

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Biología Celular



**Comportamiento de las células microgliales en cultivos
organotípicos de retina en desarrollo**

Programa de Doctorado: Avances en Biomedicina: Nuevas Tecnologías
Aplicadas a la Investigación en los Diferentes Sistemas Biológicos
(Universidad de Granada)

TESIS DOCTORAL

María del Carmen Carrasco Sierra

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María del Carmen Carrasco Sierra
D.L.: GR 1207-2013
ISBN: 978-84-9028-525-1

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular



Comportamiento de las células microgliales en cultivos organotípicos de retina en desarrollo

Programa de Doctorado: Avances en Biomedicina: Nuevas Tecnologías
Aplicadas a la Investigación en los Diferentes Sistemas Biológicos
(Universidad de Granada)

Memoria presentada por **MARÍA DEL CARMEN CARRASCO SIERRA**,
Licenciada en CC. Biológicas, para optar al grado de Doctora.

Directores

Prof. Dr. JOSÉ LUIS MARÍN TEVA, Profesor Titular de Biología Celular, Universidad de Granada.

Prof. Dr. JULIO NAVASCUÉS MARTÍNEZ, Catedrático de Biología Celular, Universidad de Granada.

Prof. Dr. RUTH CALVENTE IGLESIAS, Profesora Titular de Biología Celular, Universidad de Granada.

A Candela

A Luis

A mis padres y hermana

AGRADECIMIENTOS

Hace casi ocho años, una chica esperaba a la puerta de un aula de óptica en el edificio Mecenas para comunicar una noticia. Esa noticia la transmitió dubitativa, entrecortada y emocionadamente a un estudiante que, callado, recibía el mensaje cargado de toneladas de emoción. De esa chica que se hacía cargo de una beca de investigación para realizar la tesis doctoral quedan todavía muchas cosas, de hecho pienso que nada ha cambiado, ya que para mí es un orgullo poder trabajar entre las paredes que, durante los cinco años que duró mi carrera de Biología, cobijaron algunos de los mejores momentos de mi vida. De las personas que compartieron, de alguna u otra manera, esos años de juventud estudiantil y etapa predoctoral guardo tan buenos momentos, fueron tantas las cosas que me aportaron, que sería difícil agradecer en unas páginas todo lo que recibí de ellas, pero es justo hacer un esfuerzo, al menos, para que ellos sepan que me marcaron la vida...

A mis directores de tesis, José Luis Marín Teva, Julio Navascués Martínez y Ruth Calvente Iglesias; habéis sido los pilares sobre los que se ha asentado esta etapa tan importante en mi vida, no sólo por lo académico, sino por lo personal, ya que tantos años juntos, mezclando sentimientos con aprendizaje, buenos y malos momentos, han dado para mucho, tanto, que no sé si se quedarán cortas mis palabras, ahora que me toca agradecerlos. Por la oportunidad brindada hace años, por la paciencia demostrada y por los valores transmitidos, muchísimas gracias.

En esta Facultad, que se ha convertido en una parte esencial de mi existencia, he crecido como persona, he madurado, he sufrido, he llorado y he reído, pero sobre todo, y de eso tienen buena culpa todos y cada uno de los profesores de la misma, he aprendido y he orientado mi futuro, por lo que no sería de justicia omitir mi profundo agradecimiento a todos y todas, que me habéis permitido acudir a vuestras clases a disfrutar, haciéndome a cada momento reiterar el acierto en la elección de mi carrera. A todos en general, y muy especialmente, a los componentes de mi Departamento de Biología Celular, que pronto me abristeis los brazos para acogerme entre vosotros como una más, desde que puse los pies en este sitio, hoy quiero daros las gracias, como también se las tengo que dar a tantas compañeras doctorandas que estuvieron a mi lado durante su tesis, y las que están ahora mismo en la dura tarea de completar la suya, porque sin ellas todo esto hubiera sido diferente. Dentro de este ámbito, y sin poder ni querer olvidarme de la atención prestada, he de incluir a David Porcel, que aunque no esté cerca en mi día a día, por lo menos en lo

que a espacio de trabajo se refiere, sí lo ha estado y lo está en el desarrollo de esta labor que hoy concluye. También quiero agradecer al Dr. Michel Mallat, por brindarme la oportunidad de mi estancia breve en su laboratorio, por su amabilidad y su disponibilidad.

Ahora que hago balance de mi tiempo entre estos muros, ahora que vuelvo la vista atrás y comienzo a ver borrosa la imagen de la que entró y más nítida la de la mujer que soy, me vienen a la mente infinidad de momentos felices; momentos de conversaciones de todo tipo, de mucha complicidad y total confianza, momentos por los que, David, hoy te doy las gracias, ya que, además de ser mi compañero, has llegado a ser uno de mis grandes amigos. Y digo uno porque hay otro; otro que, al igual que el anterior pero de manera diferente, también me ha demostrado muchas cosas, y me ha hecho sentirme única, especial y admirada; en una palabra y usando el argot del deporte que tanto le fascina, me ha hecho sentir ganadora. Gracias Juanjo, por todo.

También hay momento para la emoción, porque eso me ocurre cuando pienso y hablo de quién me dio la vida, de quién me apoyó siempre, me entendió y me protegió, de quien me tendió la mano cuando me caí, para luego secarme las lágrimas y hacerme guiños para que me riera y, así, olvidara el llanto. Me emociono porque no dejarán de fluir las lágrimas cuando empiezo a enumerar todas las cosas que me han dado y que nunca podré devolver, aunque lo intente. Decirles, a ellos que un día me trajeron a este mundo para hacerme la vida tan fácil, que sin ellos, yo no estaría aquí hoy, porque nunca podría haber existido. Papá, mamá, podéis sentirnos orgullosos de lo que habéis conseguido porque esta tesis, es vuestra tesis.

A mi hermana, por el abrazo eterno, la risa continua, el amor desinteresado, el cariño enorme y la entrega total; por la palabra, las mañanas de canciones y las conversaciones en la cama antes de dormir; tú, maestra en la enseñanza y en la vida, enséñame cómo hacer que un corazón sea tan noble y bondadoso. Gracias hermana, hoy también es tu día.

A ti, Luis, por llenar mi vida de emociones y experiencias nuevas; por quererme, acompañarme, respetar mis decisiones y hacer que el sol abra una rendija en mis días tristes; para ti van dirigidas estas torpes letras que nada tienen que ver con todas las que tú me escribes casi a diario pero que tan llenas de amor están. Gracias por existir para mí. Te quiero.

Para concluir, he dejado para el final el más importante de los agradecimientos; un agradecimiento especial a la vida, que me ha hecho sentir tantas cosas, que me ha dado

tiempo para conocer a tanta gente, que me ha permitido saborear los buenos momentos con la calma suficiente para poder disfrutar de ellos plenamente, y que me ha dado el mejor regalo que se le puede ofrecer a una mujer, ser madre. Por ella, por esa niña que llevo en mi vientre y que se llamará Candela, tienen sentido muchas cosas y encajan muchas piezas en el rompecabezas de mi vida, hasta el punto de que aun no ha nacido y ya estoy en deuda con ella; algún día le contaré que leí mi tesis doctoral una mañana de Diciembre, embarazadísima de ella, y que ella fue la razón más importante para decidirme a leerla, y la fuerza necesaria para tantos momentos difíciles. Gracias, Candela, por ser la luz al final del túnel...

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Estructura de la retina de los vertebrados	3
Células gliales de la retina de los vertebrados	5
Estados de las células microgliales: funciones	8
Origen ontogenético de la microglía y entrada de sus precursores en el SNC	12
Migración de las células microgliales ameboides durante el desarrollo del SNC	15
La retina como órgano modelo para el estudio de la microglía: distribución de células microgliales en la retina de los vertebrados	17
Dispersión de las células microgliales en la retina	19
REFERENCIAS.....	22
 OBJETIVOS	35
 CAPÍTULO I: MIGRACIÓN Y RAMIFICACIÓN DE LA MICROGLÍA EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA EMBRIONARIA DE CODORNIZ	39
INTRODUCCIÓN	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
Animales	43
Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de explantes de retina	44
Anticuerpos	45
Inmunomarcaje de explantes totales y secciones de criostato	45
Captación a intervalos regulares de tiempo de imágenes de células microgliales marcadas vitalmente mediante inmunofluorescencia directa	47
Análisis cuantitativo de la densidad y morfología microgliales en las diferentes capas de la retina	48
RESULTADOS	49
Puesta a punto de ERECs para conseguir la ramificación de las células microgliales	49
La microglía ameboide migra tangencialmente en ERECs de E9 durante las primeras 24 hiv	56
Migración radial y ramificación de las células microgliales en ERECs de E9 durante la primera semana <i>in vitro</i>	64
Análisis comparativo de la densidad y morfología microgliales entre ERECs y retinas <i>in situ</i> de edades equivalentes	72
Cambios en la citoarquitectura de la retina en los explantes cultivados durante la primera semana <i>in vitro</i>	78

Redondeamiento microglial en ERECs de E9 durante la segunda semana <i>in vitro</i>	86
DISCUSIÓN	90
Los ERECs de E9 son un modelo ideal para estudios experimentales <i>in vitro</i> de la migración y diferenciación de la microglía	90
Condiciones de cultivo de los ERECs de E9 para conservar la migración y ramificación de la microglía	92
¿Por qué la microglía no se redondea en ERECs de E9 durante los primeros 7 div?	93
¿Por qué la microglía se redondea en ERECs de E9 después de 7 div?	95
Conclusión	96
REFERENCIAS.....	97

CAPÍTULO II: CINÉTICA DEL MOVIMIENTO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES QUE MIGRAN TANGENCIALMENTE EN EXPLANTES DE RETINA EMBRIONARIA DE CODORNIZ CULTIVADOS IN VITRO	103
INTRODUCCIÓN.....	105
MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de explantes de retina.....	108
Captura de imágenes de células microgliales inmunomarcadas con QH1 tomadas a intervalos periódicos de tiempo	108
Análisis cuantitativo de la entrada y comportamiento migratorio de las células microgliales en la retina cultivada	109
RESULTADOS	111
Las células microgliales de ERECs de E7 entran en la retina desde la CNO/BP y migran tangencialmente en ella	111
Cinética del movimiento de las células microgliales en ERECs de E7	118
División de las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 cultivados durante 6,5 hiv	128
DISCUSIÓN	134
Entrada en la retina de precursores microgliales procedentes de la región de la CNO/BP en ERECs de E7	134
Mecanismos que regulan la migración de las células microgliales en ERECs de E7.....	137
División de las células microgliales durante la migración tangencial en ERECs de E7 cultivados <i>in vitro</i>	142
Conclusión	143
REFERENCIAS.....	144

CAPÍTULO III: PARTICIPACIÓN DE METALOPROTEASAS Y LAS QUINASAS SRC Y ROCK EN LA MIGRACIÓN TANGENCIAL DE LA MICROGLÍA DE LA RETINA EMBRIONARIA DE CODORNIZ.....	155
INTRODUCCIÓN	157
MATERIALES Y MÉTODOS	161
Cultivo <i>in vitro</i> de explantes	161
Tratamiento de ERECs de E7 con inhibidores farmacológicos y anticuerpos bloqueantes.....	162
Inmunocitoquímica de montajes totales de ERECs de E7	164
Inmunocitoquímica de criosecciones de ERECs de E7	165
Zimogramas de gelatina	166
Microscopía y análisis morfométrico.....	167
RESULTADOS	169
Alteración de la orientación y el fenotipo de las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 tras la inhibición de MMPs.....	169
Alteración del fenotipo de las células microgliales que migran tangencial- mente en ERECs de E7 tras la inhibición de la tirosina-quinasa Src.....	184
Incremento en la densidad de células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 tras la inhibición de la proteína-quinasa ROCK asociada a Rho	190
Ausencia de efectos en las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 tras el bloqueo de las integrinas	194
Alteraciones del fenotipo de las células microgliales y de la organización histológica de la retina en ERECs de E7 tras la inhibición de calpaínas	198
DISCUSIÓN	204
Participación de MMPs en la migración tangencial de la microglía de la retina.....	204
Papel de tirosina-quinasas de la familia Src en la migración microglial	207
Implicación de la proteína-quinasa ROCK en la migración tangencial de la microglía de la retina.....	210
Tipo de mecanismo migratorio de las células microgliales ameboides en la retina.....	214
REFERENCIAS.....	219
CONCLUSIONES	233

ABREVIATURAS

BME: Medio basal Eagle
BSA: albúmina de suero bovino
CCG: Capa de células ganglionares
CNE: Capa nuclear externa
CFN: Capa de fibras nerviosas
CGs: células ganglionares
CNI: Capa nuclear interna
CON/BP: cabeza del nervio óptico/base del pecten
CPE: Capa plexiforme externa
CPI: Capa plexiforme interna
DMSO: Dimetilsulfóxido
e-CPI: borde escleral de la capa plexiforme interna
EP: Epitelio pigmentario
ERECs: Explantes de retina embrionaria de codorniz
FAK: Quinasa de adhesiones focales
i-CPI: regiones intermedias de la capa plexiforme interna
iPLA2: Fosfolipasa A2 independiente de Ca²⁺
ITS: Insulina-transferrina-selenito sódico
MMP: Metaloproteasa
NB: Neurobasal libre de suero
PB: Tampón fosfato
PBS: Tampón fosfato salino
PI3,4-P2: fosfatidil-inositol-3,4-difosfato
PI3K: fosfatidil-inositol-3-quinasa
QH1-A488: Anticuerpo Qh1 conjugado con Alexa Fluor 488
SNC: Sistema nervioso central
SC: Suero de caballo
SDS: Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: Dodecilsulfato sódico-gel electroforético de poliacrilamida
SP: Suero de pollo
T: Tritón X-100
TKs5: tirosina-quinasa con 5 dominios de homología con Src
uPA: Plasminógeno tipo uroquinasa
v-CPI: borde vítreo de la capa plexiforme interna

Introducción General

Estructura de la retina de los vertebrados

La retina forma parte del sistema nervioso central (SNC) y, como éste, se diferencia a partir del neuroepitelio del tubo neural. La retina, en concreto, se origina a partir de evaginaciones bilaterales del prosencéfalo denominadas vesículas ópticas, que se invaginan para dar lugar a las copas ópticas. Cada copa óptica permanecerá conectada con el cerebro a través del tallo óptico, que será colonizado por fibras procedentes de la retina para constituir finalmente el nervio óptico.

La retina constituye la capa más interna de las tres túnicas concéntricas que forman el globo ocular (esclera, coroides y retina) y está compuesta de dos capas básicas:

- La **retina neural** o retina propiamente dicha, que es la capa más interna, que contiene los fotorreceptores, que captan la señal luminosa, y el resto de tipos celulares que colaboran en la transmisión del impulso nervioso.
- El **epitelio pigmentario** de la retina, la capa más externa que se compone de una sola lámina de células cúbicas, las células pigmentarias que se encuentran firmemente adheridas a la coroides a través de la membrana de Bruch.

Entre las dos capas de la retina existe un espacio virtual denominado espacio subretiniano.

La retina neural está constituida por un conjunto de neuronas y células gliales con una disposición laminar relativamente sencilla, sobre todo cuando se compara con otras partes del SNC. Todo ello la convierte en un modelo muy útil para el estudio del desarrollo y diferenciación de las células que la constituyen.

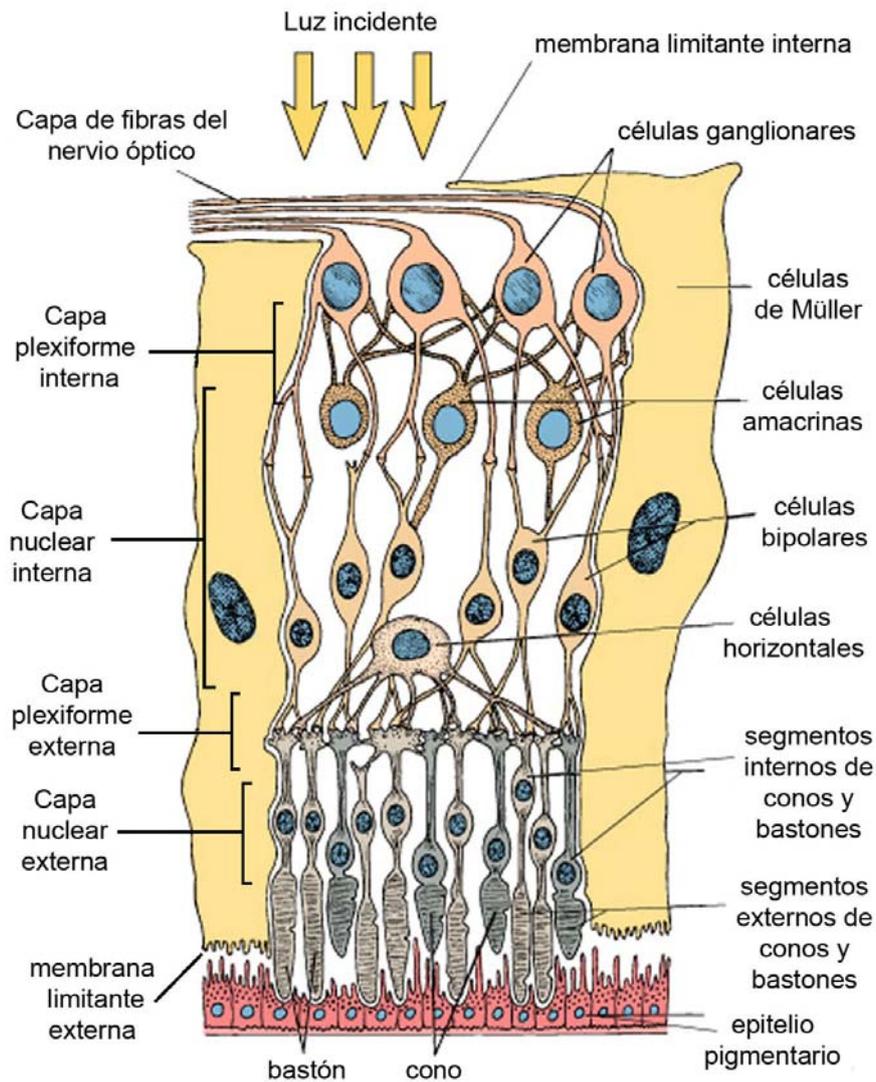
Las diferentes células de la retina pueden ser clasificadas atendiendo a su naturaleza y función. Las neuronas se pueden dividir en tres tipos funcionales:

- Las células fotorreceptoras, conos y bastones, sensibles a los estímulos lumínicos.
- Las células ganglionares, que son las neuronas que conducen el estímulo nervioso desde la retina al cerebro a través de las fibras nerviosas del nervio óptico.
- Las neuronas de asociación o integración, que están dispuestas entre los fotorreceptores y las células ganglionares, integran los impulsos recibidos de los fotorreceptores y los transmiten a las células ganglionares. Existen tres tipos de

neuronas de asociación en la retina: células bipolares, células horizontales y células amacrinas.

Las células gliales que forman parte de la retina de los vertebrados son los astrocitos, las células de Müller, los oligodendrocitos y la microglía. Todos estos tipos celulares se organizan en la retina formando diez capas fácilmente identificables con el microscopio óptico y que, desde fuera del ojo hacia el interior, son las siguientes (Fig. 1):

1. *Epitelio pigmentario (EP)*, que no pertenece a la retina neural y es la capa más externa de la retina dispuesta exteriormente a los fotorreceptores.
2. *Capa de conos y bastones*, en la que se localizan los segmentos externos e internos de los fotorreceptores.
3. *Membrana limitante externa*, que constituye el límite apical de las células de Müller, muy próximo al EP.
4. *Capa nuclear externa (CNE)*, que contiene los somas de los conos y bastones.
5. *Capa plexiforme externa (CPE)*, en la que se hallan las prolongaciones axónicas de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células horizontales, amacrinas y bipolares que conectan con ellas.
6. *Capa nuclear interna (CNI)*, que contiene los somas de las células horizontales, amacrinas, bipolares y de las células de Müller.
7. *Capa plexiforme interna (CPI)*, en la que se localizan las prolongaciones de las células horizontales, amacrinas y bipolares que conectan con las prolongaciones dendríticas de las células ganglionares.
8. *Capa de células ganglionares (CCG)*, que contiene los somas de las células ganglionares.
9. *Capa de fibras nerviosas (CFN)*, formada por las prolongaciones axónicas de las células ganglionares, que salen de la retina y se incorporan al nervio óptico, a través del cual se dirigen hasta el encéfalo.
10. *Membrana limitante interna*, formada por la lámina basal que se localiza bajo la porción terminal de las células de Müller.



Copyright 2003 Lippincott Williams and Wilkins

Fig.1. Esquema de las capas de la retina en el que se indican los diferentes tipos de neuronas (tomado de Ross y Pawlina, 2007).

Células gliales de la retina de los vertebrados

La retina neural, como parte del SNC, contiene células gliales. Además de los astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales presentes en otras regiones del SNC, la retina de los vertebrados contiene un tipo específico de glia, las células de Müller, que constituyen el tipo glial predominante.

Astroцитos

La presencia de astroцитos en la retina parece estar ligada a la vascularización. Así, los astroцитos se localizan en todas las regiones de las capas vitreales de las retinas vascularizadas de mamíferos (Schnitzer, 1987; Schnitzer, 1988; Stone & Dreher, 1987), mientras que faltan en la retina de aves, que es avascular (Meyer 1977; Reichenbach et al., 1993). No obstante, en la retina de pollo se ha descrito una población de células gliales similares a los astroцитos que están presentes en la CCG y CFN (Prada et al., 1998). Recientemente se ha identificado un nuevo tipo glial de la retina del pollo denominado “células gliales no astrocíticas de la retina interna” (Fischer et al., 2010; Zelinka et al., 2012).

Al igual que en el resto del SNC, los astroцитos en la retina madura de mamíferos son esenciales para el soporte trófico y metabólico de las neuronas, la supervivencia y la diferenciación neuronal, la génesis de las sinapsis y la homeostasis cerebral. Sus prolongaciones, junto con las de las células microgliales, contribuyen a la formación de la glia limitans perivascular, que separa el compartimento vascular del parénquima nervioso (Choi & Kim, 2008; Provis, 2001). Además, los astroцитos controlan la migración, proliferación y supervivencia de las células endoteliales de los vasos a través de la liberación del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF) (Fruttiger, 2002; Kubota & Suda, 2009; Provis, 2001; Stone et al., 1995; West et al., 2005)

Células de Müller

Las células de Müller han sido consideradas por algunos autores como astroцитos modificados, atendiendo a sus características estructurales, moleculares y funcionales (Hollander et al., 1991; Magalhaes & Coimbra, 1973), aunque también se las puede considerar elementos de la glía radial, dada la disposición que adoptan en la retina (Bernardos et al., 2007; Reichenbach et al., 1993). Las células de Müller ocupan todo el espesor de la retina y están en contacto con todas las neuronas de la retina de los vertebrados. El núcleo de estas células, albergado en el soma, se localiza a nivel de la CNI, mientras que sus prolongaciones radiales se extienden desde la membrana limitante externa, justo por debajo del EP, hasta la CCG/CFN, donde se ramifican en varias prolongaciones que terminan en expansiones denominadas pies terminales, los cuales descansan sobre una lámina basal que constituye la membrana limitante interna de la retina.

Las células de Müller dan soporte estructural y funcional a la retina, ya que contactan y envuelven los somas y las prolongaciones de las neuronas retinianas formando unidades funcionales a modo de columnas (Bringmann et al., 2006; Reichenbach & Bringmann, 2010; Reichenbach & Robinson, 1995). Las células de Müller proporcionan sustancias tróficas a las neuronas e intervienen en la eliminación de los desechos metabólicos. Juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis del volumen extracelular, de los iones y del agua (Bringmann et al., 2006; Newman & Reichenbach, 1996). Todas estas funciones modifican directa e indirectamente la actividad neuronal. Las células de Müller sustentan la supervivencia de los fotorreceptores y neuronas, son las responsables de la estabilización estructural de la retina y modulan las respuestas inmunes e inflamatorias (Bringmann et al., 2009; Reichenbach & Bringmann, 2010). Además, las células de Müller guían la luz hasta los fotorreceptores (Franze et al., 2007) y amortiguan las deformaciones mecánicas que sufre la retina (Lu et al., 2006). Las células de Müller se activan frente a cualquier estímulo patógeno (Bringmann et al., 2009; Reichenbach & Bringmann, 2010) dando lugar a células reactivas. Las células de Müller reactivas son neuroprotectoras pero también puede contribuir a la degeneración neuronal (Bringmann & Wiedemann, 2012). Frente a una lesión, las células de Müller responden mediante una gliosis reactiva que puede dar lugar a su desdiferenciación hacia células progenitoras multipotentes que podrían diferenciarse posteriormente en fotorreceptores y otros tipos neuronales de la retina (Bernardos et al., 2007). Las células de Müller también participan en el control de la angiogénesis en retinas vascularizadas y en la regulación del flujo sanguíneo.

La disposición radial de las células de Müller en la retina sugiere que sirven como guía o sustrato de migraciones celulares que tienen lugar durante el desarrollo de la retina para conseguir la organización de la retina madura (Newman & Reichenbach 1996). En concreto, las células de Müller parecen intervenir en la migración de las células microgliales de la retina (Cuadros & Navascués, 2001; Navascués et al., 1996), ya que la disposición de sus pies terminales y de sus prolongaciones determina la dirección de la migración tangencial, circunferencial o radial de las células microgliales (Marín-Teva et al., 1999a; Sánchez-López et al., 2004).

Oligodendrocitos

Durante el desarrollo tardío y periodos postnatales, los precursores de los oligodendrocitos migran a lo largo del nervio óptico desde el quiasma hacia la retina, antes de diferenciarse en oligodendrocitos maduros que proporcionan la vaina de mielina de los axones de las células ganglionares (CGs) (Small et al., 1987). En algunas especies de mamíferos, incluyendo la rata, el ratón y el hombre, la mielinización de los axones de las CGs termina en la unión entre nervio óptico y retina (Ffrench-Constant et al., 1988; Perry & Lund, 1990) y no se observa mielina en la CFN. Por lo tanto, los oligodendrocitos y sus precursores están ausentes en la retina neural de dichas especies (Gao et al., 2006; Stone & Dreher, 1987). En la retina de conejo, los oligodendrocitos están presentes en determinadas zonas de la retina y mielinizan los axones de los rayos medulares (Hollander et al., 1995; Jeon & Masland, 1993; Schnitzer, 1985; Schnitzer, 1988). La retina de aves contiene oligodendrocitos en toda su extensión (Cho et al., 1997; Fujita et al., 2001; Gotoh et al., 2011; Ono et al., 1998; Rompani & Cepko, 2010) y los axones de las CGs están envueltos por una vaina de mielina compacta formada por oligodendrocitos presentes en la CCG y CFN de la retina adulta (Seo et al., 2001) que migran al interior de la misma durante el desarrollo embrionario y postnatal (Nakazawa et al., 1993).

Células microgliales

La microglía es el objeto de estudio de esta tesis; por tanto, en los siguientes apartados de esta introducción general se describirá con más detalle el origen, desarrollo y distribución de estas células en el SNC.

Estados de las células microgliales: funciones

Las células microgliales constituyen el único tipo celular del SNC que tienen un origen mesodérmico, en contraposición a las neuronas y células macrogliales (astrocitos, oligodendrocitos, células de Müller, etc.), cuyo origen es neuroectodérmico. Por lo tanto, en etapas iniciales del desarrollo embrionario, los precursores de las células microgliales se localizan en el mesénquima e invaden progresivamente el parénquima nervioso durante el desarrollo embrionario y postnatal. La microglía presenta tres estados de diferenciación diferentes, cada uno de los cuales muestra características morfológicas y propiedades funcionales específicas (Harry & Kraft, 2012; Pont-Lezica

et al., 2011; Rezaie et al., 2005). Dichos estados morfofuncionales corresponden a la microglía ameboide, la microglía ramificada o madura (también llamada “quiescente” o en “en reposo”) y la microglía activada (Figura 2). La microglía ameboide corresponde al estado indiferenciado de las células microgliales y está presente durante el desarrollo del SNC. La microglía ramificada representa el estado diferenciado de este tipo celular y se localiza en el SNC adulto en condiciones de normalidad, mientras que la microglía activada corresponde a un estado morfofuncional estimulado que aparece en el SNC en respuesta a un daño de origen diverso (mecánico, infeccioso, químico, degenerativo, etc.).

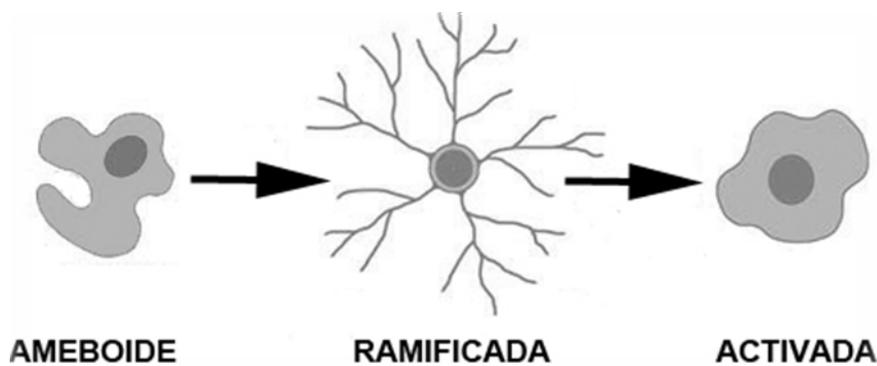


Fig.2. Estados de diferenciación de las células microgliales. La microglía ameboide está presente durante el desarrollo del SNC. En el SNC adulto, las células microgliales adoptan una morfología ramificada. Cuando el SNC sufre un daño, las células microgliales se activan.

Las células microgliales ameboides muestran una morfología irregular, con numerosos pseudópodos y lamelipodios, y son muy abundantes durante el desarrollo del SNC, en el seno del cual migran activamente para llegar a colonizar todas sus regiones. La microglía ameboide se diferencia durante etapas avanzadas del desarrollo, emitiendo numerosas y delgadas prolongaciones, para transformarse en microglía ramificada. Las células microgliales ameboides fagocitan células que degeneran y restos celulares que se producen durante los procesos de muerte celular programada que ocurren en el SNC en desarrollo (Bessis et al., 2007; Mallat et al., 2005; Schlegelmilch et al., 2011). Pero también intervienen activamente en otros procesos de gran trascendencia para el desarrollo normal del SNC, como la angiogénesis (Friedlander et al., 2007; Rymo et al., 2011), la eliminación de ciertos tipos celulares (Marín-Teva et al., 2004) y el

crecimiento de axones y remodelación sináptica (Bessis et al., 2007; Mallat et al., 2005; Paolicelli et al., 2011; Stevens et al., 2007; Tremblay et al., 2010).

Parte de la microglía ameboide presente en el cerebro embrionario degenera (Dalmau et al., 2003), pero la mayoría de estas células desarrollan finas prolongaciones y adquieren una apariencia ramificada (Cuadros & Navascués, 1998). La transformación de células microgliales ameboides en microglía ramificada fue descrita inicialmente por del Río Hortega (del Río-Hortega, 1932) y ha sido ampliamente documentada con posterioridad (Cuadros & Navascués, 1998; Hirasawa et al., 2005; Ilshner & Brandt, 1996; Ling & Wong, 1993; Rezaie & Male, 1999).

En el SNC adulto, las células microgliales adquieren una morfología ramificada, típica de un estado diferenciado o maduro, por lo que reciben el nombre de microglía ramificada. También se conoce como “microglía en reposo”, ya que se trata de células que no se desplazan en el seno del parénquima nervioso sino que permanecen en posición más o menos constante dentro del mismo. Estudios recientes han demostrado que las células microgliales “en reposo” no son células absolutamente estáticas que carecen de función específica (Hanisch & Kettenmann, 2007), sino que son células muy dinámicas, con una elevada motilidad que les permite estar extendiendo y retrayendo continuamente sus prolongaciones, con el fin de vigilar permanentemente el territorio del parénquima nervioso en el que se ubican (Davalos et al., 2005; Liang et al., 2009; Nimmerjahn et al., 2005; Stence et al., 2001; Wake et al., 2009). De hecho, la microglía ramificada expresa receptores de membrana para todos los neurotransmisores conocidos (Kettenmann et al., 2011) y es capaz de producir una gran cantidad de moléculas neuroactivas (Lucin & Wyss-Coray, 2009) que les permite detectar la actividad neuronal y reaccionar adecuadamente a la misma. Estos datos relativamente recientes han cambiado profundamente la imagen de la microglía en los últimos años, siendo considerada ahora como un sensor del SNC, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Barres, 2008).

Las células microgliales ramificadas son capaces de responder a pequeños daños del SNC, como pérdida de neuronas individuales, sin presentar grandes transformaciones fenotípicas. Por ejemplo, un reciente trabajo en hipocampo de ratón adulto ha demostrado que las células microgliales ramificadas adultas son capaces de engullir restos de neuroprogenitores adultos apoptóticos, sin presentar alteraciones en su fenotipo y sin activarse (Sierra et al., 2010). Estos datos indican que la activación no es

un requisito imprescindible para la fagocitosis microglial. Sin embargo, cuando se producen profundas alteraciones en alguna región del SNC como consecuencia de una agresión de cualquier naturaleza (que normalmente da lugar a la muerte de gran número de neuronas), la microglía ramificada detecta dichas alteraciones a través de sus mecanismos de vigilancia (en el que están implicados numerosos receptores) y responde rápida e intensamente, sufriendo importantes cambios en su inmunofenotipo y comportamiento funcional (Hanisch & Kettenmann, 2007; Ransohoff & Perry, 2009). Así, la microglía ramificada se transforma desde su estado “en reposo” a un estado totalmente activado. Dicho estado se caracteriza por un rápido cambio de la morfología celular, con pérdida de la ramificación mediante retracción de las prolongaciones, dando lugar a células morfológicamente parecidas a la microglía ameboide, con un cuerpo celular ovoide o alargado provisto de cortas prolongaciones pseudopódicas. Además, las células microgliales activadas adquieren una gran capacidad migratoria que les permite desplazarse activamente hacia la zona dañada, incluso recorriendo distancias considerables. También incrementan su actividad proliferativa, fagocitan restos de neuronas dañadas y liberan una amplia variedad de citoquinas y factores de diversa naturaleza (Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999).

La activación microglial no es un proceso de “todo o nada” (Raivich et al., 1999), sino que las células microgliales pueden presentar diferentes niveles de activación. De hecho, no todas las células microgliales activadas muestran el mismo inmunofenotipo y las características particulares de las mismas varían en función de factores intrínsecos como la edad, la densidad microglial, el tipo de daño, etc. (Olah et al., 2011; Perry et al., 2010; Sawada et al., 2008). Esta heterogeneidad fenotípica de la microglía activada podría explicar los diferentes efectos que tienen lugar durante la activación microglial dependiendo del tipo de alteración que sufre el SNC.

Aunque las células microgliales han sido consideradas principalmente como “limpiadoras” que eliminan restos celulares producidos por degeneración de neuronas, numerosas observaciones sugieren que las células microgliales pueden tener un papel más activo a la hora de determinar si una célula muere o vive en el SNC dañado. De este modo, la activación microglial puede cumplir funciones contrapuestas en el parénquima nervioso. Así, en determinadas circunstancias la microglía activada tiene un papel neurotóxico favoreciendo la degeneración de neuronas parcialmente dañadas, mientras que en otras muestra un papel neuroprotector, siendo capaz de rescatar de la

muerte a una considerable proporción de neuronas dañadas (Hanisch & Kettenmann, 2007; Mallat & Chamak, 1994). El papel neurotóxico o neuroprotector de la microglía activada dependerá del balance entre las diferentes moléculas neurotróficas y neurotóxicas liberadas por las células microgliales, así como del contexto microambiental (Marín-Teva et al., 2011; Vilhardt, 2005).

Origen ontogenético de la microglía y entrada de sus precursores en el SNC

El origen de las células microgliales ha sido ampliamente debatido en las últimas décadas (Cuadros & Navascués, 1998; Chan et al., 2007; Kettenmann et al., 2011; Prinz & Mildner, 2011; Ransohoff & Cardona, 2010; Rezaie & Male, 2002; Saijo & Glass, 2011; Tambuyzer et al., 2009). Aunque algunos autores han apoyado el origen neuroectodérmico de las células microgliales (Fedoroff et al., 1997; Richardson et al., 1993; Yokoyama et al., 2004), numerosas evidencias avalan el origen mesodérmico propuesto por del Río-Hortega (Cuadros & Navascués, 1998; Cuadros & Navascués, 2001; Chan et al., 2007; del Río-Hortega, 1932; Kaur et al., 2001; Rezaie & Male, 2002; Streit, 2001). En la actualidad se considera fuera de toda duda que las células microgliales son fagocitos mononucleares que invaden el SNC durante el desarrollo y, por lo tanto, tienen un linaje hematopoyético.

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar las vías de entrada de células de origen mesodérmico en el SNC. Una primera vía, que coincide con la propuesta inicialmente por del Río-Hortega, serían las meninges que rodean al SNC. Según esta hipótesis, las células microgliales se originan a partir de fagocitos de las meninges que atraviesan la superficie pial durante el desarrollo, incorporándose al parénquima nervioso donde se diferencian en microglía (Boya et al., 1991; Cuadros et al., 1994, 1997; Dalmau et al., 1997a; del Río-Hortega, 1932; Navascués et al., 1995). El ventrículo del SNC en desarrollo contiene numerosos fagocitos que también pueden incorporarse al parénquima nervioso atravesando la superficie apical del neuroepitelio, en donde se diferencian en células microgliales. Por lo tanto, las cavidades ventriculares del SNC constituyen una segunda vía de entrada de precursores microgliales en el parénquima nervioso (Cuadros et al., 1997; Kaur et al., 2001; Li et al., 1997). Una tercera vía de entrada de precursores microgliales en el SNC serían los vasos sanguíneos, de forma que las células microgliales podrían derivar de monocitos/macrófagos que abandonan el torrente sanguíneo y colonizan el parénquima

nervioso. Del Río-Hortega (del Río-Hortega, 1932) ya indicaba que las células de las meninges que invadían el SNC tenían características similares a los leucocitos sanguíneos y, por lo tanto, probablemente fueran células procedentes de la médula ósea. Esta hipótesis, que ha tenido amplia aceptación durante las décadas de los 80-90 (Ling et al., 1980; Perry et al., 1985; Rezaie & Male, 2002), establece que las células microgliales, igual que otros fagocitos mononucleares, derivan de los monocitos sanguíneos que se originan en la médula ósea. Tras la vascularización del SNC y mediante la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 (Dalmau et al., 1997b) e ICAM-2 (Rezaie et al., 1997), que actúan como receptores diana en el endotelio del cerebro, los monocitos sanguíneos atravesarían la pared de los vasos sanguíneos para alcanzar el parénquima nervioso. Las células microgliales y los monocitos/macrófagos comparten numerosas características inmunofenotípicas, que se han considerado como pruebas a favor del origen monocítico de la microglía. Así, cabe destacar el marcaje inmunocitoquímico para las enzimas nucleósido difosfatasa, esterasas no específicas y fosfatasa ácida (Castellano et al., 1991; Oehmichen et al., 1980) y el marcaje con lectinas (Colton et al., 1992). Por otro lado, el origen monocítico también estaba apoyado por los estudios llevados a cabo en el laboratorio de Ling (Ling et al., 1980), en los que se inyectaban partículas de carbono coloidal en el torrente sanguíneo que eran incorporadas por los monocitos, permitiendo seguir su rastro durante el desarrollo del SNC de rata. Los monocitos que habían ingerido partículas de carbono periféricamente aparecían como microglía ameboide en el SNC en desarrollo y, más tarde, como microglía ramificada. La ausencia de microglía ameboide en cerebros postnatales tras la administración de glucocorticoides, que son fuertes inmunosupresores, también constituye un apoyo indirecto al origen monocítico de las células microgliales (Kaur et al., 1994).

La presencia de microglía en el cerebro en desarrollo antes de que se desarrolle la vascularización (Ashwell, 1991; Cuadros et al., 1993; Wang et al., 1996) y de que los monocitos estén presentes en los tejidos hematopoyéticos (Naito et al., 1996; Sorokin et al., 1992) es un hecho que se contrapone a la hipótesis del origen monocítico de la microglía, sugiriendo que ésta se origina a partir de una población de células hematopoyéticas indiferenciadas que no pasan por la etapa de monocitos. Actualmente existen numerosos estudios que apoyan el origen de las células microgliales a partir de progenitores mieloides primitivos derivados del saco vitelino, los cuales, tras penetrar

en el SNC durante las etapas tempranas del desarrollo, muestran una apariencia tipo macrófago (Alliot et al., 1999; Chan et al., 2007; Davoust et al., 2008; Ginhoux et al., 2010; Herbomel et al., 2001; Kaur et al., 2001; Prinz et al., 2011; Ransohoff & Cardona, 2010; Saijo & Glass, 2011; Streit, 2001). Así, en roedores, se observan las primeras células tipo macrófago dentro del neuroepitelio durante los días 8,5-10 de la embriogénesis. Dichas células muestran una morfología ameboide y penetran en el SNC de manera independiente del sistema circulatorio (Ashwell, 1990, 1991; Chan et al., 2007; Kurz & Christ, 1998; Kurz et al., 2001). En esas etapas del desarrollo embrionario aparecen los primeros macrófagos inmaduros en el saco vitelino (Takahashi et al., 1996), algunos de los cuales serían precursores de células microgliales (Alliot et al., 1999) diferenciándose a través de una vía no monocítica (Lichanska & Hume, 2000; Takahashi et al., 1996). Estos macrófagos inmaduros formados en el saco vitelino han recibido diferentes nombres, tales como macrófagos primitivos (Andjelkovic et al., 1998; Ginhoux et al., 2010), macrófagos tempranos (Cuadros et al., 1993; Herbomel et al., 2001), macrófagos fetales (Streit, 2001; Ransohoff & Perry, 2009), macrófagos primitivos/fetales (Sorokin et al., 1992) o incluso microglía temprana (Schlegelmilch et al., 2011). En embriones de pez cebra, cuya transparencia permite hacer observaciones microscópicas directas en el interior del embrión, se ha descrito que los macrófagos primitivos comienzan a diferenciarse en el saco vitelino antes de que se desarrolle la propia circulación sanguínea (Herbomel et al., 2001). Estos macrófagos primitivos se diseminan en el mesénquima cefálico, desde el cual penetran en el esbozo de cerebro donde se diferencian en microglía ameboide con elevada actividad fagocítica.

Estudios recientes han aportado nuevos datos experimentales convincentes en favor del origen de la microglía a partir de células mieloides generadas en el saco vitelino (Ginhoux et al., 2010; Mizutani et al., 2012). Estos estudios utilizaban ratones $Cx3cr1^{gfp/+}$, en los que las células que expresan el receptor de la fractalquina CX_3CR1 se observan marcadas con proteína fluorescente verde (GFP-positivos). Este receptor es un marcador específico de progenitores mieloides tempranos y de microglía, por lo que se ha podido hacer un seguimiento *in vivo* de las células de este linaje durante el desarrollo, demostrándose que las células microgliales derivan de macrófagos primitivos del saco vitelino y son de linaje diferente a los macrófagos derivados de la médula ósea.

En resumen, las células microgliales son de linaje mieloide, aunque su relación con macrófagos primitivos o con células de la línea monocítica ha encontrado apoyos en los resultados de diferentes autores, siendo la primera posibilidad la que empieza a ser predominante en la actualidad. Cualesquiera que sean los precursores mieloides de la microglía, lo que está fuera de toda duda es que, una vez que éstos entran en el SNC, dan lugar a la microglía ameboide que se diferencia en microglía ramificada durante etapas más avanzadas del desarrollo.

Migración de las células microgliales ameboides durante el desarrollo del SNC

La migración y proliferación de las células microgliales permite que éstas colonicen las diferentes regiones del SNC. Los mecanismos utilizados por las células microgliales para progresar en el SNC han sido objeto de estudio en los últimos años (Harry & Kraft, 2012; Navascués et al., 1995, 2000; Pont-Lezica et al., 2011; Rezaie & Male, 1999; Tambuyzer et al., 2009). En el cerebro humano, la colonización inicial de la microglía coincide con la vascularización del SNC (Cuadros et al., 1993; Dalmau et al., 1997a; Herbomel et al., 2001; Monier et al., 2007). Los precursores microgliales localizados en regiones vascularizadas parecen estar en relación con la expresión de moléculas de adhesión intracelular (ICAM-2) en el endotelio cerebral (Rezaie et al., 1997) y se observan asociados a la pared de los vasos sanguíneos que se distribuyen en el parénquima nervioso (Rezaie et al., 2005). Esta relación topográfica entre microglía y vasos sanguíneos sugiere que las células microgliales pueden usar la pared de los vasos sanguíneos como sustrato para su avance a través del parénquima nervioso. Por lo tanto, las interacciones entre la microglía y las moléculas adhesivas de los vasos sanguíneos o de la matrix extracelular regularían el desplazamiento microglial dentro del cerebro en desarrollo (Rezaie & Male, 1999). No obstante, también se ha indicado la existencia de una interacción bidireccional entre microglía y vasos, de manera que las células microgliales podrían segregar factores solubles con actividad angiogénica que, a su vez, promoverían la formación de la red vascular del SNC (Rymo et al., 2011).

Parece claro que la migración microglial está determinada por factores presentes en el SNC en desarrollo. De hecho, la colonización microglial coincide con la formación de la glía radial, migración neuronal, sinaptogénesis y mielinización. Estudios en médula espinal de humanos y ratón han mostrado interacciones de las células microgliales con las fibras de la glía radial (Rezaie & Male, 1999; Rigato et al.,

2011). Resultados similares se han descrito en la retina de ratón y codorniz (Sánchez-López et al., 2004; Santos et al., 2008) y en hipocampo de rata (Dalmau et al., 1997a), sugiriendo que la glía radial del cerebro y las células de Müller de la retina participan en el mecanismo de migración de la microglía. Por otro lado, en la sustancia blanca de la médula espinal en desarrollo, las células microgliales se localizan predominantemente en áreas de entrada y salida de las raíces nerviosas (Calderó et al., 2009). Además, en varias especies también se ha observado una estrecha asociación de la microglía migratoria con prolongaciones axónicas (Ashwell, 1989; Cuadros et al., 1993; Herbomel et al., 2001; Verney et al., 2010). Los anteriores estudios indican que las proyecciones axónicas podrían constituir rutas de colonización de las células microgliales durante el desarrollo del SNC.

En resumen, varios estudios han sugerido que las células microgliales ameboides colonizan las diferentes partes del SNC en desarrollo utilizando diversos componentes del mismo (vasos sanguíneos, glía radial y fascículos axónicos) como sustrato para avanzar en sus rutas migratorias.

La colonización del SNC por células microgliales coincide con la presencia de células apoptóticas en algunas zonas del parénquima nervioso (Ashwell, 1989; Calderó et al., 2009; Cuadros et al., 1993; Dalmau et al., 1997a; Marín-Teva et al., 1999a; Rigato et al., 2011), lo cual indica que la muerte celular también podría desempeñar algún papel en la regulación de la migración microglial. Sin embargo, esta hipótesis ha sido cuestionada ya que en muchas regiones cerebrales no existe una relación directa entre la muerte celular y el patrón de migración de las células microgliales. Por lo tanto, no existen en la actualidad resultados concluyentes a favor de que la muerte celular que tiene lugar durante el desarrollo normal del SNC sea un foco de atracción para las células microgliales.

Estudios llevados a cabo en regiones del SNC de embriones de codorniz con citoarquitectura laminar, tales como el techo óptico, el cerebelo y la retina (Cuadros & Navascués, 2001; Navascués et al., 1995, 2000), han demostrado que la migración microglial transcurre en dos etapas: primero tiene lugar una migración tangencial seguida por un movimiento radial. La migración tangencial es paralela a la superficie pial y permite que las células microgliales se dispersen y ocupen una capa de la región colonizada. Las células microgliales migran tangencialmente en la retina a lo largo de la capa de fibras nerviosas (Marín-Teva et al., 1998), mientras que en el techo óptico lo

hacen a través del stratum album centrale (Cuadros et al., 1994) y en el cerebelo se mueven a lo largo del eje central de sustancia blanca (Cuadros et al., 1997). Estos estratos son ricos en fascículos de axones que son utilizados como vías de migración tangencial de los precursores microgliales.

La migración radial es utilizada por las células microgliales para moverse perpendicularmente desde la capa que ha sido colonizada mediante migración tangencial hacia los diferentes niveles de profundidad de cada región del SNC. En el techo óptico y en el cerebelo, esta migración radial tiene lugar desde niveles profundos, donde se localizan el stratum album centrale o la sustancia blanca, hacia las capas más externas (Cuadros et al., 1994, 1997). En la retina, las células microgliales migran desde la superficie vítrea hacia niveles cada vez más esclerales. Este movimiento radial de la microglía en la retina tiene lugar mediante sucesivos saltos desde la capa de fibras nerviosas hasta la capa plexiforme interna y desde ésta hasta la capa plexiforme externa (Sánchez-López et al., 2004).

La retina como órgano modelo para el estudio de la microglía: distribución de células microgliales en la retina de los vertebrados

La migración y diferenciación de las células microgliales son dos procesos importantes que tienen lugar durante el desarrollo embrionario y postnatal del SNC. La retina es una región del SNC con características particulares que facilitan el estudio de ambos procesos. En primer lugar, se encuentra anatómicamente delimitada del resto del SNC, lo que permite su fácil aislamiento. Además, sus células adoptan una disposición laminar estricta, que ya puede ser reconocida en edades tempranas del desarrollo, aportando referencias morfológicas de los diferentes microambientes en los que avanzan las células microgliales. Estas particularidades hacen de la retina un material muy favorable para el estudio de la biología de las células microgliales, por lo que desde la década de los 90 en adelante se ha utilizado como modelo en numerosos estudios que analizan diferentes aspectos de la microglía.

La retina de los mamíferos está infiltrada por una profusa red de vasos sanguíneos (Fruttiger, 2002, 2007; Stahl et al., 2010). Por el contrario, la retina de aves es completamente avascular, ya que el ojo de estos animales contiene un órgano profusamente plegado y vascularizado, que se denomina pecten, el cual se proyecta hacia el interior del vítreo desde la unión entre la cabeza del nervio óptico y la retina. En

él se concentran numerosos vasos sanguíneos, responsables de la nutrición de las células de la retina mediante difusión de nutrientes a través del vítreo (Bellhorn & Bellhorn, 1975; Meyer, 1977). La condición avascular de la retina de aves se ha utilizado ventajosamente en estudios sobre el origen de la microglía, ya que se evitan interferencias en la interpretación de los resultados, al descartar un posible origen desde los vasos sanguíneos. Además, la retina de codorniz es especialmente favorable para este tipo de estudios, ya que permite utilizar un marcador, el anticuerpo QH1, que reconoce células microgliales de codorniz en estadios embrionarios y adultos, así como células de los endotelios vasculares (Cuadros et al., 1992). Al carecer de vasos sanguíneos, el tratamiento inmunocitoquímico de la retina de codorniz con el anticuerpo QH1 permite marcar exclusivamente las células microgliales, que pueden ser claramente identificadas sin posibles confusiones con células endoteliales. Por este motivo, la retina de codorniz ha sido utilizada como modelo en nuestro laboratorio para el estudio del comportamiento y desarrollo de la microglía, tanto en situaciones normales como experimentales.

La distribución de las células microgliales en la retina adulta ha sido descrita en peces (Dowding et al., 1991; Salvador-Silva et al., 2000), anfibios (Goodbrand & Gaze, 1991), aves (Cuadros et al., 2006; Navascués et al., 1994; Won et al., 2000) y mamíferos, incluyendo conejo (Ashwell, 1989; Humphrey & Moore, 1996; Schnitzer, 1989), ratón (Santos et al., 2008; Zhang et al., 2005a), rata (Ashwell, 1989; Boya et al., 1987; Harada et al., 2002; Zhang et al., 2005b), mono (Boycott & Hopkins, 1981; Vrabc, 1975) y humanos (Gupta et al., 2003; Penfold et al., 1991,2001; Provis et al., 1995; Yang et al., 2000). Prácticamente en todas las especies analizadas, las células microgliales ramificadas se distribuyen en los estratos fibrosos de la retina, mientras que están ausentes en las capas nucleares. Así, la mayoría de las células microgliales ramificadas están presentes en las capas plexiformes interna y externa, aunque un escaso número de células microgliales poco ramificadas también se pueden observar en la capa de fibras nerviosas de la zona central de la retina, adyacente al nervio óptico. En la capa plexiforme externa, las prolongaciones de las células microgliales se distribuyen fundamentalmente en un único plano horizontal, aunque muestran delgadas ramas que se introducen radialmente entre los fotorreceptores. La microglía de la capa plexiforme interna se dispone en las interfases de la misma con la capa nuclear interna y la capa ganglionar, así como en niveles intermedios, mostrando prolongaciones tanto

horizontales como radiales. En ambas capas plexiformes, cada célula microglial extiende sus prolongaciones en un territorio propio, que no se solapa con los territorios de células adyacentes. Esta distribución de las células microgliales ramificadas en dominios territoriales no es exclusiva de la retina, sino que se extiende a todos los centros nerviosos (Jinno et al., 2007; Kettenmann, 2011; Ransohoff & Perry, 2009).

Dispersión de las células microgliales en la retina

Mientras que la distribución topográfica de las células microgliales en la retina adulta es bien conocida, sus mecanismos de desarrollo están menos comprendidos. Se han descrito parcialmente en retinas en desarrollo de rata (Ashwell, 1989), conejo (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989), ratón (Hughes et al., 2003; Hume et al., 1983; Santos et al., 2008) y humanos (Diaz-Araya et al., 1995a; Diaz-Araya et al., 1995b). Estudios en la retina avascular de embriones de codorniz (Marín-Teva et al., 1998, 1999a; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004) han puesto de manifiesto que las células microgliales colonizan la retina mediante dos tipos de migración, tangencial y radial (Figura 3). Las células microgliales ameboides entran en la retina desde la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CON/BP) entre los días 7 y 16 de incubación (E7-E16) en la región central de la retina. No se ha establecido si estos precursores proceden del nervio óptico o del pecten, puesto que la base de éste está íntimamente asociada con la cabeza del nervio óptico, lo que dificulta la determinación de la procedencia exacta de las células localizadas en este área. En la retina de mamíferos se ha descrito que las células microgliales tienen una doble procedencia: desde la cabeza del nervio óptico y desde el esbozo de cuerpo ciliar (Diaz-Araya et al., 1995a; Diaz-Araya et al., 1995b). En la retina de aves, también se ha descrito una entrada de células microgliales desde el cuerpo ciliar (Marín-Teva et al., 1999b).

En las aves, una vez que han accedido al interior de la retina, las células microgliales ameboides colonizan toda la extensión de la misma migrando tangencialmente en dirección centro-periférica sobre los pies terminales de las células de Müller y entre los fascículos de axones de la CFN (Navascués et al., 1995). Estudios previos de nuestro laboratorio han establecido la cronología de dicha migración tangencial, que tiene lugar desde E7 hasta E16. Tras su migración tangencial, las células microgliales ameboides cambian la dirección de su movimiento, desplazándose radialmente desde partes vítreas de la retina hacia partes esclerales. Mediante esta

migración radial, las células microgliales ameboides colonizan primero la capa plexiforme interna y más tarde la capa plexiforme externa. La cronología de la migración radial de la microglía en la retina embrionaria de la codorniz también ha sido establecida, iniciándose en E9 y extendiéndose hasta la mitad de la primera semana post-eclosión (Marín-Teva et al., 1999a; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004). Las células microgliales ameboides comienzan a diferenciarse en microglía ramificada cuando alcanzan las capas plexiformes, extendiéndose el proceso de diferenciación hasta la primera semana post-eclosión.

