

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



**Desarrollo de la Microglía y Respuesta a la  
Fotodegeneración Inducida por Luz Intensa  
en la Retina de Ratón**

**TESIS DOCTORAL**  
**Ana María Santos Carro**  
Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Ana María Santos Carro  
D.L.: GR. 1733-2009  
ISBN: 978-84-692-1322-3





UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Celular

# **Desarrollo de la Microglía y Respuesta a la Fotodegeneración Inducida por Luz Intensa en la Retina de Ratón**

Memoria presentada por **Ana María SANTOS CARRO**, licenciada en Biología, para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Granada.

## Directores

Prof. Dr. Miguel Ángel Cuadros Ojeda, Profesor Titular de Biología Celular, Universidad de Granada.

Prof. Dr. Julio Navascués Martínez, Catedrático de Biología Celular, Universidad de Granada.

Prof. Dr. José Luís Marín Teva, Profesor Titular de Biología Celular, Universidad de Granada.



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 y concluida el 10 de Diciembre de 2008.

Fdo. Ana M<sup>a</sup> Santos Carro



## **AUTORIZACIÓN PARA PRESENTACIÓN DE TESIS**

Miguel Ángel CUADROS OJEDA, Julio NAVASCUÉS MARTÍNEZ y José Luís MARÍN TEVA, directores de la Tesis “Desarrollo de la Microglía y Respuesta a la Fotodegeneración Inducida por Luz Intensa en la Retina de Ratón”, de la que es autora Dña. Ana María SANTOS CARRO

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

AUTORIZAN la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, emitiendo el siguiente informe:

Una vez revisado el presente trabajo, los Directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente en Granada, a 10 de diciembre de 2008.

Fdo. Miguel A. Cuadros Ojeda

Fdo. Julio Navascués Martínez

Fdo. José L. Marín Teva



## CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

DEPARTAMENTO: BIOLOGÍA CELULAR  
PROGRAMA DE DOCTORADO: Avances en Biomedicina  
Dña. Ruth CALVENTE IGLESIAS, Secretaria de este  
Departamento,

CERTIFICO: Que este Departamento, en su reunión del día 10 de julio de 2008 ha dado su conformidad para la presentación de la Tesis Doctoral de Dña. *Ana María SANTOS CARRO*.

TÍTULO DE LA TESIS: Desarrollo de la Microglía y Respuesta a la Fotodegeneración Inducida por Luz Intensa en la Retina de Ratón.

DIRECTORES: Miguel Ángel CUADROS OJEDA, Julio NAVASCUÉS MARTÍNEZ y José Luís MARÍN TEVA.

Y para que conste a los efectos pertinentes en la Comisión de Doctorado, expido la presente con el Vº Bº del Director de este Departamento.

Granada, 10 de diciembre de 2008.

Vº Bº

EL SECRETARIO

Fdo. Julio Navascués Martínez

Fdo. Ruth Calvente Iglesias

Sello del Departamento

EXCMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO  
DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA





## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la realización de esta Tesis.

Al Prof. Dr. Miguel Ángel Cuadros Ojeda, Director de esta Tesis, a quien estoy especialmente agradecida por iniciarme en el estudio de la microglía, por su dedicación y seguimiento de mi trabajo y por su exhaustiva corrección del manuscrito.

Al Prof. Dr. Julio Navascués Martínez, Director de esta Tesis, por su apoyo durante estos años y por su experta ayuda en la confección de las imágenes de este trabajo.

Al Prof. Dr. José Luís Marín Teva, Director de esta Tesis, por sus siempre oportunos consejos en la parte experimental y su participación en el tratamiento de las imágenes.

A la Prof. Dra. Ruth Calvente Iglesias, siempre presta a solucionar problemas de tipo informático y a la revisión del manuscrito.

Al Prof. Dr. David Martín Oliva, por sus consejos y ánimo durante la parte experimental, especialmente en la obtención de imágenes de microscopía confocal.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, Mohamed, Mari Carmen, Rosa, Ana y Susana, por su ayuda, apoyo y compañía, especialmente en la época del *deshielo*.

A todos los compañeros del Departamento de Biología Celular, que me han mostrado su interés y apoyo durante todos estos años.

A David Porcel, Concepción Hernández y Juan de Dios Bueno, miembros del CIC, por su valiosa colaboración durante la obtención y procesado de muestras e imágenes, y sobre todo por su afecto y cordialidad. A María José García-Chicano, por su eficaz gestión del animalario durante todos estos años.

Al Prof. Dr. Thomas G. Cotter, del *University College of Cork* (Irlanda), por brindarme la oportunidad de realizar mi estancia breve en su laboratorio, por su amabilidad y su disponibilidad. A mis compañeros del *Tumour Biology Lab*, en Cork, y especialmente a Nuria Sanvicens, porque además de ayudarme con todo se convirtió en amiga.

Al Dr. José María Frade, por su amabilidad, apoyo y consejos prodigados durante la estancia breve pero fructífera que pasé en el, para mí, mítico, *Instituto Cajal* (CSIC, Madrid). Fueron dos meses muy agradables y productivos. Gracias también a Pilar y al resto de compañeros del, por aquel entonces, laboratorio 18.

A mi familia y a mis amigos, que me han dado ánimos durante todo este tiempo. Quiero agradecer especialmente: a Mohamed, su gran paciencia y su insustituible apoyo en el laboratorio todos estos años; a Mari Carmen, Carolina y Marga, su ayuda y ánimos durante la elaboración y maquetado de la tesis. A Maila e Irini, su compañía *helenófila* y a los miembros de mi *equipo de voley* internacional, que siempre me han apoyado. *Valeu a pena!*

Este trabajo ha sido financiado por:

- Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) con referencia AP2003-3940, del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia.
- Proyectos: *BFU2004-01209/BFI* y *BFU2007-61659/BFI*, del Ministerio de Educación y Ciencia y *P07-CVI-03008*, de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía.
- Contrato de Investigación adscrito al Grupo de Investigación CVI 178 *Embriología del Sistema Nervioso* (BOJA nº 37, 21 de febrero de 2008; Ref. 1789).



## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	7
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>9</b>
LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS.....	11
Estructura de la retina de los vertebrados .....	11
Células gliales de la retina de los vertebrados.....	14
Astrocitos .....	14
Células de Müller .....	15
Oligodendrocitos .....	16
Células microgliales .....	16
Vascularización de la retina de los vertebrados.....	16
LAS CÉLULAS MICROGLIALES .....	21
Origen y desarrollo de las células microgliales .....	21
Tipos de células microgliales .....	22
Activación de las células microgliales .....	24
Funciones de las células microgliales.....	28
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>37</b>
<b>DESARROLLO DE LA MICROGLÍA EN LA RETINA DE RATÓN</b>	
INTRODUCCIÓN .....	39
MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
Animales .....	41
Obtención de secciones histológicas de retina .....	41
Obtención de extensiones de retina .....	42

Inmunocitoquímica.....	43
Histoquímica de Lectina de tomate.....	46
Detección de fenómenos de muerte celular mediante TUNEL .....	47
Microscopía y análisis cuantitativo.....	48
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
Diferencias de marcaje entre los marcadores microgliales.....	51
Distribución de las células macrófago/microgliales durante el desarrollo embrionario.....	53
Distribución de las células microgliales durante el desarrollo postnatal .....	55
Distribución de las células microgliales en la retina adulta .....	57
Extensiones de retinas completas .....	58
Distribución de la microglía en las retinas de ratones albinos y pigmentados .....	60
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>83</b>
Entrada de las células macrófago/microgliales en la retina murina .....	83
Patrón de distribución de las células microgliales en la retina murina durante el desarrollo y en el adulto.....	86
Observación de extensiones totales de retina .....	88
Diferencias en la distribución de las células microgliales en retinas albinas y pigmentadas .....	89
Factores que afectan la migración de las células microgliales en la retina...	90
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>95</b>
<b>RESPUESTA MICROGLIAL A LA FOTODEGENERACIÓN INDUCIDA POR LUZ INTENSA</b>	
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>97</b>
Fotodegeneración.....	101
Tipos de muerte celular de los fotorreceptores.....	103
Degeneración progresiva de los fotorreceptores .....	105
Papel de las células gliales en la degeneración de los fotorreceptores.....	108
Células de Müller .....	108
Células microgliales .....	109

MATERIALES Y MÉTODOS .....	119
Animales .....	119
Protocolo de inducción de fotodegeneración .....	119
Obtención de secciones histológicas de retina .....	120
Inmunocitoquímica.....	121
Detección de fenómenos de muerte celular mediante TUNEL .....	123
Detección de fenómenos de muerte celular por cuantificación de nucleosomas citosólicos mediante ELISA .....	124
Microscopía electrónica de Transmisión (TEM).....	126
Microscopía y análisis cuantitativo.....	127
RESULTADOS .....	129
Efecto de la exposición a la luz sobre la retina .....	129
Manifestaciones morfológicas en las retinas lesionadas.....	129
Cuantificación de la muerte celular mediante detección de nucleosomas libres por ELISA .....	131
Detección de apoptosis en la retina mediante la técnica de TUNEL.....	132
Estudio inmunofenotípico de las células microgliales y macrófagos-que aparecen en la ONL y el espacio subretiniano de las retinas con fotodegeneración .....	132
Expresión de anti-CD45 tras la inducción de la fotodegeneración .....	133
Expresión de anti-CD68 tras la inducción de la fotodegeneración .....	136
Expresión de anti-F4/80 tras la inducción de la fotodegeneración .....	137
Expresión de anti-SRA tras la inducción de la fotodegeneración.....	140
Análisis cuantitativo de la presencia de células microgliales y macrófagos en la ONL y espacio subretiniano tras la fotodegeneración.....	142
Relación espacial entre la muerte celular y las células microgliales.....	143
DISCUSIÓN .....	177
Fotodegeneración inducida por luz visible .....	177
Características morfológicas de las retinas expuestas a la luz.....	178
Activación de las células microgliales retinianas tras la fotodegeneración .	181
Origen de las células macrófago/microgliales que invaden la retina externa tras la exposición a la luz intensa .....	187



1. Migración desde otras regiones del SNC.....	188
2. Proliferación de células microgliales preexistentes .....	189
3. Entrada de nuevas células provenientes de fuera del SNC .....	190
Papel de las células microgliales durante tras la fotodegeneración.....	193
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>195</b>
<b>CONCLUSIONS / CONCLUSIONES .....</b>	<b>227</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>235</b>
<b>SUMMARY</b>	
<b>ANEXO II.....</b>	<b>251</b>
<b>ORIGINAL ARTICLE</b>	
AM Santos, R Calvente, M Tassi, MC Carrasco, Martín-Oliva D, Marín-Teva JL, J Navascués, MA Cuadros (2008), <i>Embryonic and Postnatal Development of Microglial Cells in the Mouse Retina</i> . The Journal of Comparative Neurology 506:224-239.	

*“Inflammatory processes of any nature are soon to be manifested in the reaction of microglia. In cases of meningitis and meningoencephalitis the microglia of the affected areas undergoes changes corresponding to the early stages of mobilization and phagocytic intervention”*

**Pío Del Rio Hortega (1932)**

*“For today’s neuropathologist, it must be hard to believe that microglia were once considered an endangered species. Yet, a few years ago, it was suggested that the existence of the microglia is in doubt and that their name should be abandoned. What can be regarded a gross scientific error by today’s standards has a long and complicated history. Discovered independently by Nissl and Robertson, microglia were first studied in detail by del Rio-Hortega. He also deserves the credit for establishing valuable knowledge on the role of microglia in CNS pathology. However, in the following years, and mainly due to a lack of cell type-specific markers, controversy arose around microglial embryonic development and their ‘nature’ as well as their cellular ‘identity’. Thus, in the mid-1980s, microglia were ‘rediscovered’ with the advent of immunocytochemistry and lectin markers. Meanwhile, the esoteric debate that surrounded microglia for decades had given way to research activity involving a broad circle of scientists. As a result, more than 1000 papers have been published on microglia over the last few years. The biology and function of microglia is central to many issues in modern neuropathology. Microglia and brain macrophages have been recognized to play crucial roles in important diseases such as viral infections, autoimmunity and neurodegenerative disorders. HIV encephalitis, multiple sclerosis and Alzheimer’s disease are examples where understanding the role of microglia promises to hold essential information concerning disease pathogenesis. In addition, it is becoming increasingly clear that certain molecules expressed by microglia have the potential of serving as diagnostic ‘sensors’ in day-to-day neuropathological practice. These markers point to subtle tissue pathology that may otherwise go undetected.*

**Graeber and Kreutzberg (1994)**



## ABREVIATURAS

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro.  
bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos.  
BSA: albúmina de suero bovino.  
CCR-2: receptor de quimioquinas-2, receptor de MCP-1.  
CNV: neo-vascularización coroidea experimental.  
D.O.: absorbancia, densidad óptica.  
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay  
ES: espacio subretiniano.  
GCL: capa de células ganglionares.  
GFAP: proteína acídica fibrilar glial.  
IL-1: interleuquina-1.  
IL-6: interleuquina-6.  
INL: capa nuclear interna.  
iNOS: sintetasa de óxido nítrico inducible.  
IPL: capa plexiforme interna.  
LPS: lipopolisacárido bacteriano.  
MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1.  
MCP-3: proteína quimiotáctica de monocitos-3.  
MHC-II: complejo principal de histocompatibilidad de clase II.  
NbL: capa neuroblástica.  
NFL: capa de fibras nerviosas.  
NGS: suero normal de cabra.  
NO: óxido nítrico.  
NOS: sintetasa de óxido nítrico.  
ONL: capa nuclear externa.  
OPL: capa plexiforme externa.  
OS: región de segmentos externos de los fotorreceptores.  
PBS: tampón fosfato salino.  
PLP: paraformaldehído/ lisina/ peryodato.

pro-NGF: forma inmadura de la neurotrofina NGF, factor de crecimiento neural.

