diversos fármacos en el segmento posterior del ojo. Accediendo a través de la esclera hacia la cámara vítrea, cavidad situada detrás del cristalino.

Aunque su origen recae a principios del siglo veinte, su seguridad se ha puesto en duda durante muchas décadas debido a los riesgos asociados a la inyección. Actualmente, las ventajas y beneficios de administrar medicamentos a través de esta vía, superan dichos riesgos y existen distintas directrices que abordan la IIV (Maceira y Cantero, 2016).

Recientes estudios investigan sobre el efecto de la administración de células mononucleadas a nivel ocular y a través de IIV. El trasplante de Células Mononucleadas derivadas de Médula Ósea (CMMO) ha mostrado resultados prometedores para el tratamiento de ciertas degeneraciones retinianas, como también buenos perfiles de seguridad.

El aspirado de médula ósea contiene dos tipos de células madre: las hematopoyéticas (HSC, del inglés *Human Stem Cells*) y las mesenquimales (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*). Las células madre son una fuente de factores neurotróficos y favorables a la supervivencia, contribuyendo a mitigar procesos inflamatorios, entre otros.

El trasplante de CMMO en la retina podría promover, por tanto, la reparación de tejidos afectados, diferenciándose éstas en células retinianas normales y sustituir las dañadas. Las CMMO apoyarían a la estimulación de la neovascularización, como también a la regularización de genes anti-apoptóticos, la modulación de la respuesta inmunológica y la liberación de vesículas extracelulares y exosomas (Di Pierdomenico, 2017).

Con un importante efecto paracrino, parecen tener capacidad de ralentizar la degeneración de los FR y su uso estaría indicado durante estadíos primerizos de la enfermedad, periodo en que se produce el mayor deterioro del tejido afectado en el caso de la RP.

1.2.2.2. Minociclina

En la práctica con roedores es común el uso de las Inyecciones IntraPeritoneales (IIP) como método de administración sistémica de líquidos. Esta vía permite suministrar volúmenes de sustancias solubles relativamente grandes en la cavidad abdominal.

Un ejemplo de ello es la inyección de antibióticos diluidos como la minociclina, perteneciente al grupo de las tetraciclinas. Esta sustancia se usa principalmente para el tratamiento de infecciones bacterianas, aunque también se puede emplear para tratar patologías inflamatorias autoinmunes (Garrido-Mesa, 2013).

Estudios previos demuestran el efecto antiinflamatorio y neuroprotector de la minociclina en patologías degenerativas de la retina, junto a una notable inhibición microglial (Di Pierdomenico *et al.*, 2019).

1.3. Justificación del trabajo

Las degeneraciones de los FR de la retina representan la primera causa de ceguera irreversible en los países desarrollados, y actualmente no existe un tratamiento *gold standard* estandarizado. Una de las terapias más prometedoras es el trasplante de células capaces de reemplazar las existentes en el tejido dañado, aumentando su supervivencia y regeneración. Paralelamente, la administración de minociclina parece contribuir en la reducción de la activación y migración microglial, preservando la retina externa mediante sus propiedades antiinflamatorias y efectos antipapoptóticos.

Por consiguiente, en el presente ensayo se plantean estos dos tratamientos como posibles dianas terapéuticas para un modelo animal de enfermedad hereditaria de la retina.

2. Objetivos e hipótesis

El **objetivo principal** de este trabajo es investigar los efectos de la administración sistémica de minociclina y el trasplante intravítreo de CMMO, por separado y en combinación, en un modelo animal de degeneración hereditaria de la retina.

Para poder extraer conclusiones en este sentido, se han definido unos **objetivos específicos** que se detallan a continuación:

- **Espesor retiniano.** Evaluar los espesores total y externo de la retina.
- **Número de FR.** Calcular la cantidad de filas de núcleos de FR presentes en la CNE.
- **Conos.** Analizar cualitativamente la morfología de este tipo de FR.
- **Microglía.** Cuantificar el número de células microgliales presentes en la retina.
- **Macroglía.** Valorar la presencia de astrocitos y células de Müller en la retina.
- **Conexiones sinápticas.** Examinar la intensidad de señal recibida por inmunorreactividad en la CPE.

Los objetivos descritos se pueden resumir en la **hipótesis** general del trabajo: la administración de minociclina y CMMO puede tener un efecto neuroprotector en degeneraciones hereditarias de la retina.

3. Material y métodos

3.1. Animales

En este estudio se ha empleado un modelo animal de degeneración hereditaria de la retina, la rata pigmentada homocigótica RCS (del inglés *Royal College of Surgeons*). Para contrastar los resultados, se ha utilizado una pequeña muestra como control sano, la rata *Piebald Viral Glaxo* (PVG).

Todas ellas han sido tratadas según la normativa europea y nacional sobre la protección de animales utilizados para experimentación. También se han seguido las directrices planteadas

por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO) y la Universidad de Murcia (**Anexo II**).

Tanto las RCS como las PVG procedían de la colonia de cría de la Universidad de Murcia. Se han mantenido en jaulas de máximo 6 animales con una dieta *ad libitum* estándar en habitaciones con control de temperatura (20-22°C) y bajo períodos de 12 horas de luz/oscuridad en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, CEIB.

En toda manipulación experimental que ha implicado sufrimiento, los animales se han anestesiado según su peso corporal mediante inhalación (isofluorano) o IIP (con una mezcla de Ketamina (*Ketolar*®, Pfizer, Alcobendas, Madrid, España) y Xilacina (*Rompun*®, Bayer, Kiel, Alemania), y posteriormente se les ha aplicado un ungüento oftalmológico para prevenir lesiones e infecciones corneales (*Tobrex*®, Alcon-Cusí, S.A., El Masnou, Barcelona, España).

Un total de 33 ratas han sido sacrificadas mediante una sobredosis de pentaorbital sódico al 20% (*Dolethal Vetoquino*®, Especialidades Veterinarias SA; Alcobendas; Madrid, España). Una vez el animal ya no presentaba reflejos, se ha procedido a la perfusión intracardiaca (protocolo completo en **Anexo V**).

Estos animales se han dividido, sin discriminación de sexos, en tres grupos experimentales, según el tipo de tratamiento que se les ha administrado (**Figura 5**):

(1) IIPs diarias de minociclina desde el día 27 post nacimiento (P27) hasta su procesamiento, (2) un único trasplante en el ojo izquierdo de células mononucleadas de médula ósea (CMMO) de la misma cepa de ratas RCS a P28 a través de una IIV o (3) la combinación de ambas. Además, se han incluido controles degenerados (ratas RCS) y como control sano, la rata PVG de la misma edad, sin recibir ningún tipo de tratamiento.

Cada grupo experimental se ha subdividido en dos tiempos de análisis, siendo procesado a P35 o a P51.

Los ojos de cada “condición experimental”, se han agrupado según si habían recibido tratamiento con minociclina, CMMO, la combinación de las dos o sin administrarse ninguna de ellas (“control”), tal y como se representa en la tabla siguiente:

n (OJOS)	Rata RCS				Rata PVG
	Control	Minociclina	CMMO	Minociclina+CMMO	Control sano
P35	4	12	4	6	
P51	12	14	4	8	2

Tabla 1 Muestra del estudio, según el total de ojos bajo cada condición experimental.

De este modo, los resultados se han clasificado en estos cuatro grupos, teniendo en cuenta que a los ojos derechos (OD) de aquellos animales trasplantados con CMMO (IIV en su ojo izquierdo, OI) no les provoca ningún efecto contralateral significativo. Por lo que los OD de estos animales se han agrupado como “controles” o bien como tratados sólo con minociclina, en los casos de haber recibido ambos tratamientos.

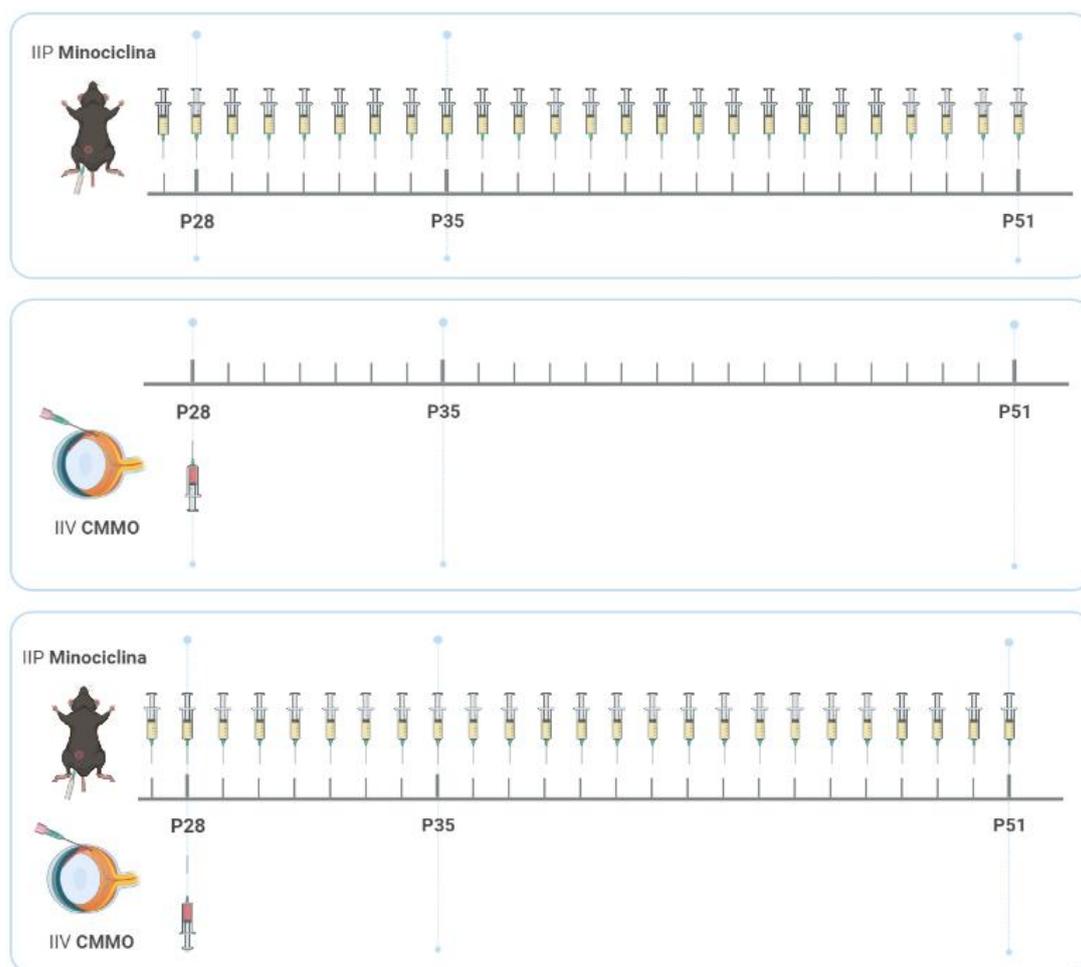


Figura 5 Diseño experimental. Tres grupos experimentales que recibieron: IIP diarias de minociclina, una IIV de CMMO o la combinación de ambos tratamientos. Tiempos de análisis: P35 o P51.