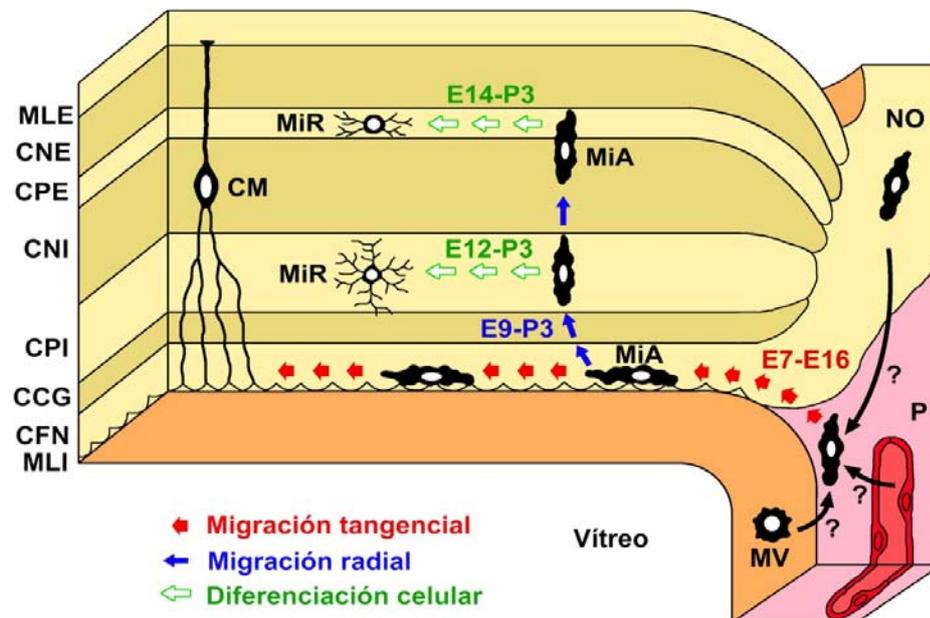


Fig. 3. Representación esquemática de la ruta de migración de los precursores microgliales en la retina embrionaria de codorniz. MiA: microglía ameboides; MiR: microglía ramificada; CM: célula de Müller; P: pecten; NO: nervio óptico; MLI: membrana limitante interna (compuesta por la lámina basal que se localiza bajo la porción terminal de las células de Müller); CFN: capa de fibras nerviosas; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa MLE: membrana limitante externa; MV: macrófago vítreo (imagen modificada de Navascués et al., 1995)

Los mecanismos generales de la migración tangencial y radial de la microglía ameboides en la retina embrionaria de codorniz han sido analizados en nuestro laboratorio. El mecanismo de migración tangencial sobre los pies terminales de las células de Müller tiene lugar en varias fases (Marín-Teva et al., 1998): 1) exploración

del ambiente mediante la extensión de lamelipodios en varias direcciones; 2) distribución polarizada de lamelipodios; 3) fuerte anclaje de las células al sustrato; 4) translocación del soma hacia la parte delantera de la célula; y 5) retracción de la parte trasera de la célula. En cuanto a la migración radial, las células microgliales ameboides de la parte vítrea emiten una delgada prolongación radial carente de lamelipodios, a través de la cual se produce la translocación del núcleo hasta un nivel más escleral. Por otra parte, las células microgliales utilizan las prolongaciones radiales de las células de Müller como sustrato para su migración radial. Además, la ramificación de las células microgliales es simultánea a su migración radial, de forma que éstas se comienzan a ramificar en diferentes niveles de profundidad de la retina antes de completar su migración radial. Desde cada uno de estos niveles, las células pueden “saltar” hasta otro nivel más escleral, en el que conservan su ramificación (Sánchez-López et al., 2004).

REFERENCIAS

- Alliot F, Godin I, Pessac B. 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res* 117:145-152.
- Andjelkovic AV, Nikolic B, Pachter JS, Zecevic N. 1998. Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res* 814:13-25.
- Ashwell K. 1989. Development of microglia in the albino rabbit retina. *J Comp Neurol* 287:286-301.
- Ashwell K. 1990. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55:219-230.
- Ashwell K. 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 58:1-12.
- Barres BA. 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430-440.
- Bellhorn RW, Bellhorn MS. 1975. The avian pecten. 1. Fluorescein permeability. *Ophthalmic Res* 7:1-7.
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA. 2007. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27:7028-7040.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. 2007. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55:233-238.
- Boya J, Calvo J, Carbonell AL. 1987. Appearance of microglial cells in the postnatal rat retina. *Arch Histol Jpn* 50:223-228.
- Boya J, Calvo JL, Carbonell AL, Borregon A. 1991. A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* 175:229-236.
- Boycott BB, Hopkins JM. 1981. Microglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience* 6:679-688.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397-424.

- Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Iandiev I, Grosche J, Wiedemann P, Albrecht J, Reichenbach A. 2009. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54:143-160.
- Bringmann A, Wiedemann P. 2012. Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 227:1-19.
- Calderó J, Brunet N, Ciutat D, Hereu M, Esquerda JE. 2009. Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death. *J Neurosci Res* 87:2447-2466.
- Castellano B, Gonzalez B, Jensen MB, Pedersen EB, Finsen BR, Zimmer J. 1991. A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. *J Histochem Cytochem* 39:561-568.
- Colton CA, Abel C, Patchett J, Keri J, Yao J. 1992. Lectin staining of cultured CNS microglia. *J Histochem Cytochem* 40:505-512.
- Cuadros MA, Moujahid A, Martin-Partido G, Navascués J. 1992. Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* 148:11-14.
- Cuadros MA, Martin C, Coltey P, Almendros A, Navascués J. 1993. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol* 330:113-129.
- Cuadros MA, Moujahid A, Quesada A, Navascués J. 1994. Development of microglia in the quail optic tectum. *J Comp Neurol* 348:207-224.
- Cuadros MA, Rodriguez-Ruiz J, Calvente R, Almendros A, Marin-Teva JL, Navascués J. 1997. Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol* 389:390-401.
- Cuadros MA, Navascués J. 1998. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173-189.
- Cuadros MA, Navascués J. 2001. Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Prog Brain Res* 132:51-59.
- Cuadros MA, Santos AM, Martin-Oliva D, Calvente R, Tassi M, Marin-Teva JL, Navascués J. 2006. Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. *J Histochem Cytochem* 54:727-738.

- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53:344-354.
- Cho SS, Lucas JJ, Roh EJ, Yoo YB, Lee KH, Park KH, Hwang DH, Baik SH. 1997. Distribution of transferrin binding protein immunoreactivity in the chicken central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 382:260-271.
- Choi YK, Kim KW. 2008. Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep* 41:345-352.
- Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B. 1997a. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J Comp Neurol* 377:70-84.
- Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B. 1997b. Expression of LFA-1alpha and ICAM-1 in the developing rat brain: a potential mechanism for the recruitment of microglial cell precursors. *Brain Res Dev Brain Res* 103:163-170.
- Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Finsen B, Castellano B. 2003. Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 458:144-157.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci* 8:752-758.
- Davoust N, Vauillat C, Androdias G, Nataf S. 2008. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* 29:227-234.
- del Rio-Hortega P. 1932. Microglia. En: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, vol. 2, W Penfield (ed.). Paul B Hoeber, New York, pp 483-534.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, Billson FA. 1995a. Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol* 363:53-68.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL. 1995b. Ontogeny and cellular expression of MHC and leucocyte antigens in human retina. *Glia* 15:458-470.
- Dowding AJ, Maggs A, Scholes J. 1991. Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS: immunohistochemical characterization using FL.1, an anti-macrophage monoclonal antibody. *Glia* 4:345-364.
- Fedoroff S, Zhai R, Novak JP. 1997. Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50:477-486.

- Ffrench-Constant C, Miller RH, Burne JF, Raff MC. 1988. Evidence that migratory oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells are kept out of the rat retina by a barrier at the eye-end of the optic nerve. *J Neurocytol* 17:13-25.
- Fischer AJ, Scott MA, Zelinka C, Sherwood P (2010) A novel type of glial cell in the retina is stimulated by insulin-like growth factor 1 and may exacerbate damage to neurons and Muller glia. *Glia* 58: 633-649.
- Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J. 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8287-8292.
- Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, Marchetti V, Moreno SK, El-Kalay M, Bird AC, Banin E, Aguilar E. 2007. Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis* 10:89-101.
- Fruttiger M. 2002. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:522-527.
- Fruttiger M. 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10:77-88.
- Fujita Y, Imagawa T, Uehara M. 2001. Fine structure of the retino-optic nerve junction in the chicken. *Tissue Cell* 33:129-134.
- Gao L, Macklin W, Gerson J, Miller RH. 2006. Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Dev Biol* 290:277-286.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845.
- Goodbrand IA, Gaze RM. 1991. Microglia in tadpoles of *Xenopus laevis*: normal distribution and the response to optic nerve injury. *Anat Embryol* 184:71-82.
- Gotoh H, Ueda T, Uno A, Ohuchi H, Ikenaka K, Ono K. 2011. Expression of myelin genes in the developing chick retina. *Gene Expr Patterns* 11:471-475.
- Gupta N, Brown KE, Milam AH. 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76:463-471.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K. 2002. Microglia-Muller glia cell interactions control

- neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 22:9228-9236.
- Harry GJ, Kraft AD. 2012. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 33:191-206.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. 2001. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* 238:274-288.
- Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, Uchino S, Kohsaka S. 2005. Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 81:357-362.
- Hollander H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling TL, Stone J. 1991. Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells. *J Comp Neurol* 313:587-603.
- Hollander H, Makarov F, Stefani FH, Stone J. 1995. Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribrosa in the normotensive eye in humans and other mammals. *Ophthalmic Res* 27:296-309.
- Hughes EH, Schlichtenbrede FC, Murphy CC, Sarra GM, Luthert PJ, Ali RR, Dick AD. 2003. Generation of activated sialoadhesin-positive microglia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2229-2234.
- Hume DA, Perry VH, Gordon S. 1983. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol* 97:253-257.
- Humphrey MF, Moore SR. 1996. Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. *Glia* 16:325-341.
- Ilschner S, Brandt R. 1996. The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. *Glia* 18:129-140.
- Jeon CJ, Masland RH. 1993. Selective accumulation of diamidino yellow and chromomycin A3 by retinal glial cells. *J Histochem Cytochem* 41:1651-1658.
- Jinno S, Fleischer F, Eckel S, Schmidt V, Kosaka T. 2007. Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55:1334-1347.

- Kaur C, Wu CH, Wen CY, Ling EA. 1994. The effects of subcutaneous injections of glucocorticoids on amoeboid microglia in postnatal rats. *Arch Histol Cytol* 57:449-459.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA. 2001. Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 54:2-9.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kubota Y, Suda T. 2009. Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 19:38-43.
- Kurz H, Christ B. 1998. Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 22:98-102.
- Kurz H, Korn J, Egli PS, Huang R, Christ B. 2001. Embryonic central nervous system angiogenesis does not involve blood-borne endothelial progenitors. *J Comp Neurol* 436:263-274.
- Li YB, Kaur C, Ling EA. 1997. Labeling of amoeboid microglial cells and intraventricular macrophages in fetal rats following a maternal injection of a fluorescent dye. *Neurosci Res* 28:119-125.
- Liang KJ, Lee JE, Wang YD, Ma W, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT. 2009. Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4444-4451.
- Lichanska AM, Hume DA. 2000. Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp Hematol* 28:601-611.
- Ling EA, Penney D, Leblond CP. 1980. Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol* 193:631-657.
- Ling EA, Wong WC. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Lu YB, Franze K, Seifert G, Steinhauser C, Kirchhoff F, Wolburg H, Guck J, Janmey P, Wei EQ, Kas J, Reichenbach A. 2006. Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17759-17764.
- Lucin KM, Wyss-Coray T. 2009. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* 64:110-122.

- Magalhaes MM, Coimbra A. 1973. Electron microscope autoradiographic detection of sites of protein synthesis in the rabbit retina Muller cells. *J Cell Biol* 57:77-87.
- Mallat M, Chamak B. 1994. Brain macrophages: neurotoxic or neurotrophic effector cells? *J Leukoc Biol* 56:416-422.
- Mallat M, Marin-Teva JL, Cheret C. 2005. Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15:101-107.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J. 1998. Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* 22:31-52.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J. 1999a. Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412:255-275.
- Marín-Teva JL, Calvente R, Cuadros MA, Almendros A, Navascués J. 1999b. Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia* 27:226-238.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J. 2011. Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 7:25-40.
- Meyer D. 1977. The avian eye and its adaptations. En: *The visual system in vertebrates*. F Crescitelli (ed). Springer-Verlag, Berlin, pp. 549-611.
- Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE. 2012. The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J Immunol* 188:29-36.
- Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide AL, Evrard P, Gressens P, Verney C. 2007. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:372-382.
- Naito M, Umeda S, Yamamoto T, Moriyama H, Umezu H, Hasegawa G, Usuda H, Shultz LD, Takahashi K. 1996. Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J Leukoc Biol* 59:133-138.
- Nakazawa T, Tachi S, Aikawa E, Ihnuma M. 1993. Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia* 8:114-121.

- Navascués J, Moujahid A, Quesada A, Cuadros MA. 1994. Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J Comp Neurol* 350:171-186.
- Navascués J, Moujahid A, Almendros A, Marin-Teva JL, Cuadros MA. 1995. Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol* 354:209-228.
- Navascués J, Almendros A, Cuadros MA. 1996. Development of microglia: evidence from studies in the avian central nervous system. En: *Topical Issues in Microglial Research*. Ling EA, Tan CK, Tan CBC (eds). Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 43-65.
- Navascués J, Calvente R, Marin-Teva JL, Cuadros MA. 2000. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc* 72:91-102.
- Newman E, Reichenbach A. 1996. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307-312.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science* 308:1314-1318.
- Oehmichen M, Wietholter H, Gencic M. 1980. Cytochemical markers for mononuclear phagocytes as demonstrated in reactive microglia and globoid cells. *Acta Histochem* 66:243-252.
- Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW. 2011. Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:108-118.
- Ono K, Tsumori T, Kishi T, Yokota S, Yasui Y. 1998. Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *J Comp Neurol* 398:309-322.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.
- Penfold PL, Madigan MC, Provis JM. 1991. Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci* 7:383-388.
- Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. 2001. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 20:385-414.

- Perry VH, Hume DA, Gordon S. 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326.
- Perry VH, Lund RD. 1990. Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol* 19:265-272.
- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. 2010. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6:193-201.
- Pont-Lezica L, Bechade C, Belarief-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A. 2011. Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem* 119:901-908.
- Prada FA, Quesada A, Dorado ME, Chmielewski C, Prada C. 1998. Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia* 22:221-236.
- Prinz M, Mildner A. 2011. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 59:177-187.
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. 2011. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 14:1227-1235.
- Provis JM, Penfold PL, Edwards AJ, van Driel D. 1995. Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia* 14:243-256.
- Provis JM. 2001. Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 20:799-821.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Ransohoff RM, Cardona AE. 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468:253-262.
- Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chao TI, Dettmer D, Hertz L. 1993. What do retinal muller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *J Chem Neuroanat* 6:201-213.

- Reichenbach A, Robinson S. 1995. Phylogenetic constraints on retinal organization and development: an Haeckelian perspective. *Prog Retin Eye Res* 15:139-171.
- Reichenbach A, Bringmann A. 2010. Müller cells in the healthy and diseased retina. New York, Springer.
- Rezaie P, Cairns NJ, Male DK. 1997. Expression of adhesion molecules on human fetal cerebral vessels: relationship to microglial colonisation during development. *Brain Res Dev Brain Res* 104:175-189.
- Rezaie P, Male D. 1999. Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc Res Tech* 45:359-382.
- Rezaie P, Male D. 2002. Mesoglia & microglia - a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci* 11:325-374.
- Rezaie P, Dean A, Male D, Ulfing N. 2005. Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cereb Cortex* 15:938-949.
- Richardson A, Hao C, Fedoroff S. 1993. Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 7:25-33.
- Rigato C, Buckinx R, Le-Corrone H, Rigo JM, Legendre P. 2011. Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* 59:675-695.
- Rompani SB, Cepko CL. 2010. A common progenitor for retinal astrocytes and oligodendrocytes. *J Neurosci* 30:4970-4980.
- Ross & Pawlina. 2007. *Histología: texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana.
- Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen Sand F, Lang R, Uv A, Betsholtz C. 2011. A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PLoS One* 6(1):e15846.
- Saijo K, Glass CK. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11:775-787.
- Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP. 2000. Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol* 417:431-447.
- Sánchez-López A, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marin-Teva JL, Navascués J. 2004. Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia* 46:261-273.

- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martin-Oliva D, Marin-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA. 2008. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506:224-239.
- Sawada M, Sawada H, Nagatsu T. 2008. Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis* 5:254-256.
- Schlegelmilch T, Henke K, Peri F. 2011. Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 21:5-10.
- Schnitzer J. 1985. Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J Comp Neurol* 240:128-142.
- Schnitzer J. 1987. Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci Lett* 78:29-34.
- Schnitzer J. 1988. Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia* 1:74-89.
- Schnitzer J. 1989. Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol* 282:249-263.
- Seo JH, Haam YG, Park SW, Kim DW, Jeon GS, Lee C, Hwang DH, Kim YS, Cho SS. 2001. Oligodendroglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult bird. *J Neurosci Res* 65:173-183.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7:483-495.
- Small RK, Riddle P, Noble M. 1987. Evidence for migration of oligodendrocyte--type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* 328:155-157.
- Sorokin SP, Hoyt RF, Jr., Blunt DG, McNelly NA. 1992. Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anat Rec* 232:527-550.
- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Lofqvist C, Hellstrom A, Smith LE. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2813-2826.

- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33:256-266.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SWM, Barres BA. 2007. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131:1164-1178.
- Stone J, Dreher Z. 1987. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255:35-49.
- Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. 1995. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 15:4738-4747.
- Streit WJ. 2001. Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology* 22:619-624.
- Takahashi K, Naito M, Takeya M. 1996. Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int* 46:473-485.
- Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ. 2009. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol* 85:352-730.
- Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8(11):e1000527.
- Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P. 2010. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat* 217:436-448.
- Vilhardt F. 2005. Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37:17-21.
- Vrabec F. 1975. Activated human retinal microglia under pathological conditions. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 196:49-60.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. 2009. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses *in vivo* and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974-3980.
- Wang CC, Wu CH, Shieh JY, Wen CY, Ling EA. 1996. Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J Anat* 189:567-574.
- West H, Richardson WD, Fruttiger M. 2005. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development* 132:1855-1862.

- Won MH, Kang TC, Cho SS. 2000. Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microsc Res Tech* 50:151-60.
- Yang P, Das PK, Kijlstra A. 2000. Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocul Immunol Inflamm* 8:149-157.
- Yokoyama A, Yang L, Itoh S, Mori K, Tanaka J. 2004. Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Glia* 45:96-104.
- Zelinka CP, Scott MA, Volkov L, Fischer AJ. 2012. The reactivity, distribution and abundance of non-astrocytic inner retinal glial (NIRG) cells are regulated by microglia, acute damage, and IGF1. *PLoS ONE* 7: e44477.
- Zhang C, Shen JK, Lam TT, Zeng HY, Chiang SK, Yang F, Tso MO. 2005a. Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis* 11:887-895.
- Zhang C, Lam TT, Tso MO. 2005b. Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Exp Eye Res* 81:700-709.

Objetivos

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la microglía coloniza el SNC embrionario de aves mediante procesos de migración tangencial y radial. La caracterización morfológica de las células microgliales que migran en la retina embrionaria de codorniz ha permitido conocer la existencia de acusadas diferencias entre ambos tipos de migración. No obstante, poco se sabe sobre los mecanismos moleculares que regulan la migración microglial durante el desarrollo del SNC. El progreso del conocimiento de dichos mecanismos requiere el empleo de ensayos experimentales difíciles de llevar a cabo en animales *in situ*, aunque fáciles de realizar *in vitro*. Sin embargo, el aislamiento de células microgliales y su cultivo *in vitro* induce una severa respuesta de las mismas frente a los drásticos cambios de su microambiente, alterando profundamente su capacidad de migrar y ramificarse. Por lo tanto, la información obtenida a partir del tratamiento experimental de cultivos celulares es difícil de extrapolar al comportamiento fisiológico de la microglía. Esta dificultad puede obviarse parcialmente mediante la utilización de cultivos organotípicos, en los que el microambiente de las células microgliales es más parecido al que existe *in situ*, aunque en ellos la microglía sigue mostrando alteraciones de comportamiento cuya intensidad depende de las condiciones de cultivo. El objetivo general perseguido en la presente Tesis ha sido desarrollar las condiciones de cultivo de explantes de retina de embriones de codorniz para reproducir lo más fielmente posible el comportamiento de las células microgliales en la retina embrionaria *in situ*, posibilitando la realización de tratamientos experimentales que permitan obtener información sobre los mecanismos moleculares de la migración microglial que sea extrapolable a la situación fisiológica del tejido *in situ*. Este objetivo general se ha desglosado en tres objetivos concretos, que son:

Primero. Puesta a punto de las condiciones idóneas de cultivo de explantes de retina embrionaria de codorniz y estudio de las características de la migración y ramificación de las células microgliales tras diferentes días de cultivo, comparándolas con las observadas en retinas *in situ* de edades equivalentes.

Segundo. Análisis de la cinética del movimiento de las células microgliales durante su migración tangencial en cultivos organotípicos de retina de embriones de codorniz de 7 días de incubación (E7).

Tercero. Estudio de la maquinaria molecular que interviene en la migración tangencial de las células microgliales en explantes de retina de embriones de codorniz de E7 cultivados *in vitro*, mediante análisis de los cambios de la morfología microglial tras el tratamiento experimental de los explantes con inhibidores específicos de algunas moléculas que participan en la migración de otros tipos celulares.

Estos tres objetivos han sido expuestos en capítulos diferentes, que tienen una estructura similar a la de los artículos publicados en revistas científicas, incluyendo los apartados de introducción, materiales y métodos, resultados y discusión propios. Con ello se pretende una mejor organización de los estudios realizados, facilitando su comprensión. Este modo de estructurar la presente memoria tiene el inconveniente de que algunas técnicas se pueden repetir en los materiales y métodos de distintos capítulos. Este problema se ha intentado evitar en lo posible, de manera que cuando en un capítulo se menciona una técnica ya descrita en capítulos anteriores, se hace referencia al capítulo en el que aparece descrita en su totalidad, a la vez que se hace un pequeño resumen de la misma. Sin embargo, la total independencia de cada capítulo, dentro de la interrelación entre todos ellos, tiene indudables ventajas tanto para el lector como para una correcta valoración de la tesis.

Capítulo I

**Migración y ramificación de la microglía
en cultivos organotípicos de retina
embrionaria de codorniz**

INTRODUCCIÓN

Migración y diferenciación son procesos clave en la ontogenia de la microglía durante el desarrollo embrionario y postnatal del sistema nervioso central (SNC). Ambos han sido bien caracterizados en el desarrollo de la retina de codorniz (Marín-Teva et al., 1998, 1999; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004), habiéndose descrito dos tipos de migración, tangencial y radial. Las células microgliales ameboides entran en la retina desde la cabeza del nervio óptico/base del pecten entre 7 y 16 días de incubación (E7-E16) y migran tangencialmente en dirección centro-periférica (Navascués et al., 1995) sobre los pies terminales de las células de Müller mediante un mecanismo similar al de los fibroblastos cultivados *in vitro* (Marín-Teva et al., 1998). A partir de E9 y hasta la mitad de la primera semana post-eclosión, migran radialmente en dirección vítreo-escleral con el fin de alcanzar las capas plexiformes y diferenciarse en microglía ramificada (Marín-Teva et al., 1999; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004).

Para llegar a comprender los mecanismos celulares y moleculares implicados en la migración y ramificación de las células microgliales es necesario emprender estudios experimentales, los cuales se ven facilitados con el empleo de modelos *in vitro*, donde la manipulación molecular del microambiente que rodea a las células microgliales se realiza sin dificultad. Sin embargo, el inconveniente de los cultivos enriquecidos con células microgliales es que éstas responden rápidamente a los cambios en el microambiente y se activan (Hurley et al., 1999; Lee et al., 2002; Slepko & Levi, 1996); por lo tanto, estos cultivos no reproducen el comportamiento de las células microgliales *in situ*. En contraste, los cultivos organotípicos de diferentes regiones del SNC, adulto y en desarrollo, sobre membranas semiporosas en una interfase aire-líquido (Stoppini et al., 1991) representan una potente herramienta para investigar la diferenciación (Hailer et al., 1996, 1997) y el comportamiento migratorio (Czapiga & Colton, 1999; Dailey & Waite, 1999; Grossmann et al., 2002; Hailer et al., 1997; Heppner et al., 1998; Kurpius et al., 2007; Petersen & Dailey, 2004; Stence et al., 2001) de la microglía.

La retina es una región del SNC especialmente favorable para realizar cultivos organotípicos porque es una región bien delimitada, con una organización citoarquitectónica en capas que permite la preparación de explantes para ser cultivados como montajes totales, evitando así el daño producido durante la confección de

rebanadas de tejido. Sin embargo, la microglía en cultivos organotípicos de explantes de retina de diferentes mamíferos se activa rápidamente después de la disección (Broderick et al., 2000; Carter & Dick, 2003, 2004; Engelsberg et al., 2004; Mertsch et al., 2001) y ello impide el análisis de la microglía en su estado original. Los cultivos organotípicos de retinas de aves parecen ser un modelo mejor que las retinas de mamíferos a la hora de estudiar la microglía, ya que en estas últimas los vasos sanguíneos degeneran rápidamente y posiblemente contribuyan a la alteración del estado fisiológico de la microglía, mientras que esto no ocurre en aves debido a la avascularidad de su retina. En este estudio se ha puesto a punto un modelo *in vitro* basado en el cultivo de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) durante largos períodos de tiempo, durante el cual se produce la migración y diferenciación de las células microgliales en desarrollo, a la vez que se conserva la citoarquitectura de la retina. Se demuestra que los procesos de migración y ramificación de la microglía ameboide en dichos ERECs son aparentemente fisiológicos, ya que son equivalentes a los que tienen lugar en la retina *in situ*. Por lo tanto, nuestro sistema *in vitro* representa una potente herramienta para futuros análisis experimentales de los mecanismos moleculares que controlan la migración y ramificación microglial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este estudio se utilizaron retinas de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) de E9, E10, E12 y E14 para obtener explantes que se cultivaron *in vitro* de la forma que se describe más adelante. Tras seleccionar la edad embrionaria en la que el comportamiento microglial en ERECs era similar al de la retina *in situ*, la mayoría de los resultados se obtuvieron de ERECs de E9. Además, se usaron retinas no cultivadas de embriones de codorniz de E9-E16 para comparar las observaciones de ERECs de E9 cultivados durante diferentes tiempos *in vitro* con retinas no cultivadas de edades equivalentes. El número de embriones y explantes de retina estudiados se incluyen en la Tabla 1.

		Edad embrionaria				
		E9	E10	E12	E14	E16
Tiempo de cultivo <i>in vitro</i>	Explantes no cultivados (retinas <i>in situ</i>)	46 (5)	45 (3)	35 (5)	35 (6)	51 (4)
	6 hiv	24 (4)	10 (3)	--	--	--
	12 hiv	24 (3)	10 (2)	--	--	--
	24 hiv	66 (8)	10 (3)	--	--	--
	2 div	34 (4)	10 (3)	--	--	--
	3 div	64 (19)	10 (4)	16 (2)	38 (7)	--
	5 div	72 (13)	--	--	--	--
	7 div	86 (18)	10 (3)	--	--	--
	8 div	30 (11)	5 (3)	--	--	--
	10 div	24 (11)	5 (3)	--	--	--
	14 div	34 (4)	10 (3)	--	--	--

E = día embrionario; hiv = horas *in vitro*; div = días *in vitro*

Tabla 1. Número de explantes de retina y embriones (entre paréntesis) utilizados en este estudio.

Aislamiento y cultivo *in vitro* de explantes de retina

Los ERECs se cultivaron *in vitro* según el método descrito por Stoppini et al., (1995) con algunas modificaciones (Marín-Teva et al., 2004). Las retinas se diseccionaron en solución salina tamponada de Gey (Sigma, St. Louis, MO) enfriada en hielo y suplementada con 5 mg/ml de glucosa (Sigma) y 50UI- μ g/ml de penicilina-estreptomicina. Tras eliminar el epitelio pigmentario, se aisló el área central de cada retina (que contiene células microgliales en proceso de migración). A continuación, con ayuda de un Tissue Chopper McIlwain (Mickle, Guildford, United Kingdom) se cortaron explantes cuadrados de 1 mm de lado y, con la ayuda de una pipeta de vidrio de bordes no cortantes, se transfirieron sobre membranas semipermeables Millicell CM de 30 mm (Millipore, Billerica, MA) y tamaño de poro de 0,4 μ m, situadas en placas de cultivo de 6 pocillos con 1 ml de medio de cultivo/pocillo, incubándose durante diferentes tiempos *in vitro* (ver más abajo) a 37°C en una atmósfera saturada de humedad con 5% de CO₂. Cada explante de retina se cultivó sobre la membrana Millicell con la superficie vítrea hacia abajo, en íntimo contacto con la membrana. El medio se cambiaba a las 24 horas *in vitro* (hiv) y posteriormente cada 3 días *in vitro* (div).

En este estudio se utilizaron diferentes medios de cultivo. El más usado estaba compuesto por 50% de medio basal de Eagle con sales de Earle (BME), 25% de solución salina de Hanks, 25% de suero de caballo (SC), L-glutamina 1 mM, 10 UI- μ g/ml de penicilina-estreptomicina (todos de Invitrogen, Paisley, United Kingdom) y 5 mg/ml de glucosa (BME+25%SC). Además, usamos tres variantes de este medio de cultivo, reemplazando el 25% de SC por 15% de SC y 10% de suero de pollo (BME+15%SC+10%SP), o por 25% de suero de pollo (BME+25%SP), o por suplemento de insulina-transferrina-selenito sódico (ITS, Sigma) y 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) Fracción V (BME+ITS). El otro medio de cultivo utilizado era un medio neurobasal libre de suero (NB, Invitrogen) suplementado con B27 (Invitrogen, NB+B27) o con N2 (Invitrogen, NB+N2).

Para seleccionar la mejor edad embrionaria, explantes de retina de E9, E10, E12 y E14 se incubaron durante 3 div. Una vez que se comprobó que E9 era la mejor edad embrionaria, ERECs de E9 se incubaron durante 0 (explantes no cultivados), 6, 12 y 24 hiv y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 14 div.

Anticuerpos

Para las técnicas inmunocitoquímicas se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: QH1, H5, 39.4D5 y M1B4 (todos de Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA). El anticuerpo QH1 se empleó para identificar las células microgliales, ya que reconoce todas las células de línea hemangioblástica de codorniz, excepto los eritrocitos maduros (Pardanaud et al., 1987), incluyendo microglía ameboide, ramificada y reactiva (Cuadros et al., 1992). Teniendo en cuenta que la retina de codorniz es avascular, el anticuerpo QH1 sólo marca la microglía en los explantes retinianos. El anticuerpo H5 reconoce la vimentina y se usó para poner de manifiesto las células de Müller (Fischer et al., 2004). El anticuerpo 39.4D5 identifica el factor de transcripción islet-1 y marca una gran proporción de células ganglionares y otras subpoblaciones neuronales de la retina (Fischer et al., 2002; Halfter et al. 2005). El anticuerpo M1B4 es un marcador de tenascina, una proteína de la matriz extracelular que se expresa en las capas plexiformes de la retina embrionaria (Pérez & Halfter, 1993; Belmonte et al., 2000; Sánchez-López et al., 2004).

También se utilizó el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa (R&D Systems, Minneapolis, MN) para identificar células apoptóticas (Borsello et al., 2002).

Las diluciones empleadas fueron las siguientes: 1:4 para QH1, 1:10 para H5 y M1B4, 1:250 para 39.4D5 y 1:100 para anti-caspasa-3 activa.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron una IgG anti-ratón de cabra conjugada con el fluorocromo Alexa Fluor 488 (dilución 1:500, Molecular Probes, Eugene, OR) para revelar los anticuerpos monoclonales y una IgG anti-conejo de cabra conjugado con Cy3 (dilución 1:500, Healthcare Europe, Freiburg, Germany) para revelar el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa.

Inmunomarcaje de explantes totales y secciones de criostato

Los ERECs cultivados y las retinas no cultivadas se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB 0,1M, pH7.4) durante 1 hora a 4°C. Algunos de ellos se utilizaron como montajes totales y se procesaron en flotación para la inmunocitoquímica, mientras que otros se seccionaron con el criostato antes de proceder a su marcaje inmunocitoquímico.

Los montajes totales de ERECs y de retinas no cultivadas se procesaron para un doble marcaje inmunocitoquímico con el anticuerpo monoclonal QH1 y el anticuerpo

policlonal anti-caspasa-3 activa. Tras la fijación, estos montajes totales se lavaron rápidamente en tampón fosfato salino (PBS 0,01M) con 0,1% de Triton X-100 (PBS-0,1%T) y se permeabilizaron en PBS con 1% de Triton-X-100 durante 4 horas a 4°C. Después se lavaron con PBS-0,1%T y se incubaron con suero normal de cabra al 10% en PBS 0,01M con 1% de BSA y 0,25% de Triton X-100 (PBS-1%BSA-0,25%T) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras incubarlos con una mezcla de los anticuerpos primarios QH1 y anti-caspasa-3 activa en PBS-1%BSA-0,25%T durante 72 horas a 4°C, se lavaron con PBS-0,1%T y se incubaron con una mezcla de los anticuerpos secundarios en PBS-1%BSA-0,25%T durante 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, los montajes totales se lavaron en PBS-0,1%T y se montaron con la parte vítrea hacia arriba sobre portas gelatinados utilizando Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL).

Otros ERECs de E9 y retinas no cultivadas se crioprotegieron mediante inmersión en PBS-0,1%T con sacarosa al 10% durante toda la noche a 4°C. A continuación, se encastraron en gelatina al 7,5% con sacarosa al 10% en PBS 0,01M-0,1%T, se congelaron en isopentano frío y se almacenaron en el congelador a -40°C hasta la confección de cortes histológicos con un criostato Leica CM1850 (Leica, Wetzlar, Germany). Los cortes de 20 µm de grosor se adhirieron sobre portas gelatinados y se utilizaron para una doble inmunocitoquímica con uno de los anticuerpos monoclonales (QH1, H5, 39.4D5 o M1B4) y el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa. El procedimiento inmunocitoquímico para las criosecciones fue similar al descrito anteriormente para los montajes totales con las siguientes diferencias: a) se omitió la permeabilización con 1% de Triton-X-100; b) las incubaciones con las mezclas de anticuerpos primarios y secundarios se hicieron durante toda la noche y durante 2,5 horas, respectivamente; y c) las criosecciones se tiñeron con Hoechst 33342 (Sigma) diluido en PBS 0,01M (10 µg/ml) durante 3 minutos con el fin de poner de manifiesto los núcleos celulares.

Los montajes totales y las criosecciones de retina inmunomarcadas se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Germany) y se obtuvieron micrografías con una cámara digital Zeiss AxioCam acoplada al microscopio.

Captación a intervalos regulares de tiempo de imágenes de células microgliales marcadas vitalmente mediante inmunofluorescencia directa

El comportamiento dinámico de las células microgliales durante su migración fue estudiado mediante el análisis de imágenes captadas a pequeños intervalos de tiempo. Para ello, las células microgliales de ERECs de E9 se marcaron vitalmente mediante inmunomarcaje directo con QH1 conjugado con Alexa Fluor 488 (QH1-A488). Previamente, se conjugó el fluorocromo Alexa Fluor 488 con el anticuerpo monoclonal QH1 después de haber purificado la inmunoglobulina a partir del sobrenadante QH1. Para purificar la inmunoglobulina, se utilizó un kit que contiene una columna HiTrap-MabTrap con Protein G Sefarosa (Healthcare Europe). Tras la purificación, la inmunoglobulina se mantuvo en agitación en una cassette de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific, Rockford, IL) de 0,5-3 ml durante 1 día a 4°C y posteriormente se concentró mediante centrifugación con un filtro para centrifuga Amicon Ultra-4 con un peso molecular límite de 10 kDa (Millipore). Seguidamente, la inmunoglobulina se conjugó con Alexa Fluor 488 utilizando un kit de marcaje de anticuerpos monoclonales (Molecular Probes) y, para eliminar la azida sódica, se mantuvo en una cassette de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific) durante 1 día a 4°C. La solución stock de QH1-A488 (0,11 µg/µl) se almacenó a -20°C en alícuotas de 5 µl.

El marcaje de células microgliales vivas con QH1-A488 se realizó mediante la adición de 2 µl de anticuerpo fluorescente sobre el explante de retina inmediatamente después de colocar éste sobre la membrana Millicell de cada pocillo, que contenía 1 ml de medio de cultivo. Tras la incubación durante 10 minutos a 37°C, QH1-A488 se unía a su antígeno específico en la membrana plasmática de las células microgliales vivas, proporcionándoles un marcaje fluorescente que permitía seguir su movimiento en el explante. Las placas de cultivo con los ERECs se llevaron a un incubador S-M (Pecon, Erbach, Germany) acoplado a la platina dotada de termostato de un microscopio de fluorescencia invertido Leica DM IRB (Leica). Los ERECs se mantuvieron en el incubador del microscopio durante diferentes tiempos, a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y un 5% de CO₂. El movimiento de las células QH1-A488-positivas se analizó mediante imágenes captadas cada 5 minutos con una cámara digital DFC300 FX (Leica) utilizando el objetivo de 40x.

Análisis cuantitativo de la densidad y morfología microgliales en las diferentes capas de la retina

La densidad y la morfología de las células microgliales se cuantificaron en la capa de fibras nerviosas (CFN), donde la microglía migra tangencialmente, y las capas plexiformes interna (CPI) y externa (CPE), donde se ramifican. También se determinó el índice de elongación de las células microgliales no ramificadas de la CFN. Dicho índice es un parámetro morfológico cuya fórmula es $[\text{longitud del eje mayor en } \mu\text{m}]/[\text{longitud del eje menor en } \mu\text{m}]$. Igualmente, se determinó el índice de transformación de las células microgliales ramificadas presentes en la CPI y CPE. Este índice es un parámetro previamente usado para evaluar la ramificación de las células microgliales *in vitro* (Fujita et al., 1996), que se calcula mediante la fórmula $[\text{perímetro celular en } \mu\text{m}]^2/[4\pi \times \text{área celular en } \mu\text{m}^2]$. Con la ayuda del programa de procesamiento de imágenes Image Tool 2.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas) y a partir de imágenes de campos microscópicos de 60.000 μm^2 de área, se estimaron los valores medios de densidad celular, índice de elongación e índice de transformación de las células microgliales presentes en las citadas capas de ERECs de E9 incubados *in vitro* durante diferentes tiempos y de retinas *in situ* de edades equivalentes. Para determinar el grado de significación de las diferencias observadas entre ERECs y retinas *in situ* se aplicó el test estadístico de la t de Student.

RESULTADOS

Puesta a punto de ERECs para conseguir la ramificación de las células microgliales

Se probaron diferentes medios de cultivo y ERECs de distintas edades embrionarias con el fin de establecer las mejores condiciones experimentales para conseguir que las células microgliales migraran y se ramificaran en los ERECs cultivados. La primera edad embrionaria utilizada fue E9 porque, en esta edad, el área central de la retina está ocupada por células microgliales que migran tangencialmente sobre la superficie vítrea de la retina y que están iniciando su migración radial hacia las capas plexiformes, donde adoptarán un fenotipo ramificado (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995). Cuando los explantes de retina E9 se cultivaban durante 3 div (E9+3div) en BME+25%SC, las células microgliales llegaban a ramificarse en el explante (Fig. 1A), mostrando el mismo comportamiento que en la retina *in situ*. La sustitución parcial del SC por SP en el medio de cultivo producía un llamativo cambio en las características morfológicas de las células microgliales, las cuales mostraban un fenotipo redondeado con prolongaciones cortas y delgadas (Fig. 1B). La sustitución completa del SC por SP afectaba en mayor medida a las células microgliales, las cuales se hacían más redondas, mostraban un citoplasma muy vacuolizado y no emitían prolongaciones (Fig. 1C). En ERECs de E9+3div, la sustitución del SC por un suplemento que contiene ITS y BSA generaba una cierta ramificación en las células microgliales (Fig. 1D), aunque sus cuerpos celulares eran más grandes y redondos que los mostrados en ERECs de E9+3div cultivados en BME+25%SC (comparar Fig. 1D con Fig. 1A). Finalmente, las células microgliales en ERECs de E9+3div cultivados con NB suplementado con B27 (Fig. 1E) o con N2 (Fig. 1F) tenían un fenotipo más o menos ramificado. Las células microgliales en ambos medios mostraban cuerpos celulares grandes e irregulares con prolongaciones de longitud y grosor variable, muy diferentes de las que presentan las células en retinas *in situ*. Por lo tanto, estos resultados mostraban que BME+25%SC es el mejor medio de cultivo para que las células microgliales de los ERECs de E9+3div conserven una morfología similar a la que tienen en la retina *in situ*.

Se probaron también cultivos de explantes de retinas de otras edades embrionarias (Fig. 2). A diferencia de la apariencia ramificada que tenían las células

microgliales en ERECs de E9+3div, éstas presentaban cierto grado de redondeamiento en ERECs de retinas de E12 o E14. De hecho, en ERECs de E12+3div (Fig. 2B) y E14+3div (Fig. 2C), las células microgliales mostraban un cuerpo celular voluminoso con prolongaciones cortas y delgadas. Teniendo en cuenta estos resultados, los explantes de E12 y E14 no se utilizaron en el presente estudio. Los ERECs de E10 mostraban resultados similares a los ERECs de E9, excepto que el número de células microgliales presentes en los explantes era considerablemente mayor (no mostrado).

Fig. 1. Influencia del medio de cultivo sobre la morfología de las células microgliales de explantes de retina. Morfología de las células microgliales QH1-positivas en el borde vítreo de la capa plexiforme interna de explantes de retina de embrión de codorniz de E9 después de incubarlos durante 3 div en medio basal de Eagle con sales de Earle (BME, **A-D**) o en medio neurobasal (NB) suplementado con diferentes componentes (**E** y **F**). Las células microgliales muestran un aspecto ramificado similar al fisiológico tras la incubación de los explantes de retina en BME suplementado con 25 % de suero de caballo (BME+25%SC, **A**). Sin embargo, muestran un fenotipo redondeado después de incubar los explantes en BME suplementado con 15% de suero de caballo y 10 % de suero de pollo (BME+15%SC+10%SP, **B**) o con 25% de suero de pollo (BME+25%SP, **C**). Las células microgliales también muestran un fenotipo ramificado en explantes de retina incubados en BME suplementado con una mezcla de insulina, transferrina y selenito sódico (BME+ITS, **D**); no obstante, este fenotipo es diferente al observado en retinas *in situ*. Después de incubar los explantes en NB suplementado con B27 (NB+B27, **E**) o con N2 (NB+N2, **F**), las células microgliales tienen un fenotipo ramificado pero su aspecto no es como el fisiológico. Barra de escala: 100 μ m.

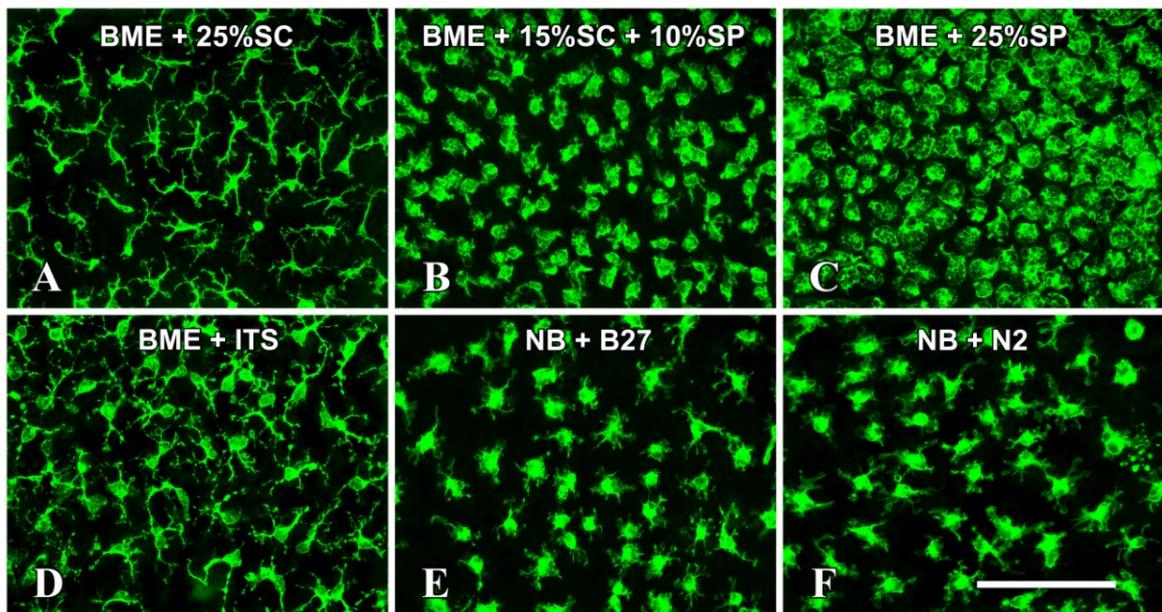
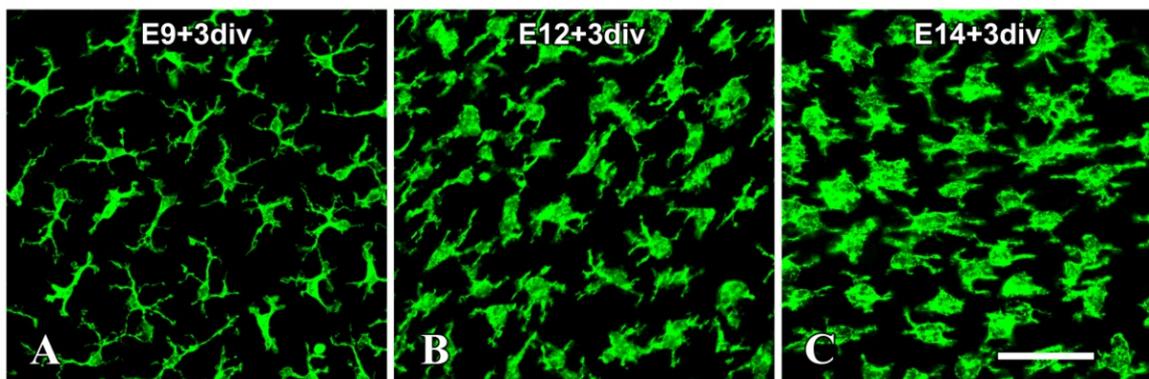


Fig. 2. Influencia de la edad embrionaria de los explantes de retina sobre la morfología de las células microgliales. Morfología de las células microgliales QH1-positivas en el borde vítreo de la capa plexiforme interna de explantes de retinas de diferentes edades embrionarias después de incubarlos 3 div en medio basal de Eagle con sales de Earle, suplementado con 25% de suero de caballo. Las células microgliales muestran un fenotipo ramificado similar al fisiológico en un explante de retina de E9 (**A**) que contrasta con la apariencia ameboide parcialmente ramificada de las células microgliales en explantes de retinas de E12 (**B**) y E14 (**C**). Barra de escala: 50 μ m.



La microglía ameboide migra tangencialmente en ERECs de E9 durante las primeras 24 hiv

Las observaciones llevadas a cabo en explantes de retina central de E9 no cultivados revelaban la presencia de abundantes células microgliales ameboides QH1-positivas distribuidas sobre la superficie vítrea de la retina (Fig. 3A, B), las cuales mostraban un cuerpo celular alargado que emite prolongaciones polarizadas de las que surgen amplios lamelipodios. Estos caracteres morfológicos corresponden al fenotipo típico de las células microgliales que se encuentran migrando tangencialmente en la retina *in situ*, previamente descrito por nuestro grupo (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995). En ERECs de E9+6hiv y E9+24hiv, las células microgliales QH1-positivas no mostraban signos de redondeamiento y mantenían su fenotipo migratorio (Fig. 3C-F), sugiriendo que conservaban su actividad migratoria sobre la superficie vítrea de los ERECs durante las primeras 24 hiv, de manera similar a lo observado en la retina embrionaria *in situ* entre E9 y E10.

Para probar de manera inequívoca que las células microgliales en ERECs de E9 no sólo mostraban el fenotipo típico de células que migran durante las primeras 24hiv sino que realmente estaban avanzando sobre la superficie vítrea de los explantes de retina cultivados, estudiamos la dinámica del movimiento microglial mediante el examen de imágenes fluorescentes captadas a sucesivos intervalos de tiempo en ERECs inmunomarcados vitalmente con QH1-A488 y cultivados hasta 24 hiv en una cabina de cultivo acoplada a una platina calefactora de un microscopio de fluorescencia invertido. Las células microgliales sufrían cambios cíclicos en su morfología durante su migración *in vitro* (Fig. 4). Primero extendían un lamelipodio, que podía emitirse en el extremo de una corta prolongación, en el borde delantero del cuerpo celular. Seguidamente translocaban el soma hacia delante y finalmente retraían la porción trasera del soma dejando una prolongación trasera muy delgada. Las células microgliales también extendían lamelipodios en regiones de su superficie diferentes del borde delantero, pero los retraían rápidamente y no los utilizaban para migrar. Aunque la mayoría de las células microgliales migraban a través de rutas más o menos paralelas (coincidentes con el curso de los axones de las células ganglionares), no todas migraban en la misma dirección, observándose la presencia en todos los ERECs de células que se movían hacia delante, hacia atrás y lateralmente (no mostrado) como también ocurre en la retina *in situ* (Marín-Teva et al., 1998). Estos resultados sugieren que en ERECs de E9 durante

las primeras 24 hiv, el comportamiento migratorio de las células microgliales coincide con el inferido a partir de imágenes estáticas de retinas embrionarias de codorniz *in situ* (Marín-Teva et al., 1998).

La migración tangencial de la microglía tiene lugar en la porción vítrea de la retina embrionaria de codorniz durante un periodo de apoptosis fisiológica en la capa de células ganglionares (CCG) y en la capa nuclear interna (CNI; Marín-Teva et al., 1999). En los ERECs de E9 sometidos a inmunomarcaje con el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3-activa, se detectaron células apoptóticas en ambas capas de la retina embrionaria de codorniz (Fig. 5). En los explantes no cultivados, las neuronas positivas para anti-caspasa-3-activa se localizaban principalmente en la CCG y en el borde vítreo de la CNI, mientras que las células microgliales QH1-positivas se encontraban migrando en la CFN y sobre la superficie vítrea de la retina (Fig. 5A, B). Tras 24 hiv, se detectaba un aumento en el número de células microgliales migrantes (Fig. 5C), mientras que en la CCG y en la región vitreal de la CNI se seguían observando células apoptóticas (Fig. 5C, D). El número de células apoptóticas en la CCG de ERECs de E9+24hiv (Fig. 5C, D) era claramente mayor que el observado en la CCG de explantes de retina embrionaria de E10 no cultivados (Fig. 5E, F), probablemente como respuesta a la axotomía de las células ganglionares durante el aislamiento de los explantes. Sin embargo, la elevada densidad de células ganglionares apoptóticas no parecía afectar al comportamiento migratorio de las células microgliales.

Fig. 3. Las células microgliales migran en explantes de retina embrionaria de E9 de manera similar a como lo hacen en la retina *in situ* de edad equivalente. Células microgliales migrando en la capa de fibras nerviosas de explantes inmunomarcados con QH1 de retinas embrionarias fijadas a las 0 hiv (E9+0hiv, **A, B**) o después del cultivo en medio basal de Eagle con sales de Earle, suplementado con 25% de suero de caballo durante 6 hiv (E9+6hiv, **C, D**) y 24 hiv (E9+24hiv, **E, F**). Las áreas enmarcadas en **A, C, y E** se observan a mayor aumento en **B, D, y F**, respectivamente. Obsérvese que las células microgliales QH1-positivas en explantes cultivados (**C-F**) mantienen el fenotipo elongado, con lamelipodios emergiendo de prolongaciones polarizadas, similar al que muestran las células que migran tangencialmente en explantes no cultivados (**A, B**). Barra de escala: 200 μm para **A, C y E**; 52 μm para **B, D y F**.

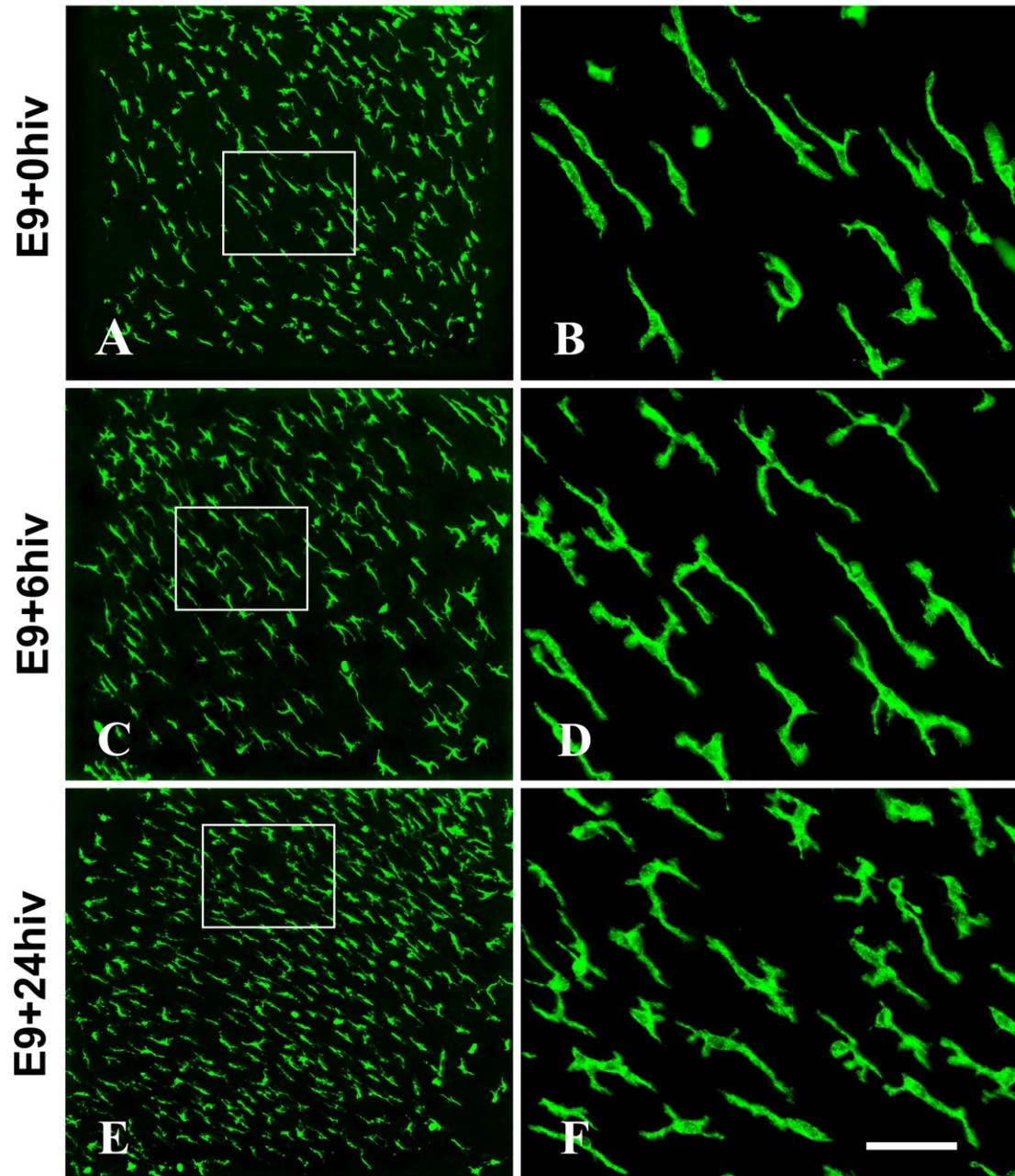


Fig. 4. Dinámica del movimiento de dos células microgliales inmunomarcadas con QH1 (célula 1 y célula 2) en un cultivo organotípico de retina embrionaria de E9. Al comienzo de la incubación del explante de retina en una cámara de cultivo acoplada a la platina calefactora del microscopio invertido, se añadió QH1 conjugado con Alexa-Fluor 488 al medio de cultivo. Los cuerpos de las células microgliales muestran un fuerte marcaje fluorescente mientras que las prolongaciones celulares y los lamelipodios se marcan más débilmente. Tras 6 horas de incubación *in vitro*, se tomaron micrografías en lapsos de tiempo de 5 minutos (0-40 min). Las células 1 y 2 se mueven en direcciones opuestas: la célula 1 se mueve hacia arriba del campo de la micrografía, mientras que la célula 2 lo hace hacia abajo y abandona el campo a partir de los 30 minutos. La célula 1 se mueve extendiendo un lamelipodio (flechas finas) en el borde delantero de su soma, el cual se transloca a continuación, simultáneamente con la retracción de la parte trasera de la célula (flechas gruesas). Ambas células extienden lamelipodios transitorios en regiones distintas al frente de avance (cabezas de flecha en célula 1 a los 15 minutos y en la célula 2 a los 5 minutos), los cuales se retraen rápidamente. Estos lamelipodios transitorios pueden contactar con la superficie de células vecinas, contribuyendo a redirigir el movimiento celular (ver células 1 y 2 en el tiempo de 5 minutos). Barra de escala: 40 μm .