RANTES: acrónimo de *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*. Esta citoquina también se denomina CCL5.

RCS: ratas con distrofia retiniana, de la cepa *Royal College of Surgeons*.

Rd: cepa de ratones con degeneración retiniana (*retinal degeneration*).

Rds: cepa de ratones con degeneración retiniana retrasada (*retinal degeneration slow*).

ROS: radicales libres del oxígeno.

RPE: epitelio pigmentario de la retina.

SNC: sistema nervioso central.

SRA: receptor *scavenger* de clase A.

TBS: tampón tris salino.

TEM: microscopio electrónico de transmisión.

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta.

TL: lectina de tomate.

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.

TUNEL: terminal transferase-dUTP nick end labelling. Técnica para la demostración *in situ* de fragmentación del DNA.

VEGF: factor de crecimiento de endotelios vasculares.

$\Phi$ : fotodegeneración.

661w: línea celular de fotorreceptores murinos.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

### Estructura de la retina de los vertebrados

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

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

La **retina neural** o retina propiamente dicha, que es la capa más interna, que contiene los fotorreceptores, que captan la señal luminosa, y el resto de tipos celulares que permiten la transmisión del impulso nervioso.

El **epitelio pigmentario de la retina** (RPE), la capa más externa, constituida, salvo en el caso de los individuos albinos, por células pigmentadas y que se encuentra firmemente adherida a la coroides a través de la membrana de Bruch.

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

La retina neural está constituida por un conjunto bien definido de células neuronales, gliales y vasculares organizadas en diferentes capas. Todo ello la convierte en una estructura ideal para el estudio de la distribución, el desarrollo y la diferenciación de las células que la integran (Igarashi *et al.*, 2007).

Las diferentes células de la retina pueden ser clasificadas atendiendo a su naturaleza y función. La retina neural contiene tanto neuronas como células gliales, razón por la cual resulta muy útil clasificar las células retinianas en tipos funcionales:



A) Células nerviosas o neuronas:

**Fotorreceptores** (o células fotorreceptoras) que captan el estímulo luminoso; hay dos tipos, los conos y los bastones.

**Células ganglionares**, son las neuronas que conducen el estímulo nervioso desde la retina al cerebro, a través de las fibras nerviosas que constituyen el nervio óptico.

Las **neuronas de asociación** o integración, están dispuestas entre los fotorreceptores y las células ganglionares, integran los impulsos recibidos de los fotorreceptores y los transmiten a las células ganglionares. En este apartado se incluyen tres tipos de neuronas retinianas: células bipolares, células horizontales y células amacrinas.

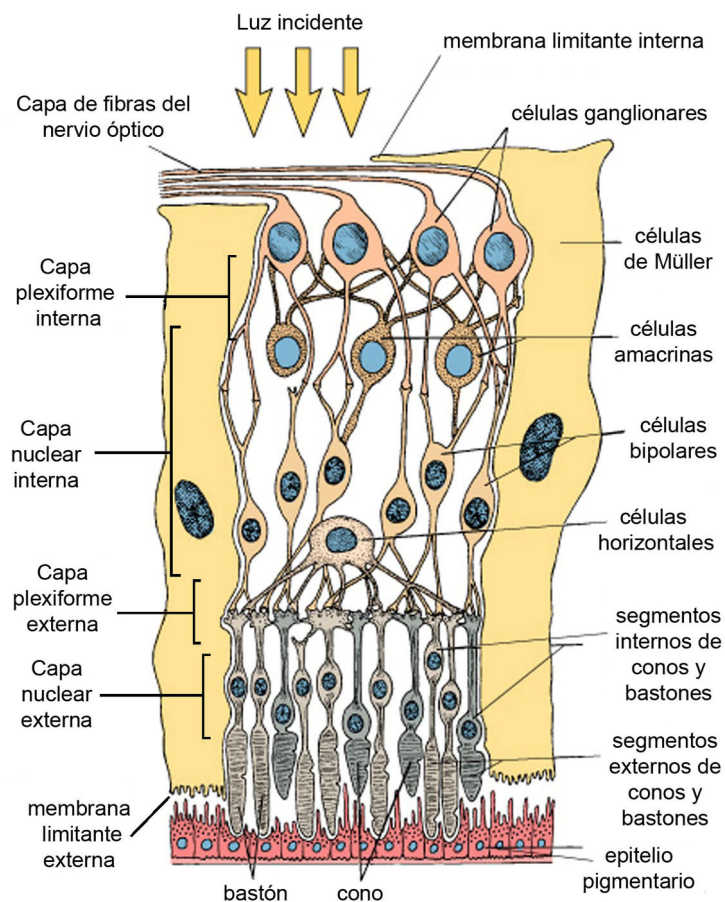
B) Células gliales:

Las **células gliales** o de sostén que aparecen en la retina de los vertebrados son: los astrocitos, las células de Müller, los oligodendrocitos y la microglía.

Todos estos tipos celulares se distribuyen y organizan en la retina formando diez capas fácilmente identificables con el microscopio óptico y que, desde el exterior del ojo hacia el interior, son las siguientes (Fig. 1):

1. **Epitelio pigmentario (RPE)**, la capa externa de la retina, que no pertenece a la retina neural.
2. **Capa de conos y bastones**, en la que se localizan los segmentos externos e internos de las células fotorreceptoras, conos y bastones.
3. **Membrana limitante externa**, que constituye el límite apical de las células de Müller, muy próximo al RPE.
4. **Capa nuclear externa (ONL)**, que contiene los somas de los fotorreceptores.
5. **Capa plexiforme externa (OPL)**, en la que se hallan las prolongaciones axónicas de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células horizontales, amacrinas y bipolares que establecen sinapsis con ellas.

6. **Capa nuclear interna (INL)**, que contiene los somas de las células horizontales, amacrinas, bipolares y de Müller.
7. **Capa plexiforme interna (IPL)**, en la que se localizan las prolongaciones de las células horizontales, amacrinas y bipolares que conectan con las prolongaciones dendríticas de las células ganglionares.
8. **Capa de células ganglionares (GCL)**, que contiene los somas de las células ganglionares.
9. **Capa de fibras nerviosas o del nervio óptico (NFL)**, formada por las prolongaciones axónicas de las células ganglionares, que se dirigen desde la retina al encéfalo.
10. **Membrana limitante interna**, formada por la lámina basal de la porción terminal de las células de Müller.



Copyright 2003 Lippincott Williams and Wilkins

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

## **Células gliales de la retina de los vertebrados**

La retina neural, como parte del SNC, contiene células gliales o de sostén. Además de los astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales, presentes en otras regiones del SNC, la retina de los vertebrados contiene un tipo específico de glia, la célula de Müller, que constituye el tipo glial predominante. Las diferentes células gliales presentes en la retina son consideradas con mayor detalle a continuación.

### **Astrocitos**

Se piensa que los precursores de los astrocitos de la retina migran desde el cerebro a través del nervio óptico (Ling y Stone, 1988; Schnitzer, 1988a; Watanabe y Raff, 1988; Ling *et al.*, 1989). La presencia de astrocitos en la retina parece estar ligada a la vascularización; así, se localizan en todas las regiones de las capas vitreales en las retinas vascularizadas (Stone y Dreher, 1987; Schnitzer, 1987) y sólo aparecen en las regiones que contiene vasos de las retinas parcialmente vascularizadas, como la del conejo (Stone y Dreher, 1987). Se ha observado, apoyando esta idea, que los astrocitos están ausentes de la retina avascular de las aves (Meyer, 1977; Reichenbach *et al.*, 1993), aunque en la retina de pollo se ha descrito una población de células gliales similares a los astrocitos (Prada *et al.*, 1998).

Como en el resto del SNC los astrocitos en la retina madura son esenciales para el soporte trófico y metabólico de las neuronas, la supervivencia y la diferenciación neuronal, la génesis de las sinapsis y la homeostasis cerebral; sus prolongaciones, junto con las de las células microgliales, contribuyen a la formación de la *glia limitans* perivascular, que separa el compartimento vascular del parénquima nervioso (Provis, 2001). Además, los astrocitos controlan la migración, proliferación y supervivencia de las células endoteliales de los vasos a través de la liberación del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF) (Provis, 2001; Fruttiger, 2007).

## Células de Müller

Las células de Müller han sido consideradas por algunos autores como astrocitos modificados, atendiendo a sus características estructurales, moleculares y funcionales (Magalhães y Coimbra, 1973; Holländer *et al.*, 1991), aunque también se las puede considerar elementos de la glía radial, dada la disposición que adoptan en la retina (Reichenbach y Reichelt, 1986; Bernardos *et al.*, 2007). Las células de Müller ocupan todo el espesor de la retina y están en contacto con todas las neuronas retinianas en la retina de los vertebrados. El núcleo de estas células, albergado en el soma, se localiza a nivel de la INL, mientras que sus prolongaciones radiales se extienden desde la membrana limitante externa, justo por debajo del RPE, hasta la GCL/NFL, donde se ramifican formando amplios pies terminales, que descansan sobre una lámina basal que constituye la membrana limitante interna de la retina.

Las células de Müller dan soporte estructural y funcional a la retina, ya que contactan y envuelven los somas y las prolongaciones de las neuronas retinianas formando unidades funcionales a modo de columnas (Reichenbach *et al.*, 1993; Bringmann *et al.*, 2006; Mack, 2007) e intervienen en la regulación de la homeostasis de la retina (Newman y Reichenbach, 1996; Bringmann *et al.*, 2006). Las células de Müller también participan en el control de la angiogénesis en las retinas vascularizadas y en la regulación del flujo sanguíneo.

Frente a una lesión, las células de Müller responden mediante una gliosis reactiva que puede dar lugar a la desdiferenciación de estas células hacia células progenitoras multipotentes que se diferenciarían posteriormente en fotorreceptores y otros tipos neuronales de la retina (Bernardos *et al.*, 2007).

La disposición radial de las células de Müller en la retina sugiere que sirven como guía o sustrato de la migración de otros tipos celulares retinianos durante el desarrollo de la retina (Newman y Reichenbach, 1996). En concreto, las células de Müller parecen intervenir en la migración de las células microgliales de la retina (Navascués *et al.*, 1996; Cuadros y Navascués, 2001), ya que la disposición de sus pies terminales y de sus prolongaciones somáticas determina la dirección de la migración tangencial, circunferencial o radial de las células microgliales (Marín-Teva *et al.*, 1999b; Sánchez-López *et al.*, 2004).

Un trabajo reciente muestra, además, que las células de Müller actuarían como una antena colectora de luz de la retina que, de forma análoga al funcionamiento de una fibra óptica, canaliza la luz hacia conos y bastones (Franze *et al.*, 2007).