3.2. Inyecciones

Para las IIP, se ha diluido minociclina con agua destilada para obtener una concentración de $45\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se ha inyectado intraperitonealmente en proporción $1\mu\text{L}/\text{peso rata (g)}$.

Para el trasplante singénico de CMMO, se ha extraído médula ósea del fémur y tibia de ratas RCS de, aproximadamente, 3 meses de edad. Las CMMO han sido separadas del resto de células mediante centrifugación de gradiente por densidad, y re-suspendidas en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) para obtener una concentración de $100.000\text{ células}/\mu\text{L}$ (ver protocolo en **Anexo IV**).

Las IIVs se han efectuado mediante esclerotomía perforante. Con la ayuda de medios de magnificación, se ha realizado una incisión en la esclera y conjuntiva supero-temporal con una aguja estéril de 27G a 2mm del limbo esclerocorneal. Una vez ejecutada la esclerotomía, la aguja de la microjeringa Hamilton (26G) se ha introducido primero oblicuamente hacia el nervio óptico y más tarde perpendicularmente hacia el centro del globo ocular. Tan pronto la aguja se ha visualizado retrolenticularmente, se ha llevado a cabo la inyección de $2,5\mu\text{L}$ de disolución de CMMO y posteriormente la aguja se ha retraído con cuidado de no dañar ninguna estructura ocular.

3.3. Tomas de imagen y cuantificación

3.3.1. Análisis *in vivo*

Para los grupos procesados a P51, se ha realizado un análisis *in vivo* a P28, P35 y P51, a través de una Tomografía de Coherencia Óptica espectral (*OCT Spectralis®*, Heidelberg® Engineering, Heidelberg, Alemania Heidelberg-Spectralis), para medir los grosores de la retina.

Las medidas tomadas con la OCT se han realizado con la previa sedación por inhalación de isofluorano y dilatación con gotas de tropicamida al 1% (*Colicursí tropicamida 1%*; Alcon-Cusí, SA., El Masnou, Barcelona, España), en ambos ojos. El análisis elegido fue el *macular-cube-scan* con un campo de 20x25°, tomando la papila óptica como el centro de la imagen; para el seguimiento de los animales, se ha utilizado el modo *follow-up* del programa OCT, de forma que se han comparado siempre las mismas regiones analizadas.

Para homogeneizar la córnea de la rata, se ha colocado una lente de contacto permeable hecha a medida, cuyo radio es de 3,5mm. Al finalizar la prueba, se ha aplicado un antibiótico oftálmico con tobramicina para prevenir la desecación corneal.

Para medir el espesor de la retina total (desde los FR hasta la MLI) y externa (de los FR hasta la CPE) se han tomado cuatro mediciones en tres líneas de las exploraciones (superior, central -línea que atraviesa el nervio óptico- e inferior). En las líneas superior e inferior, estas medidas se han tomado a cuatro distancias equidistantes y, en la línea central, por comprender el disco óptico, las medidas se han tomado dos a cada lado de este. Así, se han obtenido 4 medidas x 3 líneas = 12 medidas de grosor retiniano total e exterior por animal.

3.3.2. Análisis *ex vivo*

3.3.2.1. Procesado histológico de la retina e inmunohistofluorescencia

Para poder alcanzar los objetivos planteados, se ha analizado la población y morfología de células de la retina seleccionadas en esta investigación mediante el procesado histológico de todos los grupos de estudio.

Al cumplir el periodo de supervivencia planteado en el diseño experimental (P35 o P51), los animales se han sacrificado y perfundido transcardialmente a través de la arteria aorta ascendente, primero con solución salina y posteriormente con paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato 0,1M (pH 7,4).

Todos los ojos han sido analizados en cortes sagitales de criostato. Para ello, fueron enucleados, lavados con PBS, post-fijados en PFA e inmersos en soluciones de sacarosa para la crioprotección de los tejidos, tal y como indica el protocolo (**Anexo V**).

Por último, las copas ópticas resultantes se incluyeron en un medio de montaje, orientadas debidamente, para su congelación rápida en isopentano a -80°C.

Tras la preparación de los bloques, se han obtenido cortes sagitales de 16 micrómetros de espesor en el criostato, los cuales contenían la cabeza del nervio óptico en la región central del corte.

Estos cortes se han inmunodetectado con anticuerpos contra la (i) molécula ionizadora adaptadora de enlace de calcio 1 (Iba1) para estudiar las células de la microglía, (ii) Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) para analizar las células macrogliales, (iii) Arrestina para examinar los segmentos interno y externo de los conos y (iv) Bassoon para observar las conexiones sinápticas entre estos FR y las células bipolares.

Finalmente, todos los cortes han sido contrateñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; *Vectashield Mounting Medium containing DAPI*, Vector Atom, Alicante, España), para estudiar los núcleos celulares en la CNE.

3.3.2.2. Adquisición de imágenes

Tres cortes de cada ojo han sido fotografiados con un microscopio de fluorescencia (*Leica DM6 B microscope*, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) y analizados con la ayuda de los programas informáticos *Adobe® Photoshop® CC* (*Adobe Systems, Inc.*, San José, CA, USA), para la cuantificación manual de células, y la herramienta *Histogram Analysis* del software *Image Pro Plus (IPP 5.1 for Windows)*; *Media Cybernetics*, Silver Spring, MD, USA), para el cálculo automático de la intensidad de señal de la expresión de la macroglía y de las conexiones sinápticas.

Además, se ha empleado un microscopio confocal (*Leica SP8*, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), para la toma de microfotografías más detalladas de la morfología de los conos y las conexiones sinápticas de la CPE.

Para el análisis celular de las muestras a partir de los fotomontajes, se ha diferenciado entre la retina superior e inferior, tomando el nervio óptico como el “punto de división” entre ellas. Cada una se ha subdividido en 4 secciones a diferentes distancias respecto al nervio: 25, 50, 75 y 95%, considerando 100% la longitud de cada hemirretina, obteniendo un total de 8 zonas de la retina donde, trazando un rectángulo de 15x20 pulgadas, se ha cuantificado o estudiado la estructura pertinente:

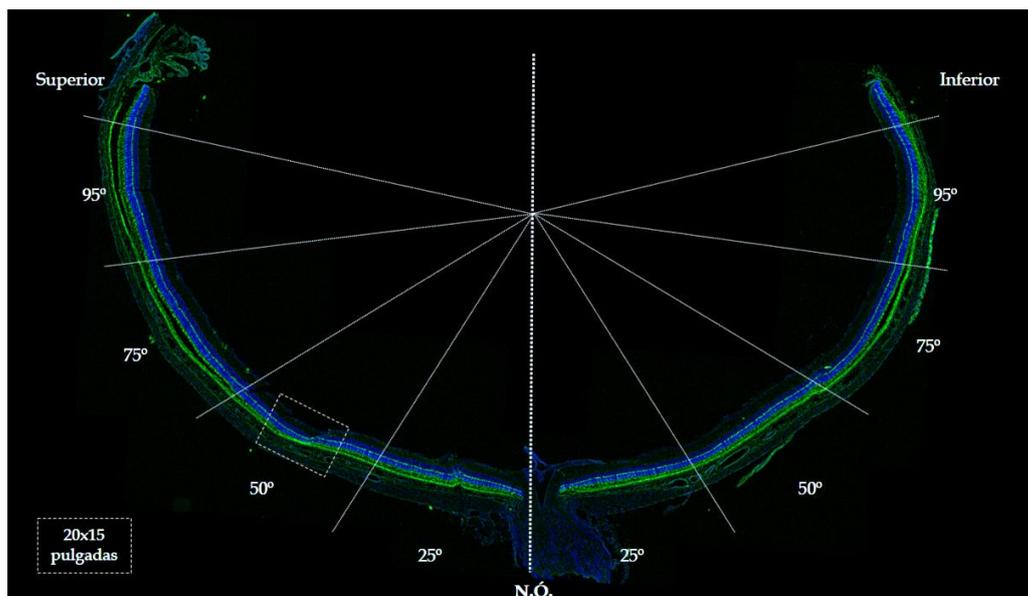


Figura 6 División de la retina para el análisis *ex vivo*. N.Ó.= Nervio Óptico, punto de división entre la hemirretina superior e inferior. □ = sección de 20x15 pulgadas a examinar dentro de cada “distancia” respecto al N.Ó. (25, 50, 75 y 95%).

3.3.2.3. Cuantificación

En las microfotografías de los cortes sagitales de la retina, se han cuantificado manualmente el número de filas de núcleos en la capa nuclear externa (CNE) y el número de células microgliales en todas las capas de la retina, según los procedimientos descritos previamente en detalle (Di Pierdomenico *et al.*, 2017; Di Pierdomenico *et al.*, 2018; Di Pierdomenico *et al.*, 2020; Martínez-Vacas *et al.*, 2021).

La inmunohistofluorescencia de GFAP y Bassoon, tal y como se ha descrito anteriormente, se ha cuantificado utilizando la herramienta *Histogram Analysis* del software *Image Pro Plus*; ésta permite medir la intensidad de fluorescencia en diferentes partes seleccionadas de las microfotografías, proporcionando la intensidad media obtenida y un gráfico de la intensidad de fluorescencia por imagen. Se ha calculado el área bajo la curva que ilustra la cantidad total de fluorescencia de cada imagen.

Para ello, las microfotografías en las que se iba a realizar la intensidad de la inmunorreactividad de GFAP o Bassoon, se adquirieron con el mismo tiempo de exposición para garantizar la uniformidad de la medición.

3.4. Variables de Estudio y Análisis Estadístico

Para validar o rechazar la hipótesis general del estudio, se han definido las hipótesis nula y alternativa en términos estadísticamente admisibles, como:

- Hipótesis nula (H0): el curso de la degeneración hereditaria de la retina en un modelo animal no cambia en presencia de minociclina ni/o CMMO.

- Hipótesis alternativa (H1): el curso de la degeneración hereditaria de la retina en un modelo animal cambia en presencia de minociclina y/o CMMO.

Se ha desarrollado un ensayo experimental de casos controles para evaluar la respuesta retiniana en un modelo de roedor de degeneración hereditaria de la retina al ser tratados con minociclina y/o CMMO.