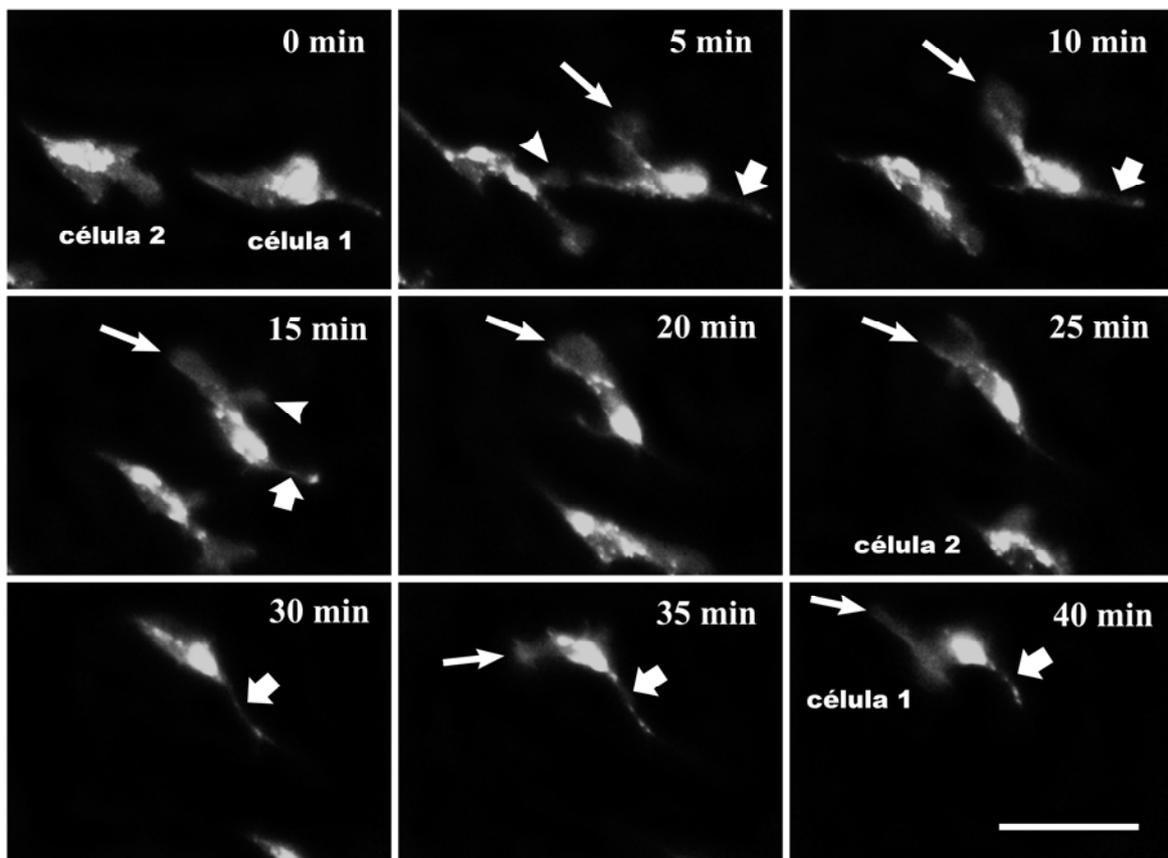
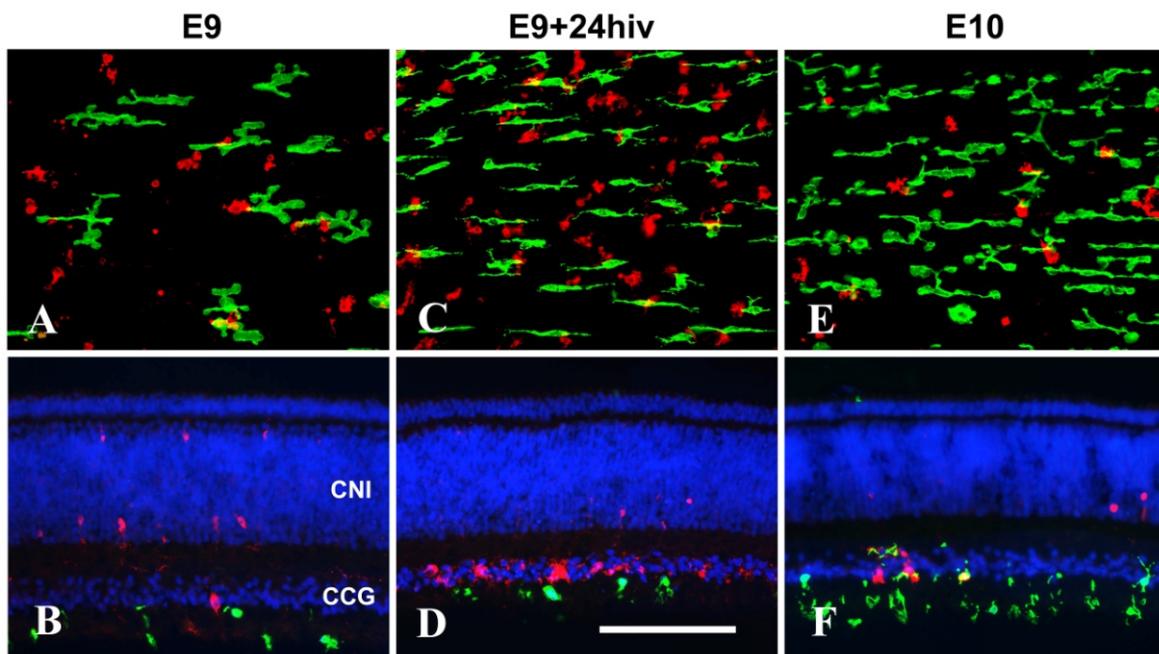


Fig. 5. Las células microgliales migran normalmente en explantes de retina embrionaria de E9 a pesar del incremento en la densidad de células apoptóticas. Distribución de células microgliales migrantes (verde) y neuronas apoptóticas (rojo) en explantes no cultivados de retina embrionaria de codorniz de E9 (**A** y **B**), en explantes de retina de E9 tras 24 horas de incubación *in vitro* (E9+24hiv, **C** y **D**) y en explantes no cultivados de retina de E10 (edad equivalente a E9+24hiv, **E** y **F**). Las células microgliales se inmunomarcaron con el anticuerpo monoclonal QH1 y las neuronas apoptóticas con el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3-activa en montajes totales (**A**, **C** y **E**) y en secciones histológicas transversales (**B**, **D** y **F**) de explantes de retina. Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst 33342 (azul) en las secciones histológicas (**B**, **D** y **F**). Se observan células microgliales que migran en la superficie vítrea, mientras que numerosas neuronas apoptóticas positivas para anti-caspasa-3-activa están presentes en la capa de células ganglionares (CCG) y, en menor grado, en la capa nuclear interna (CNI) de explantes de retina de E9+24hiv (**C** y **D**), igual que ocurre en explantes no cultivados de retina de E9 (**A** y **B**) y E10 (**E** y **F**). A pesar de que las neuronas apoptóticas de la CCG son más numerosas en los explantes de retina de E9+24hiv que en las retinas de E10 no cultivadas (comparar **C** y **D** con **E** y **F**, respectivamente), no se detectan aparentes alteraciones en el comportamiento migratorio de las células microgliales. Barra de escala: 100 μm .



Migración radial y ramificación de las células microgliales en ERECs de E9 durante la primera semana *in vitro*

Entre 24 hiv y 2 div, las células microgliales perdían progresivamente su fenotipo elongado y polarizado. En ERECs de E9+2div, estas células mostraban un soma ligeramente más grande que emitía múltiples prolongaciones cortas en todas direcciones (Fig. 6A). Observaciones en secciones transversales de ERECS de E9+2div (no mostradas) ponían de manifiesto que la microglía no sólo se localizaba en la CFN, como ocurría durante las primeras 24 hiv, sino que también estaba presente en la CCG. Estas observaciones sugerían que las células microgliales en ERECs de E9+2div estaban comenzando a migrar radialmente desde la superficie vítrea hacia capas más esclerales de la retina.

Secciones transversales de ERECs de E9+3div (Fig. 6B) mostraban que las células microgliales estaban presentes en la CFN y CCG, así como en el borde vítreo de la capa plexiforme interna (v-CPI) y en regiones intermedias de esta capa (i-CPI), confirmando la existencia de migración radial de las células microgliales en los ERECs. El análisis de diferentes planos focales de montajes totales de ERECs de E9+3div mostraba que el soma de muchas células microgliales QH1-positivas se localizaba entre la CFN y la CCG (flechas en Fig. 6C), emitiendo una delgada prolongación radial delantero que se ramificaba en v-CPI o en i-CPI (flechas en Fig. 6C'). Otras células QH1-positivas se localizaban íntegramente en la CPI, incluyendo tanto el soma como las prolongaciones delgadas (cabezas de flecha en Fig. 6C'). Estas observaciones eran compatibles con la existencia de migración radial de las células microgliales en los ERECs por un mecanismo similar al descrito previamente en la retina embrionaria de codorniz *in situ* (Sánchez-López et al., 2004).

En ERECs de E9+5div, las células microgliales QH1-positivas se localizaban principalmente en la CCG, v-CPI e i-CPI, y algunas de ellas habían alcanzado el borde escleral de la CPI (e-CPI, Fig. 7A), de forma similar a lo observado en la retina *in situ* de embriones de codorniz de E14 (Marín-Teva et al., 1999), edad del desarrollo equivalente a E9+5div. La distribución de células microgliales en diferentes niveles de profundidad de los explantes era evidente tras el análisis de montajes totales de los mismos enfocados en diferentes planos (Fig. 7B-B''). Así, algunas células QH1-positivas se localizaban entre la CCG y v-CPI (flechas finas en Fig. 7B) mientras que otras se observaban en i-CPI (cabezas de flecha en Fig. 7B') o en e-CPI (flechas gruesas

en Fig. 7B''). En cualquiera de estos tres niveles, las células microgliales presentaban un fenotipo más o menos ramificado, indicando que su diferenciación estaba teniendo lugar en la CPI de ERECs de E9+5div.

Después de 7 div, el tejido se había extendido ligeramente en el borde de los explantes de retina, dando lugar a la aparición de una estrecha área marginal por fuera de los límites del explante original, en la cual se distribuían irregularmente células QH1-positivas (Fig. 8A, A'). Las células microgliales en el área original del explante se distribuían en el espesor de la retina siguiendo un patrón similar al observado en retinas *in situ* de edad equivalente. Así, el examen de diferentes planos focales en montajes totales de ERECs de E9+7div revelaba la presencia de microglía con fenotipo ramificado en la CCG/v-CPI (Fig. 8B), e-CPI (Fig. 8B') y CPE (Fig. 8B''). Las observaciones en secciones transversales de ERECs de E9+7div (Fig. 8C) confirmaban este patrón de distribución de la microglía. La presencia de células microgliales con ramificación incipiente en la CPE sugería que algunas de ellas habían migrado radialmente desde la CPI hasta la CPE después de atravesar la CNI, reproduciendo el comportamiento observado en la retina *in situ* de embriones de codorniz de E16 (Marín-Teva et al., 1999), edad equivalente a E9+7div. Además, unas pocas células QH1-positivas no ramificadas comenzaban a observarse en la superficie escleral del explante (Fig. 8A, asteriscos), por encima de la capa nuclear externa (CNE, Fig. 8C). Aparentemente, dichas células QH1-positivas colonizaban la superficie escleral de los ERECs migrando desde el área marginal alrededor del límite original del explante. Esta situación no es fisiológica, ya que no existen células QH1-positivas en la superficie escleral de retinas *in situ* de E16.

Fig. 6. Comienzo de la migración radial y ramificación de la microglía en explantes de retina a los 3 días de incubación *in vitro*. Distribución de células microgliales inmunomarcadas con QH1 (verde) en explantes de retina de embriones de codorniz de E9 después de su incubación durante 2 div (E9+2div, **A**) y 3 div (E9+3div, **B**, **C**, **C'**), que muestran el inicio de la migración radial. **A:** Montajes totales de explantes de retina de E9+2div mostrando células microgliales en el límite entre la capa de fibras nerviosas y la capa de células ganglionares (CFN-CCG), con prolongaciones que irradian desde el soma en varias direcciones, sugiriendo que estas células han detenido su migración tangencial. **B:** Secciones transversales de explantes de retina de E9+3div mostrando cómo algunas células microgliales (cabezas de flecha) han alcanzado la parte vítrea de la capa plexiforme interna (CPI). La capa de células ganglionares (CCG) y la capa nuclear interna (CNI) se distinguen por el marcaje de los núcleos celulares con Hoechst 33342 (azul). **C** y **C':** Campo microscópico del montaje total de un explante de retina de E9+3div enfocado en el límite CFN-CCG y en la parte vítrea de la CPI (v-CPI), respectivamente. Algunas células microgliales tienen su soma en la interfase CFN-CCG (flechas en **C**) y emiten prolongaciones con una ramificación incipiente en v-CPI (flechas en **C'**), lo cual es típico de células microgliales en proceso de migración radial. Otras células microgliales pobremente ramificadas se localizan íntegramente en v-CPI (cabezas de flecha en **C'**). Barra de escala: 100 μm para **A**, **C** y **C'**; 105 μm para **B**.

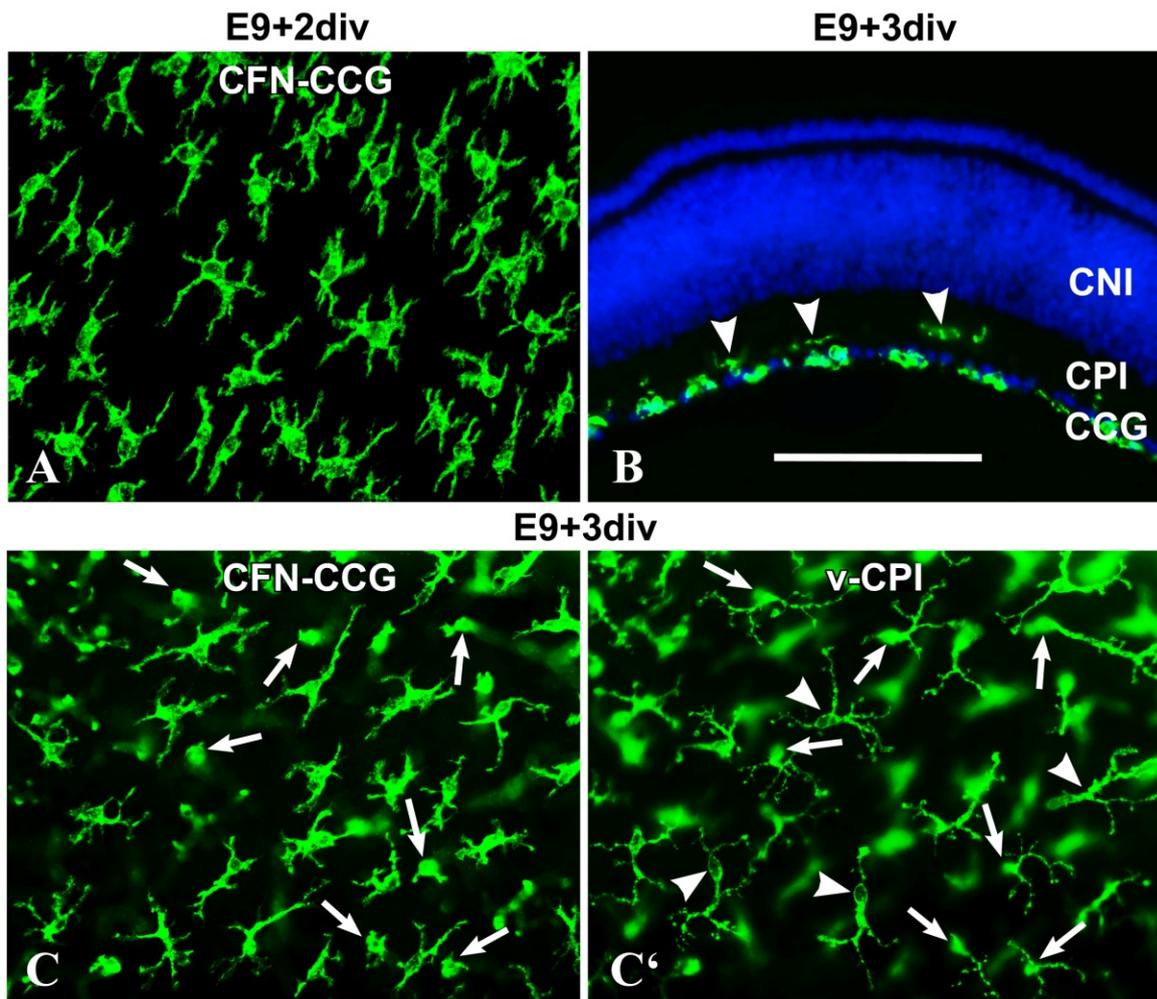


Fig. 7. Ramificación de la microglía en la capa plexiforme interna de explantes de retina de E9 a los 5 días de incubación *in vitro*. Las células microgliales inmunomarcadas con QH1 (verde) se distribuyen en la capa de células ganglionares (CCG) y en la parte vítrea (v-CPI), intermedia (i-CPI) y escleral (e-CPI) de la capa plexiforme interna de explantes de retina embrionaria de codorniz de E9 tras 5 div (E9+5div). **A:** Sección transversal de un explante de retina de E9+5div mostrando una célula microglial ramificada horizontalmente (flecha gruesa) en e-CPI. Otras células microgliales ramificadas (flechas finas) se observan en el límite entre la CCG y v-CPI (CCG+v-CPI). La CCG y la capa nuclear interna (CNI) se distinguen por el marcaje de los núcleos celulares con Hoechst 33342 (azul). **B-B'':** Campo microscópico del montaje total de un explante de retina de E9+5div enfocado en tres niveles diferentes del espesor de la retina (**B** enfocado en CCG+v-CPI, **B'** en i-CPI y **B''** en e-CPI). Las células microgliales muestran una ramificación incipiente, con prolongaciones gruesas en CCG+v-CPI (flechas finas en **B**) y más delgadas en i-CPI (cabezas de flecha en **B'**) y en e-CPI (flechas gruesas en **B''**). Barra de escala: 90 μm para **A**; 100 μm para **B-B''**.

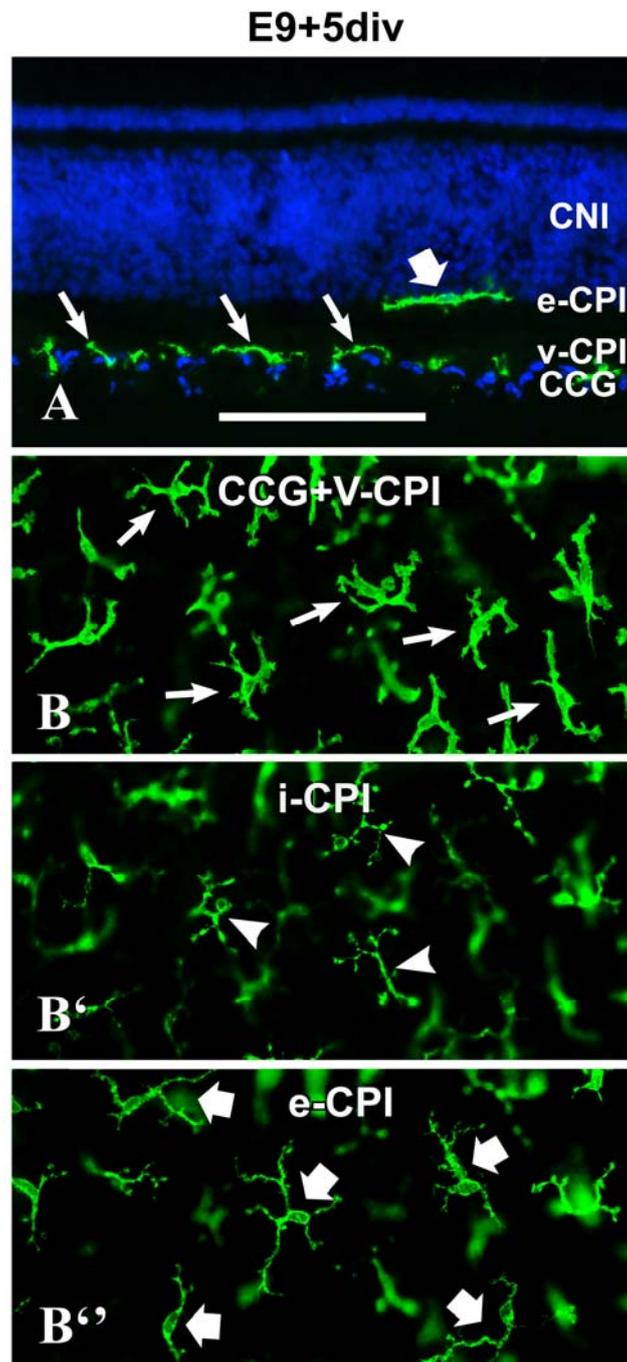
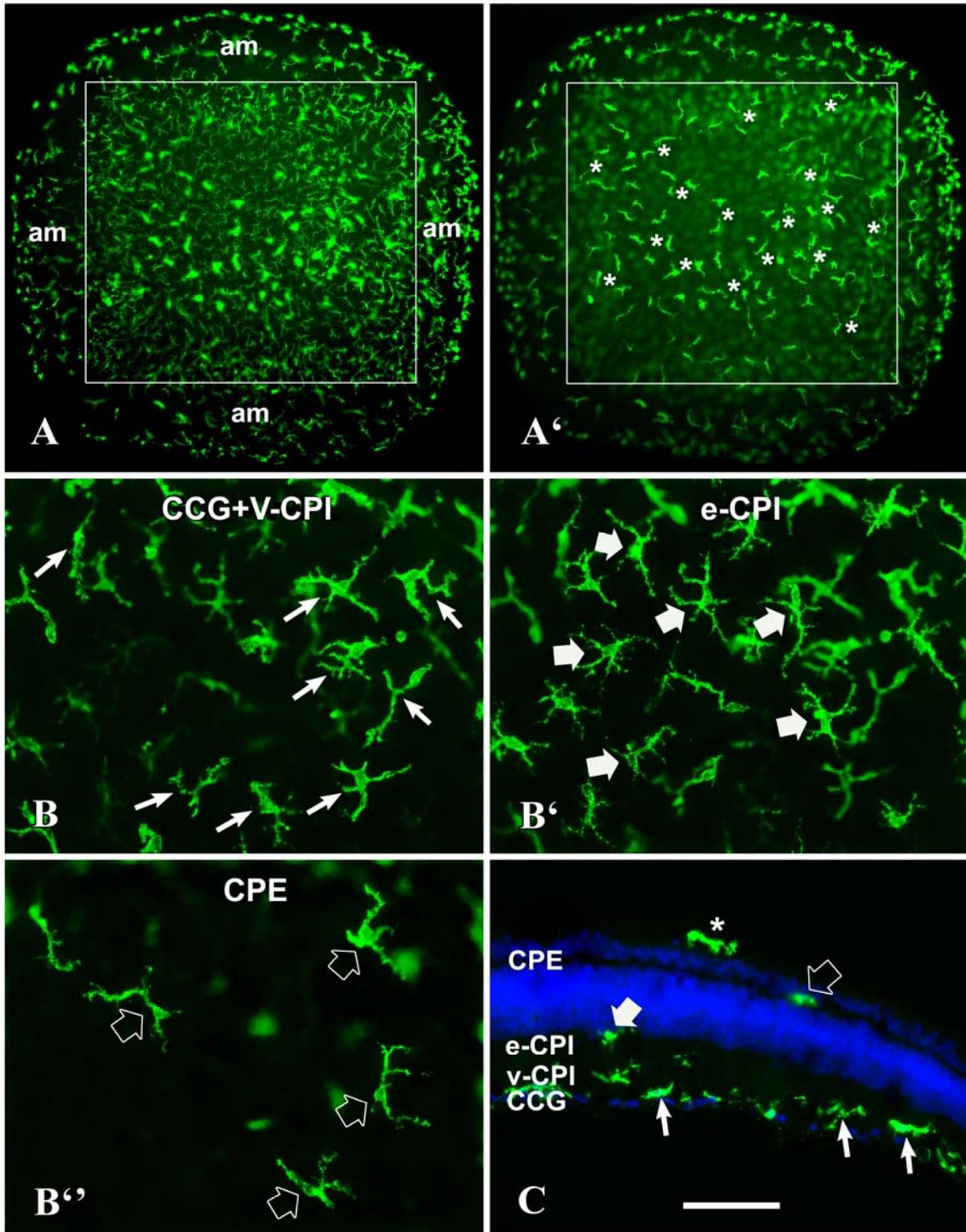


Fig. 8. Distribución de células QH1-positivas en explantes de retina de E9 a los 7 días de incubación *in vitro*. Las células inmunomarcadas con QH1 (verde) en explantes de retina embrionaria de codorniz de E9 tras 7 div (E9+7div) corresponden a células ameboides localizadas en la superficie escleral de los explantes y a microglía ramificada distribuida en las capas plexiformes interna (CPI) y externa (CPE). **A-A'**: Bajo aumento de un montaje total de un explante de retina de E9+7div enfocado dentro del espesor de la retina (**A**) y sobre la superficie escleral del explante (**A'**). El cuadrado delimitado por líneas blancas representa el límite original del explante de retina, el cual se ha extendido tras la incubación dando lugar a la aparición de un área marginal (am) alrededor de la superficie original, donde las células microgliales QH1-positivas se distribuyen de modo irregular. En la superficie escleral del explante se observan numerosas células ameboides QH1-positivas que extienden prolongaciones gruesas y cortas (asteriscos en **A'**). **B-B''**: Campo microscópico de un montaje total de un explante de retina de E9+7div enfocado en tres niveles diferentes del espesor de la retina que coinciden con la capa de células ganglionares y borde vítreo de la CPI (CCG+v-CPI, **B**), el borde escleral de la CPI (e-CPI, **B'**) y la CPE (**B''**). Se observan células microgliales ramificadas en CCG+v-CPI (flechas finas en **B**), e-CPI (flechas gruesas y sólidas en **B'**) y CPE (flechas gruesas y huecas en **B''**). **C**: Sección transversal de un explante de retina de E9+7div mostrando células microgliales QH1-positivas en diferentes niveles del espesor de la retina que corresponden a CCG-v-CPI (flechas finas), e-CPI (flecha gruesa y sólida) y CPE (flecha gruesa y hueca). La sección se marcó con Hoechst 33342 (azul) para distinguir los núcleos celulares en la CCG y las capas nucleares. Una célula QH1-positiva (asterisco) se observa en la superficie escleral del explante justo por encima de la capa nuclear externa. Barra de escala: 300 μm para **A** y **A'**; 55 μm para **B-B''**; 70 μm para **C**.

E9+7div



Análisis comparativo de la densidad y morfología microgliales entre ERECs y retinas *in situ* de edades equivalentes

La densidad de células microgliales en la CPI y CPE no difería significativamente en ERECs de E9+7div y retinas *in situ* de E16 (Fig. 9), revelando que en ambos sistemas la colonización de las capas plexiformes mediante migración radial era similar. Sin embargo, la comparación de la densidad microglial en la CFN/CCG y CPI de ERECs de E9+1div y E9+3div con las mismas capas de retinas *in situ* de E10 y E12, respectivamente (Fig. 9), sugería que la migración radial de la microglía estaba ligeramente retrasada en ERECs con respecto a las retinas *in situ*. De hecho, la densidad microglial en la CFN/CCG era significativamente menor en ERECs de E9+1div que en retinas *in situ* de E10 (Fig. 9), lo que podría explicarse por el hecho de que la entrada de células microgliales desde la cabeza del nervio óptico/base del pecten, que tiene lugar en la retina *in situ*, está ausente en los ERECs. En contraste, la densidad de células microgliales en la CFN/CCG era significativamente mayor en ERECs de E9+3div que en retinas *in situ* de E12 (Fig. 9), probablemente debido a que la proliferación celular se vería incrementada en los ERECs con respecto a las retinas *in situ* y a que las células microgliales irían abandonando la CFN mediante migración radial más lentamente en los ERECs que en las retinas *in situ*. En apoyo de esta hipótesis, la densidad microglial en la CPI de ERECs de E9+3div era significativamente menor que en la misma capa de retinas *in situ* de E12 (Fig. 9).

El análisis del índice de elongación en la CFN/CCG, un parámetro morfológico relacionado con la actividad migratoria tangencial de las células microgliales, revelaba diferencias significativas entre ERECs de E9+1div y retinas *in situ* de E10, pero no entre ERECS de E9+7div y retinas *in situ* de E16 (Fig. 10A). De acuerdo con estos hallazgos, la migración tangencial de las células microgliales en la parte vítrea de los explantes de retina se vería afectada transitoriamente al inicio de la incubación *in vitro*, recuperando la normalidad posteriormente.

Teniendo en cuenta que, tanto en ERECs como en retinas *in situ*, las capas plexiformes solo contenían microglía ramificada, se analizó el índice de transformación de las células microgliales en dichas capas, ya que este índice es directamente proporcional al grado de ramificación celular (Fujita et al., 1996). En la CPI, el índice de transformación no difería significativamente entre ERECs de E9+3div y retinas *in situ* de E12, pero era significativamente menor en ERECs de E9+7div que en retinas *in*

situ de E16 (Fig. 10A). Por lo tanto, la ramificación de las células microgliales en las etapas iniciales de su diferenciación era similar en ERECs y en retinas *in situ* (comparar B con C en la Fig. 10), pero el grado de ramificación al final de la diferenciación era mayor en retinas *in situ* que en ERECs (comparar D con E en Fig. 10). Resultados similares se encontraron en la CPE (Fig. 10A).

Fig. 9. Comparación de la densidad de células microgliales entre explantes de retina embrionaria cultivados *in vitro* y retinas *in situ* de edades equivalentes. Densidades de células microgliales en la capa de fibras nerviosas-capa de células ganglionares (CFN/CCG), capa plexiforme interna (CPI) y capa plexiforme externa (CPE) de explantes de retina de embriones de codorniz de E9 (ERECs) incubados durante 1, 3 y 7 días *in vitro* (1div, 3div, 7div) y de retinas *in situ* de edades embrionarias equivalentes (E10, E12, E16). Los datos se presentan como medias (\pm error standard) del número de células microgliales (NC) obtenidas a partir de recuentos en diez campos microscópicos de $60.000 \mu\text{m}^2$ (CM) de las respectivas capas de los explantes cultivados o de retinas *in situ*. Las barras negras y vacías corresponden a los valores obtenidos en ERECs y en retinas *in situ*, respectivamente. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En la CFN/CCG, las densidades celulares encontradas en ERECs de los tres tiempos *in vitro* son significativamente diferentes de las halladas en retinas *in situ* de edades equivalentes. Es de destacar que la densidad celular de la CFN/CCG en los ERECs incubados durante 3 div es significativamente mayor que en retinas *in situ* de E12, mientras que la densidad de la CPI es significativamente menor en los ERECs que en las retinas *in situ*. En los ERECs incubados durante 7 div, las densidades microgliales de la CPI y CPE no muestran diferencias con las obtenidas en retinas *in situ* E16.

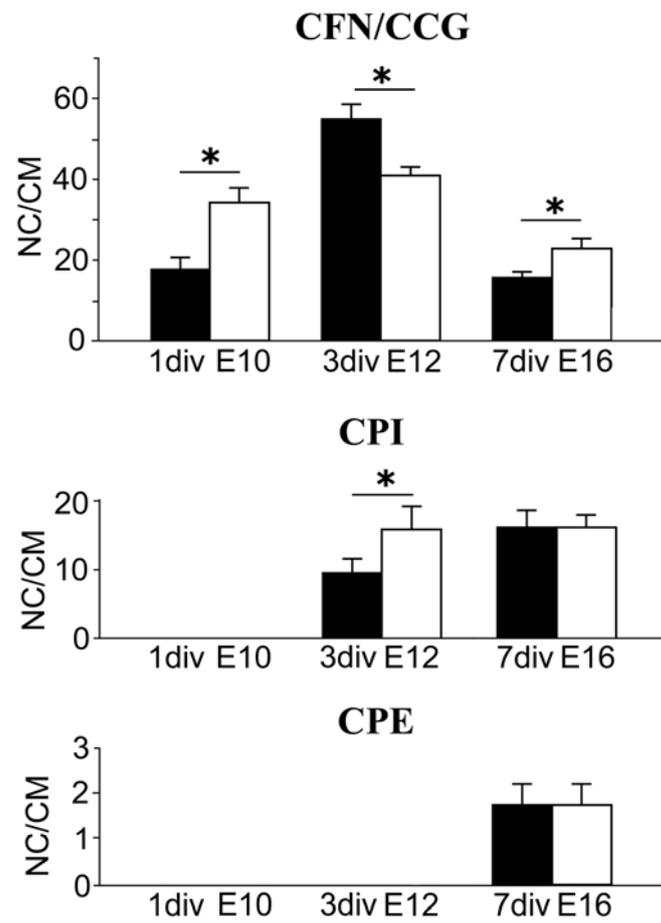
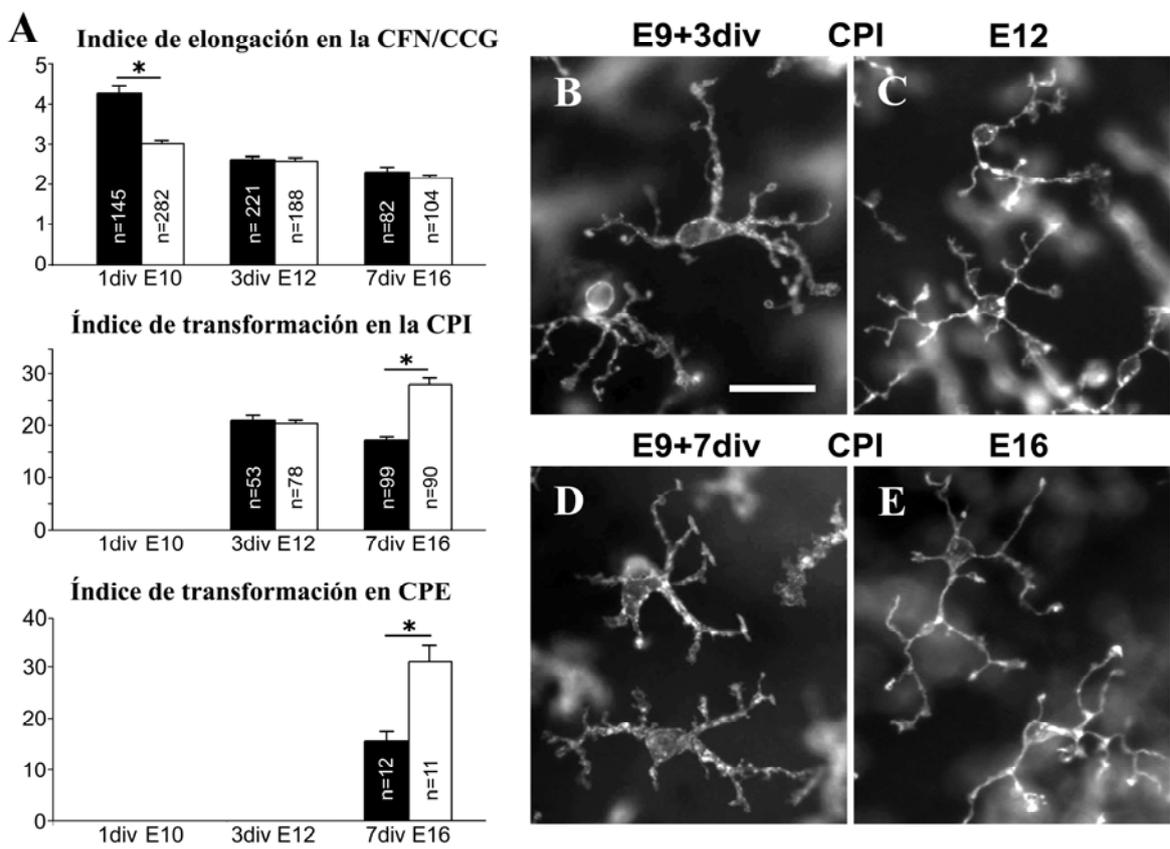


Fig. 10. Comparación morfométrica del fenotipo de las células microgliales entre explantes de retina cultivados *in vitro* y retinas *in situ* de edades equivalentes. A: Índice de elongación de las células microgliales en la capa de fibras nerviosas-capas de células ganglionares (CFN/CCG) e índice de transformación de dichas células en las capas plexiformes interna (CPI) y externa (CPE) de explantes de retina de embriones de codorniz de E9 (ERECs) incubados durante 1, 3 y 7 días *in vitro* (1div, 3div, 7div) y de retinas *in situ* de edades embrionarias equivalentes (E10, E12, E16). Los datos se presentan como medias (\pm error standard) de los valores obtenidos a partir del análisis del número de células microgliales mostrado en cada barra (n), efectuado en ERECs o retinas *in situ* procedentes de, al menos, tres embriones diferentes. Las barras negras y vacías corresponden a los valores obtenidos en ERECs y en retinas *in situ*, respectivamente. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El índice de elongación de las células microgliales en la CFN/CCG es significativamente mayor en ERECs de E9+1div que en retinas *in situ* de E10, pero no existen diferencias significativas entre ERECs de E9 cultivados *in vitro* durante más tiempo y retinas *in situ* de edades equivalentes. Los índices de transformación de la microglía en la CPI y CPE de ERECs de E9+7div son significativamente menores que los obtenidos en las mismas capas de retinas *in situ* de E16, pero el índice de transformación de la CPI no muestra diferencias significativas entre ERECs de E9+3div y retinas *in situ* de E12. **B-E:** Comparación de las características morfológicas de la microglía ramificada en la CPI de ERECs de E9+3div y E9+7div con las observadas en la misma capa de retinas *in situ* de edades equivalentes. Las células microgliales tienen una ramificación parecida en ERECs de E9+3div (**B**) y en retinas *in situ* de E12 (**C**), pero muestran menor grado de ramificación en ERECs de E9+7div (**D**) que en retinas *in situ* de E16 (**E**). Barra de escala: 20 μ m.



Cambios en la citoarquitectura de la retina en los explantes cultivados durante la primera semana *in vitro*

Con el fin de comprobar si la citoarquitectura retiniana se mantenía intacta en los explantes cultivados *in vitro*, ésta fue analizada en secciones transversales de ERECs de E9 cultivados desde 24 hiv hasta 7 div, las cuales eran teñidas con Hoechst e inmunomarcadas con diferentes anticuerpos específicos frente a distintos componentes de la retina.

El doble marcaje con Hoechst y el anticuerpo monoclonal H5, que reconoce la vimentina presente en las células de Müller, revelaba que tanto las capas retinianas como el armazón de células de Müller vimentina-positivas de los ERECs de E9 cultivados entre 24 hiv y 7 div (Fig. 11) mantenían una organización semejante a la mostrada en retinas *in situ* de edades equivalentes. Así, las células de Müller formaban una densa red de prolongaciones vimentina-positivas orientadas radialmente a través de todo el espesor de la retina (Fig. 11A-D), que era similar a la observada en retinas *in situ* (no mostrada). La única diferencia entre el armazón de las células de Müller en ERECs y en retinas *in situ* se observaba entre 2-3 div, cuando se detectaba un aumento del marcaje de vimentina en la parte vítrea de este armazón (asteriscos en Fig. 11B), probablemente como consecuencia de una reacción de las células de Müller a la axotomía de las células ganglionares durante la disección del explante de retina. Los espesores de la CNI y la CNE no mostraban cambios significativos entre 24 hiv y 7 div (Fig. 11A'-D'). Sin embargo, los de la CCG y la CFN disminuían progresivamente durante la primera semana de cultivo *in vitro* (Fig. 11A'-D'), probablemente como resultado del incremento de la muerte celular en la CCG durante las primeras 24 hiv (Fig. 5C, D). Por el contrario, los espesores de la CPE y la CPI (las dos capas sinápticas de la retina) aumentaban durante la primera semana de cultivo *in vitro* (comparar estas capas en la Fig. 11A'-C'), sugiriendo que el desarrollo de estas capas progresaba normalmente en los ERECs. Este desarrollo normal de la CPE y CPI era confirmado al comparar el patrón de expresión de la glicoproteína de matriz extracelular tenascina (inmunomarcada con el anticuerpo M1B4) en ERECs desde 24 hiv hasta 7div (Fig. 12A, C, E) con el observado en retinas *in situ* de edades equivalentes (Fig. 12B, D, F). La expresión de tenascina en la CPI de los ERECs mostraba una progresiva estratificación desde E9+3div hasta E9+7div (Fig. 12C, E), reproduciendo las observaciones llevadas a cabo en retinas *in situ* desde E12 hasta E16 (Fig. 12D, F).

También se comparó el patrón de expresión del factor de transcripción islet-1 (inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal 39.4D5) encontrado en ERECs cultivados desde 24 hiv hasta 7 div con el observado en retinas *in situ* de edades equivalentes (E10-E16). En explantes de retina de E9+24hiv, islet-1 se expresaba en los núcleos celulares de subpoblaciones neuronales de la CNE, CNI y CCG (Fig. 13A, A'), siguiendo un modelo que coincidía con el observado en retinas *in situ* de E10 (Fig. 13B, B'). En ERECs de E9 cultivados desde 3 hasta 7 div, los núcleos islet-1 positivos habían desaparecido en la CNE mientras que se mantenían en las subpoblaciones neuronales de la CNI y la CCG (Fig. 13C, C', E, E'). En retinas *in situ* desde E12 hasta E16 se detectaba una distribución similar de núcleos islet-1 positivos (Fig. 13D, D', F, F'). Estos resultados sugerían que el desarrollo neuronal en la CNE, CNI y CCG de ERECs de E9 era similar al que tiene lugar en retinas *in situ*.

Fig. 11. Distribución de capas y células de Müller en explantes de retina cultivados *in vitro*. Células de Müller vimentina-positivas en secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de E9 incubados durante 24 hiv (E9+24hiv, **A**), 2 div (E9+2div, **B**), 5 div (E9+5div, **C**) y 7 div (E9+7div, **D**). Las secciones han sido inmunomarcadas con el anticuerpo monoclonal anti-vimentina H5 (verde) y los núcleos celulares se han teñido con Hoechst 33342 (azul) para poner de manifiesto las capas nucleares de la retina (**A'**-**D'**). CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. En los cuatro tiempos de incubación *in vitro*, los explantes de retina muestran un armazón formado por células de Müller con una organización similar a la fisiológica, si bien se detecta un aumento del marcaje de vimentina en la parte vítrea de explantes de E9+2div (asterisco en **B**). Barra de escala: 50 μ m.

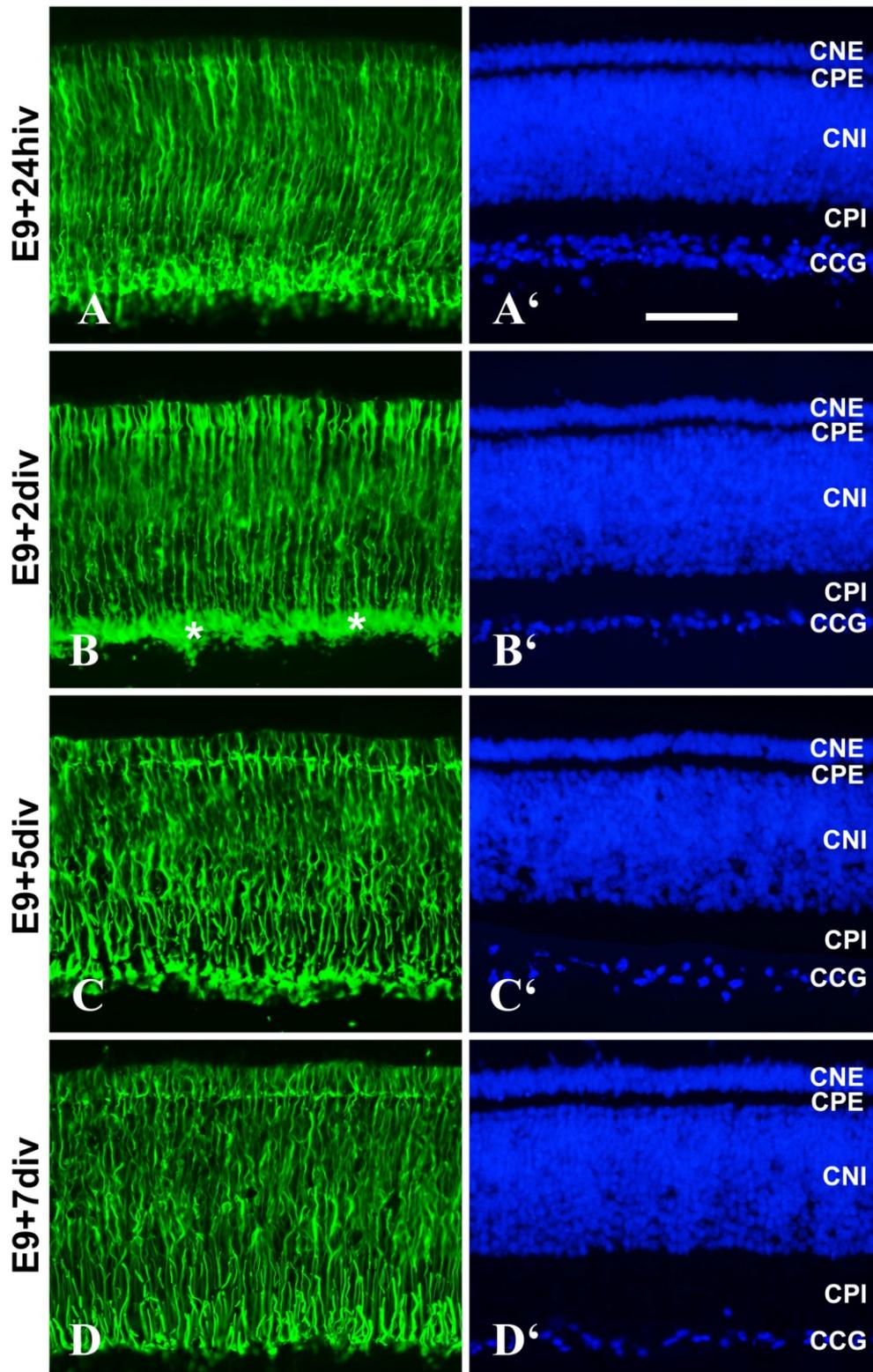


Fig. 12. Comparación de los patrones de distribución de tenascina en explantes de retina cultivados *in vitro* y en retinas *in situ*. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de E9 incubados durante 24 hiv (E9+24hiv, **A**), 3 div (E9+3div, **C**) y 7 div (E9+7div, **E**) y de retinas *in situ* de edades equivalentes: E10 (**B**), E12 (**D**) y E16 (**F**). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal anti-tenascina M1B4 (verde) y se han teñido con Hoechst 33342 (azul) para poner de manifiesto las capas nucleares de la retina. La tenascina se expresa fuertemente en la capa plexiforme interna (CPI) y externa (CPE) de los explantes de retina desde 24 hiv hasta 7 div (**A**, **C** y **E**) de manera semejante a lo observado en retinas *in situ* desde E10 hasta E16 (**B**, **D** y **F**). Barra de escala: 50 μ m.

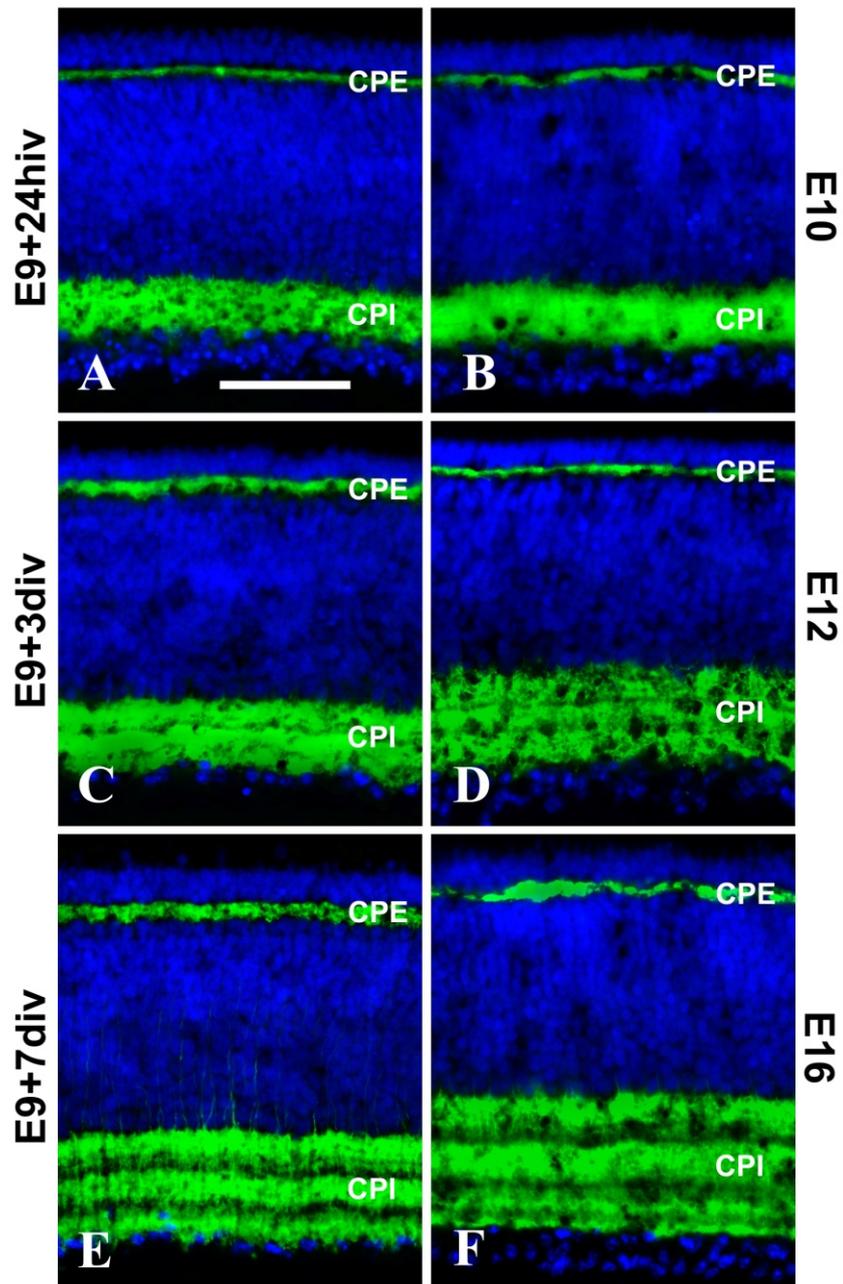
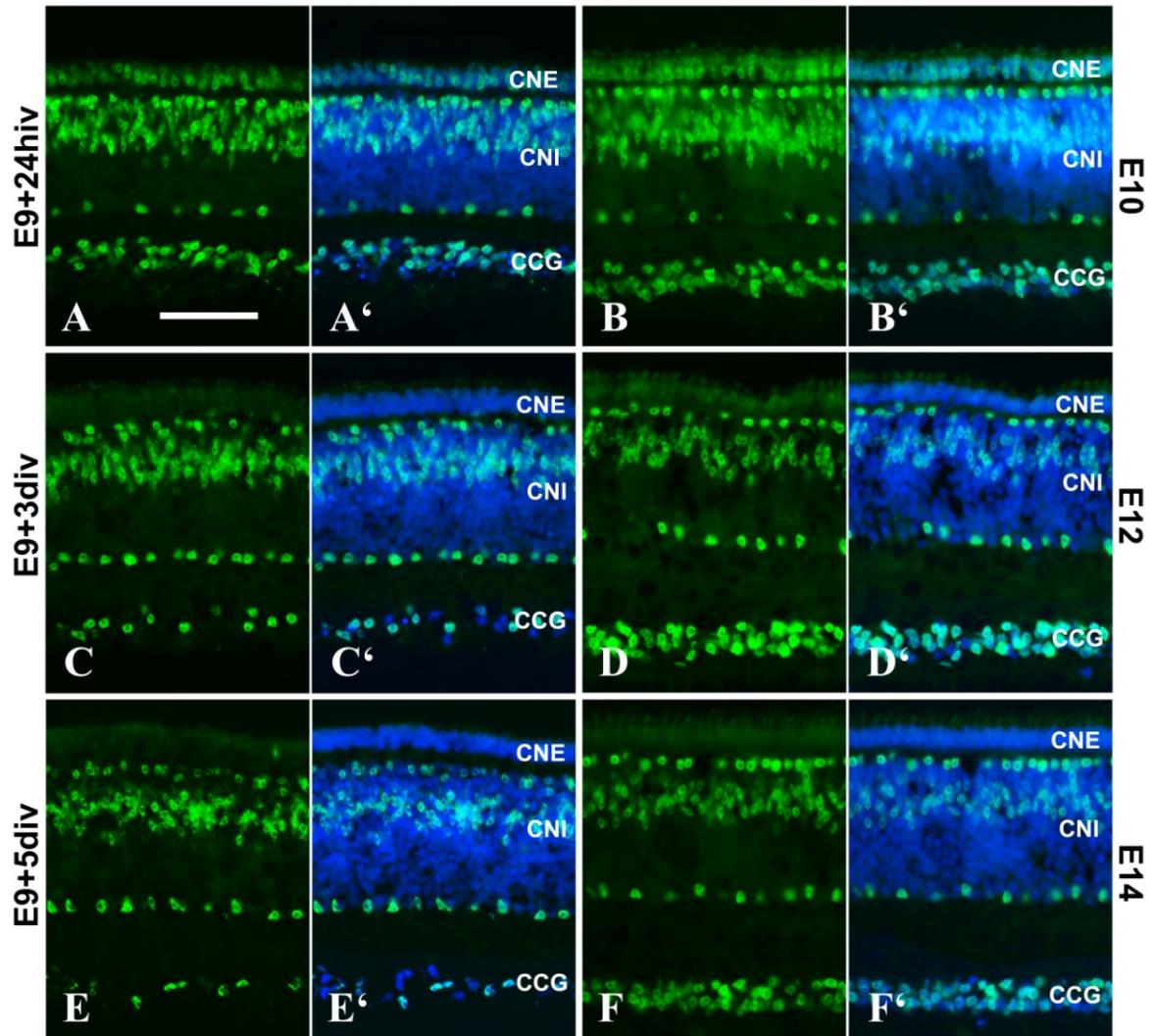


Fig. 13. Comparación de los patrones de expresión de islet-1 en explantes de retina cultivados *in vitro* y en retinas *in situ*. Distribución de neuronas islet-1-positivas en secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de E9 incubados durante 24 hiv (E9+24hiv, **A**), 3 div (E9+3div, **C**) y 5 div (E9+5div, **E**) y de retinas *in situ* de edades embrionarias equivalentes: E10 (**B**), E12 (**D**) y E14 (**F**). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal anti-islet-1 39.4D5 (verde) y se han teñido con Hoechst 33342 (azul) para poner de manifiesto las capas nucleares de la retina (**A'-F'**). CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. La subpoblaciones de neuronas islet-1-positivas presentes en explantes de retina de E9+24hiv (**A**), E9+3div (**C**) y E9+5div (**E**) son similares a las observadas en retinas *in situ* de E10 (**B**), E12 (**D**) y E14 (**F**), respectivamente. Es de destacar que las células islet-1-positivas se observan transitoriamente en la CNE de explantes de retina de E9+24hiv (**A**) y de retinas *in situ* de E10 (**B**), desapareciendo en explantes con mayores tiempos de incubación (**C** y **E**), así como en retinas *in situ* de edades equivalentes (**D** y **F**). Barra de escala: 50 μ m.



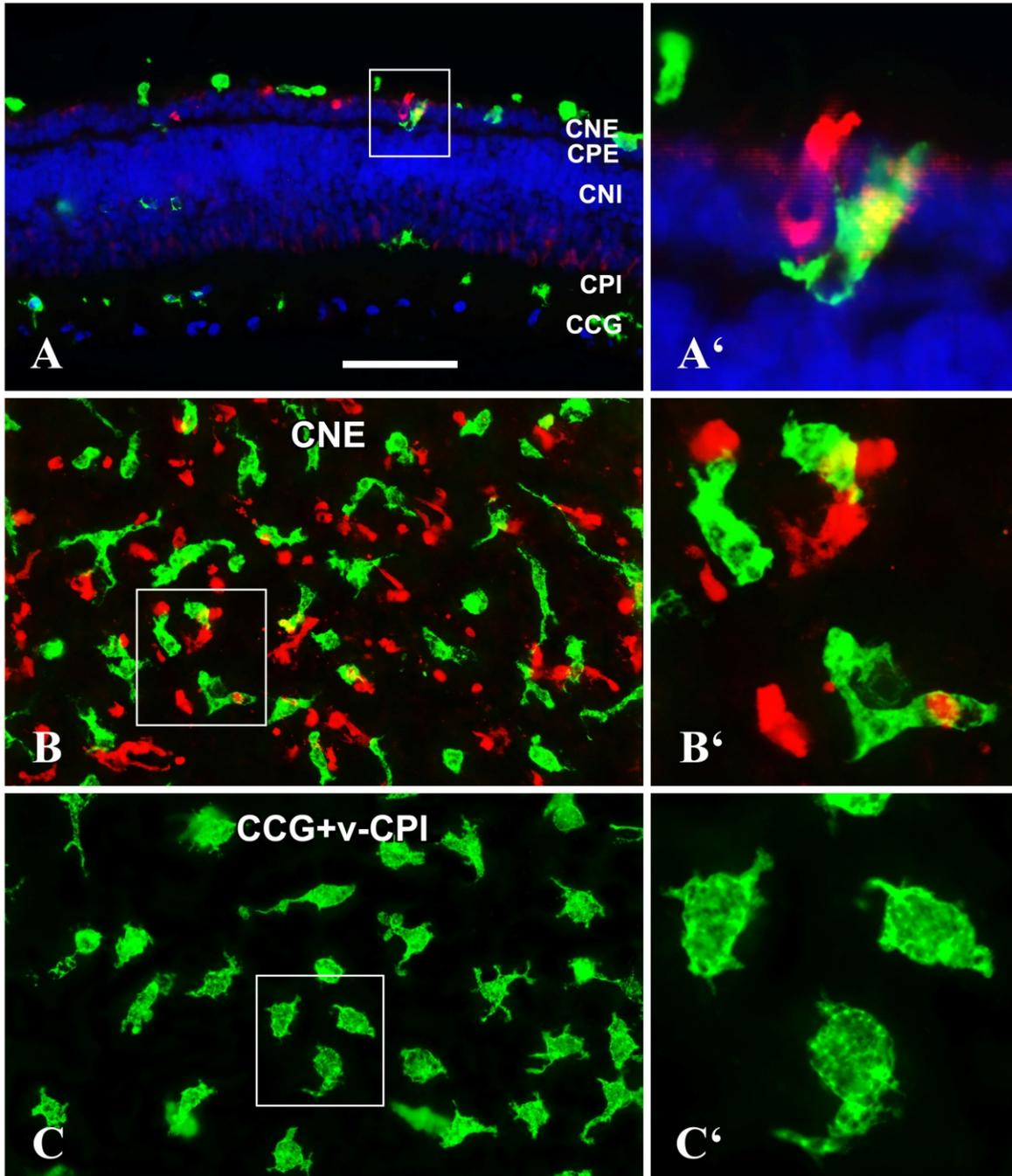
Redondeamiento microglial en ERECs de E9 durante la segunda semana *in vitro*

A partir de 8 div comenzaron a observarse células microgliales redondeadas en la CPE de ERECs y su número se incrementaba progresivamente 14 div (el último tiempo de incubación *in vitro* estudiado). La aparición de microglía en la CPE era inmediatamente posterior a la detección de las primeras células QH1-positivas en la superficie escleral del explante (Fig. 8A') y coincidía con la presencia en ella de abundantes fotorreceptores positivos para anti-caspasa-3-activa (Fig. 14A, A'), los cuales no se detectaban en ERECs cultivados hasta 7 div. Con frecuencia, se observaban contactos entre las células microgliales redondeadas y los fotorreceptores caspasa-3-positivos (Fig. 14A', B, B'), sugiriendo una relación entre la muerte de los fotorreceptores y la llegada de microglía a la CNE.