### **Oligodendrocitos**

Los precursores de los oligodendrocitos migran a lo largo del nervio óptico hasta alcanzar la retina antes de diferenciarse en oligodendrocitos y formar las vainas de mielina de los axones de las células ganglionares retinianas. En la mayoría de las especies de mamíferos, incluyendo la rata, el ratón y el hombre, la mielinización de las células ganglionares termina en la unión entre la retina y el nervio óptico, y tanto los oligodendrocitos y como sus precursores están ausentes de la retina neural (Stone y Dreher, 1987; Gao *et al.*, 2006). En la retina de conejo, sin embargo, los oligodendrocitos mielinizan los axones de los rayos medulares (Schnitzer, 1985, 1988b; Jeon y Masland, 1993; Holländer *et al.*, 1995; Morcos y Chan-Ling, 1997). La retina de las aves contiene axones mielinizados en la GCL; de esta forma, se pueden observar oligodendrocitos maduros y sus precursores distribuidos por la NFL y la GCL (Nakazawa *et al.*, 1993; Ono *et al.*, 1998) de la retina embrionaria y postnatal de pollo, así como una población heterogénea de oligodendrocitos distribuida a través de la retina adulta de pollo y codorniz (Seo *et al.*, 2001).

### **Células microgliales**

Al ser la microglía el objeto de estudio de esta tesis, pasaremos a describir con más detalle el origen, desarrollo y distribución de estas células en el SNC en los siguientes apartados de esta introducción general.

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

La retina de ciertos mamíferos, como la de las aves, es avascular y las células retinianas se nutren mediante difusión desde los capilares de la coroides, localizados externamente al epitelio pigmentario (RPE). En otras

especies de mamíferos, como la rata, el ratón y el hombre, la retina contiene vasos sanguíneos, aunque los vasos se encuentran restringidos a las capas más internas de la retina, mientras que las capas externas (la ONL y la OPL y ONL en primates) no son invadidas por vasos y sus células deben nutrirse por difusión desde los vasos de la coroides (Provis, 2001). La presencia de vasos sanguíneos permite que la retina alcance un espesor mayor, y, así, las retinas vascularizadas son alrededor de un 60% más gruesas que las retinas avasculares (Buttery *et al.*, 1991).

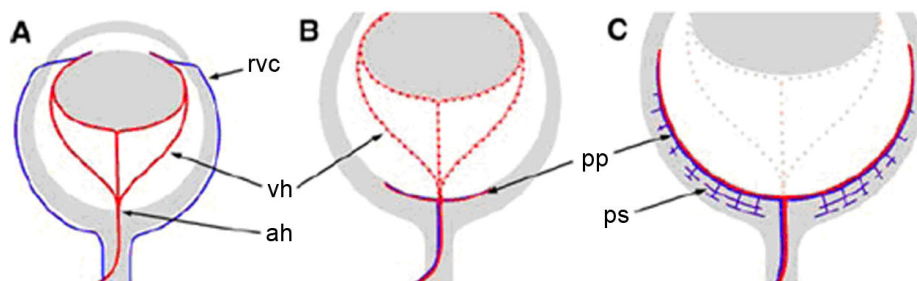
Dadas las importantes interacciones que ocurren entre las células que integran el complejo vascular de la retina desde el desarrollo temprano (Penfold *et al.*, 1990; Provis *et al.*, 1991; Díaz-Araya *et al.*, 1995b), se ha propuesto que las características de las células endoteliales de los vasos retinianos están condicionadas por la naturaleza de estas interacciones con otros tipos celulares, especialmente astrocitos. Los astrocitos son, junto con las células microgliales, el principal componente de la *glia limitans* perivascular (Lassmann *et al.*, 1991; Provis *et al.*, 1995) y las evidencias sugieren que ambos tipos celulares influyen en la permeabilidad del endotelio vascular (Provis, 2001).

En la formación de la vasculatura retiniana participan dos mecanismos diferentes: vasculogénesis y angiogénesis (Provis, 2001; Fruttiger, 2007). Mediante la vasculogénesis se forman nuevos vasos a partir de células precursoras indiferenciadas, que se crean y entran en la retina durante el desarrollo embrionario temprano. La formación de vasos mediante la angiogénesis se produce por crecimiento y expansión de la vasculatura preexistente. Puesto que el estadio inicial del desarrollo vascular en la retina implica el desarrollo de vasos sobre la superficie de una retina previamente avascular, estos vasos establecidos en la fase inicial se denominan vasculatura primaria (Sandercoe *et al.*, 1999). A continuación, se originan los vasos que se introducen en capas más profundas de la retina y que crecen radialmente desde la vasculatura primaria hacia las capas internas de la retina, por proliferación de los vasos preexistentes, constituyendo la vasculatura secundaria de la retina (Sandercoe *et al.*, 1999). La formación de la vasculatura primaria ocurre fundamentalmente mediante vasculogénesis, mientras que el

desarrollo de la vasculatura secundaria se produce principalmente por angiogénesis.

Se ha sugerido que el proceso de vascularización de la retina está relacionado con la demanda de oxígeno por parte de células de la retina (Stone y Maslim, 1997); las condiciones de hipoxia producen un incremento en los niveles de VEGF, liberado por astrocitos y células de Müller.

La red vascular de la retina sufre una drástica reorganización a lo largo del desarrollo (Fig. 2).



**Fig. 2.-** Remodelación de la vasculatura retiniana durante el desarrollo. **(A)** la vasculatura hialoidea (vh) es abastecida por la arteria hialoidea (ah) y drena en la red venosa colectora (rvc, no representada en las figuras B y C), en la parte anterior del ojo. **(B)** la vasculatura hialoidea desaparece al mismo tiempo que el plexo primario (pp) de la vasculatura retiniana crece sobre el superficie vitreal de la retina. Este plexo primario consta de arterias y venas. **(C)** El plexo profundo o secundario (ps) de la vasculatura retiniana se desarrolla a partir de las venas del plexo primario (tomado de Fruttiger, 2007).

Inicialmente, la nutrición de la retina se produce a partir de la vasculatura hialoidea, una red arterial localizada en el vítreo. Por tanto, la sangre entra en el ojo a través de la arteria hialoidea, situada a nivel del nervio óptico, recorre los vasos hialoideos en el vítreo y abandona el ojo por un vaso venoso colector en la región frontal ocular. En el ratón, el desarrollo de la vasculatura retiniana comienza alrededor del nacimiento. Inicialmente, la vasculatura está restringida a las regiones más vitreales de la retina: se produce el crecimiento de vasos sanguíneos desde la cabeza del nervio óptico y, sucesivamente, se extenderán por la NFL hasta cubrir toda la superficie vitreal de la retina, coincidiendo con la desaparición progresiva de la vasculatura hialoidea. Este plexo vascular de la retina, o plexo primario, contiene tanto arterias como venas, a diferencia de la vasculatura hialoidea. El plexo vascular primario que reviste la superficie

vitreal de la retina dará lugar, posteriormente, a tres redes vasculares paralelas interconectadas entre sí, localizadas en la NFL, en la IPL y en la OPL. Este proceso comienza en el ratón hacia P8 y finaliza hacia P14, edad en la que las tres redes vasculares están establecidas (Fruttiger, 2007).





## LAS CÉLULAS MICROGLIALES

Generalmente se considera que las células microgliales son la población residente de macrófagos del SNC y juegan un papel fundamental en la defensa inmunitaria (Kim y de Vellis, 2005; de Haas *et al.*, 2008).

Se pueden distinguir tres momentos clave en el descubrimiento de la microglía: el primero es la descripción de la *mesoglia* por Robertson, en 1900; el segundo, la inclusión del *tercer elemento del SNC* hecha por Cajal, en 1913. Sin embargo, la caracterización definitiva de la microglia no llegó hasta que Del Río Hortega definió la naturaleza dual del *tercer elemento* de Cajal, separando los oligodendrocitos (de origen neuroectodérmico), de la microglía (de origen mesodérmico), entre los años 1919 y 1921 (Del Río Hortega, 1920, 1932; Rezaie y Male, 2002). Desde las primeras aportaciones de Del Río Hortega, la microglía ha sido objeto de numerosas investigaciones, especialmente durante las últimas décadas, encaminadas a desvelar el papel de dichas células en los procesos patológicos del SNC (Rezaie, 2003).

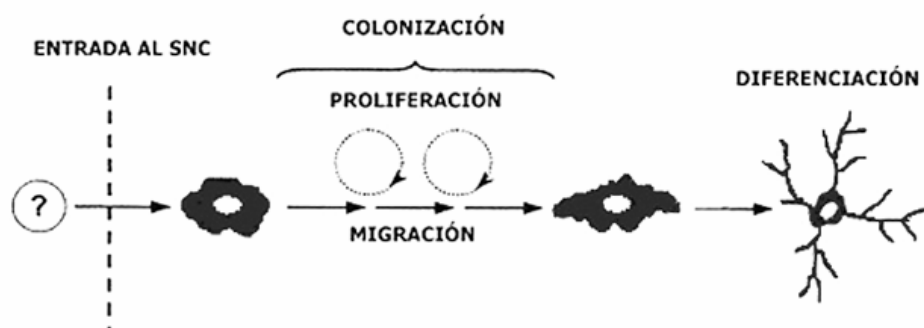
### Origen y desarrollo de las células microgliales

El origen inicial de las células microgliales ha sido ampliamente debatido. Mientras que algunos autores apoyan la idea de que la microglía, al igual que neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, es de origen neuroepitelial (Richardson *et al.*, 1993; Fedoroff, 1995; Yokoyama *et al.*, 2004), la opinión más generalizada es que provienen de la diferenciación de precursores de naturaleza mesodérmica, probablemente de linaje hematopoyético. Del Río Hortega fue el primero en sugerir que las células microgliales eran de origen mesodérmico (Del Río Hortega, 1920, 1932), idea que ha recibido fuerte apoyo posteriormente (véase Cuadros y Navascués, 1998, 2001; Kaur *et al.*, 2001; Streit, 2001; Rezaie y Male, 2002; Rezaie, 2003; Chan *et al.*, 2007).

Los precursores microgliales que se han introducido en el SNC han de colonizar las diferentes regiones del parénquima nervioso hasta alcanzar su

localización definitiva. La colonización del SNC se realiza mediante migración y proliferación (Fig. 3).

Una vez que las células microgliales han alcanzado su objetivo se diferencian, adoptando progresivamente la morfología ramificada propia del adulto (Cuadros y Navascués, 1998, 2001; Navascués *et al.*, 2000) La densidad, morfología y rasgos inmunofenotípicos de las células microgliales no son los mismos en todas las regiones del SNC maduro (Perry *et al.*, 1985; Lawson *et al.*, 1990; Mittelbronn *et al.*, 2001; Schwartz *et al.* 2006).



**Fig. 3.-** Esquema que muestra las diferentes etapas del desarrollo de las células microgliales en el SNC. Las células microgliales ameboides colonizan todas las regiones del parénquima nervioso mediante los mecanismos de migración y proliferación. Finalmente, las células microgliales se diferencian, dando lugar a la microglía ramificada del SNC adulto (tomado de Cuadros y Navascués, 2001).

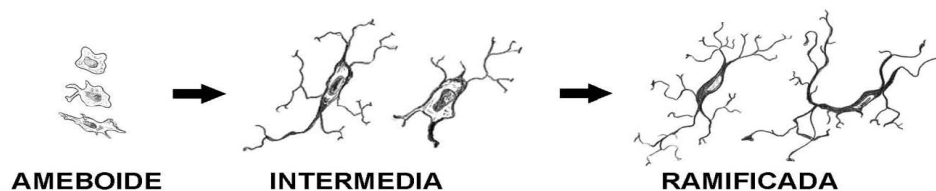
### **Tipos de células microgliales**

El fenotipo de la microglía depende de su localización, estado de diferenciación y funciones (Rezaie *et al.*, 2005). Los estudios clásicos sobre microglía pusieron ya de manifiesto que las células microgliales pasan por diferentes estadios durante el desarrollo normal del SNC y en situaciones patológicas (Del Río Hortega, 1920, 1932). Por ello, en el SNC normal tradicionalmente se distingue entre microglía ameboide, microglía intermedia y microglía ramificada o madura (también llamada “quiescente” o en “reposo”), mientras que en el SNC patológico también nos encontramos con microglía reactiva y microglía senescente.

La microglía ameboide, el tipo de célula microglial predominante durante parte del desarrollo, muestra numerosas similitudes morfológicas, histoquímicas e inmunológicas con los macrófagos presentes en otros tejidos. Las células microgliales en proceso de migración durante el desarrollo pertenecen a este grupo. Este tipo comprende células redondeadas sin prolongaciones o con gruesas prolongaciones poco ramificadas (Fig. 4).