La variable independiente del estudio es el tratamiento recibido por el animal y las variables dependientes son el espesor retiniano, el número de filas de FR y de células gliales, la morfología de los conos y la intensidad de las conexiones sinápticas en la CPE.

Se han tratado los resultados desde un punto de vista inferencial mediante un análisis estadístico. Para llevarlo a cabo, se ha utilizado el programa *SigmaPlot® (Version 14.0; Systat Software Inc. (SSI), San José, California, EEUU)*.

Para la comparación entre dos grupos se ha aplicado la prueba *t-test* o la prueba *Mann-Whitney* dependiendo de si los valores eran paramétricos o no paramétricos. Para comparar diferentes intervalos de supervivencia dentro del mismo grupo se ha empleado la prueba de análisis de variancia *one-way ANOVA* seguida de una prueba *post-hoc* de *Tukey*. Las diferencias se han considerado significativas cuando $p \leq 0,05$.

4. Resultados

Los resultados de este estudio se describen según la estadística descriptiva y según la estadística inferencial.

La estadística descriptiva tiene como objetivo analizar las variables y describir los resultados; de manera que, los datos resultantes del experimento se han resumido y clasificado en forma de gráficos o histogramas, con la intención de señalar las características que los definen.

Simultáneamente, se han añadido los datos obtenidos del análisis inferencial, con el fin de rechazar o aceptar las hipótesis planteadas. Para ello, se han anotado los valores promedios, seguidos de la desviación estándar (SD, *Standard Deviation*) y su significancia, siguiendo este formato: "PROMEDIO±SD, *p*-valor".

Añadir que, los resultados *ex vivo* de los grupos "degenerados" (rata RCS) se han contrastado con los valores obtenidos de un animal sano (rata PVG), al inicio de cada sub-apartado.

4.1. Resultados *in vivo*

Todas las ratas RCS procesadas a P51 han sido analizadas *in vivo* en tres tiempos distintos: P28 (instante *baseline*, sin influencias de ningún tratamiento), P35 y P51, antes de su perfusión, mediante tomografía de coherencia óptica (OCT).

4.1.1. Estudio cuantitativo del espesor de la retina total y externa

Los resultados obtenidos de las medidas de la OCT se muestran, en forma de medias aritméticas por cada tiempo analizado, en el siguiente gráfico de barras (**Gráfico 1**):

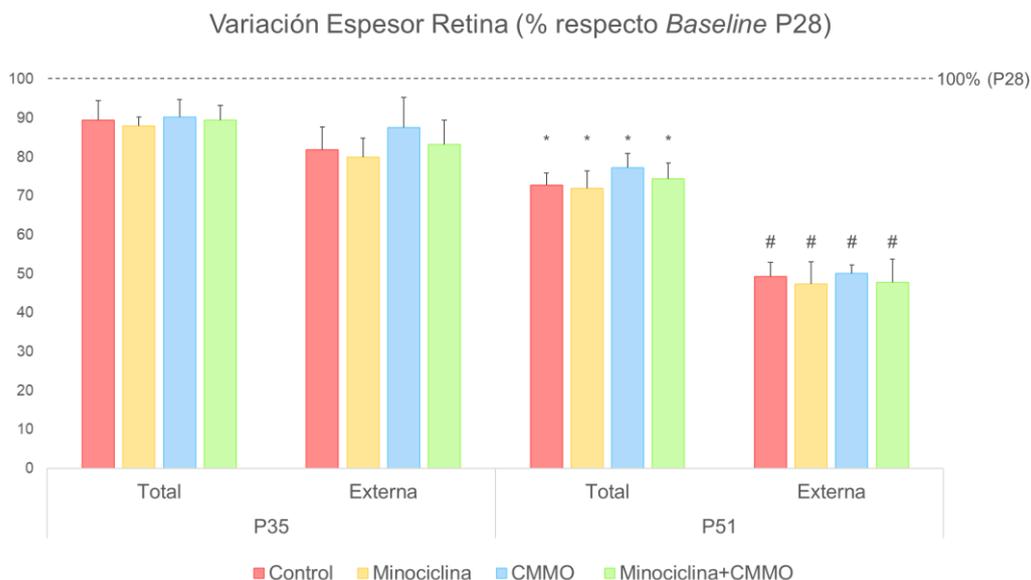


Gráfico 1 Diagrama de barras representando la variación del espesor total y externo de la retina a P35 y P51, calculada según el porcentaje medio obtenido respecto a P28 (100%). * y # = diferencia estadísticamente significativa con los tiempos de análisis previos en el mismo grupo (*One Way-ANOVA*, $p < 0,05$) No existen diferencias significativas entre el efecto de cada grupo experimental, aunque parece que hay una tendencia de mayor preservación de la retina externa a P35 cuando el ojo recibe un trasplante de CMMO.

Para reducir la variabilidad, se han calculado los porcentajes del espesor retiniano a P35 y P51, con respecto al de P28; de esta forma, se ha tenido en cuenta la variación que ha experimentado cada animal en comparación con sus condiciones iniciales. Con estos valores, se ha obtenido el promedio de cada uno de los tres grupos experimentales y del “grupo control degenerado” (ratas RCS *naive*).

Al analizar el **espesor de la retina total** se observa que, independientemente del tratamiento usado no existe diferencia significativa entre la variación del grosor retiniano de los ojos controles (89,49%±5,06 a P35 y 72,72%±3,20 a P51, **Gráfico 1, Anexo VII.a.**) y los ojos tratados, siendo los valores medios 87,95%±2,37, 90,30%±4,56 y 89,47±3,82 a P35 y 71,94%±4,47, 77,25±3,66 y 74,46±3,98 a P51 para los ojos tratados con minociclina, CMMO o la combinación de ambos tratamientos, respectivamente (**Gráfico 1, Anexo VII.a.**).

De la misma manera, al analizar los **espesores de la retina externa** se aprecia que no existe diferencia estadística entre los ojos controles (81,90%±5,83 a P35 y 49,34±3,57 a P51) y los ojos tratados, siendo los valores medios 80,04%±4,87, 87,65%±7,66 y 83,28%±6,24 a P35 y 47,40%±5,64, 50,12%±2,19 y 47,82%±6,01 a P51 para los ojos tratados con minociclina, CMMO o la combinación de ambos tratamientos, respectivamente (**Gráfico 1, Anexo VII.a.**).

En vista a los valores obtenidos, no se rechaza la H_0 , es decir, se considera que el grosor retiniano de una rata RCS no cambia en presencia de minociclina ni/o CMMO.

Al examinar la evolución tanto del espesor de la retina total como el de la retina externa en los distintos tiempos de análisis, se ha comprobado que la disminución progresiva del espesor retiniano total de los cuatro grupos estudiados es causada, esencialmente, por la reducción del grosor de la retina externa, mostrando unos resultados muy similares entre ambas.

No existe una diferencia significativa entre los distintos grupos experimentales para ninguno de los tiempos analizados (*t-test*: valores $p > 0,05$), pero sí hay una disminución progresiva significativa del espesor retiniano total y externo conforme transcurre el tiempo (*One-Way ANOVA* $p < 0,001$ en la mayoría de casos).

4.2. Resultados *ex vivo*

En el siguiente apartado se describen los resultados obtenidos a través de los inmunohistomarcajes de las muestras procesadas.

4.2.1. Fotorreceptores

El posible efecto de las CMMO y la minociclina sobre los FR se ha analizado de forma cuantitativa y cualitativa, tal y como se describe a continuación.

4.2.2.1. Estudio cuantitativo de los núcleos de los FR

Para examinar cuantitativamente los FR, se ha calculado el promedio del número de filas de núcleos contabilizados en la CNE. Estos resultados se muestran en forma de gráfico de barras, para los dos tiempos analizados:

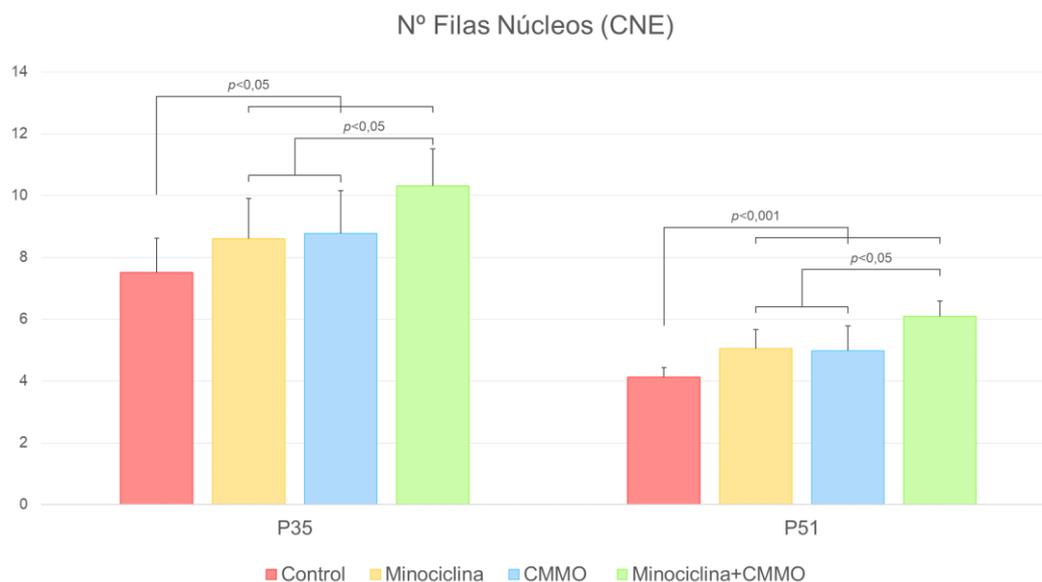


Gráfico 2 Diagrama de barras del promedio de filas de núcleos en la CNE en los dos tiempos analizados. Los grupos experimentales presentan un mayor número de filas respecto al control, tanto a P35 como a P51, siendo este aumento más relevante en el grupo que recibe ambos tratamientos.

Un animal no degenerado presenta, de media, $11,82 \pm 1,80$ filas de núcleos en la CNE a P51, y se considera estable a lo largo del tiempo.

Tal como se puede ver en el **Gráfico 2** y en la **Figura 7**, en ratas distróficas (RCS), las filas nucleares de la CNE disminuyen significativamente durante el paso del tiempo, evento debido al progreso natural de la degeneración retiniana del modelo animal empleado (Di Pierdomenico, 2017). Así y todo, los tres grupos experimentales presentan un número de filas de núcleos significativamente más grande que el grupo control en ambos tiempos analizados (filas de núcleos en los ojos control: $7,52 \pm 1,10$ a P35 y $4,13 \pm 0,30$ a P51, **Gráfico 2, Anexo VII.b.**).