La mayoría de las células microgliales de la CCG, CPI y CPE, que mostraban una morfología ramificada en ERECs de E9+7div, también se redondeaban a partir de 8 div (Fig. 14C-C'), coincidiendo con la aparición de microglía y fotorreceptores muertos en la CNE. Aparentemente, el redondeamiento de la microglía no se debía a cambios estructurales en las capas de la retina, ya que la citoarquitectura de la misma durante la segunda semana *in vitro* (Fig. 14A) era similar a la observada a los 7 div.

Fig. 14. Distribución de microglía redondeada y fotorreceptores muertos en explantes de retina de E9 durante la segunda semana de cultivo *in vitro*. La distribución de fotorreceptores apoptóticos (rojo) se observa en la capa nuclear externa (CNE) de explantes de retina embrionaria de codorniz de E9 incubados durante 10 div (E9+10div), simultáneamente con la presencia de células microgliales no ramificadas (verde). Las células microgliales se han inmunomarcado con el anticuerpo QH1 (verde) y los fotorreceptores apoptóticos con el anticuerpo anti-caspasa-3-activa (rojo) en una sección transversal (**A**) y en un montaje total (**B**, **C**) de explantes de retina de E9+10div. Los núcleos celulares se han teñido con Hoechst 33342 (azul). Las áreas enmarcadas en **A**, **B** y **C** se observan a mayor aumento en **A'**, **B'** y **C'**, respectivamente. **A**: Las células microgliales ameboides no ramificadas están presentes en todas las capas de la retina aunque son particularmente abundantes en la CNE, donde hay numerosas células apoptóticas positivas para anti-caspasa-3-activa. CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. **B** y **C**: Idéntico campo microscópico de un montaje total de un explante de retina de E9+10div enfocado en dos niveles distintos del espesor retiniano: la CNE (**B**) y el límite entre la CCG y la parte vítrea de la CPI (CCG+v-CPI, **C**). Las células microgliales en ambos niveles muestran un fenotipo no ramificado con prolongaciones cortas y gruesas (**B'** y **C'**). En la CNE se observan numerosos contactos entre células microgliales no ramificadas y fotorreceptores apoptóticos (**A'** y **B'**). Barra de escala: 50 μm para **A-C**; 10 μm para **A'**; 17 μm para **B'** y **C'**.

E9+10div



DISCUSIÓN

El presente estudio ha desarrollado un modelo de cultivos organotípicos de retina en condiciones óptimas para el estudio de la migración y diferenciación de las células microgliales. Dichas condiciones permiten el desarrollo de la microglía durante la primera semana *in vitro* de manera comparable al que tiene lugar en la retina *in situ*, preservando citoarquitectura normal de la retina en desarrollo.

Los ERECs de E9 son un modelo ideal para estudios experimentales *in vitro* de la migración y diferenciación de la microglía

En esta investigación, el desarrollo de la microglía en ERECs de E9 durante la primera semana *in vitro* mostraba un llamativo parecido al observado en la retina *in situ*, mientras que el redondeamiento de la microglía se retrasaba a la segunda semana *in vitro*, coincidiendo con la aparición de muerte de fotorreceptores. Este es el primer estudio con cultivos organotípicos en los que las células microgliales no se redondean durante las primeras horas y días *in vitro* como respuesta al aislamiento del explante y posterior cultivo. En consecuencia, el fenotipo, comportamiento migratorio y patrón de diferenciación de la microglía se parece el observado *in situ*. Solamente dos estudios (Lee et al., 2008; Liang et al., 2009), llevados a cabo en explantes de retina de ratones transgénicos CX3CR1+/GFP adultos, mostraban células microgliales que mantenían su fenotipo fisiológico. Estos estudios examinaban el comportamiento dinámico de las prolongaciones celulares en microglía madura de retina de ratón adulto. Sin embargo, en ellos se usaban explantes de retina mantenidos durante pocas horas en una cabina de temperatura controlada y acoplada al microscopio a través de la cual se inyectaba una solución oxigenada Ringer, en lugar de cultivos organotípicos cultivados durante largos periodos de tiempo como los que usamos en nuestro estudio, los cuales aumentan las posibilidades de experimentación.

En apoyo de la naturaleza casi fisiológica de la conducta microglial en los ERECs de E9 hasta 7 div, los patrones cronológicos de migración y ramificación de las células microgliales observados en los mismos mostraban una gran semejanza con los descritos en la retina *in situ* de edades equivalentes. Tanto en los explantes como en la retina *in situ*, las células microgliales migran tangencialmente en la CFN y sobre la superficie vítrea de los ERECs durante las primeras 24 hiv, migrando radialmente con

posterioridad para colonizar progresivamente capas retinianas más esclerales como la CCG, la CPI y la CPE. La migración radial de las células microgliales en los ERECs de E9 sigue un patrón cronológico en el que dichas células alcanzan el borde vitreal y niveles intermedios de la CPI en E9+3div, el borde escleral de la CPI en E9+5div y la CPE en E9+7div. En estos tiempos de cultivo, las retinas de los explantes serían equivalentes a retinas *in situ* de E12, E14 y E16, respectivamente, edades en las que las células microgliales de áreas centrales de la retina *in situ* alcanzan estratos similares a los citados en los ERECs (Marín-Teva et al., 1999; Navascués et al., 1995). Además, las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E9 describen movimientos hacia delante, hacia atrás y hacia los lados (Fig. 4), como también ocurre en la retina *in situ* (Marín-Teva et al., 1998). Nuestros resultados también revelan que la citoarquitectura de la retina está bien preservada en ERECs durante los primeros 7 div, no mostrando diferencias con la observada en explantes de retinas recién aisladas de embriones de codorniz de edades equivalentes. De hecho, nuestros estudios inmunocitoquímicos han revelado que la distribución de diferentes componentes de la retina *in situ*, tales como las células de Müller (Prada et al., 1995, 1998; Sánchez-López et al., 2004), tenascina (Belmonte et al., 2000; Sánchez-López et al., 2004) y neuronas islet-1-positivas (Fischer et al., 2002; Halfter et al., 2005; Hashimoto et al., 2003) guarda una gran semejanza con la observada en los ERECs durante la primera semana de cultivo.

Aunque el patrón cronológico de migración y ramificación de la microglía en ERECs de E9 se parece al de la retinas *in situ*, se pueden detectar algunas diferencias. Así, la llegada de la microglía a la CPI parece ser más lenta en ERECs que en retinas *in situ* (Fig. 9), mientras que la densidad de las células microgliales en la CFN/CCG (Fig. 9) y el grado de ramificación de éstas en las capas plexiformes (Fig. 10A) son menores en ERECs de E9+7div que en retinas *in situ* de edades equivalentes. Sin embargo, a pesar de estas variaciones, la microglía en ERECs de E9 se comporta de manera similar a las retinas *in situ* y, después de 7 div, alcanza una morfología ramificada como la observada en retinas de E16. Por lo tanto, es razonable pensar que las interacciones intercelulares y los factores quimiotácticos y quimocinéticos que regulan los procesos de desarrollo microglial podrían ser similares en los explantes de retina y en las retinas *in situ*. Puesto que se sabe poco de estos factores y señales, los ERECs usados en este estudio podrían ser un excelente modelo para investigar los mecanismos moleculares

implicados en la migración y diferenciación de la microglía. Además, algunas de las conclusiones obtenidas en este modelo de aves podrían ser generalizadas a los mecanismos de migración y ramificación en mamíferos, aunque es evidente que los factores específicos que operan en distintas partes del SNC y en diferentes especies pueden ser diferentes.

Condiciones de cultivo de los ERECs de E9 para conservar la migración y ramificación de la microglía

En este estudio se han utilizado dos medios de cultivo, BME y NB suplementado con diferentes nutrientes, para la incubación *in vitro* de ERECs de E9. Nuestros resultados muestran que el BME+25% SC es el mejor medio de cultivo para conservar la migración y ramificación de las células microgliales durante el desarrollo. Los protocolos de cultivo en los que se emplean medios sin suero, cuyos ingredientes son bien conocidos, podrían ser aparentemente preferibles para el cultivo de explantes, ya que si alguno de sus componentes afectara al comportamiento de la microglía podría ser fácilmente sustituido. Además, se ha descrito que el medio NB sin suero y suplementado con B27 o N2 mantiene la viabilidad de explantes de retina de rata adulta mejor que el medio con suero de caballo (Johnson & Martin, 2008). Sin embargo, los resultados del presente estudio demuestran que el BME+25% SC favorece el comportamiento fisiológico de las células microgliales en ERECs de E9 mucho más eficazmente que el medio NB suplementado con B27 o N2. Estos resultados resultan sorprendentes teniendo en cuenta que cualquier suero contiene inmunoglobulinas, proteínas del complemento, trombina y albúmina, moléculas que se han descrito como señales de activación para las células microgliales (Garden & Möller, 2006; Nakamura, 2002; Patrizio et al., 1996; Ransohoff & Perry, 2009; Si et al., 1997). No obstante, el comportamiento fisiológico de la microglía sólo se observa cuando los explantes de retina se incuban en BME suplementado con suero de caballo y no con suero de pollo. El suero de caballo podría contener factores que favorezcan la viabilidad de los explantes sin afectar al desarrollo de las células microgliales, probablemente porque estas células carecen de receptores para dichos factores. El redondeamiento de las células microgliales en presencia de suero de pollo indica que el suero de esta especie de ave contiene factores que son reconocidos como señales de activación por la

microglía de codorniz, posiblemente porque pollo y codorniz son dos especies muy próximas.

¿Por qué la microglía no se redondea en ERECs de E9 durante los primeros 7 div?

El desarrollo fisiológico de las células microgliales observado en ERECs de E9 incubados en BME+25% SC durante la primera semana *in vitro* podría deberse a una combinación de varios factores favorables. Primero, el uso de retina permite cultivar explantes más o menos extensos sin tener que seccionar el tejido para obtener rebanadas, como sucede en los cultivos de otras regiones del SNC. Esto favorece que las superficies superior e inferior de los explantes cultivados coincidan con las superficies escleral y vítrea de la retina, reproduciendo así las condiciones naturales de la retina *in situ*. Segundo, nosotros hemos cultivado la retina con las células ganglionares hacia abajo, a diferencia de lo que se hace en la mayoría de los estudios que usan cultivos organotípicos de retina, en los que las células ganglionares se disponen hacia arriba (Engelsberg et al., 2004; Koizumi et al., 2007; Johnson & Martin, 2008; Mertsch et al., 2001). Dicha orientación es más fisiológica que cuando se hace con la CCG hacia arriba, porque la retina de aves es avascular y los nutrientes parecen difundir desde los vasos sanguíneos del pecten hacia la retina a través del vítreo (Bellhorn & Bellhorn, 1975). De este modo, los explantes de retina con la superficie vítrea en contacto con la membrana millicell, a través de la cual difunden los nutrientes desde el medio de cultivo, reproduciría la situación fisiológica. Nuestra experiencia (resultados no mostrados) indica que las células microgliales adquieren un fenotipo redondeado no fisiológico y migran hacia las áreas más periféricas de los explantes de retina cuando éstos se cultivan con las células ganglionares hacia arriba.

Otro factor que podría intervenir en el comportamiento fisiológico de la microglía en ERECs de E9 es el grado de inmadurez de las células microgliales al inicio del cultivo. En relación con esto, nuestros resultados muestran que, en ERECs de E12 y E14 cultivados 3 div, la microglía muestra caracteres morfológicos de células activadas que no se observan en ERECs de E9. Además, otros estudios también han puesto de manifiesto que las células microgliales se comportan de manera distinta en edades diferentes. Así, Graeber et al. (1998) mostraban en el núcleo facial de rata que la respuesta de la microglía a la axotomía era claramente diferente entre el cerebro neonatal y el adulto.

El comportamiento microglial en cultivos organotípicos podría verse afectado por la degeneración de las células ganglionares que tiene lugar como consecuencia de la sección del nervio óptico durante el aislamiento de los explantes de retina (Engelsberg et al., 2004; Manabe et al., 2002; Mertsch et al., 2001). De hecho, se ha descrito una cascada masiva de muerte celular en la CCG de explantes de retinas inmaduras de roedores después de unas pocas horas tras el aislamiento de los explantes (Engelsberg et al., 2004; Manabe et al., 2002; McKernan et al., 2007), coincidiendo con la presencia de microglía activada en dicha capa (Engelsberg et al., 2004; Mertsch et al., 2001). Nuestros resultados muestran que la intensidad de muerte celular, puesta de manifiesto mediante la expresión de anti-caspasa-3 activa, es ligeramente mayor en la CCG de ERECs de E9 durante las primeras 24 hiv que en la retina *in situ* de una edad equivalente, mientras que en la CNi es muy similar. En retinas *in situ* de embriones de codorniz de E9, los precursores microgliales migran tangencialmente en la parte vítrea de la retina central coincidiendo con una oleada de muerte celular en la CCG (Marín-Teva et al., 1999; Navascués et al., 1995). Estudios anteriores de nuestro laboratorio han mostrado que, durante su proceso migratorio, las células microgliales parecen ignorar las células muertas de la CCG, continuando su migración para colonizar toda la superficie vítrea de la retina, y tan sólo ocasionalmente algunas células microgliales fagocitan restos celulares (Marín-Teva et al., 1999). Este comportamiento *in situ* concuerda con nuestras observaciones en cultivos de ERECs de E9, en los que las células microgliales no alteran su programa de migración tangencial y radial, incluso cuando la muerte celular en la CCG se incrementa considerablemente.

Finalmente, las diferencias entre la composición celular de las retinas de aves y mamíferos también podrían contribuir a explicar porqué las células microgliales se activan durante las primeras horas de cultivo en los explantes de retina en desarrollo de roedores (Engelsberg et al., 2004; Mertsch et al., 2001) pero no en ERECs. Así, la retina de aves carece de astrocitos y vasos sanguíneos, cuya presencia podría afectar el comportamiento de las células microgliales en retinas cultivadas de roedores. Los vasos sanguíneos degeneran en los cultivos organotípicos de retina postnatal de rata poco después del comienzo del cultivo (Mertsch et al., 2001) y esta degeneración podría inducir la activación de las células microgliales. Esta respuesta no tendría lugar en explantes de retina de aves, en las que los astrocitos y los vasos sanguíneos están ausentes.

¿Por qué la microglía se redondea en ERECs de E9 después de 7 div?

En ERECs de E9, comienzan a aparecer células microgliales redondeadas en la CNE desde 8 div en adelante, coincidiendo con la aparición de abundantes fotorreceptores en proceso de muerte (anti-caspasa-3 positivos) en esta capa. En explantes de retina de rata en desarrollo se ha descrito una coincidencia similar entre la presencia de microglía activada en la CNE y la aparición de fotorreceptores muertos (Engelsberg et al., 2004). Hay dos posibles explicaciones para esta coincidencia. Primero, la muerte de los fotorreceptores en la CNE podría ser provocada por las células microgliales redondeadas que comienzan a observarse por encima de la capa de fotorreceptores a partir de 7 div. Dichas células probablemente migran desde el área marginal alrededor de los límites originales del explante. En algunos modelos experimentales de degeneración retiniana, las células microgliales pueden promover la muerte de fotorreceptores mediante la producción de sustancias citotóxicas (Langmann, 2007; Zeng et al., 2005; Zhang et al., 2005). En nuestro modelo, la observación a partir de 8 div de numerosos contactos entre células microgliales y fotorreceptores positivos para anti-caspasa-3 activa parece avalar dicha hipótesis. Sin embargo, no podemos descartar una segunda posibilidad consistente en que la oleada de muerte de fotorreceptores en ERECs de E9+8 div estuviera provocada por un mecanismo independiente de las células microgliales, y éstas fueran activadas y atraídas por factores procedentes de los fotorreceptores en proceso de muerte. A favor de esta hipótesis se puede argumentar que los ERECs de E9+8 div serían equivalentes a retinas *in situ* de codorniz del primer día postnatal, en las que no se observan fotorreceptores muertos. Por lo tanto, la muerte de fotorreceptores en ERECs de E9+8 div podría ser debida a la ausencia de ciertos factores que sí estarían presentes en la retina *in situ*. La muerte de fotorreceptores atraería algunas células microgliales hacia la CNE, de manera semejante a lo descrito en diferentes modelos de degeneración retiniana de roedores en desarrollo y adultos (Kunert et al., 1999; Santos et al., 2010; Thanos, 1992; Zeng et al., 2005; Zhang et al., 2005; Yang et al., 2007). Si esto fuera así, no se puede descartar que la llegada de células microgliales a la CNE indujera, a su vez, la muerte de nuevos fotorreceptores, amplificando el proceso degenerativo en dicha capa. De todos modos, serían necesarias nuevas investigaciones para clarificar el origen de la muerte de fotorreceptores que tiene lugar en ERECs de E9+8 div.

Conclusión

En conclusión, el presente estudio demuestra que a pesar de las diferencias observadas en la densidad celular y grado de ramificación, hay cierta semejanza entre el patrón cronológico de migración y ramificación de las células microgliales en ERECs de E9 cultivados hasta 7 div y el observado durante el desarrollo de retinas *in situ* de edades equivalentes. Por lo tanto, el modelo experimental descrito en este estudio se puede usar como herramienta para aclarar los mecanismos moleculares implicados en la migración y diferenciación de la microglía en retinas en desarrollo. Además, los ERECs de E9 cultivados durante más de 7 div podrían servir como modelo para estudiar un posible papel de la microglía de la retina en la degeneración de fotorreceptores.

REFERENCIAS

- Bellhorn RW, Bellhorn MS. 1975. The avian pecten. 1. Fluorescein permeability. *Ophthalmic Res* 7:1-7.
- Belmonte KE, McKinnon LA, Nathanson NM. 2000. Developmental expression of muscarinic acetylcholine receptors in chick retina: selective induction of M2 muscarinic receptor expression in ovo by a factor secreted by Müller glial cells. *J Neurosci* 20:8417-8425.
- Borsello T, Mottier V, Castagne V, Clarke PG. 2002. Ultrastructure of retinal ganglion cell death after axotomy in chick embryos. *J Comp Neurol* 453:361-371.
- Broderick C, Duncan L, Taylor N, Dick AD. 2000. IFN- γ and LPS-mediated IL-10-dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:2613-2622.
- Carter DA, Dick AD. 2003. Lipopolysaccharide/interferon- γ and not transforming growth factor β inhibits retinal microglial migration from retinal explant. *Br J Ophthalmol* 87:481-487.
- Carter DA, Dick AD. 2004. CD200 maintains microglial potential to migrate in adult human retinal explant model. *Curr Eye Res* 28:427-436.
- Cuadros MA, Moujahid A, Martín-Partido G, Navascués J. 1992. Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* 148:11-14.
- Czapiga M, Colton CA. 1999. Function of microglia in organotypic slice cultures. *J Neurosci Res* 56:644-651.
- Dailey ME, Waite M. 1999. Confocal imaging of microglial cell dynamics in hippocampal slice cultures. *Methods* 18:222-230.
- Engelsberg K, Ehinger B, Wasselius J, Johansson K. 2004. Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 242:229-239.
- Fischer AJ, Dierks BD, Reh TA. 2002. Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development* 129:2283-2291.
- Fischer AJ, Omar G, Eubanks J, McGuire CR, Dierks BD, Reh TA. 2004. Different aspects of gliosis in retinal Müller glia can be induced by CNTF, insulin, and FGF2 in the absence of damage. *Mol Vis* 10:973-986.

- Fujita H, Tanaka J, Toku K, Tateishi N, Suzuki Y, Matsuda S, Sakanaka M, Maeda N. 1996. Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. *Glia* 18:269-281.
- Garden GA, Möller T. 2006. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:127-137.
- Graeber MB, López-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreuzberg GW, Kohsaka S. 1998. The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813:241-253.
- Grossmann R, Stence N, Carr J, Fuller L, Waite M, Dailey ME. 2002. Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia* 37:229-240.
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. 1997. Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur J Neurosci* 9:863-866.
- Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R. 1996. Resting microglial cells *in vitro*: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18:319-331.
- Halfter W, Willem M, Mayer U. 2005. Basement membrane-dependent survival of retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1000-1009.
- Hashimoto T, Zhang XM, Yang XJ. 2003. Expression of the Flk1 receptor and its ligand VEGF in the developing chick central nervous system. *Gene Expr Patterns* 3:109-113.
- Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R. 1998. Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 10:3284-3290.
- Hurley SD, Walter SA, Semple-Rowland SL, Streit WJ. 1999. Cytokine transcripts expressed by microglia *in vitro* are not expressed by amoeboid microglia of the developing rat central nervous system. *Glia* 25:304-309.
- Johnson TV, Martin KR. 2008. Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an *in vitro* intraocular stem cell transplantation model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3503-3512.
- Koizumi A, Zeck G, Ben Y, Masland RH, Jakobs TC. 2007. Organotypic culture of physiologically functional adult mammalian retinas. *PLoS ONE* 2:e221.

- Kunert KS, Fitzgerald ME, Thomson L, Dorey CK. 1999. Microglia increase as photoreceptors decrease in the aging avian retina. *Curr Eye Res* 18:440-447.
- Kurpius D, Nolley EP, Dailey ME. 2007. Purines induce directed migration and rapid homing of microglia to injured pyramidal neurons in developing hippocampus. *Glia* 55:873-884.
- Langmann T. 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81:1345-1351.
- Lee JE, Liang KJ, Fariss RN, Wong WT. 2008. Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:4169-4176.
- Lee YB, Nagai A, Kim SU. 2002. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* 69:94-103.
- Liang KJ, Lee JE, Wang YD, Ma W, Fontainhas AM, Fariss R, Wong WT. 2009. Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4444-4451.
- Manabe S, Kashii S, Honda Y, Yamamoto R, Katsuki H, Akaike A. 2002. Quantification of axotomized ganglion cell death by explant culture of the rat retina. *Neurosci Lett* 334:33-36.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J. 1998. Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* 22:31-52.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J. 1999. Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412:255-275.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547.
- McKernan DP, Guerin MB, O'Brien CJ, Cotter TG. 2007. A key role for calpains in retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:5420-5430.
- Mertsch K, Hanisch UK, Kettenmann H, Schnitzer J. 2001. Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system. *J Comp Neurol* 431:217-227.
- Nakamura Y. 2002. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 25:945-953.

- Navascués J, Cuadros MA, Calvente R, Marín-Teva JL. 2002. Roles of microglia in the developing avian visual system. En: *Microglia in the regenerating and degenerating central nervous system*. WJ Streit (ed). Springer, New York, pp. 15-35.
- Navascués J, Moujahid A, Almendros A, Marín-Teva JL, Cuadros MA. 1995. Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol* 354:209-228.
- Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lievre F, Buck CA. 1987. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100:339-349.
- Patrizio M, Riitano D, Costa T, Levi G. 1996. Selective enhancement by serum factors of cyclic AMP accumulation in rat microglial cultures. *Neurochem Int* 29:89-96.
- Perez RG, Halfter W. 1993. Tenascin in the developing chick visual system: distribution and potential role as a modulator of retinal axon growth. *Dev Biol* 156:278-292.
- Petersen MA, Dailey ME. 2004. Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46:195-206.
- Prada FA, Dorado ME, Quesada A, Prada C, Schwarz U, de la Rosa EJ. 1995. Early expression of a novel radial glia antigen in the chick embryo. *Glia* 15:389-400.
- Prada FA, Quesada A, Dorado ME, Chmielewski C, Prada C. 1998. Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia* 22:221-236.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Sánchez-López A, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J. 2004. Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia* 46:261-273.
- Santos AM, Martín-Oliva D, Ferrer-Martín RM, Tassi M, Calvente R, Sierra A, Carrasco MC, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA. 2010. Microglial response to light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *J Comp Neurol* 518:477-492.

- Si QS, Nakamura Y, Kataoka K. 1997. Albumin enhances superoxide production in cultured microglia. *Glia* 21:413-418.
- Slepko N, Levi G. 1996. Progressive activation of adult microglial cells *in vitro*. *Glia* 16:241-246.
- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33:256-266.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Meth* 37:173-182.
- Thanos S. 1992. Sick photoreceptors attract activated microglia from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy. *Brain Res* 588:21-28.
- Yang LP, Zhu XA, Tso MO. 2007. A possible mechanism of microglia-photoreceptor crosstalk. *Mol Vis* 13:2048-2057.
- Zeng HY, Zhu XA, Zhang C, Yang LP, Wu LM, Tso MO. 2005. Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2992-2999.
- Zhang C, Shen JK, Lam TT, Zeng HY, Chiang SK, Yang F, Tso MO. 2005. Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis* 11:887-895.

Capítulo II

Cinética del movimiento de las células microgliales que migran tangencialmente en explantes de retina embrionaria de codorniz cultivados *in vitro*

INTRODUCCIÓN

Desde los primeros estudios de Rio-Hortega (1932) es bien conocido que una de las principales características de las células microgliales es su gran motilidad. Dicha motilidad se manifiesta tanto en el sistema nervioso central (SNC) maduro, cuando la microglía ramificada se activa en respuesta a diferentes estímulos (Davalos et al., 2005; Stence et al., 2001), como durante el desarrollo, cuando se produce la colonización del SNC por células microgliales ameboides. Estas células migran largas distancias desde sus puntos de entrada en el parénquima nervioso hasta sus lugares de destino, donde se diferencian en microglía ramificada (Cuadros & Navascués, 1998; Ling & Wong, 1993; Navascués et al., 2000; Perry et al., 1985; Perry et al., 1994). En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que las células microgliales ameboides entran en la retina embrionaria de codorniz entre el séptimo día de incubación (E7) y E16 procedentes de la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP). A continuación, migran tangencialmente sobre la superficie vítrea de la retina, en estrecho contacto con los pies terminales de las células de Müller, siguiendo una dirección centro-periférica (Navascués et al., 1995; Marín-Teva et al., 1998). Entre E9 y la primera mitad de la primera semana posteclosión, las células microgliales ameboides que migran sobre la superficie vítrea de la retina pueden desplazarse radialmente en dirección vítreo-escleral para alcanzar las capas plexiformes interna y externa, en las que se transforman en microglía ramificada (Navascués et al., 1995; Marín-Teva et al., 1999a). Durante su migración tangencial, las células microgliales siguen un curso paralelo a la superficie vítrea de la retina, moviéndose mediante un mecanismo parecido al utilizado por fibroblastos cultivados *in vitro* (Marín-Teva et al., 1998). El movimiento radial de las células microgliales es simultáneo a su proceso de ramificación y tiene lugar mediante un mecanismo diferente del utilizado para la migración tangencial (Sánchez-López et al., 2004).

Una vez caracterizado el proceso de migración de la microglía durante el desarrollo de la retina *in situ*, es necesario llevar a cabo estudios experimentales para profundizar en el conocimiento de dicho proceso. Se han usado diferentes modelos experimentales *in vitro* para el estudio de la motilidad de la microglía como por ejemplo los cultivos de células microgliales aisladas (Calvo et al., 1998; Nolte et al., 1996; Rezaie et al., 2002; Tassi et al., 2006). Sin embargo, en este tipo de cultivos las células

microgliales responden rápidamente al aislamiento y adquieren una morfología semejante a la microglía activada (Hurley et al., 1999; Lee et al., 2002; Slepko & Levi, 1996; Tassi et al., 2006). Una alternativa a este tipo de cultivo ha sido la utilización de cultivos de rebanadas de tejido nervioso en desarrollo de diferentes regiones del SNC (cultivos organotípicos), en los que, a diferencia de los cultivos de células aisladas, se mantiene la citoarquitectura del tejido originario, de forma que el microambiente celular conserva un alto grado de organización y diferenciación celular, semejante al que existe *in vivo* (Gähwiler et al., 1997). Cultivos de este tipo han sido utilizados principalmente para estudiar la motilidad de la microglía activada que se desplaza hacia zonas lesionadas del SNC adulto (Brockhaus et al., 1996; Schiefer et al., 1999; Stence et al., 2001). Sin embargo, los mecanismos de migración de las células microgliales indiferenciadas durante el desarrollo embrionario y postnatal han sido relativamente poco estudiados usando este tipo de cultivos.

En el capítulo I de la presente Tesis, hemos puesto a punto un modelo *in vitro* basado en los cultivos organotípicos de explantes de retina de embriones de codorniz (ERECs) siguiendo la metodología descrita por Stoppini y colaboradores (1991), que hemos optimizado para el estudio de la migración y diferenciación de las células microgliales inmaduras (ver también Carrasco et al., 2011). La retina es una región bien delimitada del SNC con una organización citoarquitectónica en capas, especialmente favorable para la preparación de cultivos organotípicos sin realizar rebanadas y para el estudio de las células microgliales (Chavarría et al., 2007; Cirillo et al., 2001; Díaz et al., 1999; Franke et al., 2006; Sanders et al., 2005). Además, la retina de aves carece de vasos sanguíneos a diferencia de la de mamíferos, lo que facilita la visualización de las células microgliales. Usando cultivos de ERECs de E9 y E10, hemos demostrado que las células microgliales inmaduras migran y se diferencian *in vitro* de forma similar a como lo hacen en la retina *in situ* (capítulo I de esta Tesis y Carrasco et al., 2011). Sin embargo, en dicho estudio se usaban explantes cuadrados de tamaño pequeño que no contenían la región de la CNO/BP y, por lo tanto, no podíamos analizar la posible entrada de las células microgliales en la retina procedentes de esta región, ni determinar la orientación espacial de sus trayectorias durante la migración tangencial *in vitro*. Con el objetivo de realizar este análisis, hemos utilizado cultivos de ERECs de E7 de mayor tamaño que incluyen la CNO/BP en combinación con el marcaje vital de las células microgliales mediante inmunofluorescencia directa. Así, hemos podido captar la

cinética de los movimientos de las células microgliales en el explante cultivado. Usando esta metodología, hemos demostrado que, en ERECs de E7, las células microgliales mantienen la capacidad de entrar en la retina desde la CNO/BP y migran tangencialmente describiendo trayectorias en las que las distancias recorridas son parecidas en todo el explante, pero con un desplazamiento neto y dirección distintos según la zona del explante considerada. Además, hemos observado que las células microgliales son capaces de dividirse de forma simultánea al proceso de migración tangencial, como también sucede en la retina *in situ* (Marín-Teva et al., 1999b).

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron retinas de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) de E7 para obtener explantes de retina que se cultivaron *in vitro* como se describe más abajo. En este estadio del desarrollo comienzan a observarse en la retina las primeras células microgliales que han entrado desde la CNO/BP.

Aislamiento y cultivo *in vitro* de explantes de retina

Los ERECs de E7 fueron cultivados siguiendo la metodología descrita por Stoppini et al. (1991) con algunas modificaciones (capítulo I de esta Tesis y Carrasco et al., 2011). El protocolo consistió en aislar explantes de retina de aproximadamente 2-3 mm de lado, obtenidos de la región central de la retina del ojo derecho de embriones de E7. Dichos explantes contenían la zona dorsal de la CNO/BP y carecían de epitelio pigmentario. El aislamiento se llevó a cabo en solución salina de Gey (GBSS, Sigma, St. Louis, MO) enfriada en hielo y suplementada con 5 mg/ml de glucosa (Sigma), 50 UI de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (ambos de Invitrogen, Paisley, Reino Unido). A continuación, los explantes eran depositados con la superficie vítrea hacia abajo sobre membranas semipermeables Millicell CM de 30mm (Millipore, Billerica, MA; pore size 0,4 µm) en una placa de cultivo de 6 pocillos con 1 ml de medio de cultivo por pocillo. El medio utilizado estaba compuesto por 50% de medio basal de Eagle con sales de Earle (BME), 25% de solución salina de Hank, 25% de suero de caballo, L-glutamina 1 mM, 10 UI/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomina (todos obtenidos de Invitrogen) y 5 mg/ml de glucosa. Los ERECs eran incubados a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ durante 6,5 horas *in vitro* (hiv).

Captura de imágenes de células microgliales inmunomarcadas con QH1 tomadas a intervalos periódicos de tiempo

Las células microgliales presentes en los cultivos de ERECs de E7 fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA) conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) (QH1-A488). El protocolo seguido para la obtención del complejo QH1-A488 se explica en el capítulo I de esta tesis. Para la realización del marcaje de las células microgliales *in vitro* se añadían 2 µl de QH1-A488 directamente sobre los explantes de retina una vez

que eran depositados sobre la membrana Millicell CM y se dejaban incubando durante 30 minutos (min) en una estufa de cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. A continuación, las placas de cultivo que contenían los ERECs inmunomarcados eran transferidas a una cabina de cultivo S-M (Pecon, Erbach, Germany) montada sobre una platina calefactora acoplada a un microscopio invertido de fluorescencia Leica DM IRB (Leica, Wetzlar, Germany). Los ERECs inmunomarcados eran mantenidos en estas condiciones durante 6 hiv adicionales, durante las cuales se realizaba el seguimiento de las células microgliales fluorescentes. Para analizar la entrada en la retina y la dinámica migratoria de las células microgliales marcadas con QH1-A488, se realizaron secuencias de imágenes tomadas cada 20 min durante un tiempo total de 6 horas, con la ayuda de una cámara digital DFC300 FX (Leica) y usando un objetivo 10x.

Análisis cuantitativo de la entrada y comportamiento migratorio de las células microgliales en la retina cultivada

La magnitud de la entrada de células microgliales en la retina fue calculada de la siguiente manera. En primer lugar se calculó el incremento en el número de células microgliales durante el periodo de observación, es decir durante 6 hiv. Para ello se realizaron recuentos de las células microgliales presentes al inicio (30 min *in vitro*) y al final de dicho periodo (6,5 hiv) en un total de 7 ERECs de E7. La diferencia entre ambos valores mostraba el incremento de células microgliales en ERECs de E7 durante 6 hiv. Teniendo en cuenta que este incremento podía deberse a dos factores, que son la entrada de nuevos precursores microgliales desde la CNO/BP y la proliferación de las células microgliales que migran tangencialmente en la retina, se realizó también un recuento de las células que se habían dividido durante el periodo de 6 hiv. Finalmente, el número de precursores microgliales que había entrado en la retina fue calculado como la diferencia entre el incremento total de células y el número de divisiones celulares para cada explante.

Para analizar el comportamiento dinámico de las células microgliales en los ERECs de E7 se realizaron dos tipos de estudio. En primer lugar se delinearon las trayectorias descritas por las células microgliales y, a continuación, se realizó un análisis estadístico de parámetros cinéticos de dichas trayectorias, tales como desplazamiento neto, desplazamiento neto absoluto y velocidad media. El desplazamiento neto es la distancia entre la posición inicial de cada célula, tomada a los

30 min *in vitro* (miv), y la posición final de la misma a las 6,5 hiv. Las células microgliales pueden mostrar un desplazamiento neto negativo, cuando se mueven en dirección centro-periférica, o positivo, cuando lo hacen en dirección periférico-central. El desplazamiento neto absoluto es el desplazamiento neto sin tener en cuenta la dirección del movimiento (es decir, el signo positivo o negativo). La velocidad media es la razón entre la longitud de la trayectoria descrita por la célula y el tiempo del cultivo. La longitud de las trayectorias y los parámetros anteriormente descritos se calcularon mediante el análisis de los movimientos de las células microgliales inmunomarcadas con QH1-A488 obtenidos a partir de secuencias de imágenes capturadas cada 20 min y con la ayuda del programa informático Adobe Photoshop 8.0. Con el fin de estudiar las posibles diferencias de las trayectorias y parámetros cinéticos entre diferentes regiones de los explantes, alrededor de la CNO/BP se delimitaron tres zonas de estudio concéntricas de 200 μm de anchura, que denominamos como zonas 1, 2 y 3, siendo la zona 1 la más cercana a la CNO/BP y la zona 3 la más alejada. Los valores medios obtenidos en cada zona se compararon entre sí mediante la prueba estadística de la t de Student.

RESULTADOS

Las células microgliales de ERECs de E7 entran en la retina desde la CNO/BP y migran tangencialmente en ella

En el presente estudio hemos utilizado cultivos organotípicos de ERECs de E7 para estudiar la entrada de células microgliales en la retina desde la región de la CNO/BP y su posterior migración tangencial en la misma. Después de 30 min (Fig. 1A), se observaba una pequeña población de células microgliales localizadas alrededor de la CNO/BP que mostraban morfologías alargadas y estaban orientadas en dirección centro-periférica, como es típico de las células microgliales que migran tangencialmente sobre la superficie vítrea retiniana (Carrasco et al., 2011; Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995; Capítulo I de esta Tesis). La región de la CNO/BP (delimitada con una línea discontinua en Fig. 1), aparecía marcada con QH1-A488 porque contiene precursores microgliales y vasos sanguíneos, y ambos se marcan con el anticuerpo QH1 (Cuadros et al., 1992). Tras 6,5 hiv (Fig. 1B), las células microgliales seguían mostrando el fenotipo alargado y orientado típico de células que migran tangencialmente, pero habían cambiado su posición dentro del explante y su número se había incrementado en un $26,18 \pm 10,38\%$ (comparar A y B en la Fig. 1). Estos resultados demostraban que, en ERECs de E7 que contienen CNO/BP, las células microgliales eran capaces de migrar en la retina, al menos durante las primeras 6,5 hiv.

Por otra parte, el incremento en el número de células microgliales observado *in vitro* podía ser debido a: 1) la entrada de nuevos precursores microgliales desde la región de la CNO/BP y/o 2) la proliferación de las células microgliales durante su migración tangencial en la superficie vítrea de la retina. Ambos procesos han sido previamente descritos en la retina embrionaria de codorniz *in situ* (Navascués et al., 1995; Marín-Teva et al., 1999b).

Para evaluar la primera posibilidad se realizó un análisis de secuencias de micrografías tomadas cada 20 min en una zona de transición entre la CNO/BP y la retina de ERECs de E7 (área enmarcada en la Fig. 2A). El resultado de este análisis reveló que las células microgliales eran capaces de entrar en la retina procedentes de la CNO/BP y migrar tangencialmente en la misma (Fig. 2B). Al inicio de las observaciones (tiempo 0 min), se observaban células QH1-positivas dentro de la región de la CNO/BP (situada a la izquierda de la imagen y delimitada con una línea

discontinua), con una morfología ameboide o redondeada que contrastaba con la morfología migratoria, alargada y polarizada, de la mayoría de células microgliales presentes en la retina adyacente. Además se observaban algunas células con una parte dentro de la región de la CNO/BP y otra dentro de la retina, como la señalada con un asterisco. Veinte minutos más tarde (tiempo 20 min), esta célula ya se localizaba completamente dentro de la retina y también había entrado otra célula, marcada con una flecha vacía. En las siguientes siete micrografías, tomadas cada 20 min, estas dos células migraban tangencialmente en la superficie vítrea de la retina, alternando movimientos hacia la periferia de la retina con movimientos hacia la CNO/BP y movimientos laterales. También había períodos en los que las células no migraban. Estas características del movimiento coinciden con las descritas en retinas *in situ*, a partir del análisis de imágenes estáticas de retinas fijadas (Marín-Teva et al., 1998). De forma paralela, durante los 160 min analizados, se produjo la entrada en la retina desde la CNO/BP de, al menos, otras tres células microgliales (señaladas en la Fig. 2B con una punta de flecha blanca, una punta de flecha vacía y una flecha blanca), las cuales también iniciaban su proceso de migración tangencial dentro de la retina. Hemos estimado que, en observaciones de ERECs de E7 durante un periodo de 6 hiv, el $11,70 \pm 7,01\%$ del número total de células microgliales observadas dentro de la retina habían entrado desde la CNO/BP durante el tiempo de observación y un $7,62 \pm 1,39\%$ procedían de la división de otras células que ya estaban dentro de la retina, aspecto que será analizado más adelante.

Con objeto de comprobar si el marcaje vital de las células microgliales con el complejo QH1-A488 afectaba a su comportamiento migratorio, se realizaron ERECs de los ojos derecho e izquierdo de varios embriones de E7 que se incubaron durante 6 hiv. El explante del ojo derecho de cada embrión era cultivado después de ser marcado con QH1-A488, mientras que el explante del ojo izquierdo se cultivaba sin ningún tratamiento y servía de control. Después de fijar los ERECs e inmunomarcarlos con el anticuerpo QH1, se comprobó que el número y distribución de células microgliales eran semejantes en los ERECs obtenidos de ojos derechos y en sus respectivos controles, demostrando que el marcaje vital de las células microgliales con QH1-A488 no afecta al comportamiento migratorio de las mismas en los ERECs (datos no mostrados).

Fig. 1. Aumento del número de células microgliales en explantes de retina embrionaria de codorniz de E7 después de 6 horas de incubación *in vitro*. Se muestran dos imágenes a bajo aumento de un mismo explante cultivado *in vitro* durante 30 min en presencia de QH1-A488 (**A**) y después de transcurridas 6 horas y media *in vitro* (**B**). Las células microgliales (inmunomarcadas vitalmente con QH1-A488) se distribuyen en una región de la retina localizada alrededor de la cabeza de nervio óptico-base del pecten (área delimitada por una línea discontinua) y muestran morfologías alargadas y orientadas centro-periféricamente. Se observa un claro incremento del número de células microgliales localizadas dentro de la retina después de 6 horas *in vitro* (comparar **A** y **B**). Barra de escala: 150 μm .

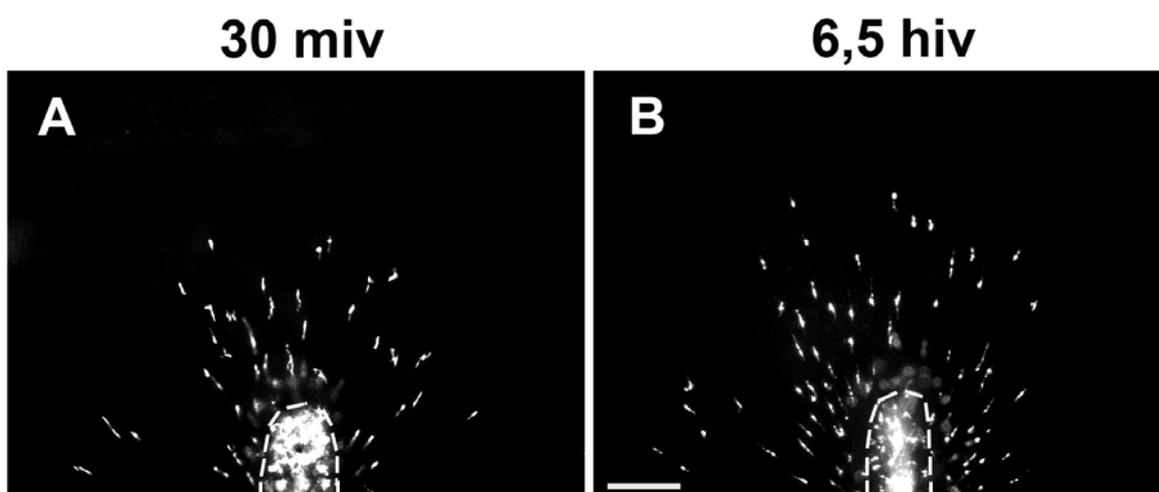
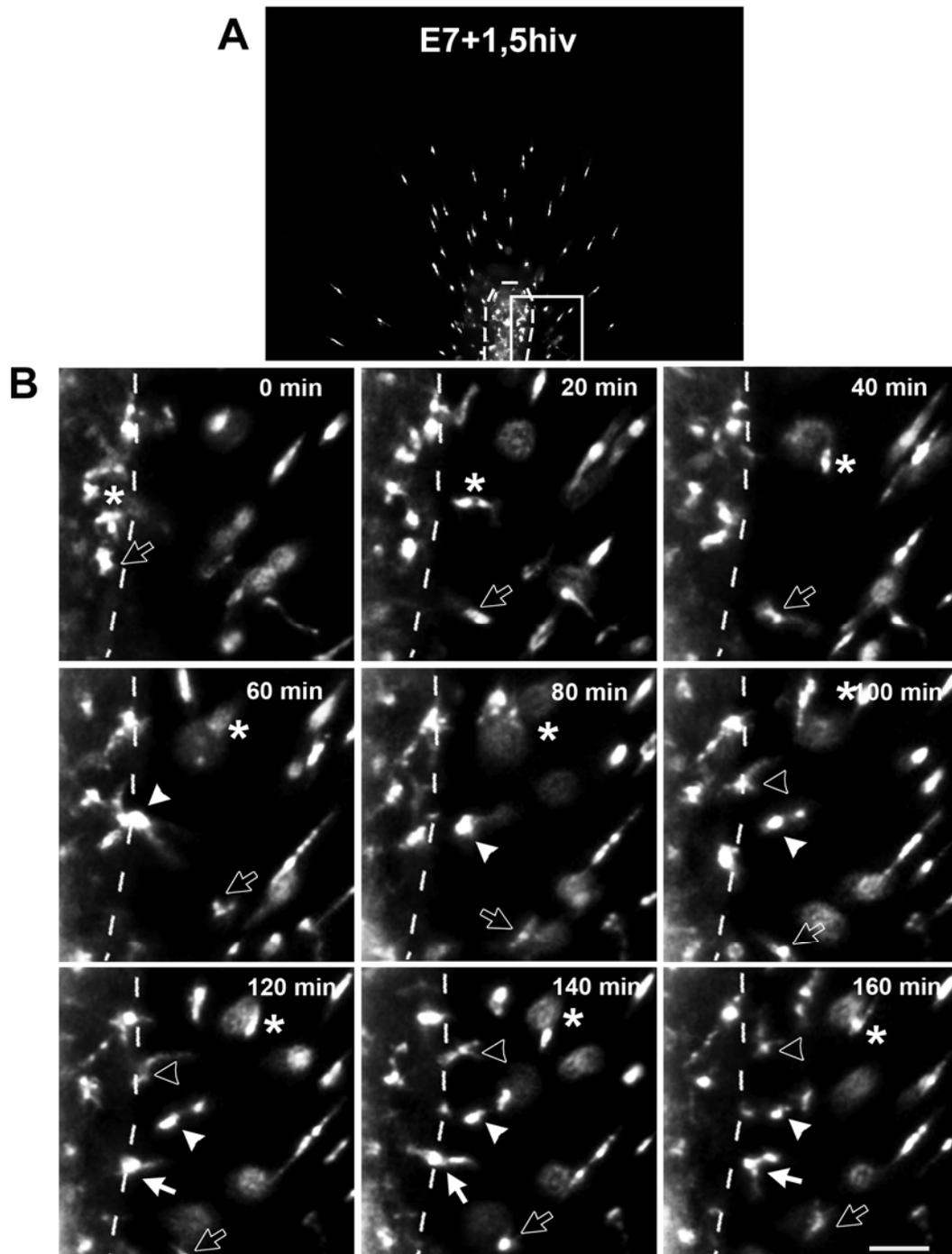


Fig. 2. Entrada de células microgliales en la retina procedentes de la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP) en un explante de retina embrionaria de codorniz de E7. A: Imagen a bajo aumento del explante cultivado durante 1,5 hiv en presencia de QH1-A488. La CNO/BP se ha delimitado con una línea discontinua. Las células microgliales, que muestran una morfología alargada, se localizan alrededor de la CNO/BP en la parte vítrea de la retina. **B:** Secuencia de imágenes del área encuadrada en **A** tomadas cada 20 minutos durante un tiempo total de 160 minutos de incubación *in vitro*. Durante este tiempo se observa la entrada en la retina de 5 células (señaladas con asterisco, flecha vacía, punta de flecha blanca, punta de flecha vacía y flecha blanca). Tras abandonar la CNO/BP, dichas células comienzan a migrar tangencialmente en la superficie vítrea de la retina, alternando periodos de movimiento con otros en los que no migran. Barra de escala: 150 μm en **A** y 42 μm en **B**.



Cinética del movimiento de las células microgliales en ERECs de E7

Para estudiar el comportamiento migratorio de las células microgliales, se analizaron las trayectorias descritas por las mismas durante un tiempo de 6 hiv en diferentes campos microscópicos de ERECs de E7 cultivados en presencia de QH1-A448. Como la colonización de la retina embrionaria de codorniz por las células microgliales avanza desde regiones centrales (alrededor de la CNO/BP) hacia la periferia (Navascués et al., 1995), la migración de las células microgliales en dirección centro-periférica era considerada como una migración hacia delante y la migración en sentido contrario, es decir periférico-central, como una migración hacia atrás. Las trayectorias descritas por las células microgliales eran variadas, con movimientos hacia delante, hacia atrás y laterales (Fig. 3A), tal como se había propuesto previamente en la retina *in situ* (Marín-Teva et al., 1998). El desplazamiento neto de las células analizadas (distancia entre la posición inicial de cada célula tomada a los 30 miv y la posición final a las 6,5 hiv), oscilaba entre -100 y +200 μm para la mayoría de las células, independientemente de la distancia que las separaba de la CNO/BP (Fig. 3B). La mayoría de células microgliales (más del 70%) mostraban desplazamientos netos con valores positivos (desplazamientos en dirección centro-periférica), mientras que casi el 30% de células tenían desplazamientos netos negativos (en dirección periférico-central) (Fig. 3B).

Un ejemplo de célula microglial con desplazamiento neto positivo aparece en la Fig. 4. Se observa como esta célula, situada inicialmente a 251 μm de la CNO/BP, alterna fases de migración en las que recorre distancias hacia delante (distancia positiva) o hacia atrás (distancia negativa) con fases estacionarias en las que no migra (Fig. 4B). La velocidad media de esta célula durante los 360 miv fue de 38,6 $\mu\text{m}/\text{hora}$. Como es lógico, el número de desplazamientos hacia delante de esta célula era significativamente mayor que el número de desplazamientos hacia atrás y la máxima distancia recorrida durante 20 min era hacia delante (60 μm entre 320 y 340 miv). Un ejemplo de célula microglial con una trayectoria migratoria con desplazamiento neto negativo se muestra en la Fig. 5. Se trata de una célula situada a 150 μm de la CNO/BP y se observa que el número de periodos de 20 min en los que ésta no migra es mayor que el observado en la célula de la Fig. 4. El máximo desplazamiento realizado en 20 min por la célula mostrada en la Fig. 5 era de 40 μm (entre los 100 y 120 miv) y lo realizaba hacia atrás. La velocidad media de esta célula durante los 360 miv era de 27,6 $\mu\text{m}/\text{hora}$.

Aunque las trayectorias descritas por las células microgliales en las diferentes zonas de la retina de ERECs de E7 eran muy variadas (con movimientos hacia delante, hacia atrás y laterales), las longitudes totales de las trayectorias realizadas por dichas células eran similares, variando entre 195 y 210 μm . Sin embargo, en zonas próximas a la CNO/BP, las células microgliales mostraban por lo general trayectorias con movimientos cortos y con desplazamientos netos pequeños y negativos. Por el contrario, las células más alejadas de la CNO/BP solían presentar trayectorias con desplazamientos netos grandes y positivos (Fig. 3A). Estos resultados sugerían que las células microgliales en los ERECs de E7 recorren distancias parecidas en todo el explante, pero con un desplazamiento neto y direccionalidad distintos según la zona del explante estudiada. Para verificar estos resultados, se delimitaron tres zonas de estudio (zonas 1, 2 y 3) concéntricas alrededor de la CNO/BP, con una anchura de 200 μm cada una. La zona 1 era la más cercana a la CNO/BP y la zona 3 la más alejada (Fig. 6A). El desplazamiento neto absoluto (desplazamiento neto sin tener en cuenta el signo) de las células microgliales presentes en cada una de las zonas delimitadas era significativamente mayor en la zona 2, con un valor medio de 68 μm , pudiendo alcanzar hasta 240 y 260 μm en algunas células. En contraste, en las zonas 1 y 3 los valores medios de los desplazamientos netos absolutos eran de aproximadamente 55 y 45 μm , respectivamente (Fig. 6B). Aunque, el desplazamiento neto absoluto variaba en función de la zona analizada, la velocidad media de las células microgliales durante la migración era semejante en las tres zonas establecidas, con valores medios entre 30 y 36 $\mu\text{m}/\text{hora}$ (Fig. 6C). La velocidad máxima, observada en una célula de la zona 2, era de 67 $\mu\text{m}/\text{hora}$. Para determinar la direccionalidad del movimiento de las células microgliales que migran en las tres zonas establecidas, se determinaron los porcentajes de células con desplazamiento neto negativo (dirección periférico-central) y con desplazamiento neto positivo (dirección centro-periférica). Los desplazamientos netos negativos eran significativamente más abundantes en la zona 1 que en la zona 2 y más abundantes en la zona 2 que en la zona 3 (Fig. 6D). Estos resultados indican que los desplazamientos netos negativos eran menos frecuentes a medida que las células se alejaban de la CNO/BP. Como es lógico, el porcentaje de desplazamientos netos positivos se incrementaba progresivamente desde la zona 1 a la 3 (Fig. 6E). Estos resultados demostraban que la dirección de la migración de una célula microglial en ERECs de E7 depende de la distancia que la separa de la CNO/BP.

Fig. 3. Trayectorias y desplazamientos netos de las células microgliales durante su migración en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. A: Cinetograma que representa las trayectorias seguidas por las células microgliales en ERECs de E7 durante 6 hiv. Dichas trayectorias son muy variadas y se componen de movimientos hacia delante, hacia atrás y laterales. En zonas próximas a la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP), las células muestran movimientos cortos y en todas las direcciones alrededor de la posición que ocupaban inicialmente. En zonas más alejadas de la CNO/BP, los desplazamientos de las células son más largos y en la mayoría de los casos siguen una dirección centro-periférica. Obsérvese que algunas células microgliales se dividen durante su migración y, una vez finalizado el proceso de división, las células hijas resultantes se mueven dibujando trayectorias que siguen direcciones opuestas (asteriscos). **B:** Representación gráfica del desplazamiento neto de las células microgliales en relación con su distancia a la CNO/BP. Los desplazamientos netos positivos (hacia la periferia de la retina) se muestran en azul y los negativos (hacia la CNO/BP) en rojo. La mayoría de los desplazamientos netos oscilan entre +200 y -100 μm , independientemente de la posición inicial de la célula en el explante. Los valores máximos de desplazamiento neto, por encima de 200 μm , corresponden a células que se encontraban inicialmente a una distancia entre 200 y 400 μm de la CNO/BP. Los desplazamientos netos negativos son generalmente de menor magnitud y son menos frecuentes a medida que las células están más alejadas de la CNO/BP.