Parte de la microglía ameboide presente en el cerebro embrionario degenera (Dalmau *et al.*, 2003), pero muchas de estas células desarrollan finas prolongaciones y adquieren una apariencia ramificada (Cuadros y Navascués, 1998). La transformación de células microgliales ameboides en microglía ramificada fue descrita por Del Río Hortega (1932) y ha sido corroborada por observaciones posteriores de tipos celulares que mostraban una morfología intermedia entre la de la microglía ameboide y la de la microglía ramificada madura (microglía intermedia, Fig. 4) (Ling, 1981; Perry *et al.*, 1985; Ling y Wong, 1993; Wu *et al.*, 1994; Rezaie y Male, 1999). La transformación de la microglía ameboide en microglía ramificada ha sido documentada ampliamente (Perry y Gordon, 1991; Ling y Wong, 1993; Barron, 1995; Ilschner y Brandt, 1996, Cuadros y Navascués, 1998; Hirasawa *et al.*, 2005).

En el SNC adulto predominan las células microgliales diferenciadas de morfología ramificada, con varias prolongaciones altamente ramificadas (Fig. 4). El número de células microgliales maduras sufre pocas alteraciones, aunque se ha observado un lento recambio de células microgliales por reclutamiento de nuevos precursores o por proliferación de los ya existentes (Lawson *et al.*, 1992; Ladeby *et al.*, 2005).



**Fig. 4.-** Diferentes estadios de la microglía desde el desarrollo hasta el adulto. La microglía ameboide adopta de manera progresiva primero una morfología escasamente ramificada (estadio de microglía intermedia) y, finalmente, la morfología ramificada que se observa en el SNC adulto (adaptado de Rezaie y Male, 1999).

Estudios recientes (Davalos *et al.* 2005; Nimmerjahn *et al.* 2005) han puesto de manifiesto que no se puede considerar a la microglia ramificada como microglía *quiescente* o en *reposo*. En ambos trabajos se visualizaban *in vivo* las diversas poblaciones de macrófagos del SNC mediante microscopía bifotónica de la expresión de moléculas fluorescentes asociadas a células de tipo macrófago/microglía en animales transgénicos. Estos trabajos han permitido comprobar que, aunque los somas de las células microgliales permanecen relativamente fijos, sus prolongaciones son enormemente móviles y continuamente están expandiéndose y retrayéndose aunque no medie ningún estímulo nocivo (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005; Raivich, 2005; Carson *et al.*, 2007).

Tras una lesión o en situaciones patológicas del SNC adulto, las células microgliales se activan rápidamente (ver siguiente apartado), convirtiéndose en microglía reactiva o activada, modificando sus características inmunofenotípicas y morfológicas y aumentando notablemente sus capacidades proliferativa y migratoria (Raivich *et al.*, 1999; Streit *et al.*, 1999).

Las células microgliales también sufren modificaciones con la edad (Perry *et al.*, 1993), lo que ha llevado a acuñar el término de *microglía senescente* (Conde y Streit, 2006; Streit, 2006).

El comportamiento de las células microgliales es diferente en cada uno de los estados morfo-funcionales descritos, por lo que no se deben extrapolar los resultados observados en uno de ellos a los obtenidos en otro distinto.

### **Activación de las células microgliales**

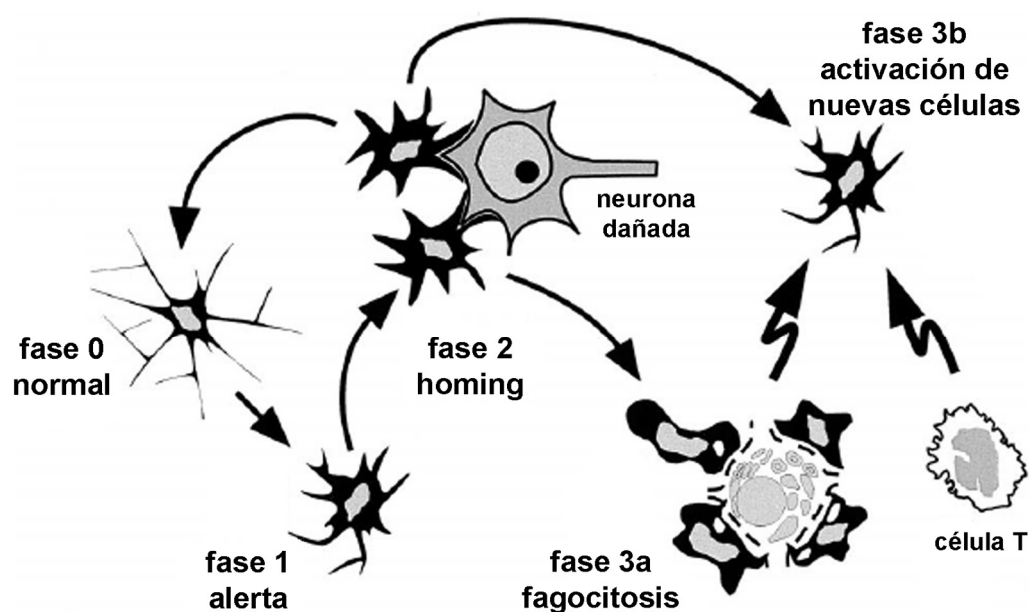
El término “plasticidad funcional de la microglía” (Streit *et al.*, 1988) hace referencia a la capacidad de estas células para cambiar su morfología, su inmunofenotipo y por tanto, sus capacidades funcionales en respuesta a cambios en su microambiente, que pueden ser resultado de un daño patológico o, simplemente, ser parte de las variaciones que ocurren en el parénquima nervioso como consecuencia del desarrollo y la maduración normales del SNC (Theele y Streit, 1993).

Las llamativas transformaciones morfológicas que experimenta la microglía en condiciones patológicas ya fueron descritas por Del Río Hortega en 1919 y, posteriormente, por Penfield y Jakob en 1927 (Rezaie y Male, 2002):

“Describíamos en páginas anteriores la hipertrofia de la microglía como primer fenómeno apreciable en los procesos tóxico-infectivos. En estos casos puede suceder que algunas células, asaz rellenas de detritus gránulo-adiposos, adquieran formas redondeadas (sobre todo en la vecindad de los vasos); pero es más frecuente que las mutaciones microgliales no pasen adelante. En cambio, si hay destrucción de substancia nerviosa por heridas, reblandecimiento, encefalitis intensas, etc., la evolución morfológica de la microglía no cesa hasta que se convierte en cuerpos granulosos (fagocitos). Para observar a satisfacción todas las fases de tal metamorfosis, recomendamos la producción de una herida con magullamiento en la corteza cerebral (conejo, por ejemplo), o bien una encefalitis exudativa difusa”

Del Río Hortega, 1920

El proceso de activación microglial no es un fenómeno “todo o nada”, sino que las células microgliales entran en diferentes niveles de activación según sus características intrínsecas y las señales que reciban del exterior (Raivich *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2006; Hanisch y Kettemann, 2007). La figura 5, adaptada de Raivich *et al.* (1999), resume el proceso de activación microglial. Las células microgliales en estado de *reposo* (fase 0), en respuesta a un daño en el SNC, retraen sus prolongaciones y adquieren una morfología más compacta (fase 1, de alerta); estos cambios morfológicos van acompañados de cambios en la expresión de marcadores celulares, conocidos con el nombre genérico de marcadores de activación. En un siguiente paso, las células migran hacia la zona de la lesión (fase 2, *homing*); si el daño detectado es grave (como por ejemplo, muerte neuronal) o el estímulo que lo desencadena es persistente (en el caso de las enfermedades degenerativas), las células activadas se transforman en fagocitos (fase 3a), a la vez que activan y reclutan nuevas células microgliales (fase 3b), que podrían realizar la presentación de antígenos a otros tipos celulares del sistema inmunitario. Si el daño que ha desencadenado la activación de la microglía es leve, las células microgliales activadas en fase 2 retornarían gradualmente a la fase 0, sin llegar a transformarse en células fagocíticas.



**Fig. 5.-** Fases del proceso de activación microglial. La transformación de microglía madura en reposo a microglía activada se lleva a cabo de manera gradual, a través de una serie de pasos o fases. El daño neuronal conduce a la rápida transformación de la microglía en reposo (fase 0) a formas más compactas (fase 1, estado de alerta), que se dirigen hacia las estructuras dañadas (fase 2, homing); si el daño es leve, las células en fase 2 volverían a la fase 0. Si el daño es grave (muerte neuronal, por ejemplo) o el estímulo nocivo persiste, la microglía activada se transforma en fagocitos (fase 3a), a la vez que se activan nuevas células microgliales no fagocíticas en la zona del daño (fase 3b), encargadas de la presentación de antígenos a las células T (modificado de Raivich *et al.*, 1999).

Aparentemente, la activación microglial es clave en la defensa frente a las diferentes situaciones patológicas que pueden afectar al SNC: infecciones, inflamación, lesiones, isquemia, tumores, enfermedades neurodegenerativas... Como se ha visto, la activación de las células microgliales *in vivo* es un proceso gradual (Kreutzberg, 1996; Streit *et al.*, 1999) que está en relación con el daño que se intenta reparar (Lay y Todd, 2008). En el SNC normal o en situaciones en que las células del parénquima neural no se encuentran muy afectadas, el grado de activación microglial es reducido, mientras que es máximo ante un daño neuronal severo. Por tanto, no es extraño que entre los factores que controlan el grado de activación de las células microgliales haya señales que indiquen el grado de daño de las células del SNC (Cardona *et al.*, 2006; Biber

*et al.*, 2007). Algunos de estos factores han sido identificados. Por ejemplo, aumentos de los niveles extracelulares de ATP y UTP constituyen una señal de activación para la microglía (las llamadas *señales ON* por Biber *et al.*, 2007), mientras que niveles bajos de estos nucleótidos y la liberación de moléculas como la citoquina fractalkina o CD200 por las neuronas sanas son *señales OFF* (Biber *et al.*, 2007) que mantienen la microglia en estado quiescente (Boehme *et al.*, 2000; Streit *et al.*, 2001; Cardona *et al.*, 2006; Biber *et al.*, 2007). Por tanto, entre neuronas y microglía se establece una comunicación bi-direccional esencial para el mantenimiento de la homeostasis del tejido nervioso (Polazzi y Contestabile, 2002; Biber *et al.*, 2007).

La activación microglial puede tener efectos neuroprotectores, debidos, entre otros factores, a la producción de neurotrofinas y citoquinas anti-inflamatorias, o efectos neurotóxicos, que pueden estar mediados por la producción de iones superóxido, de citoquinas pro-inflamatorias o de óxido nítrico (Kim y de Vellis, 2005; Bessis *et al.*, 2007; Biber *et al.*, 2007; Nakajima *et al.*, 2007). El efecto perjudicial de las células microgliales se ha demostrado en situaciones que muestran que su presencia es necesaria para que se produzca daño neuronal (Ullrich *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2002; Block y Hong, 2007), mientras que los efectos neuroprotectores se han puesto de manifiesto al comprobar que la eliminación de todas las células microgliales, o parte de ellas, resulta en un incremento de la degeneración (Lalancette-Hébert *et al.*, 2007; Sasahara *et al.*, 2008)

El proceso de activación microglial, por tanto, puede entenderse como un arma de doble filo (Kreutzberg, 1996) que es preciso controlar; la activación controlada de la microglía representa un mecanismo fisiológico encaminado a la neuroprotección, mientras que la sobre-activación de estas células incrementa el daño del parénquima nervioso (Polazzi y Contestabile, 2002).

Además de las células microgliales residentes en el parénquima nervioso, otros fagocitos mononucleares se infiltran en el interior del parénquima en muchas situaciones patológicas, como se ha puesto de manifiesto utilizando animales transplantedos de médula ósea (Ladeby *et al.*, 2005; Davoust *et al.*, 2008). Existen discrepancias sobre cuál es la participación de la microglia residente en el SNC y la de las células procedentes de fuera del



parénquima nervioso (Stoll y Jander, 1999; Ladeby *et al.*, 2005; Ajami *et al.*, 2007; Davoust *et al.*, 2008).

La dificultad para discriminar entre microglía intrínseca y células exógenas se debe, en parte, a la carencia de marcadores específicos que permitan distinguir entre estos dos tipos celulares (Stoll y Jander, 1999; Cuadros *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2007), por lo que con frecuencia se utiliza el término *células macrófago/microgliales* para designar a las células de origen monocítico presentes en el parénquima nervioso.