Esta condición es más evidente para el grupo que recibe ambos tratamientos ($10,31 \pm 1,20$, $p < 0,001$ a P35 y $6,09 \pm 0,50$, $p < 0,001$ a P51), seguida del grupo de CMMO ($8,77 \pm 1,40$, $p < 0,05$ a P35 y $4,98 \pm 0,80$, $p < 0,001$) y minociclina ($8,61 \pm 1,30$, $p < 0,05$ a P35 y $5,06 \pm 0,60$, $p < 0,001$ a P51; **Gráfico 2, Anexo VII.b.**).

Estos datos sugieren que, tanto el trasplante de CMMO como la administración de minociclina, ejercen un efecto neuroprotector sobre los FR, y éste es significativamente mayor cuando se administran de forma conjunta. Así, se descarta la H_0 , para constatar que el número de filas de FR en la CPE cambia en presencia de minociclina y/o CMMO.

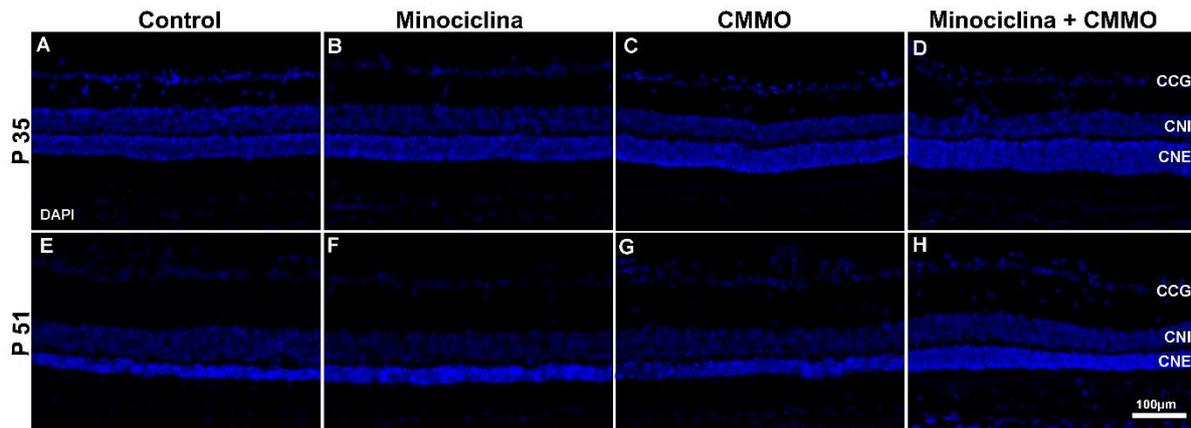


Figura 7 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS contrañeídas con DAPI, mostrando los núcleos celulares. Ojos *naive* (A y E), tratados con minociclina (B y F), CMMO (C y G) y combinación de minociclina y CMMO (D y H) analizados a P35 y P51.

4.2.2.2. Estudio cualitativo de la morfología de los fotorreceptores

Los conos se han inmunodetectado con Arrestina, lo que ha permitido hacer una evaluación cualitativa de estas células. Se ha examinado su morfología en los distintos tiempos de análisis para cada grupo experimental, tal y como se muestra a continuación:

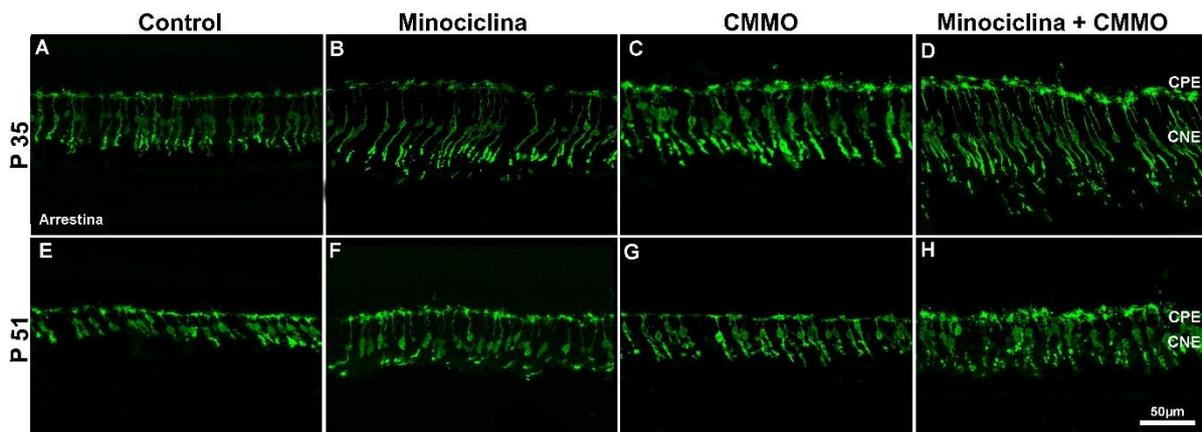


Figura 8 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS inmunomarcadas con Arrestina, mostrando los conos. Ojos *naive* (A y E), tratados con minociclina (B y F), CMMO (C y G) y combinación de minociclina y CMMO (D y H) analizados a P35 y P51.

En vista a las imágenes representadas, se observa una preservación de la morfología de los conos en los ojos tratados (tanto con minociclina, con CMMO como con la combinación de ambas) respecto a los *naive*. Este efecto es más evidente a plazos cortos de estudio, el cual va perdiendo efectividad con el transcurso del tiempo.

Esta mejora cualitativa de los FR se puede apreciar como un mantenimiento de la integridad de sus expansiones interna y externa, presentando menos interrupciones o fragmentaciones. Además, cuando el animal recibe inyecciones de minociclina (aislada o conjuntamente con CMMO), se percibe una mayor longitud y rectitud de estas células, contrastándolas con los animales control.

4.2.2. Estudio cuantitativo de la expresión de Iba-1 en las células de microglía

El recuento de células microgliales se resume en el siguiente gráfico, donde los promedios de las áreas analizadas de cada muestra se han clasificado en los grupos previamente definidos:

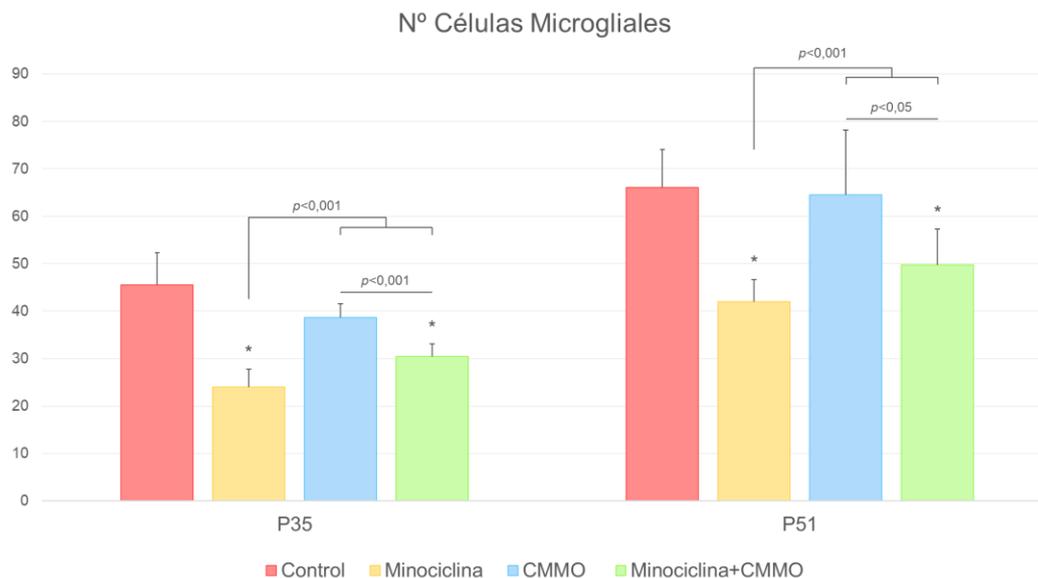


Gráfico 3 Diagrama de barras representando el promedio del número de células microgliales en los dos tiempos de análisis. Los ojos tratados con minociclina muestran una activación microglial reducida respecto con los ojos control. * = diferencia estadísticamente significativa respecto con el grupo control (*t-test*, $p < 0,001$) en cada tiempo analizado.

Los niveles de microglía en una rata sin degeneración se mantienen constantes, mientras no existan procesos inflamatorios; el valor medio encontrado es de $13,85 \pm 0,80$ células.

Los resultados de este estudio demuestran que la presencia de microglía en la rata RCS aumenta significativamente durante el transcurso de su degeneración. No obstante, en los dos tiempos experimentales analizados, la media del número de células de la microglía se ve significativamente reducida ($p < 0,001$) en los grupos tratados con minociclina ($24,06 \pm 3,77$ a P35 y $42,01 \pm 4,64$ a P51) y con la combinación de minociclina y CMMO ($30,47 \pm 2,65$ a P35 y $49,74 \pm 7,52$ a P51) respecto al control (recuento medio de los ojos control: $45,54 \pm 6,80$ a P35 y $66,06 \pm 7,98$ a P51, **Gráfico 3, Anexo VII.b.**).

Sin embargo, los animales tratados únicamente con CMMO no presentan diferencia significativa en comparación con el control ($38,68 \pm 2,92$ a P35 y $64,51 \pm 13,71$ a P51, $p > 0,5$, **Gráfico 3, Anexo VII.b.**).

Cuando se equipara entre los distintos tratamientos (tanto a P35 como a P51), se puede observar que existe diferencia estadísticamente significativa entre cada uno de ellos. El número total de células microgliales presentes en la retina tratada con minociclina es significativamente menor ($p < 0,001$) en comparación con los otros dos grupos experimentales (**Figura 9**). Paralelamente, la presencia de microglía en ojos tratados con la combinación de minociclina y CMMO es significativamente inferior a la encontrada en aquellos que solo recibieron IIV de CMMO.

De este modo, se rechaza la hipótesis nula para demostrar que la administración de minociclina ayuda a disminuir la presencia de microglía en la retina de la rata RCS.