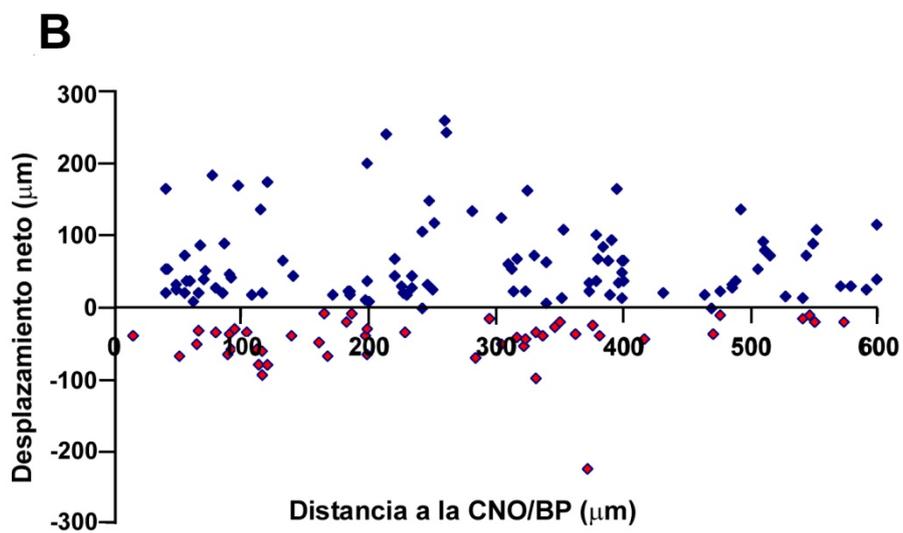
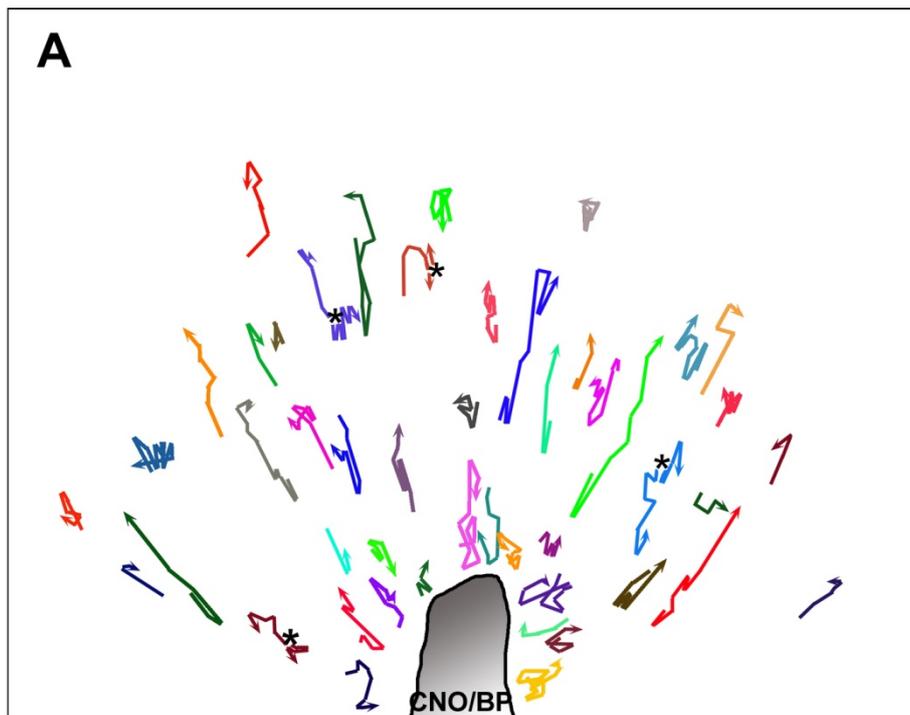


Fig. 4. Migración de una célula microglial que describe una trayectoria con desplazamiento neto positivo en un explante de retina embrionaria de codorniz (EREC) de E7. A: Sucesión de imágenes tomadas cada 20 minutos durante un tiempo de observación de 360 minutos en un campo microscópico de un EREC de E7 que muestra la migración de una célula microglial (flecha) con un desplazamiento neto positivo (en dirección centro-periférica). En las imágenes, el centro de la retina queda hacia la parte inferior y la periferia hacia la parte superior. A los 0 minutos, la célula microglial presenta un fenotipo elongado, con una fina prolongación celular apuntando hacia la periferia de la retina. Después de 20 minutos la célula microglial da un pequeño salto en dirección periférico-central y muestra un soma ovoide con un lamelipodio en el polo delantero de la célula (asterisco), orientado hacia la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP). La célula continúa migrando hacia el centro de la retina hasta los 100 minutos, momento en el que se detiene durante 20 minutos y a continuación reanuda su migración, pero esta vez en dirección centro-periférica. La célula continúa migrando hacia la periferia hasta los 360 minutos, con una única parada entre los 220 y los 240 minutos. Durante su migración la célula adopta la morfología típica de células que migran tangencialmente, es decir muestra una morfología elongada con lamelipodios orientados en la dirección de la migración (asteriscos). En la última imagen de **A** se muestra la trayectoria descrita por esta célula durante todo el periodo de tiempo analizado. **B:** Gráfica que muestra la distancia recorrida por la célula microglial observada en **A** en cada periodo de 20 minutos. Los valores positivos representan el movimiento hacia delante de la célula microglial (en dirección centro-periférica), mientras que los valores negativos representan movimientos hacia atrás (hacia la CNO/BP). Nótese que la célula microglial se mueve principalmente hacia delante, aunque durante los primeros 80 minutos realiza movimientos hacia atrás. La distancia total recorrida por la célula durante los 360 minutos es de 231,76 μm . Barra de escala: 70 μm .

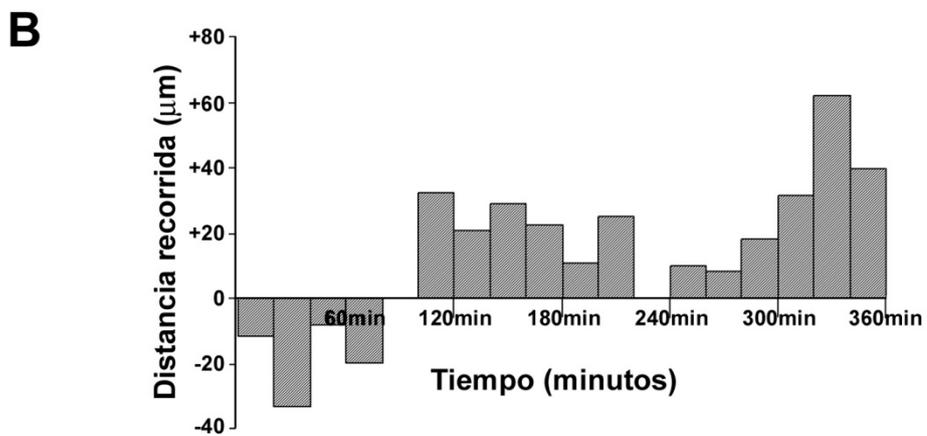
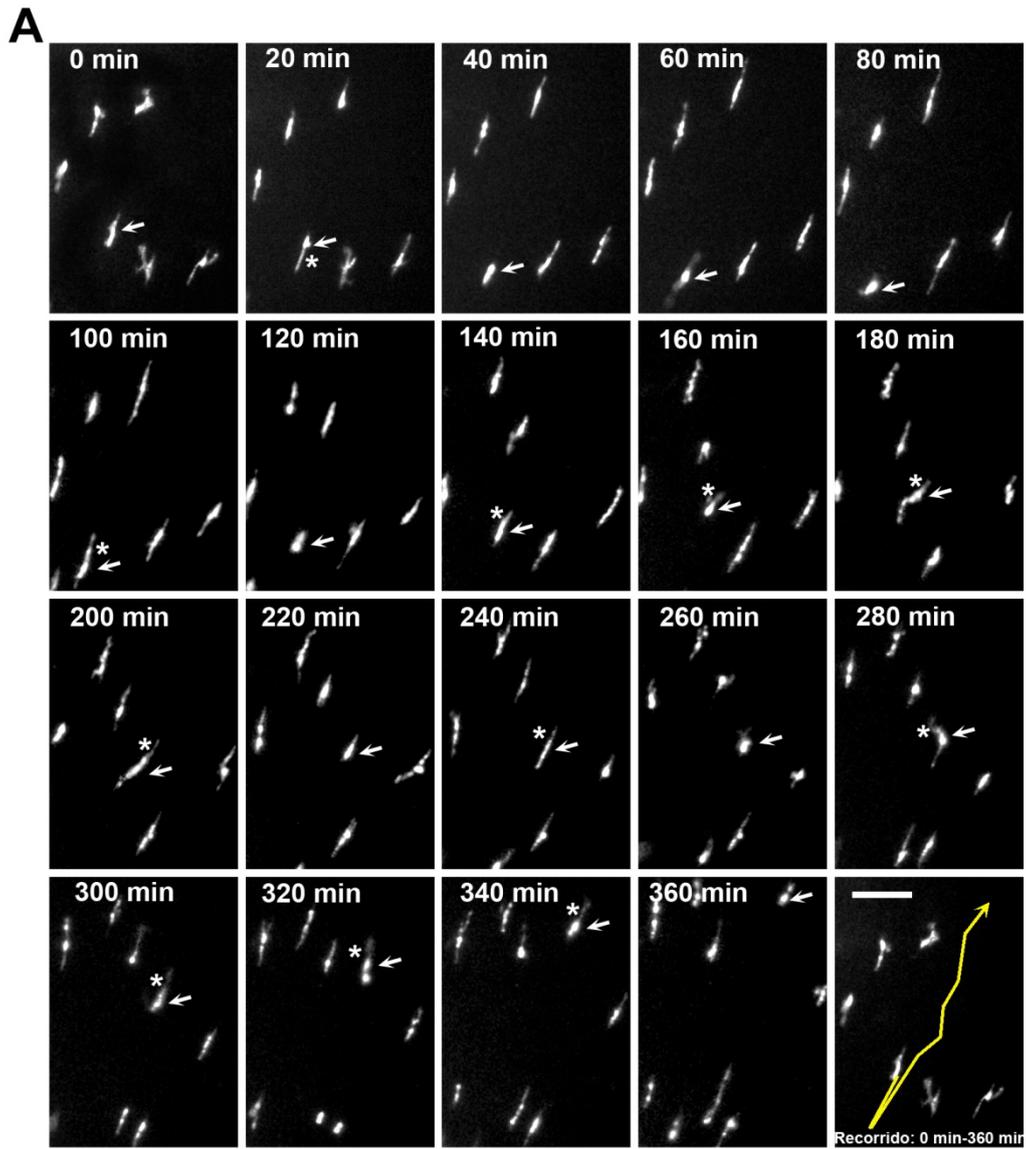


Fig. 5. Migración de una célula microglial que describe una trayectoria con desplazamiento neto negativo en un explante de retina embrionaria de codorniz (EREC) de E7. A: Sucesión de imágenes tomadas cada 20 minutos durante un tiempo de observación de 360 minutos en un campo microscópico de un EREC de E7 que muestra la migración de una célula microglial (flecha) con un desplazamiento neto negativo (en dirección periférico-central). El centro de la retina queda hacia la parte inferior de las imágenes y la periferia hacia la parte superior. A los 0 minutos, la célula señalada con la flecha presenta un soma alargado del que sale un lamelipodio dirigido hacia la periferia de la retina. Seguidamente, la célula empieza a migrar hacia la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP), cuyas inmediaciones alcanza a los 160 minutos. Durante este movimiento hacia atrás, la célula presenta una morfología alargada y polarizada, con un soma más o menos ovoide del que salen lamelipodios orientados en la dirección de la migración (asteriscos). Entre 180 y 360 minutos, la célula se localiza muy cerca de la CNO/BP y mantiene una morfología redondeada, alternando frecuentes periodos en los que está detenida con otros periodos en los que se desplaza hacia delante (hacia la periferia). En la última imagen de **A** se muestra la trayectoria descrita por esta célula durante el periodo de tiempo analizado. **B:** Gráfica que muestra la distancia recorrida por la célula microglial señalada en **A** en cada periodo de 20 minutos. Los valores positivos representan movimientos hacia delante de la célula microglial, mientras que los valores negativos representan movimientos hacia atrás (hacia la CNO/BP). Nótese que la célula microglial se mueve principalmente hacia atrás, aunque al final del periodo analizado también realiza algunos movimientos hacia delante. La distancia total recorrida por la célula durante los 360 minutos es de 166 μm . Barra de escala: 50 μm .

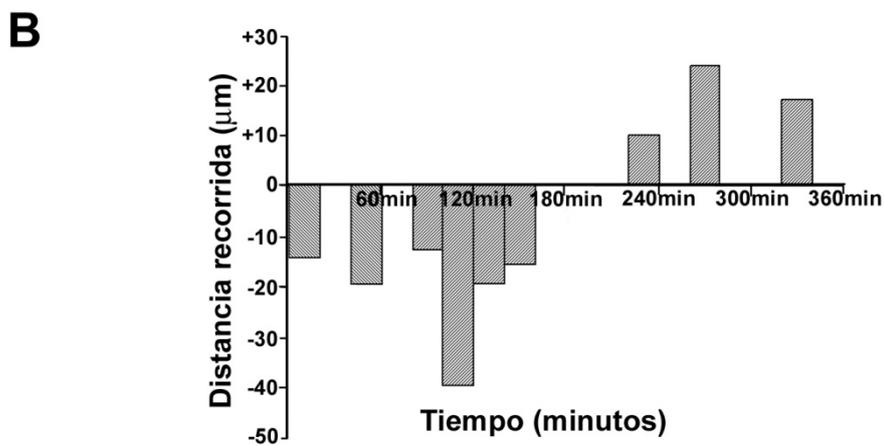
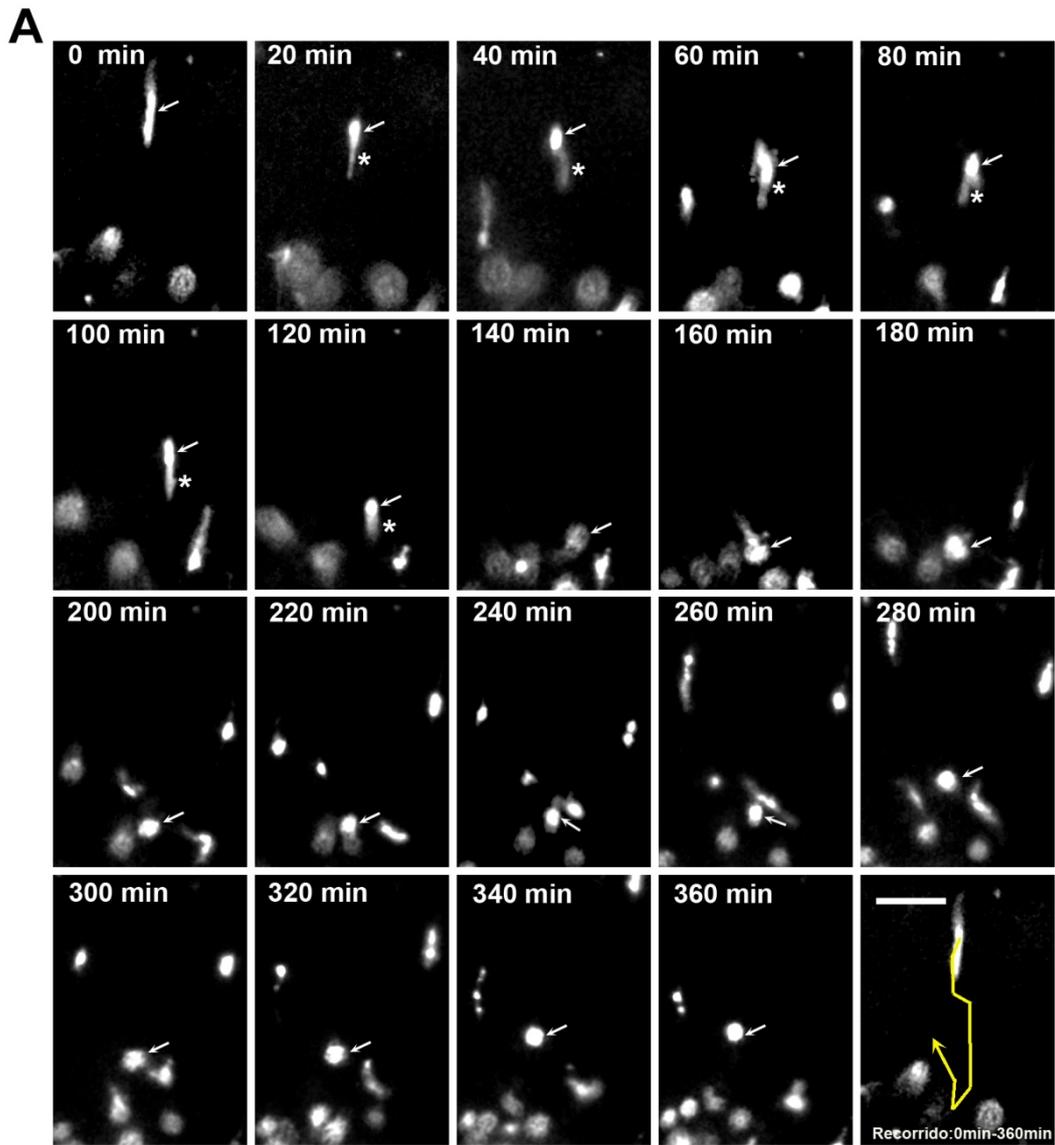
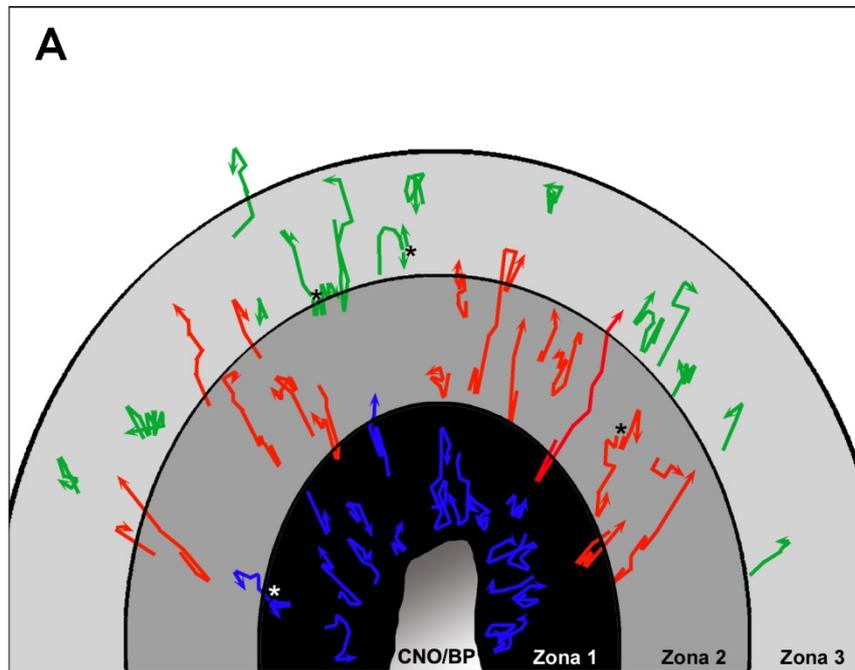
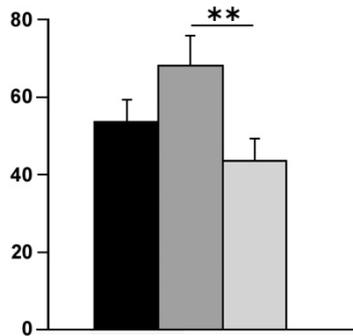


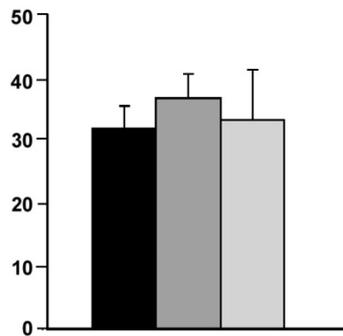
Fig. 6. Relación entre la cinética de las células microgliales que migran en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7 y la distancia que las separa de la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP). **A:** Cinetograma de las trayectorias descritas por las células microgliales que se muestran en la Fig. 3A en un EREC de E7 cuya superficie ha sido dividida en tres zonas concéntricas alrededor de la CNO/BP. Estas zonas, de 200 μm de anchura, se han denominado zona 1 (la más cercana a la CNO/BP), zona 2 (intermedia) y zona 3 (la más alejada de la CNO/BP). Las células de la zona 1 muestran trayectorias (en color azul) con desplazamientos cortos y en todas direcciones, pero con una longitud semejante a las descritas por las células microgliales de las zonas 2 (en rojo) y 3 (en verde), que presentan desplazamientos más largos y generalmente positivos. Los asteriscos indican células en división. **B, C, D, E:** Representación gráfica del desplazamiento neto absoluto (**B**), velocidad media (**C**), porcentaje de células con desplazamiento neto negativo (**D**) y porcentaje de células con desplazamiento neto positivo (**E**) en la zona 1 (barras negras), zona 2 (barras grises oscuras) y zona 3 (barras grises claras) de ERECs de E7. Las medias representadas en los histogramas se obtuvieron a partir de las medidas efectuadas sobre 60 células de cuatro explantes diferentes (15 células por zona y explante). La velocidad media no presenta diferencias significativas entre las diferentes zonas, mientras que el desplazamiento neto absoluto sí las presenta (dos asteriscos: $p < 0,01$). Además, el porcentaje de células con desplazamiento neto negativo es significativamente mayor en la zona 1 que en las zonas 2 (asterisco: $p < 0,05$) y 3 (dos asteriscos: $p < 0,01$), mientras que el porcentaje de células con desplazamiento neto positivo es significativamente menor en la zona 1 que en las otras dos zonas.



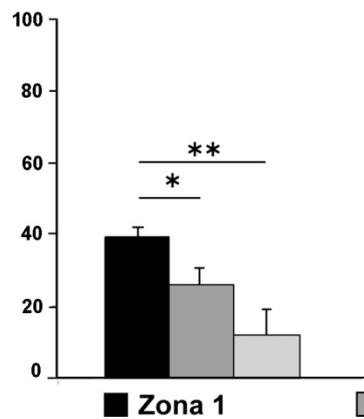
B Desplazamiento neto absoluto (μm)



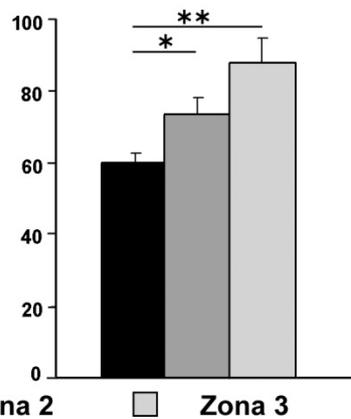
C Velocidad media ($\mu\text{m}/\text{hora}$)



D % Células microgliales con desplazamiento neto negativo



E % Células microgliales con desplazamiento neto positivo



■ Zona 1 ■ Zona 2 ■ Zona 3

División de las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 cultivados durante 6,5 hiv

El análisis de las trayectorias de las células microgliales que migran en ERECs de E7 cultivados demostró que algunas células se dividían durante el proceso de migración tangencial (asteriscos en Fig. 3A). Por lo general, las dos células hijas resultantes se movían describiendo trayectorias con direcciones opuestas, lo que coincide con lo sugerido en retinas embrionarias de codorniz *in situ* (Marín-Teva et al., 1999b). El porcentaje medio de células microgliales que se dividen en ERECs de E7 incubados durante 6,5 hiv era de un 7,62%, aunque este porcentaje variaba dependiendo de la zona analizada (Fig. 7). Así, el mayor porcentaje medio de divisiones celulares correspondía a la zona 3 (45 %), mientras que en las zonas 1 y 2 los porcentajes medios eran de 3,12% y 12,37%, respectivamente. Es decir, el porcentaje de células microgliales que se dividen era mayor a medida que éstas se alejaban de la CNO/BP.

En la Fig. 8 se muestra el comportamiento migratorio de una célula microglial que entra en mitosis durante su proceso de migración tangencial. Se trata de una célula localizada inicialmente (0 min) en la zona 3, a 446 μm de la CNO/BP. Esta célula se redondeaba y detenía su migración durante los primeros 100 min, dando lugar posteriormente a dos células hijas que comenzaban a migrar en direcciones opuestas, de tal manera que una célula hija mostraba un desplazamiento neto positivo y la otra tenía un desplazamiento neto negativo. Curiosamente, una de las dos células hijas (célula 2) no cambiaba prácticamente su posición durante el tiempo de observación, ya que realizaba desplazamientos positivos y negativos que se compensaban entre sí, mientras que la otra célula hija (célula 1) se alejaba significativamente mediante desplazamientos mayoritariamente positivos.

Fig. 7. Porcentajes de células microgliales que sufren división en diferentes zonas de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7 cultivados durante 6,5 hiv. Las barras negra, gris oscura y gris clara corresponden a los porcentajes de células microgliales que se dividen en las tres zonas representadas en la Fig. 6A. En cada zona se estudiaron 60 células de cuatro explantes diferentes, es decir 15 células por zona y explante. El porcentaje de divisiones celulares es significativamente mayor en la zona 3 que en la zonas 2 (asterisco: $p < 0,05$) y 1 (dos asteriscos: $p < 0.01$). Aunque no existen diferencias significativas entre las zonas 1 y 2, se observa que el porcentaje de divisiones celulares aumenta a medida que las células microgliales se alejan de la cabeza del nervio óptico/base del pecten.

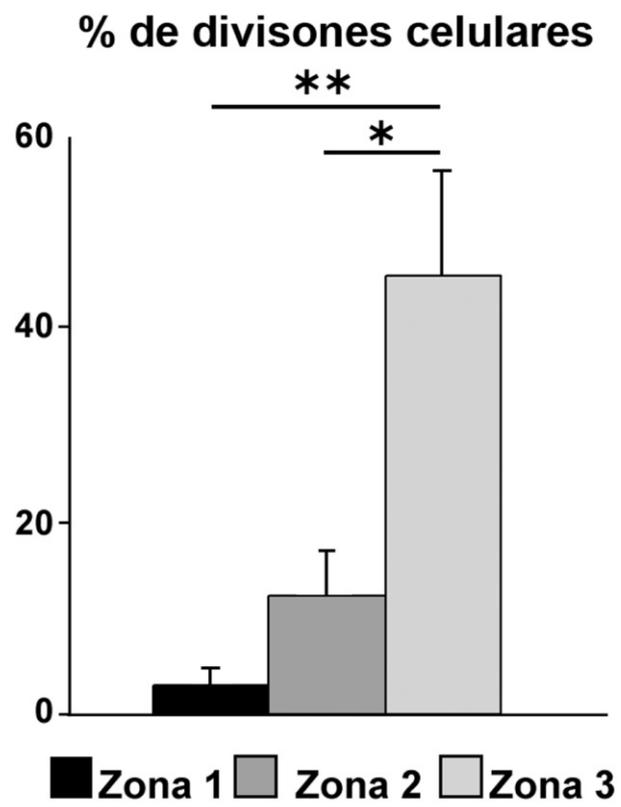
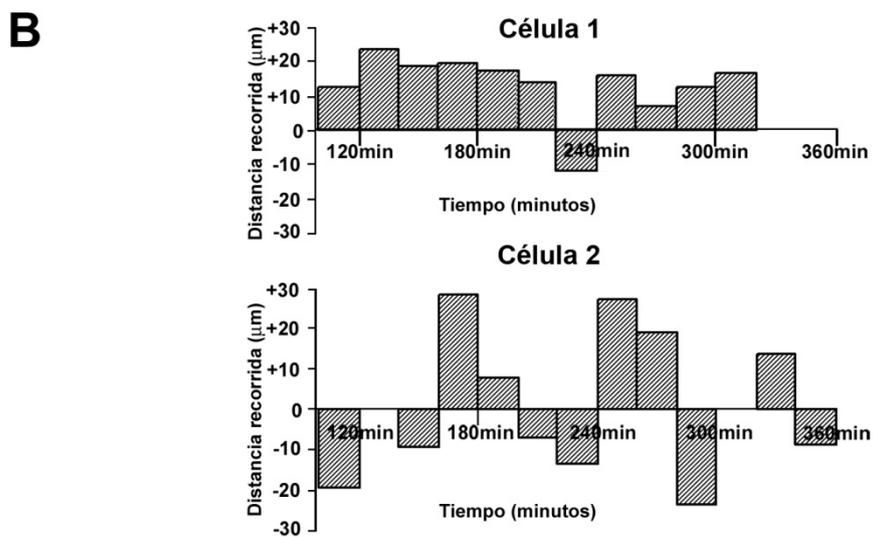
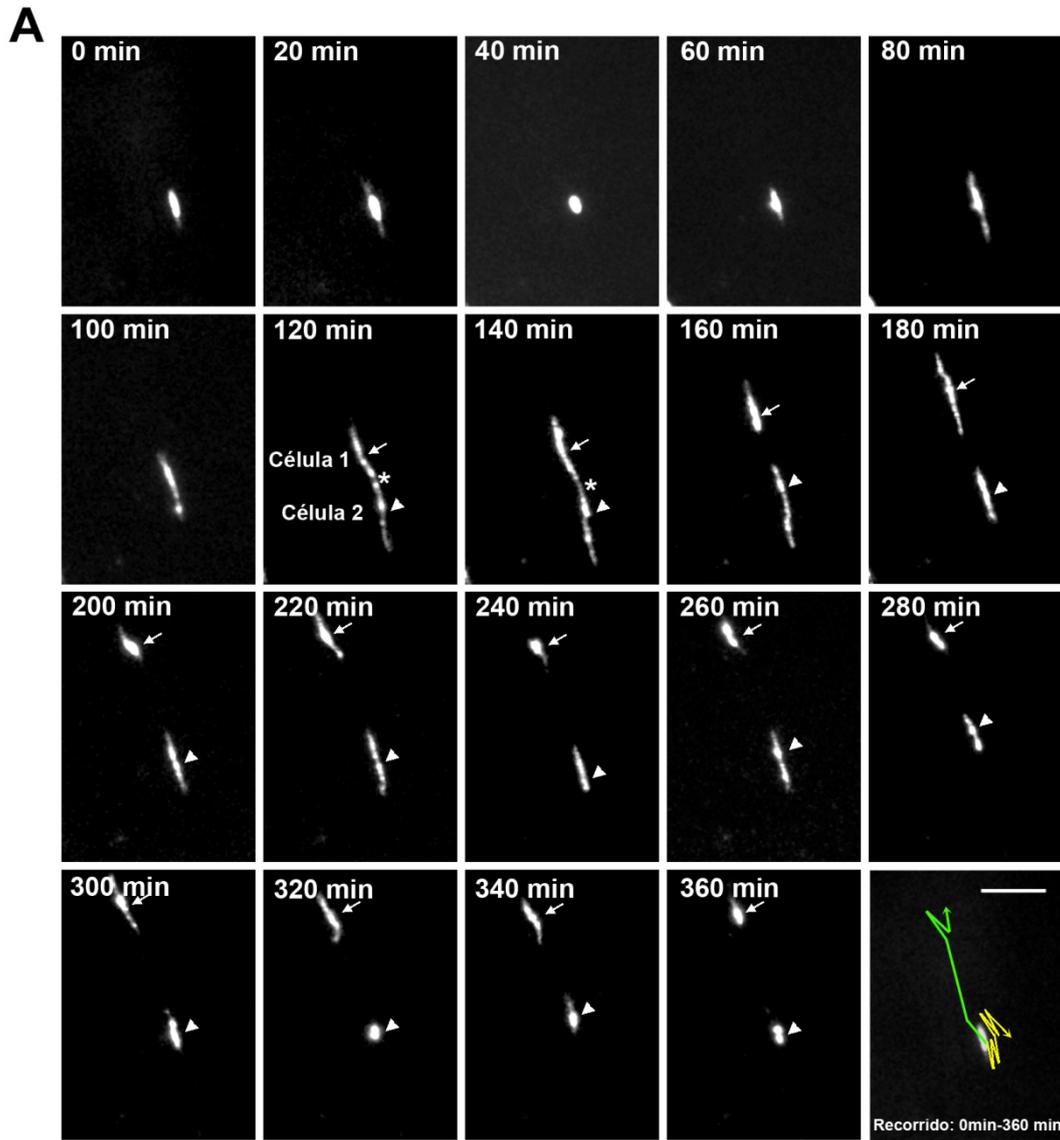


Fig. 8. División de una célula microglial en migración en un explante de retina embrionaria de codorniz (EREC) de E7. **A:** Secuencia de micrografías tomadas cada 20 minutos durante 6 hiv de una célula localizada en la zona 3 de un EREC de E7 situada a 446 μm de la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP). El centro de la retina se sitúa hacia la parte inferior de las imágenes y la periferia hacia la parte superior. Al inicio de la observación (minuto 0), la célula tiene un soma ligeramente alargado, que se redondea a los 40 minutos y vuelve a elongarse entre 60 y 100 minutos. A los 120-140 minutos, comienzan a distinguirse dos somas (flecha y cabeza de flecha) unidos mediante un delgado filamento (asterisco), que corresponderían a dos células hijas (célula 1 y célula 2), procedentes de la división de la célula inicial, unidas por un puente de citocinesis. Las dos células hijas muestran un soma alargado y polarizado, con lamelipodios en sus extremos que les permiten reanudar su migración incluso antes de estar separadas por completo. A los 160 minutos, las dos células hijas ya están totalmente separadas y continúan migrando en direcciones opuestas entre 160 y 360 minutos. En la última imagen de **A** se representan las trayectorias seguidas por las dos células hijas entre 120 y 360 minutos. **B:** Representación esquemática de los desplazamientos realizados cada 20 minutos por las dos células hijas observadas en **A** durante el periodo comprendido entre 120 y 360 minutos. Los valores positivos representan desplazamientos hacia delante (en dirección centro-periférica) de la célula, mientras que los valores negativos representan desplazamientos hacia atrás (hacia la CNO-BP). El análisis de las distancias recorridas por ambas células demuestra que la célula 1 tiene desplazamientos positivos sostenidos, que le permiten moverse rápidamente en dirección centro-periférica, mientras que la célula 2 se mantiene en una posición cercana a su localización inicial, ya que alterna desplazamientos positivos y negativos. Barra de escala: 50 μm .



DISCUSIÓN

Los cultivos organotípicos de ERECs de E7 que contienen la parte dorsal de la CNO/BP constituyen un excelente modelo experimental para el estudio de las fases iniciales de la colonización de la retina por los precursores de células microgliales. Dicha colonización consta de las siguientes etapas: 1) entrada en la retina desde la región de la CNO/BP, que comienza en E7 en la retina *in situ* (Navascués et al., 1995); 2) migración tangencial de las células microgliales en la parte vítrea de la retina desde regiones centrales hacia regiones periféricas (Marín-Teva et al., 1998, 1999a; Navascués et al., 1995); y 3) división celular de las células microgliales de manera simultánea a la migración (Marín-Teva et al., 1999b).

Nuestros resultados en estos cultivos demuestran que los precursores microgliales son capaces de entrar en la retina desde la región de la CNO/BP. Seguidamente migran tangencialmente dentro de la retina siguiendo trayectorias con desplazamientos hacia delante, hacia atrás y laterales de un modo que coincide con el deducido a partir de las observaciones realizadas en la retina embrionaria *in situ* (Marín-Teva et al., 1998, 1999a; Navascués et al., 1995). Así mismo, algunas células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 detienen temporalmente su migración para dividirse, como habíamos descrito previamente en la retina *in situ* (Marín-Teva et al., 1999b). Finalmente, un hallazgo importante ha sido que el comportamiento migratorio y la frecuencia de divisiones de las células microgliales varían dependiendo de la distancia entre las células y la CNO/BP.

Entrada en la retina de precursores microgliales procedentes de la región de la CNO/BP en ERECs de E7

Desde los primeros estudios de del Rio-Hortega se acepta de forma casi general que los precursores de las células microgliales son de origen mesodérmico que entran y colonizan el SNC durante el desarrollo, transformándose posteriormente en células microgliales ramificadas maduras (Chan et al., 2007; Cuadros & Navascués, 1998; del Rio-Hortega, 1932; Prinz & Mildner, 2011). Se han descrito varios linajes celulares y diferentes vías de entrada en el SNC de los precursores microgliales, que varían según la especie, región del SNC y momento del desarrollo estudiados, por lo que el origen de la microglía sigue siendo un tema controvertido. La idea más antigua, apoyada también

por trabajos recientes, es que los precursores microgliales son células de origen hematopoyético que entran en el parénquima nervioso desde las meninges, los ventrículos y los plexos coroideos (Boya et al., 1987, 1991; Cuadros et al., 1994, 1997; del Rio-Hortega, 1932; Hess et al., 2004; Swinnen et al., 2012; Verney et al., 2010). Otros autores han demostrado que al menos algunas células microgliales proceden de macrófagos primitivos originados en el saco vitelino que invaden el SNC durante el desarrollo temprano, antes de la formación de los vasos sanguíneos (Alliot et al., 1991, 1999; Cuadros et al., 1992, 1993; Ginhoux et al., 2010; Herbomel et al., 2001; Mizutani et al., 2012) o de células monocíticas circulantes que, en etapas más avanzadas del desarrollo, atraviesan el endotelio de los vasos sanguíneos y entran en el parénquima nervioso para transformarse en la población de macrófagos residentes del SNC (Ling, 1979, 1981; Ling et al., 1980; Ling & Wong, 1993). Estos diferentes orígenes de las células microgliales podrían no ser excluyentes, lo que daría lugar a una población heterogénea de células microgliales maduras, probablemente con diferentes capacidades funcionales, tal como han sugerido algunos autores (Chen et al., 2010; Hanisch & Kettenmann, 2007; Olah et al., 2011; Prinz et al., 2011; Provis et al., 1996).

En la retina de codorniz que, como sucede en otras aves, es la única región del SNC que carece de vasos sanguíneos, las células microgliales entran durante el desarrollo embrionario desde la región de la CNO/BP a partir de E7 (Marín-Teva et al., 1999a; Navascués et al., 1995). El pecten es una estructura alargada y vascularizada en forma de peine que se proyecta sobre el vítreo en el lado opuesto de la cabeza del nervio óptico. Su función es la nutrición de la retina avascular y se adhieren en su superficie una gran cantidad de macrófagos del vítreo (hialocitos). A partir de las observaciones realizadas en estudios anteriores de nuestro laboratorio, hemos propuesto tres posibles orígenes no excluyentes para los precursores microgliales que entran en la retina desde la CNO/BP: 1) hialocitos adheridos a la superficie del pecten que atravesarían la lámina basal para posteriormente migrar hasta la base del pecten; 2) monocitos que entrarían desde los vasos sanguíneos del pecten (compatible con la hipótesis del origen monocítico de la microglía); y 3) células de origen hematopoyético o macrófagos que se localizarían en la cabeza del nervio óptico desde edades más tempranas del desarrollo. La entrada de células microgliales observada en ERECs de E7 cultivados *in vitro* es compatible con la tercera posibilidad, pero no con la primera y segunda, ya que al confeccionar los explantes de retina se elimina el vítreo (que contiene hialocitos) y la

mayor parte del pecten, interrumpiéndose la circulación en los vasos sanguíneos de éste, que impide una posible entrada de monocitos. No obstante, estos resultados no permiten afirmar que la cabeza del nervio óptico sea la única fuente de células microgliales de la retina embrionaria de codorniz. De hecho, algunos estudios en otras especies, como ratón y rata, apoyan el origen de las células microgliales retinianas a partir de macrófagos del vítreo. Estos estudios han descrito la presencia de numerosos hialocitos adheridos a la superficie vítrea de la retina *in situ*, algunos de los cuales parecían estar atravesando la lámina basal para entrar en la retina (Ashwell et al., 1989; Santos et al., 2008).

En cuanto a los factores implicados en la entrada de las células microgliales en el SNC inmaduro continúan siendo desconocidos en la actualidad. De forma clásica, se relacionaba la entrada de células microgliales con la muerte celular que tiene lugar de forma natural en el SNC durante el desarrollo (Ashwell, 1990, 1991; Moujahid et al., 1996; Perry et al., 1985; Perry & Gordon, 1991). Según esta hipótesis, los precursores microgliales se verían atraídos hacia el parénquima nervioso por los restos de células muertas, que fagocitarían posteriormente para eliminarlos. Aunque es frecuente observar células microgliales inmaduras en contacto con células en proceso de muerte o restos celulares, la relación entre la entrada de precursores microgliales en el SNC y la muerte celular no se ha podido demostrar en ningún estudio, incluido un trabajo previo de nuestro grupo en retina embrionaria de codorniz (Marín-Teva et al., 1999a). También se ha propuesto la implicación de otros factores en la entrada de la microglía inmadura en el SNC, entre los que se encuentran moléculas de adhesión, como los sistemas receptor-ligando LFA-1 / I-CAM-1 (Dalmau et al., 1997) y PECAM / ICAM-2 (Rezaie et al., 1997), o quimioquinas, como MCP-1 y RANTES (revisado en Rezaie & Male, 1999). El hecho de que se produzca la entrada de células microgliales en ERECs de E7 cultivados *in vitro* indica que las moléculas e interacciones celulares necesarias para dicha entrada seguirían estando presentes en estos cultivos. Por lo tanto, los ERECs de E7 podrían constituir en el futuro una excelente herramienta para la realización de estudios experimentales sobre los factores implicados en la colonización del SNC por precursores microgliales durante el desarrollo. Además, el conocimiento de estos factores ayudaría a entender el mecanismo de entrada de nuevas células microgliales que se produce en patologías del SNC en desarrollo y maduro.

Mecanismos que regulan la migración de las células microgliales en ERECs de E7

Los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de las células microgliales (mediante su inmunomarcaje vital con QH1-A488 y captura de imágenes a lapsos de tiempo) en ERECs de E7 cultivados durante 6,5 hiv han puesto de manifiesto el mecanismo de migración tangencial de las células microgliales en la superficie vítrea de dichos explantes. Este mecanismo consiste en la polarización del soma celular en la dirección de la migración, la extensión de prolongaciones con lamelipodios en la parte delantera de la célula, la traslocación del soma hacia delante y la retracción de prolongaciones dirigidas en otras direcciones así como de la parte trasera. Esta forma de migración coincide con la observada en ERECs de E9 (Capítulo I de esta Tesis y Carrasco et al., 2011) y con la propuesta en la retina *in situ* (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995). Además, se ha demostrado que, aunque en conjunto la colonización microglial de la retina se produce en dirección centro-periférica, las trayectorias de las células son muy irregulares y variadas e incluyen desplazamientos hacia la periferia, hacia el centro y hacia los lados que alternan con periodos estacionarios en los que las células no se desplazan. Este comportamiento migratorio también coincide con el modelo propuesto previamente en la retina *in situ* (Marín-Teva et al., 1998). De ahí que los cultivos de ERECs de E7 constituyan un excelente modelo para el estudio de la migración fisiológica de las células microgliales inmaduras en la retina de codorniz.

Los cultivos organotípicos de diferentes regiones del SNC de roedores han sido utilizados previamente para el estudio de la migración celular de las células microgliales (Carbonell et al., 2005; Czapiga & Colton, 1999; Grossmann et al., 2002; Hailer et al., 1997; Heppner et al., 1998; Kurpius et al., 2006, 2007; Petersen & Dailey, 2004; Stence et al., 2001; Swinnen et al., 2012). Sin embargo, excepto el último estudio que describe la invasión inicial de la corteza cerebral embrionaria de ratón por células microgliales, estos trabajos muestran el comportamiento migratorio de células microgliales activadas (discutido en el Capítulo I de esta Tesis y Carrasco et al., 2011). Por lo tanto, sus resultados, aunque aportan valiosos datos sobre el mecanismo de migración de estas células, no pueden ser extrapolados a la migración fisiológica de los precursores microgliales en el SNC *in situ*. En contraste, existen numerosos trabajos con cultivos organotípicos que han permitido importantes descubrimientos sobre la migración fisiológica de otros tipos celulares del SNC en desarrollo que no reaccionan tan

rápidamente como las células microgliales. Entre los tipos celulares que migran con aparente normalidad en cultivos organotípicos están las neuronas (Bellion et al., 2005; Fishell & Hatten, 1991; Kakita & Goldman, 1999; Komuro et al., 2001; Komuro & Rakic, 1995, 1998; Martini et al., 2009; Nadarajah et al., 2001, 2002, 2003; O'Rourke et al., 1992) y los oligodendrocitos (Tsai et al., 2009). Las neuronas inmaduras, originadas en la zona ventricular del tubo neural, se diseminan en las diferentes regiones del SNC mediante un mecanismo de migración dividido en tres etapas (revisado en Marín et al., 2010). En la primera, la célula extiende una prolongación delantera que se puede bifurcar o no dependiendo del tipo de neurona. La extensión de este proceso hace que la célula muestre una morfología altamente polarizada en la dirección de la migración. En una segunda etapa se produce la traslocación del núcleo celular dentro de la prolongación delantera (nucleoquinesis). Dicha traslocación tiene lugar de forma muy rápida (movimiento saltatorio). En la tercera etapa, la neurona elimina la prolongación trasera resultante tras la traslocación nuclear, consiguiendo el movimiento neto de la célula. La sucesión cíclica de estas tres etapas hace que las neuronas muestren un modo de migración saltatoria, con cambios bruscos en su morfología que les permiten dar rápidos saltos que alternan con fases estacionarias. Una migración saltatoria similar ha sido descrita en precursores de oligodendrocitos que migran en cultivos organotípicos de médula espinal de ratón en desarrollo (Tsai et al., 2009). No obstante, Tsai y colaboradores han descrito un segundo modo de migración de precursores de oligodendrocitos, que han llamado exploratorio. Esta migración exploratoria se caracteriza por la formación de prolongaciones celulares con lamelipodios que exploran el sustrato, en una de las cuales el núcleo y el citoplasma circundante va fluyendo mediante traslocación lenta y continua. Por lo tanto, en la migración exploratoria no se observan cambios bruscos en la morfología de la célula durante su desplazamiento, como los observados en la migración saltatoria.

Nuestras observaciones demuestran que las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 muestran trayectorias muy irregulares, con desplazamientos hacia delante, hacia atrás y hacia los lados aparentemente al azar, es decir migran de una manera estocástica. La finalidad de esta migración estocástica parece ser la exploración del microambiente, por lo que sería equivalente a la migración exploratoria de los oligodendrocitos. Las características del movimiento de las células microgliales que migran en ERECs de E9 desprovistos de CNO/BP (Capítulo I de esta

Tesis; Carrasco et al., 2011) también son compatibles con una migración exploratoria y estocástica. Además, este tipo de migración explica satisfactoriamente las observaciones realizadas en las células microgliales de retinas embrionarias *in situ* (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995). En cultivos organotípicos de cerebro de ratón adulto previamente lesionado, también se ha descrito una migración estocástica de las células microgliales activadas que se mueven hacia la zona dañada (Carbonell et al., 2005). Por lo tanto, cuando las células microgliales se mueven dentro del SNC, ya sea durante el desarrollo o tras su activación en el adulto, siempre parecen hacerlo mediante un mecanismo de migración exploratoria y estocástica.

En este capítulo hemos demostrado que la velocidad media de las células microgliales que migran en los ERECs de E7 cultivados *in vitro* se mantiene más o menos constante en todo el explante, independientemente de las trayectorias descritas por las mismas. Dicha velocidad media ha sido estimada en 35 $\mu\text{m/h}$, con valores máximos de 50 $\mu\text{m/h}$. Esta velocidad es similar a la mostrada por las células microgliales que migran en cultivos organotípicos de cuerpo caloso de ratón postnatal (Brockhaus et al., 1996), las que invaden la corteza cerebral durante el desarrollo embrionario de ratón (Swinnen et al., 2012) y las procedentes de cerebro humano cultivadas *in vitro* sobre astrocitos (Rezaie et al., 2002). Sin embargo, dicha velocidad es muy diferente de la mostrada (300 $\mu\text{m/h}$) por la microglía activada que migra hacia una zona lesionada en cultivos organotípicos de cerebro (Carbonell et al., 2005). Estas diferencias en la velocidad de migración sugiere que los mecanismos celulares y moleculares que regulan el movimiento de las células microgliales dependen tanto de características celulares intrínsecas como de señales presentes en el microambiente celular, que podrían ser diferentes dependiendo de la especie, región del SNC y modelo experimental utilizado. Por otra parte, las células microgliales migran tangencialmente tanto en ERECs de E7 que contienen CNO/BP como en explantes de retina central de E9 desprovista de CNO/BP (Capítulo I de esta Tesis; Carrasco et al., 2011). Esto indica que las moléculas que controlan la migración de las células microgliales no se expresan ni en la CNO/BP ni en la retina periférica, puesto que la migración sigue teniendo lugar cuando estas regiones son eliminadas. Además, el hecho de que las células microgliales sigan migrando en dirección centro-periférica en los dos tipos de explantes cultivados sugiere que no hay gradientes de moléculas solubles implicados en la orientación de la migración, ya que no es razonable suponer que dichos gradientes se pudieran mantener

en nuestro modelo experimental *in vitro*. En conjunto, todos estos datos sugieren que la migración tangencial de las células microgliales en la retina embrionaria de codorniz estaría regulada por factores intrínsecos de las propias células, implicados en su polarización y migración (que se discuten el capítulo III de la presente tesis), y por factores externos del microambiente en el que se mueven. Entre los factores microambientales que participan en la migración de diferentes tipos celulares, se ha prestado especial atención a la inhibición por contacto y a la topografía orientada de la matriz extracelular (Carmona-Fontaine et al., 2008; Grande-García et al., 2007; Huttenlocher., 2005; Lauffenburger et al., 1996; Petrie et al., 2009; Ridley et al., 2003).

Inhibición por contacto

El concepto de inhibición por contacto fue introducido por Abercrombie en los años 50 (Abercrombie & Heaysman, 1953, 1954) para describir el comportamiento migratorio de los fibroblastos en cultivo, los cuales retraen sus prolongaciones celulares y cambian la dirección de su migración cuando contactan entre sí. Así, las células consiguen migrar en una dirección determinada en ausencia de factores quimiotácticos. Este modo de migración también ha sido descrito en neuronas (Ayala et al., 2007; Borrell & Marín, 2006; Risau & Flamme, 1995) y células de la cresta neural (Carmona-Fontaine et al., 2008). Nuestros resultados han aportado evidencias que sugieren la existencia de un mecanismo similar durante la migración tangencial de las células microgliales en ERECs. Una primera evidencia es que las células microgliales que migran tangencialmente muestran morfologías muy variadas, con prolongaciones provistas de lamelipodios dirigidos en diferentes direcciones, pero cada célula parece ocupar un territorio que no se solapa con el de las vecinas. Si no existiese inhibición por contacto se observarían solapamientos entre las células microgliales que están migrando. Una segunda evidencia a favor de la existencia de inhibición por contacto deriva de la captación de series de imágenes de células concretas a cortos intervalos de tiempo (cada 20 minutos). En estas series de imágenes se observa que las células microgliales extienden lamelipodios transitorios en diferentes direcciones, que son rápidamente retraídos cuando contactan con otra célula microglial vecina (Capítulo I de esta Tesis; Carrasco et al., 2011).

La inhibición por contacto explicaría las diferencias observadas en el desplazamiento neto y en las trayectorias de las células microgliales que migran en

ERECs de E7, dependiendo de la zona del explante en la que se localizan. Concretamente, en zonas cercanas a la CNO/BP, las células microgliales muestran trayectorias con desplazamientos netos pequeños y frecuentemente negativos, a diferencia de las células más alejadas de la CNO/BP, que presentan trayectorias con desplazamientos netos frecuentemente grandes y positivos. Estas diferencias se explican si tenemos en cuenta que en las regiones cercanas a la CNO/BP la densidad de células microgliales es mucho más elevada (puesto que están entrando desde la CNO/BP) que en zonas más alejadas. Por lo tanto, en las zonas próximas a la CNO/BP, cada célula dispone de menos espacio para realizar sus movimientos, dando como resultado un pequeño desplazamiento neto en cortos periodos de tiempo. Además, las células de estas regiones cercanas a la CNO/BP tampoco podrían migrar con facilidad hacia la periferia porque establecerían contactos con las células de la zona intermedia que impedirían un avance rápido en esa dirección. Por el contrario, la densidad de células microgliales es menor en regiones más alejadas de la CNO/BP, por lo que éstas podrían realizar desplazamientos más largos sin ocupar el territorio de células vecinas. Así, las células microgliales que se encuentran en el frente de avance tienden a moverse en dirección centro-periférica, donde no encuentran células vecinas que obstaculicen su movimiento, que sí van a encontrar hacia atrás y hacia los lados. En resumen, la inhibición por contacto explica el avance en dirección centro-periférica de un conjunto de células microgliales que están muy concentradas en la CNO/BP. En resumen, las células microgliales, que están muy concentradas en la CNO/BP, se ven obligadas a moverse en dirección centro-periférica porque su movimiento hacia la CNO/BP se ve impedido por la inhibición que sufren al contactar con las células que les siguen, quedándoles la única posibilidad de moverse hacia zonas periféricas, donde no hay células microgliales con las que puedan contactar.

Es interesante resaltar que las células microgliales conservan la inhibición por contacto después de haberse diferenciado, ya que este mecanismo ha sido descrito en las células microgliales ramificadas, cuyas prolongaciones se extienden y retraen de forma continua para explorar el microambiente que las rodea (Nimmerjahn et al., 2005). Además, este mecanismo resultaría decisivo para conseguir que, durante el desarrollo del SNC, cada célula microglial disponga de un dominio territorial propio en el que extiende sus prolongaciones sin que se solape con los dominios de células adyacentes (Jinno et al., 2007; Kettenmann, 2011; Ransohoff & Perry, 2009).

Topografía orientada del sustrato sobre el que migran las células microgliales

Varios estudios han propuesto la existencia de una migración celular en respuesta a señales mecánicas del ambiente, conocida como durotaxis (Lo et al., 2000; Petrie et al., 2009). En estudios previos de nuestro laboratorio, hemos demostrado que las células microgliales migran entre los pies terminales de las células de Müller y los fascículos de axones de células ganglionares, en una especie de surcos flanqueados por hileras de prolongaciones radiales de células de Müller, que constituyen un sustrato orientado en dirección centro-periférica (Marín-Teva et al., 1998). La existencia de este sustrato orientado facilitaría la migración de las células microgliales hacia la periferia. Además, las observaciones realizadas en la retina *in situ* sugieren fuertemente que las células microgliales pueden pasar de un surco al adyacente mediante un desplazamiento lateral entre las hileras de prolongaciones radiales de células de Müller (Marín-Teva et al., 1998). Por lo tanto, la naturaleza física del sustrato podría influir decisivamente en la migración tangencial de las células microgliales. De hecho, diferentes tipos celulares, tales como fibroblastos, oligodendrocitos, neuronas y células epiteliales, son capaces de moverse *in vitro* sobre una superficie de canales paralelos, llegando a alinearse en la dirección de los mismos (Clark et al., 1990; Gómez et al., 2007; Teixeira et al., 2003; Webb et al., 1995).

División de las células microgliales durante la migración tangencial en ERECs de E7 cultivados *in vitro*

Nuestros resultados demuestran que la división de las células microgliales contribuye al proceso de diseminación de la microglía inmadura en ERECs de E7 cultivados *in vitro*. Concretamente, hemos determinado que más de un 7% de las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs se dividen en un periodo de 6 hiv. Antes de dividirse, las células microgliales detienen su migración tangencial y adoptan una morfología redondeada. Aproximadamente una hora después, ya se observan las dos células hijas resultantes, que continúan migrando en direcciones opuestas. Este proceso está de acuerdo con estudios anteriores llevados a cabo en retinas de conejo y codorniz *in situ* (Schnitzer, 1989; Marín-Teva et al., 1999b). Además, hemos comprobado que el porcentaje de células que se dividen en ERECs de E7 varía dependiendo de la zona del explante estudiada, siendo mayor a medida que las células

se alejan de la CNO/BP. Es importante recordar que la densidad de células microgliales es menor a medida que nos alejamos de la CNO/BP, lo cual sugiere que puede haber una relación entre la división y la densidad de las células microgliales en las diferentes zonas de los explantes cultivados. De hecho, numerosos estudios han mostrado que la proliferación celular se inhibe activamente por encima de un valor crítico de densidad celular. Este fenómeno, conocido con el término de “inhibición del crecimiento celular dependiente de la densidad” (Blat et al., 1994; Stoker & Rubin, 1967), parece estar implicado en el control de la proliferación de células gliales como astrocitos, precursores de oligodendrocitos (Nakatsuji & Miller, 1998, 2001) y células microgliales (Geisert et al., 2002; Koguchi et al., 2003; Yamada et al., 2006). Nosotros proponemos que la proliferación de células microgliales en ERECs de E7 dependería de su densidad. Concretamente, en zonas próximas a la CNO/BP, donde la densidad de células microgliales es elevada, el contacto entre ellas actuaría como señal para inhibir la proliferación. Por el contrario, en zonas alejadas de la CNO/BP, donde hay una cantidad de células microgliales mucho menor, habría menos contactos entre ellas y, por lo tanto, menos señales inhibitorias, potenciándose así la proliferación celular. El incremento de la proliferación en zonas de la retina despobladas de células microgliales contribuiría a la colonización de las mismas, junto con la llegada de otras células procedentes de zonas de mayor concentración celular.

Conclusión

En resumen, nuestro estudio demuestra que, en ERECs de E7 cultivados *in vitro*, las células microgliales entran en la retina desde la CNO/BP y posteriormente colonizan la superficie vítrea de la misma mediante un mecanismo de migración exploratoria y estocástica, junto con la proliferación de las células que migran en territorios poco poblados. El hecho de que los explantes de retina aislados sean colonizados por células microgliales de forma semejante a lo que sucede en la retina *in situ* sugiere que la migración tangencial de las mismas está regulada por factores intrínsecos. Nuestros resultados también apoyan la participación de factores microambientales, tales como la inhibición por contacto con células vecinas y la topografía orientada del sustrato, en el proceso de diseminación de las células microgliales dentro de la retina. La inhibición por contacto parece ser un mecanismo decisivo para conseguir que toda la retina sea colonizada uniformemente por las células microgliales.

REFERENCIAS

- Abercrombie M, Heaysman JE. 1953. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exp Cell Res* 5:111-131.
- Abercrombie M, Heaysman, JE. 1954. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. *Exp Cell Res* 6:293-306.
- Alliot F, Lecain E, Grima B, Pessac B. 1991. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1541-1545.
- Alliot F, Godin I, Pessac B. 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res* 117:145-152.
- Ashwell KW, Hollander H, Streit W, Stone J. 1989. The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci* 2:437-448.
- Ashwell K. 1990. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Dev Brain Res* 55:219-230.
- Ashwell K. 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev Brain Res* 58:1-12.
- Ayala R, Shu T, Tsai LH. 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128:29-43.
- Bellion A, Baudoin JP, Alvarez C, Bornens M, Metin C. 2005. Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25:5691-5699.
- Blat C, Villaudy J, Harel L. 1994. Density-dependent inhibition of mouse embryo fibroblast growth: involvement of IGFBP-3. *Exp Cell Res* 215:114-118.
- Borrell V, Marin O. 2006. Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* 9:1284-1293.
- Boya J, Calvo J, Carbonell AL. 1987. Appearance of microglial cells in the postnatal rat retina. *Arch Histol Jpn* 50:223-228.
- Boya J, Calvo JL, Carbonell AL, Borregon A. 1991. A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* 175:229-236.