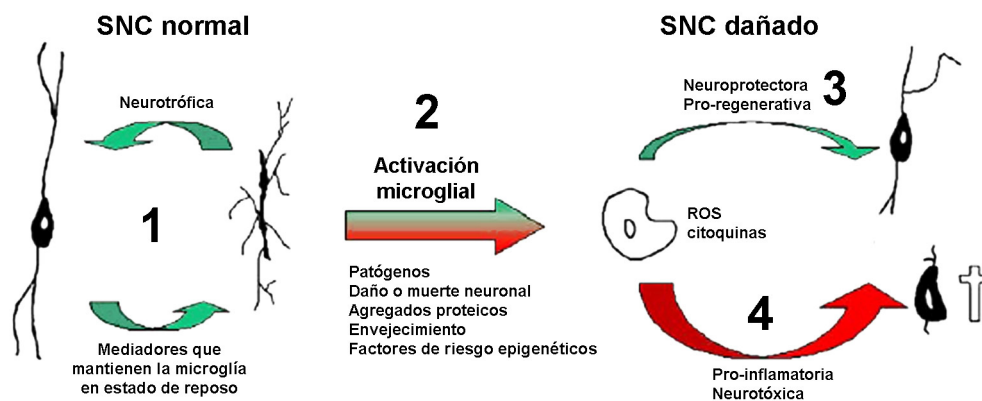
### **Funciones de las células microgliales**

La microglía ameboide fagocita células que degeneran y los restos que se producen durante los frecuentes procesos de muerte celular que ocurren en el SNC en desarrollo (Bessis *et al.*, 2007; Peri y Nüsslein-Volhard, 2008). Pero las células microgliales también parecen intervenir activamente en otros procesos que contribuyen a esculpir el SNC, como la eliminación de ciertas células (Marín-Teva *et al.*, 2004), el crecimiento y remodelación axónicas (Mallat *et al.*, 2005), la remodelación sináptica (Bessis *et al.*, 2007), la angiogénesis (Giulian *et al.*, 1988; Friedlander *et al.*, 2007) y la diferenciación de poblaciones neuronales a través de la liberación de diversos factores e interacciones célula-célula (Polazzi y Contestabile, 2002; Streit, 2002).

La microglia presente en el SNC adulto muestra características y funciones diferentes (esquematisadas en la figura 6). En el SNC sano las células microgliales extienden y retraen continuamente sus prolongaciones celulares para vigilar de manera eficaz su “territorio”, por lo que se piensa que la función de la microglia ramificada es “inspeccionar” el SNC para detectar rápidamente cualquier anomalía (Kreutzberg, 1996; Hanisch y Kettenmann, 2007). Muchas de las funciones microgliales que aparecen en la microglia activada se encuentran desreguladas en la microglía ramificada (también llamada *quiescente*), por lo que se considera que la microglia es un macrófago en potencia que precisa de la estimulación apropiada para sufrir una

transformación gradual que le lleve a convertirse en un “auténtico” macrófago. (Hanisch, 2002).

Tras una lesión, las células microgliales sufren rápidamente la activación, migrando y/o dirigiendo sus prolongaciones celulares hacia la zona dañada (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005; Kurpius *et al.*, 2007), a la vez que muestran nuevos rasgos morfológicos (ya descritos anteriormente) y funcionales, como las capacidades proliferativa y fagocítica, la producción de mediadores pro- y anti-inflamatorios y la capacidad de presentar antígenos. De hecho, las células microgliales eliminan neuronas completas y sinapsis de neuronas y axones dañados (Banati, 2003; Cullheim y Thams, 2007; Trapp *et al.*, 2007). Finalmente, las células microgliales también participan en la respuesta inmune, innata o adaptativa, que tiene lugar en el SNC (Aloisi, 2001; Nakajima y Kohsaka, 2004; Van Rossum y Hanisch, 2004; Kim y De Vellis, 2005; Block *et al.*, 2007; Hanisch y Kettenmann, 2007), como ha sido puesto de manifiesto por estudios en los que se inhibía la actividad de estas células (Van Rossum y Hanisch, 2004; Cardona *et al.*, 2006; Streit, 2006; Lalancette-Hébert *et al.*, 2007).



**Fig. 6.-** Funciones básicas de las células microgliales. En el SNC sano (1), la microglía cumple una función de soporte neuronal y mantiene una comunicación directa con las neuronas a través del intercambio de mediadores (crosstalk), señales que la mantienen en el estado de *reposo*. En respuesta a un amplio número de estímulos nocivos (2) la microglía se activa. La activación puede ser beneficiosa para el organismo (3) si los mediadores secretados por la microglía (ROS y citoquinas) se mantienen a niveles bajos. En estas condiciones, cumplen una función neuroprotectora y pro-regenerativa. Sin embargo, cuando los mediadores producidos por la microglía activada superan el límite de tolerancia del organismo (4), el mecanismo se vuelve neurotóxico, provocando la disfunción y muerte neuronal, hecho que exacerbaría la activación microglial (microgliosis reactiva) (modificado de Vilhardt, 2005).



## **OBJETIVOS**



El presente trabajo intenta poner de manifiesto el papel de las células microgliales durante la degeneración del Sistema Nervioso Central (SNC), en concreto, en la retina neural. La retina ha sido escogida para el presente estudio por presentar evidentes ventajas en relación con otras regiones del SNC, entre las que cabe destacar:

- a) Que la retina es una región muy bien delimitada, conectada con otras partes del SNC únicamente a través del nervio óptico.
- b) Que presenta una organización histológica bien definida en capas, nucleares y plexiformes, claramente delimitadas, las cuales proporcionan referencias topográficas que permiten determinar los movimientos celulares dentro de la retina y compararlos entre distintos individuos, ya sean de la misma o de diferentes edades a lo largo del desarrollo.

La realización de nuestro trabajo precisaba del establecimiento detallado de la distribución de las células microgliales durante el desarrollo de la retina. Este trabajo ha sido ya realizado en nuestro laboratorio utilizando como modelo la retina de codorniz (Navascués *et al.*, 1994, 1995; Marín-Teva *et al.*, 1998, 1999; Sánchez-López *et al.*, 2004). En mamíferos, hay menos datos sobre el desarrollo de la microglía de la retina. Se han publicado, no obstante, estudios muy detallados acerca de la presencia y distribución de las células microgliales en la retina en desarrollo de la rata (Ashwell *et al.*, 1989; Thanos *et al.*, 1996) y del conejo (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989), pero los estudios acerca de la distribución de la microglía en las retinas murina y humana son escasos o incompletos (Hume *et al.*, 1983; Hughes *et al.*, 2003; Diaz-Araya *et al.*, 1995a, b). No conocemos, por tanto, ningún estudio minucioso acerca del desarrollo microglial en la retina de ratón, sino solo descripciones parciales de la distribución microglial, fundamentalmente en el adulto y como control a determinados tratamientos. Esta carencia puede deberse, en parte, a la dificultad para encontrar un marcador que reconozca las diferentes formas que adoptan las células microgliales a lo largo del desarrollo. Por ello, la primera

parte de nuestro trabajo consiste en la realización de este estudio del desarrollo microglial en la retina.

Para la segunda fase del trabajo, la determinación de la reacción microglial ante un fenómeno degenerativo, nos interesaba que esta degeneración afectase primordialmente a una región concreta de la retina, sin que se produjese una alteración masiva de la estructura retiniana que eliminase parte de las referencias topográficas señaladas anteriormente. Para que se produjesen estas condiciones, nos inclinamos por un modelo de inducción de degeneración de fotorreceptores mediante tratamiento con luz intensa (fotodegeneración). El proceso de fotodegeneración afecta inicialmente a los fotorreceptores en la capa nuclear externa (ONL), mientras que las neuronas retinianas de otras capas no sufren modificación aparente. El que la degeneración se produzca en la ONL es una gran ventaja ya que, por una parte, no se encuentra vascularizada (a diferencia del resto de capas de la retina del ratón), eliminando una de las posibles rutas de colonización microglial de la retina, esto es, a partir de la migración de células sanguíneas; por otra parte, no aparecen células microgliales en la ONL de las retinas normales, de forma que se puede determinar fácilmente la presencia microglial en respuesta al tratamiento de fotodegeneración.

Los experimentos de fotodegeneración han sido y están siendo ampliamente utilizados *in vivo* (en diversas especies de mamíferos) e *in vitro* (en líneas celulares de fotorreceptores y células ganglionares), como modelos de enfermedades neurodegenerativas de la retina humana, tales como las retinosis pigmentarias o la degeneración macular asociada a la edad. También se han desarrollado cepas de ratones modificadas genéticamente que muestran los rasgos propios de las diferentes mutaciones humanas relacionadas con el desarrollo de este tipo de enfermedades retinianas. Por ello, la utilización de un modelo de fotodegeneración posibilita que posteriormente se utilicen cepas modificadas genéticamente; en la actualidad hay ratones con estas modificaciones genéticas, pero es mucho más difícil encontrar modelos en otras especies. Todo esto nos ha llevado a elegir el ratón

como modelo animal para nuestro estudio, aunque trabajos previos de nuestro laboratorio se hayan centrado en la microglía de las aves.

En resumen, el objetivo general de esta tesis ha sido profundizar en el estudio del origen y el patrón de desarrollo normal de las células microgliales en la retina murina, así como en la respuesta de estas células ante una situación patológica. Este objetivo general se ha desglosado en dos objetivos concretos, cada uno de los cuales será tratado en capítulos diferentes de esta tesis:

**Primero.** Estudio del patrón de colonización, distribución y diferenciación de las células microgliales durante el desarrollo embrionario y postnatal de la retina murina. Análisis de los patrones de expresión de marcadores microgliales a lo largo del desarrollo retiniano.

**Segundo.** Estudio de la respuesta de las células microgliales a la degeneración de los fotorreceptores provocada por exposición a luz intensa (fotodegeneración) y análisis de los cambios en el patrón de distribución y de expresión de marcadores por parte de las células microgliales.

Estos dos objetivos son expuestos seguidamente en capítulos diferentes, cada uno de los cuales tiene una estructura similar a la de los trabajos publicados en revistas científicas, incluyendo apartados de resumen, introducción, material y métodos, resultados y discusión propios. Con ello se pretende una mejor organización de los estudios llevados a cabo en esta tesis, facilitando así su comprensión. Por el hecho de ser una tesis que opta al Grado Europeo de Doctor, las conclusiones generales se incluyen en inglés, así como el resumen de cada capítulo.





## **CAPÍTULO I**

### **DESARROLLO DE LA MICROGLÍA EN LA RETINA DE RATÓN**



## INTRODUCCIÓN

La microglía se origina a partir de células del linaje mesodérmico que colonizan el SNC (Cuadros y Navascués, 1998), incluida la retina, hasta alcanzar el patrón de distribución definitivo característico de cada región del SNC (Lawson *et al.*, 1990; Mittelbronn *et al.*, 2001). La distribución de las células microgliales en la retina adulta ha sido descrita en peces (Dowding *et al.*, 1991; Salvador-Silva *et al.*, 2000), anfibios (Goodbrand y Gaze, 1991), aves (Navascués *et al.*, 1994; Won *et al.*, 2000; Cuadros *et al.*, 2006) y mamíferos, incluyendo el conejo (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989; Humphrey y Moore, 1996), el ratón (Zhang *et al.*, 2005b), la rata (Ashwell *et al.*, 1989; Harada *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005a), diversas especies de monos (Vrabec, 1970; Boycott y Hopkins, 1981) y el hombre (Provis *et al.*, 1995; Penfold *et al.*, 1991, 2001; Yang *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003). En todas estas especies, se ha observado que las células microgliales en la retina adulta normal aparecen distribuidas en la capa de células ganglionares (GCL) y en todas las capas fibrosas (capas plexiformes externa (OPL) e interna (IPL) y capa de fibras ópticas (NFL)), mientras que son muy escasas en la capa nuclear interna (INL) y están totalmente ausentes de la capa nuclear externa (ONL). Numerosos trabajos han demostrado que estas células son capaces de responder a diferentes tipos de daños inducidos en la retina modificando este patrón normal de distribución (Humphrey y Moore, 1996; Roque *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002; Harada *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005 a,b).

