

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**Departamento de Biología Celular**



**Muerte celular fisiológica y comportamiento de la  
microglía en cultivos organotípicos de retina de ratón**

**Programa de Doctorado:** Biología Fundamental y de Sistemas  
(Universidad de Granada)

**TESIS DOCTORAL**  
**Rosa María Ferrer Martín**  
Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Rosa María Ferrer Martín  
D.L.: GR 363-2014  
ISBN: 978-84-9028-768-2



Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Celular



## **Muerte celular fisiológica y comportamiento de la microglía en cultivos organotípicos de retina de ratón**

**Programa de Doctorado:** Biología Fundamental y de Sistemas  
(Universidad de Granada)

Memoria presentada por **ROSA MARÍA FERRER MARTÍN**,  
Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctora.

### Directores

Prof. Dr. MIGUEL ÁNGEL CUADROS OJEDA, Profesor Titular de Biología Celular, Universidad de Granada.

Prof. Dr. FRANCISCO DAVID MARTÍN OLIVA, Profesor Titular de Biología Celular, Universidad de Granada.

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



La doctoranda Rosa María Ferrer Martín y los directores de la tesis Miguel Ángel Cuadros Ojeda, Francisco David Martín Oliva y Julio Navascués Martínez. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 24 de mayo de 2013

Doctoranda

Fdo: Rosa María Ferrer Martín

Director/es de la Tesis

Fdo: Miguel A. Cuadros Ojeda

Fdo: Francisco David Martín Oliva

Fdo: Julio Navascués Martínez



Esta Tesis Doctoral fue realizada por la que suscribe en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. La investigación realizada ha sido financiada mediante la concesión de una Beca Predoctoral adscrita al Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía CVI-3008 y a través de los siguientes proyectos de investigación:

REFERENCIA DEL PROYECTO: CVI 3008

ENTIDAD FINANCIADORA: Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa. Junta de Andalucía

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Miguel Ángel Cuadros Ojeda

REFERENCIA DEL PROYECTO: BFU2010-19981

ENTIDAD FINANCIADORA: Dirección General de Investigación Científica y Técnica. Ministerio de Economía y Competitividad

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Julio Navascués Martínez

Granada, 24 de Mayo de 2013

Fdo. Rosa María Ferrer Martín



A mis padres  
A mis hermanos



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar un sincero agradecimiento a las personas que han contribuido a la finalización de este trabajo.

En primer lugar a mis directores de tesis, los Dres. Julio Navascués Martínez, Miguel Ángel Cuadros Ojeda y David Martín Oliva. Por confiar en mí para desempeñar este proyecto, por el esfuerzo y tiempo que han invertido en mi formación, así como por la sencillez y cercanía en el trato personal.

En particular quiero agradecer:

A Julio, el minucioso trabajo de revisión que ha realizado en esta tesis, en el tratamiento de imágenes y su experta guía en la escritura de la misma. Su rigurosidad y calidad científica constituyen para mí un modelo a seguir.

A Miguel Ángel, su seguimiento a lo largo de este camino científico, tanto en la parte del laboratorio como en la parte más teórica, relacionada con el desarrollo de seminarios, discusión de trabajos, apoyo bibliográfico y diseño experimental. También agradecerle su comprensión, apoyo y humanidad en los momentos difíciles que he vivido en estos años.

A David, por iniciarme y guiarme paso a paso en los experimentos del “labo”, (wester blot, PCR...), por su apoyo en la realización de seminarios, tanto internos como externos a nuestro grupo de investigación, por enseñarme cómo superar y afrontar determinadas situaciones, por introducir la citometría de flujo en mi trabajo, así como por su ayuda en su puesta a punto, que tantos quebraderos de cabeza nos dio al principio. Y por las muchas ocasiones que me ha hecho reír, con su humor gaditano, haciendo ameno el trabajo.

También quiero agradecer al Dr. José Luis Marín Teva la transmisión de su experiencia en cultivos organotípicos y la formación que de él he recibido, tanto profesional como personal.

A la Dra. Ruth Calvente Iglesias, por su disponibilidad cuando he necesitado ayuda informática o bibliográfica, su cordialidad y amabilidad.

A mis compañeras del laboratorio a lo largo de todo este periodo, Susana, Ana Santos y Mari Carmen, en una etapa inicial, y Ana y María, en una segunda etapa, por apoyarme en momentos difíciles a lo largo de estos años. No quiero olvidarme de los becarios de colaboración, Javier y María, por facilitarme la labor con vuestra simpatía y entusiasmo. Tampoco quiero olvidar al resto de personas que han pasado por el laboratorio, Cándido, Ana, Laura y Eli: gracias por enriquecer la experiencia del grupo.

A todos los profesores del Departamento de Biología Celular, por tratarme como un miembro más del Departamento desde el primer día y brindarme su ayuda. Por el apoyo y ánimo que he recibido de todos, gracias. Al Dr. Ramón Carmona Martos, por hacer posible mi participación en seminarios científicos dentro del Departamento así como en actividades de divulgación científica. Y por mostrarme siempre su disponibilidad para resolver cualquier problema tanto en el ámbito personal como laboral. A los Dres. Antonio Almendros Gallego, Antonio Ríos Guadix, María Asunción Abaurrea Equisoain y María del Valle Ostos Garrido, por su asesoramiento en la docencia de prácticas y su cordialidad. A la Dra. Esperanza López Garrido, por contribuir a mi formación profesional a través del programa formativo docente. Agradecerle también los buenos ratos que hemos vivido en los desayunos navideños y porque su compañía es siempre un placer. Al Dr. Francisco Abadía Molina, por su cordialidad, interés en mi trabajo y muestras de ánimo y apoyo. A la Dra. Mari Carmen Fernández Fernández, por su sonrisa y amabilidad constantes. A la Dra. María del Rosario Sepúlveda Justo le agradezco su ayuda en el manejo del programa Endnote y que haya compartido conmigo su experiencia en la técnica de perfusión y aislamiento de cerebro; de ella valoro su dulzura e inteligencia serena. A la Dra. Cristina Elena Trenzado Romero, antigua compañera de la licenciatura de Bioquímica y en la actualidad de Departamento, de la que admiro su valor, inteligencia y humildad. No tengo palabras para agradecerle la fuerza positiva que me ha dado su compañía y buen hacer. Cristi, gracias por tu aportación en el análisis estadístico de esta tesis, gracias por las demás aportaciones,

gracias por estar ahí. No me olvido de los profesores recientemente jubilados, el Dr. José Luis Caballero López-Lendínez, a quien le agradezco la atención prodigada de estos años sacándome siempre una sonrisa. Y a la Dra. Maritina Vidal Bernabé, gracias por su cordialidad, amabilidad y simpatía. Tampoco quiero olvidarme de D. Juan José Megías Ambel, responsable de la administración del Departamento, a quien le agradezco su excelente profesionalidad y trato personal.

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin la ayuda material y personal de los magníficos profesionales del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. Por ello quiero mostrar mi agradecimiento de manera particular a: D<sup>a</sup>. María José Martínez Guerrero y al Dr. David Porcel Muñoz por su trato personal, experta guía y trabajo en la obtención de imágenes de microscopía electrónica de transmisión. Además, quiero agradecer a David Porcel, su paciencia y dirección en el manejo del microscopio láser confocal, sus oportunos consejos técnicos, sentido del humor y las muchas horas de confocal que ha compartido conmigo; muchas gracias David. A D<sup>a</sup>. Concepción Hernández Castillo por su esmerado trabajo en el procesado de muestras biológicas y por ser tan buena gente. A D. Juan de Dios Bueno Pérez, por su amabilidad y disponibilidad cuando he necesitado ayuda. Al Dr. Jaime Lazuén Alcón, responsable del citómetro de flujo, quiero agradecerle la aportación científica y profesional que de él he recibido, la disponibilidad para resolver cuestiones metodológicas, su actitud optimista y sentido del humor así como su paciencia por las muchas muestras que hemos “procesado” en el citómetro. A D<sup>a</sup>. María José García Chicano, por el minucioso seguimiento de los cruces de ratón y nacimientos de las crías de los mismos. Siempre disponible y amable. A D. Pablo Rodríguez Prieto y D. Luis Arcos Pérez, por su colaboración en el cuidado y seguimiento de los ratones así como por su eficiencia y cordialidad. Al Dr. Francisco Javier Carreras Egaña quiero agradecerle la deferencia que ha mostrado conmigo al enseñarme su trabajo y estudios sobre el glaucoma, en los ratos que hemos compartido en la instalación del microscopio confocal en el CIC.

Porque la vida es tomar decisiones, y por desgracia no siempre vemos la salida, es para mí un placer y un deber agradecer la ayuda que he recibido de la gente que ha contribuido a que hoy haya llegado hasta aquí. Gracias a todos los profesores que han contribuido a mi actual formación académica y personal. A todos mis compañeros de estudios, que han compartido conmigo la tarea de aprender y estudiar, los buenos y malos momentos. Mis compañeros de bioquímica se merecen una mención especial, por las muchas horas de clases de prácticas y estudio que hemos compartido (Maribel, José Martínez, Ángel, Celina, Ana Gema, Anabel, Cristina...). Belén Fernández no me olvido de ti, gracias por estar conmigo cuando te he necesitado. Gracias también a Antonio por el apoyo, ánimo y guía. Gracias a Raquel y Elsa, por vuestro afecto y apoyo. A Tita y a Paco, muchas gracias por vuestra orientación y ayuda, que tan generosamente me ofrecisteis cuando acabé la carrera. A Esther Zumaquero, de la que admiro su tesón, voluntad, generosidad y capacidad de trabajo abnegada. Mil gracias por las tardes de té sin azúcar y charlas científicas, gracias por tu generosa contribución en la puesta a punto de mis experimentos de citometría, gracias por todo. A Juanjo Romero, muchísimas gracias por tu generosa colaboración en la portada de esta tesis.

A mis amigas de siempre, María José, Mati, Loli, Nuria, Ángela, Inma, Manoli, Ana Garcia, las hermanas Esther y Jacqueline, Belén, Luisa y Carolina. Gracias por todo el cariño y afecto recibido. Y porque, aunque nuestros caminos profesionales nos han separado, siempre habéis estado y estáis cuando os necesito.

A mis padres Juan y Manuela, por vuestro incondicional amor, apoyo, esfuerzo y entrega por vuestros hijos. A vosotros os lo debo todo, gracias por educarnos en el respeto, amor, y sacrificio. Enseñarnos a valorar las cosas sencillas de la vida. Vuestro ejemplo es una prueba fehaciente para nosotros de que con amor se puede transformar y conseguir cualquier cosa en la vida. A mis hermanos, Juan Manuel, Miguel Ángel e Isabel Séfora, a los que tanto quiero y admiro por su capacidad de superación, voluntad y coraje, gracias por aguantarme en el convivir

diario, gracias por todo el amor recibido, gracias porque vuestra actitud ante la vida me da fuerzas y motivación para alcanzar mis propias metas.

A toda mi familia porque, de una manera u otra, han influido a que hoy esté aquí. En especial a mis tíos Juan e Isabel, inseparables desde nuestra infancia, a los que consideramos nuestros segundos padres. Gracias por vuestra generosidad, amor y apoyo en todos estos años, por acompañarnos en las alegrías, y sobre todo en las penas.

A mi tío abuelo Francisco por su afecto y por ser un ejemplo para todos nosotros de superación. Gracias a mis familiares que ya no están físicamente con nosotros pero sí en nuestros corazones, porque sus vidas han sido nuestros pilares.

Finalmente, a todas las personas que han pasado por mi vida y que por circunstancias del destino se han alejado de ella. Por contribuir a mi crecimiento personal.

A todos, mi más profundo agradecimiento.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS .....	3
Embriología de la retina de los vertebrados.....	3
Citoarquitectura de la retina de los vertebrados.....	4
Estratificación de la retina .....	6
Tipos neuronales de la retina.....	7
Células gliales de la retina.....	10
Vascularización de la retina de los vertebrados.....	14
MODELOS <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DE LA RETINA.....	16
Cultivos de células disgregadas y cultivos histiotípicos .....	16
Cultivos organotípicos .....	17
Cultivos organotípicos de explantes de retina.....	19
LAS CÉLULAS MICROGLIALES .....	20
Origen de la microglía.....	20
Tipos de microglía y activación microglial.....	22
La microglía de la retina .....	27
MUERTE CELULAR.....	29
Muerte celular durante el desarrollo de la retina.....	34
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO I: MUERTE CELULAR Y EXPRESIÓN DE POLI-ADP- RIBOSA-POLIMERASA-1 (PARP-1) DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DE LA RETINA DE RATÓN.....</b>	<b>43</b>
RESUMEN .....	45
INTRODUCCIÓN .....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
Animales .....	49
Aislamiento de la retina .....	49

Detección de la muerte celular mediante ELISA.....	50
Criotomía.....	51
Inmunocitoquímica .....	51
Histoquímica TUNEL .....	54
Microscopía confocal .....	54
Extracción y cuantificación de proteínas .....	55
Western blot .....	57
Extracción, purificación y cuantificación de ARN .....	58
Retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc).....	59
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) .....	60
Análisis estadístico.....	62
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
Aumento de la muerte celular en la retina durante la primera semana de desarrollo postnatal .....	63
Algunas células de la retina mueren por un mecanismo independiente de caspasas .....	64
Expresión de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina .....	68
Actividad de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina.....	74
Expresión y translocación de AIF durante el desarrollo postnatal de la retina .....	79
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>86</b>
<b>CAPÍTULO II: MICROGLÍA Y VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE EXPLANTES DE RETINA DE RATONES POSTNATALES Y ADULTOS.....</b>	<b>91</b>
RESUMEN .....	93
INTRODUCCIÓN .....	95
MATERIALES Y MÉTODOS .....	99
Animales .....	99
Obtención y cultivo <i>in vitro</i> de explantes de retina.....	99

Criotomía de explantes de retina.....	104
Inmunocitoquímica .....	104
Histoquímica TUNEL .....	108
Microscopía óptica .....	109
Microscopía electrónica de transmisión.....	109
Análisis cuantitativo de perfiles TUNEL-positivos .....	110
Determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo .....	111
Determinación de la proporción de células microgliales y tasa de inmunoreactividad para CD68 mediante citometría de flujo .....	117
Análisis estadístico .....	121
RESULTADOS .....	122
Alteraciones estructurales en los explantes de retina a diferentes tiempos de cultivo <i>in vitro</i> .....	122
Supervivencia y muerte celular en los explantes de retina a lo largo del tiempo de cultivo <i>in vitro</i> .....	136
Distribución y morfología de la microglía en explantes de P3, P10 y P60 no cultivados .....	150
Cambios en la distribución y morfología de la microglía a diferentes tiempos de cultivo <i>in vitro</i> en explantes de P3, P10 y P60.....	156
Inmunomarcado con anti-CD68 de las células microgliales.....	168
Cambios en el número de células microgliales durante el cultivo <i>in vitro</i> de los explantes de retina de diferentes edades.....	172
Tasa de IR-CD68 de las células microgliales en los explantes de retina de diferentes edades .....	179
Las células microgliales activadas engloban núcleos neuronales negativos o débilmente positivos para TUNEL.....	182
DISCUSIÓN .....	190
Condiciones de cultivo y preservación de la estructura de la retina .....	190
Supervivencia y muerte celular en los explantes de retina cultivados .....	194

Variaciones en la proporción de células microgliales de los explantes cultivados .....	197
Activación microglial en los explantes de retina cultivados .....	201
<b>CAPÍTULO III: PAPEL NEUROPROTECTOR DE LA MICROGLÍA ACTIVADA EN EXPLANTES DE RETINA POSTNATAL DE RATÓN CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>209</b>
RESUMEN .....	211
INTRODUCCIÓN .....	213
MATERIALES Y MÉTODOS .....	219
Animales .....	219
Cultivo <i>in vitro</i> y tratamiento experimental de explantes de retina .....	219
Inmunocitoquímica y TUNEL de explantes de retina.....	222
Microscopía electrónica de transmisión.....	223
Determinación de la viabilidad celular.....	223
Determinación de las tasas de inmunorreactividad para CD68 y de de células microgliales.....	224
Medida de TNF $\alpha$ .....	225
Análisis estadístico de los resultados .....	225
RESULTADOS .....	226
El tratamiento con minociclina disminuye la viabilidad celular en los explantes de retina cultivados <i>in vitro</i> .....	226
La minociclina inhibe la activación de la microglía en los explantes de retina cultivados <i>in vitro</i> .....	231
El tratamiento con LPS mantiene el estado activado de la microglía y no modifica la viabilidad celular de los explantes de retina .....	240
El tratamiento combinado con minociclina y LPS inhibe la activación microglial y reduce la viabilidad celular de los explantes de retina .....	240
La eliminación de la microglía mediante tratamiento con Lip-Clo reduce la viabilidad celular de los explantes de retina .....	245

DISCUSIÓN .....	249
Reacción microglial en los explantes de retina cultivados <i>in vitro</i> .....	249
La minociclina inhibe la activación de la microglía y el LPS la potencia ...	250
La minociclina disminuye la viabilidad celular en los explantes de retina..	252
Papel neuroprotector de la microglía activada en los explantes de retina....	253
Mecanismos de la microglía activada que inducen neuroprotección.....	255
Comentario final.....	257
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>259</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>299</b>



## ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario  
ADP: adenosina 5' difosfato  
AIF: factor inductor de la apoptosis  
ATP: adenosina 5' trifosfato  
BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro  
bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico  
BME: Medio basal de Eagle  
BSA: albúmina de suero bovino  
CAD: DNasa activada por caspasas  
CCG: capa de células ganglionares  
CCR2: receptor de CCL2  
CFN: capa de fibras nerviosas  
CNb: capa neuroblástica  
CNE: capa nuclear externa  
CNI: capa nuclear interna  
CNTF: factor neurotrófico ciliar  
CPE: capa plexiforme externa  
CPI: capa plexiforme interna  
CSE: capa de los segmentos externos de los fotorreceptores  
Ct: ciclo umbral  
CX3CR1: receptor de la fractalquina  
DAPI: 4',6'diamina-2-fenilindol  
div: días *in vitro*  
DTT: Ditioneitol  
dUTP: desoxiuridín trifosfato  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EGTA: etilenglicoltetraacético  
EndoG: endonucleasa G

EPR: epitelio pigmentario de la retina  
FDA: diacetato de fluoresceína  
GBSS: Solución salina balanceada de Gey  
GDNF: factor neurotrófico derivado de glía  
GFAP: proteína ácida fibrilar glial  
HEPES: ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinil-etanosulfónico  
IAPs: proteínas inhibidoras de la apoptosis  
IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1  
IgG: inmunoglobulina G  
IL-1: interleuquina 1  
IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 $\beta$   
IL-4: interleuquina 4  
IL-6: Interleucina 6  
IL-10: interleuquina 10  
IL-13: interleuquina 13  
IP: Ioduro de propidio  
IR-CD68: inmunorreactividad para CD68  
Lip-Clo: liposomas cargados de clodronato  
Lip-PBS: liposomas cargados de PBS  
LPS: lipopolisacárido  
MAPK : proteína quinasa activada por mitógeno  
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1 (también llamada CCL2)  
MIN: minociclina  
MLE: membrana limitante externa  
MLI: membrana limitante interna  
NF- $\kappa$ B: nuclear factor  $\kappa$ B  
NGS: suero normal de cabra  
P: día postnatal  
PAR: polímero de ADP-ribosa

PARP-1: poli-ADP-ribosa polimerasa-1  
PB: tampón fosfato  
PBS: tampón fosfato salino 1X  
PBS-Tr: PBS con tritón.  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PLP: fijador paraformaldehído/lisina/periyodato  
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
pro-NGF: Pro-factor de crecimiento nervioso  
RIPK-3: quinasa 3 de proteínas que interaccionan con receptores de membrana  
RNasa: ribonucleasa  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
RT: reverso-transcriptasa  
RT-PCR: PCR en tiempo real  
SDF-1: factor 1 derivado de células estromales  
SDS: dodecilsulfato sódico  
SNC: Sistema Nervioso Central  
TdT: desoxinucleotidil-transferasa terminal  
TFG- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta  
TLR: receptores de membrana tipo Toll  
TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa  
TUNEL: Terminal transferase-dUTP Nick end labelling  
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular



# **Introducción General**

---



## **LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS**

La retina es la estructura del sistema nervioso central (SNC) sensible a los estímulos visuales. En las neuronas sensoriales de la retina se produce la transducción de la señal lumínica en una señal nerviosa que será procesada y transmitida, a través del nervio óptico, a los centros visuales del cerebro. Dado que es la estructura en la que hemos realizado nuestro estudio, se comenta brevemente su origen y citoarquitectura.

### **Embriología de la retina de los vertebrados**

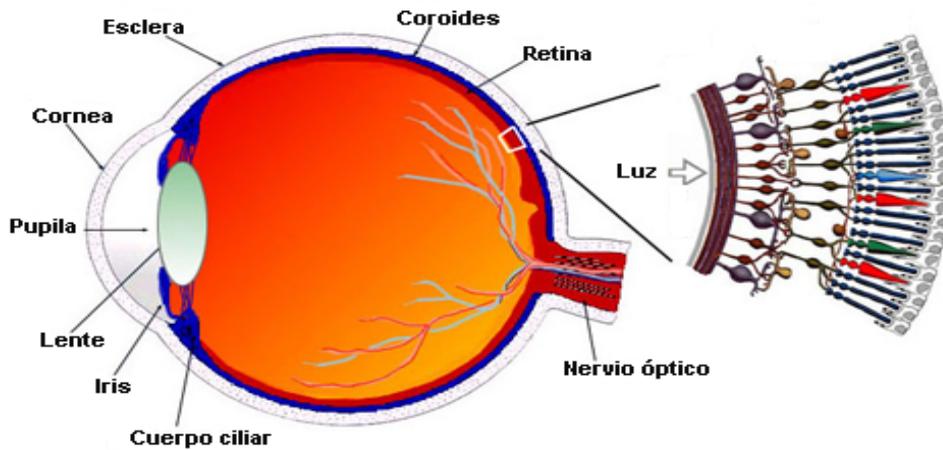
La retina deriva del neuroectodermo que da lugar a la formación del tubo neural o esbozo inicial del SNC. Cuando el tubo neural se cierra se forman dos evaginaciones a ambos lados del prosencéfalo denominadas vesículas ópticas, que representan el esbozo de los ojos. La invaginación de la vesícula óptica da lugar a la copa óptica inicial, en la que se distingue una capa interna, que dará lugar a la retina neural, y otra interna, que corresponde al futuro epitelio pigmentario, en cuya parte marginal se formará el epitelio ciliar y el del iris.

La retina neural primitiva se encuentra separada de la capa prospectiva de epitelio pigmentario por un espacio que se hace virtual en fases más avanzadas del desarrollo, ya que las células pigmentarias emiten prolongaciones que establecen contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina neural. Este espacio virtual, que puede dilatarse en ciertas condiciones, se denomina espacio subretiniano.

Los diferentes tipos neuronales de la retina y las células de Müller proceden del epitelio interno de la propia copa óptica. Por el contrario, los astrocitos y oligodendrocitos retinianos son de origen neuroepitelial, pero migran hasta la retina desde regiones cerebrales externas a ella. Finalmente, las células microgliales son de origen mesodérmico.

### Citoarquitectura de la retina de vertebrados

La retina de los vertebrados es invertida, ya que el estímulo visual ha de atravesar todo el espesor de la retina para alcanzar las neuronas sensoriales o fotorreceptores. En efecto, los fotorreceptores se localizan en la parte más externa de la retina neural, y por tanto más alejada del punto de entrada de las señales lumínicas en el ojo. Desde los fotorreceptores se transmiten impulsos nerviosos a neuronas situadas en partes más internas de la retina, que intervienen en el procesamiento y la transmisión de la información a los centros visuales del cerebro.



**Fig. 1.** Sección sagital de un globo ocular humano. La imagen ha sido tomada de <http://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/simple-anatomy-of-the-retina>.

Como se aprecia en la figura 1, la parte más externa del globo ocular está formada por tejidos de tipo conectivo. La capa más externa del globo ocular constituye la esclera, o esclerótica, un tejido fibroso que sirve de protección al ojo. Más internamente se dispone la coroides, abundantemente vascularizada, que contiene células pigmentadas de morfología estrellada. Los vasos sanguíneos de la coroides intervienen en la nutrición de las capas externas de la retina neural.

Las siguientes capas corresponden a estructuras derivadas de la copa óptica primitiva. Inmediatamente por debajo de la coroides se encuentra el epitelio pigmentario de la retina (EPR), que deriva de la capa externa de la copa óptica. El EPR rodea a la retina neural y se une a la membrana de Bruch, que es la capa más interna de la coroides. El EPR está formado por una delgada capa de células poligonales profusamente pigmentadas, ya que contienen abundantes gránulos de melanolipofuscina (mezcla de melanina y de lipofuscina). Los gránulos de pigmento aparecen sobre todo en el polo apical de las células (más próximo a la retina) y en las prolongaciones citoplasmáticas de estas células, que se intercalan entre los segmentos externos de conos y bastones.

Se han atribuido diversas funciones al EPR (Strauss, 2005). En primer lugar, gracias a la pigmentación de sus células, absorbe gran parte de la luz no recogida por los fotorreceptores, reduciendo la pérdida de calidad de imagen debida a la presencia de luz difusa en el interior del ojo. Además el EPR realiza otras funciones, como a) proteger a los fotorreceptores de la fotooxidación, b) participar en la renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores mediante fagocitosis de las porciones de los mismos que deben ser reemplazadas, y c) intervenir en la regulación del metabolismo de los fotorreceptores. Las células del EPR secretan varios tipos de moléculas, algunas de las cuales, como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento endotelial (VEGF) o el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), son necesarias para la diferenciación y mantenimiento de las células retinianas y la correcta vascularización de la retina.

La parte más interna del globo ocular corresponde a la retina neural, constituida por capas bien definidas que contienen diferentes tipos de neuronas y células gliales mantenidos por un armazón glial y vascular. La distribución en capas de las células de la retina adulta está presente en todos los vertebrados y contribuye a facilitar su estudio (Igarashi et al., 2007).

### **Estratificación de la retina**

Las células de la retina se disponen de forma organizada, constituyendo diez capas fácilmente identificables con el microscopio óptico. Estas capas son las siguientes, ordenadas desde la coroides hacia el humor vítreo (Fig. 2):

1. Epitelio pigmentario de la retina (EPR), externo a la retina neural. Está constituido por células pigmentadas, en cuyo citoplasma hay gránulos de pigmento. Impide que la luz se pierda en los tejidos que rodean al globo ocular.

2. Capa fotosensible o capa de conos y bastones, en la que se localizan los segmentos externos e internos de los fotorreceptores.

3. Membrana limitante externa (MLE), formada por los complejos de unión (fundamentalmente uniones ocludens) que se establecen entre las principales células gliales de la retina, las células de Müller, y los segmentos internos de conos y bastones.

4. Capa nuclear externa (CNE), que contienen los núcleos de conos y bastones.

5. Capa plexiforme externa (CPE), que contiene los terminales sinápticos de conos y bastones junto con prolongaciones de células horizontales y bipolares. En ella se establecen conexiones sinápticas entre los fotorreceptores y estas neuronas de asociación.

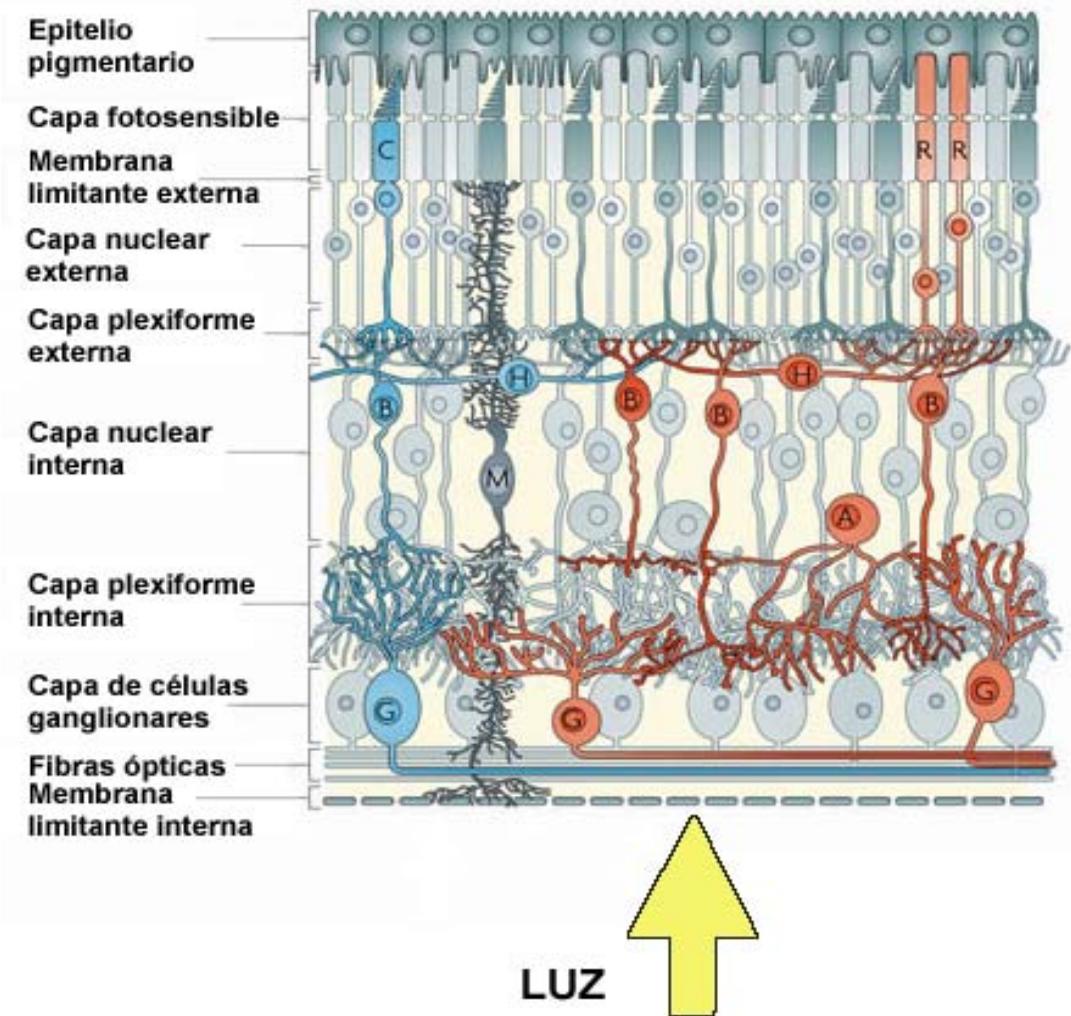
6. Capa nuclear interna (CNI), en la que se localizan los somas de la mayoría de las neuronas de asociación (de todas células horizontales y bipolares y de muchas células amacrinas) junto con los núcleos de las células de Müller.

7. Capa plexiforme interna (CPI), constituida por prolongaciones de las células amacrinas, bipolares y horizontales que establecen conexiones sinápticas 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 las fibras nerviosas (CFN), formada por los axones de las células ganglionares, que convergen en la cabeza del nervio óptico para abandonar la retina.

10. Membrana limitante interna (MLI), que está formada por la lámina basal y los pies terminales de las células de Müller y separa la retina del vítreo.



**Fig. 2.** Esquema de las capas de la retina con los diferentes tipos de neuronas. También se indica el origen de la luz que llega a la retina (flecha). G: células ganglionares; A: células amacrinas; M: células de Müller; B: células bipolares; H: células horizontales. C: conos; R: bastones. Modificado de Swaroop et al. (2010).

### Tipos neuronales de la retina

En la retina de los mamíferos hay al menos seis tipos diferentes de neuronas que se distinguen por su localización y sus rasgos morfológicos y funcionales. Siguiendo un criterio funcional, los diferentes tipos neuronales se

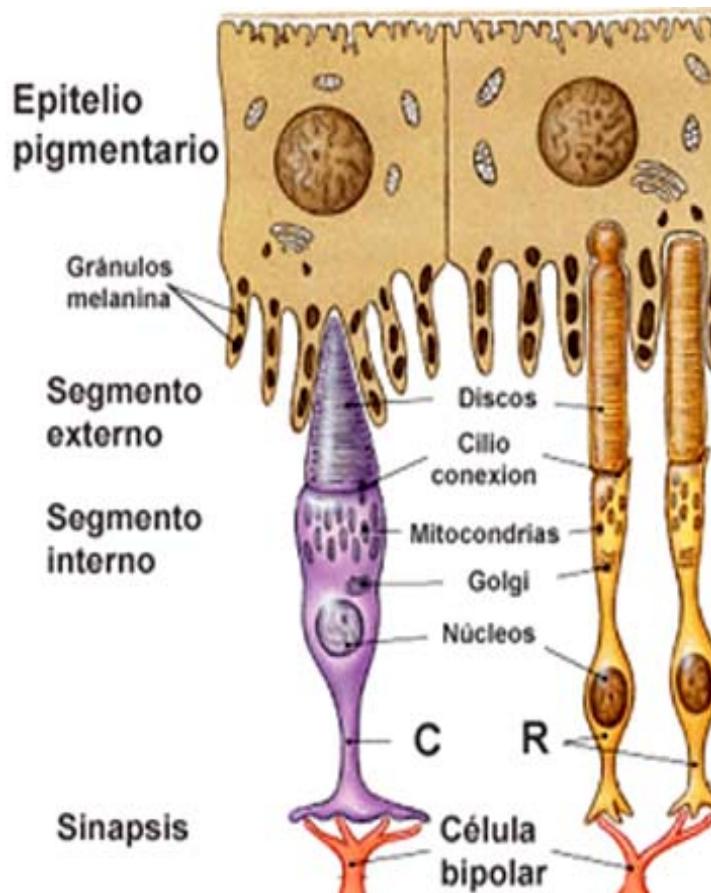
pueden incluir en tres grupos: neuronas sensoriales, de asociación y de proyección.

### *Neuronas sensoriales*

Son las células de la retina sensibles a la luz que llevan a cabo procesos de fototransducción (transformación del estímulo luminoso en señal nerviosa). Se denominan fotorreceptores, que pueden ser de dos tipos: conos y bastones. Los bastones son los fotorreceptores más abundantes de la retina humana (alrededor de 120 millones) y del ratón (alrededor del 97% de todos los fotorreceptores) y son sensibles a intensidades lumínicas bajas. Los conos son mucho menos abundantes (alrededor de 6 millones en la retina humana y solo un 3% de los fotorreceptores en ratón). Son menos sensibles que los bastones, pero permiten percibir el color ya que existen tres tipos de conos sensibles a radiaciones de distinta longitud de onda, denominados L (onda larga), M (onda media), y S (onda corta). Debido a su menor sensibilidad, actúan en situaciones de alta luminosidad.

Los conos y bastones presentan características estructurales similares (Fig. 3). En primer lugar, tienen un segmento externo que proyecta hacia el epitelio pigmentario y que contiene gran cantidad de sáculos membranosos donde se produce la captura de fotones y comienza la fototransducción. A continuación se encuentra el segmento interno, que conecta con el externo mediante un cilio de conexión y contiene la mayor parte de la maquinaria metabólica de la célula, incluyendo retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias. Ambos segmentos se localizan en la capa fotosensible de la retina. Los segmentos externo e interno de los conos se distinguen de los segmentos de los bastones en que son más cortos y gruesos y, además, su segmento externo se adelgaza hacia el extremo. El segmento interno de los conos y bastones se continúa en el soma, que aloja el núcleo y se localiza la CNE. Del soma surge una prolongación axónica que pasa a la CPE, donde finaliza en terminales sinápticos que establecen conexiones con las neuronas de asociación de la retina.

A pesar de ser las células sensibles al impulso luminoso, los fotorreceptores de la retina de vertebrados se encuentran situados en el lado opuesto al de entrada de luz. Por lo tanto, están localizadas cerca de la membrana coriocapilar de la coroides, desde donde difunden los nutrientes y el oxígeno necesarios para asegurar el mantenimiento de su metabolismo.



**Fig. 3.** Esquema de un cono (C) y de dos bastones (R) en los que se distinguen sus partes constitutivas. Los segmentos externos de ambos tipos celulares se encuentran rodeados de prolongaciones de células del epitelio pigmentario, y por el extremo opuesto establecen conexiones sinápticas con células bipolares. Modificado a partir de <http://iupucbio2.iupui.edu/anatomy>.

#### *Neuronas de asociación o de integración*

Reciben señales provenientes de los fotorreceptores y las transmiten a las células que establecen conexiones con los centros visuales del cerebro (neuronas

ganglionares). Las neuronas de asociación de la retina son las neuronas bipolares, las amacrinas y las neuronas horizontales, cuyos somas se localizan en la CNI.

#### *Neuronas de proyección*

Están constituidas por las células ganglionares, que son neuronas cuyo soma está situado cerca del límite interno (vitreal) de la retina. Sus dendritas conectan con las neuritas de las neuronas de asociación y sus largos axones discurren por la CFN de la retina hasta alcanzar el nervio óptico, a través del cual llegan hasta los centros visuales encefálicos. En general, los somas de las células ganglionares se disponen en un solo estrato, formando la CCG.

#### **Células gliales de la retina**

Como sucede en otras regiones del SNC, la retina neural contiene, además de neuronas, otras células que constituyen la glía retiniana. Estas células proporcionan soporte estructural al resto de células de la retina, formando un “andamio” que le da consistencia, y regulan procesos metabólicos y de homeostasis de la retina. En concreto, tanto la retina de ratón como la humana contienen células de Müller, astrocitos y células microgliales. Sin embargo, los oligodendrocitos, que forman la vaina de mielina de las fibras nerviosas en el SNC, no están presentes en la retina, ya que los axones de las células ganglionares solo están mielinizados a partir de su entrada en el nervio óptico (Gao et al., 2006; Stone y Dreher, 1987). Sí existen oligodendrocitos en retinas totalmente avasculares, como las de las aves (Ono et al., 1998; Rompani y Cepko, 2010), o de vascularización parcial, como la del conejo (Ehinger et al., 1994; Schnitzer., 1988).

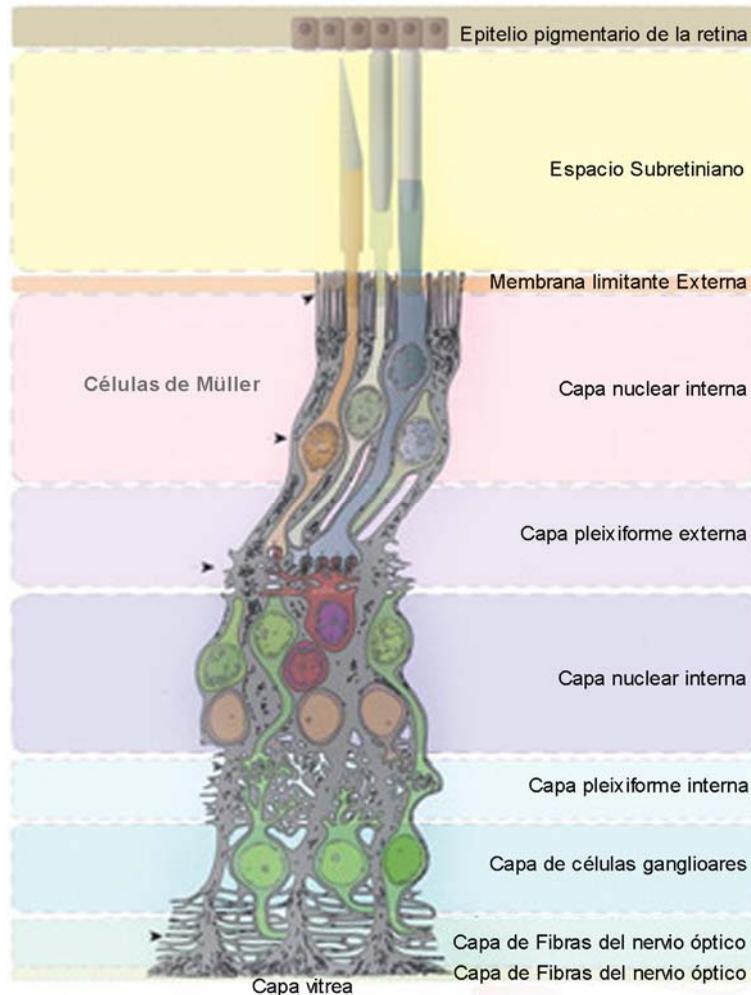
#### *Células de Müller*

Son células macrogliales que proceden del neuroepitelio retiniano y constituyen el principal tipo de glía retiniana. Por sus características estructurales, moleculares y funcionales, se supone que se trata de astrocitos modificados

(Hollander et al., 1991), aunque su distribución en la retina las asemeja a la glía radial (Bernardos et al., 2007). En efecto, las células de Müller son alargadas, con prolongaciones que abarcan todo el espesor de la retina neural, desde la MLE hasta la MLI. El soma celular, que alberga el núcleo, se localiza en la CNI (Fig. 4). Gracias a esta distribución, las células de Müller se encuentran en estrecha relación topográfica con todos los tipos neuronales de la retina, habiéndose descrito que constituyen unidades funcionales a modo de columnas, que proporcionan soporte estructural y funcional a la retina y dan soporte trófico a las neuronas (Bringmann et al., 2006; Bringmann y Wiedemann, 2012; Mack, 2007; Reichenbach et al., 1993). Las células de Müller desempeñan diferentes funciones que afectan de forma directa o indirecta a la fisiología de las neuronas, como conducir la luz hacia las células fotorreceptoras, amortiguar deformaciones mecánicas del tejido retiniano, participar en la eliminación de desechos metabólicos o regular la homeostasis iónica y acuosa (Bringmann y Wiedemann, 2012; Newman y Reichenbach, 1996). Junto con otros tipos celulares (células endoteliales, pericitos, astrocitos y microglía), las células de Müller mantienen la barrera hematorretiniana y contribuyen a la vasculogénesis y regulación del flujo sanguíneo en las retinas vascularizadas.

Las células de Müller son capaces de activarse frente a daños retinianos, sufriendo cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. La activación de estas células induce un incremento de su tamaño (hipertrofia), el aumento de la expresión de filamentos intermedios de GFAP (proteína ácida fibrilar de la glia) y vimentina, un incremento de su actividad proliferativa y, en algunas especies, la dediferenciación hacia progenitores neuronales (Bernardos et al., 2007). Cuando hay lesiones en la retina, las células de Müller modulan la respuesta inmunitaria mediante la producción de diferentes moléculas, como citoquinas pro- o anti-inflamatorias y factores neurotróficos (GDNF, BDNF, bFGF), que pueden tener actividad neurotóxica o neuroprotectora (Drescher y Whittum-Hudson, 1996; Harada et al., 2002; Zhou et al., 2012). Por ejemplo, se ha comprobado que la quimioquina CCL-2, también conocida como proteína quimioatrayente de

monocitos (MCP-1), es producida por las células de Müller y recluta macrófagos y microglía en el área lesionada (Hollborn et al., 2008; Nakazawa et al., 2006; Rutar et al., 2012).



**Fig. 4.** Esquema de la estructura de la pared retiniana en la que se representan las prolongaciones celulares de las células de Müller, que van desde la membrana limitante interna hasta la superficie vitreal. Se puede apreciar que las expansiones de las células de Müller forman un entramado en el que se encuentran alojadas el resto de células de la retina. A la derecha se indican las diferentes capas de la retina. Modificado a partir de Klimczak et al. (2009).

Durante el desarrollo de la retina, la glía de Müller constituye un entramado orientado radialmente que contribuye a la distribución ordenada de las neuronas retinianas en diferentes capas (Meller y Tetzlaff, 1976). En concreto, las células de Müller parecen intervenir en la migración de las células microgliales de la retina (Cuadros y Navascués, 2001; Navascués et al., 1996), ya que la disposición de sus pies terminales y de sus prolongaciones orientan la dirección de la migración tangencial, circunferencial y radial de dichas células (Marín-Teva et al., 1999b, 1999c; Sánchez-López et al., 2004).

### *Astroцитos*

Los astroцитos de la retina provienen de precursores neuroepiteliales que se originan fuera de la retina y penetran en ella a través del tallo óptico, propagándose por toda la retina desde la cabeza del nervio óptico. Se localizan en la CFN y su presencia se correlaciona con la existencia de vasos sanguíneos, de forma que las retinas vascularizadas contienen astroцитos (Schnitzer, 1987; Stone y Dreher, 1987), en las parcialmente vascularizadas, como la del conejo, solo hay astroцитos en aquellas regiones que contienen vasos (Stone y Dreher, 1987), y las retinas avasculares de las aves no contienen astroцитos (Meyer, 1977; Prada et al., 1998; Won et al., 2000).

Los astroцитos de la retina tienen un soma del que irradian numerosas prolongaciones que los proporcionan un aspecto estrellado. Contienen abundantes filamentos de GFAP y su localización está restringida a la CFN, donde sus prolongaciones pueden rodear axones de células ganglionares y vasos sanguíneos. Los astroцитos de la retina parecen contribuir a la barrera hemato-retiniana y probablemente intervienen en el mantenimiento de la homeostasis iónica.

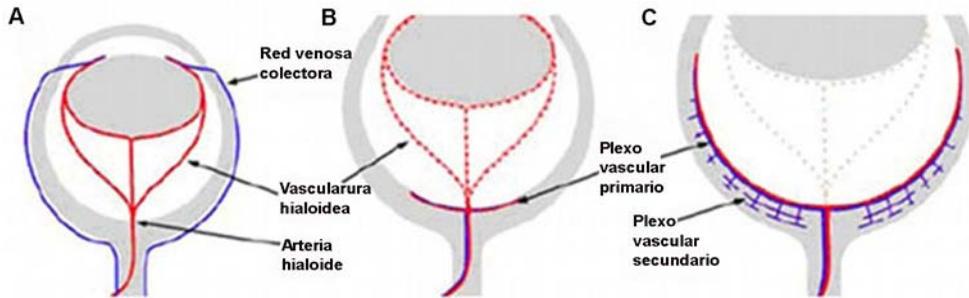
### *Microglía*

Las células microgliales de la retina son un objetivo principal de esta Tesis, por lo que sus características morfológicas y funcionales son objeto de un apartado específico de esta introducción.

## **Vascularización de la retina de los vertebrados**

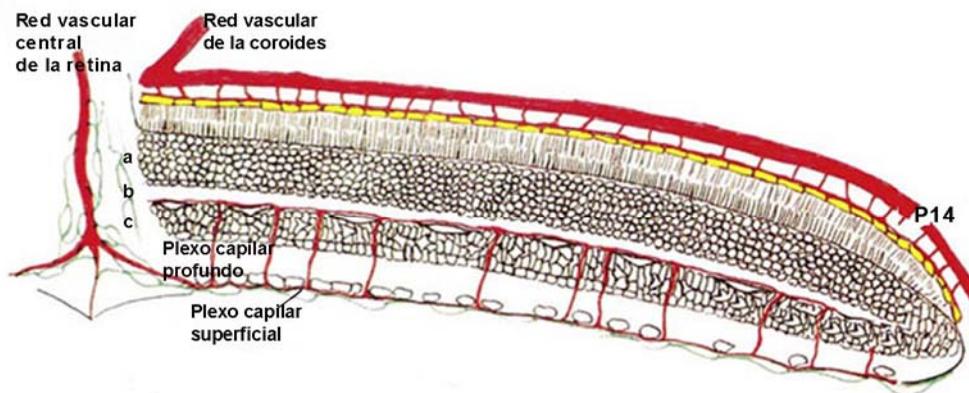
La retina de los vertebrados se encuentra parcial o totalmente vascularizada mediante una red de vasos sanguíneos que se forman durante el desarrollo, extendiéndose desde la cabeza del nervio óptico hacia la periferia de la retina. En general, los vasos sanguíneos se pueden formar mediante dos mecanismos diferentes: angiogénesis y vasculogénesis. La angiogénesis corresponde a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de yemas vasculares formadas en vasos preexistentes mediante proliferación de sus células endoteliales, que permiten la extensión de la red vascular. La vasculogénesis es la organización de nuevos vasos a partir de precursores mesenquimales (angioblastos) que migran individualmente, coalescen para formar cordones celulares y finalmente se diferencian en células endoteliales dando lugar a vasos sanguíneos independientes de los vasos preexistentes. En la retina ocurren fundamentalmente procesos de angiogénesis (Gariano, 2003) que están regulados por los niveles de oxígeno existentes en la retina, que a su vez regulan la secreción de VEGF por astrocitos y células de Müller. En etapas iniciales del desarrollo, se forma una red vascular inicial en el vítreo, conocida como vasculatura hialoidea, que procede de la arteria hialoidea presente en la cabeza del nervio óptico. La vasculatura hialoidea va desapareciendo a lo largo del desarrollo, al mismo tiempo que se va desarrollando la vasculatura de la retina mediante angiogénesis a partir de la arteria hialoidea (Fig. 5), con la aparición inicial de un plexo vascular primario.

El plexo vascular primario, que contiene arterias y venas, se extiende progresivamente por la CFN desde la cabeza del nervio óptico hasta cubrir toda la superficie vitreal de la retina. Este plexo da lugar a tres redes vasculares paralelas interconectadas entre sí, que se localizan en la CFN, CPI y límite de la CPE con la CNI. La vascularización de la retina de ratón comienza alrededor del nacimiento y se completa, con el desarrollo de redes vasculares en la CPI y la CPE, alrededor de P14 (Fruttiger, 2007).



**Fig. 5.** Esquema del proceso de remodelación de la vasculatura retiniana durante el desarrollo. **A:** La arteria hialoidea abastece la vasculatura hialoidea y drena en la red venosa colectora. **B:** Formación del plexo vascular primario dotado de arterias y venas, sobre la superficie vitreal de la retina, al mismo tiempo que desaparece la vasculatura hialoidea. **C:** Desarrollo del plexo vascular profundo o secundario a partir de los vasos sanguíneos del plexo vascular primario. Modificado de Fruttiger (2007).

Como se aprecia en la figura 6, la CNE es totalmente avascular y recibe aporte nutritivo y de oxígeno mediante difusión a partir de vasos situados fuera de la retina, fundamentalmente los capilares de la coroides (Provis, 2001).



**Fig. 6.** Representación de la vascularización de una retina de rata postnatal de 14 días (P14). A la izquierda se representa el disco óptico, mientras que la periferia de la retina aparece a la derecha. En este estadio del desarrollo postnatal, la vascularización de la retina se ha completado. **a,** CNE; **b,** CPE; **c,** CNI. Modificado a partir de Kur et al., (2012).

## **MODELOS *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA RETINA**

### **Cultivos de células disgregadas y cultivos histiotípicos**

Los modelos de cultivo *in vitro* de células y tejidos permiten el estudio del efecto de diversos tratamientos o manipulaciones sobre las células, independientemente de influencias sistémicas (Freshney, 1994). Los modelos de células disgregadas facilitan los tratamientos químicos o genéticos de las mismas, aunque se pierde en ellos el microambiente original de las células y desaparecen las relaciones intercelulares así como las interacciones de las células con componentes de la matriz extracelular. Además, las células cultivadas *in vitro* modifican la morfología y el comportamiento que tienen en los órganos *in situ*.

Con la finalidad de recuperar las interacciones celulares se han desarrollado cultivos histiotípicos, en los que las células disociadas se reagrupan en una estructura tridimensional más o menos similar al tejido original. Se han puesto a punto diferentes técnicas para conseguir esta reestructuración *in vitro* de los tejidos. Por ejemplo, las células disgregadas se pueden disponer sobre sustratos artificiales, como matrices de colágeno, que reproducen la estructura tridimensional del tejido original. En otros casos, las células disociadas se cultivan en un agitador giratorio, induciendo la formación de grupos celulares (“esferas”) que adquieren una organización estructural similar a la del tejido originario. La capacidad de producir este tipo de formaciones es mayor en las células embrionarias que en las adultas. Aunque en estos cultivos histiotípicos se puede conseguir una buena organización estructural, ésta muestra importantes diferencias con la observada en el tejido *in vivo*. Por ejemplo, a partir de células disociadas de la retina de un embrión de pollo se obtienen esferas que reproducen la disposición laminar de la retina *in vivo*. Sin embargo, la distribución laminar obtenida en estas esferas retinianas se encuentra invertida con respecto a la disposición normal, ya que la lámina de fotorreceptores se dispone en su parte interna en lugar de estar localizada en la superficie externa, como ocurre en la retina *in situ* (Layer et al., 2002).

### **Cultivos organotípicos**

En los cultivos organotípicos se cultivan *in vitro* fragmentos de tejidos u órganos que conservan la organización estructural originaria. Cuando el tejido u órgano que se desea cultivar forma una lámina sin un grosor excesivo, los fragmentos cultivados pueden ser simples explantes obtenidos de dicha lámina sin necesidad de otro procesamiento. Los cultivos organotípicos también pueden provenir de rebanadas (“slices”) de tejido, que son secciones de un grosor de 200-400  $\mu\text{m}$  que se cultivan sobre un sustrato. Aunque explante y slice no son términos totalmente sinónimos, es frecuente utilizarlos de forma indistinta (Lossi et al., 2009).

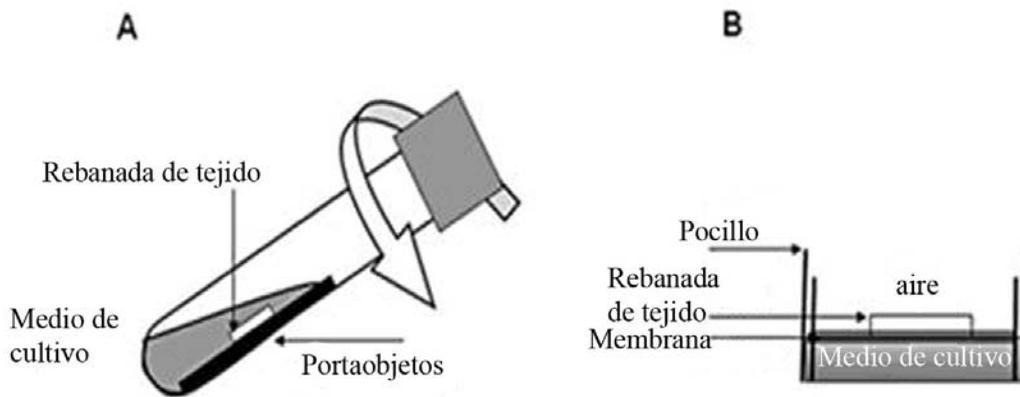
Los cultivos organotípicos de explantes de tejido neural son modelos bien caracterizados, en los que se conservan muchas de las características celulares propias del tejido *in situ*. Así, no se modifican muchas de las interacciones celulares (como las conexiones entre diferentes neuronas del explante o sus relaciones con las células gliales) o las relaciones con elementos de la matriz extracelular. No obstante, sí se eliminan las proyecciones neuronales establecidas con dianas localizadas fuera del explante (Lossi et al., 2009).

Una forma de cultivo de fragmentos de tejido es la conservación de preparaciones en fresco o “acute slices” del mismo durante un corto periodo de tiempo. Estos “acute slices” generalmente se mantienen algunas horas mediante perfusión con soluciones nutritivas que contienen los electrolitos adecuados. Estas preparaciones han sido ampliamente utilizadas para estudios electrofisiológicos, ya que permiten el acceso controlado de electrodos a células determinadas (Fadool et al., 2011; Lein et al., 2011), pero también se han usado para estudiar algunos aspectos de la biología de tipos celulares específicos, como las características dinámicas de la microglía retiniana y su respuesta a neurotransmisores (Fontainhas et al., 2011; Liang et al., 2009).

En otros casos, los fragmentos son mantenidos *in vitro* durante periodos de tiempo prolongados, que pueden llegar a varias semanas. Este tipo de procedimiento es característico de los cultivos organotípicos y permite estudiar

procesos biológicos de duración prolongada, como proliferación, neurogénesis, sinaptogénesis y muerte celular (Lossi et al., 2009; Rambani et al., 2009).

Tanto en los “acute slices” como en los cultivos organotípicos, se intentan reproducir las condiciones del tejido *in vivo* a la vez que se facilita el acceso de las células a la manipulación y tratamiento experimental. Las modificaciones que se producen en el seno del tejido son menores en los “acute slices”, ya que se mantienen *in vitro* durante cortos periodos de tiempo. Por ejemplo, el patrón de conexiones sinápticas apenas se altera respecto a la situación *in vivo*. Por el contrario, los cultivos organotípicos se mantienen durante periodos de tiempo más prologados, permitiendo la aparición de modificaciones respecto a la situación *in vivo*, como reordenación sináptica, activación glial o formación de una “cicatriz astrocitaria” (Lossi et al., 2009). De todas formas, aun teniendo en cuenta estas limitaciones, el uso de cultivos organotípicos ha resultado muy útil ya que permite realizar análisis experimentales que no serían posibles *in vivo*.



**Fig. 7.** Tipos de procedimientos metodológicos para la obtención de cultivos organotípicos. **A:** En un cultivo “roller tube”, el tejido se adhiere sobre un portaobjetos que se introduce en el interior de un tubo con medio de cultivo y es sometido a un movimiento rotatorio (flecha). **B:** En el cultivo sobre una membrana semipermeable, la superficie del medio de cultivo está en contacto con la membrana sobre la que se sitúa el tejido, de modo que los nutrientes atraviesan la membrana por difusión capilar y llegan hasta el tejido. La atmósfera que rodea al tejido permite su aireación. Modificada de Cavaliere y Matute (2011).

Se han desarrollado dos tipos de metodología para el mantenimiento de los cultivos organotípicos (Fig. 7). La primera es la denominada “roller tube” (Gahwiler, 1981), en la que el tejido, previamente embebido en un coágulo de plasma, se fija a un portaobjetos que, a su vez, se coloca en el interior de un tubo con una pequeña cantidad de medio de cultivo (Fig. 7A). El tubo se mantiene inclinado a la temperatura adecuada y en rotación lenta (alrededor de 10 revoluciones por hora) hasta varias semanas. El explante queda expuesto al medio de cultivo en algunas fases de la rotación, mientras queda al aire en otras, de forma que se alternan periodos de interfase gaseosa con otros de interfase líquida, asegurando la oxigenación y nutrición de las células (Lein et al., 2011; Lossi et al., 2009).

La otra metodología utiliza una membrana semipermeable como sustrato (Stoppini et al., 1991). Así, el tejido cultivado se mantiene sobre una membrana porosa situada en la interfase entre el medio de cultivo y la atmósfera húmeda situada por encima del explante (Fig. 7B), de forma que dicho explante recibe un aporte adecuado de nutrientes a través de la membrana situada por debajo, a la vez que sus células pueden realizar el intercambio gaseoso con el aire situado por encima (Lossi et al., 2009).

### **Cultivos organotípicos de explantes de retina**

La retina es una región del SNC especialmente favorable para la obtención de explantes ya que:

1. Es una región bien delimitada anatómicamente del resto del SNC, que permite su fácil aislamiento.
2. Está organizada citoarquitectónicamente en capas, es decir sus células se disponen en disposición laminar desde el principio del desarrollo (Santos et al., 2008). La estructura laminar aporta referencias topográficas útiles para determinar el movimiento de las células.
3. Presenta un grosor adecuado (entre 200 y 400  $\mu\text{m}$ ) para el cultivo de explantes sin necesidad de realizar secciones. Por lo tanto, se evita dañar muchos

de los axones de la retina, ya que solo se seccionan los axones de las células ganglionares, mientras que la mayoría de los axones de otras neuronas del interior del explante no son afectados.

4. Finalmente, ya sea por las características del tejido empleado o por el procedimiento de obtención de los explantes, no se forma una cicatriz astrocitaria sobre la superficie del explante retiniano, como sucede en las rebanadas de tejido cerebral.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la microglía de explantes de retina embrionaria de codorniz cultivados en medio basal de Eagle se comporta de un modo fisiológico, es decir similar al observado en la retina *in situ* (Carrasco et al., 2011). En otras especies, como el ratón, en las que la retina es vascular, el comportamiento de la microglía en los cultivos *in vitro* difiere del mostrado *in vivo* (Carter y Dick, 2003; Engelsberg et al., 2004; Liljekvist-Soltic et al., 2008; Mertsch et al., 2001), lo que seguramente se debe en parte a la degeneración de los vasos sanguíneos de la retina.

## **LAS CÉLULAS MICROGLIALES**

Las células microgliales son los macrófagos residentes del SNC, que reaccionan frente a daños del tejido nervioso, que pueden producirse por infecciones de patógenos externos, por lesiones traumáticas o por patología degenerativas del SNC. Por tratarse de células de tipo macrofágico, estas células tienen muy desarrollada su capacidad fagocítica, de crucial importancia tanto durante el desarrollo como en condiciones patológicas (Marín-Teva et al., 2011; Sierra et al., 2013).

### **Origen de la microglía**

Algunos autores han defendido que las células microgliales tienen un origen común con las neuronas y la macroglía (astrocitos, oligodendrocitos, células de Müller, y glía de Bergmann) y, por lo tanto, serían de origen neuroectodérmico (Dickson y Mattiace, 1989; Fedoroff et al., 1997; Hao et al.,

1991; Kitamura et al., 1984; Richardson et al., 1993). Actualmente, sin embargo, existe un consenso prácticamente generalizado sobre el hecho de que las células microgliales derivan de precursores de tipo mesodérmico (Chan et al., 2007; Cuadros y Navascués, 1998, 2001; Kaur et al., 2001; Prinz y Mildner, 2011; Saijo y Glass, 2011).

Se piensa que las células microgliales derivan de precursores específicos independientes de los monocitos que invaden el SNC durante etapas tempranas de su desarrollo normal. En concreto, los precursores microgliales de roedores invaden el neuroepitelio embrionario en torno a los 8,5 días de embriogénesis (Chan et al., 2007) y derivan de fuentes hematopoyéticas diferentes de la médula ósea, que incluyen el saco vitelino (Davoust et al., 2008; Ginhoux et al., 2010; Gomez Perdiguero et al., 2013; Mizutani et al., 2012; Saijo y Glass, 2011). Estos precursores expresan fuertemente el receptor de la citoquina fractalquina (CX3CR1), pero no expresan el receptor de la citoquina CCL2 (CCR2), también conocida como MCP1 (Mizutani et al., 2012).

La utilización de quimeras de saco vitelino codorniz-pollo ha permitido comprobar que células similares a macrófagos originadas en el saco vitelino entran en el SNC durante etapas tempranas del desarrollo embrionario (Cuadros et al., 1992, 1993). La entrada de estas células es independiente de los vasos sanguíneos (Ashwell, 1991; Cuadros et al., 1993; Prinz y Mildner, 2011; Wang et al., 1996), ya que en las primeras fases de la invasión aún no se ha desarrollado la vascularización del SNC. La realización de parabiosis entre embriones de codorniz y pollo han permitido concluir que los precursores microgliales no son células circulantes que atraviesan el endotelio de los vasos sanguíneos, sino que colonizan el parénquima nervioso inmaduro mediante migración desde la superficie pial (Kurz y Christ, 1998).

Una vez dentro del SNC, los precursores microgliales colonizan todo el parénquima nervioso mediante procesos de migración y proliferación hasta alcanzar sus lugares de destino, donde se diferencian en células microgliales maduras (Cuadros y Navascués, 1998, 2001; Dalmau et al., 2003; Marín-Teva et

al., 2011), de forma que la microglía está presente en todas las regiones del SNC adulto (Del Río Hortega, 1932; Vela et al., 1995). Sin embargo, su distribución en el cerebro adulto no es homogénea, mostrando mayor densidad en unas regiones que en otras (Lawson et al., 1990).

La entrada de precursores microgliales después de completado el desarrollo del SNC parece ser escasa en condiciones normales (Davoust et al., 2008). Por lo tanto, el mantenimiento de la población microglial depende aparentemente de la proliferación de las células microgliales preexistentes (Ajami et al., 2007; Lawson et al., 1992). Las células microgliales se acumulan en regiones del parénquima nervioso que han sufrido daños, como consecuencia de un incremento en su capacidad migratoria y proliferativa (Hanisch y Kettenmann, 2007; Ransohoff y Brown, 2012; Ransohoff y Perry, 2009). Aunque algunos estudios han señalado que en circunstancias patológicas macrófagos de procedencia sanguínea, indistinguibles de las células microgliales, pueden ser reclutados hasta el parénquima nervioso alterado (Ladeby et al., 2005; Saijo y Glass, 2011), otras investigaciones han defendido que las células circulantes de la sangre no contribuyen al incremento de células microgliales observado en patologías que no implican una rotura de la barrera hematoencefálica (Ajami et al., 2007; Davoust et al., 2008). Estos resultados rechazan el posible origen monocítico de la microglía y apoyan que monocitos y microglía son tipos celulares diferentes con distintos orígenes y funciones diferenciadas (Jung y Schwartz, 2012; Mildner et al., 2011; Soulet y Rivest, 2008).

### **Tipos de microglía y activación microglial**

Las células microgliales presentan al menos tres estados de diferenciación diferentes, con propiedades morfofuncionales específicas (Harry y Kraft, 2012; Marín-Teva et al., 2011; Rezaie et al., 2005), que reciben los nombres de microglía ameboide, microglía ramificada y microglía activada.

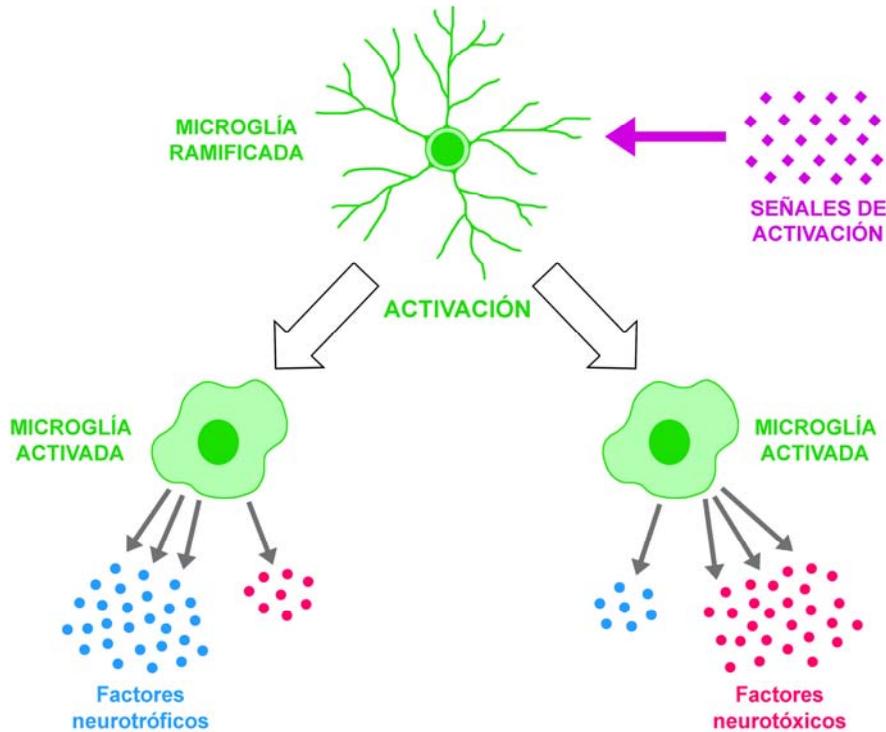
Las células microgliales ameboides son células inmaduras que están presentes durante el desarrollo del SNC y muestran una morfología irregular, con

pseudópodos pero sin prolongaciones o con escasas prolongaciones cortas y gruesas. Estas células ameboides migran activamente para colonizar todas las diferentes regiones del SNC en desarrollo. La microglía ameboide fagocita restos de células que mueren durante el desarrollo normal del SNC (Schlegelmilch et al., 2011), participa en el establecimiento de la red de vasos sanguíneos (Rymo et al., 2011) y también tiene un papel relevante en el crecimiento de axones y en la remodelación sináptica (Paolicelli et al., 2011). Además, la microglía ameboide tiene capacidad de reaccionar frente a lesiones del parénquima nervioso (Sánchez-López et al., 2005).

Las células microgliales ramificadas proceden de las ameboides que sufren un proceso de diferenciación y transforman su morfología, adquiriendo un aspecto ramificado. Por lo tanto, la microglía ramificada corresponde al estado diferenciado de la microglía y está presente en el SNC adulto en condiciones normales (Hanisch y Kettenmann, 2007; Ransohoff y Perry, 2009). Las células microgliales ramificadas han sido tradicionalmente consideradas como células en reposo, por lo que también se han denominado microglía “quiescente”. Sin embargo, actualmente se sabe que las prolongaciones de dichas células escanean activa y continuamente el parénquima nervioso (Davalos et al., 2005; Nimmerjhan et al., 2005) para detectar posibles alteraciones del mismo, incluidos pequeños daños no detectables externamente que pueden cursar de forma subclínica (Hanisch y Kettenmann, 2007). Cuando detectan alguna alteración de la fisiología normal del SNC, las células microgliales ramificadas responden adecuadamente y se activan para favorecer la restauración de la normalidad (Kreutzberg, 1996). Pero la microglía ramificada del cerebro sano no es solamente una reserva de células para hacer frente a posibles situaciones de daño, sino que también participa en actividades necesarias para el mantenimiento de la fisiología normal del tejido nervioso (Tremblay et al., 2011; Kettenmann et al., 2013), tales como remodelación de circuitos nerviosos (Tremblay, 2011; Wake et al., 2009) y plasticidad neuronal (Sierra et al., 2010).

La microglía activada procede de células microgliales ramificadas que sufren transformaciones en respuesta a daños de naturaleza traumática, infecciosa, degenerativa o química, que pueden afectar al SNC (Kettenmann et al., 2011; Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999). Tras la aparición de estos daños, la microglía ramificada retrae sus prolongaciones, llegando a mostrar una apariencia semejante a la de la microglía ameboide del cerebro en desarrollo, y migran activamente a las zonas afectadas donde proliferan activamente. Además, la dotación inmunofenotípica de la microglía se modifica cuando se activa. Así, algunas moléculas de superficie, tales como MHC-II, que no se detectaban en la microglía ramificada, son expresadas en la microglía activada, mientras que otras moléculas, como CD11b, Iba-1 o CD45, que ya estaban presentes en la microglía ramificada, incrementan su expresión en la microglía activada (Kettenmann et al., 2011). La activación también supone un incremento de la capacidad fagocítica y proliferativa de la microglía, así como la secreción de un amplio rango de factores moleculares, como citoquinas pro- y anti-inflamatorias, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), neurotrofinas y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Garden y Möller, 2006).