- Brockhaus J, Moller T, Kettenmann H. 1996. Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia* 16:81-90.
- Calvo CF, Dobbertin A, Gelman M, Glowinski J, Mallat M. 1998. Identification of CSF-1 as a brain macrophage migratory activity produced by astrocytes. *Glia* 24:180-186.
- Carbonell WS, Murase S, Horwitz AF, Mandell JW. 2005. Migration of perilesional microglia after focal brain injury and modulation by CC chemokine receptor 5: an in situ time-lapse confocal imaging study. *J Neurosci* 25:7040-7047.
- Carmona-Fontaine C, Matthews HK, Kuriyama S, Moreno M, Dunn GA, Parsons M, Stern CD, Mayor R. 2008. Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* 456:957-961.
- Carrasco MC, Navascués J, Cuadros MA, Calvente R, Martín-Oliva D, Santos AM, Sierra A, Ferrer-Martín R. M, Marín-Teva JL. 2011. Migration and ramification of microglia in quail embryo retina organotypic cultures. *Dev Neurobiol* 71:296-315.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53:344-354.
- Chavarria T, Valenciano AI, Mayordomo R, Egea J, Comella JX, Hallbook F, de Pablo F, de la Rosa EJ. 2007. Differential, age-dependent MEK-ERK and PI3K-Akt activation by insulin acting as a survival factor during embryonic retinal development. *Dev Neurobiol* 67:1777-1788.
- Chen SK, Tvrdik P, Peden E, Cho S, Wu S, Spangrude G, Capecchi MR. Hematopoietic origin of pathological grooming in *Hoxb8* mutant mice. *Cell* 141:775-785.
- Cirillo A, Chifflet S, Villar B. 2001. Neural retina of chick embryo in organ culture: effects of blockade of growth factors by suramin. *Cell Tissue Res* 304:323-331.
- Clark BJ, Scothorne RJ. 1990. Variation in the response of chick embryos to incision of the roof plate of the neural tube at different developmental stages. *J Anat* 168:167-184.
- Cuadros MA, Moujahid A, Martín-Partido G, Navascués J. 1992. Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* 148:11-14.

- Cuadros MA, Martin C, Coltey P, Almendros A, Navascués J. 1993. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol* 330:113-129.
- Cuadros MA, Moujahid A, Quesada A, Navascués J. 1994. Development of microglia in the quail optic tectum. *J Comp Neurol* 348:207-224.
- Cuadros MA, Rodríguez-Ruiz J, Calvente R, Almendros A, Marín-Teva JL, Navascués J. 1997. Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol* 389:390-401.
- Cuadros MA, Navascués J. 1998. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173-189.
- Czapiga M, Colton CA. 1999. Function of microglia in organotypic slice cultures. *J Neurosci Res* 56:644-651.
- del Rio-Hortega P. 1932. Microglia. En: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, vol. 2, W Penfield (ed.). Paul B Hoeber, New York, pp 483-534.
- Dalmau I, Vela JM, González B, Castellano B. 1997. Expression of LFA-1 α and ICAM-1 in the developing rat brain: a potential mechanism for the recruitment of microglial cell precursors. *Dev Brain Res* 103:163-170.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758.
- Diaz B, Pimentel B, de Pablo F, de La Rosa EJ. 1999. Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur J Neurosci* 11:1624-1632.
- Fishell G, Hatten ME. 1991. Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development* 113:755-765.
- Franke AG, Gubbe C, Beier M, Duenker N. 2006. Transforming growth factor- β and bone morphogenetic proteins: cooperative players in chick and murine programmed retinal cell death. *J Comp Neurol* 495:263-278.
- Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. 1997. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20:471-477.

- Geisert EE Jr, Williams RW, Geisert GR, Fan L, Asbury AM, Maecker HT, Deng J, Levy S. 2002. Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. *J Comp Neurol* 453:22-32.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845.
- Gomez N, Chen S, Schmidt CE. 2007. Polarization of hippocampal neurons with competitive surface stimuli: contact guidance cues are preferred over chemical ligands. *J R Soc Interface* 4:223-233.
- Grande-Garcia A, Echarri A, de Rooij J, Alderson NB, Waterman-Storer CM, Valdivielso JM, del Pozo MA. 2007. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* 177:683-694.
- Grossmann R, Stence N, Carr J, Fuller L, Waite M, Dailey ME. 2002. Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia* 37:229-240.
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R. 1997. Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur J Neurosci* 9:863-866.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R. 1998. Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 10:3284-3290.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. 2001. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* 238:274-288.
- Hess DC, Abe T, Hill WD, Studdard AM, Carothers J, Masuya M, Fleming PA, Drake CJ, Ogawa M. 2004. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 186:134-144.

- Hurley SD, Walter SA, Semple-Rowland SL, Streit WJ. 1999. Cytokine transcripts expressed by microglia in vitro are not expressed by amoeboid microglia of the developing rat central nervous system. *Glia* 25:304-309.
- Huttenlocher A. 2005. Cell polarization mechanisms during directed cell migration. *Nat Cell Biol* 7:336-337.
- Jinno S, Fleischer F, Eckel S, Schmidt V, Kosaka T. 2007. Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55:1334-1347.
- Kakita A, Goldman JE. 1999. Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 23:461-472.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Koguchi K, Nakatsuji Y, Okuno T, Sawada M, Sakoda S. 2003. Microglial cell cycle-associated proteins control microglial proliferation in vivo and in vitro and are regulated by GM-CSF and density-dependent inhibition. *J Neurosci Res* 74:898-905.
- Komuro H, Rakic P. 1995. Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. *J Neurosci* 15:1110-1120.
- Komuro H, Rakic P. 1998. Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci* 18:1478-1490.
- Komuro H, Yacubova E, Rakic P. 2001. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci* 21:527-540.
- Kurpius D, Wilson N, Fuller L, Hoffman A, Dailey ME. 2006. Early activation, motility, and homing of neonatal microglia to injured neurons does not require protein synthesis. *Glia* 54:58-70.
- Kurpius D, Nolley EP, Dailey ME. 2007. Purines induce directed migration and rapid homing of microglia to injured pyramidal neurons in developing hippocampus. *Glia* 55:873-884.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.

- Lee YB, Nagai A, Kim SU. 2002. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* 69:94-103.
- Ling EA. 1979. Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles. *J Anat* 128:847-858.
- Ling EA, Penney D, Leblond CP. 1980. Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol* 193:631-657.
- Ling EA. 1981. Ultrastructure and peroxidase cytochemistry of macrophages present in the retina of postnatal rats. *Arch Histol Jpn* 44:167-176.
- Ling EA, Wong WC. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79:144-152.
- Marín O, Valiente M, Ge X, Tsai LH. 2010. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001834.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J. 1998. Tangential migration of amoeboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* 22:31-52.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J. 1999a. Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412:255-275.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J. 1999b. Proliferation of actively migrating amoeboid microglia in the developing quail retina. *Anat Embryol* 200:289-300.
- Martini FJ, Valiente M, López Bendito G, Szabo G, Moya F, Valdeolmillos M, Marín O. 2009. Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136:41-50.
- Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE. 2012. The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J Immunol* 188:29-36.

- Moujahid A, Navascués J, Marín-Teva JL, Cuadros MA. 1996. Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. *Anat Embryol* 193:131-144.
- Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL. 2001. Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4:143-150.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-432.
- Nadarajah B, Alifragis P, Wong RO, Parnavelas JG. 2003. Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex* 13:607-611.
- Nakatsuji Y, Miller RH. 1998. Homotypic cell contact-dependent inhibition of astrocyte proliferation. *Glia* 22:379-389.
- Nakatsuji Y, Miller RH. 2001. Control of oligodendrocyte precursor proliferation mediated by density-dependent cell cycle protein expression. *Dev Neurosci* 23:356-363.
- Navascués J, Moujahid A, Almendros A, Marín-Teva JL, Cuadros MA. 1995. Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol* 354:209-228.
- Navascués J, Calvente R, Marín-Teva JL, Cuadros MA. 2000. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc* 72:91-102.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308: 1314-1318.
- Nolte C, Moller T, Walter T, Kettenmann H. 1996. Complement 5a controls motility of murine microglial cells in vitro via activation of an inhibitory G-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neuroscience* 73: 1091-1107.
- Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW. 2011. Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:108-118.
- O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK. 1992. Diverse migration pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258:299-302.

- Perry VH, Hume DA, Gordon S. 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326.
- Perry VH, Gordon S. 1991. Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 125:203-244.
- Perry VH, Lawson LJ, Reid DM. 1994. Biology of the mononuclear phagocyte system of the central nervous system and HIV infection. *J Leukoc Biol* 56:399-406.
- Petersen MA, Dailey ME. 2004. Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46:195-206.
- Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. 2009. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:538-549.
- Prinz M, Mildner A. 2011. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 59:177-187.
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. 2011. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 14:1227-1235.
- Provis JM, Diaz CM, Penfold PL. 1996. Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol* 3:213-222.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Rezaie P, Cairns NJ, Male DK. 1997. Expression of adhesion molecules on human fetal cerebral vessels: relationship to microglial colonisation during development. *Dev Brain Res* 104:175-189.
- Rezaie P, Male D. 1999. Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc Res Tech* 45:359-382.
- Rezaie P, Trillo-Pazos G, Greenwood J, Everall IP, Male DK. 2002. Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis. *Exp Cell Res* 274:68-82.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302:1704-1709.
- Risau W, Flamme I. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.

- Sánchez-López A, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J. 2004. Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia* 46:261–273.
- Sanders EJ, Parker E, Aramburo C, Harvey S. 2005. Retinal growth hormone is an anti-apoptotic factor in embryonic retinal ganglion cell differentiation. *Exp Eye Res* 81:551-560.
- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martín-Oliva D, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA. 2008. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506:224-239.
- Schiefer J, Kampe K, Dodt HU, Zieglansberger W, Kreutzberg GW. 1999. Microglial motility in the rat facial nucleus following peripheral axotomy. *J Neurocytol* 28:439-453.
- Schnitzer J. 1989. Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol* 282:249-263.
- Slepko N, Levi G. 1996. Progressive activation of adult microglial cells in vitro. *Glia* 16:241-246.
- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33:256-266.
- Stoker MG, Rubin H. 1967. Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature* 215:171-172.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 37:173-182.
- Swinnen N, Smolders S, Avila A, Notelaers K, Paesen R, Ameloot M, Brône B, Legendre P, Rigo JM. 2012. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* (en prensa).
- Tassi M, Calvente R, Marín-Teva JL, Cuadros MA, Santos AM, Carrasco MC, Sánchez-López AM, Navascués J. 2006. Behavior of in vitro cultured ameboid microglial cells migrating on Muller cell end-feet in the quail embryo retina. *Glia* 54:376-393.
- Teixeira AI, Abrams GA, Bertics PJ, Murphy CJ, Nealey PF. 2003. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J Cell Sci* 116:1881-1892.

- Tsai HH, Macklin WB, Miller RH. 2009. Distinct modes of migration position oligodendrocyte precursors for localized cell division in the developing spinal cord. *J Neurosci Res* 87:3320-3330.
- Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P. 2010. Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat* 217:436-448.
- Webb A, Clark P, Skepper J, Compston A, Wood A. 1995. Guidance of oligodendrocytes and their progenitors by substratum topography. *J Cell Sci* 108:2747-2760.
- Yamada J, Sawada M, Nakanishi H. 2006. Cell cycle-dependent regulation of kainate-induced inward currents in microglía. *Biochem Biophys Res Commun* 349:913-919.

Capítulo III

Participación de metaloproteasas y las quinasas Src y ROCK en la migración tangencial de la microglía de la retina embrionaria de codorniz

INTRODUCCIÓN

Las células microgliales derivan de precursores relacionados con el linaje mesodérmico (Cuadros & Navascués, 1998; Davoust et al., 2008; Ling et al., 2001; Rezaie et al., 2007; Streit et al., 2001) que entran en el Sistema Nervioso Central (SNC) durante el desarrollo, adquieren la apariencia de microglía ameboide y migran largas distancias (Cuadros et al., 1994, 1997; Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995, 1996, 2000; Schnitzer, 1989). Una vez que alcanzan su destino final, las células microgliales ameboides se diferencian y transforman en microglía ramificada (Ashwell et al., 1991; Lawson et al., 1990; Ling & Wong, 1993; Mittelbronn et al., 2001; Monier et al., 2006, 2007; Navascués et al., 1995, 2000; Perry & Gordon, 1991; Perry et al., 1985; Santos et al., 2008; Wu et al., 1994). Las células microgliales ramificadas constituyen el sistema de vigilancia inmune del SNC (Kreutzberg, 1996). Aunque habían sido consideradas tradicionalmente como células estáticas (resting microglia), estudios *in vivo* han demostrado que son células muy dinámicas que vigilan el microambiente que las rodea mediante la continua extensión y retracción de prolongaciones y protrusiones (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). En respuesta a un daño en el SNC, la microglía ramificada reacciona rápidamente, transformándose en microglía activada, de morfología ameboide y dotada de gran movilidad (Nimmerjahn et al., 2005; Stence et al., 2001). Las células microgliales activadas son capaces de migrar hacia la zona lesionada (Carbonell et al., 2005; Grossmann et al., 2002; Kettenmann et al., 2007; Kurpius et al., 2007; Langmann et al., 2007; Paques et al., 2010; Liang et al., 2009) en donde actúan fagocitando restos de células muertas y participando en procesos de reparación del tejido nervioso.

Durante su migración en el SNC inmaduro, las células microgliales ameboides siguen rutas específicas que han sido identificadas en el techo óptico (Cuadros et al., 1994), cerebelo (Cuadros et al., 1997) y retina (Navascués et al., 1995) de embriones de codorniz. La migración de la microglía ameboide puede ser de dos tipos: tangencial y radial (revisado en Cuadros & Navascués, 1998). En la migración tangencial, las células siguen un curso paralelo a la superficie del SNC, mientras que en la migración radial se desplazan en dirección perpendicular a su trayectoria tangencial para llegar a sus destinos finales en diferentes profundidades del parénquima nervioso.

Estudios en nuestro laboratorio en la retina embrionaria de codorniz han mostrado que las células microgliales ameboides siguen un patrón de migración característico, que tiene lugar en etapas del desarrollo muy bien definidas. Así, estas células entran en la retina desde la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP) entre el séptimo día de incubación (E7) y E16 (día de la eclosión) y migran tangencialmente sobre su superficie vítrea en dirección centro-periférica (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995). Desde E9 hasta la mitad de la primera semana post-eclosión, las células microgliales migran radialmente en dirección vítreo-escleral para alcanzar las capas plexiformes interna y externa, en las que se diferencian para dar microglía ramificada (Marín-Teva et al., 1999; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004). La migración tangencial de las células microgliales ameboides tiene lugar en la superficie vítrea de la retina, en estrecho contacto con los pies terminales de las células de Müller, mediante un mecanismo que implica extensión polarizada de lamelipodios en el borde delantero de la célula, fuerte unión de la célula al sustrato, translocación hacia delante del cuerpo celular y retracción de la parte trasera de la célula (Marín-Teva et al., 1998).

Estudios sobre el modo de invasión de tejidos por células cancerosas han permitido avanzar considerablemente en el conocimiento de la relación entre las características morfológicas de las células migratorias y los requerimientos moleculares de las mismas (Carragher et al., 2006; Friedl & Wolf, 2003; Sahai & Marshall, 2003; Torka et al., 2006; Wolf et al., 2003a; Wolf & Friedl, 2006). Se han descrito dos modos de migración de células individuales, denominadas migración mesenquimal y migración ameboides, cuyas características han sido objeto de diversas revisiones (Biname et al., 2010; Friedl, 2004; Friedl & Wolf, 2010; Wolf & Friedl, 2006). Las células que migran mediante migración mesenquimal adoptan una forma alargada y extienden protrusiones con lamelipodios, los cuales son estabilizados mediante la creación de sitios de adhesión al sustrato, denominados contactos focales, en los que participan decisivamente las integrinas. La estabilización de un lamelipodio contribuye a la polarización de la célula, indicando la dirección de su movimiento. Los sitios adhesivos son lugares de inicio de cascadas de señalización molecular que desencadenan modificaciones del citoesqueleto implicadas en el avance de la célula y conducen finalmente a la liberación de los sitios adhesivos de la parte trasera de la célula y a la retracción de la misma. La extensión de nuevos lamelipodios se lleva a cabo al azar y cuando uno de ellos es estabilizado

mediante adhesión puede definir una nueva dirección del movimiento. En la migración ameboide, las células son redondeadas y muestran un burbujeo dinámico en su superficie que promueve el movimiento celular mediante contracciones de la corteza de actomiosina. Las excrecencias de la superficie celular (blebs o filopodios) que intervienen en la migración ameboide son diferentes de los lamelipodios de la migración mesenquimal. Además, la migración ameboide requiere una adhesión de la célula al sustrato más débil, en la que no participan las integrinas.

El mecanismo de migración mesenquimal ha sido descrito en diferentes tipos celulares que adquieren un fenotipo alargado durante su movimiento, como los fibroblastos (Friedl, 2004; Rhee et al., 2007) o las células tumorales en su transición epitelio-mesenquimal que les permite escapar del tumor primario (Biname et al., 2010; Friedl & Wolf, 2003). Por el contrario, la mayoría de células cancerígenas con actividad metastásica, que muestran un fenotipo redondeado, migran mediante un mecanismo ameboide (Carragher et al., 2006; Friedl & Wolf, 2003; Torika et al., 2006). Otros tipos celulares cuyo mecanismo de migración es típicamente ameboide son la ameba *Dictyostelium discoideum* (Devreotes et al., 1988), las células madre hematopoyéticas, los neutrófilos y los linfocitos T (Friedl & Weigel, 2008; Friedl & Wolf, 2010). Es interesante destacar que los macrófagos pueden usar la migración ameboide o mesenquimal dependiendo de las restricciones que encuentren en el microambiente en el que están migrando (Verollet et al., 2011).

Los requerimientos moleculares de la migración mesenquimal son claramente diferentes de los de la migración ameboide, permitiendo distinguir ambos tipos de movimiento. Así, el mecanismo de migración mesenquimal es dependiente de la proteólisis focalizada de la matriz extracelular (Lauffenburger & Horwitz, 1996) en un proceso que comprende cinco pasos (Friedl & Wolf, 2009; Sheetz et al., 1999): 1) extensión mediada por actina del borde delantero de la célula; 2) formación de contactos focales mediados por integrinas en la parte delantera de la célula; 3) degradación de la matriz extracelular en el frente de avance de la célula; 4) contracción mediada por actomiosina que produce el deslizamiento hacia delante del cuerpo celular; y 5) retracción de la parte trasera de la célula. La migración mesenquimal es un movimiento lento en el que las células muestran una morfología elongada como consecuencia de la adhesión célula-sustrato, mediada por las subunidades α y β de las integrinas (Hynes, 1992) y la presencia de fuerzas de tracción en los polos celulares (Tamariz et al., 2002).

Dos procesos decisivos de la migración mesenquimal son la degradación de la matriz extracelular, con la participación de metaloproteasas (MMPs) (Goss et al., 1998; Mignatti & Rifkin, 1993; Wolf et al., 2003a; Zucker & Vacirca, 2004) y la renovación de los contactos focales, con la actuación de la calpaína 2 y la tirosina-quinasa Src (Carragher et al., 2006; Dourdin et al., 2001; Webb et al., 2004).

El movimiento ameboide es un mecanismo de migración rápido, de débiles interacciones con el sustrato y baja expresión de integrinas (Carragher et al., 2006), independiente de las MMPs (Sahai & Marshall, 2003; Wolf et al., 2003a) y de la calpaína-2 y tirosina-quinasa Src (Carragher et al., 2006). Las células muestran rápidos cambios de su morfología que les permiten adaptarse a los huecos de la matriz e infiltrarse a través de la misma. Los cambios morfológicos requieren la polimerización de la actina cortical para generar tensión y mantener la morfología redondeada característica de las células ameboides. Estos procesos están controlados por las GTPAsas Rho y sus efectores ROCK (Croft et al., 2004; Sahai & Marshall, 2003; Smith et al., 2003; Torika et al., 2006; Worthylake et al., 2001, 2003), los cuales regulan ciertos aspectos de la dinámica del citoesqueleto que controlan los cambios de forma de la célula (Cox et al., 2001; Schmitz et al., 2000).

El objetivo del presente capítulo es caracterizar algunos de los requerimientos moleculares de la migración de las células microgliales en la retina embrionaria de codorniz, tratando de determinar si el modo de migración de estas células se asemeja al mecanismo mesenquimal o ameboide descrito en otros tipos celulares. Dicha caracterización requeriría el tratamiento experimental de la retina con inhibidores específicos y anticuerpos bloqueantes de las distintas moléculas implicadas en ambos tipos de mecanismos migratorios, mediante la inoculación de tales inhibidores y anticuerpos en el vítreo del ojo de embriones *in situ*. Sin embargo, esta inoculación es difícil de llevar a cabo y en muchas ocasiones las moléculas inoculadas no acceden al interior de la retina. Por lo tanto, los diferentes tratamientos experimentales se han llevado a cabo en cultivos organotípicos de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs), ya que en ellos las células microgliales son capaces de migrar sobre la superficie vítrea de la retina, manteniendo un comportamiento muy similar al de las células que migran tangencialmente en la retina embrionaria *in situ*, tal como se ha descrito en el primer capítulo de esta Tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) de 7 días de incubación (E7) para obtener explantes de retina. Esta etapa del desarrollo coincide con la primera entrada en la retina de células microgliales procedentes de la región en la que confluye la CNO/BP. Los ERECs fueron cultivados *in vitro*, siendo utilizados en dos tipos de experiencias: a) experimentos para comprobar el efecto de inhibidores farmacológicos o anticuerpos bloqueantes de diferentes moléculas candidatas a tener una participación en el mecanismo de migración de las células microgliales; y b) experiencias de zimografía de gelatina para detectar la presencia de MMPs con actividad gelatinasa en los explantes.

Cultivo *in vitro* de explantes

Los explantes utilizados en este estudio se cultivaban durante 1 día *in vitro* (1 div) siguiendo el método de Stoppini (1991), modificado por Marín-Teva et al. (2004). En los experimentos de inhibición de moléculas presuntamente implicadas en la migración microglial se utilizaron ERECs de E7 que conservaban una pequeña porción de CNO/BP. Estos explantes eran cuadrados de retina de 3 mm de lado, obtenidos de la región central de la retina inmediatamente dorsal a la CNO/BP, en los que se conservaba el extremo dorsal de dicha CNO/BP. Estos explantes se cultivaban en medio basal Eagle suplementado con suero de caballo (BME+SC), compuesto por 50% de medio basal Eagle con sales de Earle (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), 25% de solución salina de Hank (Invitrogen), 25% de suero de caballo (Invitrogen), L-glutamina (Invitrogen) 1 mM, penicilina-estreptomina (Invitrogen, 10 UI/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomina) y 5 mg/ml de glucosa. Los inhibidores farmacológicos o anticuerpos bloqueantes utilizados en las experiencias de inhibición eran añadidos al medio desde el inicio del cultivo.

Los explantes utilizados en experiencias de zimografía de gelatina eran de tres tipos: a) ERECs de E7 idénticos a los ya descritos; b) ERECs de E7 similares a los anteriores en los que se extirpaba totalmente la porción de CNO/BP; y c) piezas de CNO/BP totalmente desprovistas de tejido retiniano, aisladas a partir de ojos de E7. Estos explantes se cultivaban durante 1 div en medio desprovisto de suero de caballo (que tiene actividad gelatinasa intrínseca), similar al descrito con anterioridad pero

reemplazando el 25% de suero de caballo por un suplemento de insulina-transferrina-selenito sódico (Sigma, St. Louis, MO) más 5 mg/ml de albúmina de suero bovino fracción V (BME+ITS).

Tratamiento de ERECs de E7 con inhibidores farmacológicos y anticuerpos bloqueantes

Se llevaron a cabo experiencias para poner de manifiesto la participación o no de determinadas moléculas (MMPs, tirosina-quinasa Src, proteína-quinasa ROCK asociada a Rho, integrinas y calpaínas) en el proceso de migración de las células microgliales presentes en los ERECs. En estas experiencias se utilizaban inhibidores farmacológicos específicos o anticuerpos bloqueantes de dichas moléculas que se añadían al medio de cultivo de ERECs de E7 y se dejaban actuar durante 1 div. Una vez transcurrido este tiempo, los ERECs se fijaban antes de analizar al microscopio los efectos inducidos por la inhibición molecular en las células microgliales. En cada experiencia se utilizaban entre 5 y 10 embriones de E7, en cada uno de los cuales se obtenía un EREC con CNO/BP a partir del ojo derecho y otro a partir del ojo izquierdo. Los ERECs procedentes de ojos derechos se utilizaban como experimentales, mientras que los procedentes de ojos izquierdos se empleaban como sus respectivos controles.

En experiencias para determinar la posible implicación de MMPs en el mecanismo de migración microglial, los ERECs eran tratados con GM6001 (Calbiochem, La Jolla, CA), un inhibidor de amplio espectro de MMPs. Los ERECs experimentales eran incubados durante 1 div en BME+SC suplementado con GM6001 diluido en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) a diferentes concentraciones (10 μ M, 20 μ M y 40 μ M). Los ERECs controles eran incubados en BME+SC al que se añadía DMSO a diluciones equivalentes a las concentraciones de GM6001 utilizadas en los respectivos ERECs experimentales (1:1000, 1:500 y 1:250). También se ensayó un inhibidor específico de MMP-2 y MMP-9 (inhibidor IV de MMP-2/MMP-9, Calbiochem) a una concentración 75 μ M, así como el inhibidor I de furina (Dec-RVKR-CMK, Calbiochem), que inhibe la MMP de membrana MT-MMP-1 (también llamada MMP-14), a una concentración de 20 μ M.

Para comprobar la posible implicación en la migración microglial de la tirosina-quinasa Src, la proteína-quinasa ROCK asociada a Rho y las calpaínas, se realizaron

experiencias en las que ERECs eran incubados durante 1 div en BME+SC suplementado con inhibidores farmacológicos de dichas moléculas diluidos en DMSO. Los inhibidores utilizados eran PP2 (Calbiochem), específico de Src, Y27632 (Calbiochem), específico de ROCK, y ALLN, específico de calpaínas, a concentraciones 20 μ M, 20 μ M y 10 μ M, respectivamente. Los ERECs controles eran incubados en BME+SC al que se añadía DMSO a diluciones 1:500 (en los controles de las experiencias con PP2 e Y27632) y 1:1000 (en los controles de las experiencias con ALLN).

<i>Anticuerpo bloqueante</i>	<i>Antígeno reconocido</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Concentración</i>
JG22	Subunidad β 1 de integrinas de aves	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, Univ. of Iowa, Iowa City, IA)	5 μ g/ μ l
V ₂ E ₉	Subunidad β 1 de integrinas de aves	DSHB	5 μ g/ μ l
CSAT	Subunidad β 1 de integrinas de aves	DSHB	4 μ g/ μ l
LM609	Integrina α V β 3 de aves (y otras especies)	Millipore (Billerica, MA)	10 μ g/ μ l

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para el bloqueo de integrinas en ERECs de E7. Se indican los antígenos reconocidos por los anticuerpos, las casas comerciales de procedencia y las concentraciones utilizadas.

También se investigó la posible participación de integrinas en la migración microglial mediante el uso de anticuerpos bloqueantes de diferentes subunidades de integrinas de aves, que eran añadidos al medio BME+SC en el que incubaban los

ERECs experimentales (procedentes de ojos derechos) durante 1 div. Los anticuerpos utilizados y sus respectivas concentraciones se indican en la Tabla 1. En las experiencias con anticuerpos bloqueantes, cada EREC experimental (procedente del ojo derecho de un embrión) tenía su correspondiente control (procedente del ojo izquierdo del mismo embrión), que se incubaba en medio de cultivo al que se añadía un anticuerpo negativo (control negativo) o que no tenía ningún aditivo (control). Cada anticuerpo negativo era del mismo isotipo que el utilizado para bloquear las integrinas, pero no reconocía ningún antígeno presente en el explante, y su concentración en el medio de cultivo era idéntica a la del respectivo anticuerpo bloqueante. Así para los anticuerpos bloqueantes JG22 y V2E9, que son inmunoglobulinas de isotipo IgG1 cadena ligera kappa, el anticuerpo control negativo era G3G4 (DHSB), producido contra bromodeoxiuridina, mientras que para CSAT, que es una IgG2b cadena ligera kappa, el anticuerpo control negativo era 74.5A5 (DHSB), dirigido contra el factor de transcripción Nkx2.2.

Inmunocitoquímica de montajes totales de ERECs de E7

Los ERECs de E7 tratados experimentalmente y sus respectivos controles se fijaban e inmunomarcaban con el anticuerpo monoclonal QH1 (DSHB) que reconoce células de línea hemangioblástica de codorniz con excepción de los eritrocitos maduros (Pardanaud et al., 1987), incluyendo todas las fases del desarrollo de las células microgliales de codorniz (Cuadros et al., 1992). El protocolo seguido para el inmunomarcado con QH1 de montajes totales de ERECs de E7 era similar al descrito en el capítulo I de la presente Tesis. Como anticuerpo secundario se utilizaba una IgG anti-ratón de cabra conjugada con Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) a una dilución 1:500. Los explantes se montaban con Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL) cuidando que la superficie vítrea se mantuviera hacia arriba.

En algunos ERECs se pretendía medir el ángulo de orientación del eje mayor de las células microgliales, tomando como referencia la orientación de los axones de células ganglionares. Para revelar simultáneamente la microglía ameboide y los axones de la capa de fibras nerviosas, estos ERECs se marcaban mediante doble inmunofluorescencia con los anticuerpos QH1 y 4H6 (DSHB). Se fijaban en paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0,1 M (PB, pH 7.4) durante 1 hora a

temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaban tres veces en PBS-Tritón X-100 0,1% (PBS-T) y se permeabilizaban en PBS-Tritón X-100 1% durante 4 horas a 4°C con agitación. Los explantes se lavaban de nuevo en PBS-T y se bloqueaban con suero normal de cabra diluido en PBS-albúmina de suero bovino 1%-Tritón X-100 0,25% (PBS-BSA-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, los ERECs se incubaban en QH1 diluido 1:4 en PBS-BSA-T durante 48 horas a 4°C con agitación, se lavaban en PBS-T y se sumergían en fragmento Fab de IgG anti-ratón de cabra conjugado con Cy2 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), diluido 1:500 en PBS-BSA-T, durante 4 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaban en PBS-T, se sumergían en suero normal de cabra diluido en PBS-BSA-T durante 1 hora, se incubaban en sobrenadante del anticuerpo 4H6 diluido 1:20 en PBS-BSA-T durante 48 horas a 4°C con agitación y se volvían a lavar. Finalmente se incubaban en fragmento Fab de IgG anti-ratón de cabra conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch), diluido 1:500 en PBS-BSA-T, durante 4 horas a temperatura ambiente, se lavaban en PBS-T y se montaban con Fluoromount G.

Algunos ERECs eran sometidos a tratamiento inmunocitoquímico con los anticuerpos monoclonales anti-MMP-2 (Neomarkers, Fremont, CA, USA) y anti-MT1-MMP (Calbiochem, San Diego, CA, USA), con el fin de detectar la posible presencia de estos dos tipos específicos de MMPs, pero en ambos casos los resultados eran negativos.

Inmunocitoquímica de criosecciones de ERECs de E7

Algunos ERECs experimentales y sus respectivos controles eran utilizados para la obtención de criosecciones que eran tratadas mediante inmunocitoquímica con una variedad de anticuerpos para comprobar la integridad o no de la estructura histológica de la retina tras los diferentes tratamientos experimentales. Estos ERECs eran fijados en paraformaldehído 4% en PB 0,1 M durante 1 hora a 4°C, se lavaban varias veces con PBS-T, se crioprotegían mediante incubación en PBS-T con sacarosa 10% durante una noche a 4°C, se sumergían en solución crioprotectora con gelatina 7,5%, se congelaban en isopentano ultrafrío y se almacenaban a -40°C. Con la ayuda de un criostato Leica CM1850 (Leica, Wetzlar, Germany) se obtenían criosecciones seriadas de 20 µm de espesor, perpendiculares al eje de la CNO. Las criosecciones seriadas se montaban

alternativamente en diez portaobjetos gelatinados diferentes que eran tratados inmunocitoquímicamente con distintos anticuerpos, de forma que podíamos disponer de criosecciones adyacentes en las que se revelaban diferentes componentes estructurales.

Las criosecciones se trataban con doble inmunocitoquímica usando el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3-activada (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), que permite identificar las células en proceso de apoptosis, y un anticuerpo monoclonal que revelaba algún otro componente estructural presente en los ERECs. Los anticuerpos monoclonales usados eran QH1 (DSHB), que reconoce las células microgliales, H5 (anti-vimentina, DSHB), que revela las células de Müller, M1B4 (anti-tenascina, DSHB), que marca las capas plexiformes, y 39.4D5 (anti-Islet-1, DSHB), que pone de manifiesto diferentes subpoblaciones neuronales de la retina. El protocolo para la realización del doble marcado inmunofluorescente de los ERECs era idéntico al descrito en el capítulo I de esta Tesis. Antes del montaje con Fluoromount G, las criosecciones con doble inmunofluorescencia eran teñidas con Hoechst 33342 (Sigma) diluido en PBS 10 mM (10 µg/ml) para poner de manifiesto todos los núcleos celulares.

Zimogramas de gelatina

Se realizaron experiencias de zimografía de gelatina para detectar la posible presencia de MMP-2 y MMP-9 (que tienen actividad gelatinasa) en los ERECs. Las muestras sometidas a zimografía de gelatina eran de dos tipos: a) medio de cultivo BME+ITS (1 ml) en el que se habían incubado durante 24 hiv ERECs con CNO/BP o ERECs sin CNO/BP o piezas de CNO/BP desprovistas de tejido retiniano; y b) extractos proteicos obtenidos a partir de los citados ERECs con o sin CNO/BP o piezas de CNO/BP cultivados durante 24 hiv. Las muestras, tanto de medio de cultivo como de extractos proteicos, se conservaban a -80°C hasta su utilización.

Los extractos proteicos eran obtenidos siguiendo un protocolo previamente descrito (Cai & Brauer et al., 2002; Koyama et al., 2000). Las muestras se homogeneizaban con 100 µl de tampón de lisis suave (PBS 10 mM, ClNa 0,9% y Tritón X-100 1%) para evitar la desnaturalización de las proteínas. Tras la homogeneización, las muestras se agitaron en un vortex cada 5 minutos durante un periodo de 45 minutos. A continuación, se centrifugaban a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes resultantes se congelaban a -80°C y se almacenaban hasta su utilización.

Para la realización de los zimogramas, las muestras (medios de cultivo o extractos proteicos) se complementaban con tampón de carga no desnaturalizante 4X, que contenía dodecilsulfato sódico (SDS, Sigma) al 10%, sacarosa (Panreac, Barcelona, España) al 4%, azul de bromofenol (Sigma) al 0,1%, tampón del gel SDS-PAGE (dodecilsulfato sódico-gel electroforético de poliacrilamida) 4X (Tris-base 0,5M, SDS 1,4%, pH 6,8) al 30%, y se incubaban durante 15 minutos a 37°C. A continuación, se hacía una separación electroforética de proteínas en un gel SDS-PAGE 10% suplementado con 4 mg/ml de gelatina tipo A (Sigma), aplicando un voltaje constante de 100 V y un amperaje de 200 mA durante 1,5 a 2 horas. Tras la electroforesis, los geles se lavaban dos veces en Tritón X-100 2.5% durante 30 minutos, se enjuagaban con agua y se incubaban en tampón de activación de gelatinasas, compuesto por Tris Base (Merck) 100 mM (pH 7,4) y cloruro cálcico (Panreac) 15 mM, durante 20 horas a 37°C con agitación. Seguidamente, los geles se trataban con solución fijadora de azul de Coomassie, compuesta por metanol (Panreac) 30%, ácido acético (Panreac) 10% y azul de Coomassie R250 (Sigma) 0,1%, durante media hora a temperatura ambiente. Finalmente, se decoloraban con varios lavados en solución decolorante (metanol 30% y ácido acético 10%). Como control positivo de MMP-2 en los zimogramas, se utilizó 1 ng de MMP-2 recombinante humana expresada en células CHO (Calbiochem).

Microscopía y análisis morfométrico

Los montajes totales o secciones de ERECs cultivados durante 1 div y tratados con inmunofluorescencia eran observados en un microscopio Zeiss AxioPhot (Zeiss, Jena, Alemania), obteniendo micrografías con una cámara digital AxioCam (Zeiss) acoplada al mismo. Las imágenes de microscopía confocal eran obtenidas con un microscopio Leitz DMRB equipado con un sistema de barrido láser confocal Leica TCS-SP5 (Leica). De cada campo microscópico seleccionado se obtenían series de secciones ópticas en el plano horizontal (XY) a intervalos de 0,2-0,3 μm en el eje vertical Z, a partir de las cuales se obtenía la imagen de proyección de las células microgliales.

Las células microgliales presentes en los ERECs de E7 tratados *in vitro* con diferentes inhibidores o anticuerpos y las contenidas en los respectivos controles eran sometidas a un análisis estadístico de algunos parámetros morfométricos para

determinar el grado de significación de las diferencias morfológicas detectadas entre ambos grupos de células. Los parámetros morfométricos analizados eran los siguientes: longitud del eje mayor de la célula, elongación celular (razón entre las longitudes de los ejes mayor y menor de la célula), área celular (área expresada en μm^2 de la superficie contenida dentro del perfil de la célula) y densidad celular (número de células contenidas en el área analizada). Estos parámetros se medían en un área rectangular de $2 \times 105 \mu\text{m}^2$ situada en la parte dorsal de la retina a una distancia de $100 \mu\text{m}$ desde el borde dorsal de la CNO. En los diferentes ERECs inmunomarcados con QH1 se obtenían micrografías de esta área con un objetivo de $20\times$ y se medían los citados parámetros de todas las células microgliales contenidas en la misma con la ayuda del programa de procesamiento de imágenes Image Tool (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas). En los experimentos con inhibidores de MMPs también se analizó el ángulo de orientación de las células microgliales, definido como el ángulo existente entre el eje mayor de cada célula microglial y el eje longitudinal de los fascículos de axones ganglionares. Dicho análisis se llevó a cabo en un área rectangular de $105 \mu\text{m}^2$ (ver rectángulos delimitados en la Fig. 1), más estrecha que la utilizada para el análisis de los restantes parámetros celulares. Esta área era suficientemente estrecha para asegurar que todos los axones ganglionares contenidos en ella eran paralelos entre sí (ver inmunomarcado rojo en la Fig. 1) y su trayectoria podía ser utilizada como referencia para medir el ángulo de orientación de las células microgliales.

En las experiencias de inhibición o bloqueo de diferentes moléculas, los valores medios de los parámetros analizados en ERECs tratados experimentalmente fueron comparados con los valores obtenidos en los respectivos ERECs controles mediante la prueba estadística de la *t* de Student para determinar el grado de significación de las diferencias observadas.

RESULTADOS

Alteración de la orientación y el fenotipo de las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 tras la inhibición de MMPs

El tratamiento experimental de ERECs de E7 con GM6001, un inhibidor de amplio espectro de MMPs, producía alteraciones en la morfología y orientación de las células microgliales en proceso de migración tangencial (Fig. 1). En ERECs control, tratados durante 24 hiv con DMSO (vehículo en el que se disolvía el GM6001), las células microgliales migratorias mostraban un fenotipo que no difería del previamente descrito en retinas *in situ* (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995). En concreto, estas células estaban fuertemente polarizadas, con una forma alargada y una orientación casi paralela a los fascículos de axones de células ganglionares (Fig. 1A, C, D), cuya trayectoria coincidía con el recorrido centro-periférico seguido por las células microgliales durante su proceso migratorio. Por el contrario, en ERECs tratados durante 24 hiv con GM6001, numerosas células microgliales migratorias mostraban una morfología llamativamente menos alargada y polarizada, con una orientación más irregular (Fig. 1B, E, F).

Los efectos de GM6001 sobre las células microgliales migratorias eran evidentes en todas las concentraciones ensayadas. Así, la morfología y la orientación de dichas células sufrían alteraciones en ERECs tratados con GM6001 a concentraciones de 10 μM (Fig. 2A, B), 20 μM (Fig. 2C, D) y 40 μM (Fig. 2E, F). El análisis morfométrico del ángulo de orientación del eje mayor de las células microgliales confirmaba que la inhibición de las MMPs mediante tratamiento con GM6001 provocaba la alteración de la orientación de dichas células. Este ángulo era de aproximadamente 15° en los ERECs control y se incrementaba significativamente en los ERECs tratados con diferentes concentraciones de GM6001. Concretamente, el ángulo de orientación era de alrededor de 23, 26 y 29° en ERECs tratados con GM6001 a concentraciones de 10, 20 y 40 μM , respectivamente (Fig. 2G). Por lo tanto, aunque el ángulo de orientación de las células microgliales de ERECs tratados se incrementaba progresivamente a medida que aumentaba la concentración de GM6001, siempre era significativamente mayor que el encontrado en ERECs control, independientemente de la concentración de GM6001 utilizada.

La inhibición de MMPs mediante tratamiento con GM6001 20 μ M no solo afectaba a la orientación de las células microgliales migratorias sino también a sus caracteres morfológicos (Fig. 3A, B). Las células microgliales presentes en ERECs control mostraban un soma alargado en dirección centro-periférica con prolongaciones claramente polarizadas en ambos extremos (Fig. 3A), en contraste con las células microgliales de ERECs tratados que tenían un soma más redondeado, con prolongaciones más cortas y menos polarizadas (Fig. 3B). El análisis morfométrico de las células microgliales migratorias confirmó la modificación de sus caracteres morfológicos tras el tratamiento con GM6001. Así, las células microgliales presentes en ERECs tratados con GM6001 mostraban un coeficiente de elongación y una longitud del eje mayor que eran significativamente menores que los encontrados en ERECs control (Fig. 3C, D). Sin embargo, el área celular media no mostraba cambios significativos entre los ERECs control y los tratados (Fig. 3E). Tampoco se observaron diferencias significativas en el número de células microgliales presentes en ambos grupos de ERECs (Fig. 3F).

En conjunto, los anteriores resultados demostraban que la inhibición de las MMPs provocaba una alteración del patrón de migración de las células microgliales dentro de la retina, con una disminución de su polarización y una aparente desorientación de las mismas, sugiriendo que algún tipo de MMPs participaba en los mecanismos de orientación del movimiento de las células microgliales.

Las alteraciones producidas por la inhibición de MMPs sobre el fenotipo y la orientación de las células microgliales migratorias podrían ser debidas a un efecto directo de GM6001 sobre dichas células o a un efecto indirecto, como consecuencia de la inducción de alteraciones en el microambiente del tejido sobre el que migran dichas células. Para descartar esta segunda posibilidad se estudiaron diferentes aspectos de la organización citoarquitectónica de la retina, comparándolos en ERECs control y ERECs tratados con GM6001. La tinción con Hoechst demostraba que las capas de células ganglionares (CCG), nuclear interna (CNI) y nuclear externa (CNE) de los ERECs control mostraban una organización y espesor similares a los observados en ERECs tratados (Fig. 4). La distribución de células muertas y de microglía, puesta de manifiesto mediante inmunocitoquímica con anti-caspasa-3 activa y QH1, también era similar en ERECs tratados y controles (Fig. 4A, B). En ambos casos se observaba gran cantidad de

células apoptóticas caspasa-3 activa-positivas, que eran muy abundantes en la CCG y menos frecuentes en la CNI, mientras que las células microgliales se localizaban en la capa de fibras nerviosas. Tampoco se detectaron diferencias entre ERECs tratados y controles en lo relativo a la distribución de las células de Müller (Fig. 4C, D), la molécula de matriz extracelular tenascina (Fig. 4E, F) y neuronas Islet-1-positivas (Fig. 4G, H). Las células de Müller se observaban como una tupida red de prolongaciones radiales vimentina-positivos distribuidos en todo el espesor de la retina (Fig. 4C, D). La tenascina se distribuía en las capas plexiformes interna (CPI) y externa (CPE), cuyos espesores eran similares en los ERECs tratados y controles (Fig. 4E, F). Los núcleos Islet-1-positivos estaban presentes en la CNE, CNI y CCG. En la CNI, los núcleos Islet-1-positivos formaban varios estratos distribuidos en su mitad escleral y una hilera dispuesta en su límite escleral (Fig. 4G, H). Estos resultados demostraban que la organización glial y neuronal de la retina se conservaba intacta después del tratamiento de los ERECs con GM6001 20 μ M, permitiendo concluir que algún tipo de MMPs tenía una participación directa en los mecanismos de orientación del movimiento de las células microgliales migratorias.

Con la intención de conocer si algunas MMPs específicas estaban presentes en los ERECs, se hicieron estudios zimográficos para MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B), que muestran actividad gelatinasa que permite su detección mediante zimografía de gelatina. Se obtuvieron zimogramas de geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina a partir de los medios de cultivo en los que se habían incubado durante 24 hiv uno de los siguientes tipos de explantes: a) ERECs de E7 que contenían CNO/BP (Fig. 5A), b) ERECs de E7 a los que se había extirpado la CNO/BP (Fig. 5B), y c) CNO/BP aislada a partir de ojos de E7 (Fig. 5C). Los zimogramas de medio de cultivo procedente de ERECs que conservaban la CNO/BP mostraban una banda de 72 kD correspondiente a la forma inactiva de MMP-2 (pro-MMP-2, Fig. 5D), mientras que las formas activas de MMP-2 (62 kD) y de MMP-9 (84 kD) y la forma inactiva de MMP-9 (pro-MMP-9, 92 kD) no estaban presentes. Los zimogramas de medio de cultivo en el que se habían incubado ERECs de E7 desprovistos de CNO/BP no mostraban la banda de pro-MMP-2 (Fig. 5D) y lo mismo sucedía en los zimogramas de medio de cultivo de explantes obtenidos en regiones dorsales de la retina, en las que no estaba presente la CNO/BP (datos no mostrados). Por el contrario, la banda de 72 kD

de pro-MMP-2 sí era detectada en el medio procedente de cultivos de CNO/BP aislada (Fig. 5D). Estos resultados demostraban que la pro-MMP-2 era expresada y secretada al medio por algunas células presentes en la CNO/BP, pero no por ningún tipo celular presente en la retina (incluyendo las células microgliales migratorias).

Para comprobar si las formas activa e inactiva de MMP-2 y MMP-9 estaban presentes en algunas células de ERECs, pero no podían ser detectadas en el medio de cultivo porque no eran secretadas al mismo, se realizaron zimogramas de gelatina a partir de extractos de cada uno de los tres tipos de explantes mencionados anteriormente (ERECs que conservaban la CNO/BP, ERECs desprovistos de CNO/BP y CNO/BP aisladas). Los zimogramas obtenidos a partir de cualquiera de estos tres tipos de extractos no mostraban bandas positivas para pro-MMP-2 o MMP-2 activa (Fig. 5E) ni para pro-MMP-9 o MMP-9 activa (datos no mostrados). Por lo tanto, las células microgliales migratorias de la retina no expresaban ni secretaban al medio MMP-2 ni MMP-9.

Por otra parte, la inmunotinción con un anticuerpo monoclonal anti-MMP-2 (Neomarkers) que había sido ensayado con éxito en pollo (Ozyigit et al., 2005) no marcaba las células microgliales ni ningún otro tipo celular en los ERECs de E7. Además, en experiencias en las que ERECs de E7 que contenían la CNO/BP eran tratados durante 24 hiv con un inhibidor específico de MMP-2 y MMP-9 (inhibidor IV de MMP-2/MMP-9) a una concentración de 75 μ M no se detectaron cambios ni en la morfología ni en el patrón de migración de las células microgliales (resultados no mostrados), sugiriendo que ninguna de estas dos MMPs tenía participación en los mecanismos de migración de las células microgliales. Estos resultados estaban de acuerdo con la ausencia de MMP-2 y MMP-9 en la retina demostrada en los estudios de zimografía.

En conjunto, todos los resultados anteriores demostraban que las MMPs participaban en el mecanismo de migración de las células microgliales de la retina, contribuyendo a la orientación y polarización de las mismas. No obstante, no se pudieron identificar las MMPs específicas que estaban implicadas en dicho mecanismo, aunque sí demostrábamos que no eran MMP-2 ni MMP-9.

Fig. 1. La inhibición de metaloproteasas con GM6001 produce alteraciones en la morfología y orientación de las células microgliales que están migrando tangencialmente en explantes de retina embrionaria embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. A, B: Montajes totales de ERECs en los que se observan las células microgliales inmunomarcadas con QH1 (verde) que están migrando en la región adyacente al extremo dorsal de la cabeza de nervio óptico-base del pecten (delimitada por líneas de puntos y señalada con CNO/BP). Los ERECs procedían de los ojos izquierdo (**A**) y derecho (**B**) de un mismo embrión de E7 y fueron tratados durante 1 día *in vitro* con DMSO 1:500 (control, **A**) y con GM6001 20 μ M (**B**), respectivamente. **C-F:** Células microgliales (verde) y axones de células ganglionares (rojo), revelados con los anticuerpos QH1 y 4H6, en el área adyacente al extremo dorsal de la CNO/BP (punteado en **C** y **E**) de ERECs obtenidos a partir de los ojos izquierdo (**C, D**) y derecho (**E, F**) de un mismo embrión de E7 tratados con DMSO 1:500 (control, **C, D**) y con GM6001 20 μ M (**E, F**), respectivamente. Las áreas delimitadas por las líneas blancas en **C** y **E** muestran los fascículos de axones de células ganglionares, orientados paralelamente entre sí, que se utilizaron como referencia para medir el ángulo del eje longitudinal de las células microgliales contenidas en dichas áreas. Los paneles **D** y **F** muestran un aumento de la parte más dorsal (derecha) de las áreas encuadradas por líneas blancas en **C** y **E**. En el EREC control, las células microgliales son muy alargadas y tienen una orientación casi paralela a los fascículos de axones de células ganglionares (**D**), en contraste con la morfología menos alargada y la orientación más irregular de las células microgliales en el EREC tratado con GM6001 (**F**). Barra de escala: 130 μ m para **A, B, C** y **E** y 50 μ m para **D** y **F**.

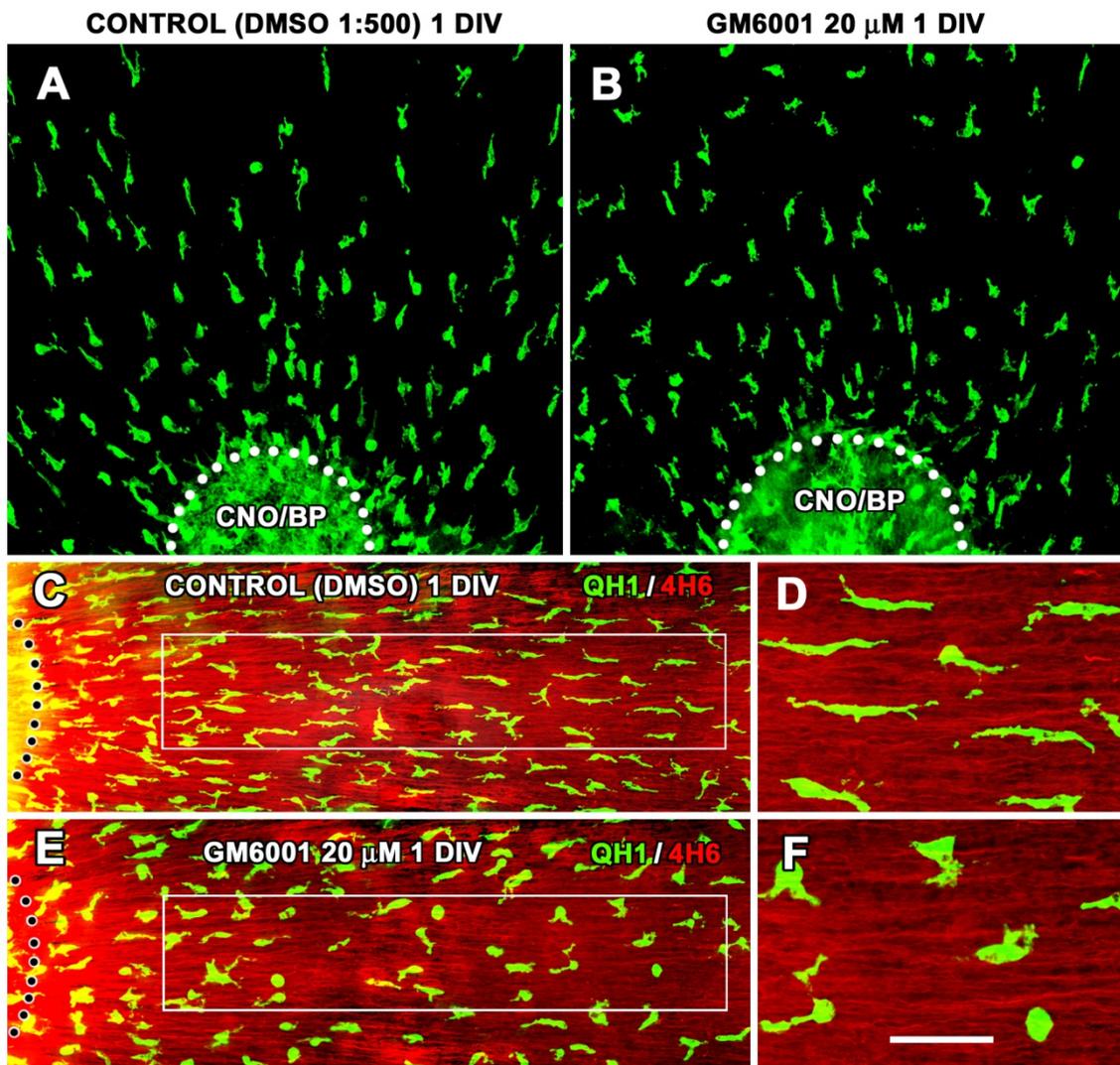


Fig. 2. Diferentes concentraciones de GM6001 tienen efectos similares sobre la orientación de las células microgliales migratorias de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. A-F: Células microgliales inmunomarcadas con QH1 que están migrando tangencialmente en el área adyacente al extremo dorsal de la cabeza de nervio óptico de ERECs de E7 controles (A, C, E) y experimentales (B, D, F) tratados durante 1 día *in vitro* con diferentes concentraciones de DMSO (1:1000 en A, 1:500 en C y 1:250 en E) y de GM6001 (10 μ M en B, 20 μ M en D y 40 μ M en F), respectivamente. Cada pareja de ERECs controles y experimentales procedía de los ojos izquierdo y derecho de un mismo embrión. Nótese que las células microgliales muestran una morfología fuertemente polarizada y una orientación casi paralela en los EREC control, que contrasta con la morfología menos polarizada y la orientación menos definida en los EREC experimentales. Barra de escala: 80 μ m. G: El valor medio del ángulo formado entre el eje mayor de las células microgliales migratorias y el eje longitudinal de los fascículos de axones de células ganglionares, expresado en grados sexagesimales, era significativamente más elevado (dos asteriscos: $p < 0,01$) en los EREC tratados con concentraciones 10, 20 y 40 μ M de GM6001 (barras negras) que en sus respectivos controles (barras vacías). Dicho ángulo no era significativamente diferente en los EREC tratados con las tres concentraciones de GM6001. Cada ángulo medio expresado en el histograma se obtuvo a partir de las medidas efectuadas en no menos de 200 células microgliales de al menos 7 explantes diferentes.