La aparición del patrón de distribución de las células microgliales durante el desarrollo ha sido mucho menos estudiada que su destino y distribución final en la retina adulta. Este proceso ha sido investigado en nuestro laboratorio en los últimos años, utilizando como modelo la retina de codorniz (Navascués *et al.*, 1994, 1995; Marín-Teva *et al.*, 1998, 1999a, b; Sánchez-López *et al.*, 2004). Estos estudios han revelado que las células microgliales colonizan la retina de

codorniz mediante dos mecanismos de migración diferentes, que se han denominado migración radial y migración tangencial:

- (i) Las células microgliales se extienden sobre la superficie vitreal de la retina mediante un proceso de migración tangencial, paralelo a la capa de fibras nerviosas (NFL) en desarrollo.
- (ii) Posteriormente, las células microgliales alcanzan el resto de capas de la retina neural por migración radial, perpendicular a la superficie vitreal.

Menos datos existen acerca del desarrollo de la microglía en la retina de otras especies. Se han publicado estudios más detallados acerca de la distribución de la microglía en las retinas en desarrollo de la rata (Ashwell *et al.*, 1989) y el conejo (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989). Pero solo se han realizado estudios parciales en otras especies que sólo se refieren a determinados estadios de desarrollo, como en el caso del ratón (Hume *et al.*, 1983; Hughes *et al.*, 2003) y el hombre (Diaz-Araya *et al.*, 1995a, b). También se han realizado algunos estudios que indicarían diferencias en la distribución de las células microgliales en retinas de ratones albinos y pigmentados (Ng y Streilen, 2001).

Para realizar un estudio completo del desarrollo de la microglía en la retina de ratón hemos utilizado varios marcadores microgliales para caracterizar los cambios en la distribución de estas células durante el desarrollo embrionario y postnatal. Además, se comparan los patrones de distribución de la microglía en dos cepas diferentes de ratón, una albina (BALB/c) y otra pigmentada (C57BL/6), a lo largo del desarrollo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Durante este estudio se emplearon retinas obtenidas a partir de ratones (*Mus musculus*) de diferentes edades embrionarias y postnatales. Se utilizaron retinas de dos cepas diferentes de ratones: C57BL/6 (pigmentada) y BALB/c (albina), ambas obtenidas de las instalaciones del *Servicio de Producción y Experimentación Animal* de la Universidad de Granada. La edad de los embriones se determinó por comprobación de la presencia del tapón vaginal en las hembras gestantes; la mañana en que era detectado el tapón vaginal, se consideró el día 0.5 de gestación, puesto que se asumió que la gestación había comenzado la noche previa. Los embriones de edades comprendidas entre los 11.5 días de gestación (E11.5) y los 18.5 días de gestación (E18.5), se obtuvieron a partir de hembras gestantes sacrificadas mediante sobredosis del anestésico halotano (*Fluothane*®, AstraZeneca Farmacéutica, Pontevedra, España). Los estadios utilizados para el estudio de la microglía en retinas postnatales incluyeron edades comprendidas entre el día del nacimiento (P0) y la edad adulta (P45, P60). Los embriones y los postnatales tempranos fueron sacrificados por decapitación y los juveniles y adultos, mediante dislocación cervical o sobredosis de anestésico. En todos los casos, se siguieron las directrices establecidas por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

### Obtención de secciones histológicas de retina

Se utilizaron tres tipos de fijadores en este estudio: a) paraformaldehído 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0.1M a pH 7.4; b) poli-L-lisina paraformaldehído (PLP; Yamato *et al.*, 1984) y c) fijador de Bouin.

Las muestras (ojos enucleados, en los animales postnatales o cabezas enteras, en el caso de los embriones), fueron fijadas en paraformaldehído o PLP durante 6 horas. Tras la fijación, se lavaron en PBS 0.1M y se

sumergieron en sacarosa 30% en PBS 0.1M durante 24 horas. A continuación, se incluyeron en crioprotector (OCT compound, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda), y se congelaron con isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Las retinas congeladas se almacenaron a  $-40^{\circ}\text{C}$ , hasta su utilización para la preparación de secciones histológicas. Las retinas se cortaron en secciones transversales de  $20\ \mu\text{m}$  de grosor con un criostato Leica CM 1850 y los cortes fueron extendidos sobre portaobjetos *Superfrost*<sup>®</sup> (Menzel-Glasser, Braunschweig, Alemania), que facilitaban su adhesión. Una parte de las muestras fueron fijadas en fijador de Bouin, durante 15-24h, deshidratadas en alcoholes de gradaciones crecientes e incluidas en parafina. Los bloques de parafina fueron cortados en un microtomo de rotación Leica RM 2035, en secciones de  $10\ \mu\text{m}$  de grosor.

### **Obtención de extensiones de retina**

Se realizaron extensiones de retina completa a partir de los ojos enucleados de ratones neonatos (entre P0 y P4). Para ello, se aislaron las retinas tras la disección rápida de los ojos en paraformaldehído 4% en PBS 0.1M y se eliminó la córnea, el cristalino, la esclera y el cuerpo vítreo. Se realizaron varias incisiones radiales a fin de facilitar el aplanamiento de las retinas sobre los portaobjetos. Finalmente, las extensiones fueron fijadas en paraformaldehído 4% en PBS 0.1M durante 1-1.5 horas. Tras la fijación, las retinas fueron extendidas sobre portaobjetos gelatinizados y permeabilizadas durante 2-4 horas mediante incubación con Tritón X-100 (Sigma) al 0.1% en PBS. El marcaje de las extensiones con el anticuerpo Iba-1 se realizó tal y como se ha descrito para las secciones (ver apartado siguiente), con la salvedad de que tanto al anticuerpo primario como al secundario y a la solución de lavado se les añadió un 0.1% de Tritón X-100, para facilitar la penetración de los anticuerpos en el tejido.

## Inmunocitoquímica

Las células microgliales de la retina murina, tanto en estadios embrionarios como postnatales y adultos, fueron identificadas mediante marcaje inmunocitoquímico con los anticuerpos que se recogen en la tabla I.

Anticuerpo	Procedencia	Tipo, hospedador	Dilución de uso
Anti-Iba-1	Wako Pure Chemicals, Osaka, Japón (# 019-19741)	Policlonal, conejo	1:100
Anti-F4/80	Serotec, Oxford, UK (# MCA 497)	Monoclonal, rata	1:30
Anti-CD45	Serotec, Oxford, UK (# MCA 1388)	Monoclonal, rata	1:40
Anti-CD68	Serotec, Oxford, UK (# MCA 1957)	Monoclonal, rata	1:40
Anti-Ki67	Abcam, Cambridge, UK (#ab15580)	Policlonal, conejo	1:100

**Tabla I.** Anticuerpos utilizados en este estudio. Se indican las casas comerciales, así como el origen del anticuerpo y la dilución empleada.

El anticuerpo anti-Iba-1 está dirigido frente a la secuencia C-terminal (secuencia PTGPPAKKAISELP) de la proteína Iba-1 (también denominada AIF1, allograft inflammatory factor-1), una proteína de unión al calcio presente en los macrófagos y células microgliales de los roedores (Ito *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 2001; Monier *et al.*, 2006); este anticuerpo reconoce una banda de aproximadamente 17kDa en Western Blot. La proteína Iba-1 es una proteína evolutivamente muy conservada con propiedades de unión a actina y parece ser esencial en la regulación del citoesqueleto de actina, la aparición de ondulaciones de membrana y la fagocitosis (Ohsawa *et al.*, 2000), funciones esenciales en las células del linaje monocítico.

El anticuerpo anti-F4/80 reconoce una glicoproteína de superficie de los macrófagos y células microgliales de ratón que tiene un peso molecular de unos 160 kDa cuando se detecta por inmunoprecipitación y Western Blot (Hume y Gordon, 1983).

Los anticuerpos anti-CD45 y anti-CD68 reconocen en el ratón las proteínas homólogas a CD45 y CD68 humanas, respectivamente. CD45 es una tirosina-fosfatasa presente en la membrana de todas las células del linaje de



los macrófagos y monocitos (Sedgwick *et al.*, 1991; Penninger *et al.*, 2001) y el anticuerpo utilizado reconoce una sola banda de unos 170 kDa en los Western Blots de extractos de cerebro en el ratón (Cuadros *et al.*, 2006). CD68 (macroscialina) es una glicoproteína de membrana presente en los lisosomas de las células del linaje macrofágico (Da Silva y Gordon, 1999); el anticuerpo utilizado en nuestros experimentos reconoce una serie de bandas de entre 87 y 115 kDa, correspondientes a diferentes grados de glicosilación de la proteína, que está directamente relacionada con la activación celular y la fagocitosis (Da Silva y Gordon, 1999).

Finalmente, el inmunógeno para el anticuerpo anti-Ki67 es un péptido comprendido entre los residuos 1200-1300 (secuencia EDLAGFKELFQTP) de la proteína humana Ki67; el anticuerpo anti-Ki67 reconoce una proteína de 345-395 kDa, presente en el núcleo de las células en proceso de proliferación (Schlüter *et al.*, 1993) y se ha utilizado como marcador de proliferación celular.

Como control negativo, los anticuerpos primarios fueron omitidos en algunas secciones, con la consecuente ausencia de marcaje. Además, las células marcadas con los diferentes anticuerpos mostraron la distribución y morfología esperadas en todas las secciones procesadas para inmunocitoquímica. Como control positivo se consideraron todas las células fuertemente marcadas con anti-Iba-1, anti-F4/80, anti-CD45 y anti-CD68 que aparecían en el interior de los vasos sanguíneos, el vítreo y los tejidos perioculares, y que mostraban las características morfológicas propias de monocitos y/o macrófagos. Como control positivo de Ki67, se tuvieron en cuenta las células positivas para dicho marcador que aparecían en las regiones de proliferación activa de la retina y tejidos perioculares.

Para el marcaje con los diferentes anticuerpos ya mencionados, secciones de retina, obtenidas con criostato y adheridas sobre portaobjetos *Superfrost*, se hidrataron durante 30 minutos en PBS 0.1M, se permeabilizaron durante 10 minutos en PBS 0.1M con Tritón X-100 (Sigma) al 0.1%, para facilitar la penetración de los anticuerpos y se incubaron durante 45-60 minutos con suero normal de cabra (NGS, S2007, Sigma) diluido 1:30 en PBS 0.1M. Seguidamente, las secciones fueron incubadas durante 24-48 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido, de acuerdo con lo que se indica

en la tabla I, en PBS 0.1M con 1% de BSA (Sigma). Tras la incubación en el anticuerpo primario, las secciones fueron lavadas por tres veces con PBS 0.1M e incubadas durante 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:1000 en PBS 0.1M con 1% de BSA. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron un anti-Ig G de conejo conjugado a Cy3 (*Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG*, PA43004, Amersham Biosciences, UK), para anti-Iba-1 y anti-Ki67 y un anti-IgG de rata conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 488 (*Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat IgG*, A11006, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), para el resto de anticuerpos primarios. Las secciones fueron, además, teñidas con Hoechst 33342 (Sigma, B2261) para marcar los núcleos celulares, lavadas en PBS 0.1M y montadas con el medio de montaje para fluorescencia *Fluoromount G* (0100-01, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA).

En algunas secciones de retina se realizaron los siguientes dobles marcajes: anti-Iba-1/anti-F4/80; anti-Iba-1/anti-CD45 y anti-Iba-1/anti-CD68. Para los dobles marcajes, las secciones de retina, obtenidas con criostato y adheridas sobre portaobjetos *Superfrost*, fueron sometidas al mismo protocolo que se utilizó en los marcajes simples. La incubación de las secciones con los dos anticuerpos primarios utilizados en cada uno de los dobles marcajes mencionados, se realizó de forma simultánea, incubando las secciones con la mezcla de los dos anticuerpos primarios y secundarios correspondiente en cada caso, a las mismas concentraciones utilizadas en los marcajes simples y durante los mismos periodos de tiempo. Las secciones doblemente marcadas también eran tratadas con Hoechst para marcar los núcleos celulares, lo que nos permite la identificación inequívoca de las diferentes capas de la retina en cada sección.