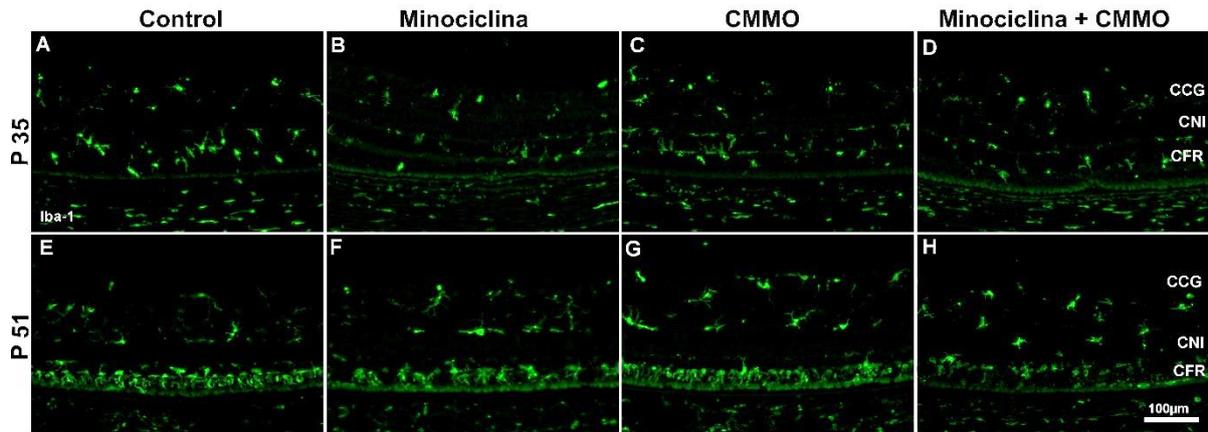


Figura 9 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS inmunomarcadas con Iba-1, mostrando las células microgliales. Ojos *naive* (A y E), tratados con minociclina (B y F), CMMO (C y G) y combinación de minociclina y CMMO (D y H) analizados a P35 y P51.

4.2.3. Estudio cuantitativo de la expresión de GFAP en las células de macroglía

El análisis de las células macrogliales se representa en el **Gráfico 4**, según el promedio de la expresión de GFAP. Para ello, se ha calculado la unidad de fluorescencia relativa (RFU, *Relative Fluorescence Unit*) de la intensidad de señal bajo la curva obtenida en las secciones examinadas.

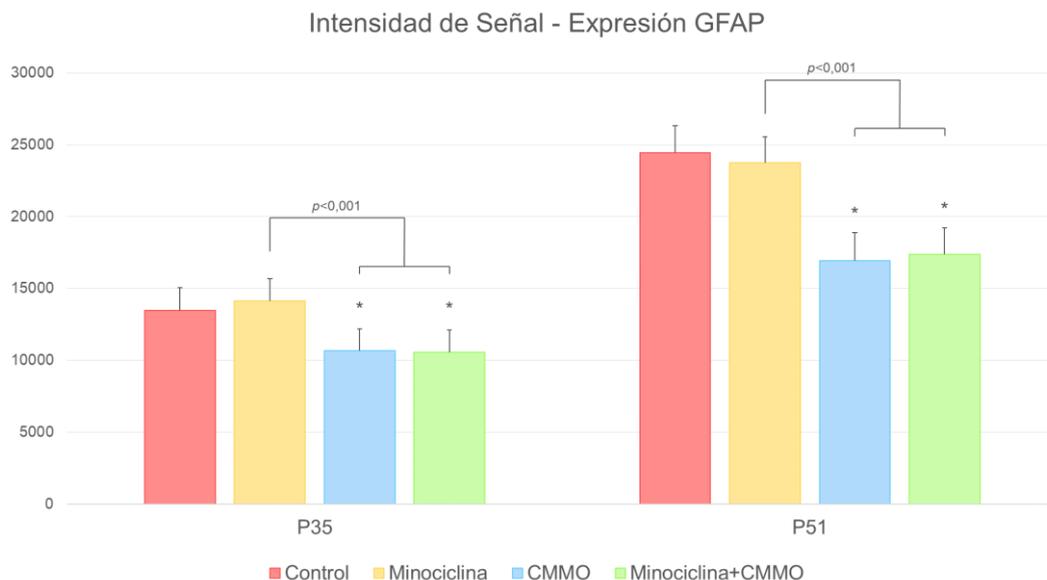


Gráfico 4 Gráfico de columnas mostrando el valor promedio de la expresión de GFAP (intensidad de señal bajo la curva, RFU) de las secciones examinadas, en cada "condición experimental". * = diferencia estadísticamente significativa respecto con el grupo control (*t-test*, $p < 0,001$) en cada tiempo analizado. La señal de GFAP disminuye en los ojos trasplantados con CMMO, es decir, la activación de la macroglía se ve reducida ante el trasplante de estas células

La retina de un animal sano presenta una expresión de GFAP media de $3464,79 \pm 189$ RPU.

En el modelo animal degenerado empleado, se puede observar que la expresión de GFAP aumenta notable y significativamente con el paso del tiempo en todas las condiciones experimentales (**Gráfico 4, Figura 10**).

No obstante, el incremento de los valores RFU del GFAP es significativamente menor, en ambos tiempos de estudio, para los grupos tratados con CMMO (10675 ± 1501 , $p < 0,000$ a P35 y 16941 ± 1934 , $p < 0,001$ a P51, **Gráfico 4, Anexo VII.b.**) y con la combinación de minociclina y CMMO (10558 ± 1541 , $p < 0,001$ a P35 y 17364 ± 1851 , $p < 0,001$ a P51, **Gráfico 4, Anexo VII.b.**) en relación con el grupo control (13475 ± 1569 a P35 y 24465 ± 1864 a P51, **Gráfico 4, Anexo VII.b.**).

En los ojos tratados solamente con minociclina, en cambio, se observan unos valores de expresión de GFAP muy similares a los ojos controles (14156 ± 1541 a P35 y 23748 ± 1801 a P51, $p > 0,05$, **Gráfico 4, Anexo VII.b.**).

Al comparar los distintos grupos experimentales entre ellos, se aprecia un descenso estadísticamente significativo ($p < 0,001$) de expresión de GFAP en los ojos trasplantados con CMMO (aislada o conjuntamente con minociclina), enfrente a los ojos tratados solamente con minociclina. Sin embargo, no encontramos diferencia estadística ($p > 0,05$) cuando se compara entre los grupos tratados con CMMO y los tratados con la combinación de minociclina y CMMO.

Considerando los valores obtenidos, que muestran una diferencia significativa entre los promedios de los dos grupos que incluyen CMMO en su tratamiento enfrente a los grupos que no las incluyen, se infiere que: la activación de la macroglía en la rata RCS decrece en presencia de CMMO. Contrariamente, el tratamiento con minociclina no tiene efecto alguno sobre la expresión de GFAP en las células macrogliales.

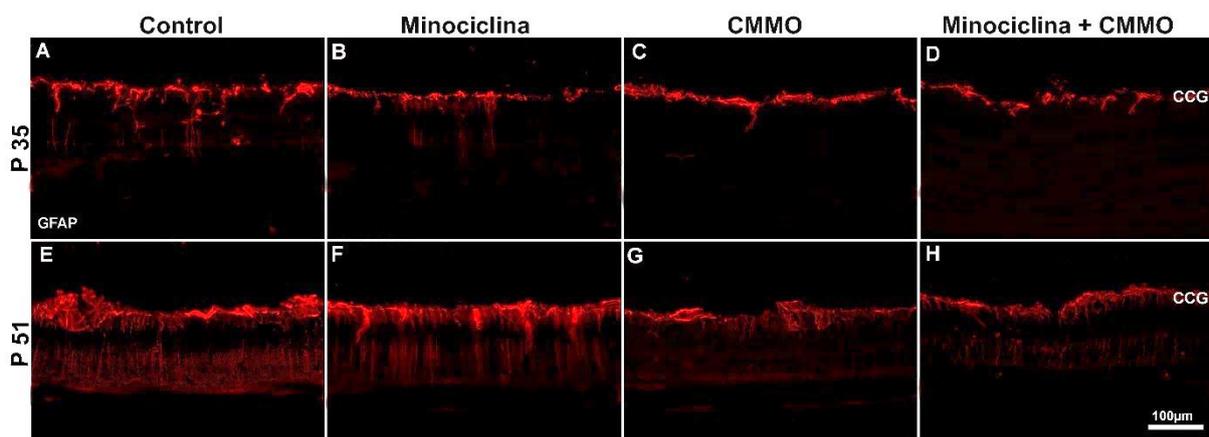


Figura 10 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS inmunomarcadas con GFAP, mostrando las células macrogliales. Ojos *naive* (A y E), tratados con minociclina (B y F), CMMO (C y G) y combinación de minociclina y CMMO (D y H) analizados a P35 y P51.

4.2.4. Estudio cuantitativo de las conexiones sinápticas entre células bipolares y FR

Del mismo modo que la macroglía, el análisis de las conexiones sinápticas de la CPE se ha realizado en función de la intensidad de señal bajo la curva que se ha obtenido de la inmunofluorescencia de Bassoon en la CPE. Los valores promedio de cada grupo se representan en el siguiente diagrama:

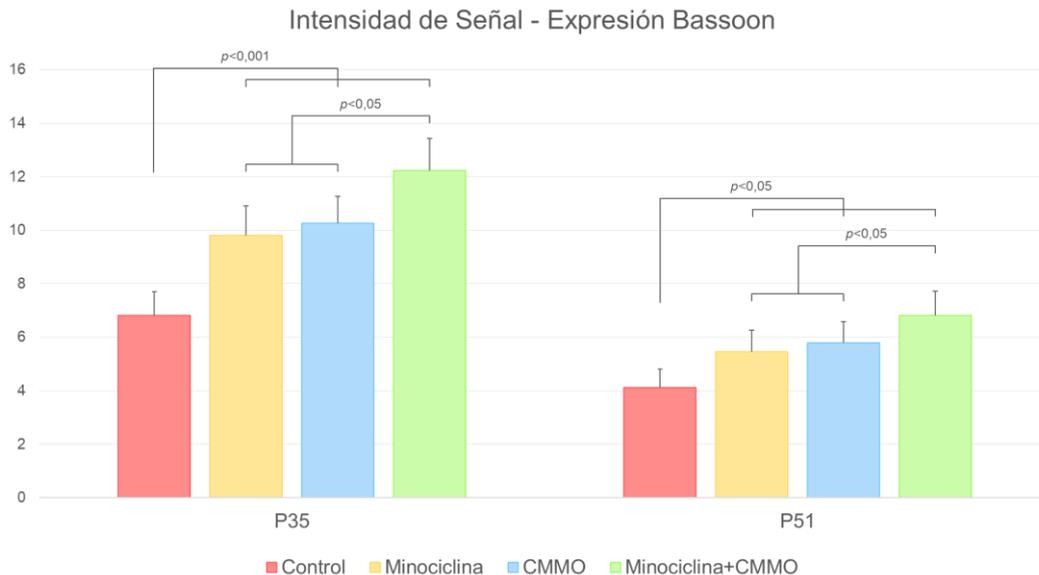


Gráfico 5 Diagrama de barras presentando el valor promedio de la intensidad de señal bajo la curva de la expresión de Bassoon en la CPE (medido en RFU) de las secciones examinadas, según el tratamiento recibido y en ambos tiempos de análisis. La señal de Bassoon aumenta ante la administración de minociclina y/o CMMO, más aún cuando se inyectan conjuntamente. Así pues, la combinación de ambos tratamientos podría actuar preservando las conexiones sinápticas de la CPE.