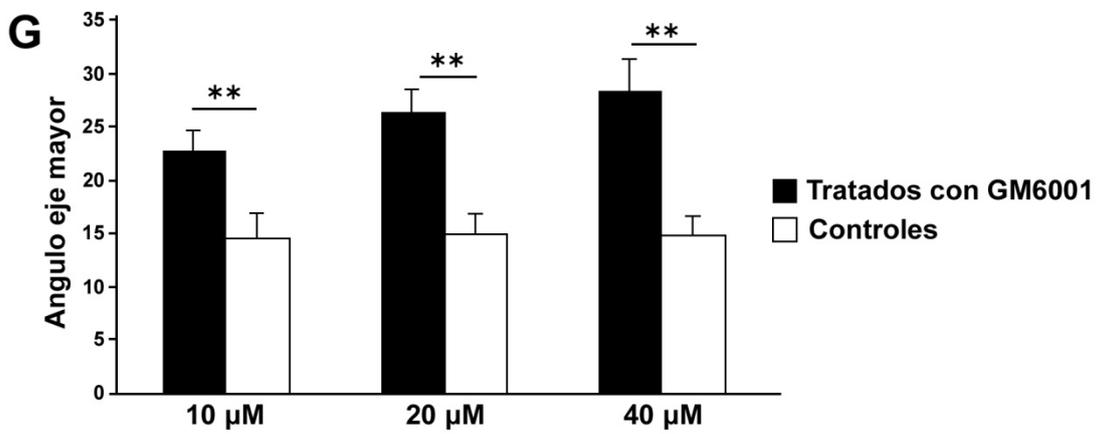
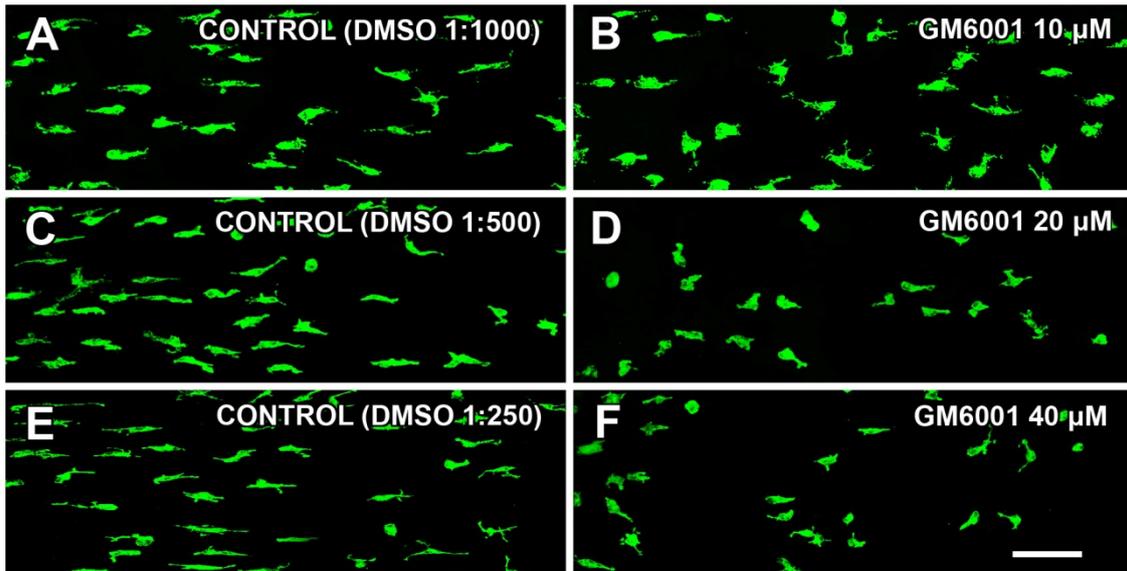


Fig. 3. La inhibición de metaloproteasas con GM6001 disminuye la longitud y la elongación de las células microgliales que están migrando tangencialmente en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. A, B: Células microgliales inmunomarcadas con QH1 que están migrando tangencialmente en un área dorsal a la cabeza de nervio óptico de ERECs tratados durante 1 día *in vitro* con DMSO 1:500 (control, **A**) y GM6001 20 μM (GM6001, **B**). Véase que las células microgliales del EREC control (**A**) muestran una morfología fuertemente polarizada en dirección centro-periférica (de abajo hacia arriba), con prolongaciones en ambos extremos, que contrasta con la morfología menos polarizada que se advierte en las células microgliales del EREC tratado con GM6001 (**B**). Barra de escala: 50 μm . **C:** Análisis morfométrico de las células microgliales QH1-positivas contenidas en cultivos de ERECs tratados con GM6001 20 μM (barras negras) y ERECs control (barras vacías). Las barras representan las medias \pm errores standard del índice de elongación, longitud del eje mayor (en μm), área (en μm^2) y densidad (en número de células por área de $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) de las células microgliales. Dichas medias eran obtenidas a partir de las medidas efectuadas en 275 y 308 células microgliales de 10 explantes tratados con GM6001 y sus correspondientes explantes control, respectivamente. El índice de elongación celular y la longitud del eje celular mayor eran significativamente menores (dos asteriscos: $p < 0,01$) en los ERECs tratados con GM6001 que en sus respectivos controles, mientras que el área y la densidad celular no eran significativamente diferentes.

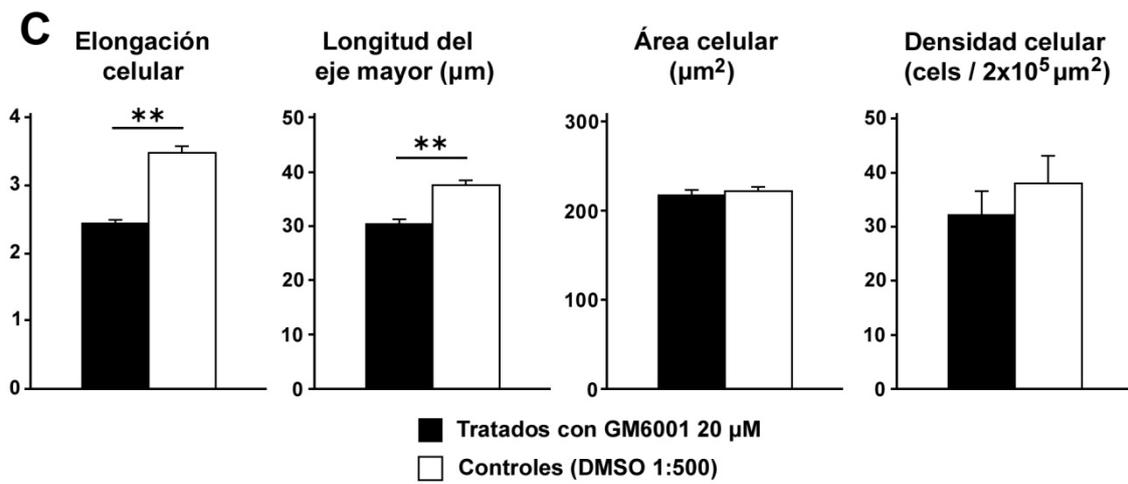
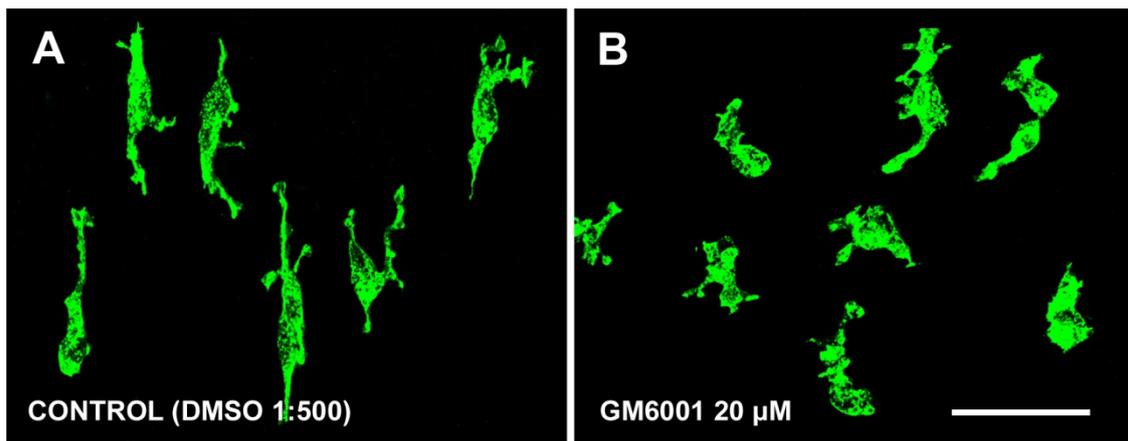


Fig. 4. El inhibidor de metaloproteasas GM6001 no produce alteraciones en la organización glial y neuronal de los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. Secciones transversales de ERECs de E7 tratados con DMSO 1:500 (controles, **A**, **C**, **E** y **G**) y con GM6001 20 μ M (**B**, **D**, **F** y **H**). Dichas secciones eran teñidas con Hoechst 33342 (que teñía en azul las capas nucleares) y marcadas mediante inmunofluorescencia con diferentes anticuerpos monoclonales que revelaban distintos aspectos de la organización tisular de los ERECs. No se advertían diferencias en ninguno de estos aspectos entre los ERECs tratados con GM6001 y los respectivos controles (comparar **B**, **D**, **F** y **H** con **A**, **C**, **E** y **G**, respectivamente). **A**, **B**: Distribución de células apoptóticas (rojo) y células microgliales (verde), puestas de manifiesto mediante doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-caspasa-3 activa (C3) y QH1, respectivamente. **C**, **D**: Organización del andamiaje de células de Müller vimentina-positivas (verde) revelado con el anticuerpo H5. **E**, **F**: Distribución de tenascina (verde), revelada con el anticuerpo M1B4, en las capas plexiformes interna y externa. **G**, **H**: Distribución de neuronas Islet-1-positivas (verde) reveladas con el anticuerpo 39.4D5. Subpoblaciones de neuronas Islet-1-positivas se localizaban en la capa nuclear externa, mitad escleral de la capa nuclear interna, interfase entre las capas nuclear interna y plexiforme interna y capa de células ganglionares. Barra de escala: 50 μ m.

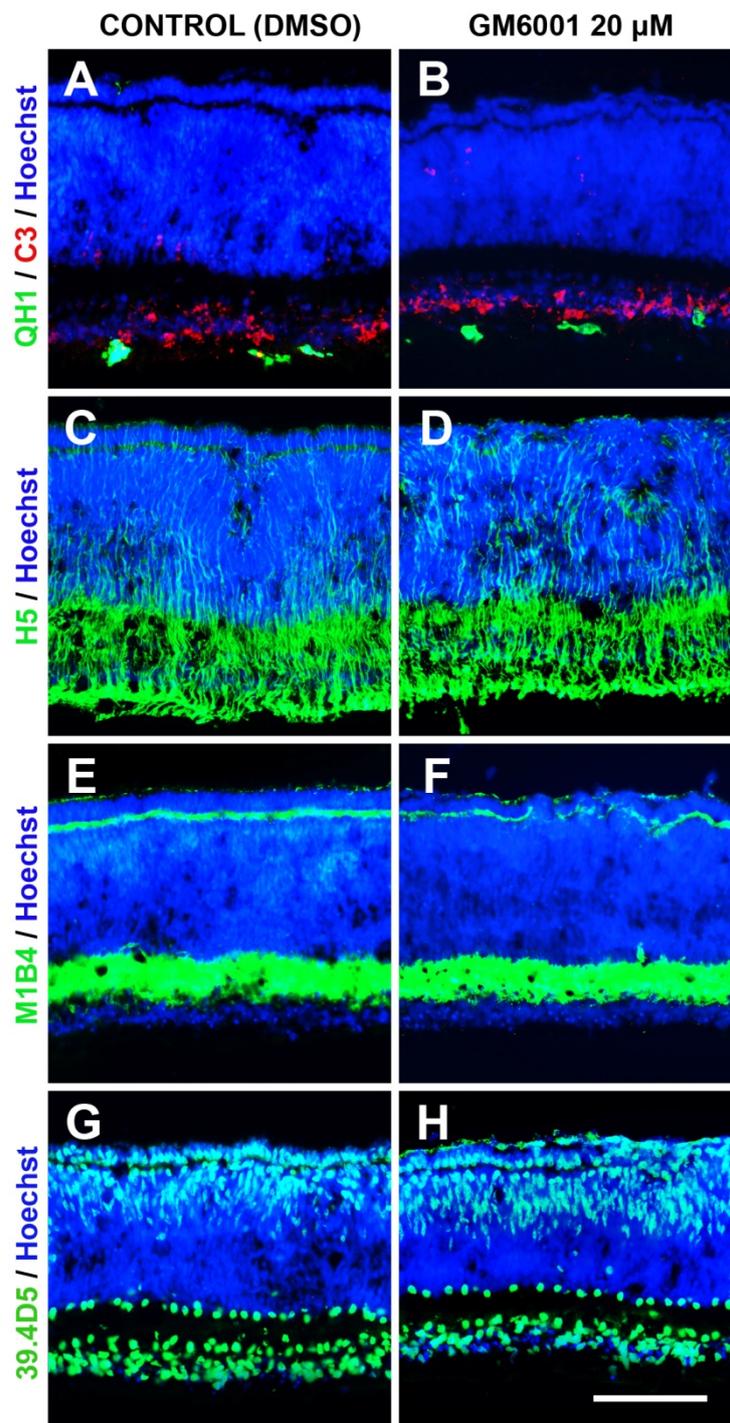
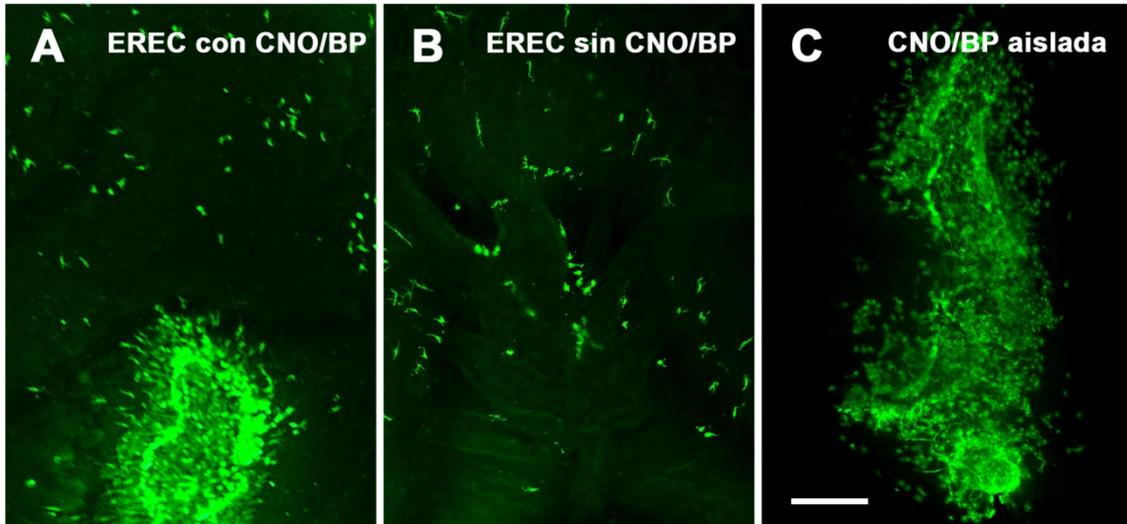
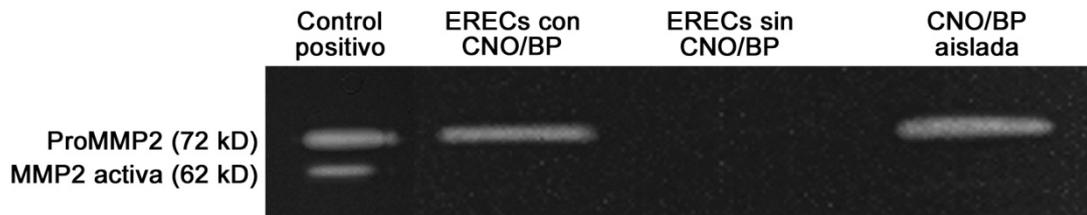


Fig. 5. Ningún tipo celular retiniano de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7 expresa MMP-2 o MMP-9 ni sus formas inactivas (pro-MMP-2 y pro-MMP-9), mientras que algunas células de la cabeza de nervio óptico/base del pecten (CNO/BP) segregan pro-MMP-2. A-C: Montajes totales de diferentes tipos de explantes cultivados (inmunoteñidos con el anticuerpo monoclonal QH1) en los que se realizaron estudios de zimografía de gelatina. En los ERECs de E7 con CNO/BP (**A**) se conservaba la parte dorsal de la CNO/BP (abajo en el centro), que era totalmente eliminada en los ERECs sin CNO/BP (**B**). También se cultivaron piezas de CNO/BP aisladas, desprovistas de tejido retiniano (**C**). Barra de escala: 200 μ m. **D:** Zimograma que muestra la actividad gelatinolítica de pro-MMP-2 (72kD) segregada al medio de cultivo por ERECs con CNO/BP y por piezas de CNO/BP aisladas, pero no por ERECs sin CNO/BP. No hay actividad gelatinolítica de MMP-2 activa (62 kD) en el medio de cultivo de ninguno de los tres explantes. **E:** Zimograma que muestra la ausencia de actividad gelatinolítica de pro-MMP-2 y MMP-2 activa en extractos de ERECs con y sin CNO/BP y en piezas de CNO/BP aisladas.



D ZIMOGRAMA DE MEDIOS DE CULTIVO



E ZIMOGRAMA DE EXTRACTOS



Alteración del fenotipo de las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 tras la inhibición de la tirosina-quinasa Src

Los ERECs de E7 tratados durante 1 div con PP2, un inhibidor de la tirosina-quinasa Src, a una concentración 20 μM mostraban la incorporación de células microgliales desde la CNO/BP hacia la retina de forma similar a lo que ocurría en ERECs control (tratados con DMSO 1:500). Una vez dentro de la retina, dichas células tenían una morfología alargada, con su eje mayor aproximadamente paralelo al curso de los axones de células ganglionares, tanto en ERECs tratados con PP2 como en controles (Fig. 6A, B). Sin embargo, las células microgliales en ERECs tratados con PP2 mostraban evidentes diferencias morfológicas en relación con las de ERECs control. Concretamente, la mayoría de las células de ERECs experimentales eran más estrechas y largas y tenían somas más pequeños que las de los controles (comparar Fig. 6C y D). Esto era especialmente llamativo en algunas células microgliales de los ERECs tratados con PP2 que tenían una apariencia filiforme, con una longitud de más de 100 μm y unas prolongaciones de 2-3 μm de anchura en toda su longitud, incluyendo las zonas adyacentes al soma (Fig. 6C). En contraste, la mayoría de las células microgliales de los ERECs control tenían un aspecto fusiforme y las más largas tenían una longitud inferior a 80 μm , con prolongaciones bipolares de alrededor de 4 μm de ancho en las inmediaciones del soma que se adelgazaban progresivamente hacia los extremos distales (Fig. 6D).

El efecto del tratamiento con PP2 sobre la morfología de las células microgliales fue valorado cuantitativamente en un estudio morfométrico llevado a cabo en un área de $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ situada a una distancia de 100 μm del extremo dorsal de la CNO/BP. Este estudio reveló que el índice de elongación medio de las células microgliales mostraba diferencias significativas en los explantes tratados con PP2 y en los controles, siendo un 56,8% mayor en los primeros que en los segundos (Fig. 6E). Puesto que el índice de elongación es el cociente entre las longitudes de los ejes mayor y menor de la célula, este resultado confirmaba nuestras observaciones previas sobre la apariencia filiforme de las células microgliales en los ERECs tratados con PP2. La longitud media del eje mayor también era significativamente más elevada en las células microgliales de los explantes tratados con PP2 (53,06 μm) que en las de los controles (46,01 μm , Fig. 6E), aunque la diferencia (15,3%) no era tan acusada como la del índice de elongación. Por

lo tanto, las elevadas diferencias en el índice de elongación eran debidas a una moderada, aunque significativa, reducción de la longitud del eje mayor y a una dramática disminución de la longitud del eje menor de las células microgliales tras la inhibición de Src con PP2. Dicha inhibición no parecía afectar a la densidad media de las células microgliales, que no mostraba diferencias significativas en los explantes tratados con PP2 y en los controles (Fig. 6E). En conjunto, estos resultados demostraban que la proteína-quinasa Src estaba implicada en los mecanismos de migración de las células microgliales, de manera que su inhibición con PP2 daba lugar a una severa alteración del fenotipo migratorio de las células.

La organización estructural de los ERECs de E7 no sufría alteraciones tras el tratamiento con PP2, siendo similar en los ERECs tratados y en los controles. Así, la apariencia y espesor de las capas nucleares de la retina (Fig. 7), la distribución de las células apoptóticas caspasa-3 activa-positivas y de las células microgliales (Fig. 7A, B), el armazón estructural de prolongaciones radiales vimentina-positivos de células de Müller (Fig. 7C, D), la presencia de tenascina en las capas plexiformes (Fig. 7E, F) y la distribución de neuronas Islet-1-positivas (Fig. 7G, H) no mostraban diferencias entre los ERECs tratados con PP2 y los controles. Por lo tanto, las alteraciones del fenotipo migratorio de las células microgliales observadas en los ERECs tratados con PP2 no eran un efecto indirecto ocasionado por alteraciones del tejido sobre el que migran dichas células sino que eran consecuencia directa de la inhibición de Src en las células microgliales.

Fig. 6. La inhibición de la tirosina-quinasa Src con PP2 incrementa la elongación de las células microgliales que migran tangencialmente en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. A-D: Montajes totales de ERECs en los que se observan células microgliales inmunomarcadas con QH1 que están migrando en la región adyacente al extremo dorsal de la cabeza de nervio óptico (**A** y **B**, abajo en el centro) de explantes procedentes de los ojos izquierdo (**A** y **C**) y derecho (**B** y **D**) de un mismo embrión de E7 tratados durante 1 día *in vitro* con DMSO 1:500 (control, **A** y **C**) y con PP2 20 μM (**B** y **D**), respectivamente. Observaciones a mayor aumento evidencian que las células microgliales del EREC tratado con PP2 (**D**) son más estrechas y alargadas que las del EREC control (**C**). Barra de escala: 150 μm en **A** y **B** y 40 μm en **C** y **D**. **E:** Análisis morfométrico de las células microgliales QH1-positivas contenidas en cultivos de ERECs tratados con PP2 20 μM (barras negras) y ERECs control (barras vacías). Las barras representan las medias \pm errores standard del índice de elongación, longitud del eje mayor (en μm), área (en μm^2) y densidad (en número de células por área de $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) de las células microgliales. Dichas medias eran obtenidas a partir de las medidas efectuadas en 150 y 167 células microgliales de 5 explantes tratados con PP2 y sus correspondientes explantes control, respectivamente. El índice de elongación celular y la longitud del eje celular mayor eran significativamente mayores (dos asteriscos: $p < 0,01$) en los ERECs tratados con PP2 que en sus respectivos controles, mientras que el área celular era significativamente menor ($p < 0,01$) en los primeros. La densidad celular no mostraba diferencias significativas entre los explantes tratados y los controles.

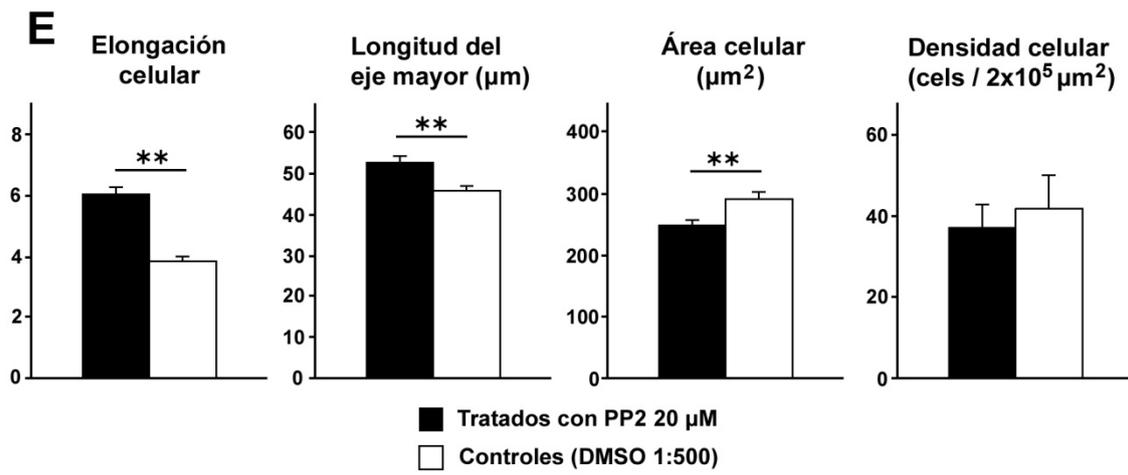
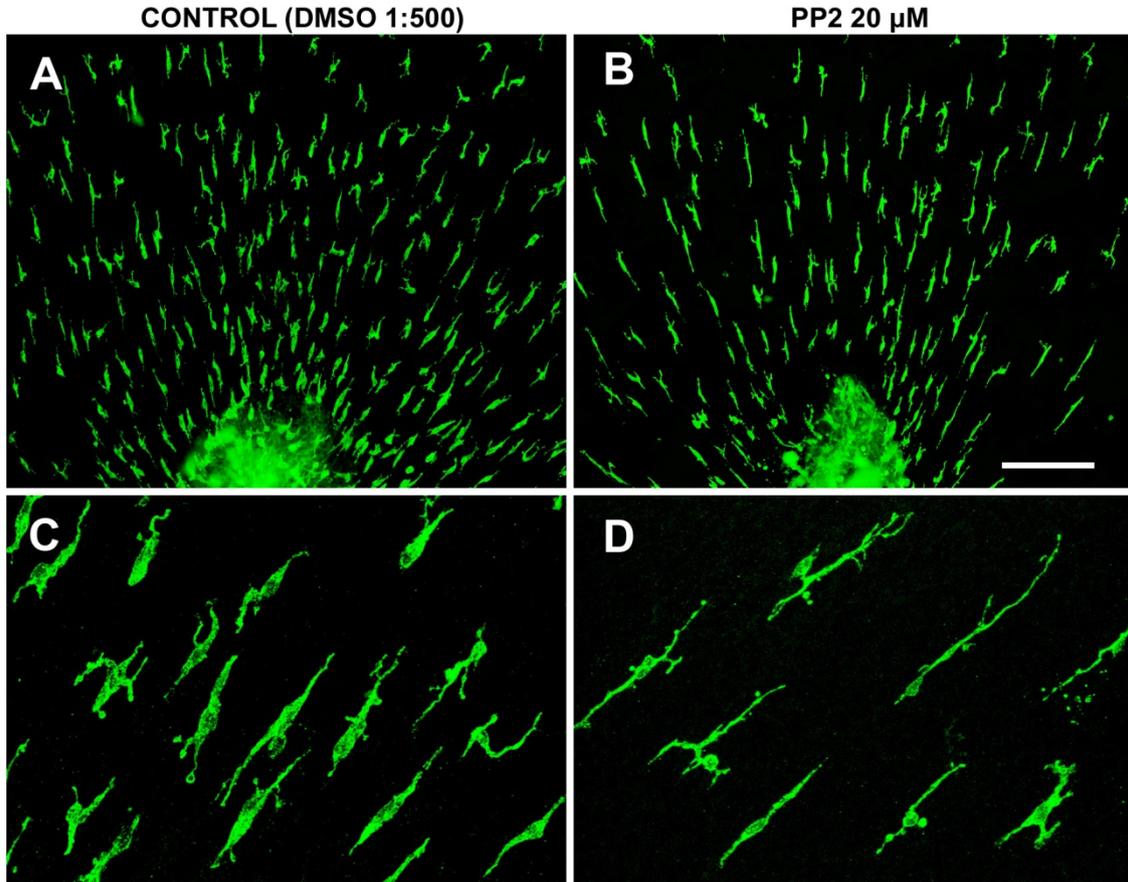
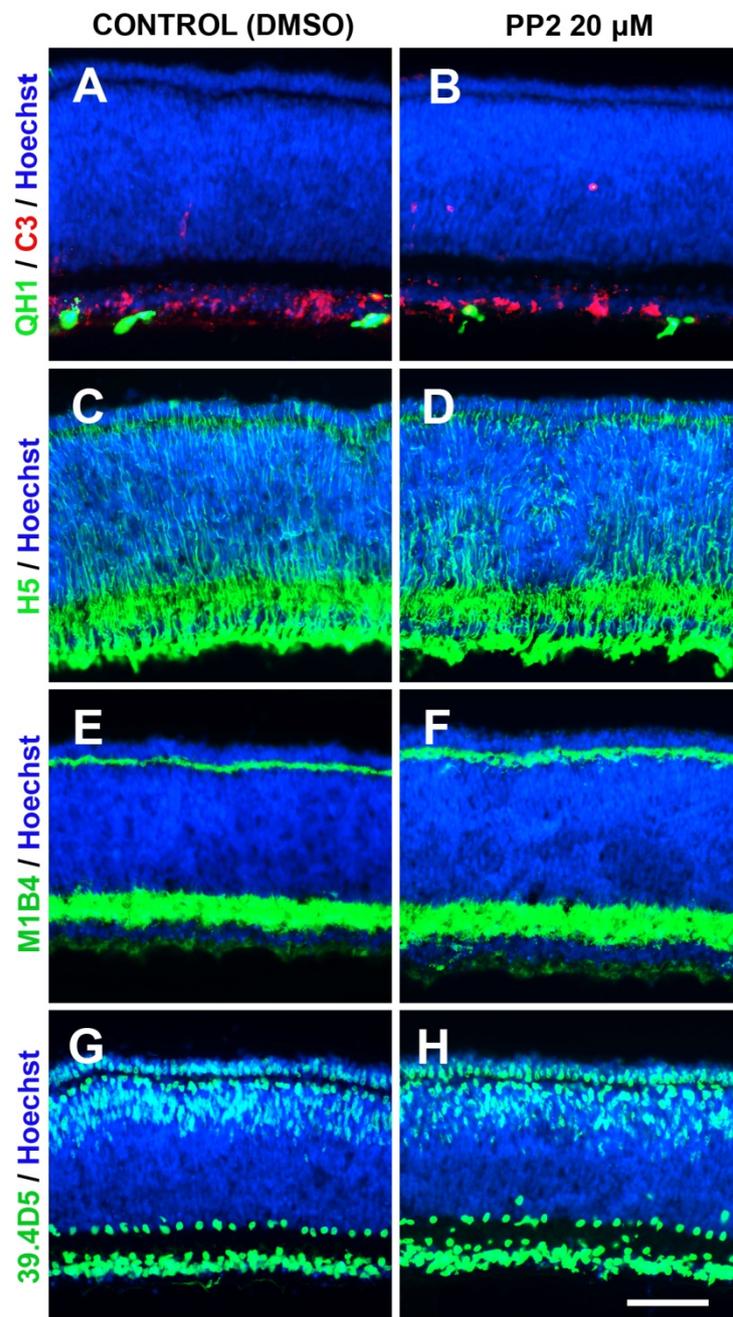


Fig. 7. El inhibidor PP2 de la tirosina-quinasa Src no produce alteraciones en la organización glial y neuronal de los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. Secciones transversales de ERECs de E7 tratados con DMSO 1:500 (controles, **A**, **C**, **E** y **G**) y con PP2 20 μ M (**B**, **D**, **F** y **H**). Dichas secciones eran teñidas con Hoechst 33342 (que teñía en azul las capas nucleares) y marcadas mediante inmunofluorescencia con diferentes anticuerpos monoclonales que revelaban distintos aspectos de la organización tisular de los ERECs. No se advertían diferencias en ninguno de estos aspectos entre los ERECs tratados con PP2 y los respectivos controles (comparar **B**, **D**, **F** y **H** con **A**, **C**, **E** y **G**, respectivamente). **A**, **B**: Distribución de células apoptóticas (rojo) y células microgliales (verde), puestas de manifiesto mediante doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-caspasa-3 activa (C3) y QH1, respectivamente. **C**, **D**: Organización del andamiaje de células de Müller vimentina-positivas (verde) revelado con el anticuerpo H5. **E**, **F**: Distribución de tenascina (verde), revelada con el anticuerpo M1B4, en las capas plexiformes interna y externa. **G**, **H**: Distribución de neuronas Islet-1-positivas (verde) reveladas con el anticuerpo 39.4D5. Barra de escala: 50 μ m.



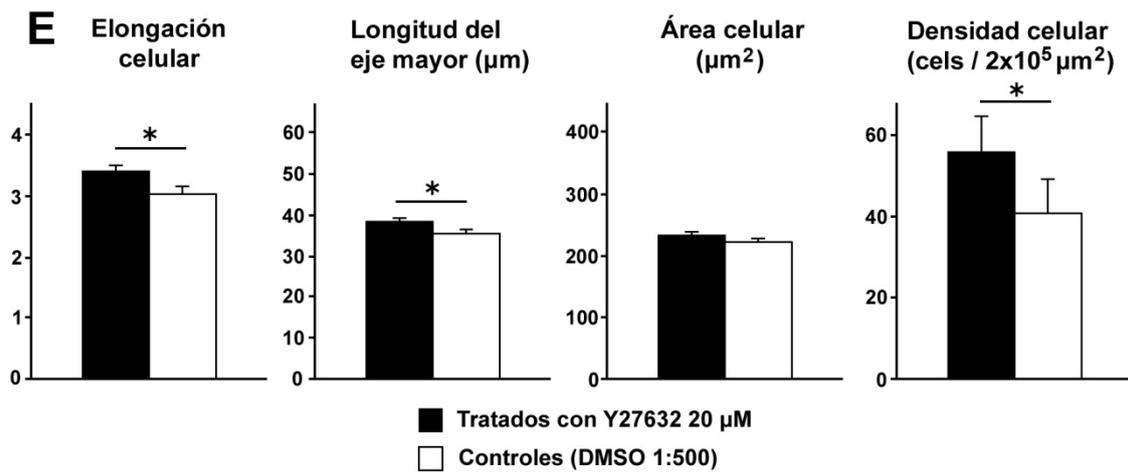
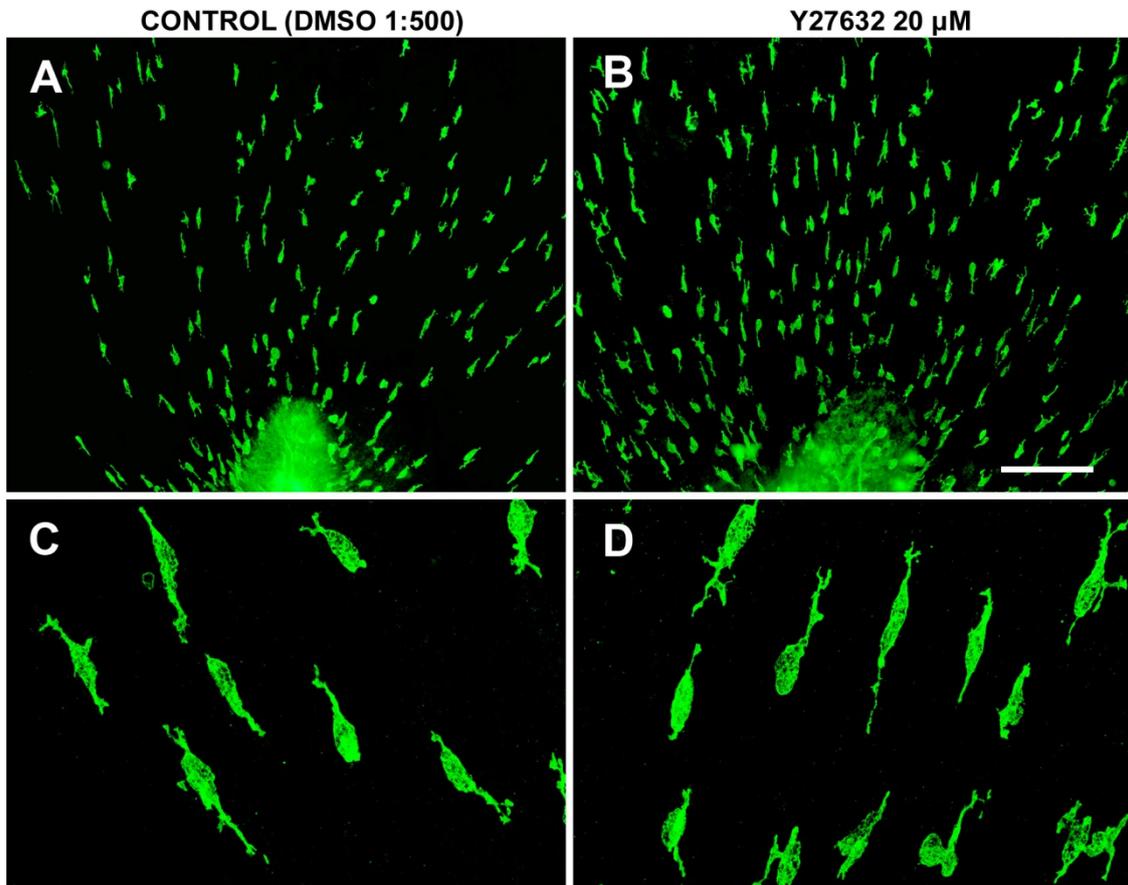
Incremento en la densidad de células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 tras la inhibición de la proteína-quinasa ROCK asociada a Rho

Los ERECs de E7 tratados durante 1 div con el inhibidor Y-27632 de la proteína-quinasa ROCK, a una concentración 20 μ M, mostraban que las células microgliales eran capaces de incorporarse a la retina desde la CNO/BP y de migrar tangencialmente en dirección centro-periférica. Las células microgliales migratorias de los ERECs tratados con Y-27632 mostraban un fenotipo alargado en la dirección del movimiento (Fig. 8B), similar al observado en ERECs control (Fig. 8A). Dichas células mostraban un soma fusiforme que albergaba el núcleo y prolongaciones polarizadas en los extremos del soma tanto en los ERECs control (Fig. 8C) como en los tratados con Y-27632 (Fig. 8D). No obstante, en todos los ERECs tratados con el inhibidor de ROCK se observaba mayor número de células microgliales migrando en la retina que en los respectivos ERECs control (comparar A y B en la Fig. 8). El análisis morfométrico de los explantes revelaba que la densidad media de células microgliales se incrementaba significativamente ($p < 0,05$) un 36% tras el tratamiento de los ERECs con Y-27632 (Fig. 8E). Las medias de la elongación y de la longitud del eje mayor de las células microgliales también eran significativamente ($p < 0,05$) más elevadas (12 y 8%, respectivamente) en los explantes tratados con el inhibidor de ROCK que en sus respectivos controles (Fig. 8E). Estos resultados demostraban que la proteína-quinasa ROCK asociada a Rho tiene algún tipo de participación en los mecanismos de diseminación de las células microgliales dentro de la retina, favoreciendo la distribución en ella de mayor número de células. Igualmente, ROCK debe jugar algún papel en el mecanismo de migración de dichas células, lo que explicaría que su inhibición diera lugar a un ligero incremento de la elongación celular.

La estructura de los ERECs de E7 tratados con Y-27632 no mostraba diferencias aparentes con la observada en los ERECs control. Concretamente, el espesor de las capas nucleares de la retina, la distribución de células microgliales y células caspasa-3 activa-positivas, las prolongaciones radiales vimentina-positivas de las células de Müller, la distribución de tenascina en las capas plexiformes y la distribución de neuronas Islet-1-positivas eran similares en los ERECs tratados con Y-27632 y en los respectivos controles. Estos resultados demostraban que las alteraciones observadas en las células microgliales tras la inhibición de ROCK no eran ocasionadas como

consecuencia indirecta de alteraciones del microambiente en el que migran dichas células, sino que había un efecto directo de la inhibición de ROCK sobre la microglía.

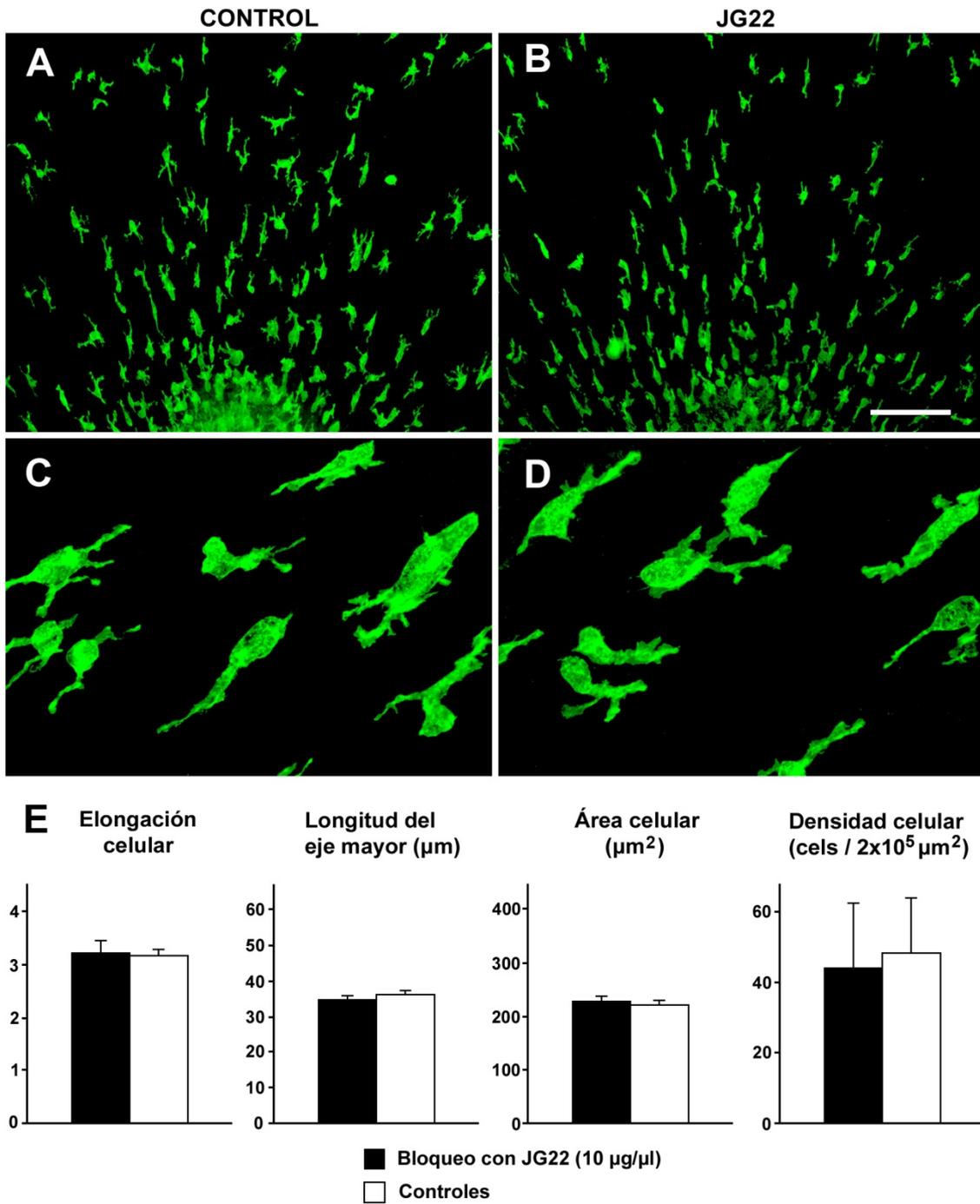
Fig. 8. La inhibición de la proteína-quinasa ROCK asociada a Rho incrementa la densidad y la elongación de las células microgliales que migran tangencialmente en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. A-D: Montajes totales de ERECs en los que se observan células microgliales inmunomarcadas con QH1 que están migrando en la región adyacente al extremo dorsal de la cabeza de nervio óptico (**A** y **B**, abajo en el centro) de explantes procedentes de los ojos izquierdo (**A** y **C**) y derecho (**B** y **D**) de un mismo embrión de E7 tratados durante 1 día *in vitro* con DMSO 1:500 (control, **A** y **C**) y con Y-27632 20 μ M (**B** y **D**), respectivamente. Se observa mayor número de células microgliales en el explante tratado con Y-27632 (**B**) que en el explante control (**A**). Observaciones a mayor aumento demuestran que no hay grandes diferencias entre las células microgliales del EREC tratado con Y-27632 (**D**) y las del EREC control (**C**), aunque las primeras parecen ligeramente más alargadas. Barra de escala: 150 μ m en **A** y **B** y 40 μ m en **C** y **D**. **E:** Análisis morfométrico de las células microgliales QH1-positivas contenidas en cultivos de ERECs tratados con Y-27632 20 μ M (barras negras) y ERECs control (barras vacías). Las barras representan las medias \pm errores standard del índice de elongación, longitud del eje mayor (en μ m), área (en μ m²) y densidad (en número de células por área de $2 \times 10^5 \mu$ m²) de las células microgliales. Dichas medias eran obtenidas a partir de las medidas efectuadas en 274 y 199 células microgliales de 5 explantes tratados con Y-27632 y sus correspondientes explantes control, respectivamente. La densidad celular, el índice de elongación celular y la longitud del eje celular mayor eran significativamente mayores (asterisco: $p < 0,05$) en los ERECs tratados con Y-27632 que en sus respectivos controles, mientras que el área celular no mostraba diferencias significativas.



Ausencia de efectos en las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs de E7 tras el bloqueo de las integrinas

Experiencias de bloqueo de integrinas con anticuerpos específicos frente a diferentes subunidades de integrinas en los cultivos de ERECs de E7 mostraban que las células microgliales continuaban migrando en éstos sin sufrir alteraciones morfológicas aparentes. Concretamente, el tratamiento de ERECs de E7 durante 1 div con el anticuerpo JG22, específico de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas de aves, ponía de manifiesto que las células microgliales mantenían un fenotipo migratorio similar al observado en ERECs controles tratados con una inmunoglobulina del mismo isotipo (G1) que el de JG22 o no tratados con ningún anticuerpo (comparar Fig. 9A y B). Las células microgliales de los ERECs tratados con JG22 mantenían su migración tangencial mostrando un soma fusiforme u ovoide con prolongaciones polarizadas en la dirección del movimiento y lamelipodios de tamaño y localización variable (Fig. 9C), igual que sucedía en los respectivos controles (Fig. 9D). Resultados similares se obtuvieron en experiencias de bloqueo con otros anticuerpos específicos frente a la subunidad $\beta 1$ de las integrinas, tales como V2E9 y CSAT. Tampoco se observaron alteraciones de la migración de células microgliales en ERECs de E7 tratados con el anticuerpo LM609, específico de la integrina $\alpha V\beta 3$ de aves (datos no mostrados). El análisis morfométrico de los explantes tratados con JG22 y sus respectivos controles no tratados confirmaba que la longitud del eje mayor, el área y el coeficiente de elongación de las células microgliales no eran significativamente diferentes en los explantes tratados con el anticuerpo JG22 y en los explantes no tratados (Fig. 9E). El bloqueo de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas con JG22 tampoco afectaba significativamente a la densidad de las células microgliales (Fig. 9E), demostrando que, tras 1 div, los ERECs tratados con JG22 eran colonizados por un número de células microgliales similar al observado en ERECs control. En conjunto, nuestras experiencias de bloqueo de las integrinas demostraban que estas moléculas no desempeñan un papel significativo en los mecanismos de migración tangencial de las células microgliales dentro de la retina de codorniz.

Fig. 9. El bloqueo de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas con el anticuerpo JG22 no tiene efectos sobre el fenotipo y el número de células microgliales que migran tangencialmente en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. **A-D:** Montajes totales de ERECs en los que se observan células microgliales inmunomarcadas con QH1 que están migrando en la región adyacente al extremo dorsal de la cabeza de nervio óptico (**A** y **B**, abajo en el centro) de explantes procedentes de los ojos izquierdo (**A** y **C**) y derecho (**B** y **D**) de un mismo embrión de E7 tratados durante 1 día *in vitro* con el anticuerpo JG22 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, **B** y **D**) o no tratados (control, **A** y **C**). No se aprecian diferencias morfológicas entre las células microgliales del EREC tratado (**D**) y las del EREC control (**C**). Barra de escala: 150 μm en **A** y **B** y 40 μm en **C** y **D**. **E:** Análisis morfométrico de las células microgliales QH1-positivas contenidas en cultivos de ERECs tratados con JG22 (barras negras) y ERECs control (barras vacías). Las barras representan las medias \pm errores standard del índice de elongación, longitud del eje mayor (en μm), área (en μm^2) y densidad (en número de células por área de $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) de las células microgliales. Dichas medias eran obtenidas a partir de las medidas efectuadas en 178 y 196 células microgliales de 5 explantes tratados con JG22 y sus correspondientes explantes control, respectivamente. Ninguno de los parámetros analizados mostraba diferencias significativas entre los ERECs tratados con JG22 y los ERECs control.



Alteraciones del fenotipo de las células microgliales y de la organización histológica de la retina en ERECs de E7 tras la inhibición de calpaínas

Los ERECs de E7 tratados durante 1 div con ALLN, un inhibidor de las proteasas calcio-dependientes calpaínas, a una concentración 10 μ M mostraban severas alteraciones en la morfología y el comportamiento migratorio de las células microgliales (Fig. 10). Así, los ERECs control eran colonizados por estas células siguiendo un patrón de migración similar al descrito en la retina *in situ* (Fig. 10A). Por el contrario, los ERECs tratados con ALLN mostraban células microgliales con un fenotipo redondeado (Fig. 10B), muy diferente de la morfología elongada y polarizada, típica de células migratorias, observada en los ERECs control. Por lo tanto, el mecanismo de migración de la microglía retiniana era severamente alterado tras la inhibición de calpaínas en ERECs de E7.

Los drásticos cambios de la morfología microglial tras el tratamiento con ALLN iban acompañados de una profunda alteración estructural de las capas vítreas de la retina. Así, los ERECs tratados con ALLN mostraban numerosos pliegues (Fig. 11) y un fuerte incremento de la caspasa-3 activa, indicativa de muerte celular, en la capa de células ganglionares y capa de fibras nerviosas (comparar A y B en Fig. 11). La inhibición de calpaínas con ALLN también afectaba a las células de Müller, cuyas prolongaciones vítreas mostraban una pérdida de inmunorreactividad con el anticuerpo H5, que sugería que dichas células habían retraído sus pies terminales y se habían desprendido de la membrana limitante interna (comparar C y D en Fig. 11). Además, la mayoría de las células ganglionares Islet-1-positivas habían desaparecido en los ERECs tratados con ALLN (comparar G y H en Fig. 11), mientras que el patrón de distribución de núcleos Islet-1-positivos en las capas nucleares interna y externa no mostraba diferencias entre los ERECs tratados y sus controles. Las alteraciones estructurales de los ERECs tratados con ALLN no afectaban a la organización de las capas plexiformes interna y externa, las cuales presentaban la misma distribución de tenascina observada en los ERECs control (comparar E y F en Fig. 11). En resumen, la inhibición de calpaínas con ALLN no parecía afectar a las capas plexiformes y capas nucleares externa e interna de la retina pero sí producía una severa alteración en la capa de células ganglionares y en la parte vítrea de las células de Müller, que es el sustrato sobre el que tiene lugar la migración de las células microgliales en los ERECs de E7.

Nuestros resultados demostraban que las profundas alteraciones observadas en las células microgliales tras la inhibición de calpaínas con ALLN podían ser una consecuencia indirecta de las modificaciones estructurales de la parte vítrea de la retina, sobre todo de las alteraciones de las prolongaciones vítreas de las células de Müller, que constituyen el microambiente en el que tiene lugar la migración tangencial de la microglía.

Fig. 10. Las células microgliales que migran tangencialmente en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7 sufren una severa alteración de su morfología y comportamiento migratorio tras la inhibición de las calpaínas con ALLN. **A, B:** Montajes totales de ERECs procedentes del ojo izquierdo (**A**) y derecho (**B**) de un mismo embrión de E7 tratados durante 1 día *in vitro* con DMSO 1:1000 (control, **A**) y con ALLN 10 μ M (**B**), respectivamente. Las células microgliales, que eran inmunomarcadas con el anticuerpo QH1, se observan en la región adyacente al extremo dorsal de la cabeza de nervio óptico (abajo en el centro) de cada explante. Las células microgliales del EREC control muestran una morfología alargada y fuertemente polarizada, típica de células en proceso de migración (**A**), que contrasta con la morfología redondeada, típica de células no migratorias, observada en las células microgliales del EREC tratado con ALLN (**B**). Barra de escala: 150 μ m.

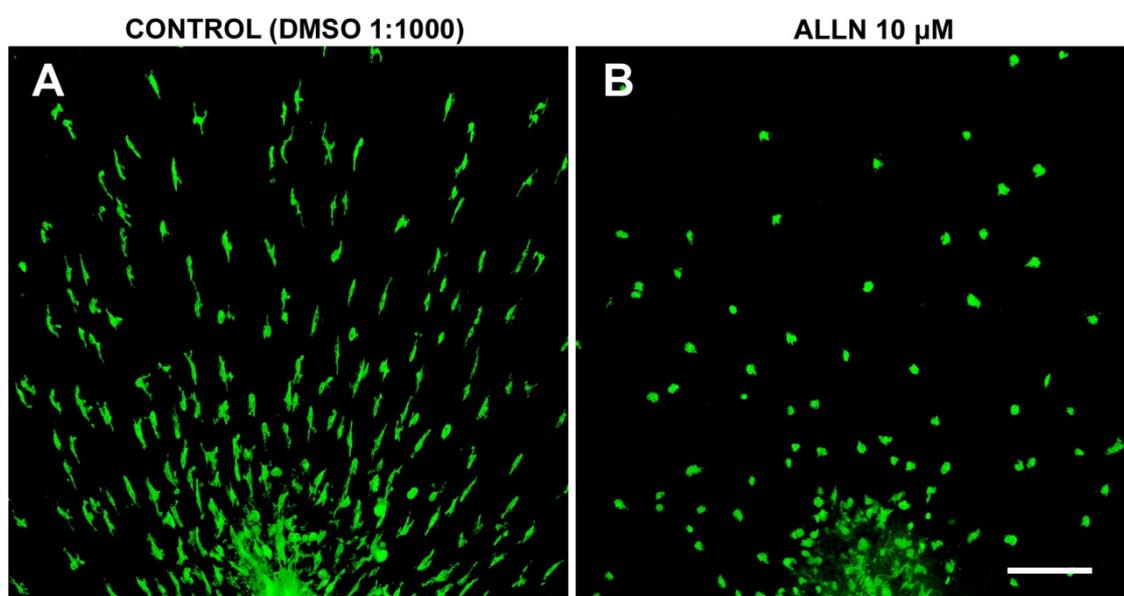
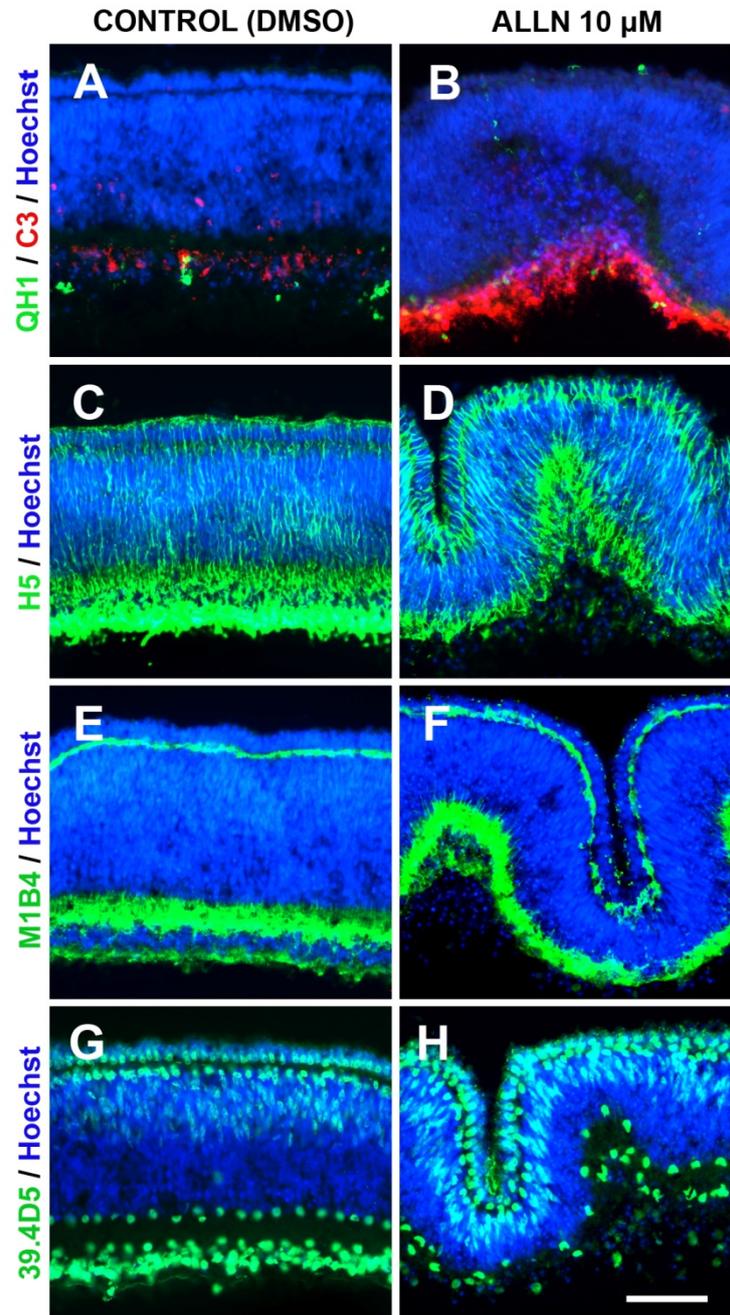


Fig. 11. La inhibición de las calpaínas produce severas alteraciones en la organización glial y neuronal de la parte vítrea de los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de E7. Secciones transversales de ERECs de E7 tratados con DMSO 1:1000 (controles, **A**, **C**, **E** y **G**) y con ALLN 10 μ M (**B**, **D**, **F** y **H**). Dichas secciones eran teñidas con Hoechst 33342 (que teñía en azul las capas nucleares) y marcadas mediante inmunofluorescencia con diferentes anticuerpos monoclonales que revelaban distintos aspectos de la organización tisular de los ERECs. Nótese la aparición de profundos pliegues en los explantes tratados con ALLN. **A**, **B**: Distribución de células apoptóticas (rojo) y células microgliales (verde), puestas de manifiesto mediante doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-caspasa-3 activa (C3) y QH1, respectivamente. Las células apoptóticas caspasa-3-positivas de la capa de células ganglionares son mucho más abundantes en el explante tratado con ALLN (**B**) que en el control (**A**). **C**, **D**: Células de Müller vimentina-positivas (verde) reveladas con el anticuerpo H5. Las prolongaciones de dichas células se observan fuertemente inmunoteñidas en la parte vítrea del explante control (**C**), en contraste con la casi inexistente inmunotinción de dichas prolongaciones en la parte equivalente del explante tratado con ALLN (**D**). **E**, **F**: Distribución de tenascina (verde), revelada con el anticuerpo M1B4, en las capas plexiformes interna y externa. No hay diferencias entre el explante control (**E**) y el tratado con ALLN (**F**). **G**, **H**: Distribución de neuronas Islet-1-positivas (verde) reveladas con el anticuerpo 39.4D5. La mayoría de las células ganglionares que aparecen inmunomarcadas en el explante control (**G**) han desaparecido en el explante tratado con ALLN (**H**). Barra de escala: 50 μ m.