En algunos casos, la inmunoreactividad fue puesta de manifiesto mediante la técnica de la Extravidina-Biotina Peroxidasa, que permite la observación de los resultados en un microscopio de luz transmitida. La actividad peroxidasa endógena fue eliminada de estas secciones por incubación con peróxido de hidrógeno al 0.3% en PBS 0.1M durante 30 minutos, antes de la incubación en el anticuerpo primario. Tras la incubación con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con biotina (anti-rabbit

IgG para anti-Iba-1 y anti-rat IgG para el resto de anticuerpos primarios, ambos de Sigma), las secciones fueron incubadas con el complejo extravidina-peroxidasa (Sigma) diluido 1:30 durante 1h a temperatura ambiente. La presencia de peroxidasa fue puesta de manifiesto por incubación de las secciones con diaminobencidina (Sigma), a una concentración de 10mg /mL, que en algunas ocasiones fue intensificada con níquel. Finalmente, las secciones de inmunoperoxidasa fueron contrastadas con hematoxilina o verde de metilo para marcar los núcleos celulares y montadas con el medio de montaje DePeX (DHB, Poole, UK).

### **Histoquímica de Lectina de tomate**

Algunas secciones de criostato y parafina fueron sometidas a marcaje histoquímico con lectina de tomate (TL). Las lectinas son moléculas que reconocen de forma selectiva residuos de diferentes azúcares que se encuentran en la superficie de macrófagos, células microgliales y células endoteliales de los vasos sanguíneos. La lectina de *Lycopersicon esculentum* o lectina de tomate (Sigma, L-0651, Missouri, USA) reconoce los restos de poli-N-acetil-glucosamina y reconoce las células microgliales y células endoteliales del SNC (Acarin *et al.*, 1994; Dalmau *et al.*, 2003).

#### Marcaje para microscopía de luz transmitida:

Las secciones de parafina se desparafinaron e hidrataron y se pasaron a tampón TBS 0.05M; se permeabilizó durante 10 minutos con Triton X-100 (Sigma, K-0217) al 0.2% en TBS. Tras lavar, las secciones se incubaron con la lectina de tomate biotinilada diluida (1:10) en tampón TBS con 0.1% de Triton-X100, durante 2 horas a 37°C. Tras los lavados, se incubaron las secciones con el complejo extravidina-peroxidasa (Sigma, E-2886) diluido 1:200 en tampón durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron y se procedió al revelado de las mismas con la solución de revelado (Diaminobencidina 5mg/0.5mL + 20mL de tampón + 20 µL de peróxido de hidrógeno al 3%) durante 1-2 minutos, controlando este revelado en el microscopio. Tras los lavados, las secciones se pasaron a agua destilada y se llevó a cabo una coloración de contraste con Hematoxilina (diluida al 10% en

agua destilada) durante 45 segundos. Las secciones se lavaron con agua corriente, se pasaron de nuevo a agua destilada y se deshidrataron para, finalmente, montarlas en DePeX® (DHB, Poole, UK).

#### Marcaje para microscopía de fluorescencia:

Las secciones de criostato se hidrataron en tampón TBS 0.05M; se permeabilizó durante 10 minutos con Triton X-100 (Sigma) al 0.2% en TBS 0.05M. Tras lavar, las secciones se incubaron con la lectina de tomate biotinilada diluida (1:10) en TBS con 0.1% de Tritón X-100, durante 2 horas a 37°C. Tras los lavados, se incubaron las secciones con el complejo avidina-extravidina-FITC (Sigma, E-2061) diluido 1:100 en TBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron tras la incubación y se contrastaron los núcleos celulares con Hoechst 33342, diluido 1:1000 en tampón, durante 2-3 minutos. Finalmente, las secciones se lavaron y se montaron con *Fluoromount G* (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA).

Algunas secciones de retina fueron doblemente marcadas con lectina de tomate y los anticuerpos anti-Iba-1 o anti-Ki67. En estas preparaciones, se realizó en primer lugar el inmunomarcaje con el anticuerpo, anti-Iba-1 o anti-Ki67, y posteriormente, la histoquímica de lectina de tomate, tal y como se acaba de describir.

#### **Detección de fenómenos de muerte celular mediante TUNEL**

La presencia de fenómenos de muerte celular en la retina en desarrollo fue investigada mediante la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase (TdT) dUTP nick-end labeling) (Gavrieli et al., 1992). Secciones de criostato fueron lavadas en PBS 0.1M e incubadas en una solución que contenía un 2% de enzima TdT (Promega, Madison, WI, USA) en tampón TdT pH 6.8 (Promega) y 0.03% del nucleótido dUTP conjugado con Tetrametilrodamina (*Tetramethylrhodamine-dUTP*, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), durante 1 hora, a 37°C. Tras la incubación con la enzima y su sustrato, las secciones fueron lavadas en PBS 0.1M, se marcaron los núcleos celulares con Hoechst 33342 (Sigma) y se montaron con el medio

de montaje *Fluouromount G* (Southern Biotech) para su observación en el microscopio de fluorescencia.

Para el doble marcaje TUNEL/TL en primer lugar se llevó a cabo la histoquímica de la lectina como se ha descrito en el apartado anterior y a continuación se procedió a realizar la técnica TUNEL.

## **Microscopía y análisis cuantitativo**

Tanto las secciones de retina preparadas para inmunofluorescencia como aquéllas marcadas con peroxidasa, fueron observadas en un microscopio *AxioPhot* (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y fotografiadas con una cámara digital *AxioCam* (Zeiss) acoplada a este mismo microscopio.

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con un microscopio *Leitz DMRB* equipado con el sistema de barrido láser confocal *Leica TCS-SP5* (Leica). En las preparaciones observadas mediante microscopía confocal, se seleccionaron previamente los diferentes campos de interés mediante microscopía de fluorescencia y, posteriormente, se hicieron las observaciones con el sistema de barrido láser confocal. 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. Seguidamente, se utilizó el software de barrido láser confocal de Leica para superponer las secciones ópticas de cada campo en imágenes de proyección, lo que permitía observar las células microgliales contenidas en cada campo y sus ramificaciones.

Las imágenes obtenidas se almacenaron en formato TIFF y fueron procesadas digitalmente mediante ajuste de brillo y contraste, con *Adobe Photoshop* (Adobe Systems, San José, CA, USA). Las leyendas de las imágenes también fueron añadidas con este software.

También se realizaron dibujos de la distribución de las células microgliales (marcadas con el anticuerpo anti-Iba-1 revelado con peroxidasa) en secciones de retinas de diferentes edades postnatales (desde P0 a P45) mediante una cámara clara (Zeiss) montada sobre un microscopio universal Zeiss. Las diferentes capas retinianas fueron dibujadas mediante un objetivo de

6.3X y las células microgliales se identificaron y situaron utilizando un objetivo de 16X.

Para poder obtener imágenes completas de algunas de las células marcadas con peroxidasa, se obtuvieron fotografías a diferentes niveles de foco que más tarde fueron tratadas mediante el software *Image J* (NHI, USA), dotado de la aplicación *Extended depth of field*, creada por el *Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne* (EPFL, Lausanne, Suiza).

Para establecer la densidad de las células microgliales en la retina a lo largo del desarrollo, en primer lugar se determinó el número de estas células presentes en retinas de ratones embrionarios (E17.5 y E18.5) y postnatales (entre P0 y P28). Para ello, se utilizaron secciones de retina de 20  $\mu\text{m}$  de grosor, marcadas con el anticuerpo Iba-1, de las diferentes edades señaladas. En dichas secciones transversales de retina, que contenían tanto retina central como retina periférica, se contaron únicamente los cuerpos celulares (somatas) de las células microgliales que mostraban inmunorreactividad para el anticuerpo anti-Iba-1. Para evitar contar la misma célula dos veces, solamente se contaron secciones alternas (cada 40  $\mu\text{m}$ ). Se contaron un mínimo de cuatro retinas, procedentes de al menos tres animales diferentes, para cada estadio estudiado, así como seis secciones diferentes en cada retina. La superficie total de retina en cada una de las secciones donde se habían realizado recuentos fue determinada utilizando el software *Image J* (NHI). Con ambos datos, el número de células Iba-1 positivas y el área ocupada por la retina, se calculó la densidad de células microgliales Iba-1 positivas (número de células marcadas por  $\mu\text{m}^2$ ) en cada una de las edades.



## RESULTADOS

### Diferencias de marcaje entre los marcadores microgliales

Se han utilizado diferentes marcadores microgliales de forma paralela para marcar todas las células microgliales de la retina murina durante el desarrollo, tanto embrionario como postnatal.

El anticuerpo anti-Iba-1 (Ito *et al.*, 1998) ha resultado ser el marcador más fiable para las células microgliales, puesto que marca a estas células desde los estadios embrionarios hasta el adulto (Fig. 1A). Por tanto, los resultados de este capítulo se apoyan fundamentalmente en las observaciones realizadas a partir de material teñido con este anticuerpo. No se apreciaron diferencias en el marcaje con anti-Iba-1 entre las retinas fijadas con paraformaldehído y las fijadas con PLP. Sin embargo, en las muestras fijadas con Bouin se perdía totalmente la inmunorreactividad para este anticuerpo.

Los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-F4/80 no reproducen los de trabajos publicados previamente, en los que, aparentemente, todas las células microgliales del cerebro y la retina aparecían marcadas con anti-F4/80 (Hume *et al.*, 1983; Lawson *et al.*, 1990). En nuestro estudio, el marcaje obtenido con anti-F4/80 era similar al obtenido con anti-Iba-1 sólo durante los primeros estadios embrionarios estudiados (véase Fig. 2), pero luego descendía notablemente. Este descenso en el marcaje con anti-F4/80 se observó en retinas fijadas con cualquiera de los tres fijadores utilizados en nuestro estudio (Bouin, paraformaldehído y PLP). En retinas de los últimos estadios de gestación y retinas postnatales, anti-F4/80 reconoce microglía ameboide, pero no marca ninguna célula ramificada, que sí aparecen marcadas fuertemente con anti-Iba-1 (compárense las figuras 1A y 1B). En un estudio reciente (Hughes *et al.*, 2003) se ha descrito el marcaje de la microglía retiniana de ratón tras la fijación de las muestras mediante perfusión. Aunque no tenemos una explicación definitiva para esta discrepancia, podría atribuirse al uso de la fijación por inmersión en nuestras muestras.

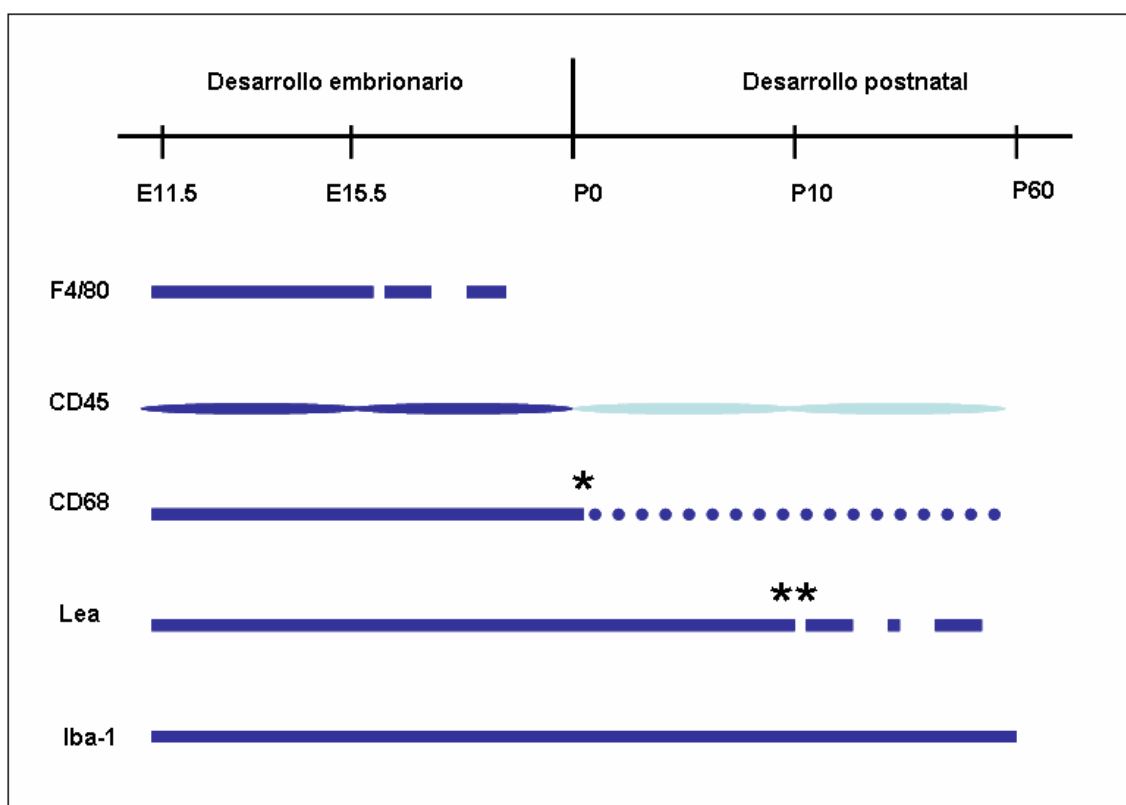


La tinción con lectina de tomate (TL, Fig. 1C) proporciona un marcaje semejante al obtenido con anti-Iba-1 en las retinas embrionarias y en las postnatales con edades comprendidas entre P0 y P10. A partir de P10, el marcaje de las células microgliales con lectina de tomate se hace más difícil de observar, debido al desarrollo de la vasculatura retiniana, que también se tiñe con lectina de tomate. Por tanto, a partir de P14, resulta difícil determinar si el marcaje corresponde a células microgliales o a células endoteliales de los plexos vasculares en desarrollo. Por todo ello, podemos concluir que la lectina de tomate es un marcador muy eficaz de las células microgliales en la retina del ratón hasta P10, pero que proporciona resultados no del todo concluyentes a partir de este estadio, debido al gran desarrollo de la vasculatura retiniana.