La CPE de una retina no patológica presenta valores RPU temporalmente estables ante la inmunorreactividad de Bassoon, con una media de $12,25 \pm 1,50$ por sección.

El gráfico de barras (ratas degeneradas RCS) muestra cómo los tres grupos experimentales presentan una intensidad de señal más alta en la CPE frente a la obtenida del grupo control (RFU de los ojos control: $6,81 \pm 0,9$ a P35 y $4,11 \pm 0,7$ a P51, **Gráfico 5, Anexo VII.b.**).

El aumento de la expresión de Bassoon es estadísticamente significativo ($p < 0,001$ a P35 y $p < 0,05$ a P51, en los tres casos) para los ojos que recibieron inyecciones de minociclina y CMMO ($12,24 \pm 1,20$ a P35 y $6,81 \pm 0,90$ a P51, **Gráfico 5, Anexo VII.b.**), CMMO ($10,27 \pm 1,00$ a P35 y $5,78 \pm 0,80$ a P51, **Gráfico 5, Anexo VII.b.**) y minociclina ($9,81 \pm 1,10$ a P35 y $5,46 \pm 0,80$ a P51, **Gráfico 5, Anexo VII.b.**).

Los ojos que presentan un mayor aumento de la intensidad de señal de la CPE son los que han recibido la combinación de ambos tratamientos (**Figura 11**), llegando a doblar los valores RFU a P35 respecto los ojos control. Asimismo, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los ojos tratados con minociclina y CMMO respecto a las otras dos condiciones experimentales, indicando que la combinación de ambos tratamientos es más efectiva que cuando se administran de forma separada a la hora de reducir la degeneración de la sinapsis de los FR con las células bipolares.

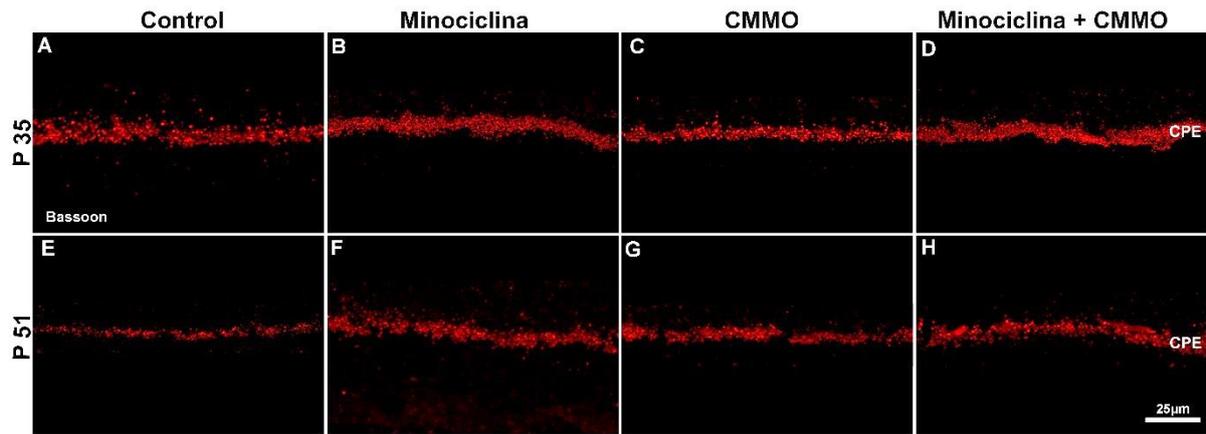


Figura 11 Microfotografías representativas de las secciones sagitales de la retina de rata RCS inmunomarcadas con Bassoon, mostrando las conexiones sinápticas en la CPE. Ojos *naive* (A y E), tratados con minociclina (B y F), CMMO (C y G) y combinación de minociclina y CMMO (D y H) analizados a P35 y P51.

5. Discusión

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la administración sistémica de minociclina e intravítrea de CMMO, tanto por separado como tratamiento combinado, durante el estadio inicial de la degeneración hereditaria de la retina en un modelo animal: la rata pigmentada RCS.

El análisis *in vivo* del **espesor total y externo de la retina**, medido mediante OCT, muestra que ningún tratamiento probado consigue una preservación significativa de la retina; sin embargo, la cuantificación *ex vivo* de los núcleos de los FR en la CNE muestra un efecto neuroprotector importante y significativo ante los tres escenarios terapéuticos propuestos.

La diferencia entre los dos resultados podría deberse a la sensibilidad y especificidad de las pruebas. Estudios previos han demostrado que la neuroprotección de los FR en este modelo animal tiene que ser muy significativa para que las pruebas *in vivo*, como la OCT y/o un análisis electrofisiológico, sean capaces de detectarla (Di Pierdomenico *et al.*, 2022, Martínez-Vacas *et al.*, 2022).

No obstante, cuando se analiza el espesor retiniano en los mismos grupos, pero a lo largo del estudio, se observa una disminución similar y significativa del grosor tanto de la retina interna como de la retina externa, típico de la degeneración en las ratas RCS (Di Pierdomenico *et al.*, 2017; Ryals, *et al.*, 2017). El adelgazamiento retiniano en estadios tempranos es debido, principalmente, al deterioro de las capas más externas de la retina.

El estudio *ex vivo* de los **FR en la CNE** muestra una disminución significativa de filas de núcleos con el paso del tiempo en todas las condiciones de estudio, similar a la obtenida en otros estudios previos (Di Pierdomenico *et al.*, 2017, 2022; Ryals *et al.*, 2017; Martínez-Vacas *et al.*, 2022) pero, a su vez, indica que existe un efecto neuroprotector importante y significativo ante los tres grupos experimentales planteados.

Cuando estos tratamientos se aplican por separado, su impacto es menor, rescatando una media de una o dos filas de núcleos en ambos tiempos de análisis. Estos valores son prácticamente iguales tanto con minociclina como con CMMO, lo que indica que ambos tratamientos preservan la CNE de la misma forma. Estos hallazgos son compatibles con la literatura previa, donde se constata que tanto el trasplante singénico de CMMO (Di Pierdomenico *et al.*, 2022) como el tratamiento con minociclina (Di Pierdomenico *et al.*, 2018) ejercen un efecto neuroprotector ante degeneraciones hereditarias de la retina.

La combinación de minociclina y CMMO ha resultado ser el tratamiento más efectivo, llegándose a preservar hasta tres o dos filas de núcleos a P35 y P51, respectivamente, en comparación con los ojos *naive*. Esto concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios donde se demuestra que la combinación de minociclina, para reducir la activación microglial, junto a la IIV de factores neurotróficos como el *bFGF* tienen un efecto aditivo ante la neuroprotección de los FR en el mismo modelo animal (Di Pierdomenico *et al.*, 2018).

En vista a los presentes resultados de preservación de los FR junto a los ya obtenidos en otras investigaciones, se reafirma que la activación de la microglía juega un papel fundamental en el avance de la degeneración en estas enfermedades (Di Pierdomenico *et al.*, 2017, 2018,

2022; Martínez-Vacas *et al.*, 2022). Así mismo, estos hallazgos corroboran que la presencia de **microglía** en el total de la retina se ve estadísticamente reducida cuando se inyecta minociclina de forma sistémica, tanto aislada como en combinación con CMMO, rebajando el número de células microgliales a la mitad a P35, y a una tercera parte a P51, en comparación a los controles.

La minociclina, pues, otorga un efecto neuroprotector sobre los FR gracias a sus propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas durante el transcurso de degeneraciones retinianas, (Scholz *et al.*, 2015; Di Pierdomenico *et al.*, 2018).

Como se ha descrito en la introducción, la expresión de GFAP en las células de **macroglía** es un indicador de inflamación en la retina que empieza en estadios muy tempranos en las ratas RCS (Di Pierdomenico *et al.*, 2017). Otros estudios han demostrado que la reducción de la inflamación retiniana mediante IIV de CMMO o tratamiento sistémico con taurina es beneficioso y ralentiza la degeneración de los FR en este modelo animal (Di Pierdomenico *et al.*, 2018, 2022; Martínez-Vacas *et al.*, 2022).

Los resultados aquí obtenidos indican que existe una disminución de la expresión de GFAP en las células de la macroglía y una consecuente neuroprotección de los FR, solamente cuando se trasplantan CMMO (como único tratamiento o en combinación con minociclina). Gracias a la reducción de la gliosis reactiva, responsable de la apoptosis neuronal de la retina, y a la modulación de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias mediante mecanismos paracrinos (García-Ayuso *et al.*, 2022), se confirma que las CMMO son capaces de neuroproteger los FR en este modelo animal de degeneración hereditaria de la retina.

Está ampliamente demostrado que en las retinas afectadas por una degeneración hereditaria presentan un deterioro de las conexiones sinápticas a medida que transcurre su degeneración y que esta alteración se puede observar como una disminución de la inmunoreactividad de Bassoon en la CPE. Este acontecimiento puede ser debido a la remodelación secundaria de la retina interna (Di Pierdomenico *et al.*, 2022; Cuenca *et al.*, 2005; Pinilla *et al.*, 2007). Así que, tras demostrar que con todos los tratamientos probados se encuentra un número significativamente mayor de núcleos de FR en la CPE y que la morfología de estos es claramente mejor respecto a los de un ojo control, se han estudiado las conexiones sinápticas entre FR y bipolares en la CPE mediante la cuantificación de la señal de Bassoon.

Los resultados de este estudio revelan que ante la administración de minociclina y CMMO, la expresión de Bassoon obtenida aumenta significativamente respecto a los ojos control independientemente del tratamiento utilizado y que, en concordancia con los resultados obtenidos en la cuantificación de núcleos en la CPE, la combinación de ambos tratamientos tiene un efecto significativamente mayor que los dos por separado. Confirmando que los FR rescatados con los diferentes tratamientos siguen teniendo conexiones sinápticas con el resto de las neuronas de la retina para poder continuar enviando información hacia las vías sensitivas aferentes.

6. Conclusiones

En este estudio se ha podido validar la hipótesis inicial, ya que, en la mayoría de los casos existe una dependencia entre la variable independiente (tratamiento) y la dependiente (respuesta retiniana).