Las células microgliales, que chequean continuamente el SNC, detectan las alteraciones de la homeostasis del mismo. Los sistemas de detección incluyen diversos tipos de receptores presentes en la membrana microglial, tales como receptores purinérgicos y receptores tipo Toll (TLR). La recepción de señales de daño hace que las células ramificadas adopten rápidamente el fenotipo de microglía activada para enfrentarse a la alteración. La activación microglial no es un proceso “todo o nada” (Kettenmann et al., 2011; Raivich et al., 1999), sino que hay diversos grados y modalidades de activación en función del tipo de lesión al que están reaccionando, de las señales producidas por el entorno y de circunstancias específicas como la edad, la densidad microglial o el estado previo de activación (Olah et al., 2011).



**Fig. 8.** Esquema de la activación microglial inducida por señales que actúan sobre la microglía ramificada haciendo que se transforme en microglía activada. La activación microglial no presenta siempre las mismas características, ya que hay variabilidad de la cantidad relativa de factores neurotóxicos y neurotróficos producidos por las células microgliales activadas. Modificado a partir de Marín-Teva et al. (2011).

Las diversas formas de activación microglial están en relación con la respuesta que producen. En muchas ocasiones esta respuesta es fundamentalmente de tipo neurotóxico e induce la muerte de neuronas. Por el contrario, otras veces la respuesta microglial es de tipo neuroprotector, ya que incrementa la supervivencia de células nerviosas en riesgo de muerte (Fig. 8; Hanisch y Kettenmann, 2007; Marín-Teva et al. 2011). Por analogía con los macrófagos periféricos, se habla de microglía con activación clásica (o M1) y microglía con activación alternativa (las diversas formas de activación M2) (Boche et al., 2013; Dirscherl et al., 2010; Saijo y Glass, 2011). La microglía con activación M1, que es inducida por agentes como el LPS o el interferón- $\gamma$ , es fundamentalmente neurotóxica, ya que produce

altos niveles de metabolitos oxidativos (ROS, NO) y citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) que promueven la muerte de células adyacentes (Block et al., 2007; Boche et al., 2013). Por el contrario, en la activación M2, inducida por citoquinas como IL-4, la microglía promueve la remodelación del tejido y suprime las reacciones neurotóxicas que ocurren en la activación M1. Para conseguir este efecto, la microglía activada incrementa la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, tales como IL-4, IL-10 e IL-13, y TGF- $\beta$  (Boche et al., 2013; Cameron y Landreth, 2010; Kettenmann et al., 2011). Por lo tanto, las células microgliales pueden tener efectos contrapuestos según el tipo de activación. Es lógico pensar que la activaciones M1 y M2 no son mecanismos totalmente antagónicos, sino mecanismos que se integran para atenuar los efectos del daño (Marín-Teva et al., 2011).

Estudios moleculares han mostrado que el enzima poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) participa en la activación microglial. Este enzima es una proteína nuclear relacionada con la señalización celular que tiene lugar tras la aparición de daños en el ADN (Amé et al., 2004). Además, es un coactivador de ciertos factores de transcripción, entre ellos NF- $\kappa$ B (Hassa y Hottiger, 1999; Oliver et al., 1999) y también ha sido implicada en la inducción de la muerte celular independiente de caspasas (Yu et al., 2002). Con respecto a la microglía, la inhibición o ausencia de PARP-1 disminuye sustancialmente la activación en respuesta al tratamiento con TNF $\alpha$  y los efectos neurotóxicos que se producen como resultado de esta activación (Kauppinen y Swanson, 2005). PARP-1 regula la respuesta inflamatoria debido a su interacción con NF- $\kappa$ B, uno de los principales factores que regulan la activación de las células microgliales y los macrófagos (Kauppinen et al., 2011). Otros estudios han revelado que PARP-1 interviene en el control de la migración microglial mediante la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B, que a su vez regula la expresión de la integrina CD11a (Ullrich et al., 2001).

## **La microglía de la retina**

La microglía también está presente en la retina, que es colonizada por microglía ameboide durante etapas tempranas del desarrollo. El proceso de colonización de la retina por células microgliales ha sido bien caracterizado en las aves. Así, la retina de codorniz es colonizada por precursores que penetran desde la cabeza del nervio óptico a partir del séptimo día de incubación y migran en las capas más vitreales (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995). En la retina de las aves hay una primera fase de migración microglial, que es paralela al borde vitreal de las células microgliales, y se conoce como migración tangencial. En etapas posteriores del desarrollo, algunas células microgliales cambian la orientación de su migración, dirigiéndose desde las capas vitreales hacia otras más esclerales. Este tipo de movimiento se denomina migración radial (Navascués et al., 1995). En otras regiones del SNC, como el techo óptico y el cerebelo, las células microgliales se comportan de forma similar, con una primera migración paralela a la superficie pial de la estructura seguida de una migración perpendicular a esta superficie (Cuadros et al., 1994, 1997; Cuadros y Navascués, 1998). La dinámica del movimiento de las células microgliales que migran tangencialmente ha podido ser estudiada en cultivos organotípicos de retina embrionaria (Carrasco, 2012), confirmando observaciones anteriores en las que se había puesto de manifiesto que la microglía ameboide migra tangencialmente sobre carriles delimitados por los pies terminales y las prolongaciones radiales de las células de Müller (Marín-Teva et al., 1998). Las células microgliales que migran radialmente parecen utilizar las prolongaciones radiales de las células de Müller como sustrato (Sánchez-López et al., 2004), de forma semejante a como lo hacen muchas células microgliales de otras regiones del SNC que migran asociadas a elementos de la glía radial (Rezaie y Male, 1999; Rigato et al., 2011). Observaciones realizadas en el cerebro en desarrollo (Andjelkovic et al., 1998; Monier et al., 2007) y en retinas fotodegeneradas por la acción de luz intensa (Santos, 2008) sugieren que las células microgliales también pueden migrar sobre la pared de los vasos sanguíneos.

La distribución de la microglía en la retina ha sido descrita en diversos grupos de vertebrados (Chen et al., 2002; Cuadros et al., 2006; Goodbrand y Gaze, 1991; Gupta et al., 2003; Navascués et al., 1994; Salvador-Silva et al., 2000; Santos et al., 2008; Won et al., 2000; Zhang et al., 2005). En la retina adulta, las células microgliales se distribuyen fundamentalmente en las capas plexiformes y en la CFN, estando ausente de las capas nucleares. Este patrón de distribución microglial se alcanza en la retina del ratón al comienzo de la segunda semana de desarrollo postnatal (Santos et al., 2008). Es interesante destacar que la CNE de la retina del ratón adulto, en la que se sitúan los núcleos de los fotorreceptores, está desprovista de microglía, aunque algunas prolongaciones de células microgliales localizadas en la CPE pueden introducirse entre los somas de los fotorreceptores (Santos et al., 2008). Un trabajo reciente ha descrito la presencia de células microgliales en la CNE de la retina de ratones Swiss/ICR (Bejarano-Escobar et al., 2011). Sin embargo, la ausencia de microglía en la CNE también ha sido descrita en las retinas de codorniz (Navascués et al., 1994), rata (Zhang y Tso, 2003), conejo (Schnitzer, 1989) y humana (Gupta et al., 2003). En algunas etapas del desarrollo de la retina, se observan células microgliales en la CNI, pero su localización en esta capa es transitoria, ya que la atraviesan durante su migración radial desde la CPI hasta la CPE (Navascués et al., 1995; Santos et al., 2008). Por el contrario, la CNE está desprovista de microglía no solo en la retina adulta sino también durante las diferentes etapas del desarrollo.

La microglía retiniana, lo mismo que la del resto del SNC, cambia su morfología y su distribución frente a situaciones patológicas (Gupta et al., 2003; Karlstetter et al., 2010; Roque et al., 1996; Santos et al., 2010; Zhang et al., 2005). En concreto, en retinas sometidas a fotodegeneración, que afecta fundamentalmente a los fotorreceptores, la CNE, normalmente desprovista de células microgliales, es colonizada por este tipo de células que aparentemente migran desde capas más vitreales (Santos et al., 2010). La CNE de la retina fotodegenerada también puede ser invadida por macrófagos procedentes de precursores originados en la médula ósea, que se añaden a las células microgliales

residentes, contribuyendo a la eliminación de restos celulares producidos por la degeneración de fotorreceptores (Joly et al., 2009).

La reducción de la activación de la microglía retiniana es beneficiosa en algunos casos (Ebert et al., 2009; Roh et al., 2012; Shen et al., 2011), mientras que en otros tiene el efecto contrario, ya sea de forma directa o a través de interacciones con las células de Müller (Bruban et al., 2011; Harada et al., 2002; Wang et al., 2011).

## **MUERTE CELULAR**

Muchas de las células que componen un organismo pluricelular degeneran de forma fisiológica a lo largo de su vida. Estos fenómenos de muerte celular fisiológica son necesarios para el correcto desarrollo y mantenimiento del individuo, siendo especialmente frecuentes durante el desarrollo. En general, la estrategia observada durante el desarrollo implica la generación inicial de un número excesivo de células, una proporción de las cuales es eliminada con posterioridad. Esta estrategia interviene en diferentes mecanismos de desarrollo, como formación de las extremidades, apertura de orificios, maduración de la innervación o selección de linfocitos.

En el adulto se siguen produciendo procesos de muerte celular fisiológica que contribuyen a la renovación de las células de diferentes tejidos, debiendo existir un equilibrio entre las nuevas células que se producen mediante proliferación y las células que son eliminadas mediante muerte celular. Cuando se altera este equilibrio se originan patologías como cáncer o enfermedades degenerativas, que comprometen la vida del organismo. Además, los mecanismos de muerte celular pueden actuar selectivamente sobre células consideradas perjudiciales, como células tumorales o infectadas. En los individuos adultos también tienen lugar procesos de muerte de células con diversos tipos de daños, como consecuencia de una patología.

La muerte de células eucariotas se puede clasificar en dos tipos generales: muerte celular fisiológica (o programada), que ocurre bajo el control y regulación

de mecanismos celulares y tisulares; y muerte celular accidental (o patológica), que se produce por causas que escapan del control celular, como un proceso infeccioso o una lesión traumática. La opinión tradicional es que la muerte celular fisiológica tiene lugar mediante un mecanismo de apoptosis, mientras que la muerte accidental transcurre mediante un mecanismo de necrosis (Galluzzi et al., 2012). Los procesos de necrosis se han relacionado con daños en los que se desregula la función celular de forma pasiva, sin consumo del ATP celular. En la necrosis celular, primeramente se produce un hinchamiento del citoplasma y sus orgánulos, en ausencia de condensación de la cromatina nuclear. Finalmente, tiene lugar la rotura de las membranas, entre ellas la membrana plasmática, y el contenido celular acaba vertiéndose al exterior. La aparición de moléculas intracelulares en el espacio extracelular es tóxica para las células vecinas, que también degeneran, a la vez que se desencadena un proceso de reclutamiento de células inflamatorias a la zona afectada. Por lo tanto, la necrosis celular produce una reacción inflamatoria y deja una cicatriz fibrosa que deforma el tejido afectado (Leist y Nicotera, 1997).

Por el contrario, en la apoptosis las células se autodestruyen de forma controlada en un proceso que requiere ATP. Las células afectadas por apoptosis disminuyen su volumen, con condensación del citoplasma y de la cromatina nuclear, que se dispone en agregados intensamente picnóticos. Finalmente, tanto el núcleo como el citoplasma se fragmentan en cuerpos apoptóticos, que pueden contener o no porciones del núcleo. Durante todo este proceso no se rompe la integridad de la membrana plasmática, por lo que el material intracelular no queda expuesto al exterior, evitando así la aparición de una respuesta inflamatoria. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados de forma eficiente por células vecinas o por macrófagos.

En la mayoría de los procesos de apoptosis interviene un tipo de proteasas denominadas caspasas, aunque también se han descrito fenómenos de muerte celular independientes de caspasas (Galluzzi et al., 2012). Actualmente se conocen más de 12 tipos de caspasas en humanos. Las caspasas que participan en

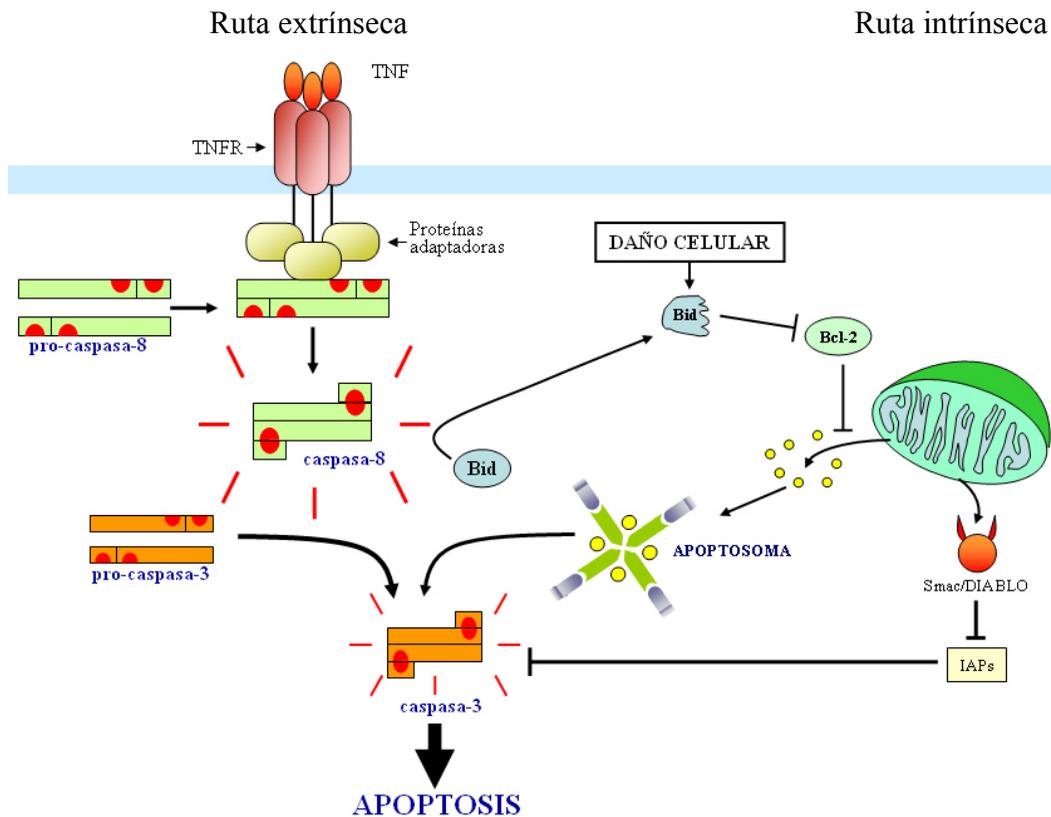
el mecanismo de la muerte celular se clasifican en dos grandes grupos: las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9, 10), que son activadas por el estímulo que desencadena la muerte, y las caspasas efectoras (caspasas 3, 6, 7), responsables directas de la muerte de la célula. Las caspasas actúan sobre un amplio abanico de sustratos moleculares, entre los que hay proteínas del citoesqueleto, proteínas nucleares, proteínas reguladoras, e incluso las propias caspasas (Earnshaw et al., 1999). Estas proteasas pueden encontrarse en forma inactiva o pro-caspasas, las cuales se activan mediante proteólisis parcial llevada a cabo por: a) fenómenos autocatalíticos desencadenados por la asociación de las pro-caspasas con determinados componentes de la cascada de muerte, de forma que la pro-caspasa actúa sobre ella misma; b) actuación de otras caspasas; y c) actuación de proteasas no caspasas. La activación de unas caspasas induce una activación secuencial en cascada de nuevas caspasas que amplifica la señal inicial de muerte, acelerando el proceso de apoptosis, que en algunos casos puede durar menos de una hora.

Se distinguen dos rutas principales de apoptosis: la ruta extrínseca, dependiente de receptores de membrana, y la ruta intrínseca, en la que la mitocondria juega un papel central (Fig. 9).

La vía extrínseca está mediada por receptores de membrana como el receptor de TNF $\alpha$  o el receptor Fas. La unión a estos receptores del respectivo ligando hace que su porción citoplasmática reclute proteínas adaptadoras que constituyen el complejo inductor de señales de muerte, que induce la activación de la caspasa 8. A su vez, la caspasa 8 activada produce la activación de caspasas efectoras, fundamentalmente de la caspasa 3.

La vía intrínseca se desencadena por factores como hipoxia, alta o baja temperatura, radiaciones, presencia de radicales libres o ausencia de factores de crecimiento que inducen daños celulares. Estos factores provocan cambios en la permeabilidad de las membranas mitocondriales, en los que participan proteínas como Bcl-2 (antiapoptótica) y Bid (proapoptótica). Si las señales proapoptóticas no son contrarrestadas por las antiapoptóticas se produce la liberación al citoplasma de proteínas que normalmente están secuestradas en la mitocondria

(Saelens et al., 2004). Entre las proteínas liberadas se encuentra el citocromo c, que en el citoplasma se asocia con la pro-caspasa 9 y Apaf-1 para dar lugar al apoptosoma, estructura que produce la activación de la caspasa 9, que a su vez activa la caspasa 3. También se liberan de la mitocondria otras proteínas, como Smac/Diablo, que inhiben determinadas proteínas citoplasmáticas capaces de bloquear la acción de la caspasa 3 (proteínas inhibidoras de la apoptosis, IAPs).



**Fig. 9.** Representación esquemática de las dos principales rutas de apoptosis: la extrínseca (a la izquierda), representada por la activación de TNFR mediante unión a su ligando TNF, y la intrínseca (a la derecha), desencadenada por daños celulares como los descritos en el texto. Algunas proteínas que regulan la permeabilidad mitocondrial (como Bid) pueden adoptar su forma activa por la acción de la caspasa 8, constituyendo una conexión entre las dos rutas. Imagen cedida por el Prof. F. Abadía-Molina (Departamento de Biología Celular, Universidad de Granada).

La alteración de la permeabilidad mitocondrial también permite que se liberen al citoplasma otras proteínas como el factor inductor de la apoptosis (AIF), la endonucleasa G (EndoG) y la DNasa activada por caspasas (CAD), que posteriormente se traslocan al núcleo para desencadenar la fragmentación de la cromatina. Mientras que la acción de AIF y EndoG parece ser independiente de caspasas, la activación de CAD precisa de la actuación de caspasa 3. En ciertos modelos experimentales, se ha demostrado que la traslocación nuclear de AIF que induce cromatinolisis es dependiente de la actividad de PARP-1 (Wang et al., 2009).

A pesar de que inicialmente se suponía que apoptosis y necrosis eran procesos totalmente diferentes, las observaciones que se indican seguidamente contradicen esta idea. En primer lugar, se han caracterizado procesos de muerte celular con características morfológicas intermedias entre apoptosis y necrosis, lo que ha llevado a proponer que apoptosis y necrosis son los extremos de una gama de procesos de muerte con numerosas variantes, en vez de tratarse de dos mecanismos independientes, (McManus y Buchan, 2000; Raffray y Cohen, 1997). Además, ambos tipos de muerte pueden producirse por estímulos semejantes, aunque de diferente intensidad. Por ejemplo, en la región más afectada por un episodio de isquemia cerebral (“core”), las células muestran signos de necrosis, mientras que muchas de las células que degeneran en regiones menos afectadas (“penumbra”) parecen sufrir apoptosis. Esta observación sugiere que un elevado grado de isquemia, como el que tiene lugar en las regiones centrales, desencadena procesos de necrosis, mientras que un menor grado de isquemia permite que haya células que degeneren de forma controlada por apoptosis (Banasiak et al., 2000). También se ha comprobado que los fenómenos de necrosis no ocurren únicamente en condiciones patológicas, sino que en ocasiones se producen en un contexto fisiológico, por lo que se habla de necrosis regulada (Galluzzi et al., 2012). Por otra parte, en una misma célula puede aparecer al mismo tiempo marcadores de muerte necróticos y apoptóticos, lo que sugiere la activación simultánea de más de un programa de muerte celular (Galluzzi et al., 2012).

Basándose en los rasgos bioquímicos del mecanismo de muerte, se han descrito diferentes formas de muerte celular con características que no corresponden totalmente a la necrosis ni a la apoptosis (Galluzzi et al., 2012). Los distintos tipos de muerte pueden compartir algunos elementos de sus rutas de señalización, por lo que no siempre es sencillo establecer fronteras entre ellos. En cualquier caso, la apoptosis es considerada el mecanismo más frecuente de muerte celular programada.

### **Muerte celular durante el desarrollo de la retina**

La muerte celular fisiológica desempeña un papel importante en el desarrollo del SNC, determinando tanto el número de neuronas como las interconexiones entre ellas. De hecho, se estima que durante el desarrollo del SNC se eliminan hasta el 50 % de las células iniciales (Barde, 1989; Hamburger, 1980; Levi-Montalcini, 1987; Oppenheim, 1989).

Lo mismo que en otras regiones del SNC, durante el desarrollo de la retina se producen abundante muerte celular. Se han caracterizado diversas oleadas de muerte celular que intervienen en el proceso de formación de la vesícula óptica y en su diferenciación histogénica (Vecino et al., 2004). En concreto, se ha identificado una fase temprana de muerte celular, aparentemente relacionada con procesos morfogénicos, de neurogénesis e histogénesis del esbozo del ojo (Cuadros y Ríos, 1988; Frade et al., 1997; Martín-Partido et al., 1988). Con posterioridad, otra fase de muerte coincide con el establecimiento de conexiones sinápticas entre la retina y los centros ópticos del cerebro (Frade et al., 1999; Vecino et al., 2004). En la retina de ratón, esta fase tardía de muerte celular tiene lugar durante el desarrollo postnatal (Péquignot et al., 2003; Young, 1984).

Las células de la retina pasan por periodos de distinta sensibilidad a factores que desencadenan muerte celular, debido a que se modifica la expresión de algunas proteínas (como Bcl-2 o AIF) que participan en los procesos de muerte (Donovan et al., 2006; Linden et al., 1999). De hecho, las células de la retina adulta son más resistentes a la muerte celular que las células postnatales, como se

puede comprobar en células ganglionares a las que se ha seccionado el axón (McKernan et al., 2006). La muerte celular en las retinas adultas parece producirse mediante rutas diferentes de las que ocurren durante el desarrollo (Donovan et al., 2006; Sancho-Pelluz et al., 2008). En este sentido, se ha descrito la participación de AIF y PARP en retinas rd1 (Paquet-Durand et al., 2007; Sahaboglu et al., 2010), aunque se desconoce la participación de estas moléculas durante el desarrollo.



# Objetivos

---



La muerte celular programada juega un importante papel durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón, estando especialmente incrementada durante la primera semana postnatal y disminuyendo notablemente durante la segunda semana. Actualmente se conoce que el mecanismo de la muerte celular observada durante el desarrollo de la retina no es homogéneo, habiéndose descrito dos tipos generales de muerte, uno dependiente de caspasas, que es mayoritario, y otro independiente de las mismas, que tiene lugar en una pequeña proporción de células de la retina. El enzima poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) juega un papel clave en la muerte celular independiente de caspasas que tiene lugar en alteraciones patológicas de la retina, pero no se sabe si también participa en este tipo de muerte durante el desarrollo normal de la retina. En la presente Tesis nos propusimos estudiar si PARP-1 se expresa durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón. Después de demostrar que sí lo hace, también quisimos analizar cuál puede ser su papel en la muerte celular.

Por otra parte, es bien conocido que existe una estrecha relación topográfica entre muerte celular y células microgliales, tanto durante el desarrollo de la retina como en alteraciones neurodegenerativas de la misma. El significado funcional de esta relación no está aclarado. Es evidente que la microglía interviene en la fagocitosis de los restos de células que mueren en la retina, pero hay estudios que apoyan una participación activa de las células microgliales en la inducción de la muerte celular, mientras que otros defienden un papel neuroprotector de las mismas. La mayor parte de estos estudios han basado sus resultados en la observación de células que muestran signos de muerte detectables al microscopio en secciones histológicas de retina. Sin embargo, la medida de la viabilidad celular mediante citometría de flujo es una aproximación metodológica más rápida y eficiente, ya que permite el análisis de un elevado número de células. Se sabe que el estado funcional de la microglía durante el desarrollo de la retina (microglía ameboide relativamente activada) es diferente al mostrado en la retina adulta (microglía ramificada no activada). Por lo tanto, sería interesante relacionar

la viabilidad celular con el diferente estado funcional de la microglía en retinas de diferentes edades.

La naturaleza de la relación entre muerte celular y microglía es difícil de investigar en la retina *in situ*, pero es más fácil de abordar en explantes de retina cultivados *in vitro*, que pueden ser sometidos a diferentes tratamientos experimentales que modifican el estado funcional de la microglía. No obstante, antes de cualquier tipo de experimentación sería necesario conocer cómo se modifica el comportamiento de la microglía tras las alteraciones microambientales inherentes al cultivo *in vitro* de la retina. También sería interesante saber cómo influye la edad de la retina de la que procede el explante cultivado en el comportamiento de la microglía y en la viabilidad celular. Por lo tanto, nos propusimos analizar las posibles modificaciones de la viabilidad celular y del estado funcional de la microglía en cultivos organotípicos de explantes de retinas de 3 días (primera semana de desarrollo postnatal), 10 días (segunda semana postnatal) y adultas.

Una vez conocidas las características morfofuncionales de las células microgliales y la viabilidad celular en los explantes de retina postnatal cultivados *in vitro*, nos planteamos someter a éstos a diferentes tratamientos experimentales para alterar el estado funcional de la microglía y comprobar cómo afectaba esta alteración a la viabilidad celular. Estudios anteriores han demostrado que el antibiótico minociclina inhibe la activación microglial, mientras que el lipopolisacárido (LPS) aislado de la pared bacteriana la potencia. Por lo tanto, decidimos someter los explantes de retina cultivados *in vitro* a la acción de minociclina o LPS y comprobar los efectos del tratamiento sobre la viabilidad celular de los explantes. También quisimos comprobar cómo se alteraba dicha viabilidad tras la eliminación de la microglía mediante tratamiento con liposomas cargados de clodronato, que son una herramienta experimental frecuentemente utilizada para la destrucción selectiva de células fagocíticas como la microglía.

Por lo tanto, en la presente Tesis se han planteado tres objetivos concretos, que se exponen seguidamente.

**Primero.** Analizar la expresión de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina, determinar su posible relación con la muerte celular independiente de caspasas y establecer su posible papel en la misma. En este primer objetivo se pretende comprobar la hipótesis de que PARP-1 juega un papel importante en la muerte celular durante el desarrollo normal de la retina de ratón.

**Segundo.** Estudiar la viabilidad celular en cultivos organotípicos de explantes de retina de ratones de diferentes edades (postnatales de 3 y 10 días de edad y adultos) y el comportamiento morfofuncional de las células microgliales en dichos explantes. La hipótesis que se pretende comprobar es que la edad de la retina afecta a la viabilidad celular y a los cambios del estado funcional de la microglía cuando explantes de la misma son cultivados *in vitro*.

**Tercero.** Determinar el efecto que ejerce la microglía presente en explantes de retina postnatal de ratón cultivados *in vitro* sobre la viabilidad de las células de dichos explantes. La hipótesis de partida es que el cambio en el estado funcional de la microglía tiene un efecto sobre la supervivencia de las células del explante de retina. Esta hipótesis se pretende comprobar analizando los cambios en la viabilidad celular tras la alteración experimental del estado de activación de la microglía.

Los estudios correspondientes a estos tres objetivos son expuestos en capítulos diferentes, cada uno de los cuales tiene una estructura similar a la de los trabajos publicados en revistas científicas, incluyendo un resumen inicial seguido de los apartados de introducción, materiales y métodos, resultados y discusión. Algunas técnicas y procedimientos pueden repetirse en los materiales y métodos de distintos capítulos, aunque se ha procurado evitar la reiteración en la descripción de cada técnica, haciendo referencia al capítulo donde se describe en su totalidad. Las referencias de todos los capítulos se agrupan en un único apartado final.



# Capítulo I

---

**Muerte celular y expresión de poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón**



## RESUMEN

La poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) es un enzima nuclear que transfiere unidades de ADP-ribosa (polímero PAR) a diferentes proteínas nucleares y ha sido implicada en la muerte celular independiente de caspasas que tiene lugar en diferentes modelos de degeneración retiniana. En el presente capítulo se ha investigado la implicación de PARP-1 en la muerte celular que ocurre durante el desarrollo postnatal normal de la retina de ratón. También se ha analizado la expresión del factor inductor de apoptosis (AIF), un mediador de muerte celular independiente de caspasas, ya que estudios anteriores han relacionado la activación de PARP-1 con la traslocación de una forma de AIF de 57 kDa desde las mitocondrias al núcleo.

La muerte celular era puesta de manifiesto en retinas de ratones postnatales mediante ELISA y TUNEL, mientras que PARP-1, PAR y AIF se analizaban mediante inmunocitoquímica e inmunoblotting. La cuantificación de los niveles de ARNm de PARP-1 en las distintas etapas del desarrollo postnatal de la retina era llevada a cabo mediante PCR a tiempo real.

Nuestros resultados han demostrado un incremento en la expresión de PARP-1 y en la formación de polímero PAR, indicativo de actividad PARP-1, durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina, coincidiendo con un aumento de la cantidad de células muertas, algunas de las cuales no estaban asociadas a caspasa-3 activa. Tanto la expresión de PARP-1 como su actividad disminuían progresivamente durante la segunda semana postnatal, coincidiendo con una acusada reducción de la muerte celular. Por otra parte, la forma truncada de AIF (de 57kDa) estaba presente en la retina durante la primera semana postnatal y disminuía progresivamente durante la segunda semana postnatal. En secciones inmunoteñidas se comprobaba que algunas células de la retina en proceso de muerte mostraban una localización nuclear de AIF, así como una fuerte tinción nuclear del polímero PAR, sugiriendo que la muerte de estas células depende de la actividad de PARP-1 y de la translocación de AIF.

Estos resultados demuestran la existencia de un mecanismo de muerte celular independiente de caspasas durante el desarrollo normal de la retina de ratón y sugieren que PARP-1 está implicada en esta forma de muerte celular, teniendo una participación en la traslocación de AIF hasta el núcleo celular.

## INTRODUCCIÓN

Como sucede en otras regiones (Kroemer y Martin, 2005), la muerte celular en la retina puede llevarse a cabo mediante un mecanismo independiente de caspasas (Carmody y Cotter, 2000; Donovan et al., 2001; Donovan y Cotter, 2002; Donovan et al., 2006; Doonan et al., 2003; Guimaraes et al., 2003). Este tipo de muerte celular independiente de caspasas puede estar mediado por el factor inductor de apoptosis (AIF), cuyo precursor de 67 kDa es sintetizado en el citoplasma celular y seguidamente, tras la pérdida de la señal de localización mitocondrial situada en su extremo aminoterminal, adquiere su forma madura de 62 kDa y se inserta en la membrana mitocondrial interna. En ciertas condiciones, por ejemplo en situaciones de estrés oxidativo o de daños en el ADN, la proteína madura es parcialmente proteolizada en su extremo aminoterminal y liberada de su unión a la membrana mitocondrial interna, dando lugar a la forma truncada de 57 kDa que migra desde la mitocondria al núcleo. Una vez en el núcleo, la forma truncada de AIF participa en el proceso de muerte celular independiente de caspasas (Otera et al., 2005; Wang et al., 2004).

Poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1) es un enzima nuclear clave para el mantenimiento de la integridad genómica, el control del ciclo celular y la expresión génica (Menissier de Murcia et al., 2003). PARP-1 modula la actividad de gran cantidad de proteínas nucleares mediante la transferencia de unidades de ADP-ribosa (polímeros PAR) (Amé et al., 2004). Entre las proteínas aceptoras de polímeros PAR se incluyen la propia PARP-1, proteínas ligadas a ADN y proteínas reparadoras de ADN (Adamietz, 1987; Ruscetti et al., 1998; Simbulan-Rosenthal et al., 1998). Además, la formación del polímero PAR por parte de PARP-1 activa es esencial para la translocación de AIF al núcleo (Andrabi et al., 2006; Moubarak et al., 2007; Vosler et al., 2009; Wang et al., 2004, 2009; Yu et al., 2006).

PARP-1 juega un papel trascendental en múltiples enfermedades y alteraciones neurodegenerativas en el sistema nervioso central (Kauppinen y Swanson, 2007; Wang et al., 2009) y en la retina (Li y Osborne, 2008; Osborne et

al., 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que la muerte de fotorreceptores que tiene lugar en la degeneración hereditaria de la retina de ratones rd1 depende de un aumento de la actividad de PARP-1 y de una mayor traslocación de AIF (Paquet-Durand et al., 2007).

La participación de la proteína PARP-1 en los fenómenos de muerte celular ha sido descrita mayoritariamente en situaciones patológicas, pero su posible papel en la muerte celular programada que tiene lugar durante el desarrollo normal de la retina no se ha investigado hasta el presente. En el presente capítulo, que ha sido publicado previamente como artículo (Martín-Oliva et al., 2011), se demuestra que la proteína PARP-1 incrementa su actividad y expresión durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina de ratón, coincidiendo con un incremento de la forma truncada de AIF y un aumento de la muerte celular. Posteriormente, durante la segunda semana de desarrollo postnatal, cuando la muerte celular es menos frecuente, disminuye la expresión de PARP-1 y de la forma truncada de AIF. Por lo tanto, existe una clara correlación entre muerte celular, activación de PARP-1 y traslocación de AIF, sugiriendo que PARP-1 podría jugar un papel en la translocación de AIF que participa en la muerte celular independiente de caspasas durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se han utilizado ratones (*Mus musculus*) de las cepas C57BL/6 y BALB/c suministrados por el Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada. La mayoría de los experimentos se realizaron con la cepa C57BL/6. Las retinas utilizadas en el estudio procedían de embriones de 18 días (E18), de animales postnatales de 0, 3, 7, 14, 21 y 28 días de edad (P0, P3, P7, P14, P21 y P28) y de animales adultos de 60 días de edad (P60). Tanto los embriones como los animales postnatales hasta P14 eran sacrificados por decapitación, mientras que los animales de P21-P60 se sacrificaban mediante dislocación cervical. Todos los animales eran mantenidos con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y acceso *ad libitum* a la comida y al agua.

La manipulación de los animales se realizó siguiendo las instrucciones del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Granada (autorización de 13 de julio de 2005 y referencia CEE 2011-357) y la declaración ARVO para el Uso de Animales en Investigación Oftalmológica y de la Visión.

### Aislamiento de la retina

Tras la muerte del animal, los ojos se enuclearon y se llevaron a placas de petri estériles (Corning, NY, USA) de 35 mm con tampón fosfato salino 1X (PBS) para realizar la disección del globo ocular. La disección se realizó bajo una lupa binocular Nikon SMZ800 (Nikon, Tokyo, Japón), utilizando pinzas Dumont nº 5 (Fine Science Tools, Heidelberg, Alemania, ref. 11252-30) y microtijeras Pascheff-Wolff MC19/B de Moria (Fine Science Tools, ref.15371-92).

Tras la enucleación del ojo, el nervio óptico era seccionado, evitando producir tensiones que pudieran provocar daños en la zona central de la retina. A continuación, se cortaba el límite entre la esclera y la córnea, separando ésta para tener acceso al interior del ojo. Seguidamente, se eliminaban el cristalino, el humor vítreo, la esclera y la porción proximal del nervio óptico, dejando al descubierto la retina que se observaba como una lámina cóncava, de color

blanquecino y textura gelatinosa. Los restos de vasculatura hialoidea, que permanecían adheridos en la parte interna de la retina, eran retirados con las pinzas, completando así el aislamiento de ésta. Aunque la mayor parte del epitelio pigmentario se desprendía junto con la esclera, algunos restos del mismo se mantenían adheridos a la retina después de su aislamiento.

### **Detección de muerte celular mediante ELISA**

Los nucleosomas son componentes de la fibra de cromatina que se encuentran circunscritos al núcleo en las células sanas. La degradación del ADN que tiene lugar en las células que mueren ocasiona la liberación al citoplasma de algunos nucleosomas. Por lo tanto, la cuantificación de nucleosomas en el citoplasma (nucleosomas libres) es indicativa de la muerte celular que ocurre en el tejido. Para medir la presencia de nucleosomas libres, las dos retinas obtenidas de cada animal fueron disgregadas en 1 ml de PBS con inhibidores de proteasas (una tableta de inhibidores [Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, ref. 11836153001] en 10 ml de tampón), con la ayuda de un homogenizador manual tipo Dounce (Pobel, Madrid, España) de ranura estrecha que evita la producción de daños en los núcleos celulares. La suspensión obtenida tras la homogeneización era centrifugada a 13200 rpm durante 10 minutos a 4°C para hacer precipitar los restos celulares. El sobrenadante resultante, que contenía los nucleosomas libres, se conservaba a -20°C hasta su utilización.

Una parte del sobrenadante de cada retina se usaba para cuantificar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que se explica más adelante, mientras que el resto se analizaba mediante ELISA con un kit comercial (Cell Death Detection ELISA, Roche Diagnostics), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit contiene anticuerpos anti histonas y anti-ADN, por lo que detecta los fragmentos de ADN asociados a histonas (mono y oligonucleosomas) presentes en los sobrenadantes. La densidad óptica de cada muestra se medía en un lector de placas (Multiskan Ascent, Thermo Scientific, Madrid, España) con un filtro de

405 nm, siendo referida a la concentración de proteínas de la muestra para obtener un valor relativo de muerte celular. Para cada edad del desarrollo, se realizaban mediciones por triplicado a partir de retinas procedentes de tres animales.

### **Criotomía**

Los ojos eran fijados durante 6 horas a 4°C en PLP (Yamato et al., 1984), cuya composición era la siguiente: paraformaldehído 2% (Panreac, Barcelona, España, ref. 141451) en tampón fosfato (PB) 0,1M; solución 0,055M de L-lisina (Sigma, St. Louis, MO, USA, ref. L5626) en PB 0,1M; y solución 0,01M de metaperyodato sódico (Panreac, ref. 131700) en PB 0,1M. Posteriormente, se lavaban a temperatura ambiente en PBS con Tritón X-100 (Sigma, ref. 9002-93-1) 0,1% (PBS-Tr) y se crioprotegían mediante incubación en una solución de sacarosa 20% en PBS-Tr durante 24 horas a 4°C. A continuación, los ojos se embebían en el medio Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda, ref. 4583) y se congelaban con isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Los ojos se mantenían congelados a -40°C, hasta la obtención de secciones histológicas de 20 µm de espesor en un criostato Leica CM1850 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las secciones histológicas se extendían sobre portaobjetos Superfrost (Menzel-Glasser, Braunschweig, Alemania, ref. J1800AMNZ), se secaban al aire y se almacenaban a -20°C.

### **Inmunocitoquímica**

Las criosecciones de ojos eran tratadas con técnicas inmunocitoquímicas, empleando los anticuerpos referidos en la tabla I-1.

El anticuerpo anti-PARP-1 (clon C2-10) es específico de un epitopo de la proteína PARP-1 localizado en el dominio aminoterminal de unión al DNA y reconoce tanto a la proteína entera como a la forma proteolizada de la misma. El anticuerpo anti-PAR es específico del polímero PAR que es añadido a diferentes proteínas tras la activación del enzima PARP-1. El anticuerpo anti-HMG-1 detecta una proteína nuclear no histónica del grupo de proteínas de alta movilidad

electroforética, que se ha utilizado como marcador de la fracción nuclear en los Western blot. El anticuerpo anti-AIF reconoce un epitopo localizado en el extremo carboxiterminal de la proteína AIF y detecta todos los tamaños de la proteína (57, 62 y 67 kDa). El anticuerpo anti-caspasa-3 activa reconoce la forma activa de dicha caspasa. Por último, el anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina III reconoce el fragmento 441-450 de residuos de aminoácidos de la  $\beta$ -tubulina III.

**Tabla I-1.** Anticuerpos utilizados en las técnicas inmunocitoquímicas (IF) y/o Western blot (WB), con sus respectivas diluciones

<i>Anticuerpo</i>	<i>Procedencia comercial</i>	<i>Referencia</i>	<i>Dilución IF</i>	<i>Dilución WB</i>
Anti-PARP1 (monoclonal)	BD Pharmingen (San Diego, CA)	556362	1:50	1:2000
Anti-PARP1 (policlonal)	Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA)	ALX-210-221	---	1:5000
Anti-PAR (monoclonal)	Alexis Biochemicals (San Diego, CA)	804-220-R100	1:50	1:400
Anti-HMG-1 (HAP46.5) (monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	sc-56698	---	1:1000
Anti-AIF (policlonal)	Sigma	A7549	1:200	1:1000
Anti-caspasa-3 activa (policlonal)	R&D Systems (Minneapolis, MN)	AF835	1:50	---
Anti- $\beta$ -tubulin III (policlonal)	Sigma	T2200	---	1:10000

Las criosecciones adheridas sobre portaobjetos Superfrost se dejaban descongelar durante 15-20 minutos y se hidrataban durante 20-40 minutos en PBS. A continuación, se permeabilizaban durante 5-10 minutos en PBS-Tr, para facilitar la penetración de los anticuerpos. Los sitios antigénicos no específicos se bloqueaban durante 45-60 minutos con suero normal de cabra (Sigma, ref. G9023) diluido al 10% en PBS, al que se añadía 1% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, ref. A9647). Sin hacer lavado posterior al bloqueo, las secciones se

incubaban durante 24-48 horas a 4°C (o 2 horas a temperatura ambiente) en alguno de los anticuerpos primarios mostrados en la tabla I-1, a la dilución indicada en la misma. Posteriormente, se lavaban en PBS y se incubaban en el correspondiente anticuerpo secundario (dilución 1:500 en PBS-BSA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales anti-PARP-1 y anti-PAR eran revelados con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra y conjugado con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, ref A11001), mientras que el anticuerpo policlonal anti-AIF era detectado con anti-IgG de conejo obtenido en cabra y conjugado con Alexa-Fluor-594 (Molecular Probes, ref. A11012). Finalmente, los núcleos celulares se teñían con Hoechst 33342 (bisbenzimidazoles, Sigma, ref. B2261) a una dilución 1:1000, conseguida a partir de una solución madre acuosa de Hoechst (10 mg/ml). En algunas ocasiones, la tinción nuclear se hacía con DAPI (4',6'-diamidina-2-fenilindol, Sigma, ref. D9542). Tras la tinción nuclear, las secciones de retina eran lavadas en PBS y montadas con Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA, ref. 0100-01). Como controles negativos, se utilizaban secciones sometidas a todo el procedimiento inmunocitoquímico, pero omitiendo la incubación en el anticuerpo primario.

En el caso de la detección inmunocitoquímica de la forma activa de la caspasa-3 se utilizaba un procedimiento similar al descrito, pero utilizando secciones de 10  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidas de ojos fijados en formaldehído 10% (Panreac, ref 143091.1214) e incluidos en parafina. Las secciones eran incubadas durante toda la noche con el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa y posteriormente (durante 2 horas, a temperatura ambiente) con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo obtenido en cabra y conjugado con Alexa-Fluor-594 (Molecular Probes, ref. A11012), diluido 1:500 en PBS-BSA.

Se llevó a cabo un estudio cuantitativo sobre criosecciones de 20  $\mu\text{m}$  de espesor, obtenidas de retinas de P7, inmunomarcadas con anti-caspasa-3 activa y teñidas con Hoechst. En este estudio se estimaba la proporción de núcleos picnóticos (detectados con la tinción de Hoechst) positivos y negativos para

caspasa-3 activa. Las secciones contenían tanto el área central como la zona periférica de la retina. Se analizaron 10 secciones procedentes de cuatro animales diferentes en un microscopio Zeiss AxioPhot (Zeiss, Oberkochen, Alemania), utilizando el objetivo de 40X.

### **Histoquímica TUNEL**

La presencia de células muertas en secciones de retina era puesta de manifiesto mediante la técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling, Gavrieli et al., 1992) que marca los extremos 3' de las cadenas de ADN fragmentadas. Esta técnica utiliza una transferasa terminal (TdT) que incorpora nucleótidos marcados (desoxiuridín-trifosfato [dUTP] conjugado con fluoresceína) en dichos extremos. Las criosecciones de retina, de 20 µm de espesor, eran incubadas durante 1 hora a 37°C en una solución que contenía TdT (Promega, Madison, WI, USA, ref. M1875) al 2% en tampón TdT (Promega, ref. M1893, pH 6,8) y 3 nmoles/ml de dUTP-fluoresceína (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, ref. 11373242910). Tras la incubación, las secciones se lavaban con PBS y se teñían con Hoechst 33342 para marcar los núcleos celulares, se lavaban nuevamente en PBS y se montaban con Fluoromount G.

En algunas secciones se hacía un doble marcado con anti-caspasa-3 activa y TUNEL. Primeramente se realizaba la inmunohistoquímica con anti-caspasa-3, siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad y utilizando anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor-594 como anticuerpo secundario. Una vez retirado el anticuerpo secundario, las secciones se lavaban tres veces con PBS y se incubaban en la solución de TdT, continuando con el procedimiento de la técnica TUNEL ya descrito.

### **Microscopía confocal**

Imágenes de microscopía confocal de secciones de retina tratadas con inmunofluorescencia o TUNEL eran obtenidas con un microscopio Leitz DMRB, equipado con el sistema de barrido láser confocal Leica TCS-SP5 (Leica). En cada

campo microscópico seleccionado, se obtenían series de secciones ópticas en el plano horizontal (XY) a intervalos de 0,5-1  $\mu\text{m}$  en el eje vertical Z. A continuación, se utilizaba el software de barrido láser confocal de Leica para obtener imágenes de proyección a partir de la superposición de secciones ópticas, lo que permitía observar las células microgliales contenidas en cada campo y sus ramificaciones. Las imágenes se almacenaron en formato TIFF, ajustándoles el brillo y el contraste con Adobe Photoshop 8.0.1 (Adobe Systems, San José, CA, USA).

### **Extracción y cuantificación de proteínas**

Tras su disección en tampón fosfato con inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics), las retinas eran sometidas al proceso de extracción de proteínas. Para ello, las retinas aisladas se sumergían en tampón de lisis (EDTA 0,1 mM, Tris HCL 50 mM a pH 8,  $\beta$ -mercaptoetanol 12,5 mM, Tritón X-100 0,5%) dentro de tubos Eppendorf estériles de 1,5 ml y se congelaban a  $-80^{\circ}\text{C}$  a la espera de obtener todas las retinas de diferentes edades. Para la detección de la proteína PARP-1 y del polímero PAR, las dos retinas de un mismo animal se colocaban en 25  $\mu\text{l}$  (para E18, P0, P3 y P7) o 50  $\mu\text{l}$  (para P14, P21, P28 y P60) de tampón de lisis. Para la detección de la proteína AIF se sumergían seis retinas de tres animales diferentes en 50  $\mu\text{l}$  (para E18, P0, P3 y P7) o 100  $\mu\text{l}$  (para P14, P21, P28 y P60) de tampón de lisis. Una vez obtenidas todas las retinas de diferentes edades, éstas eran descongeladas y mantenidas sobre hielo durante 45 minutos, con agitación cada 5 minutos en un agitador tipo vórtex. A continuación, las muestras se centrifugaban a 13200 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido, que corresponde a la fracción proteica aislada, se trasladaba a un nuevo tubo Eppendorf estéril. La concentración de proteína presente en los extractos era determinada mediante el método colorimétrico de Bradford. Este método se basa en la unión en medio ácido del colorante Coomassie Blue Brilliant G-250 (Bio-Rad) a las proteínas. En estas condiciones, la unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm.

Por lo tanto, se medía la densidad óptica de cada sobrenadante en un espectrofotómetro (Multiskan Accent, Thermo Scientific) equipado con un filtro de 595 nm. Para las medidas de concentración de proteínas, se obtenía una recta patrón de concentraciones crecientes de BSA, desde 0,2 hasta 2 mg/ml. Se añadía 1  $\mu$ l de extracto proteico a 200  $\mu$ l de solución Bradford 1X (Bio-Rad) para la obtención de la densidad óptica correspondiente a 595 nm. La concentración de proteínas de cada muestra era referida a las concentraciones proporcionadas por la recta patrón. La absorbancia de cada punto de la recta patrón y de cada muestra problema se obtenía por triplicado después de repartir cada muestra en tres pocillos diferentes.

Para la obtención de la fracción de proteínas nucleares, las retinas eran disociadas en frío en 1 ml de PBS con inhibidores de proteasas (una tableta de inhibidores [Roche Diagnostics] en 10 ml de tampón), utilizando un homogeneizador de vidrio tipo Dounce de ranura ancha (Pobel). El disgregado obtenido se pasaba tres veces por una jeringa con aguja de 0,33 mm de diámetro (29G, Becton & Dickinson, New York, USA). La suspensión celular resultante era centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decantaba y el precipitado era resuspendido en 200  $\mu$ l de tampón A (HEPES 10 mM a pH 7,9 [Sigma, ref. H3375], EDTA 1 mM [Sigma, ref. ED2SC], EGTA 1mM [Sigma, ref. E4378], KCl 10 mM [Merck, ref. 529552], DTT 1mM [Sigma, ref. 43815], PMSF 1 mM [Sigma, ref. P7626] e inhibidores de proteasas [Roche Diagnostics]) sobre hielo. A continuación, se utilizó un homogeneizador Dounce de ranura estrecha (Pobel), dando 15 pulsos de homogeneización en hielo, tras los que se recuperaba el homogeneizado y se le añadía detergente Igepal CA-630 (Sigma, ref. I8896) 0,5%. La mezcla era agitada vigorosamente durante 15 segundos, y mantenida sobre hielo durante 10 minutos. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante obtenido correspondía a la fracción citosólica, que se guardaba a -80°C, mientras que el precipitado se resuspendía en 50  $\mu$ l de tampón A con glicerol (Sigma, ref. G2289) 20% y KCl 0,4M. La fracción resuspendida era mezclada en un agitador orbital-vertical

durante 30 minutos en cámara fría y centrifugada a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido correspondía a la fracción nuclear de proteínas (Velasco et al., 1997), cuya concentración se determinaba con el método de Bradford descrito en el párrafo anterior.

### **Western blot**

Una vez cuantificadas las proteínas, se prepararon alícuotas de carga de 25 µg de proteína (para la detección de PARP-1 y del polímero PAR) o de 75 µg (para la detección de AIF). Se añadieron a cada alícuota 5 µl de tampón de carga reductor 6X (Tris-Hcl 0.25 M pH 6.8 [Sigma, ref. T5941], 2-mercaptoetanol 8% [Sigma, ref. M3148], SDS 8% [Sigma, ref. 14390] y azul de bromofenol 0,4% [Sigma, ref. B0126]) y tampón de lisis hasta completar un volumen de 30 µl. Las alícuotas así preparadas se incubaron durante 10 minutos a 95°C en un bloque térmico (AccuBlock, Labnet, Edison, NJ, USA) para desnaturalizar las proteínas.

Las muestras se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras en un gel de poliacrilamida en tampón dodecilsulfato sódico (SDS). Tras el tratamiento descrito, las alícuotas se cargaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%. El gel se sometió a electroforesis en el sistema Mini-Gel de Bio-Rad. Las proteínas separadas de este modo eran transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilo (Inmun-blot PVDF membrane, Bio-Rad, ref. 162-0174) en un equipo de transferencia semiseco (Trans-Blot SD, Bio-Rad). Dicha transferencia se llevaba a cabo durante 50 minutos a 100 mA.

Para la detección de las diferentes proteínas, primeramente se saturaban los sitios inespecíficos mediante tratamiento de las membranas de inmunoblot con una solución de bloqueo (leche en polvo al 5% en PBS-Tween 0,1% [Sigma, ref. P5927]) durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Después del bloqueo, las membranas se incubaban durante toda la noche con el correspondiente anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios usados en experiencias de Western blot, su procedencia y la dilución empleada se indican en

la tabla I-1. El anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina se usaba como referencia para normalizar la carga de proteínas. Una vez realizada la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavaba tres veces (durante 5 minutos cada vez) con abundante PBS-Tween 0,1%, y se incubaba durante 2 horas a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón cuando el anticuerpo primario era monoclonal o anti-IgG de conejo cuando el anticuerpo primario era policlonal). En ambos casos el anticuerpo secundario estaba conjugado con peroxidasa. Posteriormente, la membrana se lavaba otras tres veces (5 minutos cada vez) con PBS-Tween 0,1% y se incubaba con el kit quimioluminiscente “ECL Western blotting Detection System” (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA, ref. RPN2232). La quimioluminiscencia producida en la membrana era puesta de manifiesto tras la exposición en oscuridad de una placa radiográfica (X-ray film, Konica Minolta, ref.0936318) y su posterior revelado con TMAX Professional (Kodak, ref. D-76R.). Las bandas resultantes eran escaneadas y archivadas en formato TIFF.

Se hizo un análisis densitométrico de las bandas del Western blot utilizando el software de análisis de imagen ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>. Los valores de densidad de las diferentes bandas se normalizaron respecto a la densidad de la banda correspondiente a la  $\beta$ -tubulina en cada edad analizada.

### **Extracción, purificación y cuantificación de ARN**

Para la extracción del ARN total, las dos retinas de un mismo animal eran aisladas y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA, ref. 15596-026). Una vez obtenidas las muestras de todas las edades, éstas se descongelaban y disgregaban en un homogeneizador tipo Dounce de émbolo esmerilado (Afora, Sevilla, España) de ranura estrecha. El disgregado obtenido se trasladaba a un tubo Eppendorf libre de RNasas, añadiéndole 0,2 ml de cloroformo (Merck, ref. 102445). Seguidamente, se agitaba durante 15 segundos, se dejaba reposar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y se centrifugaba a

13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogía en un nuevo tubo Eppendorf libre de RNasas, se incubaba durante 10 minutos a temperatura ambiente con 0,5 ml de isopropanol (VWR BDH, Poole, Inglaterra, ref. 437423R) y se centrifugaba de nuevo a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

El precipitado obtenido en esta segunda centrifugación, que contenía el ARN total aislado, se lavaba con etanol frío 70 % libre de RNasas y se dejaba secar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Una vez seco, el precipitado era resuspendido en 20 µl de agua libre de RNasas (QIAGEN, Dusseldorf, Alemania, ref.129112) e incubado durante 10 minutos a 55-60°C en bloque térmico para facilitar la resuspensión del ARN total. 2 µl de este ARN total se diluían nuevamente en agua libre de RNasas (dilución 1:50) para obtener 100 µl de ARN diluido que se utilizaba para cuantificarlo en un espectrofotómetro (Biophotometer Plus, Eppendorf). El resto de ARN total no diluido se congelaba a -80°C para su posterior utilización. La concentración de ARN se calculaba teniendo en cuenta que cada unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN. También se obtenía la relación entre absorbancia a 260 nm y absorbancia a 280 nm ( $ABS_{260}/ABS_{280}$ ) para determinar el grado de pureza de las muestras.

### **Retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc)**

2 µg de ARN total de cada muestra se retrotranscribían a ADNc utilizando el kit comercial “iScript cDNA Synthesis” (Bio-Rad, ref. 170-8896). En cada reacción de retrotranscripción se utilizaban 1 µl del enzima reverso-transcriptasa (RT) del virus de la leucemia murina, 4 µl de la mezcla “iScript reaction mix 5X” (que contiene tampón de retrotranscripción, oligodesoximidina y cebadores aleatorios) y el volumen de ARN total purificado de cada muestra necesario para contener 2 µg de ARN, completando con agua libre de RNasa hasta alcanzar un volumen final de 20 µl. Se utilizaron controles negativos en los que se sustituía el enzima RT por 1 µl de agua. La retrotranscripción se realizaba en el bloque térmico del termociclador iCycler (Bio-Rad), utilizando el perfil térmico indicado

por el fabricante (preincubación durante 5 minutos a 25°C, transcripción reversa durante 30 minutos a 42°C, inactivación durante 5 minutos a 85°C y refrigeración final a 4°C). El ADNc obtenido se conservaba a -20°C hasta su utilización.

### **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)**

La expresión cuantitativa del gen que codifica para la proteína PARP-1 se determinaba mediante RT-PCR en un termociclador iCycler MyiQ (Bio-Rad), utilizando el kit de reactivos “iQ SYBR Green Supermix 2X” (Bio-Rad, ref.170-8880) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

El tipo de RT-PCR utilizado en este estudio es una técnica cuantitativa que emplea el agente intercalante SYBR Green, específico de ADN de doble cadena, para registrar la cinética de la reacción de amplificación (Wittwer et al., 1997). Este agente intercalante es un fluorocromo (absorción a 497 nm y emisión a 520 nm) que se une al ADN de doble cadena conforme éste se sintetiza, aumentando la emisión de fluorescencia del mismo. La fluorescencia es recogida por el sistema detector en cada uno de los ciclos de amplificación, permitiendo medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, que es proporcional a la intensidad de fluorescencia detectada. En el sistema de detección “iCycler MyiQ” de Bio-Rad, el programa informático iCycler va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo y esta información se refleja gráficamente en curvas que expresan la cinética de la reacción para cada una de las muestras. En nuestro estudio, cada reacción de amplificación se realizaba por triplicado utilizando una solución que contenía 1 µl del ADNc previamente obtenido, 10 µl de Supermix 2x (que contiene tampón para la amplificación génica, desoxinucleótido-trifosfatos, iTaq ADN polimerasa, MgCl<sub>2</sub> y SYBR Green), 0,5 µM de cebador “sentido” del gen PARP-1 (5'-AGGCCCTAAAGG CTCAGAAT-3'), 0,5 µM de cebador “antisentido” de dicho gen (5'-CGGCTA CCACATCCAAGGAA-3') (Pacini et al., 1999) y agua libre de DNasas hasta completar un volumen final de 20 µl. Como gen de referencia para normalizar los resultados de expresión del gen PARP-1 se utilizaba el gen del ARN ribosómico

18S (Burbach et al., 2003). Para ello, se utilizaba una solución similar a la anterior en la que se sustituían los cebadores “sentido” y “antisentido” del gen PARP-1 por cebadores “sentido” (5’-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3’) y “antisentido” (5’-GCTGGAATTACCGCGG CT-3) del gen del ARN ribosómico 18S a una concentración final 0,5  $\mu$ M. También se utilizaba un control negativo en el que se sustituía el ADNc por agua. El perfil térmico utilizado para cada reacción de amplificación era el preestablecido en el software “iCycler MyiQ detection system” (Bio-Rad), que consistía en 40 ciclos de 10 segundos a 95°C para la apertura de las cadenas de ADN, 10 segundos a 60°C (para cebadores de PARP-1) o 64°C (para cebadores de ARN ribosómico 18S) para la hibridación de estos cebadores de ADN y 10 segundos a 72°C para la extensión del ADN por la polimerasa (amplificación).

El ciclo de la RT-PCR en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de “threshold cycle”) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN presente en la muestra. La comparación del Ct de una muestra con el Ct del gen del ARN ribosómico 18S (gen de referencia) permite calcular el incremento de Ct ( $\Delta$ Ct) en la citada muestra. Por lo tanto, en nuestro estudio se determinaban los  $\Delta$ Ct en cada una de las muestras de retinas de diferentes edades postnatales ( $\Delta$ Ct P0,  $\Delta$ Ct P3,  $\Delta$ Ct P7,  $\Delta$ Ct P14,  $\Delta$ Ct P21,  $\Delta$ Ct P28,  $\Delta$ Ct P60) y en una muestra de retina de E18 ( $\Delta$ Ct E18), que se utilizaba como unidad relativa de expresión (Livak y Schmittgen, 2001). Seguidamente se calculaba el número de veces de inducción de la expresión del gen PARP-1 para cada edad del desarrollo según la fórmula de Livak y Schmittgen  $N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , siendo  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct P(0 \text{ a } 60) - \Delta Ct E18$ . Para la validación del cálculo del  $\Delta\Delta Ct$  es necesario que las curvas de amplificación del gen de referencia y del gen de PARP-1 muestren una eficiencia próxima al 100%. Además, se elaboraba una recta patrón destinada a comprobar la fidelidad de la duplicación del ADNc en cada ciclo de la RT-PCR, independientemente de la concentración de ADNc utilizada. Esta recta patrón se obtenía utilizando al menos

cuatro diluciones de ADNc realizadas por triplicado y tenía un coeficiente de correlación superior a 0,98 y una pendiente entre 3,2 y 3,4.

La RT-PCR basada en la utilización de SYBR Green tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es relativamente fácil. El principal inconveniente del SYBR Green es su baja especificidad, debido a que se une indistintamente a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para minimizar las posibles inespecificidades es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (“hot-start PCR”). El método de detección “iCycler MyiQ” posee un sistema de análisis denominado “Melting Point” o curva de desnaturalización por calor que permite asegurar la especificidad de los resultados (Ririe et al., 1997). En este sistema de análisis, las curvas de desnaturalización por calor de muestras con amplificación específica tienen un sólo pico a temperaturas superiores a 81,5°C. Sin embargo, en muestras con amplificación inespecífica se observan otros picos a temperaturas inferiores a 81°C, correspondientes a dímeros de cebadores generados durante la amplificación.

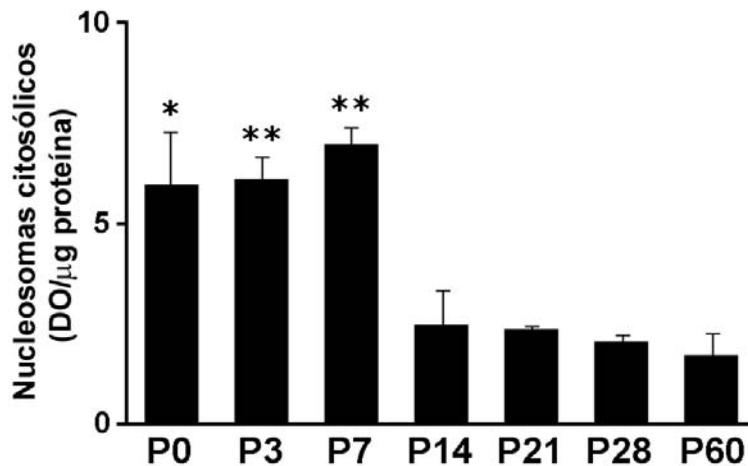
### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos experimentales se utilizaba un test t de Student, considerándose diferencias significativas todas aquellas en las que se obtenían valores de  $P < 0,05$ . El paquete estadístico utilizado era SPSS19 (IBM).

## RESULTADOS

### Aumento de la muerte celular en la retina durante la primera semana de desarrollo postnatal

La muerte celular durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón, cuantificada mediante determinación de la cantidad de nucleosomas libres en el citosol, se producía mayoritariamente durante la primera semana de desarrollo postnatal, como también ha sido descrito por otros autores (Pequignot et al., 2003; Young, 1984). El número de nucleosomas libres permanecía elevado desde P0 hasta P7, alcanzando el valor máximo en este último día, y posteriormente descendía, siendo mucho menor entre P14 y P60 (Fig. I-1). Por lo tanto, los niveles de muerte celular en la retina descendían de manera significativa después de la primera semana de desarrollo postnatal.



**Fig. I-1.** Cuantificación mediante ELISA del número de nucleosomas citosólicos libres, indicativos de muerte celular, durante el desarrollo postnatal de retinas de ratón. Las barras expresan el valor promedio ( $\pm$  error estándar) de tres experimentos independientes. La cantidad de nucleosomas libres se incrementa hasta el séptimo día postnatal (P7) y disminuye en etapas posteriores (P14 a P60). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas (un asterisco:  $P < 0,05$ ; dos asteriscos:  $P < 0,01$ ) entre los valores marcados y los correspondientes a P14-P60. DO: densidad óptica.

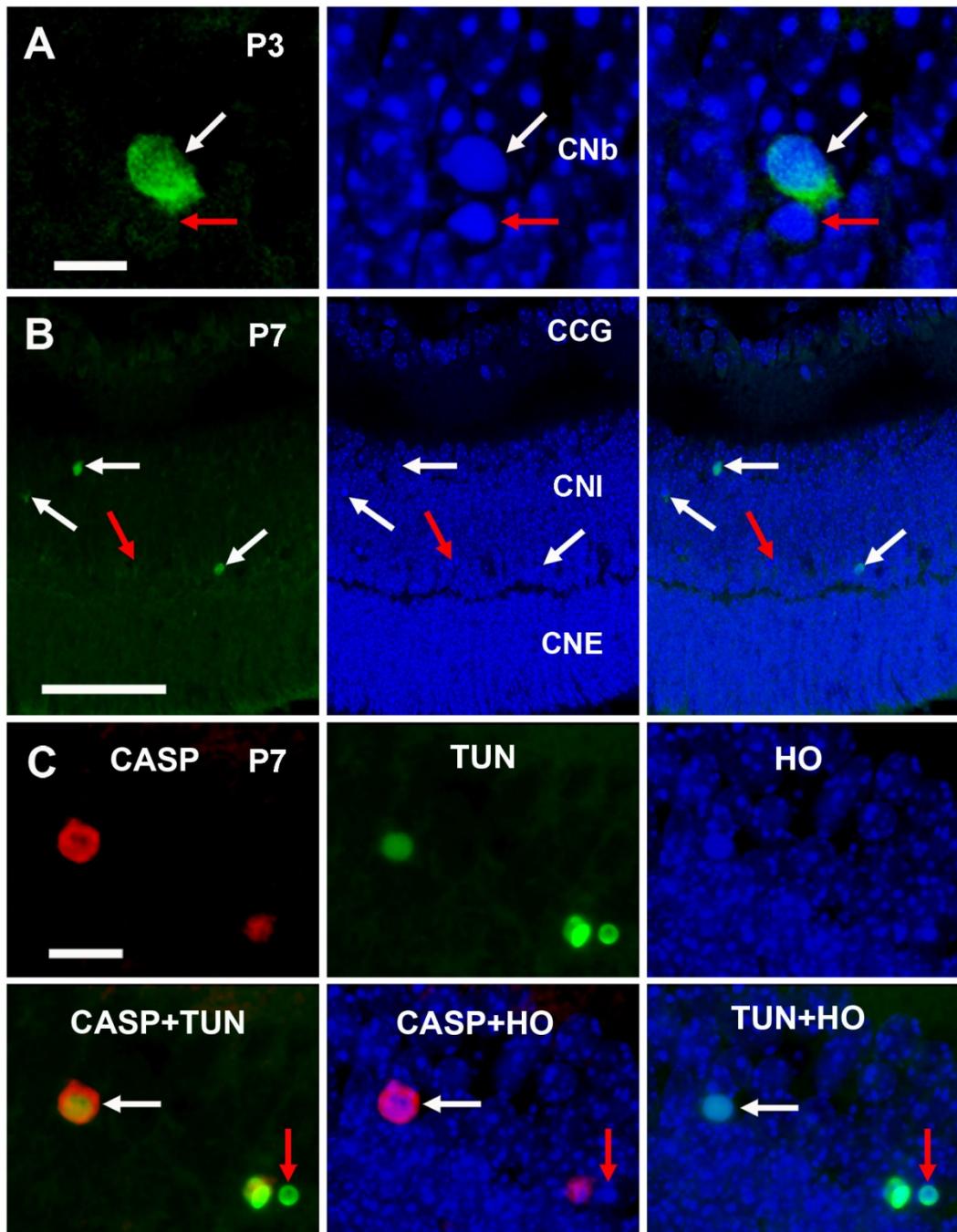
### **Algunas células de la retina mueren mediante un mecanismo independiente de caspasas**

La tinción con Hoechst de los núcleos de las células de la retina en los días P3 y P7 (primera semana postnatal de desarrollo) ponía de manifiesto que las células que mostraban condensación de la cromatina y picnosis (rasgos morfológicos del proceso de muerte celular) presentaban mayoritariamente actividad para la caspasa-3, aunque un considerable porcentaje de células con rasgos morfológicos de muerte no poseían actividad caspasa-3 (Fig. I-2A, B). Concretamente, en el estadio P7, el 46,6% de las células picnóticas eran negativas para la actividad caspasa-3. Estas observaciones eran confirmadas mediante doble marcaje TUNEL y caspasa-3 activa de secciones de retina de P7, en las que algunas células TUNEL-positivas carecían de actividad caspasa-3 (Fig. I-2C).

Estas observaciones demostraban que, aunque durante la primera semana postnatal de desarrollo de la retina de ratón existen procesos de muerte celular mayoritariamente dependiente de caspasas, también se producían fenómenos alternativos de muerte celular independiente de caspasas.



**Fig. I-2.** Microscopía confocal de secciones transversales de retina postnatal marcadas con anti-caspasa-3 activa y TUNEL. **A, B:** Inmunomarcado de caspasa-3 activa (verde) y tinción de los núcleos con Hoechst (azul) en retinas de P3 (**A**) y P7 (**B**). Dicho marcado revela la presencia de núcleos picnóticos asociados a actividad caspasa-3 (flechas blancas) y otros no asociados a dicha actividad (flechas rojas) en la retina postnatal de ratón. **C:** Inmunodetección de caspasa-3 activa (rojo, CASP), marcado con TUNEL (verde, TUN) y tinción nuclear de Hoechst (azul, HO) en una sección confocal de la capa nuclear interna de una retina de P7. Obsérvese en la imagen de doble exposición para actividad caspasa-3 y TUNEL (CASP+TUN) que no todos los núcleos TUNEL-positivos están asociados con actividad caspasa-3 (flecha roja). La imagen de marcado para caspasa-3 y tinción de Hoechst (CASP+HO) revela que el núcleo que carece de actividad caspasa-3 (flecha roja) muestra picnosis. En la imagen con doble exposición para TUNEL y tinción de Hoechst (TUN+HO) se observa que todos los núcleos TUNEL-positivos muestran picnosis. Las flechas blancas señalan un núcleo picnótico, TUNEL-positivo y con actividad caspasa-3. CCG: capa de células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; CNE: capa nuclear externa. Barras de escala: 5  $\mu\text{m}$  en A, 50  $\mu\text{m}$  en B y 10  $\mu\text{m}$  en C.



### **Expresión de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina**

Dado que PARP-1 ha sido descrita como una proteína que participa en los fenómenos de muerte celular dependientes de la translocación de AIF al núcleo e independientes de la actuación de caspasas (Yu et al., 2002), se ha analizado la expresión del ARNm de PARP-1 y la actividad de esta proteína durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón.