DISCUSIÓN

Participación de MMPs en la migración tangencial de la microglía de la retina

En nuestro estudio se ha analizado la influencia de la actividad de MMPs sobre el patrón de migración de las células microgliales en ERECs de E7 tratados experimentalmente con el inhibidor de MMPs GM6001. Dicho patrón se ve alterado con el tratamiento, detectándose una disminución de la polarización y aparente desorientación de dichas células. En otros tipos celulares que migran a través de diferentes tejidos también se ha demostrado que la alteración de la actividad de MMPs tiene un efecto sobre la morfología celular. Así, en cultivos celulares de astrocitos de cerebro de ratón, el análisis morfométrico en el frente de migración ha revelado que el tratamiento con el inhibidor de MMPs provoca un redondeamiento en los astrocitos, que contrasta con el fenotipo más elongado que exhiben las células no tratadas (Ogier et al., 2006). Los macrófagos que migran en embriones de *Xenopus* son células polarizadas provistas de filopodios; sin embargo, en embriones tratados con morfolinós para modificar la expresión de los genes de tres metaloproteasas (MMP-7, MMP-9 y MMP-18), los macrófagos aparecen redondeados y sin filopodios (Tomlinson et al., 2008). Por otro lado, la morfología de fibroblastos cultivados sobre geles 3D también se ve afectada tras el tratamiento con GM6001, observándose un mayor redondeamiento de los mismos y, en consecuencia, una disminución de su polaridad (Martin-Martin et al., 2011). En conjunto, todos estos resultados sugieren que las MMPs parecen inducir fenotipos más elongados y polarizados de las células migratorias.

Numerosos estudios han demostrado que la migración de células tumorales o la invasión de un tumor por células endoteliales podría estar mediada por una estrecha cooperación entre moléculas de adhesión celular, elementos del citoesqueleto y proteasas que degradan la matriz (Kessenbrock et al., 2010; Stetler-Stevenson & Yu, 2001; Vu & Werb, 2000; Wolf & Friedl, 2006; Yong, 2005). La disminución en la elongación y los cambios en la orientación de las células microgliales migratorias observados en ERECs tratados con GM6001 podrían explicarse suponiendo que las MMPs intervienen en la migración, alterando la matriz extracelular para facilitar el avance de las células microgliales en la retina. Así, las células microgliales migrarían en los ERECs mediante un mecanismo similar al modelo de migración celular revisado por Lauffenburger & Horwitz (1996). En este modelo, las células migratorias extienden

lamelipodos en su parte delantera adoptando una morfología elongada, interaccionan con la matriz extracelular formando contactos focales, degradan la matriz extracelular en las zonas de contacto con el sustrato sobre el que migran mediante la intervención de diferentes MMPs y finalmente translocan el cuerpo celular hacia delante retrayendo la parte trasera de la célula (Friedl & Wolf, 2003). Las observaciones de Marín-Teva et al. (1998) en la retina embrionaria de codorniz *in situ* están de acuerdo con este mecanismo. La inhibición de las MMPs tras el tratamiento con GM6001 impediría que las células microgliales pudieran degradar la matriz, de manera que deberían adoptar otro mecanismo que no implicara la participación de MMPs para poder migrar en la retina. En apoyo de esta hipótesis, se ha propuesto un mecanismo de migración no proteolítica en neutrófilos, linfocitos T y macrófagos (Friedl et al., 1998a; Friedl & Wolf, 2009; Guet et al., 2012; Mandeville et al., 1997; Verollet et al., 2011). Las células adaptan su morfología a los huecos existentes en la matriz para poder migrar a través de ellos y, si las barreras de la matriz son demasiado densas, las células son capaces de migrar en otra dirección, evitando el obstáculo que impide su paso. Este mecanismo podría explicar que las células microgliales en ERECs tratados con GM6001 sean menos elongadas y presenten una aparente desorientación tras el tratamiento.

En resumen, una disminución en la elongación y un aumento en la desorientación en las células microgliales tras el tratamiento con el inhibidor GM6001 demuestra que una vía-dependiente de MMPs participa en la migración microglial en ERECs. Dichos cambios en la morfología y orientación de las células microgliales podrían ser debidos a una alteración de su mecanismo de migración que, tras la inhibición de las MMPs, pasaría a ser independiente de la degradación proteolítica de la matriz por MMPs. Dicho mecanismo sería probablemente semejante al descrito en neutrófilos y linfocitos, aunque nuestros resultados no permiten asegurarlo con certeza.

La participación de las MMPs en la migración celular de diferentes tipos celulares está bien documentada. Así los macrófagos se conocen porque producen un número elevado de MMPs que intervienen en la migración celular (Guet et al., 2012; Van Goethem et al., 2010; Verollet et al., 2011). El estudio en macrófagos embrionarios de *Xenopus* (Tomlinson et al., 2008) demostraba que MMP-7, MMP-18 y MMP-9 se expresan durante la migración de macrófagos y que, actuando conjuntamente, son

esenciales para mediar la migración de éstos durante el desarrollo del embrión. La MMP-9 también juega un papel importante en procesos inflamatorios, en los que el plasminógeno regula la capacidad de los macrófagos para migrar a través de la matriz extracelular vía activación de MMP-9 (Gong et al., 2008). En un modelo de encefalitis autoinmune, MMP-2 y MMP-9 actúan como mediadores de la migración de las células inmunes en el cerebro, degradando componentes de la matriz extracelular (Agrawal et al., 2006). Por otra parte, la MMP-12 (metaloelastasa) de los macrófagos es requerida para la proteólisis de la matriz extracelular y la invasión a través del tejido (Anghelina et al., 2002; Shipley et al., 1996). En monocitos, la MT1-MMP se expresa en el frente de avance, concretamente en los lamelipodios, durante su migración sobre células endoteliales activadas humanas (Matias-Roman et al., 2005). En macrófagos derivados de médula ósea, la MT1-MMP promueve la invasión de los mismos mediante su actividad proteásica (Sakamoto & Seiki, 2009).

Otros estudios han demostrado la participación de las MMPs en la migración de las células microgliales. Así, en las células BV-2 (una línea de células microgliales murinas inmortalizadas), el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) parece jugar un papel importante en la migración celular, incrementando la actividad de MMP-9 mediante la activación de pro-MMP-9, en parte por su acción directa sobre la MMP-9 y en parte también por la activación de la cascada plasminógeno/plasmina (Shin et al., 2010). En apoyo de esta hipótesis, la inhibición de la actividad de MMPs con inhibidores farmacológicos contra el uPA o MMPs impedía la migración celular (Shin et al., 2010). Además, en las células microgliales de la sustancia nigra de la pars compacta, igual que en las células microgliales BV-2, la α -synucleína inducía la expresión de CD44 y MT1-MMP y promovía la migración celular (Kim et al., 2009). Por otra parte, el ATP también induce una rápida respuesta migratoria de las células microgliales, a la vez que estimula un incremento en la actividad de MMP-9. La inhibición de la actividad de MMP-9 con inhibidores específicos prevenían la migración microglial inducida por ATP (Choi et al., 2010). En consonancia con estos estudios, nuestros resultados en ERECs tratados con GM6001 también apoyan la implicación de las MMPs en el mecanismo de migración de las células microgliales durante el desarrollo de la retina.

Nuestros resultados demuestran que las MMPs están implicadas en la migración de las células microgliales; sin embargo, no permiten identificar con claridad las MMPs específicas comprometidas en dicho mecanismo. Los estudios zimográficos para MMP-2 y MMP-9 no mostraban bandas positivas para estas MMPs. La ausencia de bandas en los zimogramas podría tener dos causas: a) las células microgliales migratorias de la retina no expresarían ni liberarían al medio MMP-2 ni MMP-9; b) podrían expresar y liberar estas MMPs, pero lo harían en un nivel tan bajo que sería inapreciable en los zimogramas. En macrófagos alveolares de rata, se ha demostrado la presencia de algunas MMPs mediante la técnica de Northern blot y, sin embargo, dichas bandas no se observan en zimogramas, sugiriendo que estas MMPs se encuentran en niveles muy bajos (Gibbs et al., 1999). No obstante, nuevos estudios serán necesarios para identificar las MMPs específicas que intervienen en la migración de las células microgliales durante el desarrollo de la retina.

Papel de tirosina-quinasa de la familia Src en la migración microglial

Las tirosina-quinasa de la familia Src están implicadas en diferentes procesos de las células microgliales, tales como activación (Dhawan et al., 2012; Kouadir et al., 2012; Wei et al., 2012) o fagocitosis (Song et al., 2012). Estudios *in vitro*, utilizando ensayos de quimiotaxis en cámaras de Boyden, también han demostrado la participación de estas tirosina-quinasa en el mecanismo migratorio de células microgliales aisladas a partir de cerebros postnatales de ratón. Así, Lee et al. (2011) demostraban que la migración quimiotáctica estimulada por ADP se ve impedida cuando se inhibe la actividad de la enzima fosfolipasa A2 independiente de Ca²⁺ (iPLA2) o se elimina genéticamente dicha enzima. En células microgliales deficientes en iPLA2 se produce una retención de Src en el compartimento endosomal, impidiendo su reciclaje hacia la membrana plasmática, en donde esta tirosina-quinasa debería activar la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) para estimular la migración de la célula. PI3K se localiza selectivamente en la membrana del borde delantero de las células que migran, en donde participa en el mecanismo de polimerización de actina. En otro estudio, Bianchi et al. (2011) demostraban que la proteína ligadora de calcio S100B, segregada por astrocitos, puede actuar como un factor que estimula la migración de células microgliales que sobreexpresan el receptor RAGE y que este efecto requiere una activación de Src y de

ROCK. En resumen, estos estudios demuestran que las tirosina-quinazas de la familia Src participan en la fosforilación de diferentes proteínas que intervienen en las vías de señalización intracelular que regulan la polimerización de actina, necesaria para la migración de las células microgliales, independientemente de los factores y receptores estimulantes de dicha migración.

Las células microgliales que migran en la retina embrionaria de codorniz muestran contactos adhesivos con el sustrato de pies terminales de células de Müller sobre el que se desplazan (Marín-Teva et al., 1998). Estos contactos deben ser transitorios para que pueda tener lugar el movimiento de avance de la célula. Por lo tanto, debe existir un mecanismo que regule el ensamblaje y desensamblaje de los contactos adhesivos, similar al turnover de las adhesiones focales de los fibroblastos cultivados *in vitro*. Nuestros resultados en el presente estudio demuestran que la inhibición de la tirosina-quinasa Src, tras el tratamiento de ERECs con PP2, altera considerablemente el fenotipo de las células microgliales ameboides en proceso de migración, que son significativamente más largas y estrechas que las células microgliales migratorias en ERECs control. Estos resultados sugieren que Src debe tener algún papel en el mecanismo de migración de dichas células, aunque no permiten discernir el papel que Src puede jugar en la migración de las células microgliales ameboides.

Recientemente, se ha descrito que las células microgliales aisladas de cerebro de ratas postnatales de 1-2 días migran *in vitro* mediante la emisión de un amplio lamelipodio en su borde delantero, el cual muestra numerosos puntos adhesivos conocidos con el nombre de podosomas (Vincent et al., 2012). Los podosomas son ligeras protrusiones de la membrana plasmática adyacente al sustrato, que contienen actina F y proteínas tirosina-fosforiladas y constituyen sitios de adhesión a la matriz extracelular y degradación de la misma. Los podosomas de las células microgliales son similares a los descritos inicialmente en fibroblastos transformados por Src (Tarone et al., 1985) y a los existentes en otros tipos celulares que migran, tales como macrófagos (Van Goethem et al., 2010, 2011) y células musculares lisas vasculares, células endoteliales, células dendríticas, osteoclastos y células cancerosas invasivas (Murphy & Courtneidge, 2011). La presencia de podosomas ha sido descrita fundamentalmente en células cultivadas *in vitro*, pero recientes estudios han demostrado que también son

estructuras fisiológicamente importantes en células que migran en tejidos de animales *in situ*, tales como células musculares lisas vasculares (Quintavalle et al., 2010), células de las crestas neurales (Murphy et al., 2011) y células cancerosas (Blouw et al., 2008; Weaver, 2008). En células microgliales ameboides de la retina embrionaria de codorniz *in situ*, se han descrito ligeras protrusiones de la membrana plasmática asociadas a filamentos de actina, las cuales separan parcialmente pies terminales de células de Müller y se adhieren a la lámina basal de la retina (Marín-Teva et al., 1998). La descripción de estas estructuras coincide con el concepto de podosomas, por lo que éstos también parecen tener un papel fisiológico en la migración de las células microgliales de la retina.

Los podosomas y los contactos focales son estructuras relacionadas que comparten algunos componentes, aunque los últimos son sitios adhesivos que participan en una unión estable de la célula al sustrato, cuya disolución es necesaria para la motilidad celular. Los podosomas parecen coordinar la degradación de matriz extracelular con la motilidad celular, facilitando la migración celular a través de diferentes sustratos. Las tirosina-quinasa de la familia Src juegan un papel primordial en la eliminación de contactos focales y formación de podosomas, para que las células pasen de un estado quiescente a un estado migratorio (Murphy & Courtneidge, 2011). Se ha propuesto que la formación de podosomas se inicia en respuesta a la generación focal de fosfatidil-inositol-3,4-difosfato (PI3,4-P2), el cual recluta la proteína adaptadora Tks5 (sustrato de tirosina-quinasa con 5 dominios de homología con Src) que, a su vez, regula la incorporación de cortactina (proteína nucleadora de actina), que finalmente promueve la polimerización y reorganización del citoesqueleto de actina. La fosforilación de proteínas del podosoma, en la que participa Src, es decisiva para esta cascada de reacciones que permiten la formación de podosomas. Pero las tirosina-quinasa Src también parecen intervenir en el mecanismo de desmontaje de los podosomas, ya que los que se forman en osteoclastos Src^{-/-} tienen un periodo de vida cuatro veces superior al de los podosomas de osteoclastos normales (Destaing et al., 2008). Además, el desmontaje de las adhesiones en la parte trasera de la célula se ve seriamente perturbado en células nulas para Src (Webb et al., 2004). Src parece inducir la fosforilación de la quinasa de adhesiones focales (FAK) y la consiguiente pérdida de FAK en los sitios adhesivos, contribuyendo al desmontaje de los mismos y al

desprendimiento celular del sustrato (Fincham et al., 1995; Fincham & Frame, 1998; Frame, 2002). En resumen, las tirosina-quinasa Src intervienen decisivamente en el proceso de renovación de sitios adhesivos necesario para la migración celular, contribuyendo tanto a la formación como al desmontaje de los mismos. Esta participación está avalada por numerosos estudios que demuestran que células deficientes en Src muestran una capacidad migratoria restringida (ver revisiones de Frame, 2002, 2004; Playford & Schaller, 2004).

Todo lo anterior explica que la inhibición de Src pueda interferir con la migración de las células microgliales ameboides. Teniendo en cuenta la participación de Src en el desmontaje de las adhesiones en la parte posterior de la célula, la inhibición de Src mediante tratamiento de ERECs con PP2 podría dificultar el desprendimiento de la parte trasera de las células microgliales ameboides, que continuarían adheridas al sustrato cuando su parte delantera avanza hacia delante. De esta forma, las células microgliales tenderían a elongarse, tal como demuestran los resultados de nuestro estudio. No obstante, esta interpretación no considera que Src también participa en la formación de sitios adhesivos, por lo que nuevos estudios de videomicroscopía a lapsos de tiempo de las células microgliales migratorias serían necesarios para obtener información adicional a favor o en contra de la misma.

Implicación de la proteína-quinasa ROCK en la migración tangencial de la microglía de la retina

Los resultados del presente estudio demuestran que la inhibición de la proteína-quinasa ROCK con Y-27632 incrementa la longitud del eje mayor y la elongación de las células microgliales que migran tangencialmente en ERECs. La inhibición de ROCK también incrementa la elongación celular en otros tipos de células migratorias, tales como los precursores neurales que migran en el cerebro de ratón desde la zona subventricular hacia el bulbo olfatorio a través de la corriente migratoria rostral. Así, el inhibidor Y-27632 causa un incremento en la elongación de los cuerpos celulares de estos precursores neurales y favorece la protrusión de prolongaciones en los mismos, potenciando la migración individualizada en detrimento de la migración colectiva en cadena (Leong et al., 2011). Por otra parte, el tratamiento con Y-27632 también incrementa la elongación de los macrófagos que migran hacia una herida en embriones

de pez cebra y dificulta su migración, ya que se mueven mucho más lentamente que en embriones controles (Redd et al., 2006). Por lo tanto, los fenotipos más elongados de macrófagos embrionarios parecen estar asociados con una mayor dificultad de migración sobre el sustrato.

El incremento en la longitud del eje mayor de las células microgliales de ERECs mostrado en nuestro estudio podría explicarse suponiendo que la inhibición de ROCK dificulta el desprendimiento de la parte trasera de las células microgliales sin afectar al movimiento hacia delante de la parte delantera, de manera que las células tenderían a incrementar su longitud. Es decir, la inhibición de ROCK podría entorpecer la desorganización de las uniones adhesivas entre la parte trasera de la célula y el sustrato de pies terminales de células de Müller. En apoyo de esta hipótesis, se ha comprobado que la actividad de ROCK es necesaria para la retracción de la cola de monocitos y linfocitos T durante su migración transendotelial (Heasman et al., 2010; Worthylake et al., 2001; Worthylake & Burridge, 2003) y de células tumorales que migran *in vitro* (Vega et al., 2011). En estos tipos celulares, ROCK regula negativamente la adhesión de integrinas sobre el sustrato endotelial y por lo tanto favorece el desprendimiento de las uniones adhesivas, de forma que la inhibición de ROCK impide la retracción de la cola y promueve la acumulación de integrina $\beta 2$ en la cola no retraída (Worthylake et al., 2001; Worthylake & Burridge, 2003). En neutrófilos, la inhibición de ROCK también dificulta su migración sobre un sustrato bidimensional debido a que la parte trasera de la célula permanece firmemente anclada al sustrato, mientras que el cuerpo celular muestra una alta motilidad (Alblas et al., 2001).

Por otra parte, ROCK favorece las interacciones contráctiles entre actina y miosina en la parte trasera de células que migran aisladamente, mediante dos mecanismos: a) fosforilación de la quinasa LIMK, que a su vez fosforila e inactiva la cofilina que proporciona la estabilización de los filamentos de actina (Maekawa et al., 1999; Sumi et al., 2001); y b) fosforilación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina, inactivándola y favoreciendo la presencia de elevados niveles de miosina fosforilada (Kawano et al., 1999; Riento & Ridley, 2003; Totsukawa et al., 2000) que es capaz de interactuar con los filamentos de actina para generar la fuerza contráctil que contribuye al desprendimiento de las uniones adhesivas con el sustrato (ver revisiones de Petrie et al., 2009 y Raftopoulou & Hall, 2004). Por lo tanto, la inhibición de ROCK

también podría dificultar las interacciones actina-miosina en las células microgliales que migran en ERECs, obstaculizando el desprendimiento y retracción de la parte trasera de las mismas.

Otros estudios han demostrado la participación de ROCK en la migración de distintos tipos celulares mediante su acción sobre la red de microtúbulos de la parte trasera de la célula (Fonseca et al., 2010; Redd et al., 2006; Takesono et al., 2010). Así, los linfocitos que migran en cultivo son incapaces de formar un urópodo estable y mantener una migración polarizada cuando se interfiere la polimerización de los microtúbulos mediante tratamiento con nocodazol. Sin embargo, la inhibición de ROCK en linfocitos tratados con nocodazol restaura la formación del urópodo y restablece la polarización de los mismos (Takesono et al., 2010), demostrando que ROCK participa activamente en la despolimerización de los microtúbulos y que su inhibición incrementa la estabilidad de los mismos. El estudio de Fonseca et al. (2010) en progenitores hematopoyéticos que migran sobre una monocapa de células mesenquimales también demostraba que la actividad de ROCK es esencial para desestabilizar la estructura de los microtúbulos en la parte trasera de la célula y promover su locomoción. Por lo tanto, el incremento de la elongación de las células microgliales observado en ERECs tras la inhibición de ROCK podría estar mediado por una estimulación de la polarización de dichas células desencadenada por una mayor estabilidad de los microtúbulos.

En resumen, la mayor elongación de las células microgliales migratorias tras la inhibición de ROCK demuestra que una vía-dependiente de ROCK participa en el proceso de migración microglial que tiene lugar en ERECs. Dicho incremento en la longitud de las células microgliales podría estar mediado por la interferencia que la inhibición de ROCK puede ocasionar con alguno de los mecanismos dependientes de ROCK que intervienen en el desprendimiento de la parte trasera de la célula, como son: a) la desorganización de las uniones adhesivas entre dicha parte trasera y los pies terminales de células de Müller; b) las interacciones contráctiles entre actina y miosina; y c) la desorganización de los microtúbulos de la parte trasera de la célula. Nuestros resultados no permiten identificar cuál de estos mecanismos se ve afectado por la inhibición de ROCK.

Existen evidencias en la literatura sobre la participación de ROCK en la migración de células microgliales. Así, estudios *in vitro* con cámaras de Boyden han

demostrado que una vía de señalización dependiente de ROCK participa en el mecanismo de migración quimiotáctica de microglía inducida por diferentes factores, tales como la proteína ligadora de calcio S100B (Bianchi et al., 2011) o el ATP (Miller & Stella, 2009). Además, la motilidad microglial inducida *in vitro* por el nucleótido UDP está mediada por una vía de señalización dependiente de la GTPasa Rho (activadora de ROCK) que desencadena la agregación de filamentos de actina en la superficie microglial (Kataoka et al., 2011). Por otra parte, un agonista selectivo del receptor A3 de adenosina prevenía la migración de microglía que ocurre tras daño cerebral isquémico o tras la inyección de lipopolisacárido en el cuerpo calloso de ratas y esta inhibición de la migración microglial estaba en estrecha relación con la disminución en la expresión de Rho (Choi et al., 2011). En consonancia con estos estudios, nuestros resultados en ERECs tratados con Y-27632 apoyan la participación de ROCK en el mecanismo de migración de las células microgliales ameboides durante el desarrollo de la retina.

Nuestro estudio demuestra que, además del incremento de la longitud de las células microgliales, la inhibición de ROCK también produce un aumento significativo de la densidad de células microgliales en los ERECs. Esta mayor densidad celular tras la inhibición de ROCK podría tener dos causas: a) mayor tasa de proliferación de las células microgliales dentro de la retina; b) incremento de la incorporación y migración de precursores microgliales desde la CNO/BP. En la primera posibilidad, ROCK debería actuar dificultando la división de las células microgliales de forma que su inhibición pudiera favorecer dicha división. Sin embargo, se ha demostrado que ROCK interviene en una vía que estimula la proliferación de diferentes tipos celulares (He et al., 2005; Liu et al., 2007; Meyer et al., 2005; Oviedo et al., 2011; Pirone et al., 2006; Wang et al., 2004; Zohrabian et al., 2009), incluyendo macrófagos (Gangoiti et al., 2011). Por lo tanto, no parece probable que la inhibición de ROCK en ERECs estimule la proliferación de las células microgliales. La otra posibilidad es que la inhibición de ROCK potencie la incorporación de estas células desde la CNO/BP hacia la retina, aunque una vez dentro de ésta su migración pudiera estar dificultada, como se ha discutido previamente. Este cambio de comportamiento migratorio podría ser debido al diferente microambiente existente en la CNO/BP y en la retina. En la CNO/BP existe un entramado tridimensional de fibras ópticas y astrocitos (Gerhardt et al., 2000; Schuck et

al., 2000) mientras que en la parte vítrea de la retina existe una alfombra bidimensional de pies terminales de células de Müller sobre la que tiene lugar la migración microglial (Marín-Teva et al., 1998, 1999). En apoyo de la anterior hipótesis, se ha descrito que los inhibidores de ROCK pueden inhibir o potenciar la migración celular dependiendo de las condiciones microambientales en la que tiene lugar (Nakayama et al., 2005; Riento & Ridley, 2003). Además, la posible existencia de determinados factores en la CNO/BP que no estuvieran presentes en el interior de la retina también podría afectar diferencialmente al modo de migración de la microglía en uno u otro ambiente. En este sentido, Miller & Stella (2011) demostraban *in vitro* que la migración de microglía inducida por ATP era mediada por una vía de señalización dependiente de ROCK, pero esta vía no participaba en la migración microglial inducida por complemento 5a. Por lo tanto, ROCK podría participar o no en la migración de microglía dependiendo de los factores que favorecen dicha migración. Además, es bien conocido que los leucocitos y los macrófagos pueden migrar mediante diferentes mecanismos, adaptando el modo de migración a la geometría y composición molecular del microambiente en el que migran (Renkawitz & Sixt, 2010; Van Goethem et al., 2010). No obstante, nuestros resultados no permiten conocer con exactitud el porqué del incremento de la densidad de células microgliales en los ERECs tratados con inhibidores de ROCK.

Tipo de mecanismo migratorio de las células microgliales ameboides en la retina

Originariamente, el modo de migración celular se clasificaba según el patrón morfológico de las células migratorias. Posteriormente, se incluyeron otros parámetros, como la organización de su citoesqueleto, el tipo de interacción molecular existente entre las células y la matriz extracelular circundante, los requerimientos moleculares de las células y la modificación de la estructura del tejido donde migran las células, habiéndose descrito dos tipos de migración celular individualizada: mesenquimal y ameboide (Biname et al., 2010; Friedl, 2004; Friedl et al., 1998b; Sanz-Moreno & Marshall, 2009; Thiery, 2002; Wolf & Friedl, 2006). En el presente estudio, hemos identificado el tipo de migración de las células microgliales en ERECs de E7 atendiendo a sus requerimientos moleculares y a la morfología que adoptan las células durante la migración. Tal como se ha discutido con anterioridad, nuestros resultados sugieren que las células microgliales migratorias con fenotipos elongados y polarizados están

asociadas a un mecanismo de migración dependiente de MMPs. Este tipo de movimiento de las células microgliales muestra similitudes con la migración mesenquimal previamente descrita en fibroblastos, células endoteliales y células tumorales (Friedl & Wolf, 2010; Rhee & Grinnell, 2007; Sabeh et al., 2009; Wolf & Friedl, 2006): en ambos es obvia la presencia de células elongadas y el requerimiento de MMPs. Tras el tratamiento de ERECs de E7 con el inhibidor de MMPs GM6001, las células microgliales siguen siendo capaces de migrar aunque se observa cierta desorientación de las mismas durante su movimiento y cambios en su morfología, con fenotipos más redondeados y prolongaciones más cortas y menos polarizadas. Este efecto también ha sido descrito en células cancerosas, en las que el tratamiento con inhibidores de MMPs induce un fenotipo más o menos redondeado (Carragher et al., 2006; Torka et al., 2006), característico del movimiento ameboide descrito en células tumorales, leucocitos y linfocitos (Friedl & Weigelin, 2008; Friedl & Wolf, 2003; Wolf et al., 2003b). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los cambios fenotípicos de las células microgliales que migran en ERECs de E7, que pasan de morfología elongada a redondeada tras la inhibición de MMPs, estaría reflejando un cambio en el mecanismo de migración utilizado para colonizar la retina embrionaria dependiendo de las condiciones microambientales de la misma. Así, las células microgliales utilizarían un mecanismo de migración mesenquimal en condiciones favorables para la actuación de MMPs, mientras que emplearían un mecanismo de migración ameboide cuando se inactivan las MMPs.

Además de la implicación de MMPs en la migración mesenquimal, este tipo de migración también es dependiente de la tirosina-quinasa Src y de calpaínas que regulan la proteólisis de contactos focales, necesaria para la renovación de las adhesiones célula-sustrato durante el movimiento de las células (Carragher & Frame, 2002, 2004; Carragher et al., 2006; Takino et al., 2006; Webb et al., 2004). Nuestros resultados muestran que, tras la inhibición de la proteína-quinasa Src, las células microgliales alteran su fenotipo, observándose células más estrechas y alargadas y con somas pequeños. Por lo tanto, esta tirosina-quinasa parece estar implicada en el mecanismo de migración de las células microgliales en ERECs. Por otro lado, tras la inhibición de calpaínas con el inhibidor ALLN, se observa un severo cambio en la morfología de las células microgliales, detectándose células muy redondeadas. Este efecto podría estar

relacionado tanto con una actuación directa del inhibidor de calpaínas sobre las células microgliales como con una acción indirecta mediada por la importante alteración citoarquitectónica de la parte vítrea, probablemente desencadenada por la destrucción de adhesiones entre los pies terminales de células de Müller. De cualquier modo, nuestros resultados sugieren una decisiva participación de las calpaínas en el mecanismo de migración de las células microgliales. La implicación de Src y de calpaínas en la migración de las células microgliales, así como la dependencia de MMPs, apoyan que esta migración es de tipo mesenquimal en condiciones normales.

Estudios en células tumorales han demostrado que tanto el modo de movimiento mesenquimal como el ameboide también están regulados por la familia de las GTPasas Rho. El movimiento mesenquimal, además de ser dependiente de MMPs, también es dependiente de la activación de Rac, que estimula un complejo de proteínas que interacciona con factores de nucleación de actina para promover la polimerización y elongación de los filamentos de actina en la parte delantera de la célula. En contraste, el movimiento ameboide es dirigido por las interacciones contráctiles entre actina y miosina mediadas por RhoA y sus efectores ROCKI y ROCKII (Crespo et al., 2011; Croft & Olson, 2008; Lammermann & Sixt, 2009; O'Neill, 2009; Pankova et al., 2009; Sanz-Moreno et al., 2008; Webb & Horwitz, 2003). Nuestros resultados en ERECs de E7 demuestran que la inhibición de la proteína-quinasa ROCK incrementa significativamente la elongación de las células microgliales que migran tangencialmente, sugiriendo que una vía dependiente de ROCK tiene algún tipo de participación en el proceso de migración microglial. Tal como se ha discutido previamente, la inhibición de ROCK tendería a ralentizar el avance de las células microgliales que estaban migrando mediante un mecanismo mesenquimal, mientras que la actuación de ROCK activaría dicho mecanismo. Por lo tanto, las células microgliales migran en ERECs mediante un mecanismo aparentemente dependiente de ROCK, lo cual es característico del tipo de migración ameboide (Carragher et al., 2006).

Los cambios de morfología y orientación de las células microgliales en ERECs de E7, mostrados en nuestro estudio tras el tratamiento de ERECs con diferentes inhibidores, indican que las células microgliales ameboides son capaces de adaptarse a cambios de las condiciones microambientales, modificando su mecanismo de migración para seguir colonizando la retina embrionaria de codorniz. Este cambio en el modo de

migración también sucede en células tumorales y en leucocitos, permitiéndoles superar los posibles obstáculos que podrían impedirles su avance utilizando un determinado mecanismo migratorio (Biname et al., 2010). Así, diferentes estudios han demostrado que cuando se tratan células cancerosas con inhibidores de MMPs, aumenta el número de células con fenotipo redondeado que adoptan un mecanismo de migración ameboide, mientras que cuando se inhibe ROCK, se reduce el fenotipo ameboide y se potencia el modo de migración mesenquimal. Sin embargo, cuando se utilizan simultáneamente inhibidores de MMPs y ROCK, la proporción de fenotipos migratorios no cambia aunque se ve afectada la capacidad invasiva de las células debido a la represión de los fenotipos de migración alternativos (Pinner & Sahai, 2008; Sahai & Marshall, 2003; Torka et al., 2006; Wilkinson et al., 2005; Wolf et al., 2003a; Wyckoff et al., 2006). Otros estudios han mostrado que, igual que las células cancerosas, los macrófagos también pueden usar alternativamente el modo de migración ameboide, dependiente de Rho/ROCK e independiente de proteasas, y el mesenquimal, dependiente de proteasas e independiente de Rho/ROCK, según las condiciones ambientales y las moléculas que se expresan (Guet et al., 2011; Le Cabec et al., 2011; Verollet et al., 2011). Por otro lado, los macrófagos humanos derivados de monocitos sanguíneos pueden llevar a cabo una migración mesenquimal o ameboide sobre un sustrato tridimensional, dependiendo de la actividad de proteasas y de la composición y arquitectura de la matriz extracelular sobre la que migran. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en células tumorales, la migración mesenquimal de estos macrófagos en Matrigel no se ve afectada por la inhibición de MMPs, lo cual sugiere la implicación de otras proteasas en el mecanismo migratorio (Van Goethem et al., 2010; Van Goethem et al., 2011).

En resumen, nuestro estudio avala que la migración microglial en ERECs no tratados es dependiente de MMPs, Src y calpaínas, como es típico del modo de migración mesenquimal, y es también dependiente de ROCK, que es característico del modo de migración ameboide. Esto sugiere que las células microgliales avanzan en la retina siguiendo un mecanismo de migración mixto, con ciertas características propias del tipo mesenquimal y otras peculiares del tipo ameboide, que también ha sido descrito en algunos tipos celulares (Friedl, 2004; Sahai & Marshall, 2003). Otra posible explicación a nuestros resultados es que las células microgliales que migran tangencialmente en los ERECs podrían alternar los dos tipos de migración,

mesenquimal y ameboide, utilizando en cada momento el modo más favorable para conseguir avanzar en cada región de un sustrato heterogéneo. Según esta hipótesis, durante el proceso de colonización microglial de la retina, siempre habría una parte de células en fase migratoria mesenquimal y otra parte en fase ameboide, de manera que la inhibición de factores que intervienen en uno u otro tipo de migración siempre afectaría al conjunto de células microgliales migratorias. No obstante, la evaluación de esta hipótesis requiere nuevos estudios que incluyan observaciones a intervalos de tiempo de células vivas en ERECs tratados con inhibidores de MMPs, Src o ROCK. Estos estudios permitirían conocer más detalles sobre el mecanismo de migración utilizado por las células microgliales durante el desarrollo de la retina.

REFERENCIAS

- Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM. 2006. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203:1007-1019.
- Alblas J, Ulfman L, Hordijk P, Koenderman L. 2001. Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell* 12:2137-2145.
- Anghelina M, Schmeisser A, Krishnan P, Moldovan L, Strasser RH, Moldovan NI. 2002. Migration of monocytes/macrophages *in vitro* and *in vivo* is accompanied by MMP12-dependent tunnel formation and by neovascularization. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67:209-215.
- Ashwell K. 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev Brain Res* 58:1-12.
- Bianchi R, Kastrisianaki E, Giambanco I, Donato R. 2011. S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *J Biol Chem* 286:7214-7226.
- Biname F, Pawlak G, Roux P, Hibner U. 2010. What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Mol Biosyst* 6:648-661.
- Blouw B, Seals DF, Pass I, Diaz B, Courtneidge SA. 2008. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth *in vivo*. *Eur J Cell Biol* 87:555-567.
- Cai DH, Brauer PR. 2002. Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases early cardiac neural crest migration in chicken embryos. *Dev Dyn* 224:441-449.
- Carbonell WS, Murase S, Horwitz AF, Mandell JW. 2005. Migration of perilesional microglia after focal brain injury and modulation by CC chemokine receptor 5: an *in situ* time-lapse confocal imaging study. *J Neurosci* 25:7040-7047.
- Carragher NO, Frame MC. 2002. Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1539-1543.
- Carragher NO, Frame MC. 2004. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 14:241-249.

- Carragher NO, Walker SM, Scott Carragher LA, Harris F, Sawyer TK, Brunton VG, Ozanne BW, Frame MC. 2006. Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* 25:5726-5740.
- Choi MS, Cho KS, Shin SM, Ko HM, Kwon KJ, Shin CY, Ko KH. 2010. ATP induced microglial cell migration through non-transcriptional activation of matrix metalloproteinase-9. *Arch Pharm Res* 33:257-265.
- Choi IY, Lee JC, Ju C, Hwang S, Cho GS, Lee HW, Choi WJ, Jeong LS, Kim WK. 2011. A3 adenosine receptor agonist reduces brain ischemic injury and inhibits inflammatory cell migration in rats. *Am J Pathol* 179:2042-2052.
- Crespo P, Calvo F, Sanz-Moreno V. 2011. Ras and Rho GTPases on the move: The RasGRF connection. *Bioarchitecture* 1:200-204.
- Cox EA, Sastry SK, Huttenlocher A. 2001. Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell* 12:265-277.
- Croft DR, Sahai E, Mavria G, Li S, Tsai J, Lee WM, Marshall CJ, Olson MF. 2004. Conditional ROCK activation *in vivo* induces tumor cell dissemination and angiogenesis. *Cancer Res* 64:8994-9001.
- Croft DR, Olson MF. 2008. Regulating the conversion between rounded and elongated modes of cancer cell movement. *Cancer Cell* 14:349-351.
- Cuadros MA, Moujahid A, Martin-Partido G, Navascués J. 1992. Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* 148:11-14.
- Cuadros MA, Moujahid A, Quesada A, Navascués J. 1994. Development of microglia in the quail optic tectum. *J Comp Neurol* 348:207-224.
- Cuadros MA, Rodriguez-Ruiz J, Calvente R, Almendros A, Marin-Teva JL, Navascués J. 1997. Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol* 389:390-401.
- Cuadros MA, Navascués J. 1998. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173-189.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci* 8:752-758.

- Davoust N, Vuailat C, Androdias G, Nataf S. 2008. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* 29:227-234.
- Destaing O, Sanjay A, Itzstein C, Horne WC, Toomre D, De Camilli P, Baron R. 2008. The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. *Mol Biol Cell* 19:394-404.
- Devreotes PN, Zigmond SH. 1988. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annu Rev Cell Biol* 4:649-86.
- Dhawan G, Combs CK. 2012. Inhibition of Src kinase activity attenuates amyloid associated microgliosis in a murine model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 9:117.
- Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce JS, Huttenlocher A. 2001. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 276:48382-48388.
- Fincham VJ, Wyke JA, Frame MC. 1995. v-Src-induced degradation of focal adhesion kinase during morphological transformation of chicken embryo fibroblasts. *Oncogene* 10:2247-2252.
- Fincham VJ, Frame MC. 1998. The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *Embo J* 17:81-92.
- Frame MC. 2002. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602:114-130.
- Frame MC. 2004. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 117:989-998.
- Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B, Zanker KS. 1998a. CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol* 28:2331-2343.
- Friedl P, Zanker KS, Brouckeban EB. 1998b. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech* 43:369-378.
- Friedl P, Wolf K. 2003. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp* (70):277-285.

- Friedl P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 16:14-23.
- Friedl P, Weigelin B. 2008. Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* 9:960-969.
- Friedl P, Wolf K. 2009. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 28:129-135.
- Friedl P, Wolf K. 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188:11-19.
- Fonseca AV, Freund D, Bornhauser M, Corbeil D. 2010. Polarization and migration of hematopoietic stem and progenitor cells rely on the RhoA/ROCK I pathway and an active reorganization of the microtubule network. *J Biol Chem* 285:31661-31671.
- Gangoiti P, Arana L, Ouro A, Granado MH, Trueba M, Gomez-Munoz A. 2011. Activation of mTOR and RhoA is a major mechanism by which Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation. *Cell Signal* 23:27-34.
- Gerhardt H, Rascher G, Schuck J, Weigold U, Redies C, Wolburg H. 2000. R- and B-cadherin expression defines subpopulations of glial cells involved in axonal guidance in the optic nerve head of the chicken. *Glia* 31:131-143.
- Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. 1999. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1145-1154.
- Gong Y, Hart E, Shchurin A, Hoover-Plow J. 2008. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest* 118:3012-3024.
- Goss KJ, Brown PD, Matrisian LM. 1998. Differing effects of endogenous and synthetic inhibitors of metalloproteinases on intestinal tumorigenesis. *Int J Cancer* 78:629-635.
- Grossmann R, Stence N, Carr J, Fuller L, Waite M, Dailey ME. 2002. Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia* 37:229-240.
- Guiet R, Van Goethem E, Cougoule C, Balor S, Valette A, Al Saati T, Lowell CA, Le Cabec V, Maridonneau-Parini I. 2012. The process of macrophage migration

- promotes matrix metalloproteinase-independent invasion by tumor cells. *J Immunol* 187:3806-3814.
- He H, Pannequin J, Tantiogco JP, Shulkes A, Baldwin GS. 2005. Glycine-extended gastrin stimulates cell proliferation and migration through a Rho- and ROCK-dependent pathway, not a Rac/Cdc42-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G478-488.
- Heasman SJ, Carlin LM, Cox S, Ng T, Ridley AJ. 2010. Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. *J Cell Biol* 190:553-563.
- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
- Kataoka A, Koga Y, Uesugi A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K. 2011. Involvement of vasodilator-stimulated phosphoprotein in UDP-induced microglial actin aggregation via PKC- and Rho-dependent pathways. *Purinergic Signal* 7:403-411.
- Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase *in vivo*. *J Cell Biol* 147:1023-1038.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141:52-67.
- Kettenmann H. 2007. Neuroscience: the brain's garbage men. *Nature* 446(7139):987-9.
- Kim S, Cho SH, Kim KY, Shin KY, Kim HS, Park CH, Chang KA, Lee SH, Cho D, Suh YH. 2009. Alpha-synuclein induces migration of BV-2 microglial cells by up-regulation of CD44 and MT1-MMP. *J Neurochem* 109:1483-1496.
- Kouadir M, Yang L, Tan R, Shi F, Lu Y, Zhang S, Yin X, Zhou X, Zhao D. 2012. CD36 participates in PrP(106-126)-induced activation of microglia. *PLoS One* 7:e30756.
- Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, Iwase H, Kobayashi S, Fujii Y. 2000. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using *in situ* zymography. *Eur J Cancer* 36:2164-2170.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

- Kurpius D, Nolley EP, Dailey ME. 2007. Purines induce directed migration and rapid homing of microglia to injured pyramidal neurons in developing hippocampus. *Glia* 55:873-884.
- Lammermann T, Sixt M. 2009. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 21:636-644.
- Langmann T. 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81:1345-1351.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Le Cabec V, Van Goethem E, Guiet R, Maridonneau-Parini I. 2011. La migration des phagocytes: tour d'horizon. *Med Sci (Paris)* 27:1112-1120.
- Lee SH, Schneider C, Higdon AN, Darley-Usmar VM, Chung CY. 2011. Role of iPLA2 in the regulation of Src trafficking and microglia chemotaxis. *Traffic* 12:878-889.
- Leong SY, Faux CH, Turbic A, Dixon KJ, Turnley AM. 2011. The Rho Kinase pathway regulates mouse adult neural precursor cell migration. *Stem Cells* 29:332-343.
- Liang KJ, Lee JE, Wang YD, Ma W, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT. 2009. Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4444-4451.
- Ling EA, Wong WC. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Ling EA, Ng YK, Wu CH, Kaur C. 2001. Microglia: its development and role as a neuropathology sensor. *Prog Brain Res* 132:61-79.
- Liu WF, Nelson CM, Tan JL, Chen CS. 2007. Cadherins, RhoA, and Rac1 are differentially required for stretch-mediated proliferation in endothelial versus smooth muscle cells. *Circ Res* 101:e44-52.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285:895-898.

- Mandeville JT, Lawson MA, Maxfield FR. 1997. Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol* 61:188-200.
- Marin-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J. 1998. Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* 22:31-52.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J. 1999. Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412:255-275.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547.
- Martin-Martin B, Tovell V, Dahlmann-Noor AH, Khaw PT, Bailly M. 2011. The effect of MMP inhibitor GM6001 on early fibroblast-mediated collagen matrix contraction is correlated to a decrease in cell protrusive activity. *Eur J Cell Biol* 90:26-36.
- Matias-Roman S, Galvez BG, Genis L, Yanez-Mo M, de la Rosa G, Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG. 2005. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium. *Blood* 105:3956-3964.
- Meyer DK, Fischer C, Becker U, Gottsching I, Boutillier S, Baermann C, Schmidt G, Klugbauer N, Leemhuis J. 2005. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide 38 reduces astroglial proliferation by inhibiting the GTPase RhoA. *J Biol Chem* 280:25258-25266.
- Mignatti P, Rifkin DB. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73:161-195.
- Miller AM, Stella N. 2009. Microglial cell migration stimulated by ATP and C5a involve distinct molecular mechanisms: quantification of migration by a novel near-infrared method. *Glia* 57:875-883.
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. 2001. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 101:249-255.

- Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C. 2006. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *J Comp Neurol* 499:565-582.
- Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide AL, Evrard P, Gressens P, Verney C. 2007. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:372-382.
- Murphy DA, Courtneidge SA. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:413-426.
- Murphy DA, Diaz B, Bromann PA, Tsai JH, Kawakami Y, Maurer J, Stewart RA, Izpisua-Belmonte JC, Courtneidge SA. 2011. A Src-Tks5 pathway is required for neural crest cell migration during embryonic development. *PLoS One* 6:e22499.
- Nakayama M, Amano M, Katsumi A, Kaneko T, Kawabata S, Takefuji M, Kaibuchi K. 2005. Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration. *Genes Cells* 10:107-117.
- Navascués J, Moujahid A, Almendros A, Marin-Teva JL, Cuadros MA. 1995. Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol* 354:209-228.
- Navascués J, Almendros A, Cuadros MA. 1996. Development of microglia: evidence from studies in the avian central nervous system. En: *Topical Issues in Microglial Research*. Ling EA, Tan CK, Tan CBC (eds). Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp. 43-65.
- Navascués J, Calvente R, Marin-Teva JL, Cuadros MA. 2000. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc* 72:91-102.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science*, 308: 1314-1318.
- O'Neill GM. 2009. The coordination between actin filaments and adhesion in mesenchymal migration. *Cell Adh Migr* 3:355-357.
- Ogier C, Bernard A, Chollet AM, T LED, Hanessian S, Charton G, Khrestchatsky M, Rivera S. 2006. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) regulates astrocyte

- motility in connection with the actin cytoskeleton and integrins. *Glia* 54:272-284.
- Oviedo PJ, Sobrino A, Laguna-Fernandez A, Novella S, Tarin JJ, Garcia-Perez MA, Sanchis J, Cano A, Hermenegildo C. 2011. Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway. *Mol Cell Endocrinol* 335:96-103.
- Pankova K, Rosel D, Novotny M, Brabek J. 2009. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 67:63-71.
- Paques M, Simonutti M, Augustin S, Goupille O, El Mathari B, Sahel JA. 2010. *In vivo* observation of the locomotion of microglial cells in the retina. *Glia* 58:1663-1668.
- Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lievre F, Buck CA. 1987. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100:339-349.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S. 1985. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326.
- Perry VH, Gordon S. 1991. Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 125:203-244.
- Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. 2009. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:538-549.
- Pinner S, Sahai E. 2008. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol* 10:127-137.
- Pirone DM, Liu WF, Ruiz SA, Gao L, Raghavan S, Lemmon CA, Romer LH, Chen CS. 2006. An inhibitory role for FAK in regulating proliferation: a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling. *J Cell Biol* 174:277-288.
- Playford MP, Schaller MD. 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23:7928-7946.
- Quintavalle M, Elia L, Condorelli G, Courtneidge SA. 2010. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Biol* 189:13-22.

- Raftopoulou M, Hall A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265:23-32.
- Redd MJ, Kelly G, Dunn G, Way M, Martin P. 2006. Imaging macrophage chemotaxis *in vivo*: studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. *Cell Motil Cytoskeleton* 63:415-422.
- Renkawitz J, Sixt M. 2010. Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *EMBO Rep* 11:744-750.
- Rezaie P, Al-Sarraj S. 2007. Vacuolar degeneration affecting brain macrophages/microglia in variant CJD: a report on two cases. *Acta Neuropathol* 114:651-658.
- Rhee S, Grinnell F. 2007. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 59:1299-1305.
- Riento K, Ridley AJ. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:446-456.
- Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. 2009. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol* 185:11-19.
- Sahai E, Marshall CJ. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5:711-719.
- Sakamoto T, Seiki M. 2009. Cytoplasmic tail of MT1-MMP regulates macrophage motility independently from its protease activity. *Genes Cells* 14:617-626.
- Sánchez-López A, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marin-Teva JL, Navascués J. 2004. Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia* 46:261-273.
- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martin-Oliva D, Marin-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA. 2008. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506:224-239.
- Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. 2008. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135:510-523.
- Sanz-Moreno V, Marshall CJ. 2009. Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity. *Cell Cycle* 8:1484-1487.

- Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D. 1999. Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp* 65:233-243.
- Shin SM, Cho KS, Choi MS, Lee SH, Han SH, Kang YS, Kim HJ, Cheong JH, Shin CY, Ko KH. 2010. Urokinase-type plasminogen activator induces BV-2 microglial cell migration through activation of matrix metalloproteinase-9. *Neurochem Res* 35:976-985.
- Shibley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. 1996. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3942-3946.
- Schnitzer J. 1989. Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol* 282:249-263.
- Schuck J, Gerhardt H, Wolburg H. 2000. The peripapillary glia of the optic nerve head in the chicken retina. *Anat Rec* 259:263-275.
- Smith A, Bracke M, Leitinger B, Porter JC, Hogg N. 2003. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* 116:3123-3133.
- Schmitz AA, Govek EE, Bottner B, Van Aelst L. 2000. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261:1-12.
- Song S, Zhou F, Chen WR, Xing D. 2012. Low-level laser therapy regulates microglial function through Src-mediated signaling pathways: implications for neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation* 9:219.
- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33:256-266.
- Stetler-Stevenson WG, Yu AE. 2001. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 11:143-152.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Meth* 37:173-182.
- Streit WJ. 2001. Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology* 22:619-624.
- Sumi T, Matsumoto K, Nakamura T. 2001. Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276:670-676.

- Takesono A, Heasman SJ, Wojciak-Stothard B, Garg R, Ridley AJ. 2010. Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. *PLoS One* 5:e8774.
- Takino T, Watanabe Y, Matsui M, Miyamori H, Kudo T, Seiki M, Sato H. 2006. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration. *Exp Cell Res* 312:1381-1389.
- Tamariz E, Grinnell F. 2002. Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. *Mol Biol Cell* 13:3915-3929.
- Tarone G, Cirillo D, Giancotti FG, Comoglio PM, Marchisio PC. 1985. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res* 159:141-157.
- Thiery JP. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442-454.
- Tomlinson ML, Garcia-Morales C, Abu-Elmagd M, Wheeler GN. 2008. Three matrix metalloproteinases are required *in vivo* for macrophage migration during embryonic development. *Mech Dev* 125:1059-1070.
- Torka R, Thuma F, Herzog V, Kirfel G. 2006. ROCK signaling mediates the adoption of different modes of migration and invasion in human mammary epithelial tumor cells. *Exp Cell Res* 312:3857-3871.
- Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F. 2000. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 150:797-806.
- Van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V. 2010. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol* 184:1049-1061.
- Van Goethem E, Guiet R, Balor S, Charriere GM, Poincloux R, Labrousse A, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V. 2011. Macrophage podosomes go 3D. *Eur J Cell Biol* 90:224-236.
- Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ. 2011. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol* 193:655-665.

- Verollet C, Charriere GM, Labrousse A, Cougoule C, Le Cabec V, Maridonneau-Parini I. 2011. Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *Eur J Immunol* 41:2805-2813.
- Vincent C, Siddiqui TA, Schlichter LC. 2012. Podosomes in migrating microglia: components and matrix degradation. *J Neuroinflammation* 9:190.
- Vu TH, Werb Z. 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14:2123-2133.
- Wang G, Woods A, Sabari S, Pagnotta L, Stanton LA, Beier F. 2004. RhoA/ROCK signaling suppresses hypertrophic chondrocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:13205-13214.
- Weaver AM. 2008. Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett* 265:157-166.
- Webb DJ, Horwitz AF. 2003. New dimensions in cell migration. *Nat Cell Biol* 5:690-692.
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6:154-161.
- Wei XH, Yang T, Wu Q, Xin WJ, Wu JL, Wang YQ, Zang Y, Wang J, Li YY, Liu XG. 2012. Peri-sciatic administration of recombinant rat IL-1 β induces mechanical allodynia by activation of src-family kinases in spinal microglia in rats. *Exp Neurol* 234:389-397.
- Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. 2005. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol* 7:255-261.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bocker EB, Friedl P. 2003a. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160:267-277.
- Wolf K, Muller R, Borgmann S, Bocker EB, Friedl P. 2003b. Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* 102:3262-3269.
- Wolf K, Friedl P. 2006. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol* 154 Suppl 1:11-15.

- Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burridge K. 2001. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 154:147-160.
- Worthylake RA, Burridge K. 2003. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 278:13578-13584.
- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA. 1994. Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J Neurocytol* 23:258-269.
- Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E. 2006. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion *in vivo*. *Curr Biol* 16:1515-1523.
- Yong VW. 2005. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 6:931-944.
- Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. 2009. Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. *Anticancer Res* 29:119-123.
- Zucker S, Vacirca J. 2004. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23:101-117.

Conclusiones

Primera. Las células microgliales ameboides presentes en la superficie vítrea de explantes de retina de embriones de codorniz de 9 días de incubación (E9) cultivados *in vitro* migran tangencialmente en los mismos. Entre 3 y 7 días *in vitro*, las células microgliales también migran radialmente en dirección vítreo-escleral, colonizando las capas plexiformes interna y externa en las que se diferencian y dan lugar a microglía ramificada.

Segunda. La utilización de diferentes medios de cultivo y la edad de los explantes cultivados influye decisivamente en el comportamiento de las células microgliales, siendo las edades no superiores a E9 y el medio basal de Eagle suplementado con suero de caballo, las condiciones de cultivo que reproducen más fielmente los procesos de migración y ramificación de la microglía que tienen lugar en retinas *in situ*.

Tercera. Durante la primera semana de cultivo *in vitro*, la citoarquitectura de la retina de los explantes de E9 es similar a la observada en retinas *in situ* de edades equivalentes, conservándose la estratificación retiniana, la distribución de células de Müller, el patrón de expresión de tenascina y el patrón de expresión del factor de transcripción islet-1 en algunas neuronas.

Cuarta. La comparación morfométrica entre la microglía de explantes de E9 tras diferentes días de cultivo y la de retinas *in situ* de edades equivalentes revela que la migración tangencial de las células microgliales se ve ligeramente afectada al principio de la incubación *in vitro* de los explantes, recuperando la normalidad después de 3 días de cultivo, mientras que la migración radial está ligeramente más retrasada en los explantes que en las retinas *in situ*. Además, las células microgliales alcanzan un mayor grado de ramificación en las retinas *in situ* que en los explantes cultivados.

Quinta. A pesar de estas diferencias, los procesos de migración y diferenciación de las células microgliales en los explantes cultivados *in vitro* en medio basal de Eagle suplementado con suero de caballo son cualitativamente similares a los descritos en retinas *in situ*, por lo que los cultivos organotípicos de dichos explantes constituyen un excelente modelo experimental para analizar los mecanismos moleculares que participan en la migración y ramificación de la microglía.

Sexta. Durante la segunda semana *in vitro*, las células microgliales presentes en las capas plexiformes de los explantes tienden a redondearse, sugiriendo que sufren un proceso de activación. Al mismo tiempo, algunas células microgliales redondeadas invaden la capa de los fotorreceptores y simultáneamente se observa la muerte de algunos de éstos. Por lo tanto, los explantes de retina embrionaria de codorniz cultivados durante más de una semana pueden ser un buen modelo experimental para analizar las posibles relaciones entre microglía y muerte de fotorreceptores descritas en algunas enfermedades degenerativas de la retina.

Séptima. En cultivos organotípicos de explantes de retina de E7 que contienen parte de la región central donde se localiza la cabeza del nervio óptico y base del pecten, los precursores microgliales acumulados en dicha región conservan la capacidad de entrar en la retina, migrando seguidamente en la superficie vítrea de la misma.

Octava. Los caracteres cinéticos del movimiento de las células microgliales durante su migración tangencial en explantes de E7 y E9 son compatibles con un modo de migración exploratorio y estocástico, en el que participan factores intrínsecos de las propias células, mecanismos de inhibición por contacto y la topografía orientada del sustrato sobre el que migran las células.

Novena. La existencia *in vitro* de un proceso de división celular simultáneo a la migración tangencial, similar al descrito en la retina *in situ*, contribuye a la colonización de aquellas zonas de la retina con menor densidad de células microgliales.

Décima. El tratamiento experimental de explantes de retina embrionaria de codorniz de E7 con un inhibidor de amplio espectro de metaloproteasas produce alteraciones en la morfología y orientación de las células microgliales en proceso de migración tangencial, sugiriendo la participación de algún tipo de metaloproteasa en el mecanismo de orientación de la polarización celular durante la migración tangencial de la microglía retiniana.

Undécima. Los estudios zimográficos para las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 demuestran que las células microgliales migratorias de la retina no expresan ni liberan al medio las formas activas o inactivas de estas dos metaloproteasas. No obstante, la forma inactiva de la MMP-2 (pro-MMP-2) sí es liberada al medio por células no identificadas presentes en la región de la cabeza de nervio óptico y base del pecten.

Duodécima. La inhibición de la tirosina-quinasa Src en los explantes de retina embrionaria de E7 induce un significativo incremento en la elongación de las células microgliales que migran tangencialmente en los mismos, demostrando la participación de Src en el mecanismo migratorio de dichas células.

Décimotercera. El tratamiento experimental de los explantes de retina de E7 con un inhibidor específico de la proteína-quinasa ROCK asociada a Rho incrementa significativamente la elongación y densidad de las células microgliales, sugiriendo la participación de ROCK en los mecanismos de diseminación de las mismas dentro de la retina.

Décimocuarta. La inhibición de las proteasas calpaínas en los explantes de retina de E7 induce la pérdida del fenotipo migratorio de la microglía y su total redondeamiento. No obstante, no se puede asegurar la participación de las calpaínas en el mecanismo de migración microglial, ya que las alteraciones morfológicas de las células microgliales podrían ser una consecuencia indirecta de las severas modificaciones estructurales de la parte vítrea de la retina, inducidas por el tratamiento con el inhibidor de calpaínas.

Décimoquinta. El fenotipo alargado provisto de lamelipodios de las células microgliales que migran en los explantes de retina y la participación de metaloproteasas y Src en su mecanismo de migración tangencial, asimilan a éste al modo de migración mesenquimal descrito en otros tipos celulares. Sin embargo, la migración microglial también es dependiente de ROCK, como sucede en el modo de migración ameboide.