Por ende, se ha demostrado que la administración de minociclina y/o CMMO tiene un efecto neuroprotector en la degeneración hereditaria de la retina de la rata RCS, siendo este impacto mayor a corto plazo (P35) y perdiendo efectividad a largo término (P51).

En base a los objetivos específicos planteados, se extraen las siguientes conclusiones:

- El **espesor retiniano** se ve reducido con el paso del tiempo en todas las condiciones. Los tratamientos examinados no producen un cambio significativo en el grosor de la retina total ni externa.
- Existe una reducción progresiva del **número de filas de núcleos en la CNE** en todos los grupos. Ésta se ve “frenada” cuando se inyecta minociclina o CMMO, más aún, al administrarse de forma conjunta.
- La **morfología de los conos** se preserva ante la administración de minociclina y/o CMMO.
- Las **células microgliales** aumentan en número a lo largo de la degeneración, hecho que se ve marcadamente reducido ante la administración de minociclina.
- La presencia de **macroglía** en la retina incrementa durante el transcurso del tiempo, si bien el trasplante de CMMO la puede llegar a atenuar considerablemente.
- Existe un deterioro de las **conexiones sinápticas de la CPE** conforme pasa el tiempo, el cual se apacigua ante la administración de minociclina o CMMO, e incluso más cuando se combinan las dos simultáneamente.

7. Bibliografía

- Bourne, R.R.A., Jonas, J.B., Bron, A.M., Cicinelli, M.V., Das, A., Flaxman, S.R., Friedman, D.S., Keeffe, J.E., Kempen, J.H., Leasher, J., Limburg, H., Naidoo, K., Pesudovs, K., Peto, T., Saadine, J., Silvester, A.J., Tahhan, N., Taylor, H.R., Varma, R., Wong, T.Y. & Resnikoff, S. (2018). Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe in 2015: Magnitude, temporal trends and projections. *Br J Pharmacol*, 102: 575– 585. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2017-311258
- Cuenca, N., Pinilla, I., Sauve, Y. & Lund, R. (2005). Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats. *Eur J Neurosci*, 22: 1057–1072. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04300.x
- Di Pierdomenico, J., García-Ayuso, D., Pinilla, I., Cuenca, N., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., & Villegas-Pérez, M. P. (2017). Early Events in Retinal Degeneration Caused by Rhodopsin Mutation or Pigment Epithelium Malfunction: Differences and Similarities. *Front neuroanat*, 11, 14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00014>
- Di Pierdomenico, J., (2017). *Estudio de la respuesta glial y de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en dos modelos animales de degeneración hereditaria de fotorreceptores y tras inyecciones intravítreas*. [Tesis doctoral, Universidad de Murcia]. DIGITUM <http://hdl.handle.net/10201/53767>
- Di Pierdomenico, J., Scholz, R., Valiente-Soriano, F.J., Sánchez-Migallón, M.C., Vidal-Sanz, M., Langmann, T., Agudo-Barriuso, M., García-Ayuso, D. & Villegas-Pérez, M.P. (2018). Neuroprotective Effects of FGF2 and Minocycline in Two Animal Models of Inherited Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 4;59(11): 4392-4403. doi: 10.1167/iovs.18-24621
- Di Pierdomenico, J., García-Ayuso, D., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M. & Villegas-Pérez, M.P. (2019). Role of microglial cells in photoreceptor degeneration. *Neural Regen Res*. 1186-1190. DOI: 10.4103/1673-5374.251204
- Di Pierdomenico, J., Garcia-Ayuso, D., Gonzalez-Herrero, M.E., García-Bernal, D., Blanquer, M., Bernal-Garro, J.M., García-Hernández, A.M., Vidal-Sanz, M. & Villegas-Pérez, M.P. (2020). Bone marrow-derived mononuclear cell transplants decrease retinal gliosis in two animal models of inherited photoreceptor degeneration. *Int J Mol Sci* 21: 7252. DOI: 10.3390/ijms21197252
- Di Pierdomenico, J., Gallego-Ortega, A., Martínez-Vacas, A., García-Bernal, D., Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M.P. & García-Ayuso, D. (2022). Intravitreal and subretinal syngeneic bone marrow mononuclear stem cell transplantation improves photoreceptor survival but does not ameliorate retinal function in two rat models of retinal degeneration. *Acta Ophthalmol*. 100(6):e1313-e1331. DOI: 10.1111/aos.15165
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F. M., Ortín-Martínez, A., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M. & Villegas-Pérez, M. P. (2014). Sectorial loss of retinal ganglion cells in inherited photoreceptor degeneration is due to RGC death. *Br J Pharmacol*, 98(3), 396–401. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-303958>
- García-Ayuso, D., Di Pierdomenico, J., García-Bernal, D., Vidal-Sanz, M. & Villegas-Pérez, M.P. (2022). Bone marrow-derived mononuclear stem cells in the treatment of retinal degenerations. *Neural Regen Res*, (9):1937-1944. DOI: 10.4103/1673-5374.335692
- Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A. & Gálvez, J. (2013). Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br J Pharmacol*, 169(2):337-52. DOI: 10.1111/bph.12139

- Hanisch, U.K. & Kettenmann, H., (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 1387-94. DOI: 10.1038/nn1997
- Lucas, F., (2019). *Estudio de la Degeneración de las Células Ganglionares de la Retina tras Axotomía del Nervio Óptico. Ensayo de Nuevas Terapias Celulares y Farmacológicas*. [Tesis doctoral, Universidad de Murcia]. DIGITUM <http://hdl.handle.net/10201/85399>
- Maceira Rozas, M.C. & Cantero Muñoz, P. (2016). *Inyecciones intravítreas. Efectividad y seguridad en función del lugar del procedimiento*. Santiago de Compostela: Agencia Gallega para la Gestión del Conocimiento en Salud, Unidad de Asesoramiento Científico-técnico, avalia-t; Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad <https://avalia-t.sergas.gal/DXerais/697/avalia-t201604-InyeccionesIntravitreas-DEF-NIPO.pdf>
- Martínez-Vacas, A., Di Pierdomenico, J., Valiente-Soriano, F.J., Vidal-Sanz, M., Picaud, S., Villegas-Pérez, M.P. & Garcia-Ayuso, D. (2021). Glial cell activation and oxidative stress in retinal degeneration induced by beta-alanine caused taurine depletion and light exposure. *Int J Mol Sci*, 23(1):346. DOI: 10.3390/ijms23010346
- Martínez-Vacas, A., Di Pierdomenico, J., Gallego-Ortega, A., Valiente-Soriano, F. J., Vidal-Sanz, M., Picaud, S., Villegas-Pérez, M. P. & García-Ayuso, D. (2022). Systemic taurine treatment affords functional and morphological neuroprotection of photoreceptors and restores retinal pigment epithelium function in RCS rats. *Redox Biol*, 57, 102506. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102506>
- Murenu, E., Gerhardt, M. J., Biel, M., & Michalakis, S. (2022). More than meets the eye: The role of microglia in healthy and diseased retina. *Frontiers in immunology*, 13, 1006897. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1006897>
- Nadal-Nicolás, F.M., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Alburquerque-Béjar, J.J., Vidal-Sanz, M. & Agudo-Barriuso, M. (2012). Whole Number, Distribution and Co-Expression of Brn3 Transcription Factors in Retinal Ganglion Cells of Adult Albino and Pigmented Rats. *PLOS ONE* 7(11): e49830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049830>
- Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Nadal-Nicolás, F.M., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Sauvé, Y., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M. & Agudo-Barriuso, M. (2010). Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(6): 3171-3183. DOI: 10.1167/iovs.09-4861
- Peng, B., Xiao, J., Wang, K., So, K.F., Tipoe, G.L. & Lin, B. (2014). Suppression of Microglial Activation Is Neuroprotective in a Mouse Model of Human Retinitis Pigmentosa. *Journal of Neuroscience*, 34(24) 8139-8150. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5200-13.2014
- Pinilla, I., Cuenca, N., Sauvé, Y., Wang, S. & Lund, R.D. (2007): Preservation of outer retina and its synaptic connectivity following subretinal injections of human RPE cells in the Royal College of Surgeons rat. *Exp Eye Res*, 85(3): 381–392. DOI: 10.1016/j.exer.2007.06.002
- Ramirez, J. M., Triviño, A., Ramírez, A., Salazar, J.J. & García-Sánchez, J. (1996). Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res*, 36(14): 2029-2036. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(95\)00322-3](https://doi.org/10.1016/0042-6989(95)00322-3)
- Rat Behavior and Biology. (2004). *Anatomy of rat and human eyes*. <http://www.ratbehavior.org/Eyes.htm>
- Ryals, R.C., Andrews, M.D., Datta, S., Coyner, A.S., Fischer, C.M., Wen, Y., Pennesi, M.E. & McGill, T.J. (2017). Long-term Characterization of Retinal Degeneration in Royal College of

Surgeons Rats Using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 58(3):1378-1386. DOI: 10.1167/iovs.16-20363

Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T. M., Lund, R. D., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2009). A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision research*, 49(1), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.09.029>

Scholz, R., Sobotka, M., Caramoy, A., Stempf, T., Moehle, C., & Langmann, T. (2015). Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J Neuroinflammation*, 12:209. DOI: 10.1186/s12974-015-0431-4

Thanos, S., C. Pavlidis, C., Mey, J. & Thiel, H.J. (1992). Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp Eye Res*, 55(1): 101-117. DOI: 10.1016/0014-4835(92)90098-d

Wohl, S.G., Schmeer, C.W., Witte, O.W. & Isenmann, S. (2010). Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(5): 2686-2696. DOI: 10.1167/iovs.09-4537

Anexo IV. Aislamiento y cultivo de CMMO

Para la extracción y el cultivo de las células mononucleadas derivadas de médula ósea (CMMO), se ha seguido (con ciertas modificaciones) el protocolo descrito por Masoud, S. & Nadri, S. (2009), tal y como se describe a continuación.

- Para aislar la médula ósea, sacrifique las ratas por sobredosis anestésica (pentaorbital sódico al 20%, Dolethal Vetoquinol®; Especialidades Veterinarias SA; Alcobendas; Madrid, España). Luego, enjuague el esqueleto del animal libremente en etanol al 70%, haciendo una incisión alrededor del perímetro de las extremidades traseras donde se unen al tronco y retire la piel tirando hacia el pie, que se corta en el hueso del tobillo. Esto elimina un mayor contacto de la pata trasera con el pelaje del animal, que es una fuente de bacterias contaminantes. Luego, diseccione las patas traseras del tronco del cuerpo cortando a lo largo de la médula espinal con cuidado de no dañar el fémur. Guarde las extremidades en hielo en DMEM complementado con penicilina/estreptomicina mientras espera una mayor disección.