Los experimentos de Western blot mostraban que niveles elevados de la proteína PARP-1 (banda de 113 kDa) estaban presentes en los extractos proteicos totales de retina de ratón de P3 y P7. En etapas del desarrollo posteriores a P7, la expresión de la proteína PARP-1 disminuía con respecto a P3 y P7 (Fig. I-3A-D). Estos resultados demuestran que niveles elevados de PARP-1 se expresan en la retina durante la primera semana de desarrollo postnatal, coincidiendo con el periodo de mayor muerte celular y que posteriormente, cuando la muerte celular disminuye, la expresión de PARP-1 también se reduce. Los resultados obtenidos con Western blot eran similares cuando se usaba un anticuerpo anti-PARP-1 monoclonal (Fig. I-3A-C) y otro policlonal (Fig. I-3D) y también con el uso de dos cepas distintas de ratón, C57BL/6 (Fig. I-3A-D) y BALB/c (Fig. I-3E). Por otro lado, los extractos proteicos de retinas de P3 y P7 también mostraban la presencia del fragmento proteico de 89 kDa, correspondiente a la forma proteolizada de la proteína PARP-1 (Fig. I-3A). Este resultado demostraba la presencia de caspasa-3 activa en la retina de ratón de P3 y P7, ya que esta proteasa es responsable de la proteólisis de la proteína PARP-1 durante los procesos de muerte celular dependiente de caspasas.

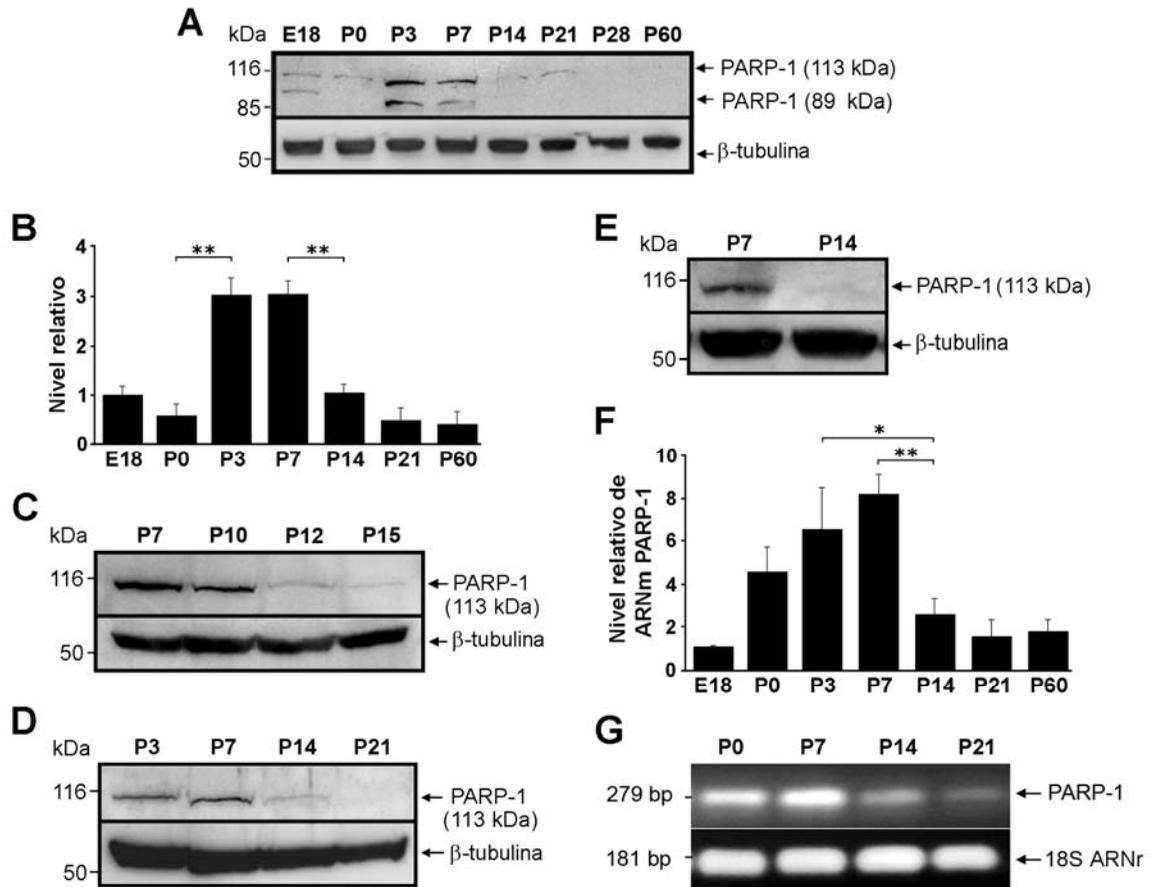
La presencia de niveles elevados de PARP-1 durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina coincidía con un incremento en los niveles del ARNm de PARP-1, medidos mediante PCR en tiempo real (Fig. I-3F, G), lo cual indicaba que el aumento en la expresión de la proteína en estos estadios se debía a una mayor transcripción del ARNm de PARP-1. Posteriormente, a partir de P14 (segunda semana de desarrollo postnatal), los niveles de ARNm disminuían de

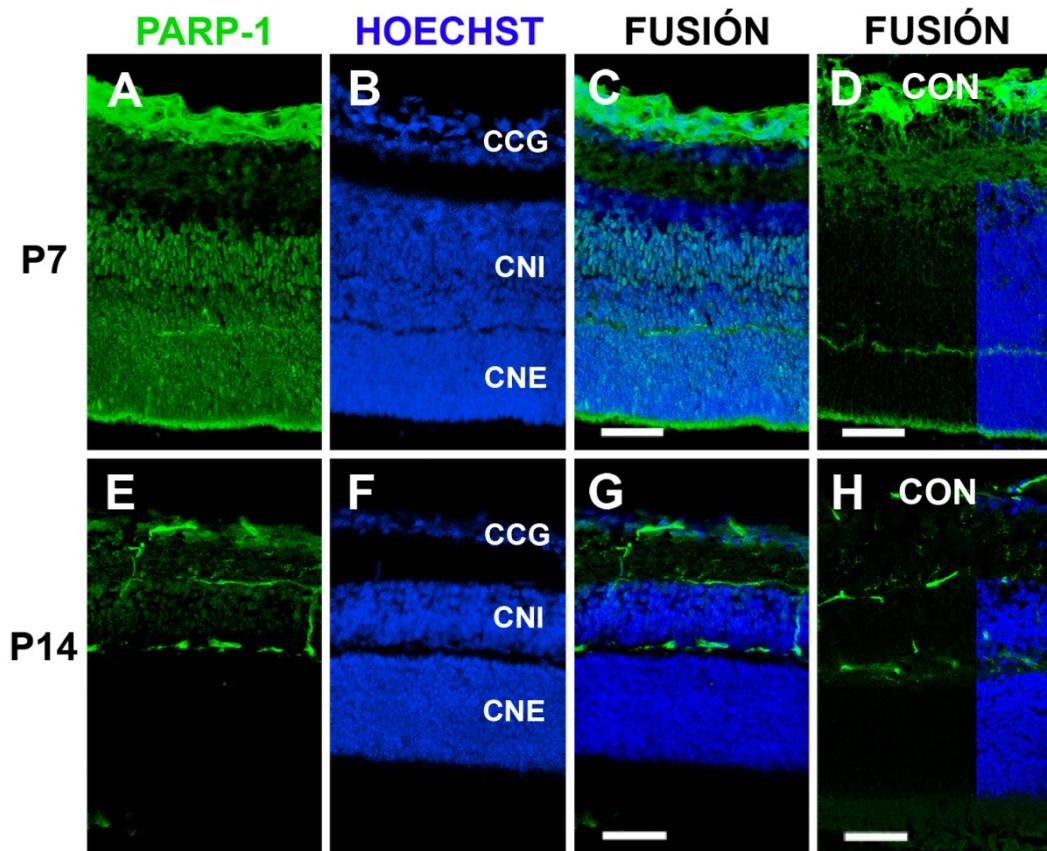
manera significativa (Fig. I-3F, G), confirmando la menor expresión de la proteína PARP-1 observada en los experimentos de Western blot.

Además, la presencia de PARP-1 durante la primera semana de desarrollo postnatal era corroborada en secciones de retina inmunoteñidas con anti-PARP-1. En concreto, la detección inmunocitoquímica de PARP-1 era muy abundante en P7 (Fig. I-4A-D), localizándose fundamentalmente en los núcleos de las distintas capas de la retina, aunque el inmunomarcado era mayoritario en la capa nuclear interna (Fig. I-5). Igual que ocurría en los experimentos de Western blot y PCR, la detección inmunocitoquímica de PARP-1 disminuía considerablemente en días posteriores a P7. Concretamente, las neuronas con núcleos PARP-1-positivos eran escasas en retinas de P14 (Fig. I-4E-H). En resumen, la detección inmunocitoquímica de PARP-1 en secciones de retina disminuía fuertemente después de la primera semana de desarrollo postnatal.

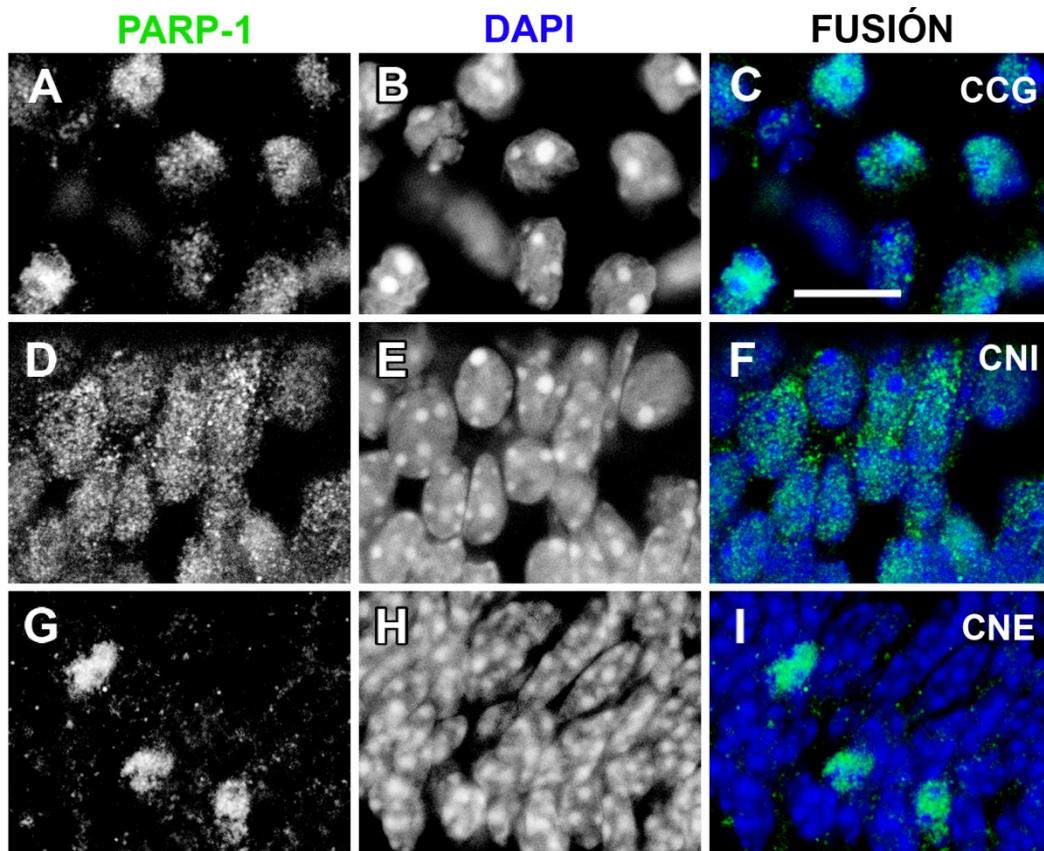
En conjunto, los resultados anteriormente comentados mostraban que la proteína PARP-1 se expresa en niveles elevados durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina, disminuyendo posteriormente a partir de la segunda semana.

**Fig. I-3.** Expresión de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina. **A:** Detección de PARP-1 mediante Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-PARP-1. Se detecta una alta expresión de la proteína PARP-1 (banda de 113 kDa) en P3 y P7, decreciendo en edades posteriores. En P28 y P60 no se evidencian bandas, ya que el inmunoblot se expuso por un periodo corto de tiempo para evitar la fuerte sobreexposición de las bandas en P3 y P7. La presencia del fragmento de 89 kDa de PARP-1 en P3-P7 indica de manera indirecta la actividad de caspasas. La detección de tubulina mediante el anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina era usada como control de carga. **B:** Análisis densitométrico de la expresión de PARP-1 (113 kDa) en tres experimentos independientes. Los valores densitométricos se expresaron como niveles relativos respecto al valor expresado en E18. Los dos asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) entre los valores correspondientes a las edades comparadas. **C:** Análisis de la disminución de expresión de PARP-1 entre P7 y P15, usando el anticuerpo monoclonal. Se observa un descenso gradual en la expresión de PARP-1. **D:** Detección mediante Western blot de PARP-1 en P3, P7, P14 y P21, usando un anticuerpo policlonal. La expresión de PARP-1 en estos inmunoblots es similar a la observada con el anticuerpo monoclonal. **E:** Expresión de PARP-1 en retinas de ratones BALB/c de P7 y P14. El inmunoblot mostrado era obtenido usando el anticuerpo policlonal anti-PARP-1. Igual que sucede en retinas de ratones C57BL/6, las retinas de ratones BALB/c también muestran un fuerte descenso de la expresión de PARP-1 entre P7 y P14. **F:** Análisis cuantitativo de la expresión de ARNm de PARP-1 mediante PCR a tiempo real durante el desarrollo postnatal de la retina. Las barras representan los valores promedio ( $\pm$  error estándar) obtenidos en cada edad a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado y normalizados con la expresión de ARNr 18S. La expresión del ARNm de PARP-1 aumenta progresivamente entre P0 y P7 y desciende con posterioridad. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los valores de expresión del ARNm de las edades comparadas (un asterisco:  $P < 0,05$ ; dos asteriscos:  $P < 0,01$ ). **G:** Gel representativo de tres experimentos independientes de electroforesis sobre gel de agarosa que muestra la expresión del ARNm de PARP-1 mediante PCR normal en retinas de P0, P7, P14 y P21. El gen de ARNr 18S se ha usado como control endógeno de expresión.





**Fig. I-4.** Microscopía confocal de secciones transversales de retinas postnatales de P7 y P14 inmunoteñidas con anti-PARP-1. **A-D:** Sección de retina de P7 que muestra la presencia de PARP-1 (verde) en todas las capas retinianas, puestas de manifiesto mediante tinción de los núcleos celulares con Hoechst (azul). El panel **D** muestra un control negativo (CON) en el que se ha omitido el tratamiento con anticuerpo primario. La banda a la derecha del panel muestra la distribución de capas teñidas con Hoechst. **E-H:** Sección de retina de P14 que muestra escasa inmunotinción de PARP-1 (verde) en las distintas capas de la retina, puestas de manifiesto mediante la tinción nuclear con Hoechst (azul). También se observa un marcado inespecífico de vasos sanguíneos (**E, G**). El control negativo (CON) mostrado en **H** también contiene dicho marcado inespecífico. CCG: capa de células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; CNE: capa nuclear externa. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



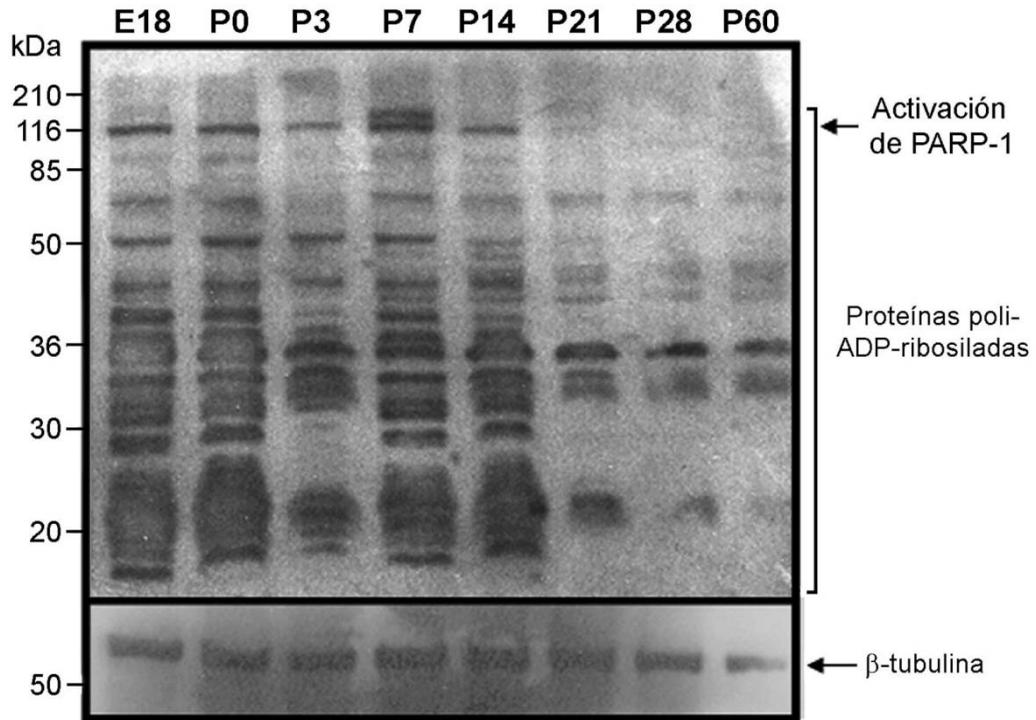
**Fig. I-5.** Secciones ópticas confocales de áreas seleccionadas en diferentes capas de secciones transversales de retinas de P7 teñidas con DAPI (azul) e inmunomarcadas con anti-PARP-1 (verde). Las micrografías de la columna izquierda muestran el canal verde (representado en escala de grises), las de la columna central exhiben el canal azul (representado en escala de grises) y las de la columna derecha muestran la fusión de los dos canales. Las imágenes de cada fila corresponden a secciones confocales de campos microscópicos obtenidas en la capa de células ganglionares (CCG, **A-C**), capa nuclear interna (CNI, **D-F**) y capa nuclear externa (CNE, **G-I**). La mayoría del inmunomarcado PARP-1 es nuclear en las tres capas, aunque también se observan núcleos no marcados, sobre todo en la CNE. La CNI es la que muestra mayor proporción de núcleos PARP-1-positivos. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### **Actividad de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina**

La actividad enzimática de PARP-1 era examinada mediante Western blot usando un anticuerpo que detecta la formación de polímero PAR, sintetizado por esta enzima cuando se activa. Los inmunoblots mostraban la presencia de gran cantidad de proteínas poli-ADP-ribosiladas durante la primera semana de desarrollo postnatal, fundamentalmente en P7 (Fig. I-6). En edades posteriores, la formación del polímero decrecía, siendo la disminución más evidente en P21, P28 y P60. En particular, una proteína poli-ADP-ribosilada con peso molecular alrededor de 113 kDa aparecía únicamente en los inmunoblots de P7. Esta proteína parecía corresponder a la forma poli-ADP-ribosilada de PARP-1, indicando una mayor activación de PARP-1 en dicha edad (Fig. I-6).

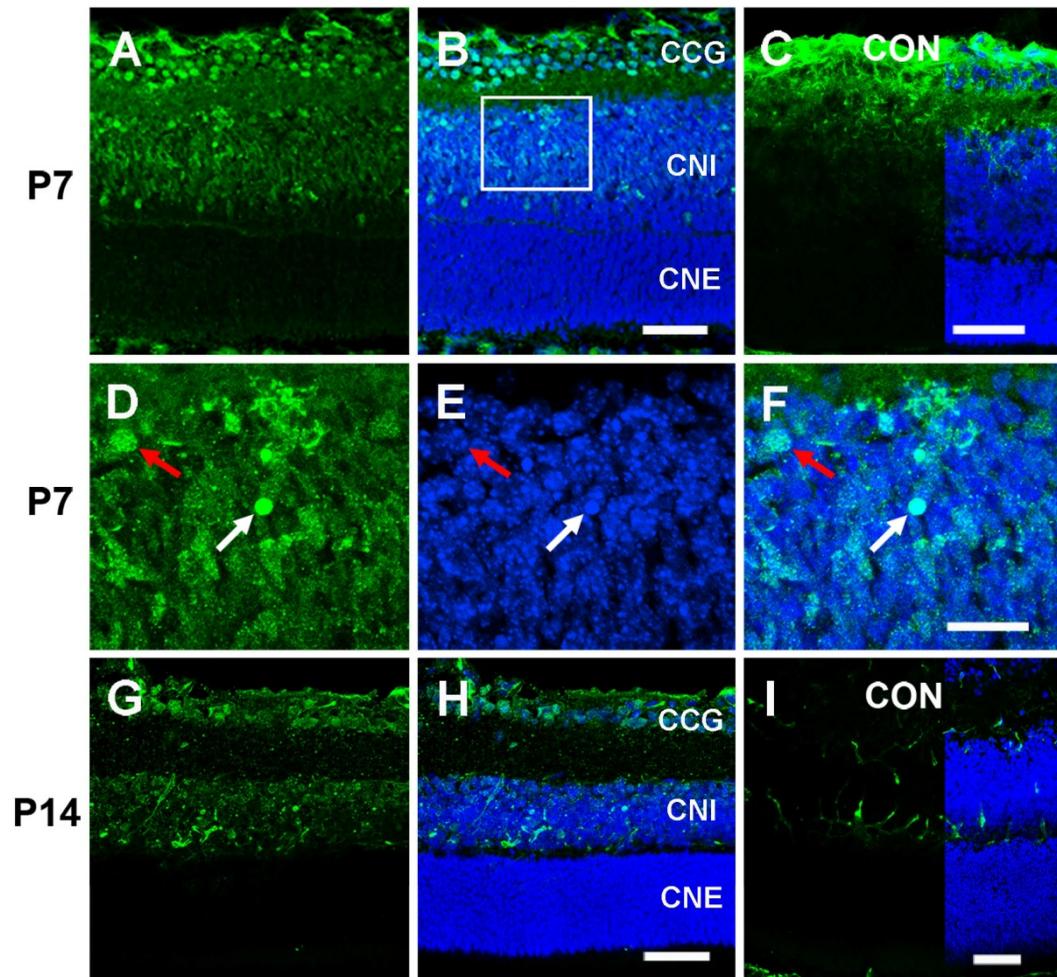
La presencia de PAR, y por tanto de actividad PARP-1, también era revelada mediante inmunofluorescencia (Fig. I-7 y I-8). La distribución de PAR durante el desarrollo postnatal de la retina era semejante a la observada para PARP-1 (Fig. I-4 y I-5), observándose menos inmunomarcado en P14 que en P7 (comparar Fig. I-7A-B y I-7G-H). En general, el inmunomarcado de PAR era nuclear en las tres capas de la retina, aunque algunos núcleos carecían de marcado (Fig. I-8). Además, algunos núcleos picnóticos de la capa nuclear interna mostraban una intensa inmunorreactividad para el polímero en retinas de P7 (Fig. I-7D-F).

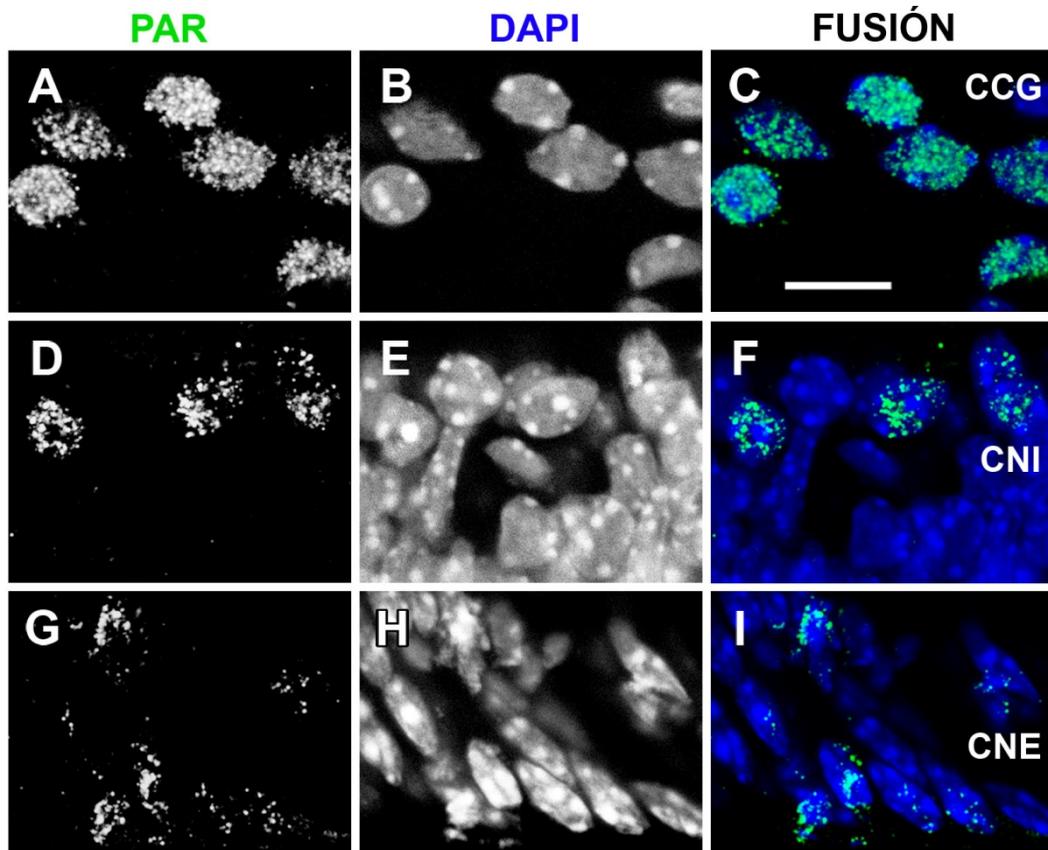
De nuestros resultados se podía deducir que los niveles de proteína PARP-1 y de su expresión génica no difieren entre P3 y P7 (Fig. I-3), pero sí hay diferencias en su actividad enzimática, que es mayor en P7 (Fig. I-6). En edades posteriores a P7 hay una disminución tanto de la expresión como de la actividad enzimática de dicha proteína que coincide con un descenso en los niveles de muerte celular en la retina postnatal de ratón.



**Fig. I-6.** Detección de proteínas poli-ADP-ribosiladas en retinas postnatales de ratón de diferentes edades (E18 a P60) mediante Western Blot. El inmunoblot es representativo de tres experimentos independientes. Se señala una banda de aproximadamente 113 kDa (activación de PARP-1) que corresponde a la propia proteína PARP-1 poli-ADP-ribosilada. El anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina era usado como control de carga.

**Fig. I-7.** Microscopía confocal de secciones transversales de retinas postnatales de P7 y P14 inmunomarcadas con anti-PAR (verde) y teñidas con Hoechst (azul). CCG: capa de células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; CNE: capa nuclear externa. **A, B:** Distribución del polímero PAR (verde) en la CCG y CNI de una retina de P7. La tinción con Hoechst (azul, **B**) pone de manifiesto las capas nucleares de la retina. **C:** Control negativo (CON) de una sección de retina de P7 en la que se ha omitido el tratamiento con anticuerpo primario. La banda de la derecha muestra la distribución de capas teñidas con Hoechst. **D-F:** Aumento del área de la CNI encuadrada en **B** que muestra los canales verde (**D**) y azul (**E**) y la fusión de ambos (**F**). Algunos núcleos picnóticos tienen un intenso marcado de PAR (flechas blancas) y otros no picnóticos también son PAR-positivos (flechas rojas). **G-H:** Escasez del polímero PAR (verde, **G**) en una sección de retina de P14. La tinción con Hoechst (azul, **H**) pone de manifiesto las capas nucleares de la retina. **I:** Control negativo (CON) de una sección de retina de P14 en la que se ha omitido la incubación con anticuerpo primario. A la derecha se muestra la distribución de capas teñidas con Hoechst. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  en A-C y G-I; 20  $\mu\text{m}$  en D-F.





**Fig. I-8.** Secciones ópticas confocales de áreas seleccionadas en la capa de células ganglionares (CCG, **A-C**), capa nuclear interna (CNI, **D-F**) y capa nuclear externa (CNE, **G-I**) de secciones transversales de retinas de P7 teñidas con DAPI (azul) e inmunomarcadas con anti-PAR (verde). Las micrografías de la columna izquierda muestran el canal verde (representado en escala de grises), las de la columna central exhiben el canal azul (representado en escala de grises) y las de la columna derecha muestran la fusión de los dos canales. El inmunomarcado de PAR es mayoritariamente nuclear en las tres capas. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### **Expresión y traslocación de AIF durante el desarrollo postnatal de la retina**

Una vez demostrado el incremento en la expresión y actividad de PARP-1 en la retina durante la primera semana de desarrollo postnatal, coincidiendo con la existencia de intensa muerte celular, se analizó si la forma truncada de AIF estaba presente en la retina de dichas edades y si se traslocaba al núcleo.

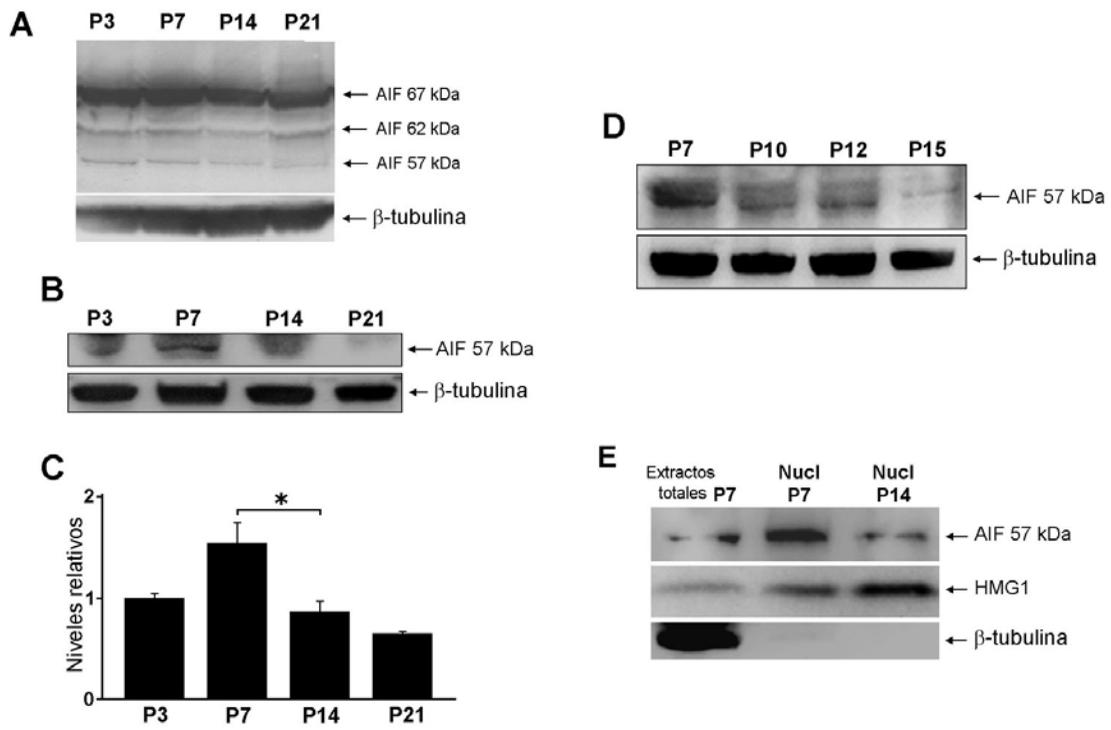
Los experimentos de Western blot mostraban la presencia de tres bandas en los extractos totales de retina (Fig. I-9A), las cuales correspondían a cada una de las formas de AIF: precursor de 67 kDa, forma madura de 62 kDa y forma truncada de 57 kDa. Se observaba una disminución de la banda de 57 kDa a partir de P7, lo cual indicaba menor presencia de la forma truncada de AIF durante el periodo del desarrollo en el que había menor actividad de PARP-1 y menos muerte celular (Fig. I-9A-C). Además, esta disminución de la forma truncada de AIF tenía lugar de manera gradual durante la segunda semana de desarrollo postnatal, igual que sucedía con PARP-1 (compárese Fig. I-3C y Fig. I-9D). Por lo tanto, parecía existir una clara correlación entre expresión y actividad de PARP-1 con presencia de la forma truncada de AIF. Los inmunoblots de extractos nucleares de retina mostraban que la cantidad de AIF truncado en los núcleos celulares era mayor en P7 que en P14 (Fig. I-9E), sugiriendo que había una traslocación de AIF al núcleo durante la primera semana postnatal, coincidiendo con el incremento de actividad de PARP-1 y formación del polímero PAR. Así, una vez en el núcleo, AIF podría participar en el mecanismo de muerte celular independiente de caspasas y dependiente de PARP-1.

La presencia de AIF en los núcleos de las células de la retina en desarrollo también era puesta de manifiesto mediante inmunofluorescencia. Así, las secciones confocales de retina de P7 mostraban una intensa señal de AIF en algunos núcleos picnóticos, que también estaban fuertemente marcados con el anticuerpo anti-PAR (Fig. I-10A), sugiriendo que estos núcleos pertenecían a células que estaban muriendo a través de un mecanismo independiente de caspasas, en el que participa AIF. Otros núcleos picnóticos carecían de AIF, sugiriendo que algunas células morían a través de una vía dependiente de

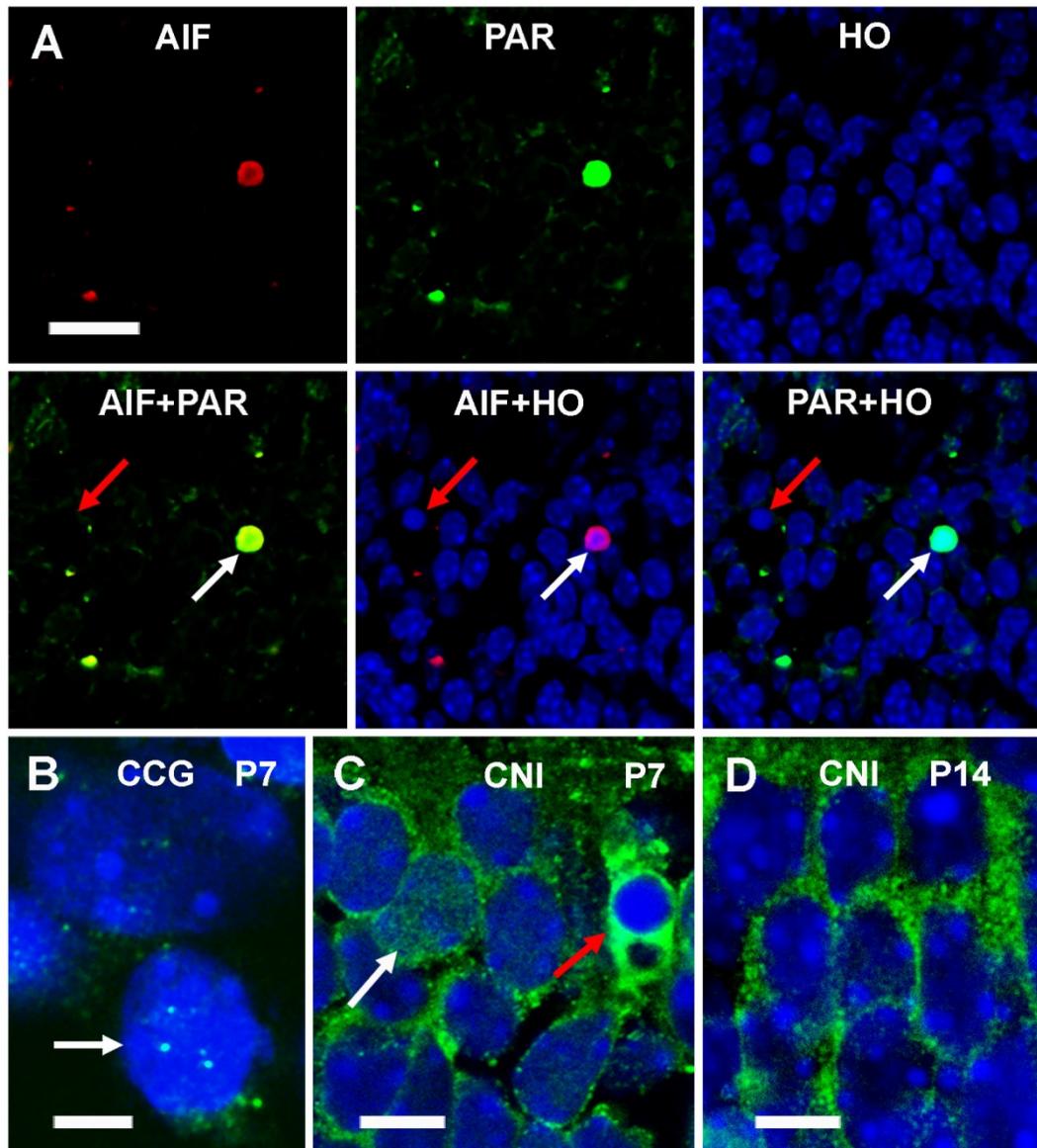
caspasas, en la que no participa AIF. Otras células presentaban marcado de AIF tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig. I-10B, C), lo que sugería que AIF estaba migrando desde el citoplasma al núcleo. Sin embargo, las células de retinas de P14 mostraban núcleos carentes de inmunomarcado de AIF, el cual solamente se localizaba en el citoplasma celular (Fig. I-10D).



**Fig. I-9.** Expresión de AIF durante el desarrollo postnatal de la retina. Todos los inmunoblots mostrados son representativos de, al menos, tres experimentos independientes. **A:** Inmunoblot que muestra diferentes bandas de AIF (precursor de 67 kDa, forma madura de 62 kDa y forma truncada de 57 kDa) detectadas en extractos totales de retinas de P3, P7, P14 y P21. La banda de la forma truncada es más débil en edades posteriores a P7. El anticuerpo frente a  $\beta$ -tubulina se ha usado como control de carga. **B:** Inmunoblot sobreexpuesto en el que se muestra únicamente la banda de 57 kDa de AIF, apreciándose con mayor claridad que ésta se va debilitando después de P7. De nuevo, el anticuerpo frente a  $\beta$ -tubulina se ha usado como control de carga. **C:** Análisis de densitometría de la cantidad de AIF truncado (normalizado respecto a la expresión de  $\beta$ -tubulina) durante el desarrollo de la retina. El asterisco indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre P7 y edades posteriores (P14 y P21). Las barras representan niveles relativos de expresión de AIF respecto a P3 (medias  $\pm$  error estándar). **D:** Western blot que muestra el descenso gradual en la expresión de AIF de 57 kDa detectado en extractos totales de retinas entre P7 y P15. De nuevo se ha utilizado la detección de  $\beta$ -tubulina como control de carga. **E:** Expresión de la forma truncada de AIF en extractos nucleares de retinas de P7 (Nucl P7) y P14 (Nucl P14). Nótese que AIF truncado es mucho más abundante en P7 que en P14. En la primera calle del inmunoblot se muestra la señal obtenida utilizando un extracto total de retina de P7. El Western blot se ha realizado utilizando la misma cantidad de proteínas en cada calle. Las proteínas  $\beta$ -tubulina (proteína citoplasmática) y HMG1 (proteína no histónica asociada a la cromatina nuclear) han sido utilizadas como indicadores de las fracciones proteicas totales y nucleares, respectivamente. La expresión de  $\beta$ -tubulina está ausente en los extractos nucleares, los cuales sí muestran un intenso marcaje de HMG1, que es mucho más débil en los extractos totales.



**Fig. I-10.** Microscopía confocal de secciones transversales de retinas postnatales de P7 (**A-C**) y P14 (**D**) que muestran la distribución del factor inductor de apoptosis (AIF). **A:** Doble inmunomarcado de AIF (rojo) y polímero PAR (verde) en secciones de retinas de P7 teñidas con Hoechst (azul, HO). También se muestran las imágenes de fusión de los canales rojo y verde (AIF+PAR), rojo y azul (AIF+HO) y verde y azul (PAR+HO). En ellas se observan dos núcleos picnóticos, uno de los cuales muestra intensa inmunorreactividad para AIF y PAR (flechas blancas), mientras que el otro carece de la misma (flechas rojas). **B, C:** Inmunomarcado de AIF (verde) en la capa de células ganglionares (CCG, **B**) y capa nuclear interna (CNI, **C**) de una retina de P7 cuyos núcleos han sido teñidos con Hoechst (azul). La mayoría de la inmunotinción de AIF es citoplasmática, pero también se observa inmunomarcado en algunos núcleos celulares (flechas blancas). La flecha roja señala una célula con intenso inmunomarcado de AIF en su citoplasma. **D:** Inmunotinción de AIF (verde) en la CNI de una retina de P14 cuyos núcleos se han teñido con Hoechst (azul). Se observa intenso inmunomarcado de AIF en el citoplasma, pero no en el núcleo de las células. Barra de escala: 15  $\mu\text{m}$  en A; 3  $\mu\text{m}$  en B; 5  $\mu\text{m}$  en C y D.



## DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo confirman que la muerte celular durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón ocurre principalmente en la primera semana de desarrollo, alcanzando sus valores máximos en P7 (Young, 1984). Los experimentos de inmunofluorescencia demuestran que el mecanismo de muerte celular en la retina es mayoritariamente dependiente de caspasas, pero también existen programas alternativos de muerte independiente de caspasas, ya que no todos núcleos picnóticos o células TUNEL-positivas muestran inmunomarcado para caspasa-3 activa (Fig. I-2). Podría pensarse que la actividad de la caspasa-3 no es detectada en algunas fases del proceso de muerte celular dependiente de caspasas. Sin embargo, la consistencia y frecuencia con que se repite la observación de células en proceso de muerte que son caspasa-3-negativas avala la existencia de un programa de muerte celular independiente de caspasas durante el desarrollo postnatal de la retina, como ha sido apoyado por otros estudios (Donovan et al., 2006). Además, la muerte celular de la retina no está bloqueada en ratones caspasa-3<sup>-/-</sup>, aunque sí se observa un retraso en su secuencia temporal (Zeiss et al., 2004). Otros autores no han detectado actividad caspasa en modelos murinos de degeneración retiniana y el uso de inhibidores de caspasas no revierte totalmente el proceso de muerte celular en la retina de ratón (Donovan y Cotter, 2002; Doonan et al., 2003; Hisatomi et al., 2002; Spalding et al., 2005). Todos estos datos apoyan la idea de que la mayoría de las células que mueren en la retina postnatal de ratón lo hacen mediante un mecanismo dependiente de caspasas, pero también operan otros mecanismos de muerte que son independientes de caspasas.

Nuestro estudio revela que la actividad de PARP-1 está vinculada con el proceso de muerte celular en la retina postnatal. Dicha actividad está incrementada durante la primera semana de desarrollo postnatal, precisamente cuando la muerte celular es más intensa. Con posterioridad, durante la segunda semana postnatal, la proteína PARP-1 disminuye tanto en expresión como en actividad, coincidiendo con la desaparición de los fenómenos de muerte (Fig. I-3,

I-4 y I-6). Estos resultados demuestran por primera vez la existencia de un proceso de regulación transcripcional del mensajero de PARP-1 durante el desarrollo de la retina, aunque esta regulación ya había sido descrita en situaciones patológicas o de alteración experimental de la retina (Weise et al., 2001). PARP-1 disminuye su expresión coincidiendo con la muerte celular, pero esto no quiere decir que PARP-1 no se exprese en la edad adulta. Así, tras la sobreexposición de los inmunoblots, se observa una clara banda de PARP-1 en la edad adulta, demostrando que esta proteína también se expresa en la retina adulta de ratón, como ha sido descrito en otros estudios (Chiang y Lam, 2000; Weise et al., 2001; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2002). No obstante, esta expresión es mucho menor que la observada en etapas tempranas de desarrollo postnatal (Fig. I-3B). Nuestros resultados (Fig I-6), así como estudios de otros autores (Drel et al., 2009; Uehara et al., 2006; Zheng et al., 2010), también muestran poli-ADP-ribosilación de proteínas en la retina adulta, pero esta modificación es claramente menor que en retinas en desarrollo. Esto es lógico si tenemos en cuenta la menor expresión de PARP-1 después de la segunda semana postnatal. También podría suceder que la leve modificación postraducciona que tiene lugar en la retina adulta fuera regulada por el otro miembro de la familia PARP (PARP-2), que posee actividad enzimática de poli-ADP-ribosa sintasa (Amé et al., 2004).

En apoyo de la relación entre actividad de PARP-1 y muerte celular, nuestros resultados demuestran la presencia de polímero en algunos núcleos picnóticos (Fig. I-7). Por lo tanto, la activación de PARP-1 podría estar desencadenando procesos de muerte celular durante el desarrollo postnatal de la retina. Otros estudios también han mostrado actividad de PARP-1 en procesos de muerte celular que tienen lugar en situaciones patológicas de la retina (Li y Osborne, 2008; Osborne et al., 2008; Paquet-Durand et al., 2007). Sin embargo, la importancia de nuestro estudio reside en que es la primera vez que se relaciona activación de PARP-1 con muerte celular en una situación fisiológica, como es el desarrollo postnatal de la retina.

La activación de PARP-1 ha sido relacionada con la muerte celular independiente de caspasas (Wang et al., 2009), a través de la poli-ADP-ribosilación de AIF que media su salida de la mitocondria y su posterior migración al núcleo (Andrabi et al., 2006; Yu et al., 2006), donde ejerce su papel inductor de apoptosis (Otera et al., 2005; Wang et al., 2004). Otros estudios han descrito que la forma madura de AIF (62 kDa) también podría participar en la muerte celular independiente de caspasas (Li y Osborne, 2008). Nuestros resultados sugieren que AIF participa en la muerte celular independiente de caspasas durante el desarrollo postnatal de la retina. En apoyo de esta participación, hemos demostrado la presencia en la retina de niveles elevados de AIF truncado (57 kDa) durante la primera semana postnatal, coincidiendo con un aumento en la actividad y expresión de PARP-1 y con un incremento de la muerte celular. Además, la existencia de una relación entre traslocación de AIF y formación del polímero PAR se ve reforzada por la observación de núcleos picnóticos que muestran inmunorreactividad tanto para AIF como para el polímero PAR (Fig. I-10), sugiriendo una interacción entre el polímero y AIF que podría desencadenar la muerte celular. Igual que ocurre para PARP-1, la expresión de la forma truncada de AIF disminuye drásticamente en la retina a partir de la segunda semana de desarrollo postnatal, coincidiendo con un fuerte descenso de la muerte celular. Recientemente el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (Galluzzi et al., 2012) ha recomendado utilizar el término “parthanatos” para describir un tipo de muerte celular independiente de caspasas, caracterizada por la activación de PARP-1, producción de PAR y traslocación de AIF al núcleo para inducir cromatinolisis, que es equivalente a la observada en nuestro estudio.

En conjunto, nuestros resultados parecen indicar que, una vez que la retina ha completado su desarrollo (en torno a P14), disminuye la expresión de todas las proteínas implicadas en la inducción y ejecución de procesos de muerte celular independiente de caspasas. Algo similar se ha descrito para distintas proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Donovan et al., 2006), algunas de las cuales,

como la proteína Bid, han sido relacionadas con la salida de AIF de la mitocondria (Culmsee y Plesnila, 2006). Por lo tanto, podría suceder que la disminución de Bid durante la segunda semana de desarrollo postnatal de la retina diera lugar a una menor liberación de AIF desde la mitocondria, bloqueando su traslocación al núcleo y originando un descenso de la muerte celular. En la retina, también se ha descrito una disminución de la expresión de caspasas y otras proteínas de la vía intrínseca de la apoptosis durante la segunda semana postnatal (Madden et al., 2007; O'Driscoll et al., 2006; Yakovlev et al., 2001). Así, las diferentes vías de apoptosis quedarían bloqueadas en las etapas en las que la muerte celular ya no es necesaria para el correcto desarrollo de la retina, previniendo una inapropiada eliminación de células necesarias para el funcionamiento de la retina madura.

Distintos autores han demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden disparar el programa de muerte celular en el que se activa PARP-1 y se escinde AIF sin activación de caspasas (Dawson y Dawson, 2004; Osborne et al., 2008; van Wijk y Hageman, 2005). Se ha propuesto en estos estudios que la producción intracelular de ROS induce la formación de peroxinitritos, los cuales pueden ocasionar daños en el ADN y activación de PARP-1 (Virag, 2005). Así, durante el desarrollo postnatal de la retina, la formación de peroxinitritos podría producir daños oxidativos en el ADN, con la aparición de roturas de doble cadena, dando lugar a la activación de PARP-1 y a la consecuente formación de polímero PAR. En apoyo de esta hipótesis, Baleriola et al. (2010) han demostrado la producción de daños de doble cadena en el ADN, inductores de muerte celular, durante el desarrollo embrionario de la retina de ratón. Finalmente, la poli-ADP-ribosilación sería responsable de la activación de AIF mitocondrial, que se escindiría para formar AIF truncado, el cual, tras su traslocación al núcleo, promovería la fragmentación del ADN y la condensación nuclear propias de la muerte celular. Por lo tanto, se necesitarían nuevos estudios para demostrar de forma inequívoca la participación de ROS en la muerte celular dependiente de PARP-1 durante el desarrollo postnatal de la retina de ratón.



## **Capítulo II**

---

**Microglía y viabilidad celular en cultivos organotípicos de explantes de retina de ratones postnatales y adultos**



## RESUMEN

En el presente capítulo se ha estudiado la supervivencia y muerte celular, así como la proporción, distribución y morfología de las células microgliales, en explantes de retina de ratones postnatales de 3 y 10 días (P3 y P10) y adultos (P60) cultivados *in vitro* entre 1 y 10 días.

La supervivencia celular se evaluó mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de los explantes, tras marcar las células vivas con diacetato de fluoresceína y las células muertas con yoduro de propidio. La muerte celular era estudiada en secciones histológicas de explantes tratadas con la técnica TUNEL. Para analizar la distribución y morfología de las células microgliales, se utilizaron secciones histológicas de explantes inmunoteñidas con los anticuerpos anti-CD11b y anti-CD45. También se utilizó el anticuerpo anti-CD68, previamente considerado como un marcador de células microgliales activadas. La citometría de flujo de suspensiones celulares tratadas con anti-CD11b y anti-CD68 permitió determinar la proporción de microglía presente en los explantes a diferentes tiempos de cultivo así como su tasa de inmunoreactividad frente a CD68 (IR-CD68).

La estructura general de la retina se conservaba en los explantes, incluso a tiempos prolongados de cultivo *in vitro*, aunque la estructura íntima de las células de cada capa retiniana mostraba progresivos signos de desorganización, sobre todo en los fotorreceptores, conforme se incrementaba el tiempo de cultivo. Sin embargo, los explantes de P10 mantenían una mayor estabilidad estructural a tiempos prolongados de cultivo, en contraste con los explantes de P3 y P60, que mostraban una considerable desorganización a los 10 días *in vitro*.

Los patrones de viabilidad y muerte celular en los explantes a diferentes tiempos de cultivo mostraban una estrecha relación con la edad de la retina. En general, los porcentajes de viabilidad celular eran más elevados en los explantes de retina en desarrollo (P3 y P10) que en los explantes de retina adulta (P60), mientras que la muerte celular era mucho más intensa en estos últimos que en los explantes de P3, con valores intermedios en P10.

La proporción de células microgliales presentes en los explantes no cultivados se incrementaba con la edad de la retina (5% en P3, 8,5% en P10 y 17,5% en P60) y disminuía significativamente durante el tiempo de cultivo, independientemente de la edad de la retina, a pesar de que la microglía mostraba actividad proliferativa. En explantes de retina en desarrollo, tanto de P3 como de P10, esta disminución tenía lugar a tiempos prolongados de cultivo, mientras que en explantes de retina adulta se observaba en los primeros días de cultivo. Estos resultados sugerían que una proporción de células microgliales activadas podrían morir durante el tiempo de cultivo.

Los cambios morfológicos de las células microgliales y su desplazamiento hacia las capas nucleares revelaban la activación microglial durante el cultivo *in vitro* de los explantes de retina. La tasa de IR-CD68 de la microglía disminuía con la edad de la retina (97% en P3, 82% en P10 y 33% en P60), sugiriendo que el marcado con anti-CD68 está más relacionado con el grado de madurez o diferenciación de la microglía que con su grado de activación.

La capa nuclear externa de la retina de ratón *in situ* siempre está desprovista de microglía. Por el contrario, en los explantes cultivados *in vitro*, las células microgliales activadas se introducían en las capas nucleares externa e interna, donde adquirían una forma globosa y fagocitaban grupos de somas celulares, cuyos núcleos eran frecuentemente negativos o débilmente positivos con TUNEL. Estas observaciones sugieren que las células microgliales activadas de los explantes podrían participar en la muerte de células viables, igual que sucede en enfermedades degenerativas de la retina. Por lo tanto, los cultivos organotípicos de explantes de retina podrían ser un buen modelo experimental para investigar los mecanismos de participación de la microglía en procesos degenerativos de la retina.

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos organotípicos de regiones particulares del Sistema Nervioso Central (SNC) conservan la citoarquitectura básica de las mismas, así como la mayor parte de las interacciones celulares y las relaciones entre células y matriz extracelular que tienen lugar en el organismo vivo. Este tipo de cultivos permiten la realización de estudios experimentales que no son accesibles en el SNC *in situ* (Lossi et al., 2009). Por otra parte, los cultivos organotípicos de retina presentan una gran ventaja, ya que se pueden cultivar explantes de retina en los que se mantiene todo el espesor de la misma sin necesidad de realizar rebanadas del tejido, como ocurre en otras regiones del SNC. Esto implica la preservación en el cultivo de la mayoría de las conexiones retinianas. De hecho, la única conexión eliminada es la de los axones de las células ganglionares con el cerebro, como consecuencia de la sección del nervio óptico al realizar el explante. La axotomía de las células ganglionares de la retina produce una degeneración progresiva de las mismas, cuya velocidad está relacionada con la edad de la retina en el momento de preparar el explante, siendo más lenta en explantes de retinas adultas que en retinas postnatales (McKernan et al., 2006).

La localización de las capas de la retina y la distribución de los diferentes tipos neuronales (células amacrinas, bipolares, fotorreceptores) es similar en cultivos organotípicos de explantes de retina y en la retina *in situ* (Caffé et al., 2001; Johansson y Ehinger, 2005; Ogilvie et al., 1999; Pinzón-Duarte et al., 2000). Aunque se ha descrito que la estructura y la función de los fotorreceptores están bien preservadas en cultivos organotípicos de retina (Bandyopadhyay y Rohrer, 2010), parece haber una degeneración progresiva de algunos tipos celulares, además de la de células ganglionares (Engelsberg et al., 2004). En concreto, se ha demostrado una degeneración progresiva de fotorreceptores aparentemente relacionada con la acumulación ectópica del pigmento rodopsina, que deja de estar circunscrito a los segmentos externos de los fotorreceptores para situarse en los somas de los mismos (Mohlin y Johansson, 2011). Esta ubicación de la rodopsina coincide con la activación de una respuesta del retículo

endoplásmico que, a su vez, conduce a la degeneración de la célula. Sin embargo, los procesos de degeneración celular en cultivos organotípicos de explantes de retina son suficientemente lentos y permiten disponer de una “ventana” de tiempo en la que se pueden realizar tratamientos experimentales de explantes con características semejantes a las de la retina *in situ*.

Algunos estudios han utilizado cultivos organotípicos de retinas procedentes de animales con degeneración intrínseca de fotorreceptores, demostrando que dicha degeneración también se produce en las condiciones ambientales *in vitro* y ensayando posibles tratamientos experimentales para rescatar a los fotorreceptores de la degeneración (Arroba et al., 2009; Ogilvie y Speck, 2002). También se han utilizado cultivos organotípicos de diversas regiones del SNC para estudiar aspectos específicos de la fisiología de diferentes tipos celulares, tales como el establecimiento de conexiones sinápticas y sus características (Grimpe et al., 2002; Zhang y Nadler, 2009). Otros estudios han utilizado cultivos organotípicos de diferentes regiones del SNC para estudiar el papel de la microglía en la muerte celular. Así, estudios en cultivos de rebanadas de cerebelo postnatal de ratón han demostrado que las células microgliales inducen muerte neuronal (Marín-Teva et al., 2004), mientras que investigaciones en cultivos organotípicos de hipocampo de ratones postnatales de 7 días sugieren un papel neuroprotector de la microglía (Montero et al., 2009; Montero-Domínguez et al. 2009; Vinet et al., 2012). Por lo tanto, las células microgliales parecen tener efectos contrapuestos en cultivos organotípicos, que aparentemente están en función de la región analizada y de la edad del animal del que se obtiene el explante que va a ser cultivado. En lo que concierne a estudios sobre el comportamiento de las células microgliales en cultivos organotípicos de retina, hay algunos trabajos que muestran la reacción de estas células a manipulaciones del cultivo como infección con citomegalovirus (Zhang et al., 2008), inhibición de la quinasa Rho (Tura et al., 2009) o administración de factores neurotróficos (Arroba et al., 2011). En cualquier caso, los estudios sobre las características y

comportamiento de las células microgliales en cultivos organotípicos de retina son escasos, con la excepción de los que se comentan a continuación.

En uno de ellos (Mertsch et al., 2001), realizado en cultivos de explantes de retina de ratas postnatales, se demostraba que las células microgliales muestran signos de activación (morfología ameboides y aumento de la liberación de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  [TNF $\alpha$ ], interleucina 6 [IL-6] o proteína quimioatrayente de monocitos [MCP-1], también conocida como CCL2) durante los primeros días de cultivo; posteriormente, a partir del sexto día de cultivo, las células microgliales adquirirían una morfología más ramificada, disminuyendo considerablemente la liberación de citoquinas. Después de 6 días de cultivo se conseguía una nueva activación microglial mediante tratamiento con lipopolisacárido (LPS), la cual era transitoria y revertía varios días después de la eliminación del LPS. Las observaciones realizadas en este estudio se centraron en la región más vitreal de la retina, ocupada por la capa de fibras nerviosas y la capa de células ganglionares (CCG), ya que dichas observaciones se llevaron a cabo en montajes totales de los explantes de retina y proporcionaban poca información sobre la respuesta microglial en capas más profundas de la retina.

En otro estudio se realizaron secciones histológicas de explantes de retina cultivados, proporcionando más información sobre la distribución y comportamiento de las células microgliales en todo el espesor de la retina (Engelsberg et al., 2004). Este estudio, realizado en explantes de retina de ratas en su primer día postnatal (P1), describía la inmediata proliferación y activación de células microgliales en la CCG, donde estaba teniendo lugar una masiva cascada de muerte celular aparentemente relacionada con la axotomía de las células ganglionares. Sin embargo, el reclutamiento y la activación de la microglía era mucho más lento en las capas más internas de la retina, llegando a detectar células microgliales en la capa nuclear externa (CNE) al cabo de una semana de cultivo.

Por otra parte, el grado de desarrollo de la retina utilizada en los explantes cultivados parece tener una decisiva influencia en el comportamiento de la microglía durante el tiempo de cultivo. Así, Carrasco et al. (2011) demostraban

que la microglía mantenía un comportamiento aparentemente fisiológico durante la primera semana de cultivo *in vitro* de explantes de retinas de embriones de codorniz entre 7 y 9 días de incubación, mientras que sufría una considerable activación en cultivos organotípicos de retina de embriones de codorniz de edades más avanzadas. En el presente capítulo se ha estudiado el comportamiento de las células microgliales en cultivos organotípicos de explantes de retina de ratones de diferentes edades, con el objetivo de analizar la influencia de la edad sobre dicho comportamiento. Además, se analizaron las modificaciones de la viabilidad y muerte celular en dichos cultivos, ya que el comportamiento microglial puede verse afectado por estos procesos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

En este estudio se emplearon explantes de retina obtenidos a partir de ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6. Se utilizaron ratones postnatales de tres (P3) y diez días (P10) de edad, así como ratones adultos de aproximadamente 60 días de edad (P60). Los ratones eran suministrados por el Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada, siendo sacrificados por decapitación (ratones de P3 y P10) o dislocación cervical (ratones de P60), de acuerdo con las indicaciones del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

### Obtención y cultivo *in vitro* de explantes de retina

La extracción de retinas y la obtención de explantes se hicieron en condiciones de asepsia para evitar contaminaciones, empleando mascarilla, guantes impregnados en alcohol 70° y material quirúrgico autoclavado. Además, la zona de trabajo y el material utilizado fueron expuestos a luz ultravioleta.

Tras el sacrificio de los animales, los ojos se enuclearon y se depositaron en placas de petri estériles de 35 mm de diámetro (Corning, New York, USA) con solución salina balanceada de Gey (Tabla II-1) preparada el mismo día de su utilización, en cuyo seno se disecaron los globos oculares para aislar la retina.

**Tabla II-1.** Composición del medio empleado durante la confección de los explantes de retina

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Procedencia comercial</b>
Solución salina balanceada de Gey (GBSS)	50 ml	Sigma, St. Louis, MO, ref. G9779
Solución acuosa de D(+)-glucosa 45%	555 µl	Sigma, ref. G8769
Penicilina-Estreptomicina (5000U/ml-5000 µg/ml)	500 µl	Sigma, ref. P4458

En el interior de una cabina de flujo laminar vertical (Cruma, Barcelona, España), con la ayuda de una lupa binocular (Nikon, Tokio, Japón), se procedió al aislamiento de los explantes de retina, según el procedimiento esquematizado en la Fig. II-1 y utilizando el instrumental quirúrgico indicado en la Tabla II-2. La adquisición de la destreza suficiente para confeccionar los explantes precisaba de un prolongado tiempo de práctica y, una vez conseguida la habilidad suficiente, la confección de cada explante se conseguía en aproximadamente 10 minutos.

**Tabla II-2.** Instrumental quirúrgico empleado en la confección de los explantes de retina.

<i>Material quirúrgico</i>	<i>Procedencia comercial</i>
Pinzas de disección Dumont nº 5	Fine Science Tools (Heidelberg, Alemania) ref. 11252-30
Microtijeras Pascheff-Wolff MC19/B de Moria	Fine Science Tools, ref.15371-92
Agujas emangadas Moria	Fine Science Tools, ref. 26016-12

Durante el aislamiento de la retina se procuraba eliminar el epitelio pigmentario, aunque generalmente quedaban algunos restos del mismo. A continuación, se eliminaba la parte periférica de la retina, de forma que los explantes obtenidos tenían aproximadamente 3 mm de diámetro y contenían exclusivamente la parte central de la retina. Estos explantes se podían extender fácilmente en un solo plano, ya que mostraban menor tendencia que la retina completa a conservar su forma cóncava natural.

Los explantes se cultivaron siguiendo la metodología descrita previamente (Marín-Teva et al., 2004; Stoppini et al., 1991). Para ello, con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio de bordes romos, cada explante de retina se colocaba sobre una membrana porosa de 0,4 µm de tamaño de poro de un dispositivo Millicell (Millipore, Cork, Irlanda, ref. PICM03050), tal como se esquematiza en la Fig. II-2. Este dispositivo se colocaba en condiciones de esterilidad en un

pocillo de fondo plano de una placa de cultivo con 6 pocillos (Corning). La membrana porosa era incubada a 4°C en el medio de cultivo durante la noche anterior a la realización del experimento. De este modo, dicha membrana estaba bien empapada al inicio del cultivo, ya que su capacidad de absorción de proteínas es baja. En cada pocillo se añadía 1 ml de medio basal de Eagle (BME) suplementado con suero de caballo, cuya composición se muestra en la Tabla II-3. Dicha cantidad permitía que el medio estuviese en contacto con la membrana porosa del dispositivo Millicell, facilitando que los nutrientes del mismo pudieran atravesar la membrana y llegar hasta el explante.

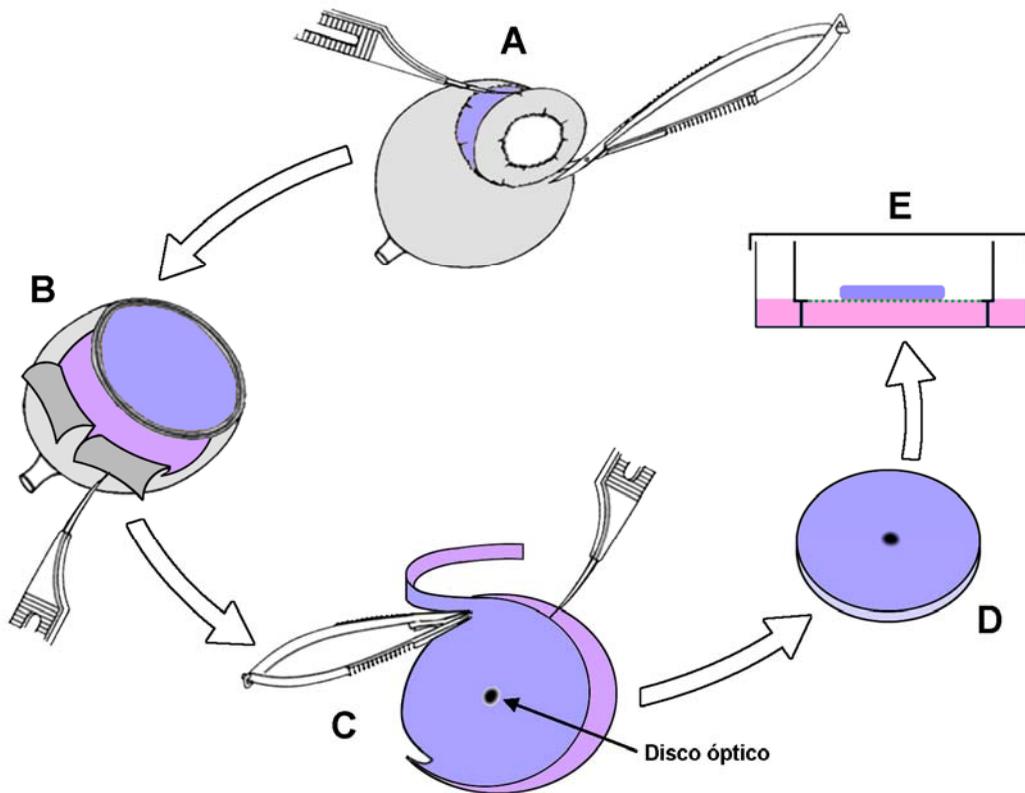
**Tabla II-3.** Composición del medio de incubación empleado para el cultivo *in vitro* de los explantes de retina de ratón

<b>Componentes del medio de cultivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Procedencia comercial</b>
Medio basal de Eagle (BME) con sales de Earle	50%	Invitrogen (Paisley, Reino Unido), ref. 41010-026
Solución salina Hanks	25%	Invitrogen, ref. 14180-046
Suero de caballo	25%	Invitrogen, ref. 16050-122
L-glutamina	1 mM	Invitrogen, ref. 25030-024
Penicilina-estreptomicina	10 UI- $\mu$ g/ml	Sigma, ref. 031MO786
Solución acuosa de D(+)-glucosa 45%	5 mg/ml	Sigma, ref. G8769

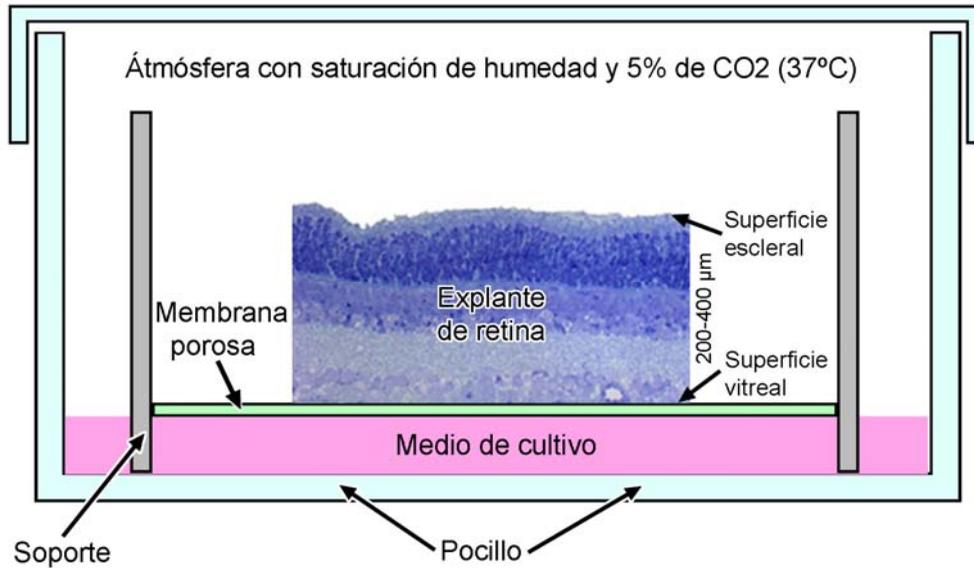
Es importante resaltar que el explante de retina se orientaba con su cara vitreal hacia abajo (Fig. II-2), es decir en contacto con la membrana porosa, mientras que la cara escleral quedaba expuesta a la atmósfera húmeda. Esta orientación de los explantes imitaba la situación fisiológica de la retina *in situ* (Carrasco et al., 2011). Además, la orientación contraria parece contribuir a una disminución del grosor de las capas celulares (Hernández et al., 2009).

Las placas de cultivo con los dispositivos Millicell se mantenían en un incubador de CO<sub>2</sub> (Galaxy S, Cultek, Madrid, España) a 37°C, con atmósfera

saturada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo era renovado cada 48 horas (h). Los explantes se incubaban con estas condiciones durante 2, 3, 4, 6 y 10 días *in vitro* (div). También se utilizaron explantes de retina no cultivados (0 div).



**Fig. II-1.** Procedimiento seguido para obtener explantes de retina que son posteriormente cultivados *in vitro*. **A.** Eliminación de la parte anterior del globo ocular enucleado. **B.** Separación de la esclera y coroides. **C.** Eliminación de la retina periférica. **D.** Explante de retina central. **E.** Cultivo *in vitro* del explante.



**Fig. II-2.** Esquema del dispositivo Millicell, provisto de una membrana porosa, ubicado en cada pocillo de una placa para el cultivo *in vitro* de los explantes de retina. La parte inferior de la membrana porosa se dispone sobre la superficie del medio de cultivo, mientras que su parte superior está en contacto con la superficie vitreal del explante de retina, cuyo grosor no se representa proporcionalmente al resto de elementos, con la finalidad de resaltar la orientación del mismo.