- Realice una mayor disección de las extremidades traseras debajo de la campana de flujo laminar. Seccione cada extremidad trasera cortando la articulación de la rodilla. Retire el músculo y el tejido conjuntivo de la tibia y el fémur raspando la diáfisis del hueso y luego tirando del tejido hacia los extremos del hueso. Después de la limpieza, almacene los huesos en DMEM suplementado con penicilina/estreptomicina en hielo.

- Coseche la médula ósea en una campana utilizando una técnica estéril adecuada. Corte los extremos de la tibia y el fémur por la epífisis proximal y distal utilizando un par de gubias afiladas. Inserte una aguja de calibre 27G unida a una jeringa de 10mL que contenga medio completo en el hueso esponjoso expuesto al retirar la placa de crecimiento. Enjuague el tapón de médula del extremo cortado del hueso con 1mL de medio completo y recoja en un tubo de 10 ml en hielo.

(Es necesario un lavado intenso durante la preparación de las células de la médula).

- Centrifugue y re-suspenda el pellet celular resultante con *buffer* de lisis de glóbulos rojos, con el fin de lisar la mayor parte de éstos y mantener los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) presentes en la fracción de células mononucleadas.

- Realice dos lavados con PBS (0,1M) y filtre la suspensión de células a través de una malla de filtro de 70mm para eliminar las espículas óseas o los grupos musculares y celulares. Determine el rendimiento y la viabilidad de las células por exclusión con azul de tripano y cuente en una cámara de Neubauer.

- Centrifugue de nuevo y re-suspenda el *pellet* celular en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS 0,1M) para obtener una densidad de 100.000 células/ μ L. Mantenerla en frío ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) hasta su inyección.

Anexo V. Procesado histológico

a. Sacrificio y perfusión del animal

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis a través de una IIP de Pentobarbital sódico al 20% (*Dolethal VetoquinoI®*; Especialidades Veterinarias SA; Alcobendas; Madrid, España). Una vez el animal ya no respondía a estímulos dolorosos ni presentaba reflejos, pero aún mantenía el latido cardiaco, se procedía a la perfusión intracardiaca, tal y como se detalla a continuación:

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

b. Enucleación

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

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

El globo ocular se post-fija durante una hora en PFA al 4%. Posteriormente, se lava con PBS 0,1M y se deja en éste a 4°C hasta su posterior manipulación para la preparación del globo ocular para secciones.

Seguidamente, se procede a limpiar íntegramente los tejidos que rodean al ojo. Después se realiza una incisión en el limbo esclero-corneal y se retira la córnea; se extraen las estructuras del polo anterior del ojo: iris y cristalino, obteniendo la copa óptica. A continuación, se coge la copa óptica obtenida y se post-fija durante 1 hora en PFA 4%, se lava con PBS 0,1M y se crioprotege mediante inmersión en soluciones secuencialmente crecientes de sacarosa (*Panreac Química S.A.*, Barcelona, España) al 15% y 30% en PBS 0,1M durante 24 horas en cada solución.

Después, el ojo se incluye en un medio de montaje para su congelación (*Tissue-Tek®*, OCT; Sakura, Finetek, Torrance, CA, EE. UU.) orientado correctamente, y se congela rápidamente en isopentano (2-metilbutano, Sigma-Aldrich, Alcobendas, Madrid, España) para mantenerlo a -80°C.

c. Procesado histológico – Secciones retinianas

Las secciones sagitales de las copas ópticas se realizan mediante un criostato (Leica, Jung CM3000, Alemania) en cortes de 16µm de grosor. Estas secciones se recogen en portaobjetos especialmente pre-tratados para este fin (*SuperFrost®Plus*, VWR International, Eurolabs S.L., Barcelona, España), y finalmente se mantienen a -20°C hasta su posterior análisis e inmunodetección.

d. Inmunohistomarcajes en secciones de retina

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

Incubación anticuerpos primarios: Se realiza la incubación de las secciones con los anticuerpos primarios (**Tabla 2**) diluidos en tampón de bloqueo con NDS en *PBS-Tritón® X-100* 2% durante toda la noche (*overnight*) a 4°C.

Para evitar la evaporación de la solución durante el periodo de incubación, tras la aplicación del anticuerpo, se cubre el portaobjetos conteniendo las secciones con una capa de plástico elástico (*Parafilm®*, Bemis Company Inc., Neenah, Wisconsin, EE.UU.). Al día siguiente, se lavan las retinas 3 veces durante 10 minutos a temperatura ambiente en *PBS-Tritón® X-100* 0,1%.

Incubación anticuerpos secundarios: Se incuban las secciones con los anticuerpos secundarios (**Tabla 2**) en *PBS-Tritón® X-100* 2% durante 2 horas, cubriendo el portaobjetos con *Parafilm®*.

Tras la incubación, se lavan las retinas con *PBS-Tritón® X-100* 0,1%. Se realizan 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente y un último un lavado con PBS (0,1M) para retirar los restos de detergente que puedan quedar.

Finalmente, se preparan con medio de montaje para la fluorescencia que contiene DAPI (*Vectashield Mounting Medium containing DAPI, Vector Atom, Alicante, España*) y se tapan con un cubreobjetos, que se sella con esmalte de uñas.

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

Identificación	Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario	Casa comercial	Dilución
Microglía	Rabbit α Iba-1	ab178846 (Abcam, Cambridge, Reino Unido)	1:500	Donkey α Rabbit [Alexa fluor 488nm]	A21206 (<i>Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, EE.UU.</i>)	1:500
Macroglía	Goat α GFAP	ab53554 (Abcam, Cambridge, Reino Unido)	1:500	Donkey α Goat [Alexa fluor 594nm]	A11058 (<i>Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, EE.UU.</i>)	1:500
Conos	Rabbit α-Cone Arrestin	AB15282 (EMD Millipore Corp, Billerica, MA, USA)	1:1000	Donkey α Rabbit [Alexa fluor 488nm]	A21206 (<i>Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, EE.UU.</i>)	1:500
Conexiones sinápticas	Mouse α Bassoon	ADI-VAM-PS003 (Enzo life Science, Lausen, Suiza)	1:500	Donkey α Mouse [Alexa fluor 594nm]	A21203 (<i>Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, EE.UU.</i>)	1:500

Tabla 2 Anticuerpos empleados.

Anexo VI. Adquisición de imágenes

a. Microscopía de fluorescencia y confocal

Las retinas se han examinado y fotografiado con un microscopio óptico de fluorescencia, equipado con un sistema de adquisición de imágenes digitales (*Leica DM6 B microscope*, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) a través de una fuente de LED's, con un aumento de 20x.

Para la captura de imágenes en detalle se ha empleado el microscopio de fluorescencia confocal Leica DM6 B a 20x, o bien el microscopio confocal (*Leica SP8*, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), mediante técnicas de inmersión en aceite y a 40x. Ambos equipos están controlados por el programa informático Las X (*Leica Application Suite X*), el que permite la captura de imágenes en *Z-Stack* para su posterior reconstrucción tridimensional.

El microscopio confocal está equipado cuatro láseres: láser de onda continua ultravioleta de 405nm; láser multilínea de Argón de 458, 476, 488, y 514nm; un láser amarillo PSS de 561nm; y un láser rojo HeNe de 633nm.

b. Fotomontajes

Para la reconstrucción de las secciones retinianas se ha realizado la adquisición automática secuencial de campos microscópicos contiguos, siguiendo el patrón de muestreo de una matriz de celdas regulares con un área preestablecida que cubría la superficie de la retina, utilizando el objetivo de 20x.

Cada microfotografía ha sido enfocada manualmente y capturada digitalmente con su máxima resolución (2048x2048 píxeles, con el modo *no binning*). Se han almacenado como una composición (*merged*) de todas ellas, obteniendo una “fotografía final fusionada” de 24 bits. Estas imágenes se han almacenado, además, en el formato *Thunder-ICC (Instant Computational Clearing)*, para eliminar fondo indeseado y obtener un nivel de detalle optimizado para su posterior análisis.

Anexo VII. Resultados

a. Resultados *in vivo*

	Grupo	Variación Espesor Retina (% respecto <i>baseline</i> , P28)			
		P35		P51	
		Total	Externa	Total	Externa
Rata RCS (degenerada)	Control	89,49±5,06 #	81,90±5,83 #	72,72±3,20 #	49,34±3,57 #
	Minociclina	87,95±2,37 #	80,04±4,87 #	71,94±4,47 #	47,40±5,64 #
	CMMO	90,30±4,56 #	87,65±7,66 #	77,25±3,66 #	50,12±2,19 #
	Minociclina+CMMO	89,47±3,82 #	83,28±6,24 #	74,46±3,98 #	47,82±6,01 #

Tabla 3. Resultados obtenidos del análisis *in vivo* sobre los espesores de la retina total y externa en los dos tiempos experimentales. Anotaciones según los valores promedio de la variación del grosor retiniano respecto a P28 (*baseline*), la desviación estándar (*Standard Deviation*, *SD*) y su significancia estadística (#): [PROMEDIO±SD#].

= valores significativamente distintos ($p < 0,05$) respecto al tiempo de análisis previo dentro de cada grupo.

b. Resultados *ex vivo*

	Grupo	Tiempo de análisis	Núcleos FR (n°)	Microglía (n° células)	Macroglía (RFU)	Conexiones Sinápticas (RFU)
Rata RCS (degenerada)	Control	P35	7,52±1,10	45,54±6,80	13475±1569	6,81±0,90
		P51	4,13±0,30	66,06±7,98	24465±1864	4,11±0,70
	Minociclina	P35	8,61±1,30*	24,06±3,77*	14156±1541	9,81±1,10*
		P51	5,06±0,60*	42,01±4,64*	23748±1801	5,46±0,80*
	CMMO	P35	8,77±1,40*	38,68±2,92	10675±1501*	10,27±1,00*
		P51	4,98±0,80*	64,51±13,71	16941±1934*	5,78±0,80*
	Minociclina +CMMO	P35	10,31±1,20*	30,47±2,65*	10558±1541*	12,24±1,20*
		P51	6,09±0,50*	49,74±7,52*	17364±1851*	6,81±0,90*
Rata PVG (sana)	Control sano	P51	11,82±1,80	13,85±0,80	3464±189	12,25±1,50

Tabla 4. Resultados obtenidos del análisis *ex vivo*, según los valores promedio, la desviación estándar (*Standard Deviation*, *SD*) y su significancia estadística (*): [PROMEDIO±SD*].

* = valores significativamente distintos ($p < 0,05$) respecto al grupo control, dentro de cada tiempo experimental.