### **Criotomía de explantes de retina**

Los explantes de retina despegados de las membranas Millicell se fijaron en PLP (Yamato et al., 1984) durante 1 hora a 4°C. La composición del PLP era la siguiente: paraformaldehído 2% (Panreac, Barcelona, España, ref. 141451) en tampón fosfato (PB) 0,1M; solución 0,055M de L-lisina (Sigma, ref. L5626) en PB 0,1M; y solución 0,01M de meta-peryodato sódico (Panreac, ref. 131700) en PB 0,1M. Seguidamente, se lavaron a temperatura ambiente en tampón fosfato salino 1X (PBS) con Tritón X-100 (Sigma, ref. 9002-93-1) 0,1% (PBS-Tr) y se crioprotegieron mediante incubación en una solución de sacarosa 20% en PBS-Tr durante 24 horas a 4°C. A continuación, se embebieron en una solución de gelatina 7,5% en PBS-Tr con 10 % de sacarosa. Cada explante embebido en gelatina se extendió en un molde de inclusión “peel away” (EMS, Hatfield, PA, USA, ref. 70180), que se enfriaba en hielo para conseguir la solidificación de la gelatina. Antes de que se completase la solidificación, los explantes se orientaban con la ayuda de una lupa Nikon SMZ800 (Nikon, Tokyo, Japón), disponiéndolos en posición vertical para facilitar la obtención de secciones transversales durante la criotomía.

Cuando la gelatina había alcanzado suficiente consistencia, cada bloque se desmoldó, talló y adhirió a una lámina de corcho con el medio Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda, ref. 4583). Los bloques adheridos al corcho se congelaron con isopentano enfriado en nitrógeno líquido y se almacenaron a -40°C hasta su utilización. Finalmente, con la ayuda de un criostato Leica CM1850 (Leica, Wetzlar, Alemania), se obtuvieron secciones transversales de 20 µm de grosor, que se extendieron sobre portaobjetos Superfrost (Menzel-Glasser, Braunschweig, Alemania, ref. J1800AMNZ), se secaron al aire y se almacenaron a -20°C.

### **Inmunocitoquímica**

Las criosecciones de explantes de retina eran tratadas con técnicas inmunocitoquímicas, empleando los anticuerpos que se incluyen en la tabla II-4.

**Tabla II-4.** Anticuerpos primarios utilizados en las técnicas inmunocitoquímicas, con sus respectivas diluciones

<i>Anticuerpo</i>	<i>Procedencia comercial</i>	<i>Referencia</i>	<i>Dilución</i>
Anti-CD11b de ratón obtenido en rata (monoclonal)	Serotec (Oxford, Reino Unido)	MCA711G	1:100
Anti-CD45 de ratón obtenido en rata (monoclonal)	Serotec	MCA1388	1:40
Anti-CD68 de ratón obtenido en rata (monoclonal)	Serotec	MCA1957	1:40
Anti-Ki67 humano obtenido en conejo (policlonal)	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	ab15580	1:200

Los anticuerpos anti-CD11b y anti-CD45 eran utilizados indistintamente para identificar toda la población de células microgliales de los explantes de retina, ya que ambos marcan tanto la microglía normal como la activada. El anticuerpo anti-CD11b reconoce una integrina de cadena  $\alpha$ M presente en la superficie de macrófagos, granulocitos, monocitos y células microgliales. CD11b, también conocida como Mac-1 y CR3 (receptor del complemento tipo 3), se expresa de forma constitutiva en las células microgliales, aunque su expresión es mayor en la microglía activada. Dicha integrina participa en mecanismos de adhesión intercelular, migración, fagocitosis y en interacciones celulares con moléculas del complemento. El anticuerpo anti-CD45 reconoce una tirosinafosfatasa presente en la membrana de todas las células de linaje macrófagos-monocitos, incluyendo las células microgliales (Penninger et al., 2001; Sedgwick et al., 1991). Este anticuerpo reconoce una banda de 170 kDa en Western blots de extractos de cerebro de ratón (Cuadros et al., 2006).

El anticuerpo anti-CD68 era utilizado en el presente estudio en un intento de identificar las células microgliales activadas de los explantes de retina. Este anticuerpo reconoce una glicoproteína de membrana fuertemente glicosilada, denominada macrosialina, que es la homóloga murina del CD68 humano y está

presente en los lisosomas de las células de linaje macrofágico. Con Western blot, dicho anticuerpo reconoce una serie de bandas entre 87 y 115 kDa, correspondientes a diferentes grados de glicosilación de la proteína aparentemente relacionados con el grado de activación celular y la fagocitosis (da Silva y Gordon, 1999).

El anticuerpo anti-Ki67 era usado para identificar las células microgliales con actividad proliferativa, ya que reconoce una proteína de 345-395 kDa presente en el núcleo de células proliferantes (Schluter et al., 1993), siendo considerado un marcador de proliferación. Anti-Ki67 reconoce un péptido (secuencia EDLAGFK ELFQTP) localizado entre los residuos 1200-1300 de la proteína Ki67 de varias especies.

Las criosecciones adheridas sobre portaobjetos Superfrost se dejaron descongelar durante 15-20 minutos y se hidrataron durante 20-40 minutos en PBS. A continuación, se permeabilizaron durante 5-10 minutos en PBS-Tr, para facilitar la penetración de los anticuerpos. Los sitios antigénicos no específicos se bloquearon durante 45-60 minutos con suero normal de cabra (NGS, Sigma, ref. G9023) diluido al 10% en PBS al que se añadía 1% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, ref. A9647). Sin hacer lavado posterior al bloqueo, las secciones se incubaron durante 24-48 horas a 4°C (o 2 horas a temperatura ambiente) en alguno de los anticuerpos primarios mostrados en la tabla II-4, a la dilución indicada en la misma. Las secciones se lavaron tres veces en PBS y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico, diluido 1:500 en PBS con BSA 1%. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de rata obtenida en cabra, conjugada con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, ref. A11006) o con Alexa Fluor-594 (Molecular Probes, ref. A11007), para revelar los anticuerpos primarios monoclonales, y anti-IgG de conejo obtenido en cabra, conjugado con Alexa-Fluor-594 (Molecular Probes, ref. A11012), para revelar el anticuerpo policlonal anti-Ki67.

Tras la incubación en el correspondiente anticuerpo secundario, las secciones se lavaron tres veces con PBS. Seguidamente, los núcleos celulares eran

marcados con fluorescencia azul mediante tratamiento durante 2-3 minutos, a temperatura ambiente, con una solución de Hoechst 33342 (bisbenzimidaz, Sigma, ref. B2261) a una dilución de 1:1000, conseguida a partir de una solución madre acuosa de Hoechst (10 mg/ml) que era diluida con PBS. Finalmente, las secciones se lavaron y se montaron en el medio de montaje Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA, ref. 0100-01).

Se comprobó la especificidad de cada tinción inmunocitoquímica mediante la utilización de controles negativos, en los que se omitió el tratamiento con el anticuerpo primario, confirmándose la ausencia de tinción.

Algunas secciones fueron sometidas a doble tinción inmunocitoquímica anti-CD11b/anti-Ki67. Para ello, tras la hidratación, permeabilización y bloqueo de los sitios antigénicos no específicos con NGS-BSA, las secciones se trataron primero con una mezcla de los dos anticuerpos primarios y a continuación con una mezcla de los anticuerpos secundarios (anti-IgG de rata conjugado con Alexa Fluor-488 y anti-IgG de conejo conjugado con Alexa-Fluor-594), seguido de la tinción con Hoechst 33342.

También se hicieron dobles tinciones anti-CD11b/anti-CD68. Al tratarse de dos anticuerpos monoclonales obtenidos en rata, las secciones no fueron tratadas con mezclas de anticuerpos, sino que se hicieron inmunotinciones sucesivas con cada anticuerpo primario y su respectivo anticuerpo secundario, con un intenso lavado y bloqueo de sitios antigénicos entre ambas inmunotinciones. Concretamente, las secciones hidratadas y permeabilizadas fueron bloqueadas con NGS-BSA durante 60 minutos, incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el primer anticuerpo primario (anti-CD68), lavadas tres veces con PBS e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con Alexa Fluor-488. Seguidamente, se hicieron tres lavados con PBS, se comprobó al microscopio la señal de fluorescencia y se hizo un nuevo lavado en PBS durante toda la noche a 4°C. Tras una nueva comprobación al microscopio de la señal de fluorescencia, los sitios antigénicos no específicos fueron bloqueados de nuevo con NGS-BSA durante 60 minutos. A

continuación, las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo primario (anti-CD11b), se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con Alexa Fluor-594. Tras una nueva observación microscópica para asegurar que el primer anticuerpo secundario no había sido desplazado por el segundo, las secciones se lavaron tres veces con PBS, se tiñeron con Hoechst 33342, se lavaron nuevamente y se montaron con Fluoromount G.

### **Histoquímica TUNEL**

La presencia de células muertas en los explantes de retina a diferentes tiempos de cultivo se puso de manifiesto mediante la técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling, Gravrieli et al., 1992). Las criosecciones de explantes de retina se extrajeron del congelador y se mantuvieron durante 15-20 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. Seguidamente, se hidrataron en PBS durante 10-20 minutos, se permeabilizaron en PBS-Tr durante 10 minutos, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 1 h, a 37°C, en la solución TUNEL. Esta solución contenía 0,01 unidades/ $\mu$ l del enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT, Promega, Madison, WI, USA, ref. M1875) en tampón TdT (Promega, ref. M1893, pH 6,8) y 3 nmoles/ml del nucleótido desoxiuridín-trifosfato conjugado con tetrametilrodamina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, ref. 11534378910). A continuación, las secciones se lavaron en PBS, se trataron con Hoechst 33342 (dilución 1:1000) para marcar los núcleos celulares, se lavaron nuevamente en PBS y se montaron con Fluoromount G.

En algunas secciones se hizo un doble marcado TUNEL/anti-CD11b o TUNEL/anti-CD45. En estos casos, primero se llevaba a cabo el tratamiento inmunofluorescente de las secciones descrito en el apartado anterior, en el que se utilizaba un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor-488, y seguidamente éstas se trataban con la técnica TUNEL recién descrita.

### **Microscopía óptica**

Las micrografías de secciones de explantes de retina tratadas con inmunofluorescencia o TUNEL, así como de secciones semifinas (ver más adelante), fueron obtenidas en un microscopio Zeiss AxioPhot (Zeiss, Oberkochen, Alemania) provisto con un cámara digital Zeiss AxioCam. También se obtuvieron imágenes de microscopía confocal de campos microscópicos seleccionados en secciones tratadas con inmunofluorescencia o TUNEL. Estas imágenes eran obtenidas con un microscopio Leitz DMRB equipado con el sistema de barrido láser confocal Leica TCS-SP5 (Leica) en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada (UGR). En cada campo seleccionado se obtuvieron series de secciones ópticas en el plano horizontal (XY) a intervalos de 0,5-1  $\mu\text{m}$  en el eje vertical Z. A continuación, se utilizó el software de barrido láser confocal de Leica para obtener imágenes de proyección a partir de la superposición de secciones ópticas, lo que permitía observar las células microgliales contenidas en cada campo y sus ramificaciones. Las imágenes obtenidas se almacenaron en formato TIFF, ajustándoles el brillo y el contraste con Adobe Photoshop 8.0.1 (Adobe Systems, San José, CA, USA).

### **Microscopía electrónica de transmisión**

Se efectuaron observaciones con microscopía electrónica de transmisión de explantes de retina de P10 para comprobar los cambios estructurales de los mismos a lo largo del tiempo de cultivo. Con esta finalidad, se emplearon tres explantes procedentes de animales diferentes de los siguientes tiempos de cultivo: P10+0div, P10+2div, P10+3div y P10+10div.

Los explantes se fijaron durante 2 horas a 4°C en una mezcla de glutaraldehído (Merck, Darmstadt, Alemania, ref. 104239) 2% y paraformaldehído (Merck, ref. 104005) 1% en tampón cacodilato (Merck, ref. 820670) 0,05M que contenía una concentración 2mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y 0,03 g/l de sacarosa (pH 7,4), post-fijados durante 1 hora en solución acuosa de tetróxido de osmio (EMS, ref. 19110) 1%, deshidratados mediante sucesivos pasos por etanol

de concentraciones crecientes e incluidos en resina Epon (EMS, ref. 14130). Con la ayuda de un ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Reichert-Jung, Heidelberg, Alemania), se realizaron secciones semifinas de 1  $\mu\text{m}$  de grosor y ultrafinas (500-700 Å). Las primeras fueron teñidas con una solución acuosa de azul de toluidina (EMS, ref. 22050) 1% y bórax (Merck, ref. 106308), siendo observadas con el microscopio Zeiss Axiophot. Las secciones ultrafinas se montaron en rejillas de cobre (EMS, ref. G200H-Cu) y se contrastaron con acetato de uranilo (EMS, ref. 22400) y citrato de plomo, obtenido tras la reacción de nitrato de plomo (Merck, ref. 107398) y citrato sódico (Merck, ref. 106432), según la fórmula de Reynolds (Reynolds, 1963). Las observaciones se hicieron en los microscopios electrónicos de transmisión Zeiss EM902 y Zeiss Libra 120 Plus del CIC de la UGR.

### **Análisis cuantitativo de perfiles TUNEL-positivos**

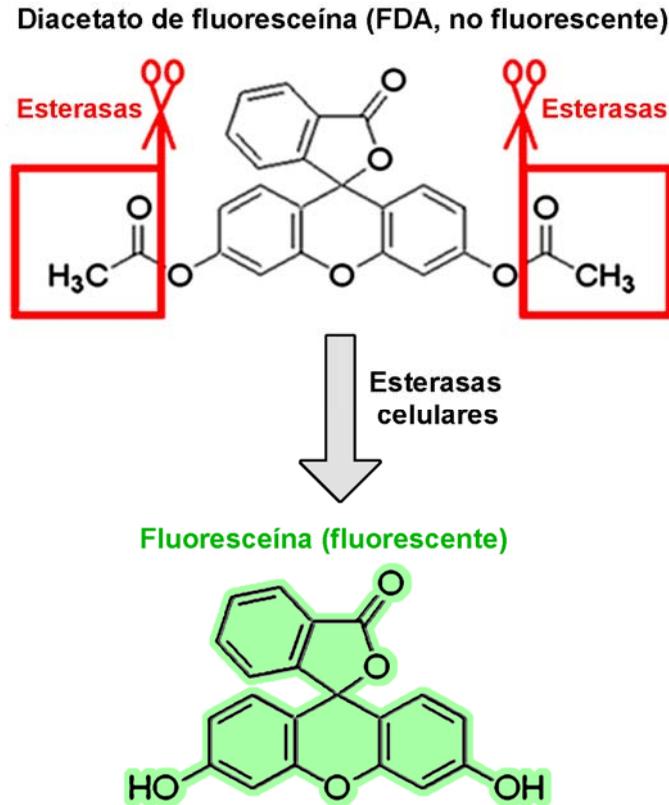
Se realizó un estudio cuantitativo para determinar la densidad de fragmentos de células muertas presentes en explantes de retina de cada edad y tiempo de cultivo. Para ello, se hicieron recuentos de perfiles TUNEL-positivos en secciones transversales de 20  $\mu\text{m}$ , seleccionadas al azar cada 140  $\mu\text{m}$ . Para ello, las secciones obtenidas de la zona central de cada explante de retina se disponían alternativamente sobre siete portaobjetos, hasta un total de cinco secciones por cada portaobjetos. Seguidamente, se seleccionaba al azar un portaobjetos y se efectuaban recuentos en las secciones contenidas en el mismo. Actuando de este modo, los recuentos se efectuaron en al menos tres explantes para cada edad y tiempo de cultivo. En cada sección seleccionada, se contó el número de perfiles TUNEL-positivos y se midió el área de la misma, que era determinada mediante el empleo del programa de procesamiento de imágenes digitales Image J (NIH). A partir de ambos valores se calculó la densidad de perfiles TUNEL-positivos, expresada como número de perfiles por cada 100  $\mu\text{m}^2$ . De los valores de densidad obtenidos en las diferentes secciones analizadas en cada explante, se obtenía la densidad media de perfiles TUNEL-positivos para cada edad y tiempo de cultivo.

### **Determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo**

La viabilidad celular en los explantes de retina era determinada mediante citometría de flujo, según la técnica de Jones y Senft (1985). Con esta técnica se evaluaba la proporción de células vivas presentes en suspensiones celulares obtenidas mediante disociación de explantes incubados con diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma, ref. F7378) y yoduro de propidio (IP, Sigma, ref. P4170).

El FDA es un indicador de la actividad esterasa. Se trata de una molécula no polar que atraviesa la membrana plasmática y es hidrolizada por las esterasas intracelulares funcionalmente activas de las células vivas, con la consiguiente formación de fluoresceína, que emite fluorescencia verde cuando es excitada con luz de longitud de onda de 488 nm (Fig. II-3). La fluoresceína solo es retenida en el interior de las células cuando éstas mantienen la integridad de su membrana, lo que no sucede en células muertas. Por lo tanto, las células vivas emiten fluorescencia verde tras la incubación con FDA, mientras que las células muertas no lo hacen porque son incapaces de hidrolizar el FDA y/o retener la fluoresceína.

El IP es un indicador de células no viables que emite fluorescencia roja tras su excitación con luz de longitud de onda de 488 nm. Se trata de un agente intercalante del ADN incapaz de atravesar las membranas celulares intactas, por lo que solo se une al ADN en aquellas células que han perdido la integridad de sus membranas, es decir que no son viables. De esta forma, todas las células con membrana plasmática deteriorada (no viables) muestran núcleos con fluorescencia roja tras la incorporación del IP en la cromatina, pudiendo ser detectadas en el citómetro de flujo.



**Fig. II-3.** Esquema de una molécula no fluorescente de diacetato de fluoresceína (FDA, arriba), en la que se resaltan los dos grupos acetato (cuadros de contorno rojo) unidos mediante enlaces tipo éster, que son susceptibles de ser hidrolizados (tijeras rojas) en células viables por esterasas intracelulares, dando lugar a una molécula de fluoresceína que emite fluorescencia (abajo).

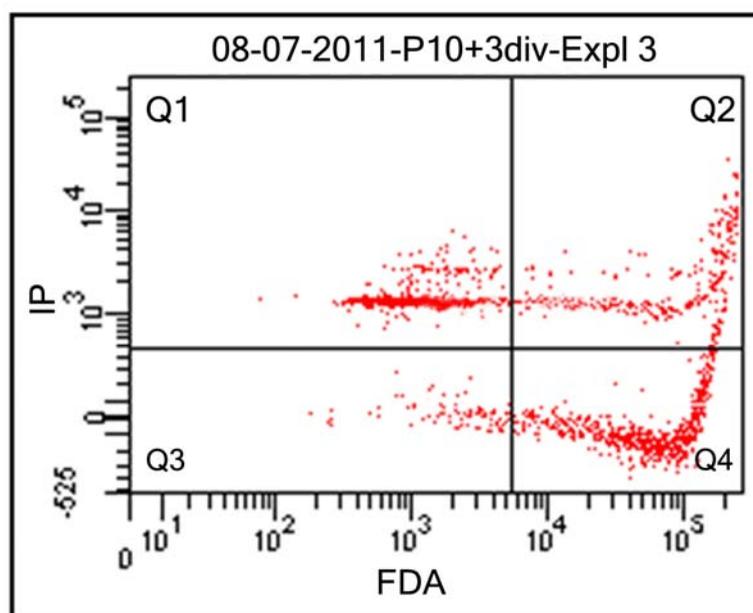
Tras despegar los explantes de la membrana Millicell con PBS, cada uno de ellos se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad, durante 10 minutos, en un vial Eppendorf de 1,5 ml con una solución compuesta por 1 ml de PBS, 10  $\mu$ l de una solución de FDA en acetona (a una concentración de 1,5 mg/ml) y 10  $\mu$ l de una solución acuosa de IP (a una concentración de 1 mg/ml). Las soluciones de IP y FDA se conservaban a 4°C. Seguidamente, la solución con los explantes se trasladó a un homogenizador de vidrio tipo Dounce de émbolo no esmerilado (Pobel, Madrid, España), procediendo a una primera disgregación de los explantes. El primer disgregado se pasó a otro vial Eppendorf, llevando a cabo una nueva y más eficaz disgregación mediante repetidos pasos a través de una jeringa con aguja de 0,33 mm x 1,27 mm (Micro-Fine 29 Gauge, Becton-Dickinson, San José, California, USA). Este protocolo de disgregación permitía obtener un número adecuado de partículas cuyo tamaño correspondía a células individuales, tal como se pudo evaluar en el citómetro de flujo a través de la ventana de tamaño de partículas (forward scatter).

La cuantificación de células viables se realizó en dos citómetros del CIC de la UGR, FACS Vantage y FACS Canto II (Becton-Dickinson), utilizando los softwares CellQuest v.3.1 y FACS Diva v.6.1 (Becton-Dickinson), respectivamente. La excitación, tanto para el FDA como para el IP, se llevó a cabo mediante láser azul de 488 nm, efectuando la lectura en un fotomultiplicador a través de filtro BP (Band Pass) de  $530 \pm 20$  nm para el FDA y  $580 \pm 30$  nm para el IP.

Antes de efectuar las medidas de viabilidad celular en los diferentes explantes, se realizó una estandarización de los rangos de tamaño de células individuales y de intensidad de fluorescencia para cada grupo de edad (P3, P10 y P60). En dicha estandarización se utilizaron tres muestras estándar: blanca, verde y roja. La muestra estándar blanca era una suspensión celular procedente de un explante de una determinada edad disgregado en 1 ml de PBS. Esta muestra era utilizada para definir la ventana de tamaños de partículas correspondientes a células individuales y también permitía determinar el marcaje de fondo no

específico de las muestras. La muestra estándar verde consistía en una suspensión celular de un explante incubada en PBS-FDA y se utilizaba para definir la ventana de intensidad de fluorescencia verde emitida por el FDA. La muestra estándar roja se incubaba en PBS-IP y servía para definir la ventana de intensidad de fluorescencia roja emitida por el IP.

Una vez estandarizado el citómetro para cada grupo de edad, se utilizaron las suspensiones celulares de explantes de dicha edad y diferentes tiempos de cultivo *in vitro* para determinar el porcentaje de células viables (FDA-positivas) en las mismas, con la ayuda del software de adquisición y análisis de datos del citómetro. Para cada explante, se capturaba una muestra de 10.000 partículas del correspondiente vial y, tras eliminar las que no entraban en la ventana de tamaños de células individuales definida durante la estandarización del citómetro, se obtenía una población P1 de células individuales que se representaba gráficamente en un perfil de citometría de flujo (Fig. II-4). Esta población aparecía dividida en cuatro subpoblaciones de partículas ubicadas en cuatro cuadrantes (Q1 a Q4) definidos en función de sus respectivas fluorescencias.



Tube Name:		P10+3div-Expl 3					
Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total	FDA Mean	IP Mean	
■	All Events	####	10,000	####	100.0	15,992	1,062
■	P1	All Events	1,585	15.8	15.8	50,986	1,079
☒	Q1	P1	565	35.6	5.6	1,267	1,464
☒	Q2	P1	308	19.4	3.1	114,924	3,012
☒	Q3	P1	81	5.1	0.8	2,492	20
☒	Q4	P1	631	39.8	6.3	70,521	-74

**Fig. II-4.** Perfil de citometría de flujo para medir la viabilidad celular de un explante de retina, obtenido en el citómetro BECTON DICKINSON FACS Canto II con el software de adquisición y análisis FACS Diva. En este ejemplo de perfil, del total de 10.000 partículas analizadas, solo 1.585 cumplían los requisitos de tamaño de células individuales definidos en la estandarización del citómetro y se muestran agrupadas en cuatro cuadrantes (Q1 a Q4). En el cuadrante Q1 se representan las células teñidas exclusivamente con yoduro de propidio (IP). El cuadrante Q2 agrupa a células doblemente teñidas con IP y diacetato de fluoresceína (FDA). En Q3 se incluyen partículas carentes de fluorescencia, que probablemente no son células individuales. El cuadrante Q4 contiene células teñidas exclusivamente con FDA. En el cuadro inferior se indican los números de partículas presentes en cada cuadrante y el porcentaje de las mismas.

El cuadrante Q1 incluía partículas con fluorescencia roja, pertenecientes a la población de células muertas teñidas con IP. Q2 agrupaba partículas con fluorescencia verde y roja, que representaban células doblemente teñidas con FDA e IP. La doble tinción era debida a que dichas células eran viables al comenzar la incubación con las moléculas fluorescentes, por lo que se marcaban con FDA, pero se habían dañado durante la fase de disgregación celular, por lo que también se marcaban con IP. El cuadrante Q3 contenía partículas que no emitían fluorescencia ya que, por circunstancias desconocidas, no se habían teñido con FDA ni con IP. Por lo tanto, no se consideraban células aunque estaban dentro de la ventana de tamaño de células individuales. Por lo general, el porcentaje de partículas de este cuadrante era bajo (alrededor del 5%), pero cuando dicho porcentaje era excepcionalmente elevado (por encima del 15%) la muestra era descartada, no siendo considerada para el análisis estadístico. Finalmente, Q4 agrupaba partículas con fluorescencia verde que correspondían a la población de células viables marcadas con FDA.

A partir de los datos proporcionados por el citómetro se obtenía la proporción de células viables presentes en cada suspensión celular analizada. Dicha proporción correspondía al cociente de dividir el número de células viables FDA-positivas (suma de partículas de Q2+Q4) entre el número total de células de la población analizada (suma de partículas de Q1+Q2+Q4). Las partículas del cuadrante Q3 no se consideraban, ya que la ausencia de fluorescencia en las mismas indicaba que no eran células. Este cociente se multiplicaba por 100 para expresar la viabilidad celular en forma de porcentaje. Así, la viabilidad celular se expresaba mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{Q2 + Q4}{Q1 + Q2 + Q4} \times 100$$

Se determinó la viabilidad celular media de los explantes para cada edad y tiempo de cultivo a partir de los análisis efectuados en al menos cinco suspensiones celulares de explantes diferentes por cada edad y tiempo de cultivo.

### **Determinación de la proporción de células microgliales y tasa de inmunoreactividad para CD68 mediante citometría de flujo**

La cuantificación de las células microgliales y de su tasa de inmunorreactividad para CD68 (IR-CD68) se llevó a cabo mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes de retina incubadas con los anticuerpos anti-CD11b y anti-CD68 conjugados con los fluorocromos ficoeritrina y fluoresceína, respectivamente (Tabla II-5). Como se ha descrito con anterioridad, anti-CD11b identifica toda la población de células microgliales, tanto normales como activadas, mientras que anti-CD68 ha sido utilizado en algunos estudios como un marcador de células microgliales activadas.

**Tabla II-5.** Anticuerpos utilizados para la cuantificación de células microgliales mediante citometría de flujo

<i>Anticuerpo</i>	<i>Procedencia comercial</i>	<i>Referencia</i>	<i>Dilución</i>
Anti-CD11b de ratón obtenido en rata conjugado con ficoeritrina	Serotec	MCA711PE	1:25
Anti-CD68 de ratón obtenido en rata conjugado con fluoresceína	Serotec	MCA1957F	1:25

El protocolo de disgregación celular de los explantes para la obtención de suspensiones de células individualizadas era similar al descrito anteriormente para el análisis de la viabilidad, aunque en este caso los explantes eran previamente sometidos a una moderada fijación. Así, cada explante era despegado de la membrana Millicell sobre la que se había cultivado y se trasladaba a un pocillo de una placa de 24 pocillos que contenía paraformaldehído 1% en PBS, en el que se incubaba durante 20-40 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se hicieron tres lavados de 5 minutos en PBS con Tween-20 (Panreac, ref. 142312) 0,1%, una permeabilización de 10 minutos en PBS con Tritón X-100 0,5% y tres nuevos lavados de 5 minutos en PBS. La permeabilización era necesaria para facilitar la penetración del anticuerpo anti-CD68, cuyo antígeno específico es de

localización intracelular. Finalmente, los explantes se trasladaron a un vial Eppendorf con 500  $\mu$ l de PBS y se disgregaron en un homogeneizador tipo Dounce con émbolo no esmerilado y mediante pasos repetidos a través de una aguja de 0,33 mm, tal como se ha descrito en el apartado anterior. Una vez obtenida la suspensión celular de cada explante, se le añadieron los anticuerpos con las diluciones indicadas en la tabla II-5, incubándola durante 2 horas a temperatura ambiente, o bien durante 24 horas a 4°C.

El análisis cuantitativo de células CD11b-positivas y CD68-positivas se llevó a cabo en los dos citómetros de flujo indicados en el apartado anterior. Los dos marcadores fluorescentes se excitaron con láser azul (488 nm) y las medidas se efectuaron en un fotomultiplicador con filtros BP (Band Pass) de  $530 \pm 20$  nm para anti-CD68-fluoresceína y  $570 \pm 20$  nm para anti-CD11b-ficoeritrina.

Igual que en los ensayos de viabilidad celular, se efectuó una estandarización de los rangos de tamaño de célula microglial individual y de la intensidad de fluorescencia para las muestras de cada grupo de edad. Para ello se emplearon muestras estándar blanca, verde y roja, que eran suspensiones celulares obtenidas según el protocolo ya descrito, sin añadir ninguno de los anticuerpos fluorescentes (muestra estándar blanca) o añadiendo uno solo de dichos anticuerpos (anti-CD68-fluoresceína en la muestra estándar verde o anti-CD11b-ficoeritrina en la muestra estándar roja).

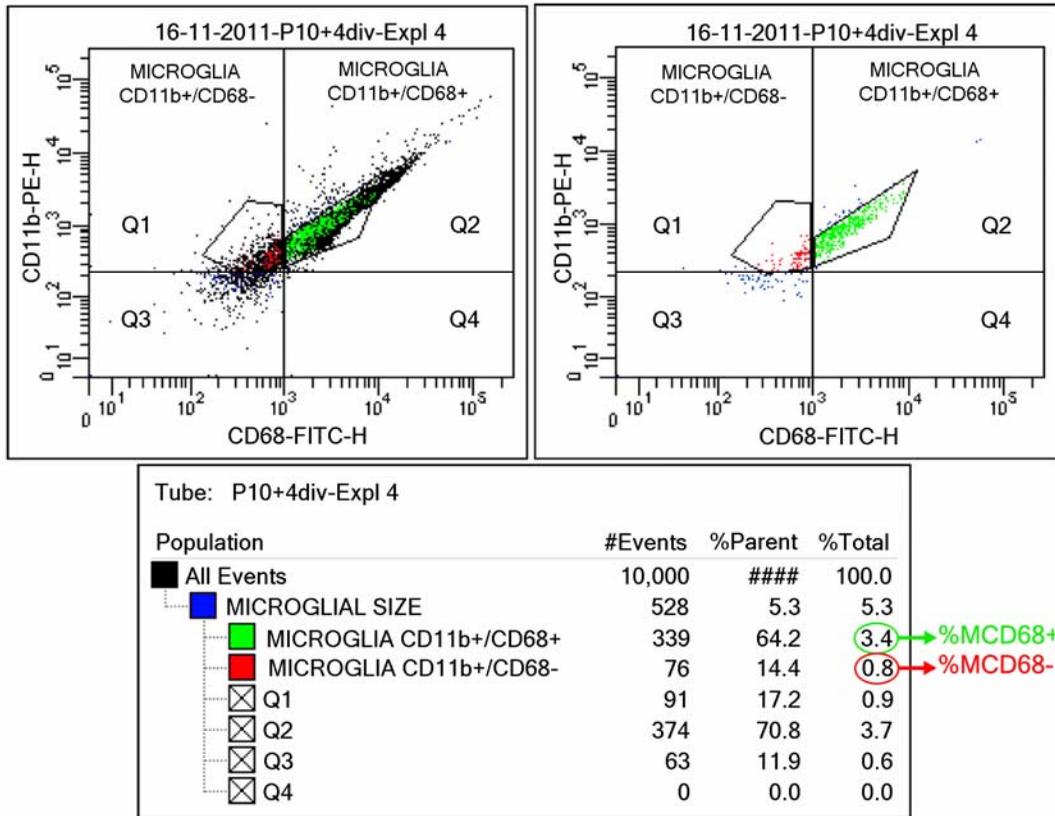
Una vez estandarizado el citómetro para cada grupo de edad, se analizaron las diferentes muestras de explantes de esa edad con el software de adquisición y análisis FACS Diva v.6.1. En cada muestra se analizó una población total de 10.000 partículas, que permitía obtener el correspondiente perfil de citometría de flujo (perfil de la izquierda en la Fig. II-5). Del total de partículas analizadas, se seleccionaban solamente las que cumplían los requisitos de tamaño de célula microglial establecidos durante la estandarización del citómetro, obteniéndose un perfil de citometría depurado (perfil de la derecha en la Fig. II-5). El cuadrante Q1 de dicho perfil contenía partículas con fluorescencia exclusivamente roja (CD11b-positivas y CD68-negativas), mientras que el cuadrante Q2 contenía partículas con

fluorescencia roja y verde (CD11b-positivas y CD68-positivas) y el cuadrante Q3 incluía partículas sin fluorescencia. Por otra parte, en los cuadrantes Q1 y Q2 se habían establecido sendas ventanas (polígonos en los perfiles de citometría de la Fig. II-5) en las que se seleccionaban partículas cuya intensidad de fluorescencia se ajustaba al rango establecido durante la estandarización del citómetro para las células microgliales (puntos rojos y verdes en la Fig. II-5), descartándose las restantes partículas (puntos azules en la Fig. II-5). Por lo tanto, la ventana de fluorescencia del cuadrante Q1 incluía células microgliales CD11b-positivas y CD68-negativas, mientras que la ventana del cuadrante Q2 contenía células con doble fluorescencia para CD11b y CD68.

Los datos proporcionados por el citómetro incluían los porcentajes de microglía CD11b-positiva y CD68-negativa (%MCD68<sup>-</sup> en la Fig. II-5) y de microglía CD11b-positiva y CD68-positiva (%MCD68<sup>+</sup> en la Fig. II-5) presentes en el explante del que se había obtenido la suspensión celular analizada. Por lo tanto, la proporción de la población de microglía en relación con la población total de células del explante era la suma de ambos porcentajes. La tasa de IR-CD68 de la microglía era el porcentaje de células microgliales CD68-positivas respecto de la población total de microglía (CD68-positiva y CD68-negativa) y se calculaba mediante la expresión

$$\text{Tasa de IR-CD68} = \frac{\%MCD68^{+}}{\%MCD68^{+} + \%MCD68^{-}} \times 100$$

Los valores medios de proporción de células microgliales y tasa de IR-CD68 de los explantes fueron determinados para cada edad y tiempo de cultivo a partir de los análisis efectuados en al menos cinco suspensiones celulares de explantes diferentes por cada edad y tiempo de cultivo.



**Fig. II-5.** Perfiles de citometría de flujo obtenidos en el citómetro BECTON DICKINSON FACS Canto II con el software FACS Diva tras el análisis de una muestra procedente de una suspensión celular de un explante de retina incubada con los anticuerpos fluorescentes anti-CD11b-ficoeritrina, que marca con fluorescencia roja toda la microglía, y anti-CD68-fluoresceína, que marca con fluorescencia verde una subpoblación de microglía. El perfil de la derecha es idéntico al de la izquierda, pero eliminando los puntos representados en negro, que corresponden a partículas que no se ajustan al rango de tamaño microglial definido en la estandarización del citómetro. Los polígonos representados en los cuadrantes Q1 y Q2 del perfil de la derecha incluyen partículas cuyos rangos de intensidad de fluorescencia se ajustan a los definidos para la microglía CD11b-positiva y CD68-negativa (puntos rojos) y para la microglía CD11b-positiva y CD68-positiva (puntos verdes), respectivamente. Los puntos azules situados fuera de los polígonos representan partículas cuyos rangos de fluorescencia no se ajustan a los definidos para la microglía. En el cuadro inferior se indican los números absolutos de microglía CD68-positiva y CD68-negativa y sus respectivos porcentajes (%MCD68+ y %MCD68-) en relación al número total de partículas analizadas (10.000).

**Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en los estudios cuantitativos se expresaron como medias  $\pm$  errores estándar de la media. Para poner de manifiesto posibles diferencias significativas entre las medias obtenidas se realizaron análisis estadísticos mediante tests de la t de Student. El paquete estadístico utilizado era SPSS19 (IBM).

## RESULTADOS

En el presente estudio se han utilizado explantes de retina procedentes de ratones de tres edades diferentes que corresponden a la primera (P3) y segunda (P10) semana de desarrollo postnatal y a la edad adulta (P60). Estas edades se escogieron para determinar si el grado de maduración de las células microgliales y de las neuronas en el momento de realizar el explante afectaba al comportamiento de las células microgliales en los cultivos organotípicos de retina. Antes de analizar el comportamiento de la microglía en los explantes a diferentes tiempos de incubación *in vitro*, se estudiaron los cambios en la estructura retiniana y en la supervivencia y muerte celular observados durante el cultivo de los explantes.

### **Alteraciones estructurales en los explantes de retina a diferentes tiempos de cultivo *in vitro***

La estructura general de la retina en los explantes cultivados era puesta de manifiesto mediante la tinción con Hoechst 33342 de las capas nucleares (Fig. II-6), la cual permitía apreciar los cambios sufridos por la organización laminar de dichos explantes durante el periodo de cultivo. En explantes de P3+0div (Fig. II-6A), la parte escleral de la retina estaba ocupada por la capa neuroblástica (CNb), que era muy gruesa y contenía numerosos núcleos densamente empaquetados. La capa plexiforme externa (CPE) todavía no se había desarrollado en el centro de la CNb, pero sí se observaba la capa plexiforme interna (CPI) que separaba la CNb de la CCG. Dicha CPI era todavía muy delgada, mientras que la CCG mostraba un considerable grosor. Durante los primeros días de cultivo *in vitro*, los explantes de P3 disminuían de espesor como consecuencia del ligero aplastamiento que sufre la pared retiniana cuando se cultiva sobre la membrana porosa, igual que ocurre en cultivos de rebanadas de órganos. Por lo tanto, el espesor de los explantes era menor en P3+3div que en P3+0div (comparar A y B en Fig. II-6). A pesar de esta disminución de grosor, la estructura de la retina se desarrollaba durante los primeros días de cultivo *in vitro* de forma similar a como lo hace *in situ*. Así, la CPE era ya claramente observable en P3+3div (Fig. II-6B), dando lugar a la

subdivisión de la CNb en CNE y capa nuclear interna (CNI). Este tiempo de aparición de la CNE y CNI en los explantes de retina de P3+3div coincidía aproximadamente con el descrito en la retina *in situ* (Johansson y Ehinger, 2005; Ogilvie et al., 1999; Pinzón-Duarte et al., 2000). Durante la segunda mitad de la primera semana de incubación *in vitro*, los explantes aparecían ligeramente plegados y las capas de la retina eran aparentemente normales, con la excepción de que la CPI no llegaba a adquirir un espesor como el mostrado *in situ*. Sin embargo, durante la segunda semana de cultivo, se apreciaban evidentes signos de desorganización en la CNE, con la formación de profundos pliegues y la apertura de amplios huecos entre los fotorreceptores (Fig. II-6C). Además, también se apreciaba una degradación de la CNI, cuyo grosor era irregular y considerablemente menor que el observado en explantes de P3+3div. La CCG seguía estando presente.

En los explantes de retina de P10+0div ya estaban presentes todas las capas de la retina, incluyendo la CPE (Fig. II-6D), cuyo grosor era mucho menor que el de la CPI. Igual que en los explantes de P3, los explantes de P10 sufrían un aplastamiento durante los primeros días de cultivo, que daba lugar a una disminución del espesor de la retina. En explantes de P10+3div, la estructura de la retina apenas sufría alteraciones (Fig. II-6E), exceptuando una aparente pérdida de células ganglionares. A tiempos prolongados de cultivo, los explantes de P10 (P10+10div) mostraban una citoarquitectura general mucho menos desorganizada que la observada en explantes de P3+10div (Fig. II-6F). Así, la CCG y la CNI conservaban una apariencia similar a la observada en P10+3div y solo la CNE mostraba una superficie algo irregular, pero sin llegar a presentar amplios huecos como los que se apreciaban en explantes de P3+10div.

En explantes de P60+0div, la citoarquitectura de la retina mostraba caracteres maduros, con una CPE más gruesa que en explantes de P10+0div y una CCG más delgada (Fig. II-6G). En los primeros días de cultivo *in vitro*, las capas de la retina no mostraban grandes cambios, aunque en explantes de P60+3div la superficie de la CPE era ligeramente irregular, observándose algunos

fotorreceptores desprendidos, y la CCG era menos densa (Fig. II-6H) que en P60+0div. En tiempos prolongados de cultivo (P60+10div), los explantes mostraban signos de desorganización, sobre todo en la CNI, cuyo espesor y densidad celular eran menores que durante la primera semana de cultivo (Fig. II-6I). La superficie escleral de la CNE presentaba irregularidades y desprendimiento de algunas células, sin llegar a mostrar amplios huecos, mientras que la CCG era discontinua como consecuencia de la desaparición de una gran proporción de células.

Los anteriores resultados demostraban que P10 era la edad de los explantes en la que éstos mantenían una mayor estabilidad estructural a tiempos prolongados de cultivo (superiores a una semana), mientras que los explantes de P3 y P60 mostraban una considerable desorganización a los 10 div. Por ello, se analizaron seguidamente las modificaciones ultraestructurales que ocurrían en explantes de P10 a diferentes tiempos de cultivo.

Las secciones semifinas de explantes de P10 no cultivados (P10+0div) mostraban la disposición laminar típica de la retina, incluyendo una capa de segmentos externos (CSE) de los fotorreceptores bien desarrollada (Fig. II-7A). A nivel ultraestructural, el núcleo de los fotorreceptores presentaba un aspecto muy característico, con numerosas y extensas masas de heterocromatina asociadas a la envoltura nuclear (Fig. II-7B). La CNE estaba atravesada por prolongaciones de células de Müller, con citoplasma relativamente claro (Fig. II-7B), que se disponían entre los somas de fotorreceptores. Las neuronas de la CNI contenían un núcleo alargado relativamente eucromático, en el cual se distribuían algunas manchas de heterocromatina mucho menos extensas y abundantes que las observadas en el núcleo de los fotorreceptores (Fig. II-7C). Las células ganglionares mostraban un núcleo más voluminoso que el de las neuronas de la CNI, que carecía de manchas de heterocromatina y contenía un nucléolo (Fig. II-7D). Las células ganglionares tenían mayor cantidad de citoplasma que las neuronas de la CNI.

En secciones semifinas de explantes de P10+3div, la CNE mostraba extensos espacios extracelulares que separaban columnas de somas de fotorreceptores (Fig II-8A). La microscopía electrónica evidenciaba la presencia de estas columnas de fotorreceptores densamente empaquetados, que estaban flanqueadas por espacios extracelulares (Fig. II-8B). Los núcleos de los fotorreceptores seguían mostrando manchas de heterocromatina que eran más extensas que en los explantes no cultivados, indicando un mayor grado de condensación de la cromatina. La CSE se conservaba en los explantes de P10+3div (Fig. II-8A), aunque la microscopía electrónica revelaba que los apilamientos de discos membranosos de los segmentos externos de fotorreceptores estaban gravemente alterados (Fig. II-8C, D). La CNI de estos explantes tenía caracteres morfológicos parecidos a los observados en explantes no cultivados, mientras que la CCG mostraba escasa cantidad de células (Fig. II-8A), ya que numerosas células ganglionares habían degenerado como consecuencia de la axotomía practicada al aislar los explantes.

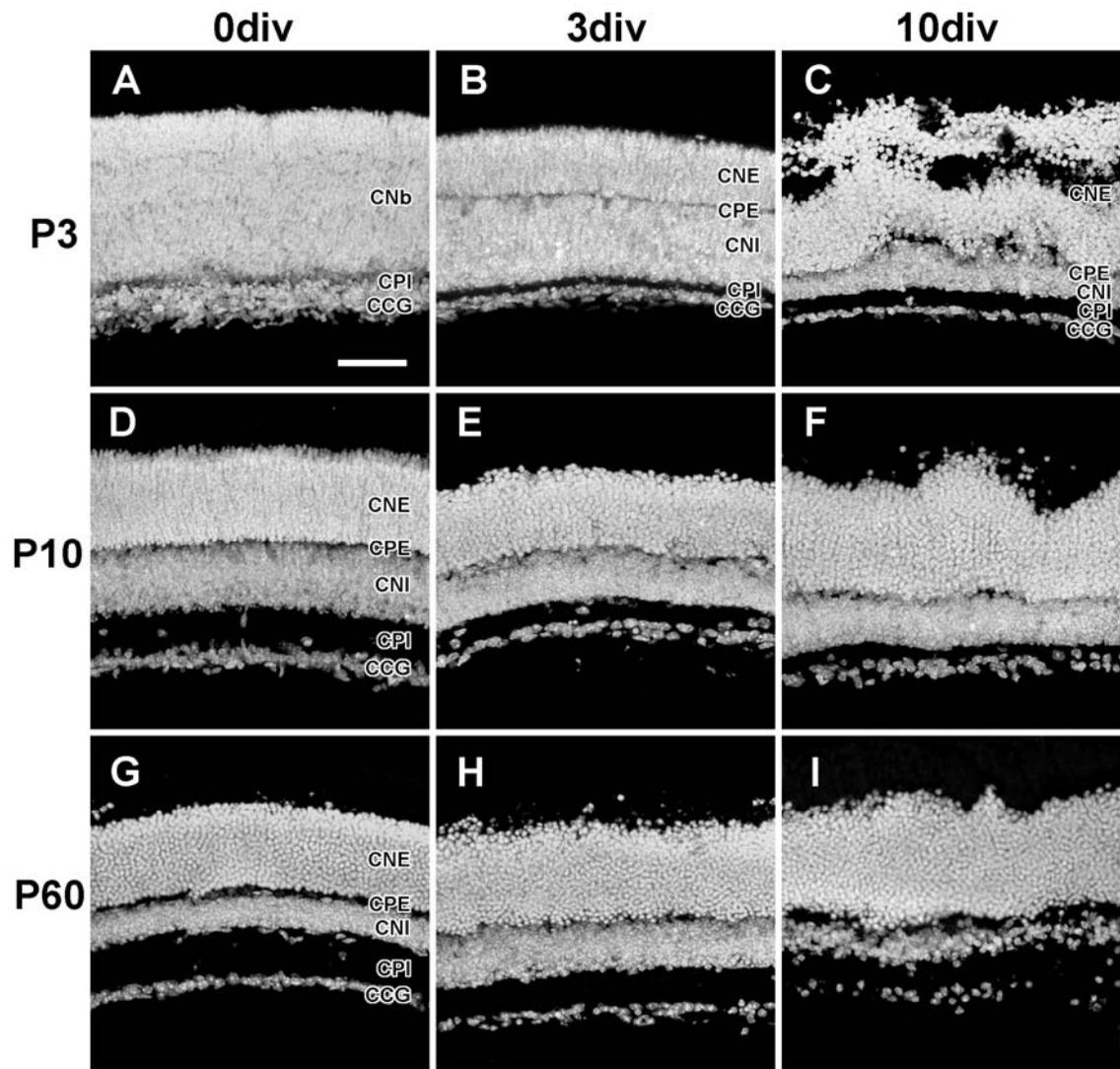
Las diferentes capas de la retina seguían siendo patentes en explantes de P10+10div, mostrando unos caracteres morfológicos no muy diferentes de los observados en explantes de P10+3div. No obstante, en la CNE se apreciaba un incremento de los espacios extracelulares entre las columnas de somas de fotorreceptores, cuyo núcleo se teñía más intensamente como consecuencia de un mayor grado de condensación de la cromatina (Fig. II-9A). En la CSE, que continuaba estando presente, los segmentos internos de los fotorreceptores eran relativamente normales, con un cilio conector patente y mitocondrias bien desarrolladas (Fig. II-9B). Sin embargo, los discos membranosos de los segmentos externos aparecían totalmente desorganizados (Fig. II-9C). Los núcleos de los fotorreceptores mostraban una mayor condensación de la heterocromatina que en P10+3div, mientras que muchas neuronas de la CNE tenían un citoplasma vacuolizado, con aparentes signos de desorganización (Fig. 9D). En la CCG todavía se observaban somas de células ganglionares formando una hilera discontinua (Fig. II-9A). Las prolongaciones de células de Müller se teñían más

intensamente que en explantes con tiempos de cultivo menos prolongados (no mostrados).

En resumen, nuestros resultados demuestran que los explantes conservan la estructura general de la retina incluso a tiempos prolongados de cultivo *in vitro*, aunque la estructura íntima de los componentes celulares de cada capa retiniana muestra progresivos signos de desorganización, sobre todo en los fotorreceptores.

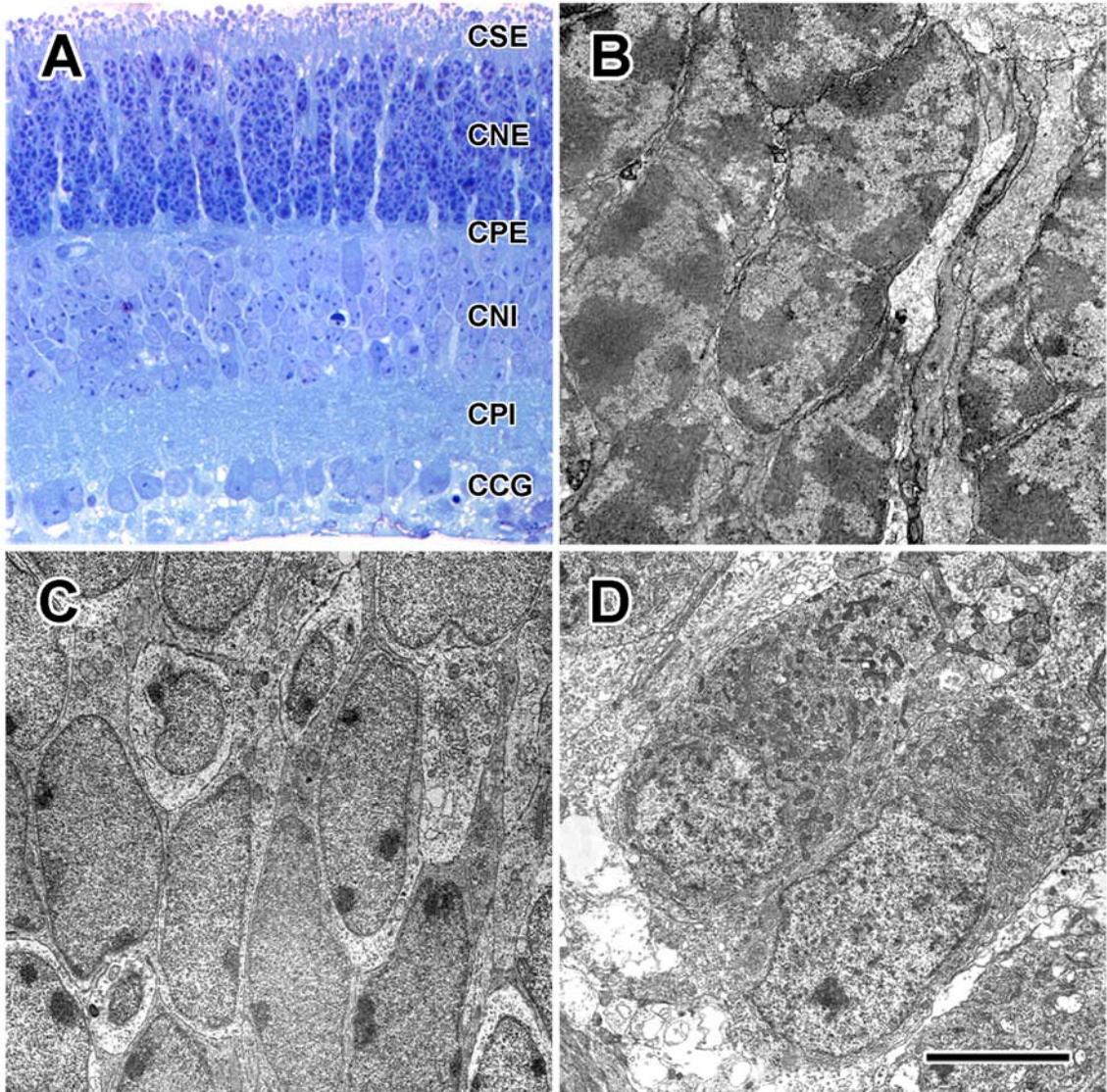


**Fig. II-6.** Caracteres estructurales de explantes de retina en desarrollo de 3 y 10 días postnatales (P3 y P10) y adulta (P60) a diferentes tiempos de cultivo *in vitro*, tal como se observan en secciones transversales contrastadas con Hoechst 33342. **A:** Explante de P3 no cultivado (0div) en el que la capa plexiforme interna (CPI) separa la capa neuroblástica (CNb) de la capa de células ganglionares (CCG). **B:** Explante de P3 cultivado durante 3 días *in vitro* (3div) en el que se observa la capa plexiforme externa (CPE), que subdivide la CNb en capa nuclear externa (CNE) y capa nuclear interna (CNI). El espesor de la retina es menor que el de explantes no cultivados de la misma edad, pero no se observan signos de desorganización estructural. **C:** Explante de P3 cultivado durante 10div en el que se observa una gran desorganización de la CNE, en la que se abren amplios huecos, y de la CNI, cuyo espesor es irregular y se ha reducido apreciablemente. **D:** Explante de P10 no cultivado en el que ya están presentes todas las capas de la retina. **E:** Explante de P10 cultivado durante 3div, en el que las capas de la retina muestran una apariencia normal. **F:** Explante de P10 cultivado durante 10div, en el que la superficie de la CNE es algo irregular y muestra algunas células desprendidas, aunque la citoarquitectura general de la retina no exhibe especiales signos de desorganización. **G:** Explante de P60 no cultivado que muestra los caracteres maduros de las diferentes capas de la retina. **H:** Explante de P60 cultivado durante 3div en el que no se aprecian grandes cambios estructurales respecto a explantes no cultivados, aunque en la superficie de la CNE hay algunos fotorreceptores desprendidos y la CCG tiene menor densidad de células. **I:** Explante de P60 cultivado durante 10div en el que el espesor y la densidad celular de la CNI es mucho menor que a los 3div, mientras que la CCG muestra discontinuidades. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

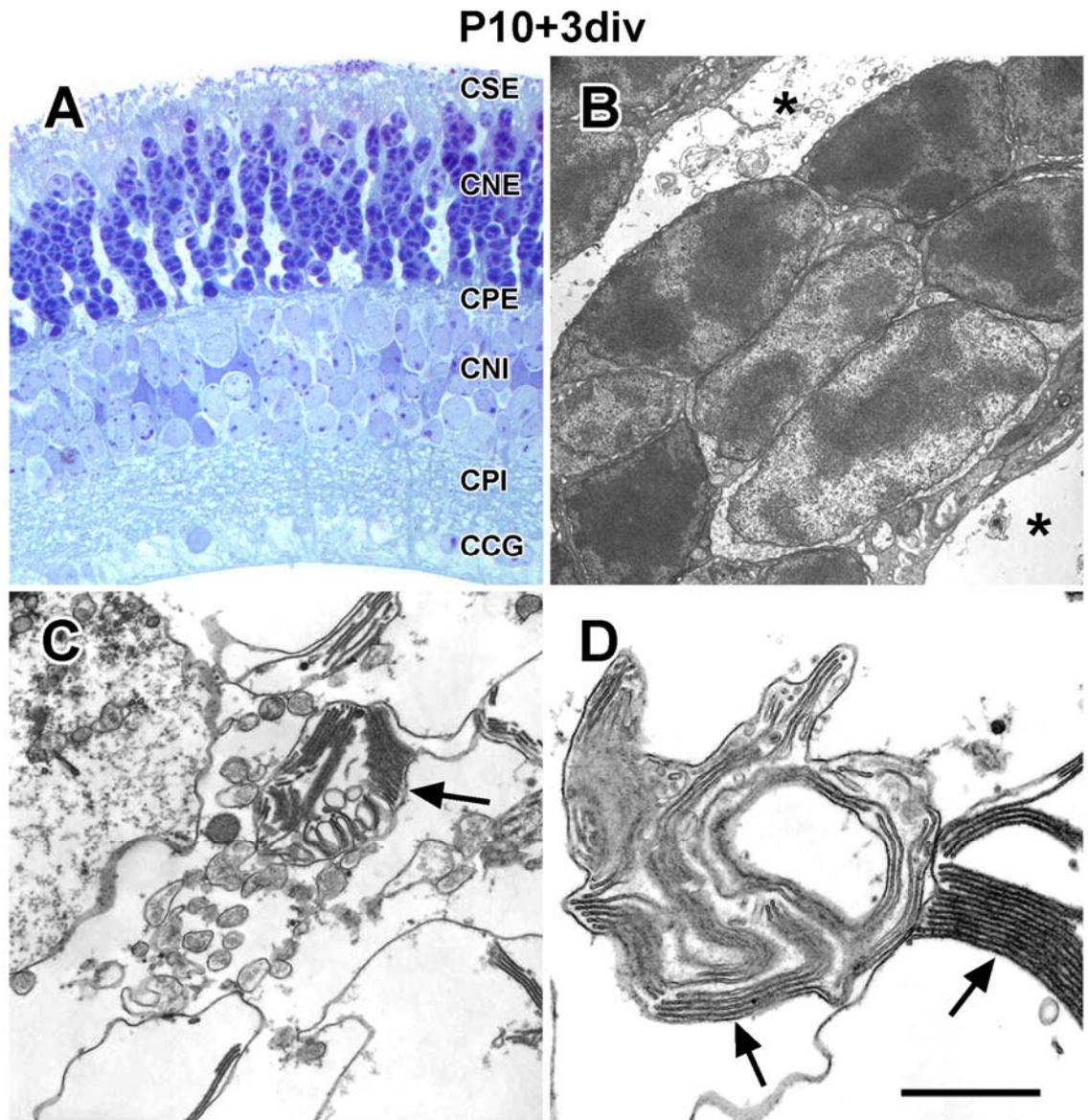


**Fig. II-7.** Caracteres estructurales de la retina en explantes de P10 no cultivados (P10+0div), tal como se observan en una sección semifina con microscopía óptica (**A**) y en secciones ultrafinas con microscopía electrónica de transmisión (**B-D**). **A:** Sección transversal de un explante que muestra todas las capas de la retina. La capa de segmentos externos (CSE) de los fotorreceptores está bien desarrollada. En la capa nuclear externa (CNE), los somas de los fotorreceptores forman columnas bien compactadas, sin apenas espacios extracelulares entre ellos. Los núcleos de las neuronas de la capa nuclear interna (CNI) son mucho más eucromáticos que los de los fotorreceptores, por lo que la CNI se observa más clara que la CNE. La capa de células ganglionares (CCG) muestra somas neuronales dispuestos unos junto a otros formando una monocapa continua. CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna. **B:** Aspecto ultraestructural de la CNE, en la que los somas de los fotorreceptores están estrechamente yuxtapuestos, mostrando escaso citoplasma y núcleos con extensas masas de heterocromatina. **C:** Estructura de la CNI, con neuronas densamente empaquetadas cuyos núcleos son alargados y eucromáticos, con algunas masas de heterocromatina pequeñas y dispersas. **D:** Células ganglionares que contienen abundante citoplasma y un núcleo claro, sin apenas heterocromatina. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  para A; 4,7  $\mu\text{m}$  para B; 7  $\mu\text{m}$  para C y D.

P10+0div

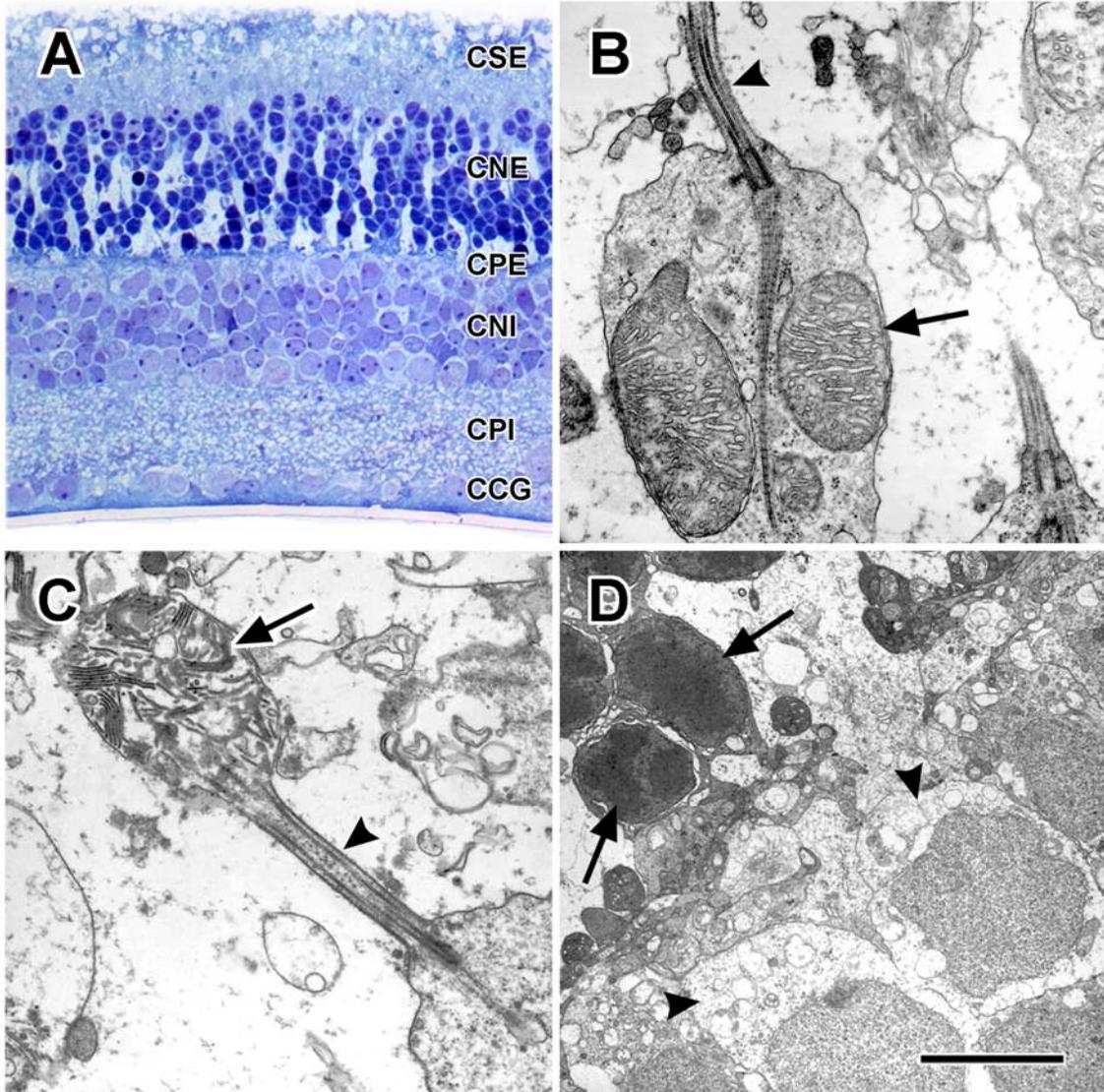


**Fig. II-8.** Caracteres estructurales de la retina en explantes de P10 cultivados durante 3 días *in vitro* (P10+3div), tal como se observan en una sección semifina con microscopía óptica (**A**) y en secciones ultrafinas con microscopía electrónica de transmisión (**B-D**). **A:** Sección transversal de un explante en la que se aprecia que la capa de segmentos externos (CSE) de los fotorreceptores se conserva a este tiempo de cultivo. En la capa nuclear externa (CNE), los somas de los fotorreceptores forman columnas entre las que se observan espacios extracelulares relativamente amplios. Los núcleos de los fotorreceptores se tiñen más intensamente que en los explantes de P10+0div. En la capa de células ganglionares (CCG), los somas neuronales son mucho más escasos que en P10+0div y no forman una capa continua. CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna. **B:** Estructura de la CNE, en la que se observan columnas de fotorreceptores separadas por amplios espacios extracelulares (asteriscos). Los núcleos de los fotorreceptores muestran un patrón de heterocromatina parecido al observado en explantes de P10 no cultivados, aunque las masas de heterocromatina son algo más extensas. **C:** Estructura de la CSE, que muestra un segmento externo de un fotorreceptor considerablemente desorganizado, en el que se advierten restos de los discos membranosos (flecha) que se apilan ordenadamente en los segmentos externos de explantes de P10+0div. **D:** Detalle de restos de discos membranosos (flechas) en el segmento externo de un fotorreceptor. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  para A; 4,7  $\mu\text{m}$  para B; 1,9  $\mu\text{m}$  para C; 1,2  $\mu\text{m}$  para D.



**Fig. II-9.** Caracteres estructurales de la retina en explantes de P10 cultivados durante 10 días *in vitro* (P10+10div), tal como se observan en secciones semifinas con microscopía óptica (**A**) y en secciones ultrafinas con microscopía electrónica de transmisión (**B-D**). **A:** Sección transversal de un explante de P10+10div. La capa de segmentos externos (CSE) de los fotorreceptores sigue observándose en este tiempo de cultivo. En la capa nuclear externa (CNE), los espacios extracelulares son más amplios y los núcleos de los fotorreceptores se tiñen más intensamente que en P10+3div. En la capa de células ganglionares (CCG), se siguen observando algunos somas neuronales dispersos. CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna. **B:** Segmento interno de un fotorreceptor (flecha) cuya ultraestructura es aparentemente normal, con mitocondrias y una raicilla ciliar en la base del cilio (cabeza de flecha) que conecta con el segmento externo. **C:** Segmento externo de un fotorreceptor con discos membranosos totalmente desorganizados (flecha). El cilio conector (cabeza de flecha) entre el segmento externo y el segmento interno del fotorreceptor muestra un aspecto normal, sin signos de desorganización. **D:** Detalle de la CNE (ángulo superior izquierdo) y la CNI (ángulo inferior derecho) de un explante de P10+10div. Los núcleos de los fotorreceptores (flechas) muestran una gran condensación de la heterocromatina. Las neuronas de la CNI contienen un citoplasma vacuolizado (cabezas de flecha), propio de células en proceso degenerativo. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  para A; 1,9  $\mu\text{m}$  para B y C; 6,8  $\mu\text{m}$  para D.

P10+10div



### **Supervivencia y muerte celular en los explantes de retina a lo largo del tiempo de cultivo *in vitro***

La cantidad de células que sobreviven o degeneran en un explante de retina tras un cierto tiempo de cultivo puede influenciar el comportamiento de las células microgliales presentes en el explante. Por este motivo, se determinó la proporción de células viables, es decir la proporción de células metabólicamente activas, en los explantes de cada edad y tiempo de cultivo. El análisis de la viabilidad celular se realizó mediante citometría de flujo de suspensiones celulares procedentes de los explantes, que eran teñidas con FDA e IP (véase sección de métodos).

En los explantes de retina de P3, la proporción de células viables era elevada (más del 80%) entre 0 y 2 div (Fig. II-10A). Sin embargo, la viabilidad celular descendía hasta el 40% en explantes de P3+3div, es decir, alrededor del 60% de las células presentes en estos explantes no eran viables y degeneraban. Sorprendentemente, la viabilidad celular se incrementaba (hasta alrededor del 75%) en explantes de P3+4div, para ir descendiendo paulatinamente en tiempos de cultivo más prolongados, hasta alcanzar algo más del 40% en P3+10div (Fig. II-10A).

El patrón de viabilidad celular era muy diferente en los explantes de retina de P10 (Fig. II-10B). En ellos, la viabilidad celular permanecía entre 65 y 80% en todos los tiempos de cultivo, con la única excepción de P10+10div donde la viabilidad caía hasta aproximadamente el 50%.

La viabilidad celular era mucho más reducida en explantes de retina de P60 (Fig. II-10C). Tan solo el 55% de las células eran viables al inicio del tiempo de cultivo y esta proporción disminuía hasta el 30% en el primer día de cultivo y descendía progresivamente durante todo el tiempo de cultivo, alcanzando valores inferiores al 20% a partir de P60+6div.

Los experimentos de citometría de flujo no proporcionaban información sobre la ubicación concreta dentro de la retina de las células no viables. Por lo tanto, para conocer la localización de las células que degeneraban, se utilizaron

secciones histológicas de explantes tratadas con la técnica TUNEL, en las que se identificaban los fragmentos nucleares de células que habían sufrido fragmentación del ADN asociada a procesos de muerte celular (Figs. II-11, II-12 y II-13). Con relativa frecuencia, la cantidad de fragmentos TUNEL-positivos no era homogénea dentro de cada explante, de manera que dichos fragmentos podían ser muy abundantes en algunas zonas y más escasos en otras regiones del mismo explante. A pesar de esta frecuente heterogeneidad, se podía apreciar un patrón general de distribución de fragmentos TUNEL-positivos en cada edad. Así, durante los primeros días de cultivo, los explantes de P3 mostraban fragmentos TUNEL-positivos tanto a nivel de la CNb como de la CCG (Fig. II-11A). A partir del tercer día de incubación *in vitro*, la CPE se desarrollaba en dichos explantes, dando lugar a la subdivisión de la CNb en CNE y CNI. Tras la aparición de la CPE, los fragmentos TUNEL-positivos se localizaban fundamentalmente en la CNI y eran muy escasos o inexistentes en la CNE (Fig. II-11B, C). Esta distribución se invertía a tiempos prolongados de cultivo, de manera que en explantes de P3+10div los fragmentos TUNEL-positivos eran muy numerosos en la CNE y muy escasos en la CNI (Fig. II-11D). En los explantes de P10, los fragmentos nucleares TUNEL-positivos se distribuían muy abundantemente en la CNE durante todos los tiempos de cultivo, siendo más escasos en la CNI y CCG (Fig. II-12A-C). Es interesante destacar que en explantes entre P10+2div y P10+4div se observaban con relativa frecuencia agrupaciones de fragmentos que podían ser fuertemente TUNEL-positivos (cabezas de flecha en Fig. II-12B, B', C) o presentar un marcaje con TUNEL muy débil (flechas en Fig. II-12B, B', C). Finalmente, en los explantes de P60, el marcaje TUNEL se localizaba tanto en la CNE como en la CNI y CCG durante todos los tiempos de cultivo (Fig. II-13).

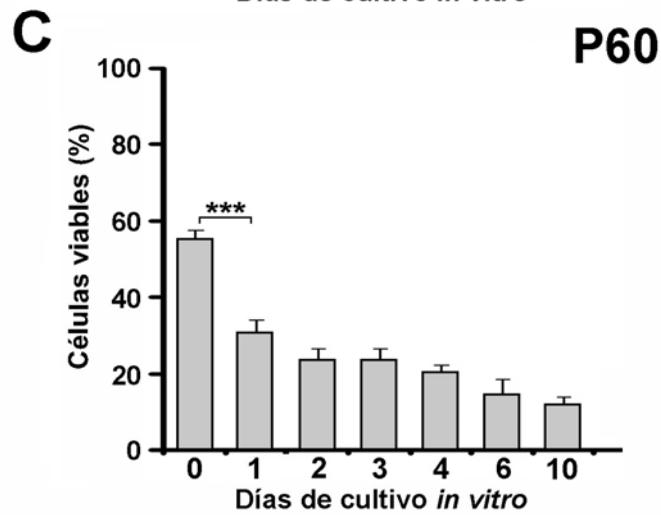
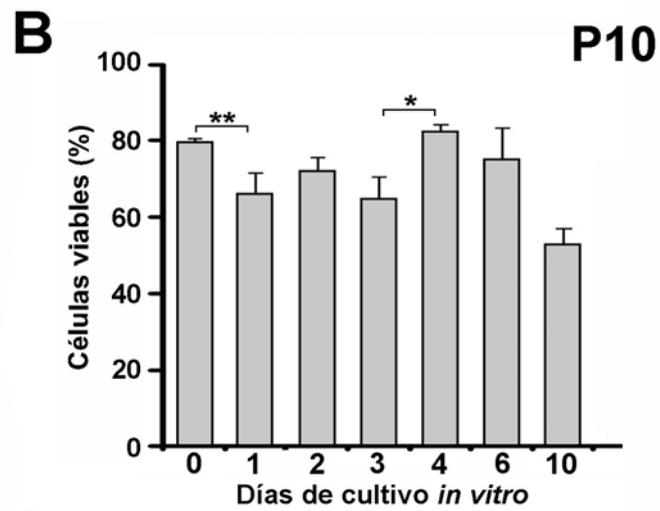
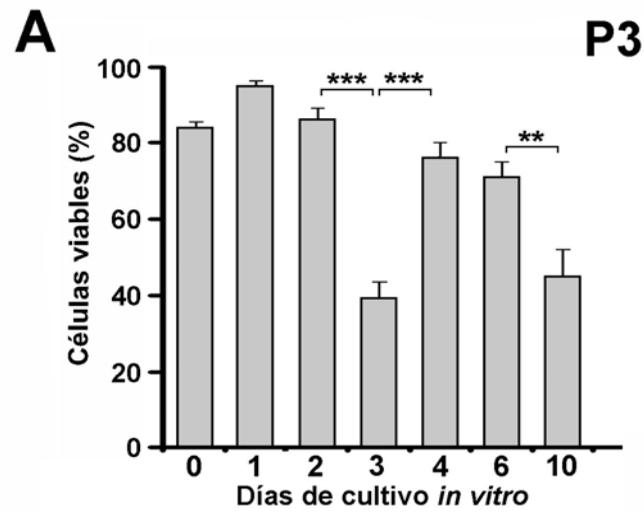
Seguidamente, se determinó la densidad de fragmentos nucleares TUNEL-positivos en secciones de los explantes de P3, P10 y P60 a diferentes tiempos de cultivo *in vitro*. Esta densidad, expresada como número de fragmentos TUNEL-positivos presentes en un área de  $100 \mu\text{m}^2$ , era siempre inferior a 2 en los explantes no cultivados, independientemente de la edad de los mismos,

incrementándose significativamente tras dos días de cultivo (Fig. II-14). Sin embargo, a tiempos más prolongados de cultivo, la densidad de fragmentos TUNEL-positivos seguía patrones específicos de cada edad. En P3, la densidad alcanzaba un pico de alrededor de 9 en P3+2div y disminuía en P3+3div y P3+4div, aumentando de nuevo en P3+10div (Fig. II-14A). Los explantes de P10 mostraban claras diferencias con los de P3, ya que la máxima densidad de fragmentos TUNEL-positivos se observaba en P10+3div, disminuyendo en tiempos de cultivo posteriores (Fig. II-14B). Además, la máxima densidad alcanzada en los explantes de P10 duplicaba la observada en explantes de P3, ya que era de alrededor de 18 en explantes de P10+3div frente a valores inferiores a 10 en explantes de P3+2div. Los explantes de P60 mostraban un patrón de densidad de fragmentos TUNEL-positivos diferente de los observados en P3 y P10, ya que dicha densidad se incrementaba progresivamente hasta P60+4div, tiempo en el que alcanzaba un valor de 28 (Fig. II-14C). Posteriormente, en P60+10div, la densidad descendía a aproximadamente 15, un valor similar al estimado en P60+3div. Por lo tanto, la muerte celular era tanto más intensa cuanto mayor grado de desarrollo tenían los explantes (9 en P3, 18 en P10 y 28 en P60), aunque la máxima densidad de células muertas se alcanzaba a menor tiempo de cultivo *in vitro* cuanto menor era la edad de los explantes (2 div en P3, 3 div en P10 y 4 div en P60).

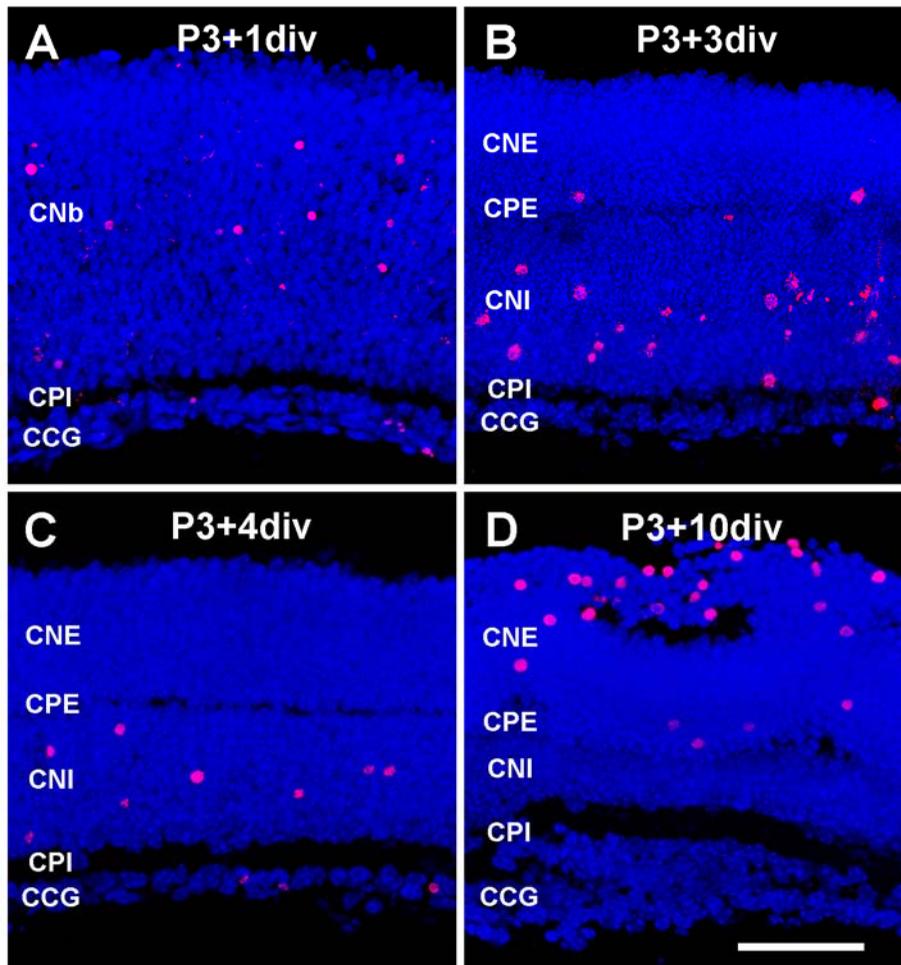
Aunque los patrones de viabilidad (Fig. II-10) y muerte (Fig. II-14) celular en los explantes de cada edad a diferentes tiempos de cultivo son difíciles de comparar, por lo general se observaba un mayor porcentaje de viabilidad celular en los explantes de retina en desarrollo (P3 y P10) que en los explantes de retina adulta (P60), coincidiendo con una menor intensidad de muerte celular en los primeros.



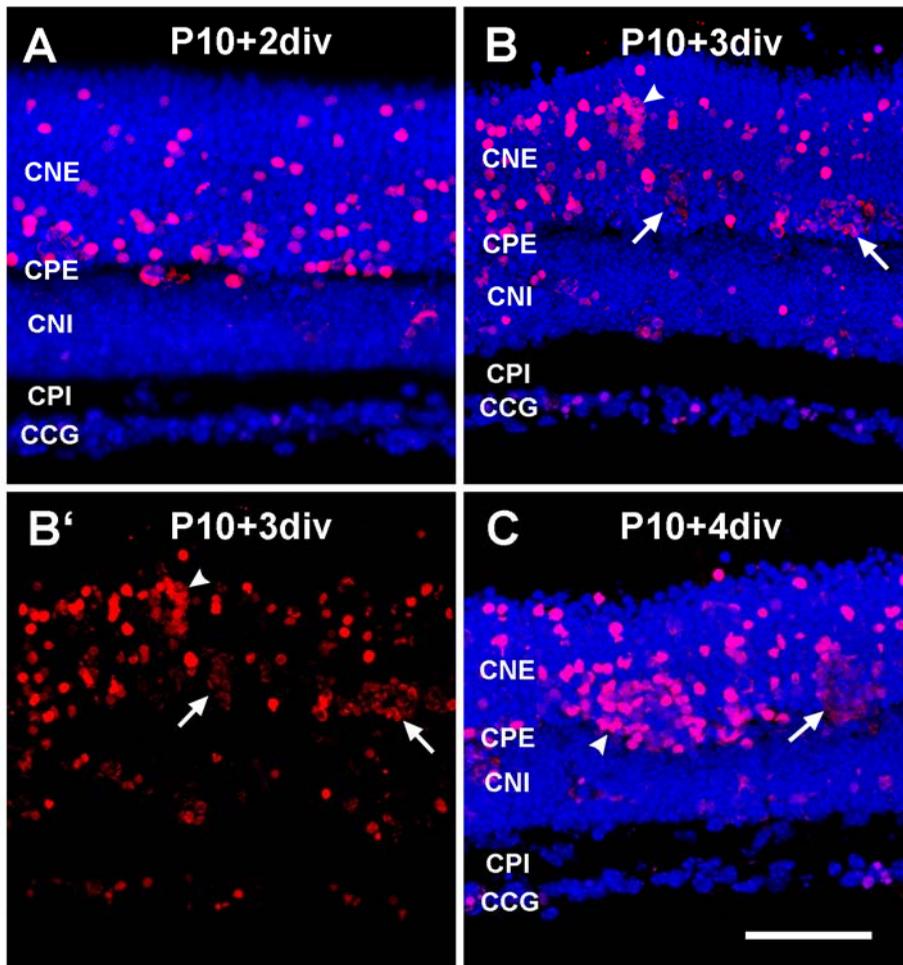
**Fig. II-10.** Porcentajes de células viables en explantes de retina de ratones de P3 (A), P10 (B) y P60 (C) sometidos a distintos tiempos de cultivo *in vitro*. Los datos mostrados corresponden a las medias  $\pm$  errores standard obtenidas a partir de 5 explantes diferentes de cada edad y tiempo de cultivo. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre las medias de tiempos de cultivo consecutivos, con un nivel de significación de  $P < 0,05$  (un asterisco),  $P < 0,01$  (dos asteriscos) o  $P < 0,001$  (tres asteriscos). **A:** La viabilidad celular en explantes de P3 es irregular en diferentes tiempos de cultivo *in vitro*: es elevada (por encima del 80%) entre 0 y 2 días, desciende significativamente (hasta el 40%) a los 3 días, vuelve a incrementarse a los 4 y 6 días, y vuelve a descender hasta un 45% a los 10 días. **B:** En explantes de P10 no cultivados, la viabilidad celular es similar a la de explantes de P3 (aproximadamente el 80%), pero se advierte una mayor estabilidad de la misma a lo largo del tiempo de cultivo *in vitro*, observándose un descenso significativo (del 80% al 65%) entre 0 y 1 día y un nuevo incremento hasta alrededor del 80% entre 3 y 4 días. A tiempos prolongados (10 días) de cultivo *in vitro*, la viabilidad se reduce a algo más del 50%. **C:** En explantes de retina adulta (P60) no cultivados, la viabilidad celular es menor que en retina de P3 o P10 (aproximadamente el 55%), disminuye significativamente en el primer día de cultivo (hasta alrededor del 30%) y hay un progresivo descenso conforme avanza el tiempo de cultivo (aunque no hay diferencias significativas entre días consecutivos).



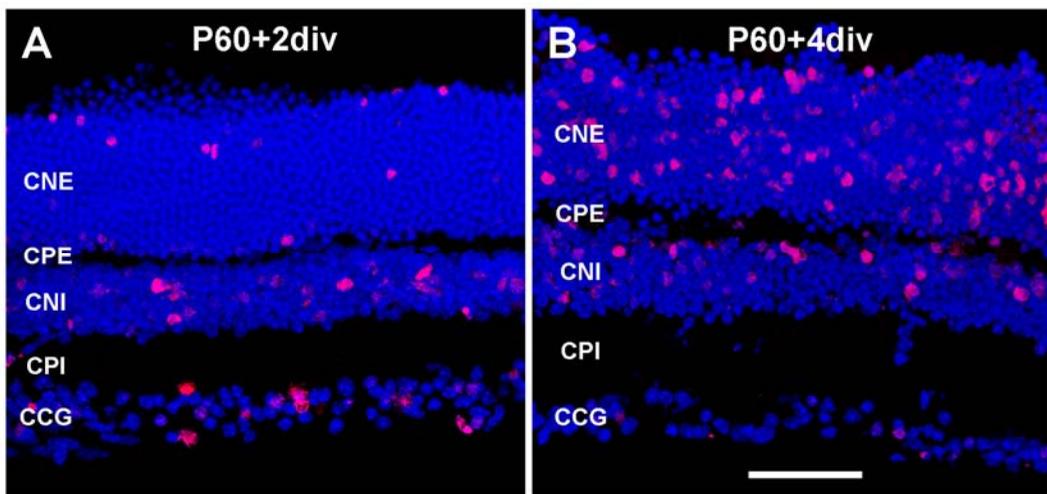
**Fig. II-11.** Distribución de fragmentos nucleares TUNEL-positivos (rojo) en explantes de retina de ratones de P3 cultivados durante diferentes días *in vitro* (div), tal como se observa en secciones histológicas con microscopía confocal. La tinción de los núcleos celulares con Hoechst 33342 (azul) pone de manifiesto los límites de las diferentes capas retinianas (CNb: capa neuroblástica; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares). **A:** Explante de retina de P3+1div que muestra fragmentos nucleares TUNEL-positivos distribuidos a nivel de la CNb y CCG. **B:** Explante de P3+3div que muestra fragmentos TUNEL-positivos distribuidos abundantemente en la CNI, siendo escasos en la CNE y CCG. **C:** Explante de P3+4div en el que los fragmentos TUNEL-positivos se observan en la CNI y CCG. **D:** Explante de P3+10div en el que los fragmentos nucleares TUNEL-positivos están distribuidos exclusivamente en la CNE. Barra de escala: 50  $\mu$ m.



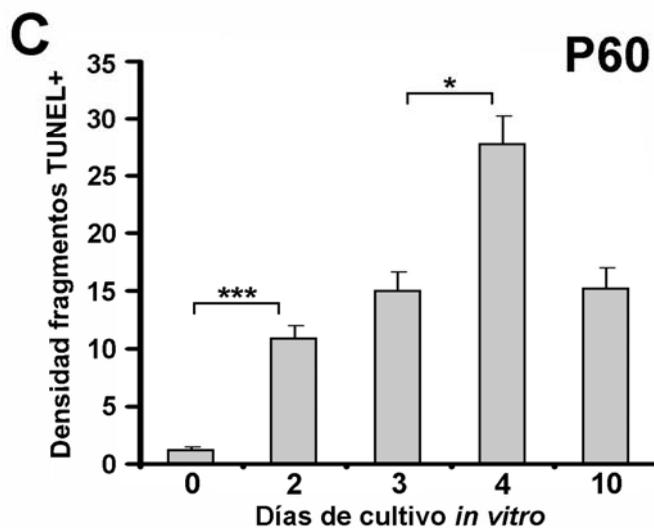
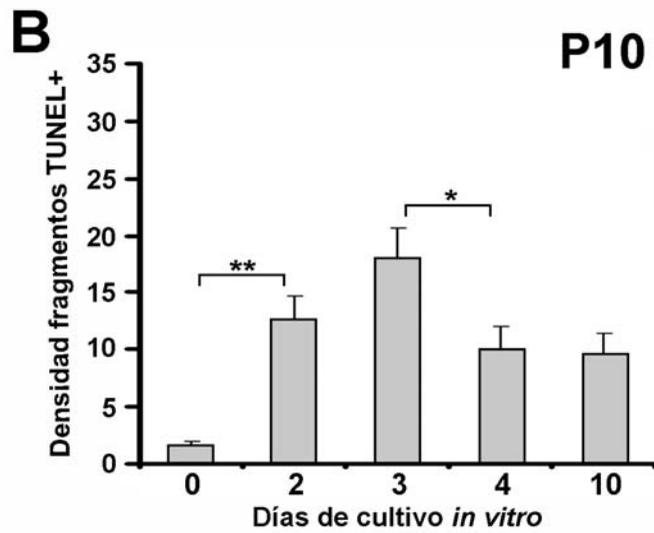
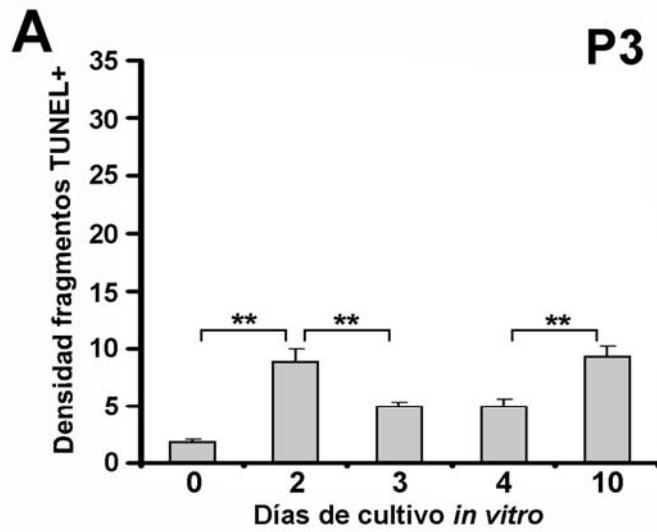
**Fig. II-12.** Distribución de fragmentos nucleares TUNEL-positivos (rojo) en explantes de retina de ratones de P10 cultivados durante diferentes días *in vitro* (div), tal como se observa en secciones histológicas con microscopía confocal. La tinción de los núcleos celulares con Hoechst 33342 (azul) pone de manifiesto los límites de las diferentes capas retinianas (CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares). **A:** Explante de retina de P10+2div en el que se aprecia que los fragmentos nucleares TUNEL-positivos se distribuyen mayoritariamente en la CNE y son más escasos en la CNI. **B:** Explante de P10+3div que muestra fragmentos TUNEL-positivos distribuidos abundantemente en la CNE y más escasamente en la CNI y CCG. **B':** Imagen microscópica idéntica a la observada en **B**, en la que solo se muestra el canal rojo para apreciar mejor los fragmentos cuyo marcado con TUNEL es débil, evitando su enmascaramiento con la tinción azul de Hoechst. Nótese la presencia de grupos de núcleos con fuerte tinción de TUNEL (cabeza de flecha) y otros con tinción mucho más débil (flechas). **D:** Explante de P10+4div en el que los fragmentos TUNEL-positivos son muy abundantes en la CNE y mucho más escasos en la CNI y CCG. La cabeza de flecha indica la presencia de un grupo de núcleos con fuerte tinción de TUNEL, mientras que la flecha señala un grupo de núcleos con tinción de TUNEL muy débil. Barra de escala: 50  $\mu$ m.



**Fig. II-13.** Distribución de fragmentos nucleares TUNEL-positivos (rojo) en explantes de retina de ratones de P60 cultivados durante diferentes días *in vitro* (div), tal como se observa en secciones histológicas con microscopía confocal. La tinción de los núcleos celulares con Hoechst 33342 (azul) pone de manifiesto los límites de las diferentes capas retinianas (CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares). **A:** Explante de P60+2div en el que se observan fragmentos nucleares TUNEL-positivos distribuidos en las tres capas nucleares de la retina (CNE, CNI y CCG). **B:** Explante de P60+4div en el que los fragmentos TUNEL-positivos también se distribuyen en las tres capas nucleares, pero son más abundantes en la CNE que en P60+2div. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. II-14.** Densidades de fragmentos nucleares TUNEL-positivos en explantes de retina de ratones de P3, P10 y P60 a diferentes días de cultivo *in vitro* (div). Las densidades se expresan como número de fragmentos TUNEL-positivos por unidad de área ( $100 \mu\text{m}^2$ ). Las barras representan los valores medios ( $\pm$  sus respectivos errores standard) obtenidos a partir de las medidas efectuadas en 5 explantes diferentes de cada edad y tiempo de cultivo. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre las medias de tiempos de cultivo consecutivos, con un nivel de significación de  $P < 0,05$  (un asterisco),  $P < 0,01$  (dos asteriscos) o  $P < 0,001$  (tres asteriscos). **A:** En explantes de P3, la densidad es muy baja antes del comienzo del cultivo (0 div), alcanza un pico de alrededor de 9 a los 2 div, disminuye posteriormente y vuelve a incrementarse en tiempos prolongados de cultivo (10 div). **B:** En explantes de P10, la densidad también es muy baja antes del comienzo del cultivo (0 div), se incrementa durante los primeros días de cultivo, alcanzando un máximo de alrededor de 18 a los 3 div, y vuelve a disminuir con posterioridad. **C:** En explantes de retina adulta (P60), la densidad se incrementa progresivamente durante los primeros días de cultivo *in vitro*, hasta alcanzar un máximo de 28 a los 4 div, y disminuye a tiempos prolongados de cultivo (10 div).



### **Distribución y morfología de la microglía en explantes de P3, P10 y P60 no cultivados**

Antes de estudiar los cambios de distribución y morfología de la microglía a lo largo del tiempo de cultivo *in vitro*, estas características fueron analizadas en explantes no cultivados de las tres edades consideradas (P3+0div, P10+0div y P60+0div).

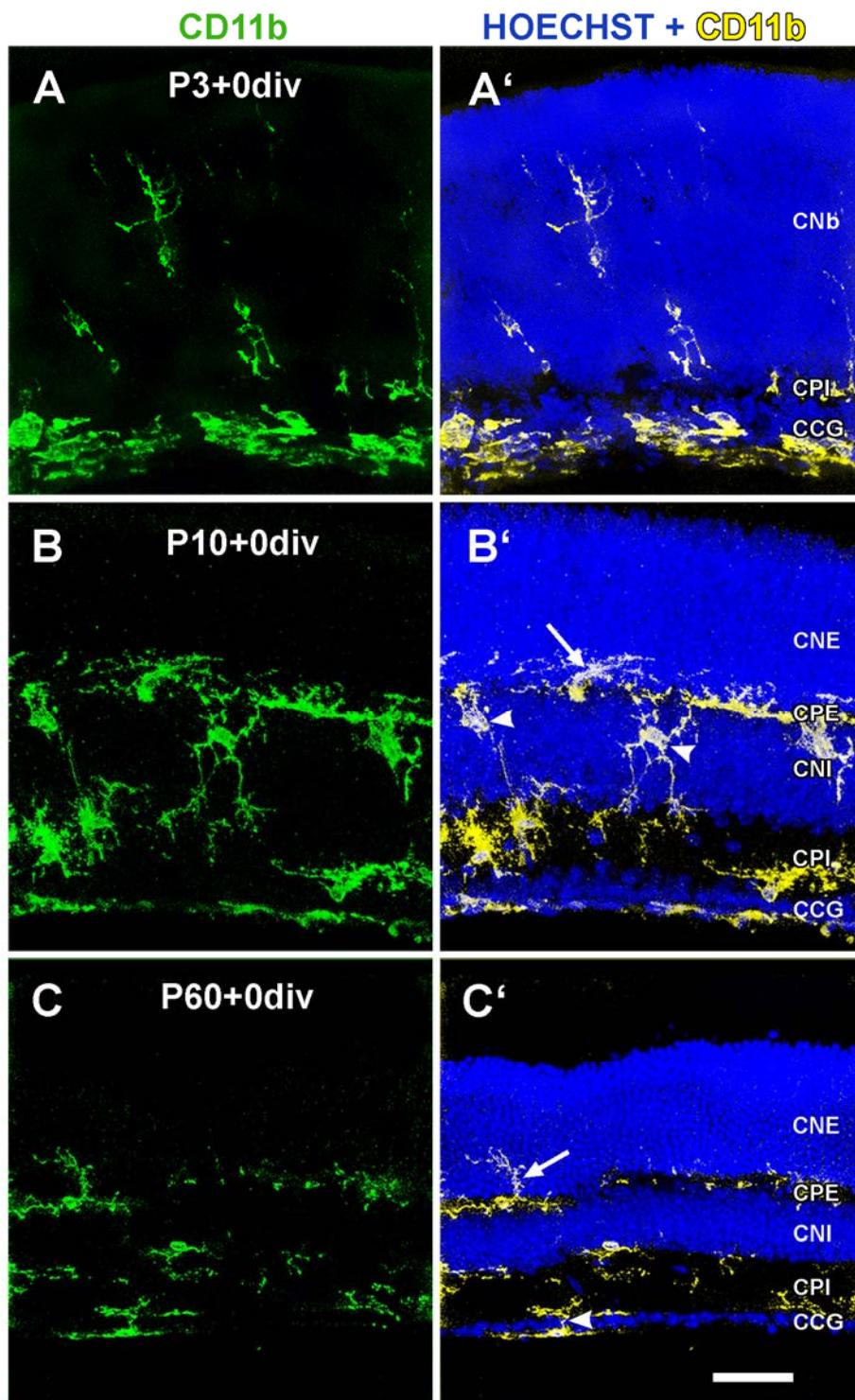
La distribución de la microglía en explantes de P3+0div, P10+0div y P60+0div (Fig. II-15), puesta de manifiesto mediante inmunocitoquímica con los anticuerpos CD11b o CD45, mostraba la progresiva diferenciación de las células microgliales que tiene lugar en retinas *in situ*, tal como ha sido descrita en estudios previos de nuestro laboratorio (Santos et al., 2008). Así, en explantes de P3+0div, la mayor parte de células microgliales se localizaban en las capas vitreales, siendo muy frecuentes en la CCG y en la CPI, donde mostraban un aspecto amebode con pocas ramificaciones (Fig. II-15A, A'). Células microgliales de aspecto relativamente ramificado se observaban en la CNb, aunque eran mucho menos abundantes que en los niveles vitreales.

En explantes de P10+0div, la microglía mostraba un aspecto ramificado y se localizaba en todas las capas retinianas excepto la CNE (Fig. II-15B, B'). No obstante, algunas prolongaciones procedentes de células microgliales de la CPE podían adentrarse en la CNE (flecha en Fig. II-15B'). Los somas de las células microgliales localizadas en las capas plexiformes eran fácilmente identificables con microscopía electrónica de transmisión (Fig. II-16), mostrando un núcleo alargado con manchas periféricas de heterocromatina y un citoplasma con abundantes lisosomas y vesículas de tamaños variados (véase Ling y Wong, 1993; Shapiro et al., 2009).

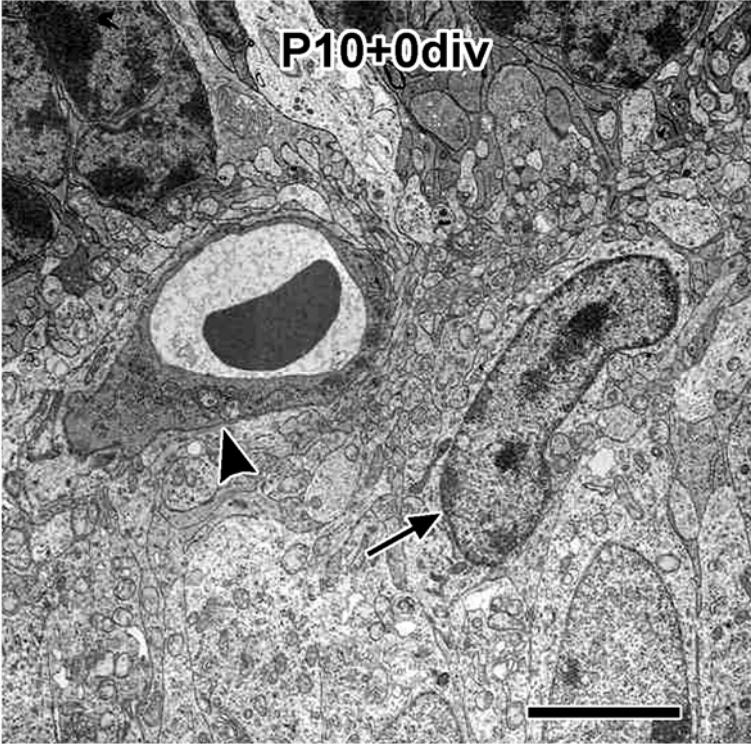
Finalmente, en explantes de P60+0div las células microgliales tenían una distribución y características morfológicas propias de la microglía madura. Estas células se localizaban en la CCG, CPI y CPE, mostrando un aspecto ramificado, con largas y delgadas prolongaciones cuya intensidad de marcaje era relativamente débil (Fig. II-15C, C'). Algunas células de la CPE introducían sus

prolongaciones en la CNE (flecha en Fig. II-15C'). Es importante destacar la ausencia de células microgliales en la CNI de explantes de retina adulta, a diferencia de lo observado en explantes de retina de P10.

**Fig. II-15.** Imágenes de microscopía confocal que muestran la distribución de células microgliales en explantes de retina no cultivados procedentes de ratones postnatales de 3 (P3+0div) y 10 (P10+0div) días y de ratones adultos (P60+0div). La fila de la izquierda (A-C) muestra el marcado inmunofluorescente con el anticuerpo CD11b (verde) para identificar las células microgliales. En la fila de la derecha (A'-C'), además del marcado con CD11b, se observa la tinción de los núcleos celulares con Hoechst 33342 (azul) que permite reconocer las capas nucleares de la retina e identificar la ubicación de las células microgliales; el color verde del marcado con CD11b se ha sustituido con un falso color amarillo para acentuar el contraste con el azul de las capas nucleares. **A, A'**: Explante de retina de P3+0div que muestra una gruesa capa neuroblástica (CNb) en la que se distribuyen células microgliales CD11b-positivas, de morfología ramificada. En la capa de células ganglionares (CCG) y capa plexiforme interna (CPI) también se advierten células microgliales con una morfología más ameboide. **B, B'**: Explante de retina de P10+0div que muestra la presencia de células microgliales ramificadas en todas las capas de la retina, con la excepción de la capa nuclear externa (CNE). En esta capa no se observan somas microgliales aunque sí penetran algunas prolongaciones (flecha) procedentes de células microgliales cuyo soma se localiza en la capa plexiforme externa (CPE). Las cabezas de flecha señalan células microgliales presentes en la capa nuclear interna (CNI). **C, C'**: Explante de retina de P60+0div en el que se aprecia la distribución de células microgliales CD11b-positivas de morfología ramificada en las capas plexiformes y capa de fibras nerviosas. En las capas nucleares no hay somas de células microgliales, aunque sí se observan prolongaciones de células presentes en la CPE que penetran en la CNE (flecha) y prolongaciones procedentes de células localizadas en la capa de fibras nerviosas que atraviesan la CCG (cabeza de flecha). Barra de escala: 50  $\mu$ m.



**Fig. II-16.** Detalle de la capa plexiforme externa de un explante de retina de P10 no cultivado (P10+0div) observada con microscopía electrónica de transmisión. Los fotorreceptores de la capa nuclear externa se ven en la esquina superior izquierda, mientras que las neuronas de la capa nuclear interna se observan en la esquina inferior derecha. En la capa plexiforme externa se aprecia una célula de aspecto microglial (flecha) en las inmediaciones de un vaso sanguíneo (cabeza de flecha). Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ .



### **Cambios en la distribución y morfología de la microglía a diferentes tiempos de cultivo *in vitro* de explantes de P3, P10 y P60**

Las células microgliales en los explantes de retina de cualquier edad respondían rápidamente a las condiciones de cultivo *in vitro* y sufrían cambios en su distribución y caracteres morfológicos. El análisis de la morfología de las células microgliales proporciona información acerca de su estado de activación. Así, la microglía no activada presenta una morfología ramificada, con prolongaciones largas y delgadas, mientras que las células activadas muestran una morfología amebode, con prolongaciones más cortas y anchas (Bosco et al., 2011; Kozlowski y Weimer, 2012). En general, con independencia de la edad considerada, la microglía presentaba una morfología más o menos activada desde el primer día de cultivo y llegaba a distribuirse en todas las capas de la retina hasta alcanzar la zona escleral de los explantes. No obstante, dependiendo de la edad de la retina explantada, se advertían diferencias en la distribución y nivel de activación microglial.

#### *Explantos de P3*

Los explantes de retina de P3+1div mostraban células microgliales de morfología amebode distribuidas en la CCG y CPI y muchas de ellas tenían un aspecto globoso típico de células activadas (Fig. II-17A). También se observaban células microgliales de apariencia ramificada en diferentes profundidades de la CNb. En explantes de P3+2div, la distribución y apariencia morfológica de la microglía era similar a la observada durante el primer día de cultivo (Fig. II-17B). En explantes de P3+3div, en los que ya estaban presentes todas las capas de la retina como consecuencia de la aparición de la CPE, las células microgliales amebodes continuaban siendo abundantes en la CCG y CPI. De la microglía previamente dispuesta en la CNb, algunas células ocupaban ahora la CPE recién formada y mostraban una morfología ramificada, con algunas prolongaciones adentrándose en la CNE, y otras se localizaban en la CNI (Fig. II-17C). Al cuarto día de cultivo *in vitro* (P3+4div), las células microgliales se distribuían en todas

las capas de la retina y mostraban signos morfológicos de fuerte activación en todas ellas (Fig. II-17D). Así, las células presentes en la CPE tenían forma globosa y se adentraban parcialmente en la CNE, donde podían englobar somas de fotorreceptores (flechas en Fig. II-17D), ofreciendo imágenes en forma de panal de abejas similares a las observadas en la CNE de retinas *in situ* sometidas a fotodegeneración (Santos et al., 2010). En la CNI también había numerosas células microgliales de aspecto globoso, algunas de las cuales abrazaban somas neuronales. Muchas de estas células parecían corresponder a proyecciones de somas microgliales presentes en la CPE y CPI, que se adentraban en la CNI para englobar núcleos neuronales (cabezas de flecha en Fig. II-17D). En explantes de P3+6div, las células microgliales de las capas plexiformes eran menos globosas y mostraban un mayor grado de ramificación, aunque seguían mostrando prolongaciones que se introducían en la CNE (flechas en Fig. II-17E) y CNI (cabezas de flecha en Fig. II-17E), donde englobaban núcleos celulares. Además, a este tiempo de cultivo *in vitro*, se observaban células ameboides sobre la superficie escleral del explante, inmediatamente por encima de la CNE (asteriscos en Fig. II-17E). Estas células microgliales ameboides continuaban estando presentes en explantes de P3+10div, en los que se localizaban en los profundos pliegues y huecos de la superficie escleral de la CNE severamente desorganizada (asteriscos en Fig. II-17F). A este tiempo de cultivo *in vitro*, la CCG, CPI y CPE estaban ocupadas por células microgliales de caracteres similares a los descritos en estas capas de explantes de P3+6div.

### *Explantes de P10*

Los explantes de retina en la segunda semana de su desarrollo postnatal (P10) ya habían completado su laminación citoarquitectónica y mostraban todas las capas desde el principio del cultivo *in vitro*. En ellos, las células microgliales de la parte escleral (CNI, CPE y CNE) manifestaban signos morfológicos de activación a partir del segundo día de cultivo, a diferencia de lo observado en explantes de P3, en los que la microglía de la parte escleral (ocupada por la CNb)

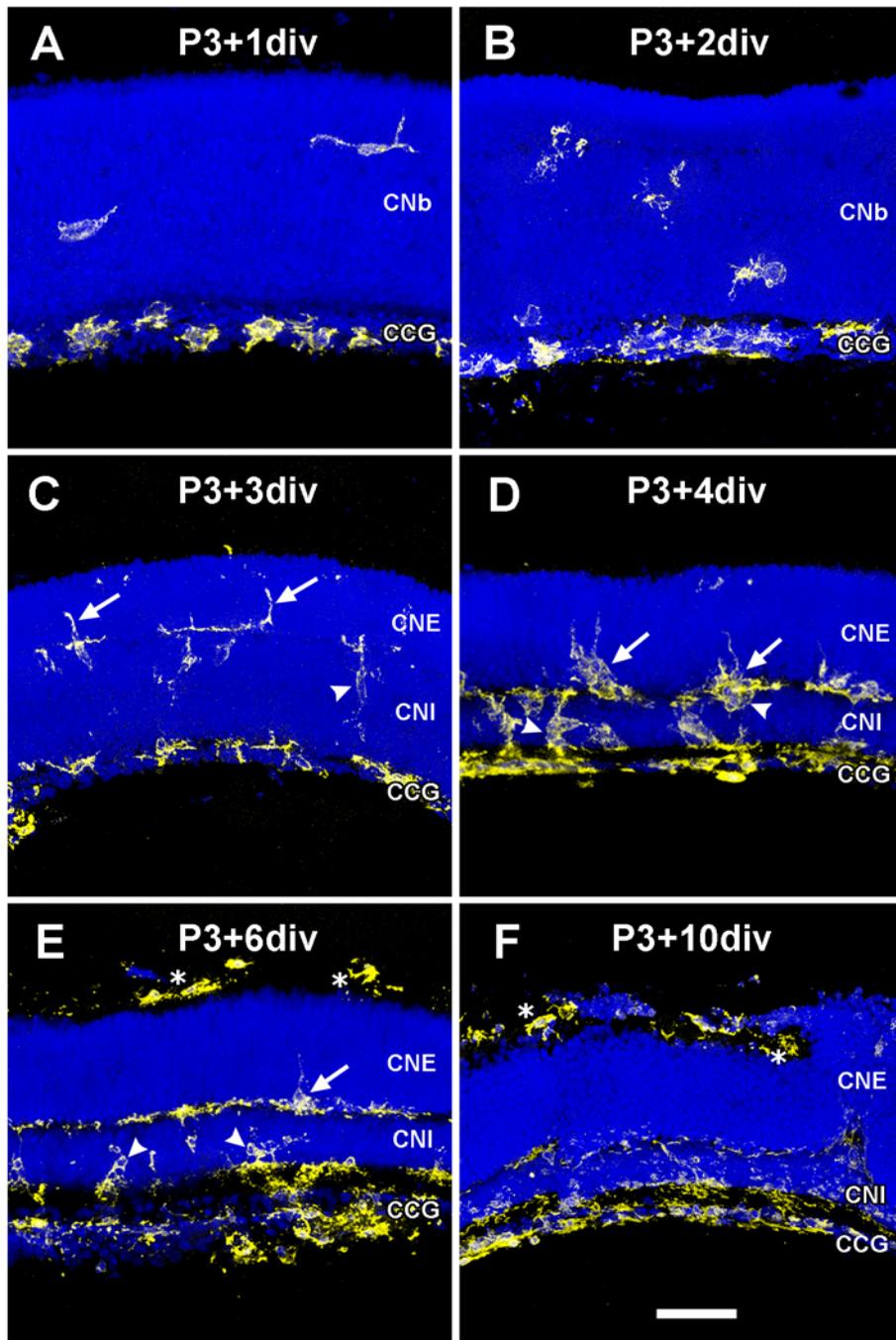
solo mostraba signos de activación a partir del cuarto día de cultivo, una vez desarrolladas la CPE y la CNE. Así, en explantes de P10+2div, se observaban células microgliales de gran tamaño y morfología globosa en la CNE, CPE y CNI (Fig. II-18A, B). Esta distribución y morfología de la microglía se mantenía en explantes de P10+3div y P10+4div (Fig. II-18C). Con frecuencia, estas grandes células microgliales englobaban grupos de núcleos de fotorreceptores de la CNE (flechas en Fig. II-18A-C) o de neuronas de la CNI (cabezas de flecha en Fig. II-18A, B). En la parte vítrea de los explantes (CCG y CPI) también se observaban células microgliales activadas, aunque éstas eran de menor tamaño que las observadas en la parte escleral. En algunos explantes de P10+4div aparecían células CD11b-positivas voluminosas y redondeadas en la superficie escleral, por encima de la CNE (asterisco en Fig. II-18C). Era llamativo que en tiempos más avanzados de cultivo *in vitro* (P10+6div), la microglía perdía su morfología globosa, mostrando una apariencia ramificada en las capas plexiformes y CNI (Fig. II-18D, E), aunque muchas células microgliales conservaban su morfología ameboide en la parte vítrea del explante (Fig. II-18E). En este tiempo de cultivo, extensas zonas de la CNE estaban desprovistas de microglía. Por otra parte, células CD11b-positivas seguían estando presentes en la superficie escleral de los explantes, tanto de P10+6div (asteriscos en Fig. II-18D) como de P10+10div (asteriscos en Fig. II-18F). Las células microgliales eran muy poco frecuentes en la CNE en este tiempo avanzado de cultivo *in vitro* y estaban presentes sobre todo en la parte vítrea (CPI y CCG) de los explantes, donde mostraban una morfología ameboide (Fig. II-18F).

Las observaciones con microscopía electrónica de transmisión también evidenciaban signos morfológicos de activación de las células microgliales en los explantes de retina cultivados *in vitro* durante tiempos prolongados. Así, los somas de estas células en explantes de P10+10div mostraban un citoplasma cargado de inclusiones y vesículas (Fig. 19), típico de células activadas que llevan a cabo procesos de fagocitosis de restos celulares.

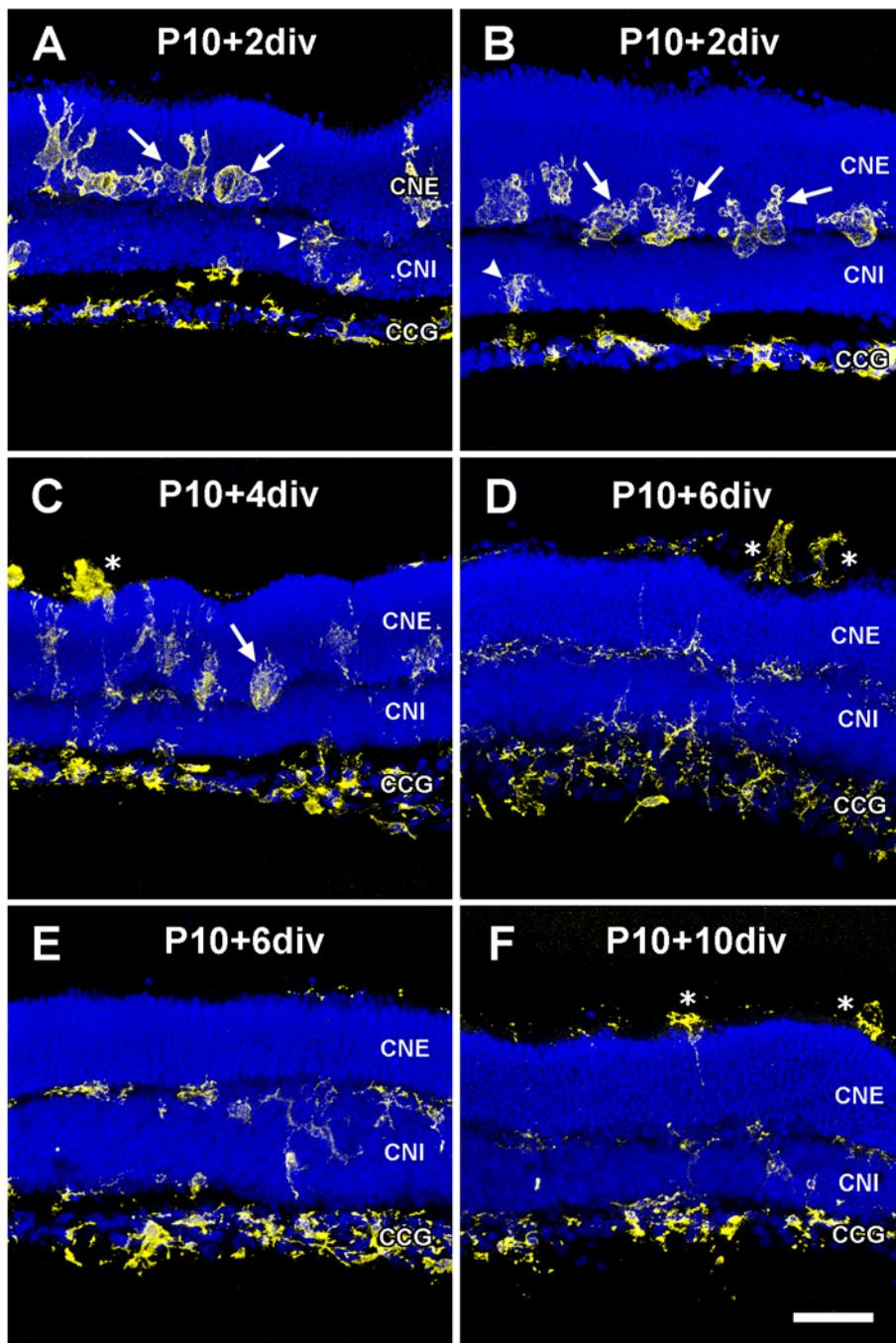
*Explantos de P60*

En los explantes de retina adulta a partir del segundo día de cultivo *in vitro*, las células microgliales estaban presentes en todas las capas de la retina (Fig. II-20A), incluyendo las capas nucleares de las que estaban excluidas en la retina adulta *in situ*. Dichas células mostraban signos de activación que eran muy evidentes en explantes de P60+3div (Fig. II-20B) y P60+4div (Fig. II-20C), en los que se observaban grandes células microgliales de morfología globosa en la CNE y CNI. Estas células globosas no eran tan voluminosas y abundantes como las descritas en explantes de P10 entre 2 y 4 días de cultivo, pero también englobaban núcleos de fotorreceptores o neuronas presentes en la CNE y CNI, respectivamente (flechas y cabeza de flecha en Fig. II-20B, C). A partir del cuarto día de cultivo, también se veían células CD11b-positivas globosas sobre la superficie escleral del explante (asteriscos en Fig. II-20C, D). En la segunda semana de cultivo (P60+10div), la localización de estas células coincidía con zonas del explante que mostraban alteraciones en la superficie de la CNE, con grupos de somas de fotorreceptores aparentemente desprendiéndose en la superficie escleral. En zonas internas de explantes de P60+10div, las células microgliales se distribuían en todas las capas de la retina y presentaban una morfología ameboide. Numerosas células microgliales estaban presentes en la CNI (Fig. II-20D), cuya estructura estaba alterada, mostrando zonas adelgazadas con neuronas menos densamente dispuestas que en tiempos de cultivo anteriores. En la parte vítrea, la CCG también contenía numerosas células microgliales ameboides.

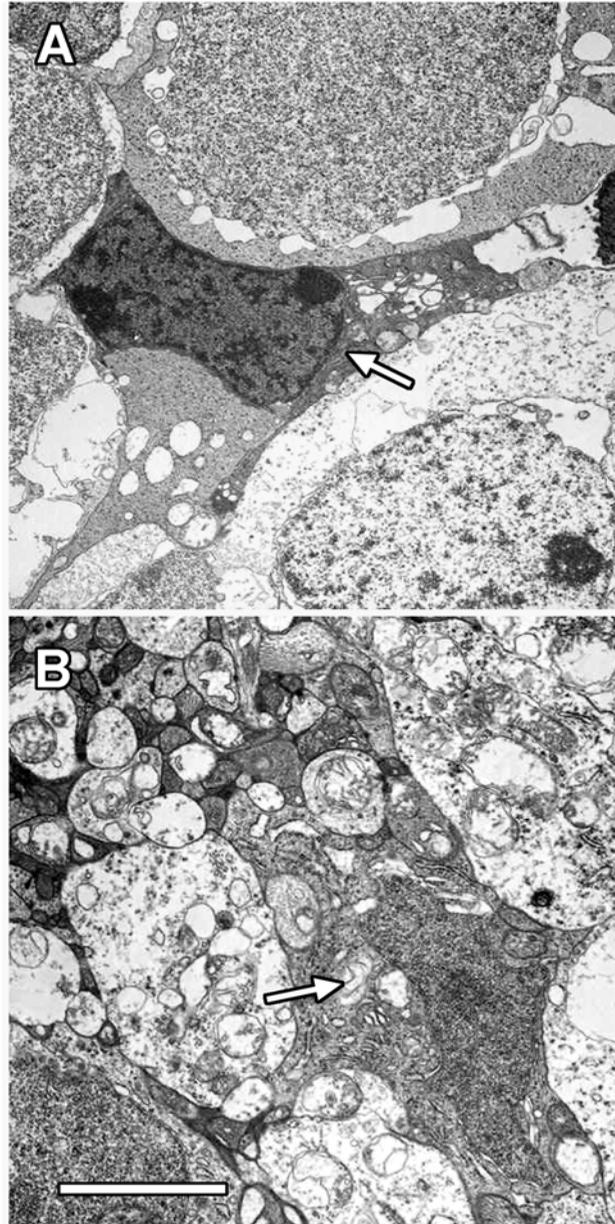
**Fig. II-17.** Distribución de células microgliales en secciones transversales de explantes de retina de ratones postnatales de 3 días (P3) incubados durante diferentes días *in vitro* (div). Las capas nucleares de la retina (CNb: capa neuroblástica; CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares) se han puesto de manifiesto con fluorescencia azul mediante tinción con Hoechst 33342. Las células microgliales se habían marcado originalmente en verde mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo CD11b, pero dicho color se ha sustituido por un falso color amarillo para potenciar el contraste con el fondo azul de las capas nucleares. **A:** Explante de retina de P3+1div, en el que células microgliales de aspecto globoso están presentes en la CCG y capa plexiforme interna, mientras que otras de apariencia ramificada se localizan en la CNb. **B:** Explante de P3+2div, en el que la distribución y apariencia morfológica de la microglía es similar a la observada en **A**. **C:** Explante de P3+3div. Se observan la CNE y la CNI separadas por una estrecha capa plexiforme externa en la que se distribuyen células microgliales de aspecto ramificado, algunas de cuyas prolongaciones se introducen en la CNE (flechas). En la CNI también se localizan células microgliales parcialmente ramificadas (cabeza de flecha). Numerosas células microgliales ameboides se distribuyen en la capa plexiforme interna y en la CCG. **D:** Explante de P3+4div, con células microgliales grandes y globosas situadas en la capa plexiforme externa, que se introducen parcialmente en la CNE (flechas) y en la CNI (cabezas de flecha), donde engloban grupos de núcleos celulares. También se observan células microgliales ameboides en la CCG y en la capa plexiforme interna. **E:** Explante de P3+6div en el que las células microgliales de las capas plexiformes muestran un mayor grado de ramificación que en **D**. Una célula de la capa plexiforme externa se introduce en la CNE (flecha) donde engloba un núcleo celular, mientras que otras de la capa plexiforme interna penetran en la CNI (cabezas de flecha) donde engloban somas neuronales. En la superficie escleral del explante, se aprecian varias células ameboides CD11b-positivas (asteriscos). **F:** Explante de P3+10div en el que las capas plexiformes externa e interna, la CNI y la CCG muestran células microgliales de caracteres similares a los observados en **E**. La superficie escleral tiene pliegues y huecos, donde se alojan células CD11b-positivas de aspecto ameboide (asteriscos). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



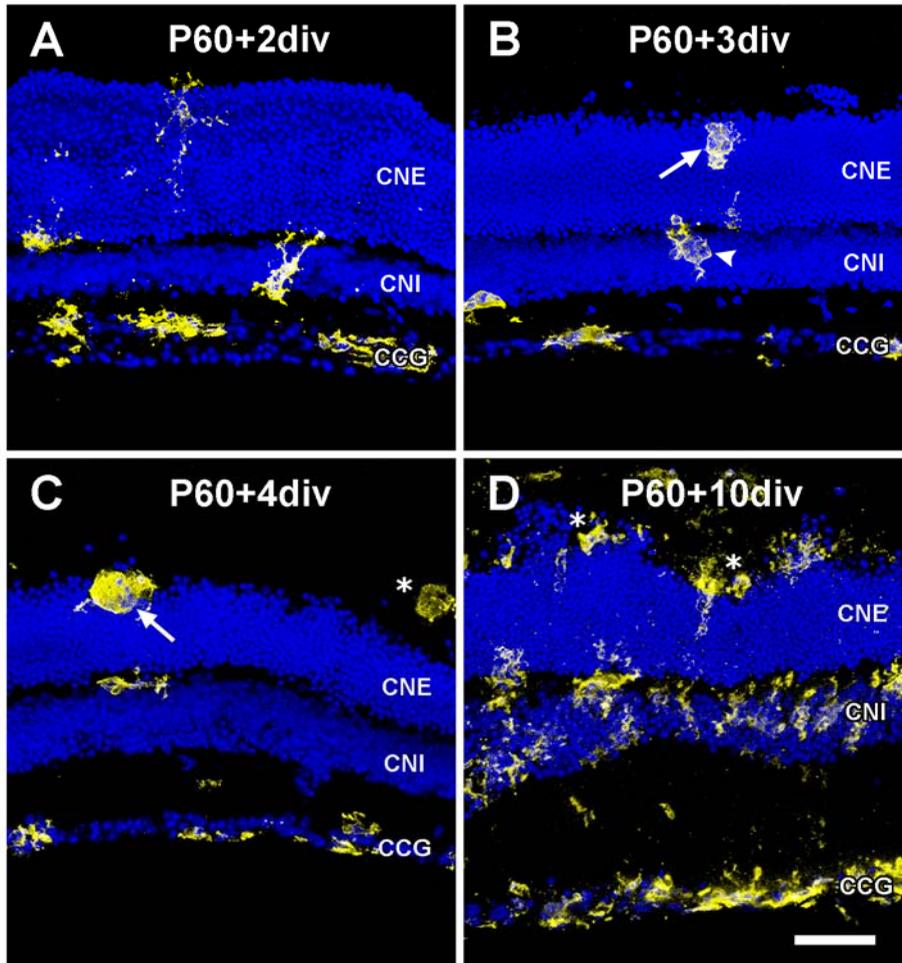
**Fig. II-18.** Distribución de células microgliales en secciones transversales de explantes de retina de ratones postnatales de 10 días (P10) incubados durante diferentes días *in vitro* (div). Las capas nucleares de la retina (CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares) muestran fluorescencia azul tras la tinción con Hoechst 33342. Las células microgliales se habían marcado originalmente en verde mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo CD11b, pero dicho color se ha sustituido por un falso color amarillo para potenciar el contraste con el fondo azul de las capas nucleares. **A, B:** Explantes de retina de P10+2div. En el límite inferior de la CNE, adyacente a la capa plexiforme externa, se observan células microgliales de aspecto globoso (flechas) que engloban núcleos de fotorreceptores. En la CNI, también se aprecian células microgliales de morfología similar (cabezas de flecha). En la CCG y capa plexiforme interna se observan células microgliales de morfología ameboide, menos voluminosas que las localizadas en la CNE y CNI. **C:** Explante de P10+4div, que muestra características similares a las de explantes de P10+2div, con grandes células microgliales globosas en la CNE (flecha) y microglía ameboide de menor tamaño en la CCG. En la superficie escleral del explante se observan dos voluminosas células CD11b-positivas (asterisco). **D, E:** Explantes de P10+6div, en los que la CNE está casi desprovista de microglía. Las células microgliales presentes en la CNI y capa plexiforme externa no muestra morfología globosa sino ramificada, mientras que las localizadas en la CCG tienen un aspecto más ameboide. Se observan células CD11b-positivas voluminosas (asteriscos) sobre la superficie escleral del explante. **F:** Explante de P10+10div en el que la CNE, capa plexiforme externa y CNI apenas contienen microglía, mientras que se observan numerosas células microgliales ameboides en la capa plexiforme interna y CCG. Células CD11b-positivas redondeadas (asteriscos) están presentes sobre la superficie escleral del explante. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. II-19.** Microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas de explantes de retina de ratón postnatal de 10 días cultivados *in vitro* durante 10 días (P10+10div). **A.** Célula microglial (flecha) en la capa nuclear interna con numerosas inclusiones y vesículas citoplasmáticas, típicas de células activadas, en contacto con neuronas que muestran signos de desorganización. **B.** Célula microglial (flecha) con inclusiones en su citoplasma, que se localiza en la capa plexiforme interna rodeada de perfiles axónicos y dendríticos. Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$  para A; 3,1  $\mu\text{m}$  para B.



**Fig. II-20.** Distribución de células microgliales en secciones transversales de explantes de retina de ratones adultos (P60) incubados durante diferentes días *in vitro* (div). Las capas nucleares de la retina (CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares) se han teñido de color azul con Hoechst 33342. Las células microgliales se habían marcado originalmente en verde mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo CD11b, pero dicho color se ha sustituido por un falso color amarillo para potenciar el contraste con el fondo azul de las capas nucleares. **A:** Explante de retina de P60+2div en el que se observan células microgliales de aspecto ameboide en todas las capas, tanto plexiformes como nucleares. **B:** Explante de P60+3div. Células microgliales de aspecto globoso se localizan en la CNE (flecha) y CNI (cabeza de flecha) y engloban núcleos celulares de la respectiva capa. **C:** Explante de P60+4div, en el que se aprecia una célula microglial globosa en la parte más escleral de la CNE (flecha) y una célula redondeada CD11b-positiva sobre la superficie del explante (asterisco). **D:** Explante de P60+10div. Células microgliales de aspecto ameboide aparecen localizadas en todas las capas de la retina. La CNE muestra alteraciones en su superficie escleral, sobre la que se disponen células redondeadas CD11b-positivas (asteriscos). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



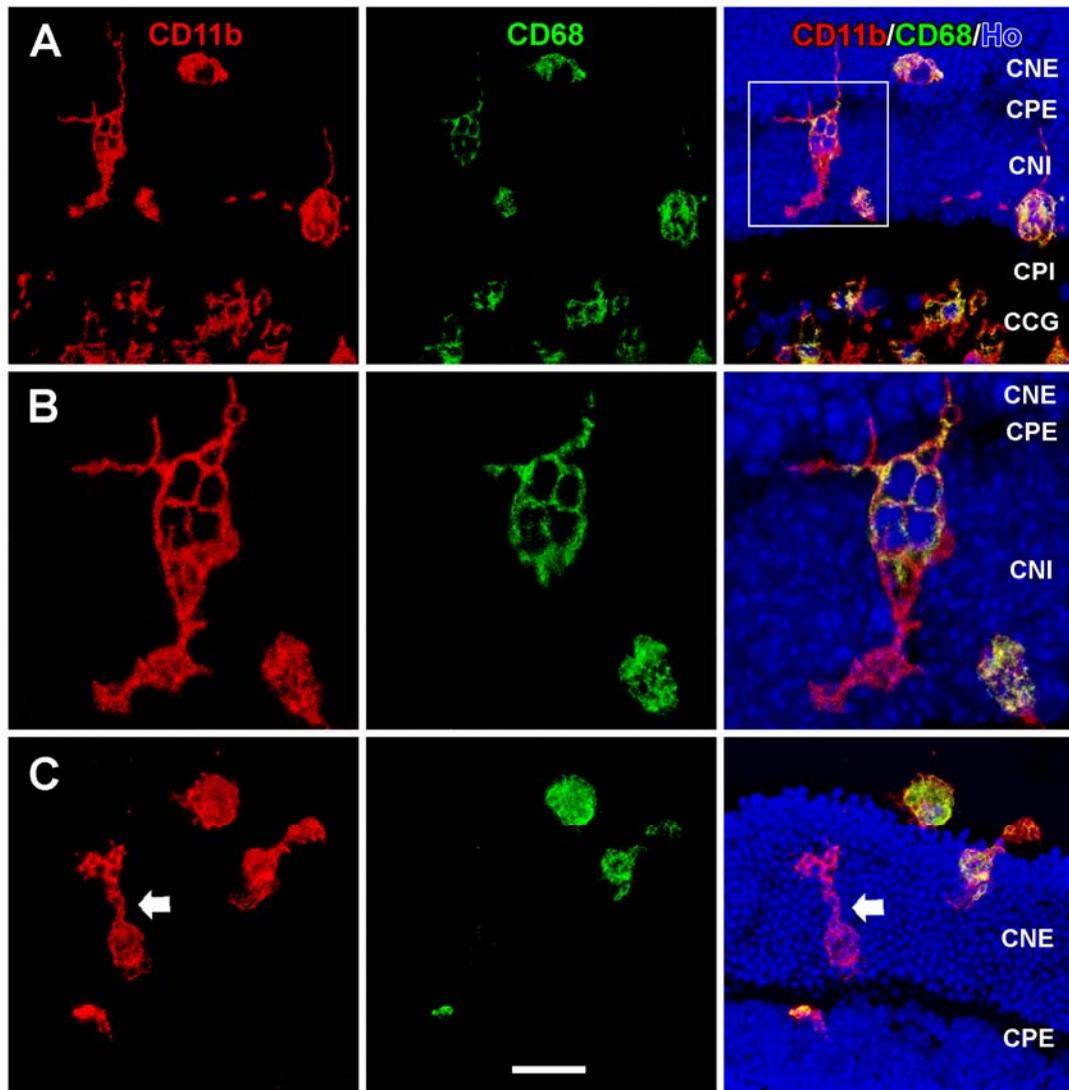
### **Inmunomarcado con anti-CD68 de las células microgliales**

Algunas secciones de explantes eran tratadas mediante inmunocitoquímica con anti-CD68. Este anticuerpo reconoce una proteína de membrana, conocida como macrosialina en el ratón, que se localiza fundamentalmente en la membrana lisosomal de células de origen macrófago/monocito, tales como las células microgliales. Puesto que el compartimento lisosómico se amplifica en células con actividad fagocítica, algunos estudios han utilizado el marcado con anti-CD68 para identificar la microglía activada fagocítica. El marcado inmunocitoquímico con anti-CD68 revelaba la presencia en los explantes de dos subpoblaciones de células microgliales: CD68-positivas y CD68-negativas.

El doble marcado CD11b/CD68 demostraba que todas las células CD68-positivas presentes en los explantes cultivados también eran CD11b-positivas (Fig. II-21A), revelando su naturaleza microglial. El marcado con anti-CD68 no delimitaba el contorno de las células, sino que aparecía como un conjunto de puntos discretos de diferente tamaño en el citoplasma (Fig. II-21B), que correspondían a lisosomas, cuyo número aumenta tras la activación microglial. Sin embargo, no todas las células microgliales (CD11b-positivas) eran CD68-positivas. En los explantes de P3 y P10, la inmensa mayoría de células microgliales eran CD68-positivas (Fig. II-21A). En los explantes de P60, era más frecuente la presencia de células microgliales CD68-negativas, algunas de las cuales mostraban una morfología activada y contenían núcleos de fotorreceptores en su citoplasma (Fig. II-21C). Estas observaciones resultaban contradictorias con la hipótesis de que CD68 es un marcador de la microglía activada fagocítica.



**Fig. II-21.** Células microgliales con doble marcado inmunocitoquímico para CD11b (rojo) y CD68 (verde) en explantes de retina de ratón cultivados *in vitro*. Los núcleos celulares se han teñido con Hoechst 3342 (Ho, color azul). CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. **A:** Explante de P10+3div en el que las células microgliales se localizan en todas las capas de la retina. Obsérvese que casi todas las células positivas para CD11b lo son también para CD68. El recuadro contorneado en blanco se muestra a mayor aumento en **B**. **B:** Detalle de una célula microglial positiva para CD11b y CD68. El marcado de CD68 es intracitoplasmático y se distribuye alrededor de cuatro núcleos picnóticos de la CNI que han sido englobados por la célula microglial. **C:** Explante de P60+4div en el que se observan varias células microgliales (CD11b-positivas), tres de las cuales son CD68-positivas y una es CD68-negativa. Esta célula se localiza en la CNE y muestra una morfología activada, englobando varios núcleos de fotorreceptores. Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$  para A; 9,8  $\mu\text{m}$  para B; 33  $\mu\text{m}$  para C.



### **Cambios en el número de células microgliales durante el cultivo *in vitro* de los explantes de retina de diferentes edades**

La proporción de células microgliales respecto del número total de células retinianas era determinada en los explantes de retina de cada edad a diferentes tiempos de cultivo mediante ensayos de citometría de flujo. En éstos se utilizaban suspensiones celulares procedentes de explantes disociados, que eran tratadas con los anticuerpos anti-CD11b conjugado con ficoeritrina (fluorescencia roja) y anti-CD68 conjugado con fluoresceína (fluorescencia verde). Anti-CD11b reconoce todas las células microgliales, mientras que anti-CD68 solo reconoce una subpoblación de las mismas. Por lo tanto, se tuvieron en cuenta las células CD11b-positivas (rojas) para determinar la proporción de todas las células microgliales (Fig. II-22), y también se evaluó la proporción de células CD68-positivas (verdes).

Los ensayos con citometría de flujo revelaban que la proporción de células microgliales presentes en los explantes de P3 en el momento de aislar la retina (P3+0div) era relativamente escasa. Así, estas células tan solo representaban alrededor del 5% del total de células de los explantes no cultivados (Fig. II-22A). Esta proporción se incrementaba ligeramente durante los primeros días de cultivo, siendo de alrededor del 7% en P3+4div, y disminuía en tiempos prolongados de cultivo, alcanzando alrededor del 4% en P3+10div.

La microglía era más abundante en los explantes de P10 recién aislados (P10+0div), en los que constituía alrededor del 8,5% del total de células (Fig. II-22B). Tras una disminución significativa en explantes de P10+2div (alrededor del 5%), la proporción de células microgliales volvía a aumentar en explantes de P10+3div, en los que alcanzaba valores semejantes a los del inicio del cultivo. Posteriormente, dicha proporción descendía progresivamente hasta llegar a aproximadamente un 2,5% en P10+10div.

La proporción más elevada de células microgliales se observaba en explantes de P60+0div, alrededor del 17,5%. Sin embargo, dicha proporción disminuía significativamente (hasta alrededor de un 8%) durante los dos primeros

días de cultivo, no mostrando variaciones significativas durante los restantes tiempos de cultivo (Fig. II-22C).

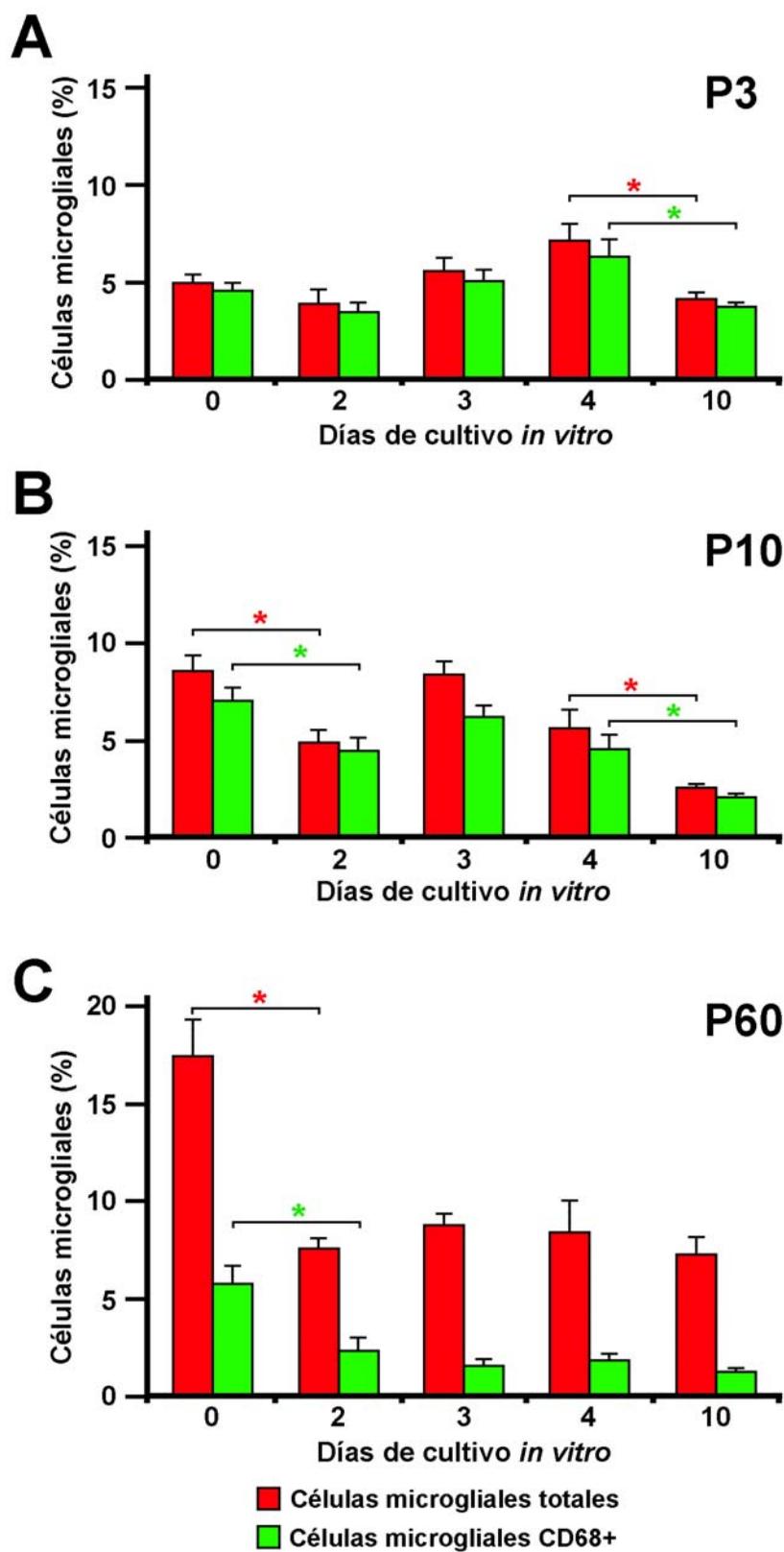
El número de neuronas de los explantes utilizados en nuestro estudio no se podía incrementar, ya que han perdido su capacidad proliferativa en retinas de P10 y P60 (Moshiri y Reh, 2004; Young, 1985a,b). Por otra parte, nuestras observaciones con TUNEL demostraban que una proporción de neuronas de dichos explantes morían durante el cultivo (Figs. II-11 a II-14). Estos datos ponían de manifiesto que el número de neuronas de los explantes debía disminuir durante el tiempo de cultivo, en coincidencia con los resultados de Pinzón-Duarte et al. (2004) en cultivos de retina de ratas de P7. Teniendo en cuenta este descenso del número de neuronas, la disminución en la proporción de células microgliales (respecto del número total de células) observada durante el tiempo de cultivo de los explantes solo podía ser explicada por una disminución del número absoluto de las mismas. Esta disminución debía ser causada por la desaparición de algunas células microgliales, que podrían morir mediante un proceso de apoptosis. Nuestras observaciones en secciones de explantes cultivados marcadas con anti-CD11b y TUNEL no permitían demostrar inequívocamente la existencia de células microgliales con núcleo TUNEL-positivo, ya que alguno de los perfiles TUNEL-positivos que se observaban dentro de algunas células microgliales podría corresponder al núcleo de éstas, pero también podría ser el núcleo de una célula retiniana en apoptosis englobado por la célula microglial.

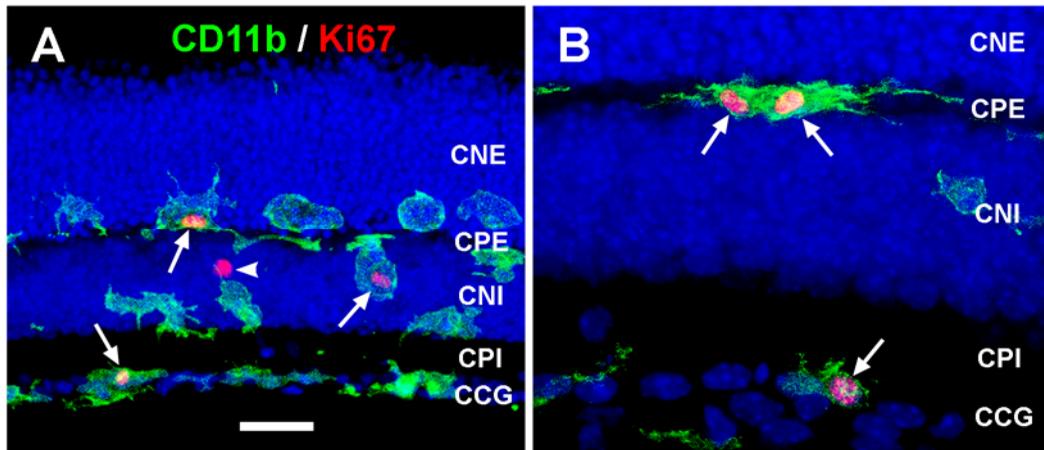
Algunas células microgliales proliferaban en los explantes cultivados, ya que eran positivas para el marcador de proliferación Ki67. En efecto, el doble tratamiento inmunocitoquímico de los explantes cultivados con anti-CD11b y anti-Ki67 ponía de manifiesto la presencia de células CD11b-positivas (células microgliales) cuyo núcleo era Ki67-positivo (Fig. II-23). Las células microgliales positivas para el marcador de proliferación estaban presentes en cualquiera de las capas de la retina, tanto plexiformes como nucleares (Fig. II-23A), y podían mostrar diferente apariencia morfológica, tanto globosa (Fig. II-23A) como ramificada (Fig. II-23B). Un ensayo de citometría de flujo, utilizando

suspensiones celulares procedentes de explantes de P10+2div marcadas con anti-CD11b conjugado con ficoeritrina y anti-Ki67 conjugado con Alexa Fluor 488, revelaba que alrededor de un 7,5% ( $7,6 \pm 0,146$ ; n=5) de las células microgliales (CD11b-positivas) estaban proliferando (eran Ki67-positivas). Teniendo en cuenta que la actividad proliferativa de las células microgliales durante el tiempo de cultivo de los explantes tendería a incrementar el número de las mismas y que realmente este número disminuía, resultaba evidente que una proporción de células microgliales debía estar desapareciendo en los explantes cultivados.



**Fig. II-22.** Porcentajes de células microgliales respecto del número total de células en explantes de retina de ratón de P3 (A), P10 (B) y P60 (C) no cultivados (0 días *in vitro*) y a distintos tiempos de cultivo (2, 3, 4 y 10 días *in vitro*). Estos porcentajes eran obtenidos mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes disociados, tratadas con los anticuerpos anti-CD11b conjugado con ficoeritrina (fluorescencia roja) y anti-CD68 conjugado con fluoresceína (fluorescencia verde). Cada barra representa el valor medio  $\pm$  error standard de los porcentajes de células microgliales obtenidos en cinco muestras procedentes de explantes de cada edad y tiempo de cultivo. Las barras rojas representan los porcentajes de células microgliales CD11b-positivas (todas las células microgliales) y las barras verdes corresponden a los porcentajes de células microgliales CD68-positivas. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los valores señalados ( $P < 0,05$ ). En las tres edades analizadas, los porcentajes de células microgliales (totales o activadas) son siempre menores en los explantes cultivados durante 10 días que en los explantes no cultivados, aunque las diferencias son más acusadas cuanto mayor es la edad considerada. También se advierte que en explantes no cultivados, los porcentajes de células microgliales totales (CD11b-positivas) se incrementan con la edad (5% en P3, 8,5% en P10 y 17,5% en P60), pero no sucede lo mismo con los porcentajes de células microgliales CD68-positivas.





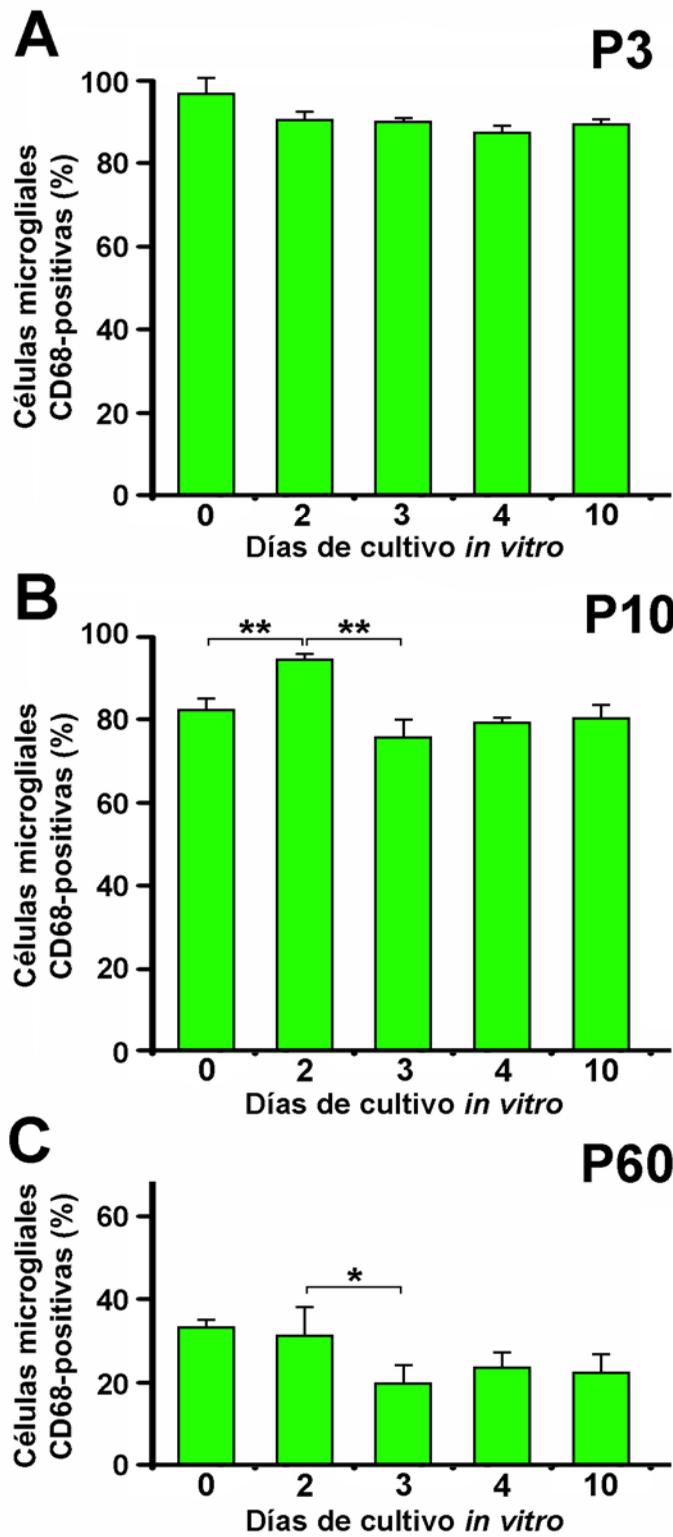
**Fig. II-23.** Secciones de explantes de retina de P10+2div doblemente inmunomarcadas con anti-CD11b (verde), que identifica células microgliales, y anti-Ki67 (rojo), que reconoce el núcleo de células proliferantes. Los núcleos celulares han sido teñidos con Hoechst 33342 (azul). CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. **A.** Células microgliales CD11b-positivas distribuidas en todas las capas de la retina, mostrando una morfología predominantemente globosa en la CNE y CNI. Tres células microgliales contienen un núcleo Ki67-positivo (flechas). Dos de ellas, localizadas en la CNE y CNI, muestran morfología globosa, mientras que la tercera, situada en la CCG, es de morfología ameboides. También se observa un núcleo Ki67-positivo perteneciente a una célula que no está marcada con CD11b (cabeza de flecha). **B.** Células CD11b-positivas de apariencia ramificada, dos de ellas localizadas en la CPE y una en la CCG, cuyos respectivos núcleos son Ki67-positivos (flechas). Barra de escala: 30  $\mu\text{m}$  en A; 12,6  $\mu\text{m}$  en B.

### **Tasa de IR-CD68 de las células microgliales en los explantes de retina de diferentes edades**

Los análisis con citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes tratadas con anti-CD11b y anti-CD68, mencionados en el apartado anterior, permitieron determinar la tasa de IR-CD68 de las células microgliales en los explantes de cada edad a diferentes tiempos de cultivo *in vitro*. Dicha tasa es el porcentaje de células microgliales inmunomarcadas con CD68 en relación a la población total de células microgliales (CD11b-positivas) de los respectivos explantes. En los explantes no cultivados, la tasa de IR-CD68 era de 97% en P3, 82% en P10 y 33% en P60 (Fig. II-24). Por lo tanto, dicha tasa disminuía con la edad de la retina, siendo muy elevada en retinas con menor grado de desarrollo y alcanzando valores muy bajos en retinas adultas.

En los explantes de P3, la tasa de IR-CD68 de la microglía durante todo el tiempo de cultivo era similar a la existente en los explantes no cultivados (Fig. II-24A). En los explantes de P10, dicha tasa se incrementaba desde el 82% en los explantes no cultivados hasta el 95% en P10+2div, retornando a valores en torno al 80% a partir de P10+3div (Fig. II-24B). En los explantes de retina adulta, la tasa de IR-CD68, que era baja (33%) antes del cultivo, se mantenía más o menos constante en P60+2div y disminuía hasta el 20% en P60+3div, estabilizándose en valores estadísticamente similares hasta P60+10div (Fig. II-24C). En resumen, la tasa de IR-CD68 se mantenía más o menos constante a lo largo del tiempo de cultivo en los explantes de retina en desarrollo (P3 y P10), mientras que disminuía en los cultivos de explantes de retina adulta.

**Fig. II-24.** Porcentajes de células microgliales que expresan CD68 (tasas de IR-CD68) en explantes de retina de P3 (**A**), P10 (**B**) y P60 (**C**) no cultivados (0 días *in vitro*) y a distintos tiempos de cultivo (2, 3, 4 y 10 días *in vitro*). Los porcentajes se han obtenido a partir de los datos adquiridos en los experimentos con citometría de flujo representados en la Fig. II-22. Cada barra representa el porcentaje medio ( $\pm$  error standard) obtenido en cinco explantes de cada edad y tiempo de cultivo. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los valores señalados (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ). La tasa de IR-CD68 en los explantes no cultivados disminuye con la edad de los mismos, siendo del 97% en P3 (**A**), 82% en P10 (**B**) y 33% en P60 (**C**). Dicha tasa se mantiene más o menos constante durante todo el tiempo de cultivo en los explantes de P3 (**A**). En los explantes de P10, se incrementa hasta el 95% al comienzo del cultivo y vuelve a estar en torno al 80% a partir de 3 días *in vitro* (**B**). En los explantes de P60, la tasa de IR-CD68 a los 2 días de cultivo *in vitro* es similar a la existente en los explantes no cultivados y disminuye hasta el 20-24% a partir de 3 días *in vitro* (**C**).



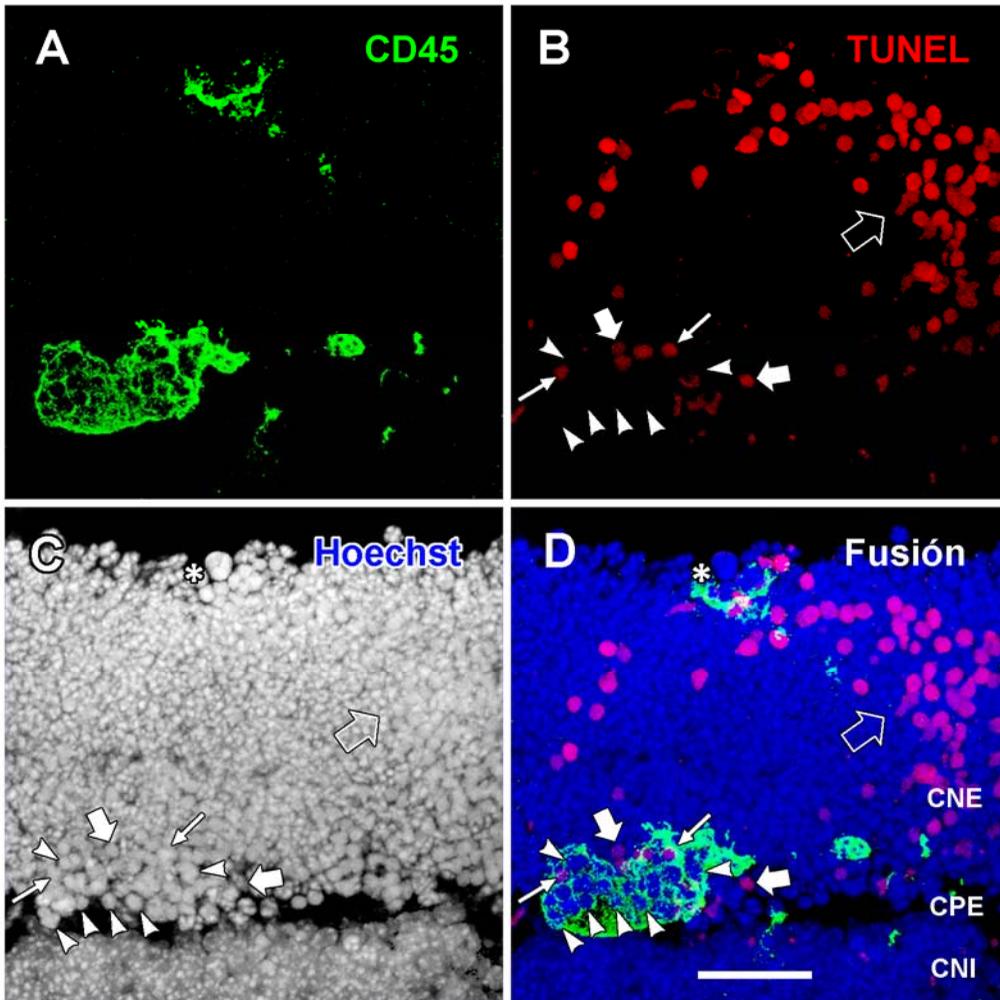
### **Las células microgliales activadas engloban núcleos neuronales negativos o débilmente positivos para TUNEL**

En general, no había una relación topográfica evidente entre la distribución de células microgliales y la de núcleos apoptóticos TUNEL-positivos en los explantes de retina cultivados, independientemente de la edad de la retina o del tiempo de cultivo. De hecho, con mucha frecuencia se observaban acumulaciones de perfiles TUNEL-positivos que no mantenían una relación obvia con células microgliales (Fig. II-25).

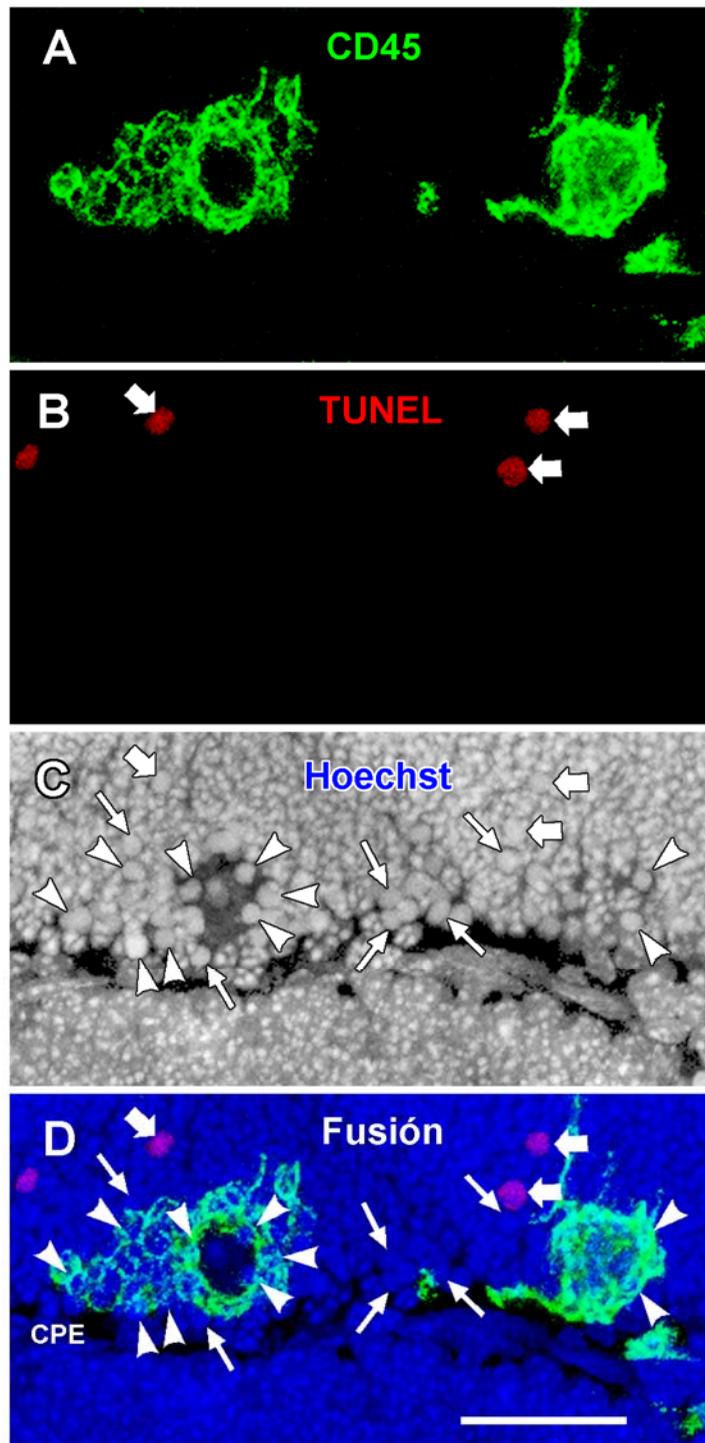
Se ha descrito con anterioridad la presencia de células microgliales globosas con aspecto de panal de abejas tanto en la CNE como en la CNI de explantes de P10 y P60 (desde los primeros días de cultivo) y de explantes de P3 (a partir del cuarto día de cultivo). Estas células microgliales con signos morfológicos de activación mostraban una intensa actividad de incorporación en su citoplasma de grupos de núcleos de fotorreceptores (Fig. II-21B). Es interesante destacar que los núcleos englobados en el citoplasma de estas células microgliales activadas eran muy frecuentemente TUNEL-negativos (Figs. II-25 y II-26). La tinción con Hoechst revelaba que estos núcleos TUNEL-negativos mostraban una condensación de la cromatina similar a la observada en núcleos TUNEL-positivos (Fig. II-26), típica de núcleos en proceso degenerativo. También se podían observar células microgliales globosas con agrupaciones de perfiles TUNEL-positivos englobados en su citoplasma. Curiosamente, estas agrupaciones mostraban una tinción de TUNEL que solo era débilmente positiva, mientras que la inmensa mayoría de los perfiles intensamente positivos para TUNEL no estaban englobados por células microgliales (Fig. II-27). Los núcleos débilmente positivos para TUNEL podrían proceder de núcleos TUNEL-negativos previamente englobados por células microgliales, o bien podrían haber sido englobados por éstas cuando ya mostraban un carácter TUNEL-positivo. Nuestras observaciones estáticas en secciones de explantes fijados no permitieron dilucidar cuál de las dos posibilidades es la acertada. Lo que sí resulta evidente es que

muchas células microgliales activadas engloban núcleos de fotorreceptores o de neuronas de la CNI con signos de degeneración, pero que son TUNEL-negativos.

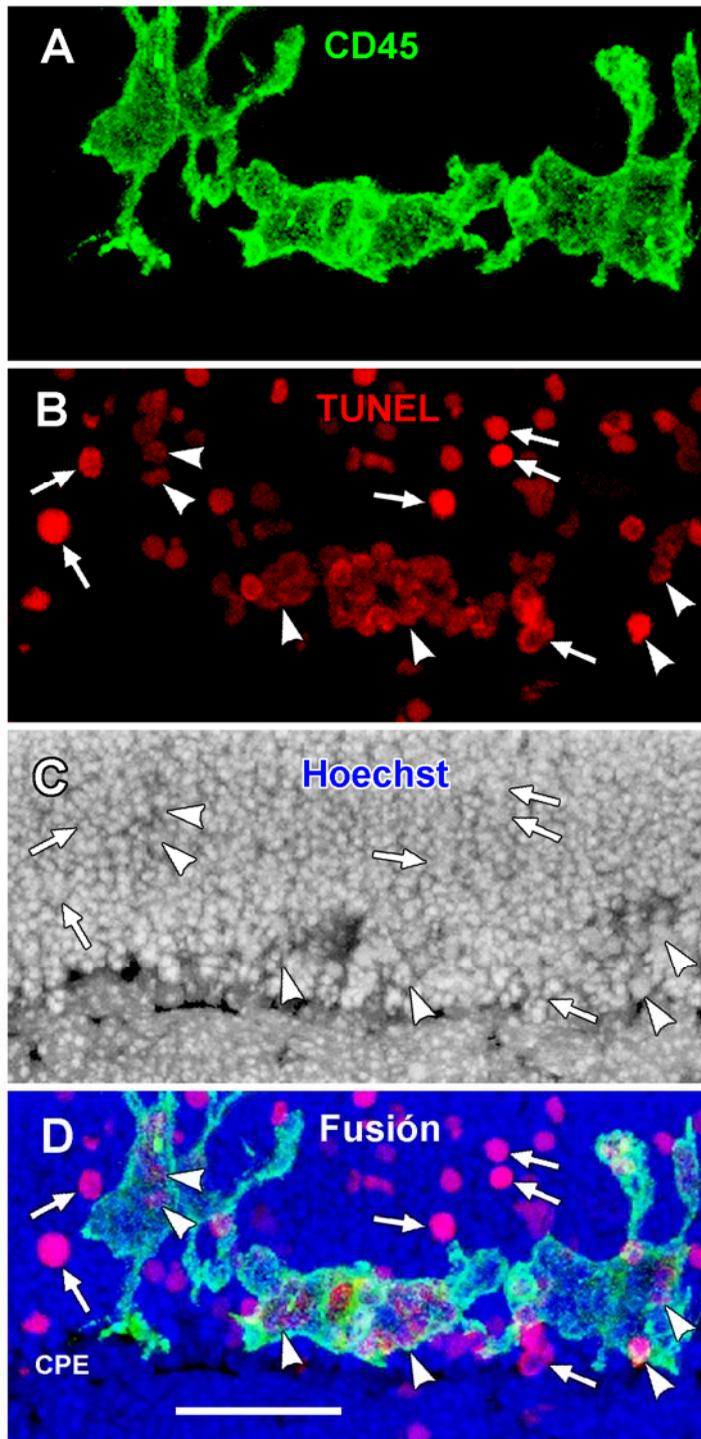
**Fig. II-25.** Microscopía confocal de una sección de un explante de P10+2div teñida mediante inmunocitoquímica con anti-CD45 (verde, **A**), histoquímica de TUNEL (rojo, **B**) y Hoechst 33342 (azul, **C**). La imagen del canal azul en **C** se muestra en escala de grises para facilitar la observación, aunque en la imagen de fusión de los tres canales (**D**) se ha conservado el color azul. En la parte inferior de la capa nuclear externa (CNE), adyacente a la capa plexiforme externa (CPE), se observa una voluminosa célula microglial CD45-positiva, con morfología globosa y aspecto de panal de abejas, que engloba numerosos núcleos de fotorreceptores de cromatina condensada, la mayoría de los cuales son TUNEL-negativos (cabezas de flecha), aunque algunos muestran una débil tinción con TUNEL (flechas delgadas). También se observan perfiles débilmente positivos para TUNEL fuera de la célula microglial y adyacentes a la misma (flechas gruesas blancas). Más alejados de la célula microglial se disponen numerosos núcleos fuertemente positivos para TUNEL (flecha gruesa vacía). En la superficie de la CNE se observa una prolongación de una célula microglial CD45-positiva que está abrazando un grupo de núcleos de fotorreceptores de cromatina condensada (asterisco). CNI: capa nuclear interna. Barra de escala: 30  $\mu\text{m}$ .



**Fig. II-26.** Microscopía confocal de una sección de un explante de P10+2div teñida mediante inmunocitoquímica con anti-CD45 (verde, **A**), histoquímica de TUNEL (rojo, **B**) y Hoechst 33342 (azul, **C**). La imagen del canal azul en **C** se muestra en escala de grises para facilitar la observación, aunque en la imagen de fusión de los tres canales (**D**) se ha conservado el color azul. En la parte inferior de la capa nuclear externa, adyacente a la capa plexiforme externa (CPE), se observan dos células microgliales CD45-positivas, con morfología globosa, que incluyen numerosos núcleos TUNEL-negativos de cromatina condensada (cabezas de flecha). Otros núcleos TUNEL-negativos de cromatina condensada no están englobados por células microgliales (flechas delgadas). También se observan núcleos débilmente positivos para TUNEL no englobados por células microgliales (flechas gruesas). Barra de escala: 30  $\mu$ m.



**Fig. II-27.** Microscopía confocal de una sección de un explante de P10+3div teñida mediante inmunocitoquímica con anti-CD45 (verde, **A**), histoquímica de TUNEL (rojo, **B**) y Hoechst 33342 (azul, **C**). La imagen del canal azul en **C** se muestra en escala de grises para facilitar la observación, aunque en la imagen de fusión de los tres canales (**D**) se ha conservado el color azul. En la parte inferior de la capa nuclear externa, adyacente a la capa plexiforme externa (CPE), se observan tres células microgliales CD45-positivas, con morfología globosa, que incluyen núcleos TUNEL-positivos (cabezas de flecha). Por lo general, estos núcleos englobados por células microgliales muestran una débil tinción TUNEL. También se observan núcleos TUNEL-positivos que no están englobados por células microgliales (flechas delgadas), entre los que se observan muchos núcleos con una fuerte tinción TUNEL. Barra de escala: 30  $\mu$ m.



## DISCUSIÓN

En este capítulo se ha analizado la distribución y caracteres fenotípicos de la microglía en cultivos organotípicos de retina de ratón a diferentes edades postnatales. Las células microgliales, que reaccionan rápidamente frente a las condiciones ambientales (Hanisch y Kettenmann, 2007; Kreutzberg, 1996), modifican su comportamiento ante su nueva situación microambiental en los explantes cultivados. En este apartado, se discutirán primeramente algunos aspectos relativos a la influencia de distintas condiciones de cultivo en la organización estructural de los explantes. A continuación, se analizarán los resultados relativos a la muerte y supervivencia de las células de los explantes. Finalmente, se discutirán las variaciones de la proporción de microglía en explantes de retina de diferentes edades y tiempos de cultivo, así como la activación microglial que tiene lugar en los mismos.

### **Condiciones de cultivo y preservación de la estructura de la retina**

Los explantes de retina cultivados *in vitro* conservan la estructura general de la retina, con sus diferentes capas, incluso a tiempos prolongados de cultivo. No obstante, se observan algunas alteraciones estructurales durante el tiempo de cultivo. Una de estas alteraciones es el menor grosor de los explantes de retina, cualquiera que sea su edad, comparado con el de retinas *in situ* de edades equivalentes. Este menor grosor es similar al observado en cultivos de rebanadas de órganos (Marín-Teva JL, comunicación personal) y podría ser debido a la acción de la fuerza de la gravedad. Otra alteración consiste en la aparición de pliegues u ondulaciones de la superficie de la CNE que alternan con áreas totalmente planas. En tiempos prolongados de cultivo, estos pliegues pueden llegar a ser muy marcados y reciben el nombre de rosetas (Ogilvie et al., 1999; Söderpalm et al., 1999). Su formación ha sido atribuida a la ausencia de presión intraocular (Ogilvie et al., 1999). El desarrollo de rosetas también está relacionado con el grado de maduración de la retina, ya que los explantes de retina de P10 y P60 son menos proclives a la aparición de las mismas. Por otra parte, la aparición

de rosetas puede estar en relación con el procedimiento mecánico seguido para el aislamiento de la retina y la confección del explante, que supone un importante estrés traumático para el tejido retiniano (Söderpalm et al., 1999). Las rosetas observadas en los explantes durante los primeros días de cultivo estarían aparentemente relacionadas con dicho estrés mecánico, pero las que aparecen en tiempos prolongados *in vitro* serían atribuibles a las propias condiciones de cultivo. En algunas ocasiones, un inadecuado estiramiento del explante sobre la membrana millicell también puede contribuir a la aparición de rosetas. La distribución de las mismas no es homogénea en todos los explantes y, en cualquier caso, éstos siempre muestran amplias áreas en las que la estructura general de la retina permanece inalterada. Las observaciones microscópicas descritas en nuestro estudio se han realizado en estas áreas desprovistas de rosetas.

Nuestras observaciones muestran que, con las condiciones de cultivo utilizadas en el presente estudio, la edad de la retina influye considerablemente en la preservación de la estructura de la retina durante el cultivo de los explantes. Los explantes de retina de P3 conservan una citoarquitectura similar a la observada *in situ* durante la primera semana de cultivo *in vitro*, pero sufren importantes alteraciones durante la segunda semana, sobre todo la CNE y CNI. Parece como si las capas formadas durante el tiempo de cultivo sufrieran alteraciones con mayor facilidad que las capas constituidas con anterioridad al cultivo. Estos resultados son coherentes con los descritos en otros estudios (Ogilvie et al., 1999; Pinzón-Duarte et al., 2000; Söderpalm et al., 1999). Los explantes de P60 también sufren un considerable deterioro de sus capas nucleares a tiempos prolongados de cultivo, aunque en este caso las capas de la retina ya son totalmente maduras antes del cultivo de los explantes. Aparentemente, las células de las diferentes capas carecen de suficiente plasticidad y no logran adaptarse convenientemente a las condiciones de cultivo dando lugar a las alteraciones observadas. Algunos laboratorios han desarrollado condiciones de cultivo específicas para retinas adultas (Johnson y Martin, 2008; Kaempf et al., 2008; Koizumi et al., 2007), tratando de conseguir una mayor estabilidad de la citoarquitectura de los explantes

a pesar de la menor plasticidad celular en la edad adulta. Sin embargo, estos explantes también muestran regiones en las que se observan alteraciones de las capas de la retina. Nuestros resultados indican que la preservación de la citoarquitectura retiniana a tiempos prolongados de cultivo es mejor en los explantes de retinas de P10 que en los explantes de P3 o P60. Esto podría ser debido a que la retina de P10 ya ha alcanzado un grado de desarrollo suficiente para mantener su estructura en condiciones no naturales, pero conserva todavía el grado de plasticidad necesario para adaptarse a las condiciones de cultivo. Por el contrario, ni el grado de desarrollo de la retina de P3 ni el nivel de plasticidad de la retina de P60 serían los adecuados para su mejor adaptación a unas condiciones no naturales.

La estructura retiniana también se ve afectada por la orientación del explante retiniano. En el presente estudio los explantes han sido cultivados con la capa de fotorreceptores hacia arriba, es decir, con la superficie vitreal en contacto con la membrana millicell, ya que trabajos previos (Hernández et al., 2009) han puesto de manifiesto que el grosor de las capas retinianas se mantiene mejor cuando se cultivan de este modo. Además, otros estudios de nuestro laboratorio han comprobado que esta orientación conserva mejor la estructura de la retina en cultivos organotípicos de retina de ave (Carrasco et al., 2011).

Otro factor que influye decisivamente en la estructura de los explantes de retina es la presencia o no de suero en el medio de cultivo. El suero es una emulsión compleja de proteínas (globulinas, albúmina, etc), polipéptidos (factores tróficos e inhibidores del crecimiento), lípidos y moléculas orgánicas e inorgánicas, algunas de las cuales son desconocidas. Diferentes estudios en cultivos organotípicos de explantes de retina han utilizado medio suplementado con suero (Mertsch et al., 2001; Ogilvie et al., 1999; Pinzón-Duarte et al., 2000) o medio libre de suero (Caffé et al., 2001; Tura et al., 2009). Con ambos procedimientos la retina postnatal temprana completa su desarrollo *in vitro* con una configuración estructural comparable a las retinas *in vivo*. La ausencia de suero permite un control más preciso de los factores que intervienen en los

experimentos (Arroba et al., 2011; Caffé et al., 2001). No obstante, la incubación en un medio sin suplemento de suero parece acelerar la muerte de las células ganglionares (Caffé et al., 2001; Tura et al., 2009) y produce una activación de los astrocitos, células de Müller y microglía (Tura et al., 2009), por lo que en el presente estudio hemos optado por el uso de un medio suplementado con suero.

El cultivo de explantes de retina también se ve afectado por la presencia o no de epitelio pigmentario en los mismos. Así, dicho epitelio es necesario para una correcta morfogénesis de la retina neural durante el desarrollo temprano del ojo (Raymond y Jackson, 1995), aunque no parece tan trascendente en etapas más avanzadas del desarrollo, en las que retinas cultivadas *in vitro* sin epitelio pigmentario muestran una diferenciación celular, laminación y sinaptogénesis comparables a las observadas durante el desarrollo *in vivo* (Pinzón-Duarte et al., 2000). El epitelio pigmentario también influye en el desarrollo de los segmentos externos de los fotorreceptores (Ogilvie et al., 1999) y en la diferenciación de los conos, que requiere de 11-cis-retinol, producido por las células de dicho epitelio (Bandyopadhyay y Rohrer, 2010). No obstante, la ausencia de epitelio pigmentario no afecta a la supervivencia de los fotorreceptores diferenciados (Söderpalm et al., 1999), aunque puede favorecer la aparición a largo plazo de anomalías estructurales en los explantes cultivados (Bandyopadhyay y Rohrer, 2010; Ogilvie et al., 1999; Pinzón-Duarte et al., 2000; Söderpalm et al., 1999, 2000). En nuestro estudio hemos utilizado explantes de retina desprovistos de epitelio pigmentario, ya que éste se suele desprender durante el aislamiento normal de la retina, como consecuencia de su fuerte adhesión a la coroides. El tratamiento del globo ocular con proteasas, que liberan la unión entre coroides y epitelio pigmentario, permite la conservación de éste en los explantes de retina (Bandyopadhyay y Rohrer, 2010). Sin embargo, este tratamiento enzimático podría afectar a proteínas superficiales de la microglía (entre ellas, numerosos receptores de membrana) que modificarían el comportamiento de la misma. Por este motivo, se evitó dicho tratamiento aun a costa de la pérdida del epitelio pigmentario en los explantes.

### **Supervivencia y muerte celular en los explantes de retina cultivados**

Nuestros resultados demuestran la existencia de numerosos núcleos TUNEL-positivos en los explantes de retina cultivados *in vitro* que revelan una intensa muerte celular durante el tiempo de cultivo. Esta muerte celular puede aparecer en respuesta tanto a lesiones producidas durante la confección del explante (principalmente axotomía de células ganglionares) como a las condiciones no naturales del cultivo *in vitro*. La densidad de núcleos TUNEL-positivos se incrementa durante los primeros días *in vitro*, alcanzando valores máximos a tiempos de cultivo tanto más prolongados cuanto mayor es la edad de la retina (2 div en P3, 3 div en P10 y 4 div en P60; ver Fig. II-14). Además, la densidad de perfiles TUNEL-positivos en los explantes de retinas adultas es mayor que en los de retinas postnatales, probablemente como consecuencia de la menor plasticidad de las células maduras de la retina que dificultaría su adaptación a las condiciones de cultivo. Es interesante resaltar que la distribución de perfiles TUNEL-positivos no es homogénea en toda la extensión de cada explante, siendo muy abundantes en algunas zonas y escasos en otras. En contraste, la muerte celular es, por lo general, menos intensa pero más uniforme en todas las regiones de explantes de retinas adultas. Esta distribución uniforme contribuye a que la densidad general de fragmentos TUNEL-positivos sea mayor en los cultivos organotípicos de retinas adultas que en los de retinas postnatales.

Los anteriores resultados son coherentes con la menor viabilidad celular detectada en los explantes de retinas adultas mediante citometría de flujo. En general, la viabilidad celular y la densidad de fragmentos TUNEL-positivos siguen patrones inversos, de manera que la viabilidad es menor cuanto mayor es la edad de la retina explantada y lo contrario ocurre con la densidad de fragmentos TUNEL-positivos. No obstante, conviene tener en cuenta que los datos de viabilidad celular no son estrictamente comparables con los ofrecidos por la técnica TUNEL, ya que las células marcadas con TUNEL no se corresponden exactamente con las células no viables detectadas mediante citometría de flujo. Hay, al menos, tres razones que justifican esta afirmación: 1) algunas células

marcadas con TUNEL pueden conservar un citoplasma funcional capaz de procesar FDA, que les permitiría ser consideradas viables con citometría de flujo, ya que la degradación del citoplasma ocurre en las últimas fases de la apoptosis, bastante después de la aparición de roturas del ADN que posibilitan el reconocimiento con TUNEL (Watanabe et al., 2002); 2) algunas células marcadas con TUNEL no están degenerando, sino que están reparando su ADN (Watanabe et al., 2002), siendo células enteramente viables a pesar de su marcado con TUNEL; y 3) el método TUNEL no reconoce todas las formas de muerte celular, mientras que el ensayo de viabilidad celular con citometría de flujo discrimina células viables y células muertas, sea cual sea el mecanismo de muerte. Tampoco hay que descartar las posibles influencias que la técnica utilizada aquí pueda tener sobre la cuantificación de la viabilidad celular de los explantes, ya que la disgregación de éstos para obtener suspensiones celulares podría afectar a algunas células, que serían viables en los explantes y perderían su viabilidad después de la disgregación. Así, la viabilidad celular medida en suspensiones celulares no sería igual que la existente en el explante. Por el contrario, la técnica TUNEL se lleva a cabo sobre secciones de explantes fijados, por lo que refleja la situación real del explante en el momento de la fijación.

Los núcleos TUNEL-positivos se observan en todas las capas nucleares de los explantes, pero en nuestro estudio se ha determinado la densidad general de los mismos, sin especificar la densidad en cada capa. Sin embargo, la simple observación microscópica revela inequívocamente que la CNE es la que presenta mayor abundancia de fragmentos TUNEL-positivos, poniendo de manifiesto una intensa muerte de fotorreceptores. La degeneración progresiva de fotorreceptores en cultivos organotípicos de explantes de retina parece ser debida al estrés del retículo endoplasmático inducido por la acumulación aberrante de rodopsina (Mohlin y Johansson, 2011). Además, las células de la CNI y CNE muestran una dependencia de destino, por lo que degeneran cuando faltan las señales apropiadas producidas en última instancia por células ganglionares, muchas de las cuales mueren en las primeras horas de cultivo (Cusato et al., 2002; Engelsberg et al.,

2004). La muerte de fotorreceptores en la CNE de explantes cultivados sigue un patrón diferente dependiendo de la edad de la retina. En explantes de retina de P3 se inicia a tiempos prolongados de cultivo (segunda semana *in vitro*), ya que la CNE no se forma en estos explantes hasta los 3 div. Estos resultados sugieren que los fotorreceptores no son sensibles a las señales que desencadenan su muerte hasta que no están suficientemente diferenciados. En explantes de P10 y P60 se aprecia muerte de fotorreceptores desde los primeros días de cultivo y es más intensa en P10 que en P60, lo que sugiere que los fotorreceptores son más vulnerables en etapas postnatales que en la edad adulta. En relación con lo anterior, es interesante mencionar que en ratones mutantes con degeneración retiniana, la muerte de fotorreceptores característica de esta patología comienza justamente en P10 (Zeng et al., 2005). La diferente sensibilidad de los fotorreceptores a estímulos que provocan su muerte en función de la edad ha sido descrita en la retina de peces sometidos a fotodegeneración (Bejarano-Escobar et al., 2012).

Nuestras observaciones revelan la muerte de células ganglionares en los explantes de retina postnatal de ratón cultivados *in vitro*, pero el número de perfiles TUNEL-positivos es relativamente bajo en la CCG (mucho menos abundantes que los localizados en la CNb o en la CNE). Por el contrario, se ha descrito una muerte celular masiva en la CCG de explantes de retina postnatal de rata durante los dos primeros días de cultivo *in vitro* (Engelsberg et al., 2004). La concentración de perfiles TUNEL-positivos en la CCG observada en nuestro estudio es comparable a la descrita en explantes de retina de ratón de P6 tras 2 div (McKernan et al., 2006). La disconformidad entre nuestros resultados y los de Engelsberg et al. (2004) podría ser debida a la utilización de diferentes especies (ratón y rata, respectivamente), con distintas “ventanas” de muerte de células ganglionares durante el desarrollo normal (Péquignot et al., 2003; Perry and Cowey, 1982), así como al empleo de retinas de edades diferentes (P1 en el estudio de Engelsberg y P3 y P10 en nuestro caso). Dicho desacuerdo también podría estar relacionado con diferencias en el procedimiento técnico seguido, ya

que el medio de cultivo utilizado por Engelsberg et al. (2004) contiene 10% de suero fetal bovino, mientras que el empleado en nuestro estudio está suplementado con 25% de suero de caballo.

### **Variaciones en la proporción de células microgliales de los explantes cultivados**

Nuestros resultados de citometría de flujo de suspensiones celulares de retina marcadas con CD11b han revelado que la proporción de células microgliales presentes en los explantes se incrementa con la edad de la retina de la que se obtiene el explante (5% en P3, 8,5% en P10 y 17,5% en P60). Otros estudios han referido que la densidad de células microgliales de la retina de ratón se incrementa progresivamente durante los 12 primeros días postnatales (Fischer et al., 2011; Santos et al., 2008). Aunque la densidad microglial y la proporción de microglía no son parámetros totalmente equivalentes y cualquier comparación entre ellos debe ser hecha con precaución, el incremento de la proporción microglial entre P3 y P10 expuesto en el presente estudio es compatible con el aumento de la densidad microglial entre P0 y P12 previamente descrito. El aumento de la proporción microglial durante el desarrollo de la retina puede ser ocasionado por el aumento del número absoluto de células microgliales, bien mediante proliferación de las mismas o bien mediante entrada de precursores microgliales desde el nervio óptico o desde los vasos sanguíneos. La existencia de una intensa actividad proliferativa de la microglía inmadura ha sido descrita durante el desarrollo de la retina de aves (Marín-Teva et al., 1999a; Navascués et al., 2002). En la retina de ratones adultos hay una pequeña proporción de células microgliales que proliferan, ya que incorporan bromodeoxiuridina y son Ki67-positivas (Wohl et al., 2011). Además, la microglía prolifera activamente durante el desarrollo de diferentes regiones del SNC de rata (Dalmau et al., 2003). Por lo tanto, es lógico suponer que también debe haber actividad proliferativa de la microglía en retinas postnatales de ratón, aunque el estudio de Santos et al. (2008) no conseguía detectar células microgliales Ki67-positivas en las mismas. Otra

causa que contribuiría a incrementar la proporción microglial sería la disminución del número de neuronas de la retina. Se sabe que la proliferación de precursores neuronales en la retina central de ratón es muy baja entre P4 y P6 y nula a partir de P7 (Young, 1985b) y que una considerable proporción de neuronas muere durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal (Young, 1984). Estos datos apoyan la existencia de una disminución del número absoluto de células no microgliales en la retina entre P3 y P10 que, junto con la proliferación de las células microgliales, justificaría el incremento de la proporción de microglía detectado en nuestro estudio.

Nuestros resultados indican que el incremento de la proporción microglial entre P10 (8,5%) y la edad adulta (17,5%) es mucho más intenso que el observado entre P3 y P10. No hay datos previos en la literatura sobre el tamaño de la población microglial en la retina de mamíferos y el único estudio que ofrece este tipo de datos (Lawson et al., 1990) indica que la proporción de células microgliales del cerebro de ratón adulto oscila entre un 5% (en la corteza cerebral y el cuerpo calloso) y un 12% (en la sustancia negra). Comparativamente, la proporción de un 17,5% encontrada en nuestro estudio parece excesiva. Esta mayor proporción microglial en la retina podría tener una explicación fisiológica, ya que ésta es una región del SNC que recibe constantemente estímulos luminosos, los cuales desencadenan una intensa actividad sináptica en las capas plexiformes donde se localizan numerosas células microgliales. Se ha demostrado que la microglía ejerce un continuo control del estado funcional de las conexiones sinápticas y contribuye al turnover de las mismas (Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2009), de manera que un déficit en la función microglial podría contribuir a generar anomalías sinápticas (Paolicelli et al., 2011). Recíprocamente, la neurotransmisión que tiene lugar en las sinapsis participa en la regulación del comportamiento de las células microgliales de la retina (Fontainhas et al., 2011). Por lo tanto, sería lógico que una región con intensa actividad sináptica, como es la retina, tenga necesidad de disponer de una mayor proporción de microglía que otras regiones del SNC.

También podría suceder que la proporción microglial de la retina adulta obtenida en nuestro estudio esté sobrevalorada como consecuencia de la metodología empleada. Lawson et al. (1990) obtenían sus datos mediante morfometría de secciones histológicas, mientras que nuestros resultados se han obtenido a partir del análisis con citometría de flujo de suspensiones celulares. Es posible que la disgregación de la retina adulta para obtener una suspensión celular pueda ocasionar la fragmentación de algunas neuronas (cuya plasticidad en la retina madura estaría seriamente limitada) sin afectar a las células microgliales (que son células dotadas de una gran plasticidad). Si esto fuera así, el análisis de citometría de flujo podría haber descartado una cierta proporción de neuronas fragmentadas pero no de células microgliales, contribuyendo a obtener una sobrevaloración de la proporción de microglía. En retinas en proceso de desarrollo, la proporción microglial podría no estar sobrevalorada como consecuencia de la mayor plasticidad de las neuronas inmaduras que permitiría una mejor adaptación a la disgregación de la retina sin llegar a fragmentarse. El considerable incremento de la proporción de microglía en la retina de ratón entre P10 y P60 no parece compatible con la disminución de la densidad microglial entre P12 y P20, descrita por Fischer et al. (2011), o entre P7 y P28, referida por Santos et al. (2008). Esta discordancia apoyaría la posibilidad de que la citometría de flujo proporcione una sobrevaloración de la proporción microglial en la retina adulta.

Independientemente de la edad de la retina de los explantes cultivados, la proporción de células microgliales en los mismos siempre muestra una significativa disminución al final del tiempo de cultivo (Fig. II-22). En explantes de retina en desarrollo, tanto de P3 como de P10, esta disminución tiene lugar a tiempos prolongados de cultivo, mientras que en explantes de retina adulta ya se observa en los primeros días de cultivo. Teniendo en cuenta que no es posible la entrada de células microgliales o de sus precursores desde regiones externas al explante y que la proliferación de neuronas en la retina central es nula en P10 y P60 o muy baja en P3 (Young, 1985b), las variaciones de la proporción microglial

pueden ser debidas a: 1) proliferación de células microgliales (que incrementaría su proporción); 2) degeneración de las mismas (que contribuiría a disminuir su proporción); y 3) muerte de neuronas de la retina (que contribuiría a elevar la proporción de microglía). Nuestros resultados demuestran la existencia de proliferación microglial a lo largo del tiempo de cultivo. Esto no es sorprendente, ya que la microglía se activa en los explantes cultivados y la activación implica un aumento de la proliferación microglial (Langmann, 2007; Marín-Teva et al., 2011). Además, la axotomía de las células ganglionares mediante sección del nervio óptico induce un aumento de la proliferación de la microglía retiniana (Wohl et al., 2010, 2011) y dicha axotomía tiene lugar durante la confección de los explantes. Nuestro estudio también demuestra la muerte de neuronas durante el cultivo *in vitro* de los explantes que, junto con la proliferación microglial, debería ocasionar un aumento de la proporción microglial al final del tiempo de cultivo, contrariamente a lo que realmente ocurre. Por lo tanto, la disminución en la proporción de células microgliales solo puede ser explicada suponiendo que algunas mueren en los explantes cultivados, lo cual no es extraño ya que una parte de la microglía activada sufre degeneración (Shin et al., 2004; Streit y Xue, 2009). En nuestro estudio no hemos podido demostrar la presencia de células microgliales apoptóticas, ya que era difícil precisar si alguno de los perfiles TUNEL-positivos englobados dentro de algunas células microgliales correspondía al núcleo de las mismas. También podría suceder que el mecanismo de degeneración de las células microgliales no permitiera su reconocimiento con la técnica TUNEL. Así, Streit y Xue (2009) han descrito un tipo de muerte microglial accidental (citorrexia) que transcurre en ausencia de tinción con TUNEL. Por otra parte, se han descrito varios tipos de muerte celular diferentes de la apoptosis (Elmore, 2007; Smith y Yellon, 2011; Wu et al., 2012; Yuan y Kroemer, 2010). Entre ellos, la necroptosis es una forma de muerte celular regulada no apoptótica, inicialmente descrita por Degterev et al. (2005), que es inducida por ligandos, como TNF $\alpha$ , los cuales se unen a receptores de muerte para activar vías de señalización específicas (Moujalled et al., 2013). Dichas vías, en

las que participa una quinasa de proteínas que interaccionan con receptores (RIPK-3), desencadenan una rápida disfunción mitocondrial, permeabilización de la membrana plasmática y lisis de la célula, sin que haya fragmentación nuclear. Es decir, se trata de un tipo de muerte similar a la necrosis, pero que está regulada por vías específicas de transducción de señal. A diferencia de la apoptosis, la necroptosis libera al exterior moléculas citoplasmáticas que promueven una respuesta inflamatoria. Recientemente se ha descrito que las células microgliales son capaces de sufrir este tipo de muerte celular (Fricker et al., 2013). Aunque no está claro si la técnica TUNEL es capaz de reconocer las células que están sufriendo necroptosis (Chien y Dix, 2012), hay datos que sugieren que dichas células no son TUNEL-positivas. Así, un inhibidor específico de la necroptosis, la necrostatina-1, no altera la tinción con TUNEL de cerebros y retinas que han sufrido isquemia (Rosenbaum et al., 2010). En resumen, las células microgliales activadas de los explantes de retina podrían sufrir algún tipo de muerte celular durante el tiempo de cultivo, que no sería puesta de manifiesto por la técnica TUNEL utilizada en nuestro estudio. No obstante, es necesario realizar nuevos estudios que permitan aclarar los mecanismos exactos de eliminación de células microgliales en los cultivos de explantes de retina.

### **Activación microglial en los explantes de retina cultivados**

La activación de las células microgliales es un proceso complejo que implica drásticos cambios de su morfología, incremento de la proliferación, movimientos migratorios, fagocitosis y liberación de diferentes tipos de moléculas reguladoras de la reacción inflamatoria (Garden y Moller, 2006; Kettenmann et al., 2011). En la actualidad, no existe un marcador molecular de la microglía activada que permita distinguirla inequívocamente de la microglía no activada y su identificación en secciones histológicas se lleva a cabo mediante detección de sus cambios morfológicos e inmunofenotípicos (Graeber y Streit, 2010). Nuestros resultados demuestran que la microglía de los explantes de retina se activa durante su cultivo *in vitro*, ya que muestra características morfológicas típicas de

microglía activada y cambios en su distribución indicativos de movimientos migratorios. La activación y cambios de distribución de la microglía en los explantes cultivados deben estar relacionados con la intensa muerte celular que tiene lugar en los mismos, ya que las células muertas o en proceso de degeneración liberan factores que desencadenan una respuesta de la microglía (Hanisch y Kettenmann, 2007; Marín-Teva et al., 2011; Rigato et al., 2011).

Nuestro estudio demuestra que el patrón cronológico de activación microglial en explantes de retina adulta presenta diferencias con el observado en explantes de retina en desarrollo. Así, la microglía se activa desde los primeros días *in vitro* tanto en explantes de retina adulta como de P10. La activación permanece más o menos constante durante todo el tiempo de cultivo en los explantes de retina adulta. Por el contrario, en los explantes de retina de P10, las células microgliales de la mitad escleral se hacen más ramificadas y abandonan la CNE a partir de 6 días *in vitro*, indicando una menor activación. No obstante, estas células más ramificadas no llegan a alcanzar el grado de ramificación mostrado por la microglía de explantes no cultivados, lo que sugiere que mantienen un cierto grado de activación. Algo similar ocurre con las células microgliales de la retina de ratones expuestos a luz intensa que, después de sufrir una intensa activación, retornan a un fenotipo ramificado, pero siguen manteniendo algunas características inmunofenotípicas propias de activación (Santos et al., 2010). El diferente comportamiento de la microglía durante el cultivo de explantes de retina adulta y en desarrollo revela que un mismo estímulo puede desencadenar respuestas diferentes en las células microgliales dependiendo del grado de diferenciación de las mismas.

Además de los caracteres morfológicos, también hemos empleado el marcado con anti-CD68, tanto mediante inmunocitoquímica como con citometría de flujo, en un intento de identificar las células microgliales activadas de los explantes. Estudios previos han utilizado CD68 como marcador de microglía activada fagocítica (Damjanac et al., 2007; Mosher et al., 2012; Slepko y Levi, 1996). Nuestros resultados en explantes no cultivados analizados con citometría

de flujo demuestran que la tasa de IR-CD68 de la microglía disminuye con la edad de la retina, siendo de 97% en P3, 82% en P10 y 33% en P60 (Fig. II-24). Estos resultados concuerdan con estudios previos que indican que el marcado con anti-CD68 de la microglía del SNC en desarrollo disminuye a medida que las células maduran (Monier et al., 2007; Santos et al., 2008). Dicho marcado se recupera cuando las células microgliales maduras reaccionan frente a una situación patológica (Galea et al., 2005; Santos et al., 2010), justificando así su utilización para el reconocimiento de microglía activada. Sin embargo, se han planteado serias dudas sobre la idoneidad del reconocimiento de microglía activada fagocítica con anti-CD68, ya que la expresión de CD68 es similar en microglía fagocítica y no fagocítica del hipocampo adulto (Sierra et al., 2010, 2013). Además, el estudio de Perego et al. (2011) en cerebros de ratón con lesiones isquémicas ha demostrado que solo una parte de la microglía activada presenta IR-CD68 y que un porcentaje de microglía ramificada también es CD68-positiva. Nuestros resultados apoyan la idea de que el marcado con anti-CD68 está más relacionado con el grado de madurez de la microglía que con su grado de activación. En efecto, si tenemos en cuenta que la microglía se activa durante el cultivo de los explantes (como revela el análisis de sus características morfológicas) y suponemos que CD68 es un marcador de activación, la tasa de IR-CD68 debería ser mucho más elevada en los explantes cultivados que en los no cultivados. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que dicha tasa a diferentes tiempos de cultivo difiere poco de la existente en los explantes no cultivados (Fig. II-24). Incluso, en explantes de retina adulta, la tasa de IR-CD68 es menor a partir de 3 días de cultivo, cuando se observan muchas células microgliales de morfología activada (Fig. II-20). Estos hallazgos parecen apoyar la hipótesis de que la IR-CD68 no está relacionada con la activación de las células microgliales y sí con su grado de madurez o diferenciación. No obstante, es de resaltar que en explantes de P10, la tasa de IR-CD68 se incrementa significativamente en los dos primeros días de cultivo (de 82% a 94%) coincidiendo con la activación de la microglía, lo que parece estar de acuerdo con

la existencia de alguna relación entre activación y marcado con CD68. Sin embargo, la disminución de la tasa de IR-CD68 en los explantes de P10+3div (hasta menos del 80%), a la vez que se mantiene la activación de la microglía, es contraria a dicha relación. Para aclarar definitivamente el asunto, sería necesario llevar a cabo nuevos estudios diseñados específicamente para tal propósito.

Es interesante destacar que la CNE de la retina *in situ* está siempre desprovista de microglía, tanto durante el desarrollo como en la edad adulta (Davies et al., 2006; Hume et al., 1983; Santos et al., 2008). Sin embargo, esta capa de la retina es invadida por células microgliales activadas tras la degeneración de fotorreceptores que tiene lugar en diferentes patologías degenerativas de la retina (Gupta et al., 2003; Joly et al., 2009; Karlstetter et al., 2010; Roque et al., 1996; Santos et al., 2010; Thanos, 1992; Zeiss y Johnson, 2004; Zhang et al., 2005). El presente estudio demuestra la degeneración de numerosos fotorreceptores (TUNEL-positivos) en la CNE de los explantes de retina de P10 y P60 cultivados *in vitro*. Simultáneamente, células microgliales activadas se mueven hacia la CNE, donde adquieren una forma globosa y fagocitan somas de fotorreceptores, exhibiendo una morfología “en panal de abejas”, similar a la observada en la microglía que invade la CNE de retinas de ratones expuestos a luz intensa, en los que tiene lugar una masiva degeneración de fotorreceptores (Santos et al., 2010). Así, el comportamiento de la microglía durante el cultivo *in vitro* de explantes de retina imita la respuesta de la misma en enfermedades degenerativas de la retina. Estas semejanzas permiten proponer que los cultivos organotípicos de explantes de retina son un buen modelo para el análisis experimental de las interacciones entre fotorreceptores y microglía que tienen lugar en patologías degenerativas de la retina de mamíferos.

Nuestro estudio demuestra que la microglía activada fagocita grupos de núcleos de fotorreceptores en la CNE y de neuronas en la CNI. Con frecuencia, dichos núcleos son negativos para TUNEL (Fig. II-26). Una posible explicación de estas observaciones es que la muerte de fotorreceptores y neuronas de la CNI que han sufrido daños iniciales como consecuencia del cultivo, pero que todavía

no tienen roturas en su ADN (por lo que son TUNEL-negativos), son inducidos a morir tras su contacto y posterior fagocitosis por células microgliales. Este tipo de muerte de células viables ejecutada por fagocitosis microglial se conoce con el nombre de fagoptosis (Brown y Neher, 2012; Neher et al., 2012) y se ha descrito durante el desarrollo normal de diferentes regiones del SNC (Cunningham et al., 2013; Marín-Teva et al., 2004; Rigato et al., 2011; Wakselman et al., 2008). Las neuronas que mueren mediante fagoptosis solo degeneran si son fagocitadas, ya que conservan su viabilidad tras la inhibición de la fagocitosis microglial (Neher et al., 2011). Aunque la muerte de fotorreceptores mediante fagoptosis no ha sido demostrada hasta ahora, numerosos estudios han aportado pruebas indirectas a favor de que la degeneración de fotorreceptores es inducida por microglía activada. Estos estudios se han llevado a cabo en retinas que sufren procesos degenerativos como consecuencia de enfermedades congénitas de roedores (Ebert et al., 2009; Guo et al., 2012; Yang et al., 2007a; Zeng et al., 2005) y de humanos (Gupta et al., 2003) o tras el tratamiento experimental con luz intensa de roedores normales (Albarracin et al., 2011; Rutar et al., 2012; Santos et al., 2010; Zhang et al., 2004). Se ha demostrado una coincidencia cronológica entre la muerte de fotorreceptores y la invasión de la CNE por microglía activada (Gupta et al., 2003; Ni et al., 2008; Santos et al., 2010; Zeiss y Johnson, 2004; Zeng et al., 2005). Además, la supervivencia de fotorreceptores se incrementa significativamente cuando se inhibe la invasión de la CNE por microglía activada, tras suprimir la expresión del gen *CCR2* que codifica el receptor de CCL2 (Guo et al., 2012) o tras diferentes tratamientos experimentales (Albarracin et al., 2011; Ebert et al., 2009; Rutar et al., 2012; Yang et al., 2007a; Zhang et al., 2004). En la actualidad se piensa que la muerte de fotorreceptores está inducida por factores difusibles, tales como TNF $\alpha$  o pro-NGF, liberados por la microglía activada. Esta idea está apoyada por estudios *in vitro* que utilizan cultivos de fotorreceptores 661W, una línea celular derivada de conos de ratón, en los que la muerte de éstos se incrementa significativamente cuando son tratados con medio condicionado procedente de cultivos de células microgliales activadas (Roque et al., 1999;

Srinivasan et al., 2004; Yang et al., 2007b). Un reciente trabajo que utiliza cocultivos de células 661W y microglía retiniana describe que la muerte de fotorreceptores se reduce significativamente cuando se inhibe la liberación de TNF $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) por las células microgliales (Zhou et al., 2012). En contraste, otro trabajo que también utiliza cocultivos de fotorreceptores 661W y microglía retiniana indica lo contrario, ya que no se previene la muerte de fotorreceptores cuando las células microgliales reducen la liberación de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por la acción de naloxona (Jiang et al., 2013). Por otra parte, el tratamiento de retinas distróficas con factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) reduce la muerte de fotorreceptores e incrementa el número de células microgliales en la CNE, sugiriendo que la microglía es necesaria para el efecto neuroprotector de IGF-1 (Arroba et al., 2011). Así, las células microgliales de la CNE podrían desempeñar una función compleja, participando en la degeneración de fotorreceptores pero teniendo también un papel activo en la acción neuroprotectora de ciertas moléculas.

En nuestro estudio también se observa que algunos núcleos de células fagocitadas por la microglía son débilmente positivos para TUNEL (Figs. II-25 y II-27). La distinta intensidad de marcaje con la técnica TUNEL puede deberse a distintas formas de fragmentación de la cromatina durante el proceso de muerte celular, de tal manera que los núcleos fuertemente positivos se correlacionarían con núcleos que sufren fragmentación internucleosomal de 200 pares de bases (o múltiplos), característica de la apoptosis. En cambio, los núcleos de cromatina condensada y débilmente positivos para TUNEL podrían estar sufriendo otro tipo de programa de muerte, conocido como “parthanatos” que cursa con un patrón de fragmentación de la cromatina, que da lugar a un menor número de extremos 3'-OH reconocidos por TUNEL. Este tipo de muerte depende de la activación de PARP-1 y es ejecutado por la proteína AIF, tal como se describe en el capítulo I de esta Tesis. Una vez en el núcleo, AIF induce la degradación del ADN en fragmentos largos de aproximadamente 50 kilobases (Galluzzi et al., 2012; Otera et al., 2005; Wang et al., 2009), que justificaría la débil tinción con TUNEL. Otro

aspecto a considerar es la pérdida de la integridad de la membrana plasmática en la muerte por parthanatos, que permite la liberación del contenido celular, en el que hay sustancias potencialmente tóxicas para otras células adyacentes. Por lo tanto, la fagocitosis de las células débilmente positivas para TUNEL por la microglía evitaría la liberación de dichas sustancias, contribuyendo a la supervivencia celular.

En resumen, los actuales conocimientos sobre el tema apoyan que, en procesos degenerativos de la retina, la microglía activada que invade la CNE induce la muerte de fotorreceptores, probablemente mediante liberación de diferentes factores solubles. Este hecho no es incompatible con la posibilidad de que las células microgliales también contribuyan al progreso de la muerte de fotorreceptores, inicialmente dañados por la acción de factores solubles, mediante fagoptosis de los mismos, tal como sugieren nuestras observaciones en cultivos organotípicos de explantes de retina. Esta hipótesis podría ser testada mediante nuevos estudios en los que se analizase la acción de sustancias que inhiban la liberación de factores solubles por parte de las células microgliales en cultivos organotípicos de explantes de retina de P10, confirmando así la bondad de este modelo experimental para investigar el papel jugado por las células microgliales en procesos degenerativos de la retina.



## **Capítulo III**

---

**Papel neuroprotector de la microglía  
activada en explantes de retina postnatal  
de ratón cultivados *in vitro***



## RESUMEN

En el capítulo precedente de esta Tesis se ha demostrado que la microglía presente en explantes de retina de ratón postnatal de 10 días (P10) cultivados *in vitro* sufre un proceso de activación e invade las capas nucleares interna y externa, donde podría inducir la muerte de células viables. Sin embargo, la tasa de viabilidad celular en dichos explantes se mantiene relativamente elevada durante la primera semana de cultivo *in vitro*. En el presente capítulo se ha pretendido analizar la naturaleza de la acción ejercida por la microglía activada sobre las células de los citados explantes de retina. Para ello, se disminuía o intensificaba el grado de activación microglial o se eliminaba la mayor parte de la microglía de los explantes, comprobando seguidamente las modificaciones de la viabilidad celular en los mismos.

La inhibición o intensificación del grado de activación microglial se llevaba a cabo mediante tratamiento con minociclina o LPS, respectivamente, de explantes de retina de P10 cultivados durante 2 días *in vitro*. La eliminación de la microglía se conseguía tras el tratamiento de los explantes con una suspensión de liposomas cargados de clodronato (Lip-Clo). La viabilidad celular de los explantes sometidos a los diferentes tratamientos experimentales era determinada mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes incubados con diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio. También se detectaba la muerte celular en los explantes mediante la utilización de la técnica TUNEL. El estado funcional de la microglía se comprobaba mediante: a) análisis morfológico en secciones de explantes inmunoteñidas con los anticuerpos anti-CD45, anti-CD11b y anti-CD68; b) presencia de actividad PARP-1 demostrada mediante inmunomarcado del polímero poli-ADP-ribosa; c) análisis de la tasa proliferativa obtenida mediante citometría de flujo; y d) determinación de la concentración de la citoquina proinflamatoria TNF $\alpha$  en el medio de cultivo de los explantes.

El tratamiento de los explantes con minociclina inhibía el estado de activación de las células microgliales, que perdían su morfología globosa y la actividad PARP-1, se retiraban de la capa nuclear externa y reducían su tasa

proliferativa, al tiempo que disminuía la concentración de TNF $\alpha$  en el medio de cultivo. La inhibición de la activación microglial coincidía con una disminución de más de un 20% de la viabilidad celular en los explantes de retina tratados con minociclina, sugiriendo un efecto beneficioso de la microglía activada sobre la supervivencia de las células retinianas. Esta hipótesis era apoyada por los resultados obtenidos tras el tratamiento de los explantes con LPS, que mantenía el estado activado de la microglía sin modificar la viabilidad celular. Además, el tratamiento combinado con minociclina y LPS reproducía los resultados obtenidos en el tratamiento exclusivo con minociclina, inhibiendo la activación microglial y reduciendo la viabilidad celular de los explantes de retina. Por otra parte, la viabilidad celular también se reducía en más del 20% cuando se eliminaba la mayor parte de la microglía de los explantes mediante tratamiento con Lip-Clo, confirmando que el efecto nocivo de la minociclina sobre la viabilidad de las células retinianas era mediado por la microglía y no por una acción directa de la minociclina sobre las células del explante.

Nuestros resultados demuestran que la microglía activada presente en los explantes de retina cultivados *in vitro* favorece la viabilidad de las células retinianas y, por lo tanto, desempeña una función neuroprotectora, ya sea a través de la secreción de factores neurotróficos o a través de la fagocitosis y eliminación de posibles factores neurotóxicos liberados por células que están muriendo.

## INTRODUCCIÓN

Numerosas enfermedades degenerativas de la retina, como las diferentes formas de retinosis pigmentaria, cursan con una progresiva degeneración de fotorreceptores que conduce a una pérdida de la visión (Bramall et al., 2010; Organisciack y Vaughan, 2010). Simultáneamente, la microglía de la retina se activa y migra masivamente a la capa nuclear externa (CNE), ocupada por los fotorreceptores (Gupta et al., 2003; Joly et al., 2009; Karlstetter et al., 2010; Roque et al., 1996; Santos et al., 2010; Thanos, 1992; Zeiss y Johnson, 2004; Zeng et al., 2005; Zhang et al., 2005), donde interviene en la fagocitosis de fotorreceptores degenerados.

Actualmente se piensa que la microglía activada que invade la CNE en retinas con patologías degenerativas tiene una función neurotóxica, induciendo la muerte de fotorreceptores a través de la liberación de factores difusibles, tales como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) o pro-factor de crecimiento nervioso (pro-NGF) (Langmann, 2007). Esta hipótesis está apoyada por: 1) la coincidencia cronológica entre muerte de fotorreceptores e invasión de la CNE por microglía activada; 2) estudios experimentales en los que se inhibe dicha invasión (Albarracin et al., 2011; Ebert et al., 2009; Rutar et al., 2012; Yang et al., 2007a; Zhang et al., 2004); y 3) estudios *in vitro* de fotorreceptores cultivados en presencia de microglía activada o en medio condicionado por la misma (Roque et al., 1999; Srinivasan et al., 2004; Yang et al., 2007b; Zhou et al., 2012). Sin embargo, otros estudios apoyan que la microglía activada tiene un efecto beneficioso, contribuyendo a rescatar numerosos fotorreceptores que hubieran muerto en ausencia de microglía. Así, la reducción experimental del número de células microgliales en la retina de ratones con distrofia retiniana (mediante inhibición del factor SDF-1) acelera la tasa de degeneración de fotorreceptores, mientras que la activación de los precursores microgliales (mediante administración sistémica de factor estimulante de colonias de granulocitos y eritropoyetina) ocasiona una mayor supervivencia de los conos (Sasahara et al., 2008). En otro estudio se demostraba que la inhibición de la activación microglial

en cocultivos *in vitro* de microglía y fotorreceptores no previene la muerte de éstos (Jiang et al., 2013). Según sus autores, estos resultados podrían ser consecuencia de que al inhibir la activación microglial se podría restringir el potencial neuroprotector de la microglía. Los resultados de Arroba et al. (2011) también apoyan la participación de la microglía en mecanismos protectores de fotorreceptores en ratones con distrofia retiniana. La controversia sobre el papel neurotóxico o neuroprotector de la microglía en procesos de degeneración retiniana justifica la necesidad de nuevos estudios que contribuyan a aclarar la cuestión.

La capacidad neurotóxica o neuroprotectora de la microglía está en estrecha relación con el estado activado de la misma y la inclinación hacia uno u otro efecto parece depender de las condiciones de activación (Hanisch y Kettenmann, 2007). Por ejemplo, la activación microglial que tiene lugar en la enfermedad de Parkinson es perjudicial y contribuye a la muerte de neuronas dopaminérgicas (Block et al, 2007), mientras que la microglía acumulada en sitios que han sufrido lesiones isquémicas parece tener un efecto neuroprotector, contribuyendo a una disminución de la muerte neuronal (Neumann et al., 2006). También se ha sugerido que la microglía puede cambiar su efecto en diferentes etapas de una patología neurodegenerativa, de manera que en etapas iniciales tendría un efecto neurotóxico, induciendo la eliminación de neuronas irreversibles, mientras que en fases más avanzadas tendría un efecto beneficioso, favoreciendo la reparación del tejido dañado (Cameron y Landreth, 2010). Estos efectos contrapuestos parecen estar en relación con dos modos diferentes de activación de la microglía, conocidos como activación clásica, o M1, y activación alternativa, o M2 (Cameron y Landreth, 2010). En la activación M1 predomina la liberación de radicales libres (como ión superóxido y óxido nítrico) y citoquinas pro-inflamatorias (como TNF $\alpha$ ), que favorecen la muerte neuronal, mientras que en la activación M2 se producen citoquinas anti-inflamatorias y otros factores que suprimen la respuesta inflamatoria y promueven la reparación del tejido (Colton, 2009).

Algunos artículos han estudiado la influencia del estado funcional de la microglía en la muerte o supervivencia de las células de la retina, mediante el análisis de los efectos sufridos por los fotorreceptores tras la inyección intravítrea (Rutar et al., 2012; Sasahara et al., 2008) o intraperitoneal (Yang et al., 2007a; Zhang et al., 2004) de sustancias que alteran el estado funcional de la microglía. Sin embargo, en las inyecciones intravítreas, una parte de la solución inoculada puede alcanzar el interior de la retina, pero otra parte permanece en el vítreo o incluso puede pasar al interior de vasos sanguíneos y abandonar el ojo a través de la circulación sanguínea. La utilización de cultivos organotípicos permite realizar tratamientos farmacológicos de forma más precisa, ya que se puede ejercer un control estricto de la cantidad de droga administrada y de su tiempo de actuación, a la vez que se mantienen gran parte de las interacciones locales de las células de la retina que pueden ser afectadas por la droga.

En el capítulo II de esta Tesis se ha demostrado que, en explantes de retina en desarrollo y adulta cultivados *in vitro*, la microglía se activa y migra hacia las capas esclerales, coincidiendo con la muerte de numerosas células. Este comportamiento es similar al descrito en patologías degenerativas de la retina, por lo que los cultivos organotípicos de explantes de retina constituyen un buen modelo para el análisis experimental de las interacciones fotorreceptores-microglía que tienen lugar en procesos degenerativos de la retina. La muerte de fotorreceptores y la invasión de la CNE por microglía comienza a los 10 días de vida postnatal (P10) en ratones con distrofia retiniana (Zeiss y Johnson, 2004; Zeng et al., 2005). Además, los explantes de retina de P10 conservan mejor su estructura a tiempos prolongados de cultivo que los explantes de retina de otras edades (ver capítulo II de esta Tesis). Por lo tanto, en el presente capítulo se han realizado estudios *in vitro* utilizando explantes de retina de ratones de P10, en los que se han analizado los efectos de la alteración experimental del estado funcional de la microglía sobre la viabilidad de las células de la retina. Dicha alteración se puede conseguir mediante tratamiento con factores que disminuyen la activación microglial, como la minociclina, o que la incrementan, como el lipopolisacárido

(LPS). La eliminación de las células microgliales de los explantes mediante tratamiento con liposomas cargados de clodronato (Lip-Clo) es otra estrategia experimental que permite investigar el efecto de la microglía sobre la viabilidad celular.

La minociclina es un antibiótico semisintético de la clase de las tetraciclinas que produce una disminución de la activación microglial en diferentes regiones del cerebro (Purisai et al., 2007; Ryu et al., 2004; Tikka et al., 2001) y en la retina (Baptiste et al., 2005; Bosco et al., 2008; Hughes et al., 2004; Wang et al., 2005). Estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que esta droga bloquea la vía de p38-MAP-quinasas (MAPK) en las células microgliales y, en consecuencia, su activación (Nikodemova et al., 2006; Yang et al., 2007c). Por lo tanto, la minociclina tiene efectos anti-inflamatorios independientes de sus propiedades como antibiótico (Zemke y Majid, 2004). En muchos casos, la acción de la minociclina sobre la microglía tiene efectos neuroprotectores, disminuyendo la muerte neuronal (Chechneva et al., 2006; Purisai et al., 2007; Yang et al., 2007a; Zhang et al., 2004; Zhao et al., 2011), aunque también se han descrito efectos tóxicos sobre las células del SNC (Diguët et al., 2004; Jackson et al., 2007; Potter et al., 2009; Yang et al., 2003), a pesar de la inhibición de la activación microglial (Sriram et al., 2006). Esta inhibición parece estar mediada por la alteración de vías de señalización en las que participan caspasas, ya que la activación microglial está inducida por la activación ordenada de caspasa 8 y caspasa 3/7 (Burguillos et al., 2011) y la minociclina inhibe la activación de las caspasas 1 y 3 (Chen et al., 2000; Kim y Suh, 2009). Teniendo en cuenta que las caspasas también participan en los mecanismos de muerte de muchas células durante el desarrollo del cerebro (Liu et al., 2008; Stankovski et al., 2007) y la retina (Guimaraes et al., 2003; Zeiss et al., 2004), el efecto inhibitorio de la minociclina sobre la activación de la microglía parece ser un caso particular de un efecto general sobre otros tipos celulares en los que la cascada de las caspasas se vería alterada. Así, el tratamiento con minociclina también afecta la viabilidad de diversos tipos celulares en ausencia de microglía. Por ejemplo, aumenta la

viabilidad de células E1A-NR.3 (una línea celular derivada de células de retina de ratas P6) sometidas a excitotoxicidad por glutamato y la de células PC-12 en las que se ha inducido degeneración (Baptiste et al., 2004; Choi et al., 2007; Kikuchi et al., 2009). Además, la minociclina también inhibe el enzima PARP-1 (Alano et al., 2006), asociado a procesos de muerte celular (Andrabi et al., 2006; Martín-Oliva et al., 2011), afecta la liberación de citocromo c por las mitocondrias (Zhu et al., 2002) e incrementa la expresión del factor anti-apoptótico Bcl-2 (Matsukawa et al., 2009).

El LPS es un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas que desencadena una fuerte activación de las células microgliales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Lund et al., 2006; Rivest, 2003; Shen et al., 2009), aparentemente a través de receptores TLR4 y la ruta de p38-MAPK (Bode et al., 2012). El LPS tiene efectos neurotóxicos que parecen estar mediados por factores liberados tras la activación microglial (Block et al., 2007; Cunningham et al., 2005), de manera que el tratamiento con LPS puede no ser neurotóxico en ausencia de microglía o cuando su activación es bloqueada (Bronstein et al., 1995; Xing et al., 2010).

El tratamiento experimental del tejido nervioso con Lip-Clo permite la eliminación específica de células fagocíticas, tales como las células microgliales. Los Lip-Clo son internalizados por dichas células y la cubierta fosfolipídica de los mismos es digerida, liberando clodronato, que es tóxico y provoca la muerte de los fagocitos (van Rooijen, 1989; van Rooijen y Sanders, 1997). Esta estrategia experimental ha permitido la eliminación de macrófagos y microglía en cultivos organotípicos de diferentes regiones del SNC (Marín-Teva et al., 2004; Vinet et al., 2012) y la retina (Arroba et al., 2011). También se ha conseguido una considerable disminución de macrófagos/microglía en cultivos organotípicos de hipocampo sin la utilización de liposomas, mediante tratamiento con clodronato no encapsulado (Katayama et al., 2012) o mediante tratamientos inmunotóxicos (Montero et al., 2009; Montero-Domínguez et al., 2009).

Teniendo en cuenta que las células microgliales de los explantes de retina de ratón de P10 cultivados *in vitro* se encuentran en estado activado (ver capítulo II de esta Tesis), en el presente estudio se ha disminuido o intensificado el grado de activación microglial mediante tratamiento con minociclina o LPS, respectivamente, o se ha eliminado la mayor parte de la microglía de los explantes tras ser tratados con Lip-Clo, comprobando los efectos neurotóxicos o neuroprotectores de estos tratamientos. En estudios previos que analizaban los efectos de la alteración del estado funcional de la microglía sobre la supervivencia neuronal, se determinaba la muerte celular mediante la técnica TUNEL o mediante tinción con yoduro de propidio (Montero et al., 2009; Montero-Domínguez et al., 2009; Neumann et al., 2006; Ullrich et al., 2001; Vinet et al., 2012). En este estudio, la viabilidad celular de los explantes de retina con alteración del estado funcional de la microglía se ha determinado mediante citometría de flujo combinada con la detección de muerte celular mediante TUNEL. Los resultados obtenidos parecen indicar que la microglía activada presente en los explantes desempeña una función neuroprotectora.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

En los experimentos descritos en este capítulo se utilizaron explantes de retina obtenidos a partir de ratones (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6 de P10. Al igual que en los estudios de los capítulos anteriores, estos animales eran proporcionados por el Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada. Los animales se sacrificaron mediante decapitación siguiendo las normas establecidas por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

### Cultivo *in vitro* y tratamiento experimental de explantes de retina

Se obtuvieron explantes de retina de ratones de P10 siguiendo el protocolo descrito en el capítulo anterior. Estos explantes eran incubados durante 2 días *in vitro* (div) en medio basal de Eagle suplementado con suero de caballo (BME-SC, ver composición en el capítulo anterior), al que se podían añadir diferentes soluciones experimentales (ver más abajo). Los explantes eran incubados a 37°C, con atmósfera saturada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. La adición de soluciones experimentales al medio de cultivo de los explantes se efectuaba en condiciones estériles dentro de una cabina de flujo laminar (Telstar, modelo BIO-II-A 6104, Tarrasa, España). En las diferentes experiencias, los explantes de retina sometidos a tratamiento experimental se obtenían del ojo derecho de cada animal, mientras que el ojo izquierdo era utilizado para obtener el correspondiente control no tratado.

### *Tratamiento con minociclina*

Los explantes de retina destinados a comprobar los efectos de la minociclina se incubaron durante 2 div en BME-SC suplementado con hidrocloreuro de minociclina (Sigma, St Louis, MO, ref. M9511) disuelto en agua para cultivos (Sigma, ref. W3500). La concentración final de la minociclina en el medio de cultivo era de 100 µg/ml (200 µM). El medio de cultivo no era renovado

durante los 2 div, con lo que el explante estuvo sometido a la acción de la minociclina durante todo el experimento hasta su extracción y análisis. En cada experiencia se utilizaron explantes control, que eran cultivados en BME-SC al que se había adicionado un volumen de agua de cultivo idéntico al añadido a los explantes experimentales, pero carente de minociclina.

#### *Tratamiento con LPS*

En otras experiencias, los explantes eran tratados con LPS. Estos explantes se incubaban en BME-SC durante 1 div, transcurrido el cual se añadía LPS (de la cepa 0111:B4 de *E. coli*, Sigma, ref. L4391) disuelto en BME al medio de cultivo, a una concentración final de 5 µg/ml. Después de 1 div en BME-SC con LPS (es decir, tras 2 div de cultivo total), los explantes eran extraídos para su análisis. Se utilizaron controles en los que, tras el primer div, se añadía al medio de cultivo un volumen de BME idéntico al añadido a los explantes experimentales, pero carente de LPS.

#### *Doble tratamiento con minociclina y LPS*

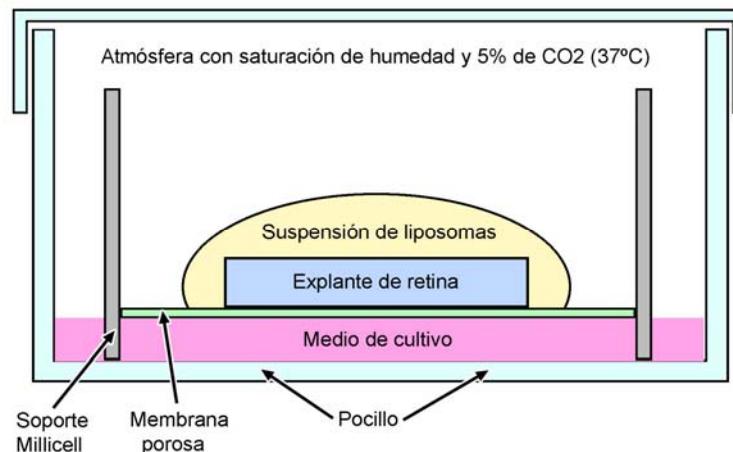
Algunos explantes eran doblemente tratados con minociclina y LPS. En este caso los explantes eran incubados desde el principio del cultivo en BME-SC que contenía 100 µg/ml de minociclina. Tras el cultivo de los explantes durante 1 div, se añadía LPS disuelto en BME a una concentración final de 5 µg/ml. Seguidamente, el cultivo se prolongaba durante otro div antes de finalizar el experimento. Los explantes control de este doble tratamiento minociclina/LPS eran cultivados en presencia de minociclina, sin añadir LPS al comienzo del segundo div.

#### *Tratamiento con Lip-Clo*

En otro tipo de experiencias, los explantes de retina eran tratados con Lip-Clo siguiendo una modificación de los protocolos descritos por van Rooijen y Sanders (1994) y Marín-Teva et al. (2004), que permite la eliminación específica

de células microgliales. Los explantes control utilizados en estas experiencias eran tratados con liposomas cargados de PBS (Lip-PBS). Previamente se demostraba que el tratamiento con Lip-PBS no producía efectos sobre las células microgliales, tras la comparación entre explantes tratados con Lip-PBS y explantes control no tratados. Todos los liposomas eran suministrados por la fundación Clodronate Liposome Foundation ([www.clodronateliposomes.org](http://www.clodronateliposomes.org)).

Para el tratamiento con liposomas, los explantes recién obtenidos eran colocados en pocillos de cultivo e incubados durante 90 minutos en una suspensión 1:5 (v/v) de liposomas en solución salina balanceada de Gey (ver composición en el capítulo II). Esta incubación se llevaba a cabo a baja temperatura y en agitación (150 rpm). Para ello, las placas de cultivo que contenían los explantes se disponían sobre hielo picado en un agitador orbital. Después de esta incubación, los explantes empapados en la suspensión de liposomas se colocaban sobre dispositivos Millicell (Millipore, Cork, Irlanda, ref. PICM03050) y se cultivaban en BME-SC a 37°C. Después del primer div, los explantes eran tratados con una nueva dosis de liposomas mediante adición de una gota de suspensión de liposomas sobre la superficie del explante (Fig. III-1), continuando el cultivo de éste durante un segundo div.



**Fig. III-1.** Representación esquemática del procedimiento seguido para el tratamiento de los explantes de retina cultivados *in vitro* con una suspensión de liposomas.

### **Inmunocitoquímica y TUNEL de explantes de retina**

Los explantes destinados al análisis histológico se fijaron en PLP (Yamato et al., 1984) durante 1 hora a 4°C y la mayoría fueron procesados para la obtención de secciones histológicas según el procedimiento descrito en el capítulo II de esta Tesis. Las secciones eran tratadas seguidamente con técnicas inmunocitoquímicas o con la técnica TUNEL. La identificación de las células microgliales se llevó a cabo mediante tinción inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-CD11b, anti-CD45 y anti-CD68, cuyas características y procedencia se indican en el capítulo II, siguiendo el mismo protocolo descrito en dicho capítulo. También se realizó inmunotinción con el anticuerpo monoclonal anti-PAR (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA, ref. 804–220-R100) para poner de manifiesto el polímero poli-ADP-ribosa (PAR), producido mayoritariamente por la actividad del enzima PARP-1, que está estrechamente relacionado con la muerte celular (Martín-Oliva et al., 2011; ver capítulo I) y la activación de la microglía (Kauppinen y Swanson, 2005). La dilución utilizada para este anticuerpo era 1:50. La técnica TUNEL se utilizó para revelar las células muertas en los explantes de retina y se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo II.

Algunos explantes tratados con liposomas se utilizaron en forma de montajes totales, siendo doblemente teñidos con isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* (GS-IB4) conjugada con Alexa Fluor-488 (GS-IB4-AF488, Invitrogen, Paisley, Reino Unido, ref. I21411) y anti-CD11b. GS-IB4 es una glicoproteína de 114 kDa aislada de semillas de la planta africana *Griffonia simplicifolia* que se une a residuos terminales  $\alpha$ -D-galactosa presentes en la superficie de células endoteliales y microglía, entre otros tipos celulares. Después de fijar en PLP durante 1 hora a 4°C, los explantes se lavaron (tres cambios de 5 minutos cada uno) en tampón fosfato salino 1X (PBS) con 0,1% de Tritón X-100 (Sigma, PBS-Tr) y se permeabilizaron en PBS-Tr, a 4°C y con agitación, durante 10 minutos. Los explantes permeabilizados se incubaron en flotación libre durante toda la noche en GS-IB4-AF488 a una concentración de 2  $\mu$ g/ml, a 4°C con

agitación suave. Seguidamente se realizó el bloqueo de antígenos inespecíficos mediante tratamiento durante 60 minutos a temperatura ambiente con suero normal de cabra (Sigma, ref. G9023) diluido al 10% en PBS, al que se añadía 1% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma, ref. A9647). A continuación, los explantes se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario anti-CD11b diluido 1:100 en PBS-Tr con BSA 1%, se lavaron tres veces en PBS-Tr y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-IgG de rata obtenida en cabra conjugada con Alexa Fluor-594, Molecular Probes, Eugene, OR, USA, ref. A11007) diluido 1:500 en PBS con BSA 1%. Finalmente, los explantes se lavaron y se montaron en un portaobjetos con el medio de montaje Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA, ref. 0100-01).

Se utilizó un microscopio Leitz DMRB equipado con el sistema de barrido láser confocal Leica TCS-SP5 para obtener imágenes de microscopía confocal, tanto de las secciones tratadas con inmunofluorescencia o TUNEL como de los montajes totales de explantes tratados con GS-IB4-AF488 e inmunofluorescencia. Estas imágenes eran obtenidas siguiendo las especificaciones descritas en el capítulo II.

### **Microscopía electrónica de transmisión**

Explantes de retina tratados con minociclina y sus respectivos controles de tres animales diferentes fueron procesados para la obtención de secciones semifinas y ultrafinas siguiendo los mismos procedimientos descritos en el capítulo II. Las secciones ultrafinas se observaron en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss Libra 120 Plus del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### **Determinación de la viabilidad celular**

La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante citometría de flujo, siguiendo la misma estrategia y metodología descrita en el capítulo anterior.

En concreto, la viabilidad celular era determinada en suspensiones celulares obtenidas tras la disociación de explantes sometidos a diferentes tratamientos experimentales e incubados con diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma) y yoduro de propidio (IP, Sigma). La células con distintos marcadores se cuantificaron en un citómetro FACS Canto II (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

### **Determinación de las tasas de inmunorreactividad para CD68 y de proliferación de las células microgliales**

La tasa de inmunorreactividad para CD68 (IR-CD68) de las células microgliales de los explantes sometidos a tratamiento con minociclina se llevó a cabo mediante citometría de flujo de suspensiones celulares obtenidas tras la fijación y disociación de los explantes e incubadas en una mezcla de anticuerpos anti-CD11b conjugado con ficoeritrina y anti-CD68 conjugado con fluoresceína (Tabla III-1), según lo descrito en el capítulo II.

**Tabla III-1.** *Anticuerpos utilizados para la determinación de la tasa de IR-CD68 y tasa de proliferación de células microgliales mediante citometría de flujo*

<i>Anticuerpo</i>	<i>Procedencia comercial</i>	<i>Referencia</i>	<i>Dilución</i>
Anti-CD11b de ratón obtenido en rata conjugado con ficoeritrina	Serotec, Oxford, Reino Unido	MCA711PE	1:25
Anti-CD68 de ratón obtenido en rata conjugado con fluoresceína	Serotec	MCA1957F	1:25
Anti-Ki67 humano obtenido en ratón conjugado con Alexa Fluor-488	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA	561165	1:33

La capacidad proliferativa de las células microgliales de explantes tratados con minociclina y sus respectivos controles también era determinada mediante citometría de flujo. Para ello, las suspensiones celulares obtenidas mediante disociación de explantes fijados en paraformaldehído 1% en PBS se incubaron en

una mezcla de los anticuerpos monoclonales anti-CD11b conjugado con ficoeritrina y anti-Ki67 conjugado con Alexa Fluor-488. Las diluciones empleadas y la procedencia de los anticuerpos se detallan en la Tabla III-1. El anticuerpo anti-Ki67 reconoce el antígeno Ki67 localizado en el núcleo de células que se encuentran en fases G1, S, G2 o M del ciclo celular, pero ausente durante la fase G0. Por lo tanto, dicho anticuerpo permite reconocer las células que proliferan. El análisis cuantitativo de las células marcadas con los dos anticuerpos mencionados se realizó mediante citometría de flujo.

### **Medida de TNF $\alpha$**

El medio de cultivo de los explantes de retina de las experiencias de tratamiento con minociclina o LPS se utilizó para determinar, mediante ELISA, la cantidad de TNF $\alpha$  (expresada en picogramos por ml de medio de cultivo) secretada en dichos explantes. Para esta determinación se empleó un kit comercial (Ray Bio mouse TNF $\alpha$  ELISA kit, RayBiotech, Norcross, GA, USA, ref. ELM-TNFalpha-001).

### **Análisis estadístico de los resultados**

Los resultados cuantitativos obtenidos en las experiencias de tratamiento de los explantes con diferentes sustancias se expresaron como medias  $\pm$  errores estándar de la media. Se realizaron al menos tres experiencias distintas para cada tipo de tratamiento, con distintos explantes de retina, y sus respectivos controles, por experiencia. Para poner de manifiesto posibles diferencias significativas entre las medias obtenidas se realizaron análisis estadísticos mediante tests de la t de Student. El paquete estadístico utilizado era SPSS19 (IBM).

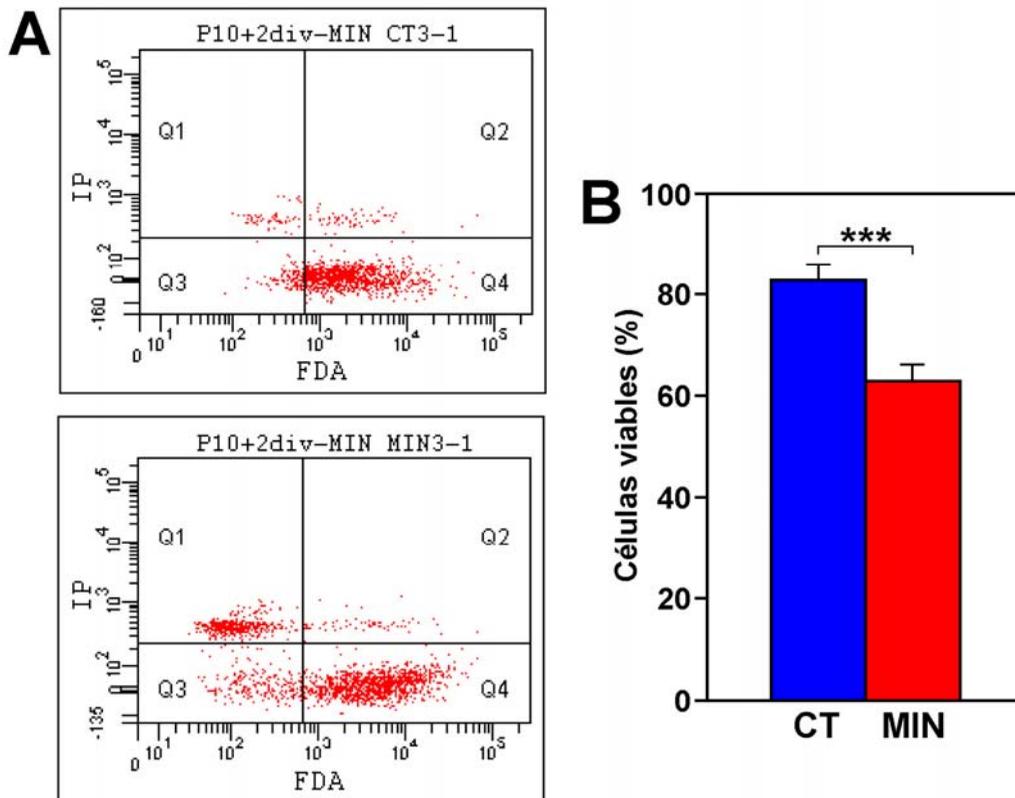
## RESULTADOS

### **El tratamiento con minociclina disminuye la viabilidad celular en los explantes de retina cultivados *in vitro***

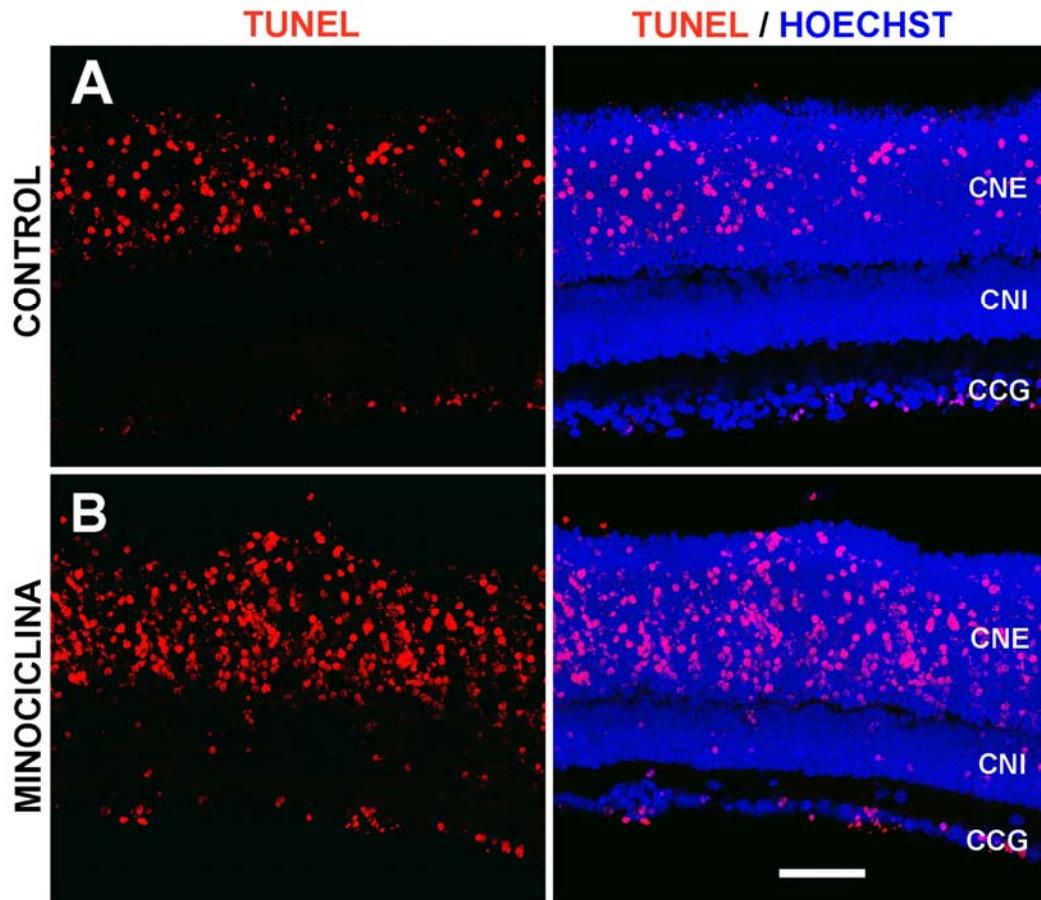
Las experiencias de tratamiento con minociclina de cultivos celulares descritas en la literatura han utilizado frecuentemente una concentración 50  $\mu\text{M}$ , aunque también hay estudios con una concentración 200  $\mu\text{M}$  (ver Discusión). En el presente estudio se ensayaron concentraciones de minociclina 20, 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$  en cultivos de explantes de retina de P10, comprobándose que la viabilidad celular no mostraba diferencias significativas entre las diferentes concentraciones testadas (resultados no mostrados). Por lo tanto, el efecto de la minociclina sobre la viabilidad celular de los explantes de retina no era dependiente de la concentración del antibiótico, eligiéndose la concentración 200  $\mu\text{M}$  para las restantes experiencias.

El tratamiento con minociclina tenía un efecto nocivo sobre la viabilidad de las células de la retina, medida mediante citometría de flujo, que era significativamente menor en explantes de retina de P10 incubados durante 2 div en medio de cultivo con minociclina 200  $\mu\text{M}$  que en explantes control incubados en medio de cultivo sin minociclina (Fig III-2). Estos resultados coincidían con las observaciones llevadas a cabo sobre secciones de explantes en las que las células muertas se habían marcado mediante tinción con TUNEL. En efecto, los perfiles TUNEL-positivos eran considerablemente más abundantes en las secciones de explantes tratados con minociclina que en las de explantes control (Fig III-3).

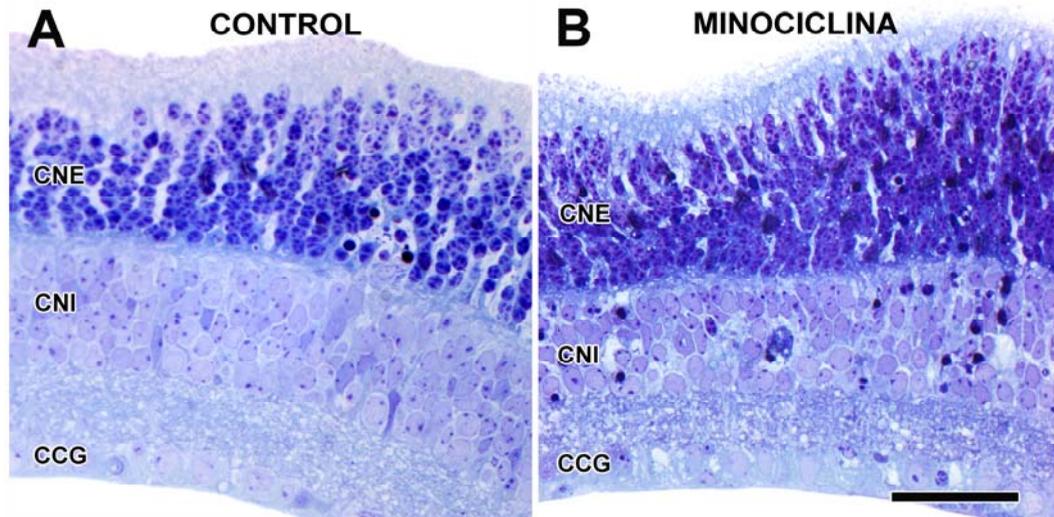
En secciones semifinas también era evidente que los explantes tratados con minociclina presentaban mayor cantidad de células picnóticas que los respectivos controles, las cuales se localizaban principalmente en la parte vitreal de la CNE y en la CNI (Fig III-4). Con microscopía electrónica de transmisión también se observaban células muertas o en proceso de degeneración (con cromatina condensada) en la CNE y CNI de explantes tratados con minociclina (Fig. III-5).



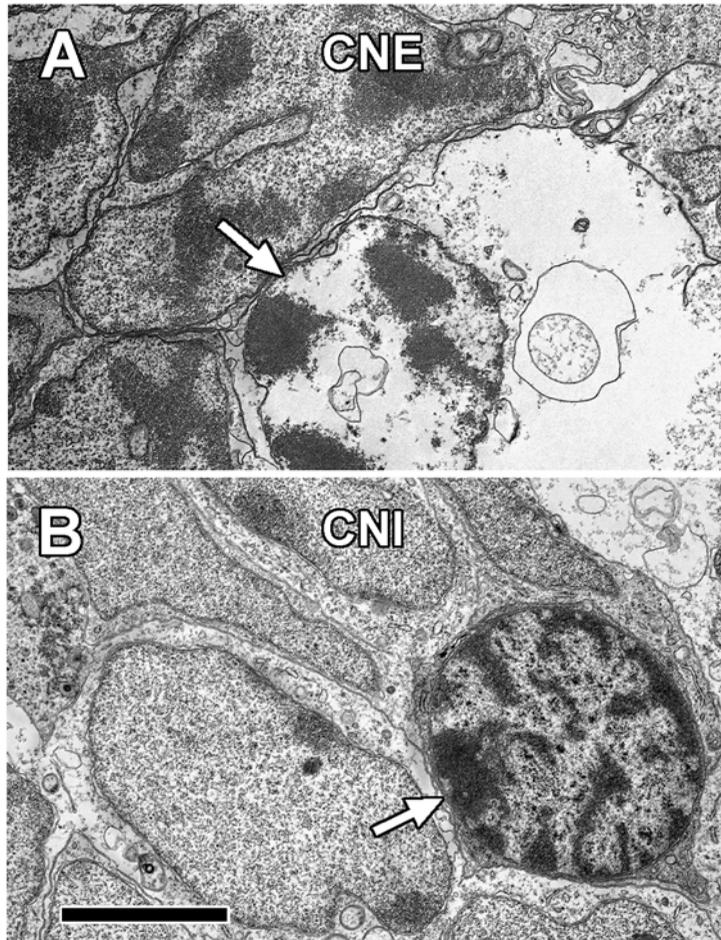
**Fig. III-2.** Viabilidad celular (porcentaje de células viables), medida mediante citometría de flujo, en explantes de retina de ratón postnatal de 10 días cultivados *in vitro*. **A:** Perfiles de citometría de flujo de un explante de retina tratado con minociclina (abajo) y su correspondiente control (arriba) obtenidos en experiencias de doble marcado con yoduro de propidio (IP) y diacetato de fluoresceína (FDA) para determinar la viabilidad celular. La nube de puntos del cuadrante Q1 (células muertas teñidas con IP) es mucho mayor en el explante tratado con minociclina que en su control. **B:** Histograma comparativo de la viabilidad celular media ( $\pm$  error estándar,  $n=8$ ) obtenida en explantes control (CT, barra azul) y explantes tratados con minociclina (MIN, barra roja). La viabilidad celular es significativamente menor ( $P<0,001$ , tres asteriscos) en los explantes tratados con minociclina (63,1%) que en los controles (82,9%).



**Fig. III-3.** Microscopía confocal de secciones histológicas obtenidas de explantes de retina de ratón de P10 cultivados *in vitro*, que han sido tratadas con TUNEL (en rojo) y marcadas con Hoechst 33342 (en azul). Las imágenes de la izquierda corresponden al canal rojo y muestran exclusivamente los perfiles TUNEL-positivos, mientras que a la derecha se observan las imágenes de fusión de los canales rojo y azul, en las que se aprecia la ubicación de estos perfiles en las diferentes capas de la retina, puestas de manifiesto por la tinción nuclear con Hoechst 33342. CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. **A:** Explante control en el que los fragmentos nucleares TUNEL-positivos se distribuyen principalmente en la CNE y CCG. **B:** Explante tratado con minociclina en el que los fragmentos nucleares TUNEL-positivos son mucho más abundantes en la CNE y CCG que en los explantes control y también se observan en la CNI. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. III-4.** Secciones semifinas de explantes de retina de ratón de P10 cultivados *in vitro* que muestran la distribución de núcleos picnóticos en explantes control (**A**) y tratados con minociclina (**B**). CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. **A:** Los explantes control muestran una discreta cantidad de núcleos picnóticos en la CNE. **B:** Los explantes tratados con minociclina presentan mayor número de núcleos picnóticos distribuidos en la CNE y CNI. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. III-5.** Microscopía electrónica de transmisión de explantes de retina de ratón postnatal de 10 días incubados en medio de cultivo con minociclina. CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna. **A:** Fotorreceptor de la CNE en proceso de degeneración (flecha). **B:** Célula de la CNI con signos iniciales de degeneración, cuya cromatina está parcialmente condensada (flecha). Barra de escala: 3  $\mu\text{m}$ .

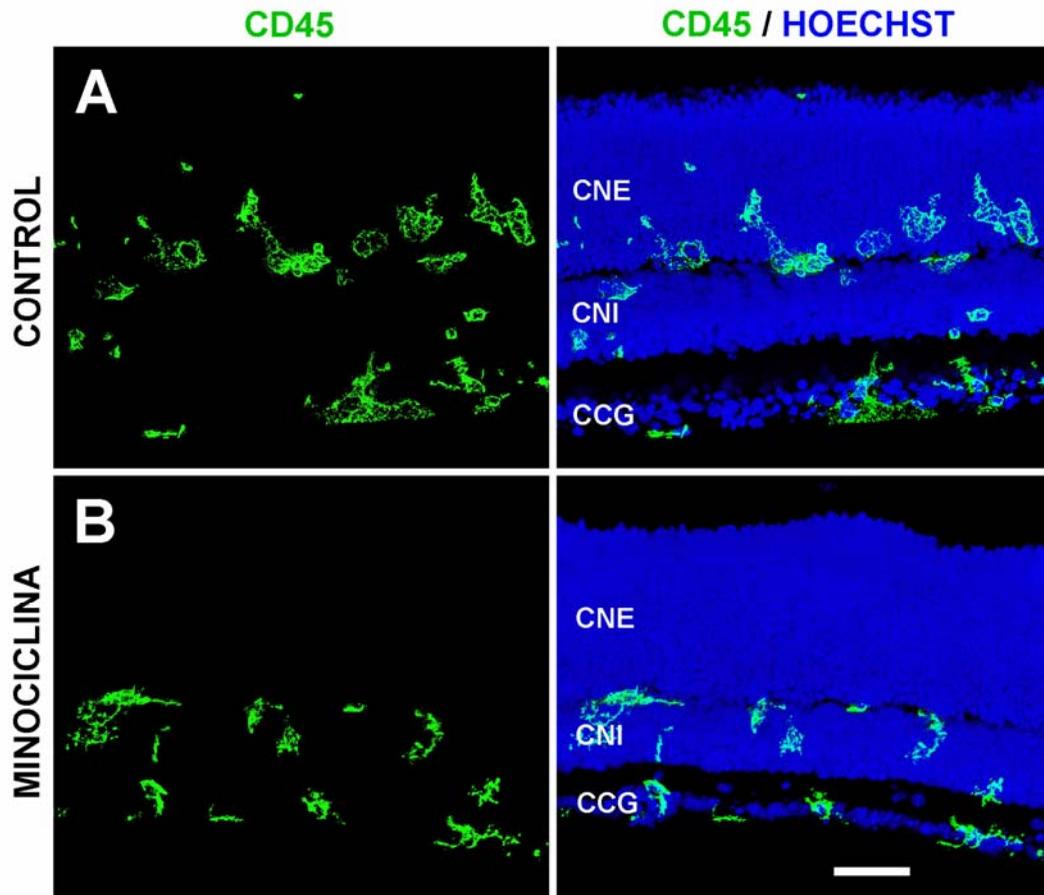
### **La minociclina inhibe la activación de la microglía en los explantes de retina cultivados *in vitro***

La distribución y morfología de las células microgliales, puestas de manifiesto mediante inmunotinción con anti-CD45, mostraban diferencias muy evidentes en los explantes tratados con minociclina y en sus controles (Fig. III-6). Así, la microglía de los explantes control mostraba una apariencia frecuentemente globosa, como la descrita en el capítulo II, y estaba presente en todas las capas de la retina, incluida la CNE (Fig. III-6A). Sin embargo, las células microgliales de los explantes tratados con minociclina presentaban una morfología ameboide, pero no adoptaban un aspecto globoso, y no estaban presentes en la CNE (Fig. III-6B), sugiriendo que su nivel de activación era menor que en los explantes control. La morfología ameboide, pero no globosa, de la microglía de los explantes tratados con minociclina era confirmada en secciones ultrafinas observadas con microscopía electrónica de transmisión (Fig. III-7).

Por otra parte, numerosas células microgliales globosas de los explantes control se observaban inmunomarcadas con el anticuerpo anti-PAR (Fig. III-8A, B), revelando que contenían el polímero PAR, producido por la actividad del enzima PARP-1. Por lo tanto, la presencia de PAR en las células microgliales demostraba la existencia de actividad PARP-1 en las mismas. La presencia de dicha actividad en las células microgliales globosas, que son células fuertemente activadas, está de acuerdo con la estrecha relación de PARP-1 con el estado de activación de la microglía descrita con anterioridad (Kauppinen y Swanson, 2005). En los explantes de retina tratados con minociclina, las células microgliales perdían su apariencia globosa, mostrando una morfología ameboide con algunas prolongaciones, y en su inmensa mayoría carecían del polímero PAR o contenían pequeños acúmulos del mismo (Fig. III-8C, D). Estas observaciones sugerían que el tratamiento con minociclina de los explantes de retina reducía el nivel de activación de la microglía.

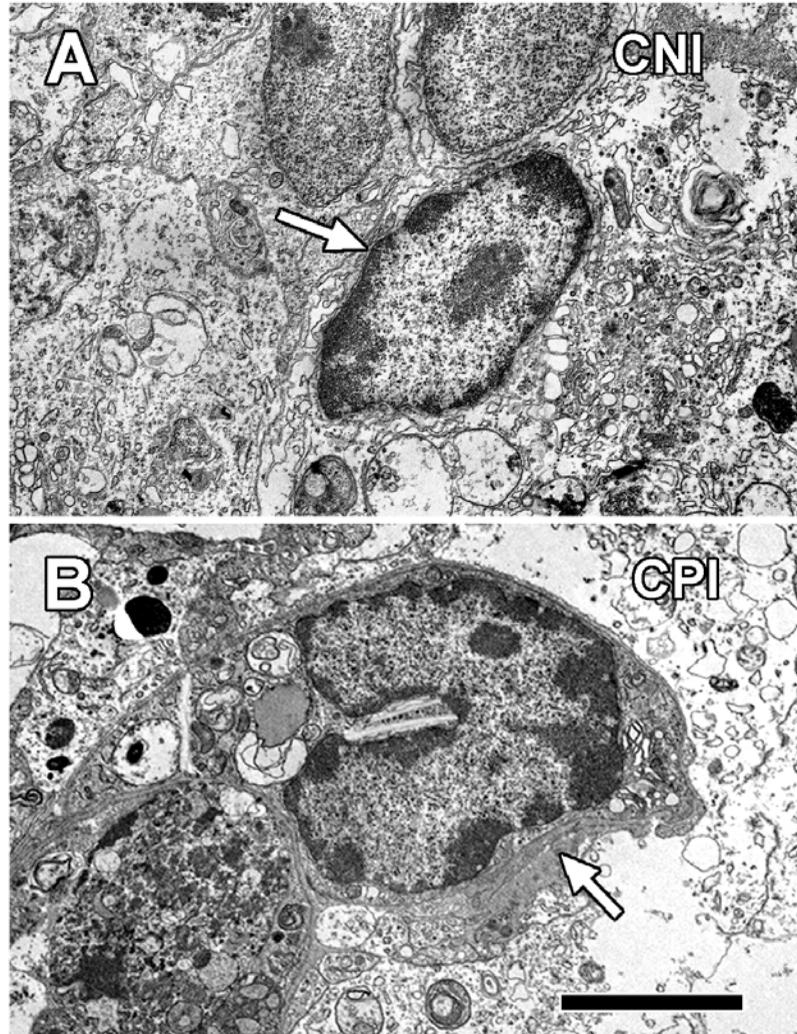
La tasa de IR-CD68 de la microglía estaba significativamente disminuida en los explantes tratados con minociclina en relación con los explantes control

(Fig. III-9A). El tratamiento con minociclina también producía una significativa reducción de la tasa proliferativa de las células microgliales, desde el 7,7% encontrado en los explantes control hasta el 3,3% hallado en los explantes tratados con minociclina (Fig. III-9B). Teniendo en cuenta que la actividad proliferativa se incrementa durante la activación microglial, estos resultados apoyaban que la minociclina inhibía, al menos parcialmente, la activación de la microglía en los explantes de retina cultivados *in vitro*. Además, la concentración de TNF $\alpha$  en el medio de cultivo de explantes de retina tratados con minociclina era significativamente menor que en el medio de explantes control (Fig. III-10). Este resultado también apoya que la minociclina inhibe la activación de la microglía de los explantes cultivados *in vitro*, ya que es bien conocido que la microglía activada libera cantidades elevadas de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF $\alpha$ .

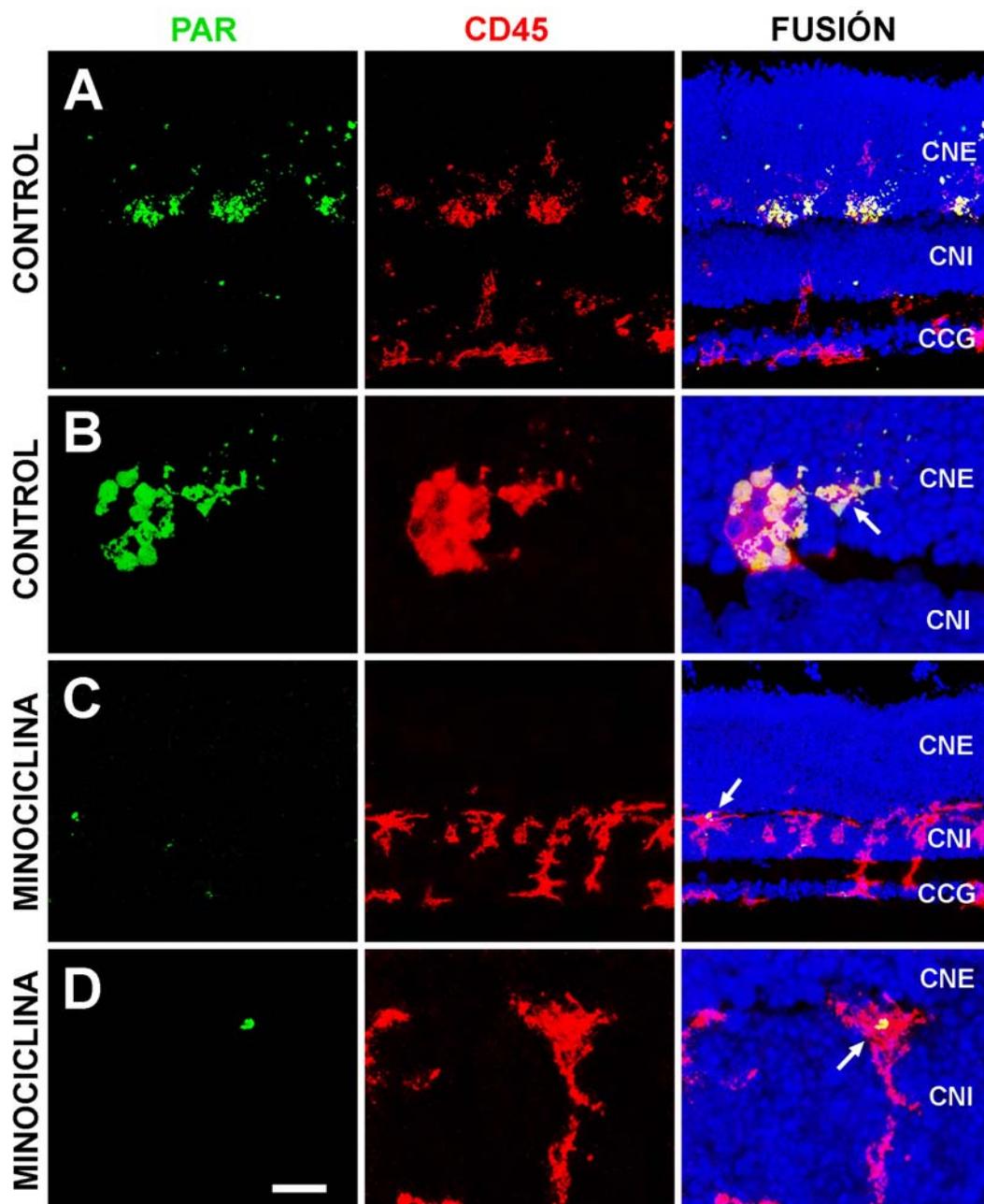


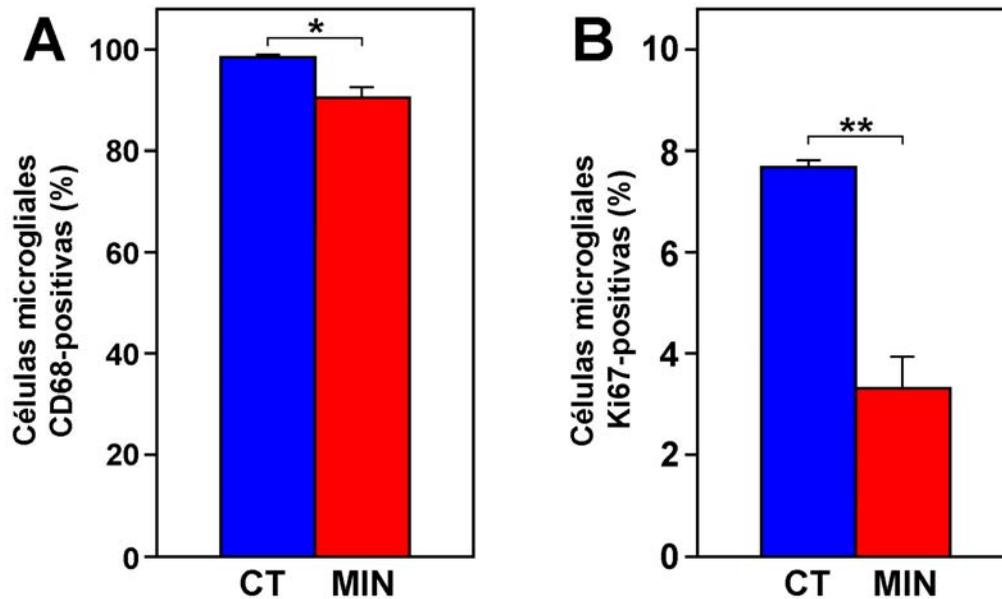
**Fig. III-6.** Células microgliales inmunoteñidas con el anticuerpo CD45 (verde) en secciones de explantes de retina de ratón postnatal de 10 días incubados en medio de cultivo sin minociclina (control, **A**) y con minociclina (minociclina, **B**). Los núcleos celulares están marcados con Hoechst 33342 (azul) para mostrar la distribución de las células microgliales en las distintas capas de la retina (micrografías de la derecha). CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. **A:** Distribución y apariencia de las células microgliales en un explante control. Dichas células se observan en todas las capas de la retina, incluyendo la CNE, donde muestran una apariencia globosa. **B:** Explante de retina tratado con minociclina que muestra células microgliales, de apariencia menos globosa que en **A**, distribuidas en las diferentes capas de la retina, con la excepción de la CNE. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

**Fig. III-7.** Microscopía electrónica de transmisión de explantes de retina de ratón postnatal de 10 días incubados en medio de cultivo con minociclina. CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna. **A:** Célula microglial (flecha) localizada en la CNI. **B:** Célula microglial (flecha) en la CPI, cuyo núcleo presenta una profunda escotadura y su citoplasma contiene una vesícula de fagocitosis. Barra de escala: 3  $\mu\text{m}$ .

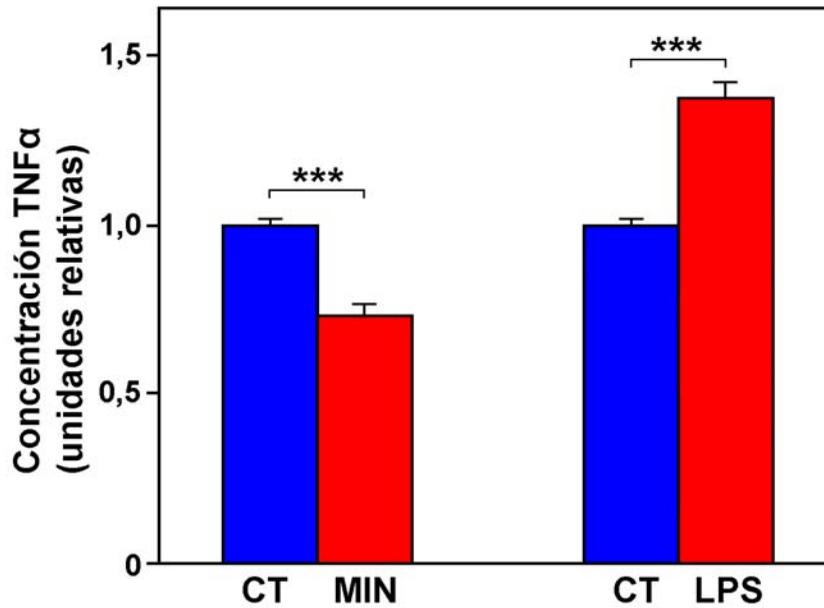


**Fig. III-8.** Microscopía confocal de secciones de explantes de retina de ratón postnatal de 10 días incubados en medio de cultivo sin minociclina (control, **A** y **B**) y con minociclina (minociclina, **C** y **D**). Las secciones están inmunomarcadas con los anticuerpos CD45 (rojo), que revela las células microgliales (columna izquierda), y anti-PAR (verde), que pone de manifiesto el polímero poli-ADP-ribosa (PAR, columna central). La tinción con Hoechst 33342 marca los núcleos celulares (azul), mostrando las capas nucleares de la retina (micrografías de la derecha). CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. **A:** Acumulación de PAR en células microgliales CD45-positivas localizadas en la CNE de un explante de retina control. **B:** Detalle de un acúmulo del polímero PAR en el interior de una célula microglial de la CNE en un explante control. Una parte del polímero se localiza en una prolongación de la célula microglial (flecha). **C:** Ausencia casi total del polímero PAR en un explante de retina tratado con minociclina. Las células microgliales CD45-positivas tienen un aspecto parcialmente ramificado y solamente una de ellas contiene señal del polímero (flecha). **D:** Detalle de un pequeño acúmulo de polímero en una célula microglial CD45-positiva de aspecto parcialmente ramificado (flecha) de un explante tratado con minociclina. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$  en **A**; 35  $\mu\text{m}$  en **B**; 34  $\mu\text{m}$  en **C**; 9  $\mu\text{m}$  en **D**.





**Fig. III-9. A:** Tasa de inmunorreactividad para CD68 (porcentaje de células microgliales CD68-positivas, **A**) y de proliferación (porcentaje de células microgliales Ki67-positivas, **B**) de células microgliales en explantes de retina de ratón postnatal de 10 días incubados en medio de cultivo con minociclina (MIN) y en sus respectivos explantes control incubados en medio sin minociclina (CT). Las barras expresan valores medios  $\pm$  error estándar (n=5). **A:** La tasa de inmunorreactividad para CD68 en explantes tratados con minociclina (90,8%) es menor ( $P < 0,05$ , asterisco) que en explantes control (98,6%). **B:** La tasa de proliferación también es menor ( $P < 0,01$ , dos asteriscos) en explantes tratados con minociclina (3,3%) que en explantes control (7,7%).



**Fig. III-10.** Niveles relativos de concentración de TNF $\alpha$  en los medios de cultivo de explantes de retina de ratón postnatal de 10 días tratados con minociclina (MIN) o con lipolisacárido (LPS) y de sus respectivos controles (CT). Las barras representan valores medios  $\pm$  errores estándar (n=12). Las concentraciones medias halladas en los medios de cultivo de explantes control se han ajustado a la unidad, mientras que las concentraciones de los medios de cultivo de explantes tratados con MIN o LPS se expresan proporcionalmente a dicha unidad. La concentración de TNF $\alpha$  en los medios de cultivo de explantes tratados con MIN es menor ( $P < 0,001$ , tres asteriscos) que en los medios de cultivo de los controles. Por el contrario, dicha concentración es más elevada ( $P < 0,001$ , tres asteriscos) en los medios de cultivo de los explantes tratados con LPS.

**El tratamiento con LPS mantiene el estado activado de la microglía y no modifica la viabilidad celular de los explantes de retina**

La inmunotinción con anti-CD45 demostraba que las células microgliales de los explantes tratados con LPS presentaban una apariencia morfológica y una distribución semejantes a las observadas en los explantes control. Así, tanto en los explantes incubados en medio de cultivo con LPS como en los controles no sometidos a la acción de LPS, las células microgliales se observaban en todas las capas de la retina, con una morfología globosa en la CNE y CNI (Fig. III-11). Estas observaciones indicaban que el tratamiento con LPS mantenía el estado activado de la microglía, ya existente en los explantes de retina cultivados *in vitro*. Además, la concentración de TNF $\alpha$  en el medio de cultivo de explantes de retina tratados con LPS era significativamente más elevada que en el medio de explantes control (Fig. III-10), sugiriendo un elevado grado de activación de la microglía tras el tratamiento con LPS.

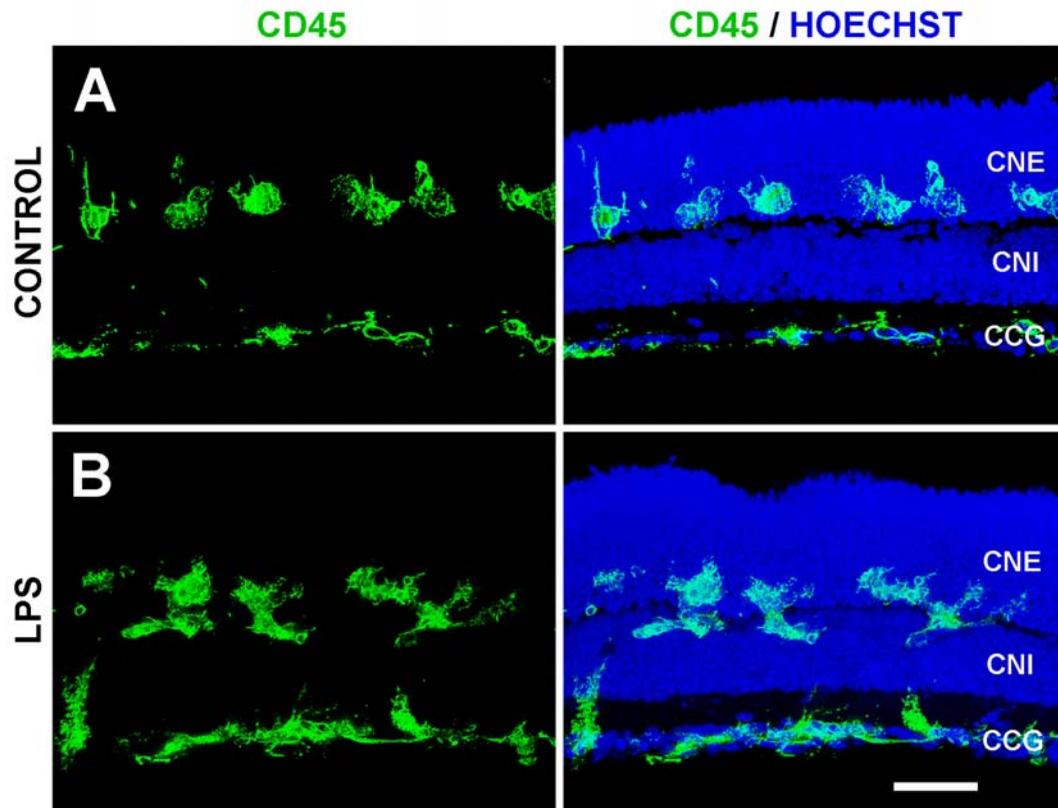
El análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares obtenidas de explantes de retina tratados con LPS y de explantes control no tratados demostraba que la viabilidad celular era similar en ambos, en torno al 82-83% (Fig. III-12). Por lo tanto, el tratamiento con LPS mantenía constantes los niveles de viabilidad celular, coincidiendo con el mantenimiento de la activación microglial.

**El tratamiento combinado con minociclina y LPS inhibe la activación microglial y reduce la viabilidad celular de los explantes de retina**

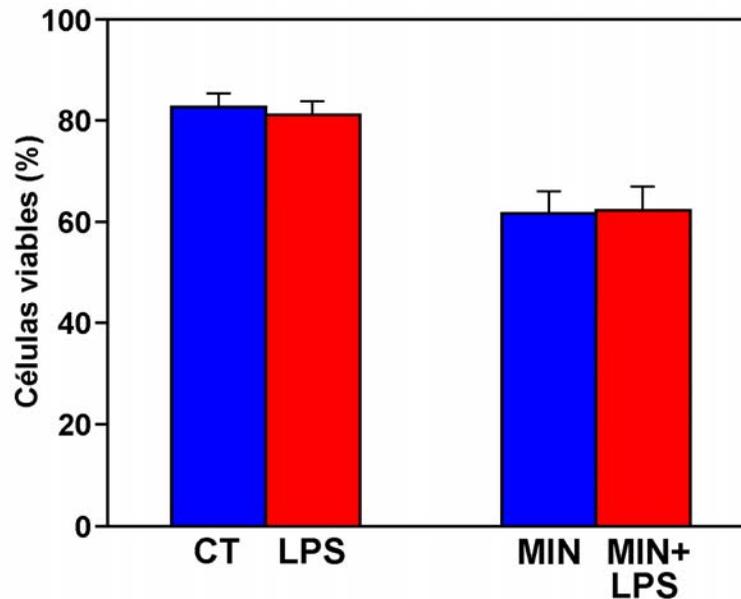
Teniendo en consideración los efectos contrapuestos del tratamiento de los explantes de retina con minociclina (disminución de la viabilidad celular y de la activación microglial) o con LPS (preservación de la viabilidad celular y de la activación microglial), se llevaron a cabo experiencias en las que los explantes eran tratados simultáneamente con minociclina y LPS. Este doble tratamiento provocaba un descenso de la viabilidad celular hasta el 63%, igual que sucedía tras el tratamiento de los explantes exclusivamente con minociclina (Fig III-12).

Por otra parte, el doble tratamiento con minociclina y LPS parecía disminuir el grado de activación de la microglía, del mismo modo que lo hacía el tratamiento exclusivo con minociclina. Así, con ambos tipos de tratamiento, las células microgliales mostraban un aspecto ameboide no globoso (Fig. III-13), claramente diferente al mostrado en explantes no tratados o tratados exclusivamente con LPS (Fig. III-11). Además, las células microgliales estaban ausentes de la CNE en los explantes doblemente tratados con minociclina y LPS (Fig. III-13B), igual que sucedía en los explantes tratados exclusivamente con minociclina (Fig. III-13A).

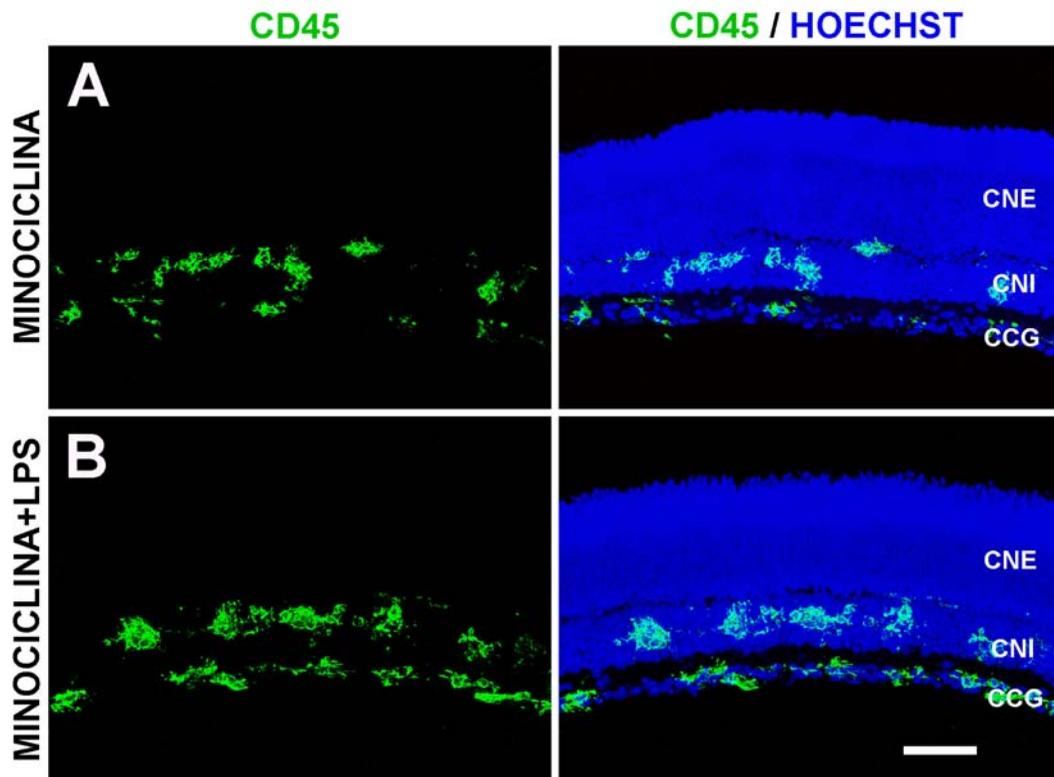
Los anteriores resultados indicaban que el efecto inhibitorio de la activación microglial logrado por la minociclina predominaba sobre el posible efecto opuesto del LPS. Además, la disminución del grado de activación de la microglía coincidía con una significativa reducción de la viabilidad celular de los explantes doblemente tratados con minociclina y LPS, igual que sucedía tras el tratamiento exclusivo con minociclina.



**Fig. III-11.** Células microgliales inmunoteñidas con el anticuerpo CD45 (verde) en secciones de explantes de retina de ratón postnatal de 10 días incubados *in vitro* en medio de cultivo sin lipopolisacárido (control, **A**) o con lipopolisacárido (LPS, **B**). Los núcleos celulares están marcados con Hoechst 33342 (azul) para mostrar la distribución de las células microgliales en las distintas capas de la retina (micrografías de la derecha). CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. **A:** Distribución de células microgliales en todas las capas de la retina de un explante control, con una morfología más globosa en la CNE. **B:** Células microgliales en un explante tratado con LPS, cuya distribución y morfología son similares a las observadas en el explante control. Barra de escala: 50  $\mu$ m.



**Fig. III-12.** Viabilidad celular (porcentaje de células viables), medida mediante citometría de flujo, en explantes de retina de ratón postnatal de 10 días tratados con lipopolisacárido (LPS) o con minociclina y LPS (MIN+LPS). Las barras representan la viabilidad celular media ( $\pm$  error estándar) obtenida a partir de los valores medidos en 5 explantes experimentales (barras rojas) y sus respectivos controles (barras azules). La viabilidad celular de explantes tratados con LPS durante el segundo día de cultivo in vitro no muestra diferencias con la de sus controles no tratados (barras de la izquierda). Tampoco hay diferencias entre la viabilidad celular de explantes tratados con MIN+LPS y la de sus controles tratados exclusivamente con MIN (barras de la derecha), aunque dicha viabilidad es menor en ambos casos que en los explantes tratados exclusivamente con LPS.



**Fig. III-13.** Células microgliales inmunoteñidas con el anticuerpo CD45 (verde) en secciones de explantes de retina de ratón postnatal de 10 días tratados exclusivamente con minociclina (**A**) o con minociclina y lipopolisacárido (minociclina+LPS, **B**). Los núcleos celulares están marcados con Hoechst 33342 (azul) para mostrar la distribución de las células microgliales en las distintas capas de la retina (micrografías de la derecha). CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. **A:** Explante tratado con minociclina que muestra células microgliales de aspecto ameboide no globoso, distribuidas en todas las capas de la retina, excepto en la CNE. **B:** Explante tratado con minociclina y LPS, en el que las células microgliales muestran una apariencia y distribución similares a las observadas en el explante tratado exclusivamente con minociclina. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

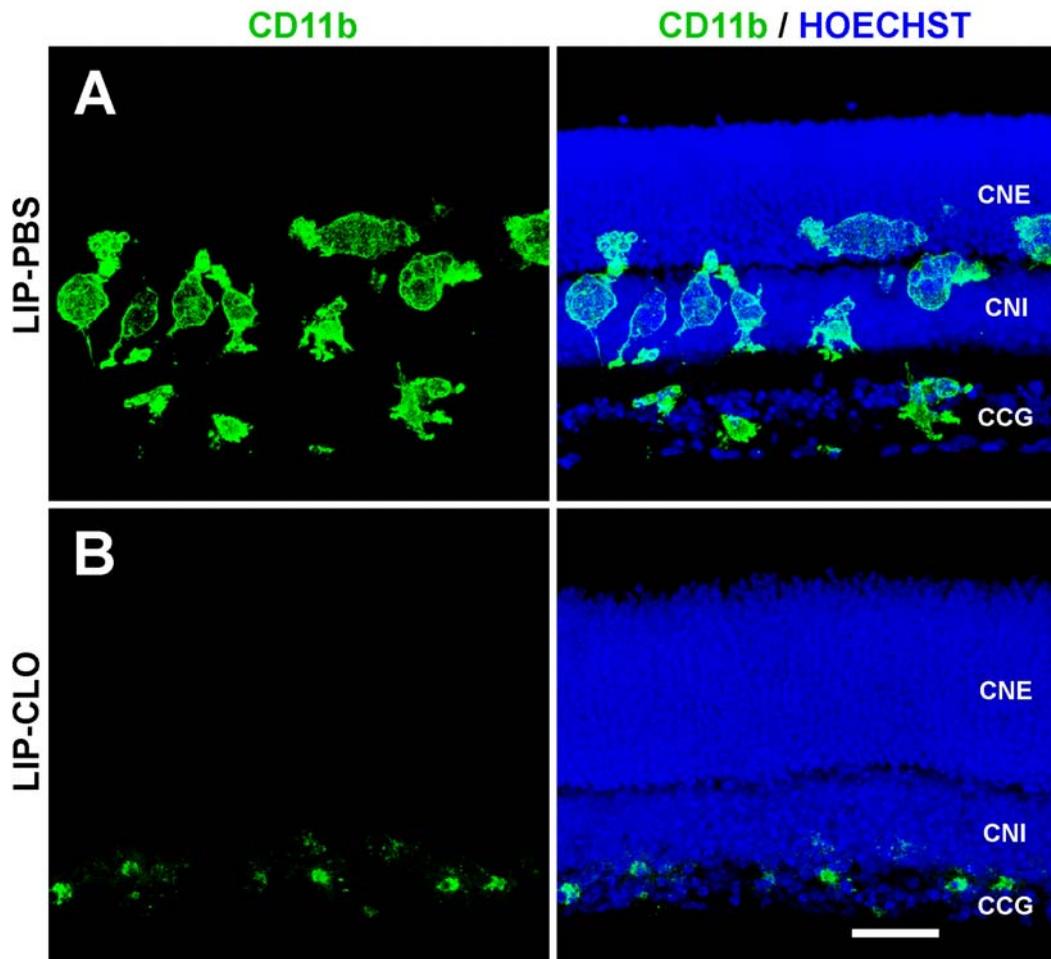
### **La eliminación de la microglía mediante tratamiento con Lip-Clo reduce la viabilidad celular de los explantes de retina**

Nuestros anteriores resultados parecían demostrar que el efecto nocivo de la minociclina sobre la viabilidad celular de los explantes de retina era consecuencia de la inhibición del estado de activación de la microglía. Sin embargo no era descartable una acción directa de la minociclina sobre las células del explante, induciendo la muerte de las mismas. Con el objetivo de aclarar esta posibilidad se realizaron experiencias de eliminación específica de la microglía mediante tratamiento de los explantes con Lip-Clo, en las que se utilizaron explantes tratados con Lip-PBS como controles.

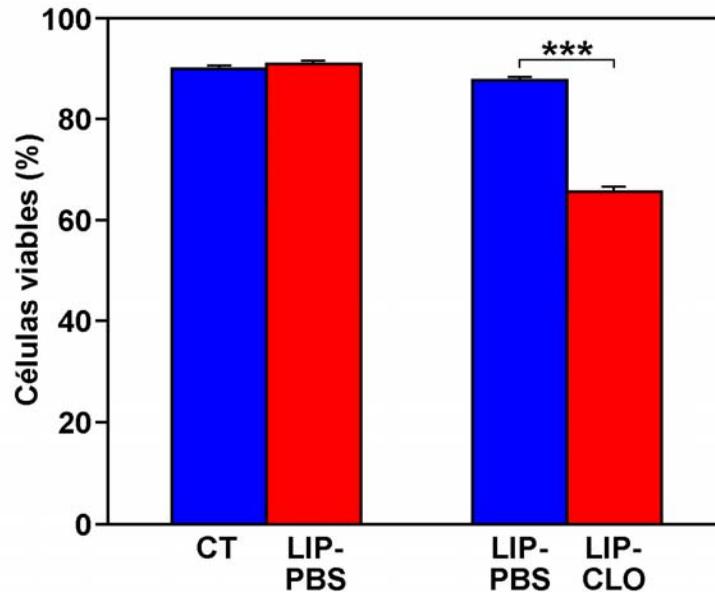
El tratamiento con Lip-PBS no modificaba la morfología ni la distribución de la microglía en los explantes de retina, que mostraban células microgliales distribuidas en todas las capas de la retina, muchas de ellas con una morfología globosa (Fig. III-14A), igual que sucedía en explantes control no tratados. Sin embargo, el tratamiento con Lip-Clo (durante 90 minutos antes del comienzo del cultivo *in vitro* y durante el segundo día de cultivo) conseguía eliminar la mayor parte de la microglía de los explantes, aunque una pequeña proporción de células microgliales sobrevivía al tratamiento (Fig. III-14B). Las pocas células microgliales observadas tras el tratamiento con Lip-Clo se localizaban fundamentalmente a nivel de la CCG y eran redondas y pequeñas. Además, muchas de ellas mostraban fragmentos de citoplasma en sus inmediaciones, aparentemente desprendidos de las mismas, sugiriendo que eran células deterioradas en vías de desaparición. Por lo tanto, los explantes de retina quedaban casi desprovistos de microglía tras el tratamiento con Lip-Clo y las escasas células microgliales resistentes al tratamiento no mostraban signos de activación.

La viabilidad celular de los explantes tratados con Lip-PBS, medida mediante citometría de flujo, no mostraba diferencias con la encontrada en explantes no tratados, estando en ambos casos en torno al 90% (Fig. III-15). Sin embargo, en los explantes tratados con Lip-Clo, la viabilidad celular disminuía

más del 20% (hasta un 65,9%) con respecto a los explantes control tratados con Lip-PBS o no tratados. Este descenso de la viabilidad celular en más de un 20% era similar al observado tras el tratamiento de los explantes con minociclina (ver Fig. III-2), apoyando la idea de que la pérdida de viabilidad de una elevada proporción de células de los explantes era inducida por los cambios sufridos por la microglía (desaparición tras el tratamiento con Lip-Clo o inhibición de su estado activado tras el tratamiento con minociclina).



**Fig. III-14.** Morfología y distribución de células microgliales inmunomarcadas con anti-CD11b (verde) en explantes de retina de ratón postnatal de 10 días incubados con liposomas-PBS (LIP-PBS, **A**) o con liposomas-clodronato (LIP-CLO, **B**). Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst 33342 (azul) para mostrar la distribución de las células microgliales en las distintas capas de la retina (micrografías de la derecha). CNE: capa nuclear externa; CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. **A:** Células microgliales CD11b-positivas de morfología globosa, distribuidas en todas las capas retinianas de un explante tratado con LIP-PBS. **B:** Explante de retina tratado con LIP-CLO, que muestra escaso número de células microgliales aparentemente deterioradas, distribuidas exclusivamente en la parte vítrea de la retina. Barra de escala: 40  $\mu$ m.



**Fig. III-15.** Viabilidad celular (porcentaje de células viables), medida mediante citometría de flujo, en explantes de retina de ratón postnatal de 10 días sin tratamiento con liposomas (controles no tratados, CT) y tratados con liposomas-PBS (LIP-PBS) o liposomas clodronato (LIP-CLO). Las barras representan la viabilidad celular media ( $\pm$  error estándar) obtenida a partir de los valores medidos en 5 explantes experimentales (barras rojas) y sus respectivos controles (barras azules). La viabilidad celular no difiere entre explantes control no tratados (90,2%) y tratados con LIP-PBS (barras de la izquierda), mientras que se reduce significativamente ( $P < 0,001$ , tres asteriscos) en explantes tratados con LIP-CLO (65,9%, barras de la derecha).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio se han llevado a cabo en un modelo de cultivos organotípicos de explantes de retina de ratones de P10, cuyas células microgliales están activadas, en el cual se ha investigado la influencia de la activación microglial sobre la supervivencia o muerte de las células de la retina. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con minociclina o LPS inhibe o intensifica, respectivamente, la activación de la microglía en los explantes de retina, mientras que el tratamiento con Lip-Clo reduce drásticamente el número de células microgliales en los mismos. La inhibición de la activación microglial o la eliminación de las células microgliales induce una disminución significativa de la viabilidad de las células retinianas, sugiriendo que la microglía ejerce un papel neuroprotector en nuestro modelo de estudio a través de mecanismos no conocidos.

### **Reacción microglial en los explantes de retina cultivados *in vitro***

La confección del explante de retina y su posterior cultivo *in vitro* desencadenan una fuerte reacción microglial, que es consecuencia de la sección del nervio óptico durante el aislamiento del explante (García-Valenzuela y Sharma, 1999; Zhang y Tso, 2003). Dicha reacción se caracteriza por el incremento de la proliferación de las células microgliales (Wohl et al., 2010) y el aumento de la expresión de marcadores como nestina y vimentina (Wohl et al., 2011). Además, la reactividad de las células microgliales del explante también es debida a las nuevas condiciones a las que se encuentran sometidas durante el cultivo. En este sentido, estudios realizados en explantes de retina embrionaria de codorniz han puesto de manifiesto que diferentes medios de cultivo afectan de diferente modo al estado funcional de la microglía (Carrasco et al., 2011). El BME-SC, como el empleado en este estudio, es el medio de cultivo que mejor mantiene las características fisiológicas de la misma, mientras que otros medios producen una mayor activación de las células microgliales.

En la retina *in situ*, la microglía intrínseca y macrófagos de procedencia sanguínea cooperan en la eliminación de los restos de células degeneradas (Joly et al., 2009). La degeneración de fotorreceptores que tiene lugar durante la retinosis pigmentaria se incrementa cuando se inhibe el reclutamiento de células provenientes de la médula ósea, sugiriendo que los macrófagos de origen medular juegan un papel neuroprotector en la enfermedad (Sasahara et al., 2008). Se ha especulado que el efecto beneficioso de estas células extrínsecas podría deberse a que constituyen un aporte adicional de nuevas células fagocíticas que colaboran con la microglía intrínseca, permitiendo una eliminación más eficiente de los restos de células degeneradas, potencialmente nocivos para otras células sanas (Sokolowski y Mandell, 2011). Otra posibilidad, que no excluye la anterior, es que las células de origen extrínseco podrían modular la acción, neurotóxica o neuroprotectora, de las células microgliales intrínsecas, como ha sido propuesto en otras regiones del SNC (Jung y Schwartz, 2012; Walker et al., 2012). En los explantes de retina aislados no hay posibilidad de entrada de células desde la sangre, por lo que la microglía intrínseca debe llevar a cabo de forma exclusiva las tareas de eliminación de los restos de células muertas. Como ha quedado reflejado en el capítulo anterior, los explantes cultivados *in vitro* sufren intensos procesos de degeneración celular y las células microgliales, que se encuentran en estado activado, llevan a cabo la fagocitosis de los restos de células muertas. Para investigar el efecto de la activación microglial sobre la viabilidad de las células del explante, las experiencias realizadas en el presente estudio han intentado disminuir o potenciar la activación de la microglía, mediante tratamiento de los explantes con minociclina o LPS, respectivamente.

### **La minociclina inhibe la activación de la microglía y el LPS la potencia**

La dosis de minociclina empleada en nuestras experiencias (200  $\mu$ M) está en el rango superior de las utilizadas en otros estudios que han analizado los efectos de la minociclina sobre la microglía o la viabilidad celular. Algunos estudios efectuados en cultivos de células disociadas, como la línea E1A-NR.3

(Baptiste et al., 2004), células de epitelio pigmentario humano (Hollborn et al., 2010), células de neuroblastoma SH-SY5Y (Ossola et al., 2012) o cultivos primarios de neuronas (Matsukawa et al., 2009), han detectado que concentraciones de minociclina menores a las utilizadas aquí producen efectos neurotóxicos. Sin embargo, experimentos llevados a cabo en cultivos mixtos de células retinianas (neuronas y glía) tratados con diversas concentraciones de minociclina han revelado que la dosis óptima de ésta en los cultivos mixtos es diferente a la establecida en células retinianas de la línea E1A-NR.3, de forma que la viabilidad celular es semejante a concentraciones de 200  $\mu\text{M}$  y de 20  $\mu\text{M}$  (ver fig. 2 en Baptiste et al., 2004). Por lo tanto, el posible efecto citotóxico de la minociclina parece estar relacionado con el ambiente en el que se encuentran las células. En cualquier caso, los resultados descritos en cultivos mixtos de retina (un sistema más parecido a nuestros explantes que los cultivos de células disociadas) permiten utilizar una concentración 200  $\mu\text{M}$  de minociclina. Otro estudio (Giuliani et al., 2005) ha utilizado esta concentración para reducir de forma drástica la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  por células microgliales, justificando su empleo en nuestro estudio para conseguir una fuerte inhibición de la activación microglial en los explantes de retina.

Como era de esperar, el tratamiento con minociclina de los explantes inducía una reducción de la activación microglial, puesta de manifiesto por la disminución de la tasa proliferativa de las células microgliales y la menor cantidad de  $\text{TNF}\alpha$  secretado en los explantes. Además, la minociclina producía un ligero descenso de la tasa de IR-CD68, aunque este parámetro no es fiable como marcador de activación microglial (ver capítulo II de esta Tesis). El tratamiento con minociclina también producía una disminución de la actividad del enzima PARP-1, que está notablemente incrementada en la microglía activada (Kauppinen y Swanson, 2005). Por último, la microglía de los explantes tratados con minociclina presentaba una morfología menos globosa que la de los explantes control y no migraba al interior de la CNE, como sucedía en dichos controles. Este conjunto de resultados demostraba inequívocamente que el tratamiento con

minociclina inhibía, al menos parcialmente, la activación microglial existente en los explantes de retina cultivados *in vitro*.

Por el contrario, tras el tratamiento de los explantes con LPS, la microglía mostraba signos morfológicos de intensa activación, similares a los observados en explantes control. Además, el LPS inducía un fuerte aumento de la cantidad de TNF $\alpha$  liberado al medio de cultivo, apoyando la idea de que potenciaba el grado de activación de las células microgliales, las cuales segregarían mayor cantidad de diferentes factores solubles, tales como TNF $\alpha$ . Aunque esta citoquina puede ser secretada por otras células de la retina, como las células de Müller (Chien y Dix, 2012), diversos estudios han demostrado que la microglía es la fuente principal de TNF $\alpha$  en la retina (Shen et al., 2011; Zeng et al., 2005). Por lo tanto, nuestros resultados sugerían que el LPS potencia el grado de activación de la microglía de los explantes, como era previsible, ya que el LPS es un potente inductor de la activación microglial, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lund et al., 2006; Rivest, 2003; Shen et al., 2009).

### **La minociclina disminuye la viabilidad celular en los explantes de retina**

El tratamiento de los explantes con minociclina, además de inhibir la activación microglial, producía una significativa disminución de la viabilidad de las células de la retina. Es decir, la minociclina parecía tener un efecto deletéreo sobre las células retinianas, como también ha sido descrito en otras partes del SNC (Diguet et al., 2004; Jackson et al., 2007; Potter et al., 2009; Yang et al., 2003). Si suponemos que la microglía activada de los explantes segrega diversos factores solubles, algunos de los cuales pueden tener efectos neuroprotectores, el efecto citotóxico de la minociclina podría ser consecuencia indirecta de su acción sobre las células microgliales, las cuales dejarían de liberar posibles factores neuroprotectores cuando se inhibe su activación. Por otra parte, nuestros experimentos demuestran que el tratamiento de los explantes con LPS, aunque potenciaba la activación microglial, no tenía ningún efecto aparente sobre la viabilidad de las células de la retina. Este resultado podría explicarse suponiendo

que el grado inicial de activación de la microglía, previo al tratamiento con LPS, es suficiente para mantener la viabilidad de una cierta proporción de células del explante, de forma que un mayor grado de activación microglial no tendría una repercusión apreciable sobre dicha viabilidad celular.

El tratamiento conjunto de los explantes con LPS y minociclina revelaba que la morfología y distribución de la microglía en los explantes con doble tratamiento eran semejantes a las observadas en explantes tratados exclusivamente con minociclina, demostrando que el efecto del LPS, potenciador de la activación microglial, no revertía el efecto inhibitorio de la minociclina. Este resultado se podría explicar suponiendo que la minociclina actuaría sobre algún factor de la ruta de activación microglial que también participaría en las vías de señalización del LPS. Es decir, que tanto la minociclina como el LPS actuarían sobre la misma ruta, operando la minociclina sobre un punto “downstream” respecto al punto de actuación del LPS. En este sentido, se ha descrito que el LPS activa la ruta de MAPK (Bode et al., 2012), sobre la que también actúa la minociclina, de forma que ésta inhibiría la activación producida por LPS (Nikodemova et al., 2006). El hecho de que la activación microglial se mantenga inhibida en los explantes con doble tratamiento minociclina/LPS explica que la viabilidad celular en este tipo de explantes sea semejante a la observada en explantes tratados únicamente con minociclina y menor que la observada en explantes no tratados.

### **Papel neuroprotector de la microglía activada en los explantes de retina**

No se puede descartar que el efecto nocivo de la minociclina sobre la viabilidad celular pueda ser el resultado de una acción directa del antibiótico sobre las células del explante, induciendo la muerte de las mismas. Teniendo en cuenta esta posibilidad, se investigó la relevancia de la microglía para la supervivencia celular mediante otra estrategia experimental consistente en la eliminación de la microglía retiniana mediante tratamiento de los explantes con Lip-Clo. Este tipo de experiencias demostraba que la eliminación de gran parte de las células microgliales producía un significativo descenso de la viabilidad celular, similar al

observado tras el tratamiento con minociclina. Así, la modificación de la actividad de la microglía, ya sea inhibiendo su activación (con minociclina) o eliminándola (con Lip-Clo), resultaba nociva para la supervivencia de las células del explante de retina. Por lo tanto, se puede concluir que la actividad de las células microgliales es necesaria para mantener la viabilidad de las células retinianas y lo más probable es que los efectos citotóxicos de la minociclina estén mediados por la inhibición de la activación microglial.

Otros estudios han obtenido resultados contrarios al papel neuroprotector de la microglía observado en nuestro modelo de cultivos organotípicos de explantes de retina. Estos estudios indican que la inhibición de la activación microglial mediante tratamiento con minociclina produce una disminución de la muerte celular en la retina tanto *in situ* (Bosco et al., 2008; Zhao et al., 2011) como *in vitro* (Leung et al., 2007), sugiriendo un papel citotóxico de la microglía activada. También se ha descrito que la minociclina no previene la muerte de fotorreceptores en ratones con distrofia retiniana, aunque sí la retrasa (Hughes et al., 2004). Es decir, el tratamiento con minociclina tiene un efecto protector transitorio sobre los fotorreceptores. La minociclina también parece tener un efecto neuroprotector transitorio sobre las células ganglionares axotomizadas, el cual se observa durante la primera semana después de la sección del nervio óptico y desaparece posteriormente (Baptiste et al., 2005).

Nuestros resultados concuerdan con el efecto neuroprotector de la microglía demostrado en diversas regiones del SNC y situaciones patológicas, en las que su desaparición incrementa el daño neuronal (Lalancette-Hebert et al., 2007; Montero et al., 2009; Narantuya et al., 2010; Neumann et al., 2006). Por lo general, la función neuroprotectora de la microglía se ha asociado al estado activado de la misma, aunque un reciente trabajo en cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo demuestra que las células microgliales ramificadas protegen frente a la muerte neuronal inducida por ácido N-metil-D-aspartico (Vinet et al., 2012). Por lo tanto, la acción neurotóxica o neuroprotectora de la

microglía es un tema muy controvertido en la literatura, con evidencias a favor y en contra de las dos opciones.

### **Mecanismos de la microglía activada que inducen neuroprotección**

La naturaleza de los factores relacionados con el papel neuroprotector de las células microgliales no es conocida en la actualidad. Se ha propuesto que la microglía activada que invade la CNE de la retina expuesta a luz intensa libera diversos factores neurotróficos, tales como NGF, factor neurotrófico ciliar (CNTF) y factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), los cuales inducen la secreción de nuevos factores neurotróficos por parte de células de Müller (Harada et al., 2002). Estos factores procedentes de células de Müller, como factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y GDNF, contribuyen a la protección de los fotorreceptores gracias a su unión a receptores específicos de la membrana de éstos. En apoyo de la existencia de este mecanismo, recientemente se ha demostrado que la muerte celular observada en cultivos de la línea de fotorreceptores 661W disminuye tras su incubación en un medio condicionado por células de Müller expuestas a microglía activada (Wang et al., 2011). De acuerdo con dicho mecanismo, cuando la interacción entre microglía y células de Müller se altera (como ocurre cuando se elimina la microglía o cuando se inhibe su activación) habría un déficit en la producción de factores neurotróficos que ocasionaría un incremento de la degeneración de fotorreceptores.

Es interesante señalar que factores liberados por la microglía activada, habitualmente considerados como neurotóxicos, también pueden tener un efecto neuroprotector. Así, el TNF $\alpha$  que generalmente ejerce una acción neurotóxica (Moujalled et al., 2013; Zhou et al., 2012; Zeng et al, 2005), en ocasiones juega un papel clave en la supervivencia de neuronas dañadas, como se ha demostrado en la isquemia cerebral (Lambertsen et al., 2009; Shohami et al., 1999) y en la neurotoxicidad por glutamato (Suzuki et al., 2004).

La intensa actividad fagocítica de la microglía activada de los explantes de retina (ver capítulo II de esta Tesis) también podría explicar la acción neuroprotectora de la misma demostrada en el presente capítulo. Dicha actividad fagocítica permite la digestión de numerosas células muertas y evitaría que sustancias nocivas liberadas por las mismas pudieran desencadenar la muerte de células vecinas. La propagación de la muerte entre fotorreceptores vecinos es un proceso bien establecido, que se conoce con el nombre de efecto “bystander”, y parece estar mediado por uniones gap, a través de las cuales sustancias tóxicas de las células que mueren penetrarían en las células sanas, induciendo su muerte (Linden, 2006; Ripps, 2002). No obstante, un reciente estudio ha cuestionado esta hipótesis, sugiriendo que las sustancias tóxicas responsables del efecto “bystander” no se propagan a través de uniones gap y podrían hacerlo a través del medio extracelular (Kranz et al., 2013). Este efecto participa en la muerte celular que tiene lugar durante el desarrollo normal de la retina (Cusato et al., 2003) y en retinas con retinosis pigmentaria (Kranz et al., 2013; Linden, 2006; Ripps, 2002) o expuestas a luz intensa (Krebs et al., 2009). En el capítulo II de esta Tesis hemos demostrado que las células microgliales de los explantes de retina cultivados in vitro fagocitan grupos de células con núcleos picnóticos. Estas células habrían sufrido daños y estarían liberando sustancias tóxicas, por lo que su permanencia en el tejido podría inducir la muerte de nuevas células sanas por un efecto “bystander”. Así, la fagocitosis y digestión de estas células dañadas por células microgliales evitaría su acción nociva sobre células vecinas sanas. Por lo tanto, la microglía activada tendría un efecto neuroprotector mediante la restricción del efecto “bystander” que beneficiaría la supervivencia celular en los explantes. A favor de esta hipótesis, se ha descrito que una insuficiente eliminación de restos celulares por parte de la microglía en algunas enfermedades neurodegenerativas podría contribuir al mantenimiento de la enfermedad (Neumann et al., 2009). En nuestras experiencias, la minociclina o el tratamiento con Lip-Clo potenciaría el efecto “bystander”, dando lugar a una reducción de la supervivencia celular como

consecuencia de la drástica disminución del poder fagocítico de la microglía, tras inhibir su activación o inducir su desaparición parcial, respectivamente.

### **Comentario final**

En resumen, nuestro trabajo demuestra que la presencia de células microgliales activadas ejerce efectos beneficiosos sobre la supervivencia celular en los explantes de retina de ratones de P10 cultivados *in vitro*. Por lo tanto, la inhibición de la activación microglial, que ha sido propuesta en algunos estudios como terapia para patologías degenerativas del SNC, podría tener efectos adversos en algunas situaciones, exacerbando los fenómenos degenerativos.



## **Referencias**

---



- Adamietz P. 1987. Poly(ADP-ribose) synthase is the major endogenous nonhistone acceptor for poly(ADP-ribose) in alkylated rat hepatoma cells. *Eur J Biochem* 169:365-372.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. 2007. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10:1538-1543
- Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA. 2006. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9685-9690.
- Albarracin R, Eells J, Valter K. 2011. Photobiomodulation protects the retina from light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:3582-3592.
- Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. 2004. The PARP superfamily. *Bioessays* 26:882-893.
- 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.
- Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. 2006. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18308-18313.
- Arroba AI, Alvarez-Lindo N, van Rooijen N, de la Rosa EJ. 2011. Microglia-mediated IGF-I neuroprotection in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52:9124-9130.
- Arroba AI, Wallace D, Mackey A, de la Rosa EJ, Cotter TG. 2009. IGF-I maintains calpastatin expression and attenuates apoptosis in several models of photoreceptor cell death. *Eur J Neurosci* 30:975-986.
- Ashwell K. 1991. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev Brain Res* 58:1-12.

- Baleriola J, Suarez T, de la Rosa EJ. 2010. DNA-PK promotes the survival of young neurons in the embryonic mouse retina. *Cell Death Differ* 17:1697-1706.
- Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. 2000. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 62:215-249.
- Bandyopadhyay M, Rohrer B. 2010. Photoreceptor structure and function is maintained in organotypic cultures of mouse retinas. *Mol Vis* 16:1178-1185.
- Baptiste DC, Hartwick AT, Jollimore CA, Baldrige WH, Seigel GM, Kelly ME. 2004. An investigation of the neuroprotective effects of tetracycline derivatives in experimental models of retinal cell death. *Mol Pharmacol* 66:1113-1122.
- Baptiste DC, Powell KJ, Jollimore CA, Hamilton C, LeVatte TL, Archibald ML, Chauhan BC, Robertson GS, Kelly ME. 2005. Effects of minocycline and tetracycline on retinal ganglion cell survival after axotomy. *Neuroscience* 134:575-582.
- Barde YA. 1989. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2:1525-1534.
- Bejarano-Escobar R, Blasco M, Martín-Partido G, Francisco-Morcillo J. 2012. Light-induced degeneration and microglial response in the retina of an epibenthonic pigmented teleost: age-dependent photoreceptor susceptibility to cell death. *J Exp Biol* 215:3799-3812.
- Bejarano-Escobar R, Holguín-Arévalo MS, Montero JA, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G. 2011. Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of cathepsins B and D. *Dev Dyn* 240:1841-1855.
- 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.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.

- Boche D, Perry VH, Nicoll JA. 2013. Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39:3-18.
- Bode JG, Ehltling C, Haussinger D. 2012. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal* 24:1185-1194.
- Bosco A, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, Hubbard WC, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML. 2008. Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1437-1446.
- Bosco A, Steele MR, Vetter ML. 2011. Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J Comp Neurol* 519:599-620.
- Bramall AN, Wright AF, Jacobson SG, McInnes RR (2010) The genomic, biochemical, and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. *Ann Rev Neurosci* 33: 441-472.
- 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, Wiedemann P. 2012. Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 227:1-19.
- Bronstein DM, Perez-Otano I, Sun V, Mullis Sawin SB, Chan J, Wu GC, Hudson PM, Kong LY, Hong JS, McMillian MK. 1995. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res* 704:112-116.
- Brown GC, Neher JJ. 2012. Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends Biochem Sci* 37:325-332.
- Bruban J, Maoui A, Chalour N, An N, Jonet L, Feumi C, Tréton J, Sennlaub F, Behar-Cohen F, Mascarelli F, Dinét V. 2011. CCR2/CCL2-mediated

- inflammation protects photoreceptor cells from amyloid- $\beta$ -induced apoptosis. *Neurobiol Dis* 42:55-72.
- Burbach GJ, Dehn D, Del Turco D, Deller T. 2003. Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR. *J Neurosci Methods* 131:83-91.
- Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B. 2011. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 472:319-324.
- Caffé AR, Ahuja P, Holmqvist B, Azadi S, Forsell J, Holmqvist I, Söderpalm AK, van Veen T. 2001. Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium. *J Chem Neuroanat* 22:263-273.
- Cameron B, Landreth GE. 2010. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37:503-509.
- Carmody RJ, Cotter TG. 2000. Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro. *Cell Death Differ* 7:282-291.
- Carrasco MC. 2012. Comportamiento de las células microgliales en cultivos organotípicos de retina en desarrollo. Tesis Doctoral, Universidad de Granada
- Carrasco MC, Navascués J, Cuadros MA, Calvente R, Martín-Oliva D, Santos AM, Sierra A, Ferrer-Martín RM, Marín-Teva JL. 2011. Migration and ramification of microglia in quail embryo retina organotypic cultures. *Dev Neurobiol* 71:296-315.
- Carter DA, Dick AD. 2003. Lipopolysaccharide/interferon-gamma and not transforming growth factor beta inhibits retinal microglial migration from retinal explant. *Br J Ophthalmol* 87:8481-8487.
- Cavaliere F, Matute C. 2011. Utility of organotypic slices in Parkinson's disease research. En: *Towards new therapies for Parkinson's disease*. Finkelstein DI (ed), DOI:10.5772/16902. <http://www.intechopen.com/books/towards-new->

- therapies-for-parkinson-s-disease/utility-of-organotypic-slices-in-parkinson-s-disease-research.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53:344-354.
- Chechneva O, Dinkel K, Cavaliere F, Martinez-Sanchez M, Reymann KG. 2006. Anti-inflammatory treatment in oxygen-glucose-deprived hippocampal slice cultures is neuroprotective and associated with reduced cell proliferation and intact neurogenesis. *Neurobiol Dis* 23:247-259.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A. 2002. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 10:27-39.
- Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. 2000. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 6:797-801.
- Chiang SK, Lam TT. 2000. Post-treatment at 12 or 18 hours with 3-aminobenzamide ameliorates retinal ischemia-reperfusion damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3210-3214.
- Chien H, Dix RD. 2012. Evidence for multiple cell death pathways during development of experimental cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression: apoptosis, necroptosis, and pyroptosis. *J Virol* 86:10961-10978.
- Choi Y, Kim HS, Shin KY, Kim EM, Kim M, Park CH, Jeong YH, Yoo J, Lee JP, Chang KA, Kim S, Suh YH. 2007. Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models. *Neuropsychopharmacology* 32:2393-2404.
- Colton CA. 2009. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:399-418.

- Cuadros MA, Coltey P, Carmen Nieto M, Martin C. 1992. Demonstration of a phagocytic cell system belonging to the hemopoietic lineage and originating from the yolk sac in the early avian embryo. *Development* 115:157-168
- 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, 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, Ríos A. 1988. Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. *Anat Embryol* 178:543-551.
- 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, Santos AM, Martín-Oliva D, Calvente R, Tassi M, Marín-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.
- Culmsee C, Plesnila N. 2006. Targeting Bid to prevent programmed cell death in neurons. *Biochem Soc Trans* 34:1334-1340.
- Cunningham C, Wilcockson DC, Champion S, Lunnon K, Perry VH. 2005. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* 25:9275-9284.

- Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC. 2013. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 33:4216-4233.
- Cusato K, Bosco A, Linden R, Reese BE. 2002. Cell death in the inner nuclear layer of the retina is modulated by BDNF. *Dev Brain Res* 139:325-330.
- Cusato K, Bosco A, Rozental R, Guimaraes CA, Reese BE, Linden R, Spray DC. 2003. Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina. *J Neurosci* 23:6413-6422.
- da Silva RP, Gordon S. 1999. Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. *Biochem J* 338:687-694.
- 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.
- Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J, Page G. 2007. Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1128:40-49.
- 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.
- Davies MH, Eubanks JP, Powers MR. 2006. Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol Vis* 12:467-477.
- Davoust N, Vuillat C, Androdias G, Nataf S. 2008. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* 29:227-234.
- Dawson VL, Dawson TM. 2004. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 36:287-294.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. 2005. Chemical inhibitor of

- nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 1:112-119.
- Del Río Hortega P. 1932. Microglia. En: *Cytology and Cellular pathology of the nervous system*, vol 2. Penfield, W (ed). Hoeber , New York: pp. 483-534.
- Dickson DW, Mattiace LA. 1989. Astrocytes and microglia in human brain share an epitope recognized by a B-lymphocyte-specific monoclonal antibody (LN-1). *Am J Pathol* 135:135-147.
- Diguet E, Fernagut PO, Wei X, Du Y, Rouland R, Gross C, Bezard E, Tison F. 2004. Deleterious effects of minocycline in animal models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 19:3266-3276.
- Dirscherl K, Karlstetter M, Ebert S, Kraus D, Hlawatsch J, Walczak Y, Moehle C, Fuchshofer R, Langmann T. 2010. Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *J Neuroinflammation* 7:3.
- Donovan M, Carmody RJ, Cotter TG. 2001. Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J Biol Chem* 276:23000-23008.
- Donovan M, Cotter TG. 2002. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death Differ* 9:1220-1231.
- Donovan M, Doonan F, Cotter TG. 2006. Decreased expression of pro-apoptotic Bcl-2 family members during retinal development and differential sensitivity to cell death. *Dev Biol* 291:154-169.
- Doonan F, Donovan M, Cotter TG. 2003. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration. *J Neurosci* 23:5723-5731.
- Drel VR, Xu W, Zhang J, Kador PF, Ali TK, Shin J, Julius U, Slusher B, El-Remessy AB, Obrosova IG. 2009. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition

- counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:1778-1790.
- Drescher KM, Whittum-Hudson JA. 1996. Herpes simplex virus type 1 alters transcript levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:2302-2312.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.
- Ebert S, Weigelt K, Walczak Y, Drobnik W, Mauerer R, Hume DA, Weber BH, Langmann T. 2009. Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration. *J Neurochem* 110:1863-1875.
- Ehinger B, Zucker CL, Bruun A, Adolph A. 1994. In vivo staining of oligodendroglia in the rabbit retina. *Glia* 10:40-48.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.
- Engelsberg K, Ehinger B, Wassélius J, Johansson K. 2004. Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 42:229-239.
- Fadool DA, Tucker K, Pedarzani P. 2011. Mitral cells of the olfactory bulb perform metabolic sensing and are disrupted by obesity at the level of the Kv1.3 ion channel. *PLoS One* 6:e24921.
- Fedoroff S, Zhai R, Novak JP. 1997. Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50:477-486.
- Fischer F, Martin G, Agostini HT. 2011. Activation of retinal microglia rather than microglial cell density correlates with retinal neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J Neuroinflammation* 8:120.
- Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT. 2011. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6:e15973.

- Frade JM, Bovolenta P, Martínez-Morales JR, Arribas A, Barbas JA, Rodríguez-Tebar A. 1997. Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development* 124:3313-3320.
- Frade JM, Bovolenta P, Rodríguez-Tebar A. 1999. Neurotrophins and other growth factors in the generation of retinal neurons. *Microsc Res Tech* 45:243-251.
- Freshney RI. 1994. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Wiley-Liss, New York.
- Fricker M, Vilalta A, Tolkovsky AM, Brown GC. 2013. Caspase inhibitors protect neurons by enabling selective necroptosis of inflamed microglia. *J Biol Chem* (publicación electrónica previa a la impresión).
- Fruttiger M. 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10:77-88.
- Gahwiler BH. 1981. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 4:329-342.
- Galea I, Palin K, Newman TA, Van Rooijen N, Perry VH, Boche D. 2005. Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia* 49:375-384.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19:107-120.
- Gao L, Macklin W, Gerson J, Miller RH. 2006. Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Dev Biol* 290:277-286.

- Garcia-Valenzuela E, Sharma SC. 1999. Laminar restriction of retinal macrophagic response to optic nerve axotomy in the rat. *J Neurobiol* 40:55-66.
- Garden GA, Möller T. 2006. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 1:127-137.
- Gariano RF. 2003. Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog Retin Eye Res* 22:295-306
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.
- 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.
- Giuliani F, Hader W, Yong VW. 2005. Minocycline attenuates T cell and microglia activity to impair cytokine production in T cell-microglia interaction. *J Leukoc Biol* 78:135-143.
- Gomez Perdiguero E, Schulz C, Geissmann F. 2013. Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. *Glia* 61:112-120.
- 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.
- Graeber MB, Streit WJ. 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89-105.
- Grimpe B, Dong S, Doller C, Temple K, Malouf AT, Silver J. 2002. The critical role of basement membrane-independent laminin gamma 1 chain during axon regeneration in the CNS. *J Neurosci* 22:3144-3160.

- Guimaraes CA, Benchimol M, Amarante-Mendes GP, Linden R. 2003. Alternative programs of cell death in developing retinal tissue. *J Biol Chem* 278:41938-41946.
- Guo C, Otani A, Oishi A, Kojima H, Makiyama Y, Nakagawa S, Yoshimura N. 2012. Knockout of *ccr2* alleviates photoreceptor cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res* 104:39-47.
- 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.
- Hamburger V. 1980. Trophic interactions in neurogenesis: a personal historical account. *Annu Rev Neurosci* 3:269-278.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Hao C, Richardson A, Fedoroff S. 1991. Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int J Dev Neurosci* 9:1-14.
- Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K. 2002. Microglia-Müller 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.
- Hassa PO, Hottiger MO. 1999. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* 380:953-959.
- Hernández M, Rivas ME, Vecino E. 2009. Análisis inmunohistoquímico de explantes de retina de mamíferos. Libro de Resúmenes, XIII Congreso Sociedad Española de Neurociencia, p. 112.
- Hisatomi T, Sakamoto T, Goto Y, Yamanaka I, Oshima Y, Hata Y, Ishibashi T, Inomata H, Susin SA, Kroemer G. 2002. Critical role of photoreceptor

- apoptosis in functional damage after retinal detachment. *Curr Eye Res* 24:161-172.
- 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.
- Hollborn M, Francke M, Iandiev I, Buhner E, Foja C, Kohen L, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A, Uhlmann S. 2008. Early activation of inflammation- and immune response-related genes after experimental detachment of the porcine retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1262-1273.
- Hollborn M, Wiedemann P, Bringmann A, Kohen L. 2010. Chemotactic and cytotoxic effects of minocycline on human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2721-2729.
- Hughes EH, Schlichtenbrede FC, Murphy CC, Broderick C, van Rooijen N, Ali RR, Dick AD. 2004. Minocycline delays photoreceptor death in the rds mouse through a microglia-independent mechanism. *Exp Eye Res* 78:1077-1084.
- 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.
- Igarashi T, Miyake K, Hayakawa J, Kawabata K, Ishizaki M, Takahashi H, Shimada T. 2007. Apoptotic cell death and regeneration in the newborn retina after irradiation prior to bone marrow transplantation. *Curr Eye Res* 32:543-553.
- Jackson AC, Scott CA, Owen J, Weli SC, Rossiter JP. 2007. Therapy with minocycline aggravates experimental rabies in mice. *J Virol* 81:6248-6253.
- Jiang X, Ni Y, Liu T, Zhang M, Ren H, Xu G. 2013. Inhibition of LPS-induced retinal microglia activation by naloxone does not prevent photoreceptor death. *Inflammation* 36:42-52.

- Johansson K, Ehinger B. 2005. Structural changes in the developing retina maintained in vitro. *Vision Res* 45:3235-3243.
- 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.
- Joly S, Francke M, Ulbricht E, Beck S, Seeliger M, Hirrlinger P, Hirrlinger J, Lang KS, Zinkernagel M, Odermatt B, Samardzija M, Reichenbach A, Grimm C, Remé CE. 2009. Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions. *Am J Pathol* 174:2310-2323.
- Jones KH, Senft JA. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 33:77-79.
- Jung S, Schwartz M. 2012. Non-identical twins - microglia and monocyte-derived macrophages in acute injury and autoimmune inflammation. *Front Immunol* 3:89.
- Kaempf S, Walter P, Salz AK, Thumann G. 2008. Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium. *J Neurosci Methods* 173:47-58.
- Karlstetter M, Ebert S, Langmann T. 2010. Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology* 215:685-691.
- Katayama T, Kobayashi H, Okamura T, Yamasaki-Katayama Y, Kibayashi T, Kimura H, Ohsawa K, Kohsaka S, Minami M. 2012. Accumulating microglia phagocytose injured neurons in hippocampal slice cultures: involvement of p38 MAP kinase. *PLoS One* 7:e40813.
- Kauppinen TM, Suh SW, Higashi Y, Berman AE, Escartin C, Won SJ, Wang C, Cho SH, Gan L, Swanson RA. 2011. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 modulates microglial responses to amyloid beta. *J Neuroinflammation* 8:152.

- Kauppinen TM, Swanson RA. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 promotes microglial activation, proliferation, and matrix metalloproteinase-9-mediated neuron death. *J Immunol* 174:2288-2296.
- Kauppinen TM, Swanson RA. 2007. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* 145:1267-1272.
- 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.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77:10-18.
- Kikuchi K, Kawahara K, Biswas KK, Ito T, Tanchaen S, Morimoto Y, Matsuda F, Oyama Y, Takenouchi K, Miura N, Arimura N, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Arimura S, Iwata M, Mera K, Sameshima H, Ohno Y, Maenosono R, Yoshida Y, Tajima Y, Uchikado H, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Hashiguchi T, Maruyama I. 2009. Minocycline attenuates both OGD-induced HMGB1 release and HMGB1-induced cell death in ischemic neuronal injury in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 385:132-136.
- Kim HS, Suh YH. 2009. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res* 196:168-179.
- Kitamura T, Miyake T, Fujita S. 1984. Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 226:421-433
- Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. 2009. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. *PLoS One* 4:e7467.
- Koizumi A, Zeck G, Ben Y, Masland RH, Jakobs TC. 2007. Organotypic culture of physiologically functional adult mammalian retinas. *PLoS One* 2:e221.

- Kozlowski C, Weimer RM. 2012. An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. *PLoS One* 7:e31814.
- Kranz K, Paquet-Durand F, Weiler R, Janssen-Bienhold U, Dedek K. 2013. Testing for a gap junction-mediated bystander effect in retinitis pigmentosa: secondary cone death is not altered by deletion of connexin36 from cones. *PLoS One* 8:e57163.
- Krebs MP, White DA, Kaushal S. 2009. Biphasic photoreceptor degeneration induced by light in a T17M rhodopsin mouse model of cone bystander damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:2956-2965.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kroemer G, Martin SJ. 2005. Caspase-independent cell death. *Nat Med* 11:725-730.
- Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. 2012. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 31:377-406.
- Kurz H, Christ B. 1998. Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 22:98-102.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Rev* 48:196-206
- Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27:2596-2605.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS, Wirenfeldt M, Nielsen M, Dagnaes-Hansen F, Bluethmann H, Færgeman NJ, Meldgaard M, Deierborg T, Finsen B. 2009. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci* 29:1319-1330.

- Langmann T. 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81:1345-1351.
- 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.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405-415.
- Layer PG, Robitzki A, Rothermel A, Willbold E. 2002. Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci* 25:131-134.
- Lein PJ, Barnhart CD, Pessah IN. 2011. Acute hippocampal slice preparation and hippocampal slice cultures. *Methods Mol Biol* 758:115-134.
- Leist M, Nicotera P. 1997. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 236:1-9.
- Leung DW, Lindlief LA, Laabich A, Vissvesvaran GP, Kamat M, Lieu KL, Fawzi A, Kubota R. 2007. Minocycline protects photoreceptors from light and oxidative stress in primary bovine retinal cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:412-421.
- Levi-Montalcini R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.
- Li GY, Osborne NN. 2008. Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose)polymerase and apoptosis-inducing factor. *Brain Res* 1188:35-43.
- 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.
- Liljekvist-Soltic I, Olofsson J, Johansson K. 2008. Progenitor cell-derived factors enhance photoreceptor survival in rat retinal explants. *Brain Res* 1227:226-233.

- Linden R, Rehen SK; Chiarini, LB. 1999. Apoptosis in developing retinal tissue. *Prog Retin Eye Res* 18:133-165.
- Linden R. 2006. Tissue biology of programmed cell death in the developing retina. En: *Apoptosis in the Retina*. Torriglia A, Crisanti-Lassiaz P (eds.), Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 13-41.
- Ling EA, Wong WC. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18.
- Liu JP, Chang LR, Gao XL, Wu Y. 2008. Different expression of caspase-3 in rat hippocampal subregions during postnatal development. *Microsc Res Tech* 71:633-638.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25:402-408.
- Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A. 2009. Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 88:221-245.
- Lund S, Christensen KV, Hedtjarn M, Mortensen AL, Hagberg H, Falsig J, Hasseldam H, Schratzenholz A, Porzgen P, Leist M. 2006. The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *J Neuroimmunol* 180:71-87.
- Mack AF. 2007. Evidence for a columnar organization of cones, Muller cells, and neurons in the retina of a cichlid fish. *Neuroscience* 144:1004-1014.
- Madden SD, Donovan M, Cotter TG. 2007. Key apoptosis regulating proteins are down-regulated during postnatal tissue development. *Int J Dev Biol* 51:415-423.
- 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, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J. 1999a. Proliferation of actively migrating amoeboid microglia in the developing quail retina. *Anat Embryol* 200:289-300.

- 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, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J. 1999c. 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, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J. 2011. Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 7:25-40.
- 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.
- Martín-Oliva D, Ferrer-Martín RM, Santos AM, Carrasco MC, Sierra A, Marín-Teva JL, Calvente R, Navascués J, Cuadros MA. 2011. Simultaneous cell death and upregulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 expression in early postnatal mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:7445-7454.
- Martín-Partido G, Rodríguez-Gallardo L, Alvarez IS, Navascués J. 1988. Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye. *Anat Rec* 222: 272-281.
- Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, Xu L, Maki M, Yu G, Kaneko Y, Ojika K, Hess DC, Borlongan CV. 2009. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. *BMC Neurosci* 10:126.
- McKernan DP, Caplis C, Donovan M, O'Brien CJ, Cotter TG. 2006. Age-dependent susceptibility of the retinal ganglion cell layer to cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:807-814.
- McManus JP, Buchan AM. 2000. Apoptosis after experimental stroke: fact or fashion? *J Neurotrauma* 17:899-914.
- Meller K, Tetzlaff W. 1976. Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina. *Cell Tissue Res* 170:145-159.

- Menissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Amé JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G. 2003. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J* 22:2255-2263.
- 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.
- Meyer. 1977. The avian eye and its adaptations. En: *The visual system in vertebrates*. Crescitelli F (ed). Springer-Verlag, Berlin, pp 549-611.
- Mildner A, Schlevogt B, Kierdorf K, Böttcher C, Erny D, Kummer MP, Quinn M, Brück W, Bechmann I, Heneka MT, Priller J, Prinz M. 2011. Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:11159-11171
- 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.
- Mohlin C, Johansson K. 2011. Death of photoreceptors in organotypic retinal explant cultures: implication of rhodopsin accumulation and endoplasmic reticulum stress. *J Neurosci Methods* 197:56-64.
- 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.
- Montero M, González B, Zimmer J. 2009. Immunotoxic depletion of microglia in mouse hippocampal slice cultures enhances ischemia-like neurodegeneration. *Brain Res* 1291:140-152.
- Montero-Domínguez M, González B, Zimmer J. 2009. Neuroprotective effects of the anti-inflammatory compound triflusal on ischemia-like neurodegeneration in mouse hippocampal slice cultures occur independent of microglia. *Exp Neurol* 218:11-23.

- Mosher KI, Andres RH, Fukuhara T, Bieri G, Hasegawa-Moriyama M, He Y, Guzman R, Wyss-Coray T. 2012. Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nat Neurosci* 15:1485-1487.
- Moshiri A, Reh TA. 2004. Persistent progenitors at the retinal margin of *ptc*<sup>+/-</sup> mice. *J Neurosci* 24:229-237.
- Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, Bouharrou A, Greer PA, Menissier de Murcia J, Susin SA. 2007. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol* 27:4844-4862.
- Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux DL. 2013. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis* 4:e465.
- Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Skondra D, Miyahara S, Sobrin L, Thomas KL, Chen DF, Grosskreutz CL, Hafezi-Moghadam A, Miller JW. 2006. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis* 12:867-878.
- Narantuya D, Nagai A, Sheikh AM, Masuda J, Kobayashi S, Yamaguchi S, Kim SU. 2010. Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One* 5:e11746.
- Navascués J, Cuadros MA, Almendros A. 1996. Development of Microglia: Evidence from Studies in the Avian Central Nervous System. En: *Topical Issue in Microglia Research*. Ling EA, Tan CK y Tan CBC (eds). Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp 43-64.
- 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*. Streit W.J. (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.
- 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.
- Neher JJ, Neniskyte U, Brown GC. 2012. Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration. *Front Pharmacol* 3:27.
- Neher JJ, Neniskyte U, Zhao JW, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC. 2011. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *J Immunol* 186:4973-4983.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288-295.
- Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K. 2006. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J* 20:714-716.
- Newman E, Reichenbach A. 1996. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307-312.
- Ni YQ, Xu GZ, Hu WZ, Shi L, Qin YW, Da CD. 2008. Neuroprotective effects of naloxone against light-induced photoreceptor degeneration through inhibiting retinal microglial activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2589-2598.
- Nikodemova M, Duncan ID, Watters JJ. 2006. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J Neurochem* 96:314-323.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- O'Driscoll C, Donovan M, Cotter TG. 2006. Analysis of apoptotic and survival mediators in the early post-natal and mature retina. *Exp Eye Res* 83:1482-1492.

- Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM, Fleming TT. 1999. A reliable method for organ culture of neonatal mouse retina with long-term survival. *J Neurosci Methods* 87:57-65.
- Ogilvie JM, Speck JD. 2002. Dopamine has a critical role in photoreceptor degeneration in the rd mouse. *Neurobiol Dis* 10:33-40.
- Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW. 2011. Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:108-118.
- Oliver FJ, Ménissier de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. 1999. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 18:4446-4454.
- 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.
- Oppenheim RW. 1989. The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* 12:252-255.
- Organisciak DT, Vaughan DN. 2010. Retinal light damage: mechanism and protection. *Prog Ret Eye Res* 29:113-134.
- Osborne NN, Li GY, Ji D, Mortiboys HJ, Jackson S. 2008. Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies. *J Neurochem* 105:2013-2028.
- Ossola B, Lantto TA, Puttonen KA, Tuominen RK, Raasmaja A, Mannisto PT. 2012. Minocycline protects SH-SY5Y cells from 6-hydroxydopamine by inhibiting both caspase-dependent and -independent programmed cell death. *J Neurosci Res* 90:682-690.
- Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K. 2005. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J* 24:1375-1386.

- Pacini A, Quattrone A, Denegri M, Fiorillo C, Nediani C, Ramon y Cajal S, Nassi P. 1999. Transcriptional down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase gene expression by E1A binding to pRb proteins protects murine keratinocytes from radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274:35107-35112.
- 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.
- Paquet-Durand F, Silva J, Talukdar T, Johnson LE, Azadi S, van Veen T, Ueffing M, Hauck SM, Ekström PA. 2007. Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse. *J Neurosci* 27:10311-10319.
- Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos AJ. 2001. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2:389-396.
- Péquignot MO, Provost AC, Sallé S, Taupin P, Sainton KM, Marchant D, Martinou JC, Ameisen JC, Jais JP, Abitbol M. 2003. Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Dev Dyn* 228:231-238.
- Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. 2011. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation* 8:174.
- Perry VH, Cowey A. 1982. A sensitive period for ganglion cell degeneration and the formation of aberrant retino-fugal connections following tectal lesions in rats. *Neuroscience* 7:583-594.
- Pinzón-Duarte G, Arango-González B, Guenther E, Kohler K. 2004. Effects of brain-derived neurotrophic factor on cell survival, differentiation and patterning of neuronal connections and Müller glia cells in the developing retina. *Eur J Neurosci*. 19:1475-1484.

- Pinzón-Duarte G, Kohler K, Arango-González B, Guenther E. 2000. Cell differentiation, synaptogenesis, and influence of the retinal pigment epithelium in a rat neonatal organotypic retina culture. *Vision Res* 40:3455-3465.
- Potter EG, Cheng Y, Natale JE. 2009. Deleterious effects of minocycline after in vivo target deprivation of thalamocortical neurons in the immature, metallothionein-deficient mouse brain. *J Neurosci Res* 87:1356-1368.
- 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.
- Provis JM. 2001. Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 20:799-821.
- Purisai MG, McCormack AL, Cumine S, Li J, Isla MZ, Di Monte DA. 2007. Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Neurobiol Dis* 25:392-400.
- Raffray M, Cohen GM. 1997. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol Ther* 75:153-177.
- 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 Rev* 30:77-105.
- Rambani K, Vukasinovic J, Glezer A, Potter SM. 2009. Culturing thick brain slices: an interstitial 3D microperfusion system for enhanced viability. *J Neurosci Methods* 180:243-254.
- Ransohoff RM, Brown MA. 2012. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 122:1164-1171

- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Raymond SM, Jackson IJ. 1995. The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina. *Curr Biol* 5:1286-1295.
- 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.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.
- 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.
- Rezaie P, Male D. 1999. Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc Res Tech* 45:359-382.
- 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-Corronc 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.
- Ripps H. 2002. Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Exp Eye Res* 74:327-336.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245:154-160.
- Rivest S. 2003. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* 17:13-19.
- Roh M, Zhang Y, Murakami Y, Thanos A, Lee SC, Vavvas DG, Benowitz LI, Miller JW. 2012. Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma. *PLoS One* 7:e40065.

- Rompani SB, Cepko CL. 2010. A common progenitor for retinal astrocytes and oligodendrocytes. *J Neurosci* 30:4970-4980.
- Roque RS, Imperial CJ, Caldwell RB. 1996. Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:196-203.
- Roque RS, Rosales AA, Jingjing L, Agarwal N, Al-Ubaidi MR. 1999. Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Res* 836:110-119.
- Rosenbaum DM, Degtrev A, David J, Rosenbaum PS, Roth S, Grotta JC, Cuny GD, Yuan J, Savitz SI. 2010. Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model. *J Neurosci Res* 88:1569-1576.
- Ruscetti T, Lehnert BE, Halbrook J, Le Trong H, Hoekstra MF, Chen DJ, Peterson SR. 1998. Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 273:14461-14467.
- Rutar M, Natoli R, Provis JM. 2012. Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in Muller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration. *J Neuroinflammation* 9:221.
- 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:e15846.
- Ryu JK, Franciosi S, Sattayaprasert P, Kim SU, McLarnon JG. 2004. Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus. *Glia* 48:85-90.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861-2874.
- Sahaboglu A, Tanimoto N, Kaur J, Sancho-Pelluz J, Huber G, Fahl E, Arango-Gonzalez B, Zrenner E, Ekstrom P, Lowenheim H, Seeliger M, Paquet-

- Durand F. 2010. PARP1 gene knock-out increases resistance to retinal degeneration without affecting retinal function. *PloS One* 5:e15495
- 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, Marín-Teva JL, Navascués J. 2004. Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia* 46:261-273.
- Sánchez-López AM, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J. 2005. Activation of immature microglia in response to stab wound in embryonic quail retina. *J Comp Neurol* 492:20-33.
- Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ van Veen T, Zrenner E, Ekstrom P, Paquet-Durand F. 2008. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Molecular Neurobiology* 38:253-269.
- Santos AM. 2008. Desarrollo de la microglía y respuesta a la fotodegeneración inducida por luz intensa en la retina de ratón. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- 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.
- 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.
- Sasahara M, Otani A, Oishi A, Kojima H, Yodoi Y, Kameda T, Nakamura H, Yoshimura N. 2008. Activation of bone marrow-derived microglia promotes

- photoreceptor survival in inherited retinal degeneration. *Am J Pathol* 172:1693-1703.
- Schlegelmilch T, Henke K, Peri F. 2011. Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 21:5-10.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123:513-522.
- Schnitzer J. 1987. Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci Lett* 78:29-34.
- Schnitzer J. 1988. Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Brain Res Dev Brain Res* 44:59-72.
- Schnitzer J. 1989. Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol* 282:249-263.
- Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dörries R, Butcher GW, ter Meulen V. 1991. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7438-7442.
- Shapiro LA, Perez ZD, Foresti ML, Arisi GM, Ribak CE. 2009. Morphological and ultrastructural features of Iba1-immunolabeled microglial cells in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res* 1266:29-36.
- Shen A, Zhou D, Shen Q, Liu HO, Sun L, Liu Y, Chen J, Yang J, Ji Y, Cheng C. 2009. The expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by the intrathecal injection of lipopolysaccharide in the rat spinal cord. *Neurochem Res* 34:333-341.
- Shen D, Cao X, Zhao L, Tuo J, Wong WT, Chan CC. 2011. Naloxone ameliorates retinal lesions in Ccl2/Cx3cr1 double-deficient mice via modulation of microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:2897-2904.

- Shin WH, Lee DY, Park KW, Kim SU, Yang MS, Joe EH, Jin BK. 2004. Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo. *Glia* 46:142-152.
- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. 1999. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:119-130.
- Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. 2013. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* 7:6.
- 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.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares AH, Smulson ME. 1998. Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J Biol Chem* 273:13703-13712.
- Slepko N, Levi G. 1996. Progressive activation of adult microglial cells in vitro. *Glia* 16:241-246.
- Smith CC, Yellon DM. 2011. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *J Cell Mol Med* 15:1797-1806.
- Söderpalm AK, Fox DA, Karlsson JO, van Veen T. 2000. Retinoic acid produces rod photoreceptor selective apoptosis in developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:937-947.
- Söderpalm AK, Karlsson J, Caffé AR, vanVeen T. 1999. 9-cis-retinoic acid in combination with retinal pigment epithelium induces apoptosis in cultured retinal explants only during early postnatal development. *Dev Brain Res* 118:169-176.
- Sokolowski JD, Mandell JW. 2011. Phagocytic clearance in neurodegeneration. *Am J Pathol* 178:1416-1428.

- Soulet D, Rivest S. 2008. Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol* 8:508-518.
- Spalding KL, Dharmarajan AM, Harvey AR. 2005. Caspase-independent retinal ganglion cell death after target ablation in the neonatal rat. *Eur J Neurosci* 21:33-45.
- Srinivasan B, Roque CH, Hempstead BL, Al-Ubaidi MR, Roque RS. 2004. Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 279:41839-41845.
- Sriram K, Miller DB, O'Callaghan JP. 2006. Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. *J Neurochem* 96:706-718.
- Stankovski L, Alvarez C, Ouimet T, Vitalis T, El-Hachimi KH, Price D, Deneris E, Gaspar P, Cases O. 2007. Developmental cell death is enhanced in the cerebral cortex of mice lacking the brain vesicular monoamine transporter. *J Neurosci* 27:1315-1324.
- Stone J, Dreher Z. 1987. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255:35-49.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845-881.
- Streit WJ, Xue QS. 2009. Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:371-379.
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. 2004. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 24:1-7.
- Swaroop A, Kim D, Forrest D. 2010. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 11:563-576.

- 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.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. 2001. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 21:2580-2588.
- Tremblay ME. 2011. The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies. *Neuron Glia Biol* 7:67-76.
- Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8:e1000527.
- Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. 2011. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31:16064-16069.
- Tura A, Schuettauf F, Monnier PP, Bartz-Schmidt KU, Henke-Fahle S. 2009. Efficacy of Rho-kinase inhibition in promoting cell survival and reducing reactive gliosis in the rodent retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:452-461.
- Uehara N, Miki K, Tsukamoto R, Matsuoka Y, Tsubura A. 2006. Nicotinamide blocks N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in rats through poly (ADP-ribose) polymerase activity and Jun N-terminal kinase/activator protein-1 pathway inhibition. *Exp Eye Res* 82:488-495.
- Ullrich O, Diestel A, Eyupoglu IY, Nitsch R. 2001. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat Cell Biol* 3:1035-1042.
- van Rooijen N, Sanders A. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174:83-93.
- van Rooijen N, Sanders A. 1997. Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? *J Leukoc Biol* 62:702-709.
- van Rooijen N. 1989. The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* 124:1-6.

- van Wijk SJ, Hageman GJ. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 39:81-90.
- Vecino E, Hernandez M, Garcia M. 2004. Cell death in the developing vertebrate retina. *Int J Dev Biol* 48:965-974.
- Vela JM, Dalmau I, Gonzalez B, Castellano B. 1995. Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 361:602-616.
- Velasco M, Díaz-Guerra MJ, Martín-Sanz P, Alvarez A, Boscá L. 1997. Rapid up-regulation of I $\kappa$ B $\beta$  and abrogation of NF- $\kappa$ B activity in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 272:23025-23030.
- Vinet J, van Weering HR, Heinrich A, Kälin RE, Wegner A, Brouwer N, Heppner FL, van Rooijen N, Boddeke HW, Biber K. 2012. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J Neuroinflammation* 9:27.
- Virag L. 2005. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 3:209-214.
- Vosler PS, Sun D, Wang S, Gao Y, Kintner DB, Signore AP, Cao G, Chen J. 2009. Calcium dysregulation induces apoptosis-inducing factor release: cross-talk between PARP-1- and calpain-signaling pathways. *Exp Neurol* 218:213-220.
- 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.
- Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. 2008. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 28:8138-8143.
- Walker PA, Bedi SS, Shah SK, Jimenez F, Xue H, Hamilton JA, Smith P, Thomas CP, Mays RW, Pati S, Cox CSJr. 2012. Intravenous multipotent adult

- progenitor cell therapy after traumatic brain injury: modulation of the resident microglia population. *J Neuroinflammation* 9:228.
- Wang AL, Yu AC, Lau LT, Lee C, Wu le M, Zhu X, Tso MO. 2005. Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. *Neurochem Int* 47:152-158.
- 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.
- Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. 2004. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* 24:10963-10973.
- Wang M, Ma W, Zhao L, Fariss RN, Wong WT. 2011. Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *J Neuroinflammation* 8:173.
- Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. 2009. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* 218:193-202.
- Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, Svoboda KK, Goldsmith EC, Heiskanen KM, Nieminen AL. 2002. The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microsc Microanal* 8:375-391.
- Weise J, Isenmann S, Bahr M. 2001. Increased expression and activation of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) contribute to retinal ganglion cell death following rat optic nerve transection. *Cell Death Differ* 8:801-807.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:134-138.
- Wohl SG, Schmeer CW, Friese T, Witte OW, Isenmann S. 2011. In situ dividing and phagocytosing retinal microglia express nestin, vimentin, and NG2 in vivo. *PLoS One* 6:e22408.

- Wohl SG, Schmeer CW, Witte OW, Isenmann S. 2010. Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2686-2696.
- Won MH, Kang TC, Cho SS. 2000. Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microsc Res Tech* 50:151-160.
- Wu W, Liu P, Li J. 2012. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 82:249-258.
- Xing B, Xin T, Zhao L, Hunter RL, Chen Y, Bing G. 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects midbrain dopaminergic neurons against lipopolysaccharide neurotoxicity. *J Neuroimmunol* 225:43-51.
- Xu B, Chiu J, Feng B, Chen S, Chakrabarti S. 2008. PARP activation and the alteration of vasoactive factors and extracellular matrix protein in retina and kidney in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 24:404-412.
- Yakovlev AG, Ota K, Wang G, Movsesyan V, Bao WL, Yoshihara K, Faden AI. 2001. Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J Neurosci* 21:7439-7446.
- Yamato S, Hirabayashi Y, Sugihara H. 1984. An improved procedure for the histochemical demonstration of cathepsin D by the mercury-labeled pepstatin method. *Stain Technol* 59:113-120.
- Yang L, Sugama S, Chirichigno JW, Gregorio J, Lorenzl S, Shin DH, Browne SE, Shimizu Y, Joh TH, Beal MF, Albers DS. 2003. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 74:278-285.
- Yang LP, Li Y, Zhu XA, Tso MO. 2007a. Minocycline delayed photoreceptor death in rds mice through iNOS-dependent mechanism. *Mol Vis* 13:1073-1082.
- Yang LP, Zhu XA, Tso MO. 2007b. A possible mechanism of microglia-photoreceptor crosstalk. *Mol Vis* 13:2048-2057.

- Yang LP, Zhu XA, Tso MO. 2007c. Minocycline and sulforaphane inhibited lipopolysaccharide-mediated retinal microglial activation. *Mol Vis* 13:1083-1093.
- Young RW. 1984. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 229:362-373.
- Young RW. 1985a. Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212:199-205.
- Young RW. 1985b. Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res* 353:229-239.
- Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. 2006. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18314-18319.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297:259-263.
- Yuan J, Kroemer G. 2010. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 24:2592-2602.
- Zeiss CJ, Johnson EA. 2004. Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:971-976.
- Zeiss CJ, Neal J, Johnson EA. 2004. Caspase-3 in postnatal retinal development and degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:964-970.
- Zemke D, Majid A. 2004. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease. *Clin Neuropharmacol* 27:293-298.
- 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, Lei B, Lam TT, Yang F, Sinha D, Tso MO. 2004. Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2753-2759.
- Zhang C, Rosenbaum DM, Shaikh AR, Li Q, Rosenbaum PS, Pelham DJ, Roth S. 2002. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3059-3066.
- 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.
- Zhang C, Tso MO. 2003. Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy. *J Neurosci Res* 73:840-845.
- Zhang M, Marshall B, Atherton SS. 2008. Murine cytomegalovirus infection and apoptosis in organotypic retinal cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:295-303.
- Zhang X, Nadler JV. 2009. Postsynaptic response to stimulation of the Schaffer collaterals with properties similar to those of synaptosomal aspartate release. *Brain Res* 1295:13-20.
- Zhao L, Ma W, Fariss RN, Wong WT. 2011. Minocycline attenuates photoreceptor degeneration in a mouse model of subretinal hemorrhage microglial: inhibition as a potential therapeutic strategy. *Am J Pathol* 179:1265-1277.
- Zheng Z, Chen H, Wang H, Ke B, Zheng B, Li Q, Li P, Su L, Gu Q, Xu X. 2010. Improvement of retinal vascular injury in diabetic rats by statins is associated with the inhibition of mitochondrial reactive oxygen species pathway mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *Diabetes* 59:2315-2325.
- Zhou WT, Ni YQ, Jin ZB, Zhang M, Wu JH, Zhu Y, Xu GZ, Gan DK. 2012. Electrical stimulation ameliorates light-induced photoreceptor degeneration in vitro via suppressing the proinflammatory effect of microglia and

enhancing the neurotrophic potential of Muller cells. *Exp Neurol* 238:192-208.

Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M, Sarang S, Liu AS, Hartley DM, Wu DC, Gullans S, Ferrante RJ, Przedborski S, Kristal BS, Friedlander RM. 2002. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417:74-78.

# **Conclusiones**

---



**Primera.** La expresión de la proteína PARP-1 y la actividad de la misma se incrementan durante la primera semana de desarrollo postnatal de la retina de ratón, coincidiendo con la existencia de niveles elevados de muerte celular, y disminuyen durante la segunda semana postnatal, cuando la muerte celular también disminuye.

**Segunda.** La forma truncada del factor inductor de apoptosis (AIF), que participa específicamente en la muerte celular independiente de caspasas, está presente en la retina durante la primera semana postnatal y disminuye progresivamente durante la segunda semana postnatal. Algunas células retinianas en proceso de muerte muestran una localización nuclear de AIF y del polímero poli-ADP-ribosa, sugiriendo que la muerte de estas células depende de la actividad de PARP-1 y de la traslocación de AIF al núcleo celular.

**Tercera.** La edad es un factor que influye en la conservación estructural de explantes de retina cultivados *in vitro* durante 10 días. Así, los explantes obtenidos durante la segunda semana postnatal mantienen una mayor estabilidad estructural a tiempos prolongados de cultivo que los explantes aislados de retinas adultas o de retinas de la primera semana postnatal.

**Cuarta.** Los patrones de viabilidad y muerte celular en los explantes de retina a diferentes tiempos de cultivo *in vitro* muestran una estrecha relación con la edad. La tasa de viabilidad celular es más elevada en los explantes de retinas postnatales que en los de retina adulta, coincidiendo con una menor intensidad de muerte celular en los primeros.

**Quinta.** La proporción de células microgliales presentes en los explantes de retina no cultivados se incrementa con la edad de la misma, desde un 5% en la primera semana postnatal hasta un 17,5% en la edad adulta. En los explantes cultivados *in vitro*, dicha proporción muestra fluctuaciones durante el tiempo de cultivo, pero

siempre es menor a los 10 días de cultivo que al comienzo del mismo, independientemente de la edad de la retina, sugiriendo la muerte de algunas células microgliales en el transcurso del cultivo.

**Sexta.** Las células microgliales de los explantes de retina cultivados *in vitro* sufren una intensa activación, que es puesta de manifiesto por los cambios en su morfología y su desplazamiento hacia las capas nucleares de la retina.

**Séptima.** La tasa de inmunomarcado de la microglía con anti-CD68 disminuye con la edad de la retina, manteniendo unos valores específicos de la edad a diferentes tiempos de cultivo *in vitro*, a pesar de que la activación microglial se manifiesta durante el cultivo de los explantes de retina independientemente de su edad. Por lo tanto, el marcado con anti-CD68 está más relacionado con el grado de madurez o diferenciación de la microglía que con su grado de activación.

**Octava.** En los explantes de retina cultivados *in vitro*, las células microgliales activadas se introducen en las capas nucleares externa e interna, donde adquieren una forma globosa y fagocitan grupos de somas celulares, cuyos núcleos son frecuentemente TUNEL-negativos, sugiriendo que las células microgliales activadas podrían inducir la muerte de células viables.

**Novena.** El comportamiento de la microglía en la capa nuclear externa durante el cultivo *in vitro* de explantes de retina imita el descrito en enfermedades degenerativas de la misma. Por lo tanto, los cultivos organotípicos de explantes de retina son un buen modelo experimental para investigar los mecanismos de participación de la microglía en procesos degenerativos de la retina.

**Décima.** El tratamiento *in vitro* de explantes de retina postnatal de 10 días con minociclina produce una fuerte inhibición de la activación microglial que coincide con una disminución de más de un 20% en la viabilidad de las células de los

explantes, sugiriendo un efecto beneficioso de la microglía activada sobre la supervivencia de las células retinianas.

**Undécima.** El tratamiento *in vitro* de explantes de retina postnatal con lipopolisacárido mantiene el estado activado de la microglía y no modifica la viabilidad celular. Sin embargo, el tratamiento combinado con minociclina y lipopolisacárido inhibe la activación microglial y reduce la viabilidad de las células de los explantes.

**Duodécima.** La viabilidad de las células de los explantes de retina postnatal de 10 días también se reduce en más del 20% tras la eliminación de la mayor parte de la microglía mediante tratamiento de los explantes con liposomas cargados de clodronato, confirmando así el papel neuroprotector de las células microgliales.