El anticuerpo anti-CD45 marca fuertemente las células macrófago/microgliales presentes en las retinas de los embriones de E11.5 y E12.5, pero da un marcaje muy débil en estadios posteriores (Fig. 1D), a pesar de que siguen apareciendo células fuertemente marcadas en los tejidos periorbitales de tipo mesenquimatoso. La fijación de las retinas con PLP, en vez de con paraformaldehído, mejora la intensidad del marcaje con anti-CD45.

El marcaje de las células microgliales con el anticuerpo anti-CD68 muestra, con frecuencia un marcaje punteado, como cabría esperar de un marcador lisosómico. Este anticuerpo marcaba fuertemente células microgliales presentes en las retinas de embriones de E11.5 y E12.5 y células situadas en las proximidades del borde vitreal de la retina hasta el final de la primera semana de desarrollo postnatal (Fig. 1E). Conforme el desarrollo de la retina avanzaba, la expresión del antígeno reconocido por el anticuerpo anti-CD68 parecía disminuir en aquellas células más alejadas del borde vitreal de la retina y el marcaje con anti-CD68 se reducía con frecuencia a unos pocos puntos en el interior del soma de las células microgliales (Fig. 1F). Este patrón puntual de marcaje con anti-CD68 contrastaba enormemente con la presencia de macrófagos y monocitos marcados fuera de la retina. La fijación de las muestras con PLP, en vez de con paraformaldehído, mejoraba claramente la calidad del marcaje con anti-CD68, tal y como ocurría con el anticuerpo anti-CD45.

En la tabla II se recoge un resumen de la expresión de los diferentes marcadores microgliales empleados en este estudio, en el se muestran las variaciones observadas en dichos marcajes a lo largo del desarrollo normal de la retina murina.



**Tabla II.** Expresión de marcadores de superficie en células macrófago/microgliales durante el desarrollo de la retina murina. Se muestran los estadios embrionarios (E) y postnatales (P); las moléculas marcadoras se recogen en la columna de la izquierda. El marcaje con anti-CD45 se debilita durante el desarrollo postnatal (líneas azul claro). A partir de P0, el marcaje obtenido con anti-CD68 deja de ser superficial y pasa a ser exclusivamente lisosómico (\*); la lectina de tomate (Lea) deja de ser válida como marcador microglial a partir de P10 (\*\*) cuando se empieza a confundir con el marcaje de los endotelios de los plexos vasculares que ya han colonizado la retina.

### Distribución de las células macrófago/microgliales durante el desarrollo embrionario

Las células macrófago/microgliales ya estaban presentes en las retinas de los primeros estadios embrionarios estudiados (desde E11.5),

fundamentalmente en las regiones centrales de la retina (Fig. 2A) y aumentaban su número hacia E12.5 (Fig. 2B, C). También aparecían células marcadas en el vítreo, tanto dentro como fuera de los vasos sanguíneos. Muchas de las células marcadas dentro de la retina tenían una morfología semejante a la de los macrófagos, con un perfil redondeado y, con frecuencia, cuerpos apoptóticos en su citoplasma (Fig. 2D). Hacia E12.5, estas células con aspecto de macrófagos aparecían también en las regiones más periféricas de la retina (Fig. 2E). A partir de E13.5, no volvieron a observarse, entre las células marcadas, estas células redondeadas con restos celulares en su interior, aunque las células marcadas con morfología ameboide o ramificación incipiente sí aumentaron en número y comenzaron a aparecer distribuidas por toda la retina entre E13.5 y E15.5 (Fig. 2F-H y 3A).

A partir de E16.5, la capa de células ganglionares (GCL) comienza a separarse de la capa neuroblástica (NbL) y aparece el esbozo de la capa plexiforme interna (IPL). Las células microgliales (células Iba-1 positivas) se encontraban localizadas en la IPL poco después de la aparición de esta capa (Fig. 3B). Las células microgliales estaban también presentes en las capas GCL y NbL (Fig. 3B y 4A). Las células que aparecían marcadas en las capas más internas de la retina (IPL y NbL) hacia el final del desarrollo embrionario eran células escasamente ramificadas, con varias prolongaciones gruesas que emergían del soma en diferentes direcciones. Mostraban, por tanto, una morfología claramente distinta de la presentada por las células marcadas que aparecían en estadios previos del desarrollo (E11.5-E12.5). En las retinas de embriones en los últimos días de desarrollo, aparecían células microgliales en las proximidades del borde vitreal de la retina, en algunos casos aparentemente en proceso de atravesarlo (Fig. 3C), lo que sugiere que dichas células pasan desde el vítreo, donde se observan numerosas células marcadas, al parénquima de la retina.

Por tanto, hacia el final del periodo embrionario, las células microgliales aparecían localizadas en todas las capas de la retina en desarrollo, esto es, capa de fibras nerviosas (NFL), GCL, IPL y NbL (Fig. 4A).

## **Distribución de las células microgliales durante el desarrollo postnatal**

El número de células microgliales que aparecían marcadas en las retinas del estadio P0 resultó ser claramente inferior al de las retinas en los últimos días de desarrollo embrionario (compárense las Fig. 4B con Fig. 4A). Estas observaciones fueron confirmadas tras la determinación de la densidad de células microgliales (Iba-1 positivas) en la retina a diferentes estadios de desarrollo, tanto embrionarios como postnatales. La densidad de células microgliales en la retina murina se reducía aproximadamente a la mitad entre los estadios de E18.5 y el momento del nacimiento (P0), aunque dicha densidad volvía a incrementarse de nuevo durante la primera semana de desarrollo postnatal (Fig. 5A).

Para tratar de determinar si el descenso en la densidad de células microgliales observado en P0 era debido a la muerte de estas células, se hicieron dobles marcajes con lectina de tomate (TL), como marcador microglial, y TUNEL, que pone de manifiesto las células en proceso de apoptosis, en secciones de retina de animales E18.5 y P0. A pesar de la presencia de prolongaciones celulares, positivas para el marcaje con lectina de tomate, rodeando fragmentos celulares TUNEL positivos, no se observaron células microgliales cuyos núcleos mostrasen una tinción positiva para TUNEL (Fig. 5B, C), lo que sugería que la muerte de células microgliales durante estos estadios no sería un factor decisivo en el descenso de la densidad microglial observado en edades peri-natales.

En el momento del nacimiento (P0) las células microgliales estaban presentes en las capas NFL, GCL e IPL, en contraste con la capa neuroblástica (NbL), en la que se observó un escaso número de células marcadas (Fig. 4B y Fig. 6A, B). La casi total ausencia de células microgliales presentes en la NbL hizo más fácil el seguimiento de la migración de la microglía desde las capas más vitreales hacia las más esclerales, que tiene lugar en los siguientes estadios de desarrollo de la retina murina. Algunas células microgliales se localizaban cerca del borde vitreal de la retina, mientras que otras aparecían cruzando este límite (Fig. 6C), lo que sugería que estas células entrarían en la

retina neural desde el vítreo. En esta fase del desarrollo (P0), la mayoría de las células microgliales observadas estaban pobremente ramificadas y tenían prolongaciones gruesas que emergían del soma (Fig. 6A, B).

Hacia el tercer día de desarrollo postnatal (P3) se observaba un claro cambio en la distribución de las células microgliales (Fig. 7A). En este estadio, aparecían numerosas células microgliales Iba-1 positivas en la mitad más vitreal de la NbL, de donde estaban prácticamente ausentes en P0. Las células microgliales continuaban localizándose próximas al borde vitreal, tal y como se han descrito en P0. Puesto que la densidad de células microgliales aumentó durante la primera semana de desarrollo postnatal, se realizaron dobles marcajes en algunas secciones de retinas comprendidas entre P0 y P7 con lectina de tomate (para marcar las células microgliales) y el marcador de proliferación celular anti-Ki67 para determinar si en estos estadios se producía una intensa proliferación de las células microgliales. El marcaje con el anticuerpo anti-Ki67 reveló la presencia de células en proliferación en la NbL de la retina y en células endoteliales en proliferación localizadas fuera de la retina; sin embargo, no se encontró ninguna célula microglial cuyo núcleo fuera positivo para anti-Ki67, lo que nos indicaba que las células microgliales retinianas no estaban proliferando en estos estadios (Fig. 5D, E).

Hacia P7, la capa plexiforme externa (OPL) comienza a detectarse dentro de la NbL en las regiones centrales de la retina, lo cual permite distinguir las capas nucleares externa e interna (ONL e INL). En las zonas de la retina con una ONL bien definida, las células microgliales nunca estaban presentes en dicha capa nuclear, a pesar de ocupar el resto de capas de la retina (Fig. 7B). Sin embargo, en las zonas prospectivas de ONL, todavía no desarrolladas (fundamentalmente en las zonas de retina periférica), las células microgliales sí se observaban en regiones correspondientes a la futura ONL (Fig. 7C). Pocas células marcadas aparentemente entrando en la retina desde el vítreo fueron observadas en P7, pero a partir de esta edad prácticamente ninguna célula aparecía en esa situación. La ramificación de las células microgliales aumentó de forma progresiva durante la primera semana de desarrollo postnatal (Fig. 7A-C).

A comienzos de la segunda semana de desarrollo postnatal, la OPL podía ser observada en la casi totalidad de la retina. Las células microgliales continuaban localizadas en las capas NFL, GCL, IPL e INL. Por lo general, estas células aparecían con una morfología muy ramificada en las capas plexiformes, mientras que en las capas INL y GCL mostraban una apariencia más compacta. Así, resultaba frecuente la presencia de somas compactos de células microgliales orientados radialmente con prolongaciones que alcanzaban la IPL, donde se ramificaban.

Hacia el final de la segunda semana de desarrollo embrionario, todas las capas de la retina aparecían ya claramente definidas y mostraban una organización semejante a la de la retina adulta. Tras la emergencia de todas las capas retinianas, las células microgliales continuaban ausentes de la ONL, a pesar de ser frecuentes en la contigua OPL (Fig. 7D), donde adquirirían una morfología ramificada con la mayoría de sus prolongaciones contenidas dentro de los estrechos límites de esta capa. Las células microgliales seguían estando presentes en el resto de capas más vitreales de la retina (NFL, GCL, IPL e INL), como ya se ha descrito para estadios anteriores.

El patrón de distribución de las células microgliales retinianas descrito para el final de la segunda semana de desarrollo postnatal (estadio P14) no se modificó en las siguientes semanas (retinas de los estadios P21 y P28). Frecuentemente, las células microgliales localizadas en las capas plexiformes de las retinas de estos estadios mostraban una elaborada pauta de ramificación (Fig. 7E), con finas prolongaciones que, a veces, penetraban en la INL (Fig. 7F).

### **Distribución de las células microgliales en la retina adulta**

Las células microgliales de la retina mostraban en animales adultos una disposición similar a las descritas en retinas de animales mayores de P14. La microglía se localizaba en las capas NFL, GCL, IPL, INL y OPL (Fig. 8A) y la mayor parte de estas células mostraban un alto grado de ramificación (Fig. 8B).

Tal y como ocurría durante el desarrollo postnatal, en la retina adulta no aparecían somas de células microgliales localizados en el interior de la ONL.

En resumen, el patrón definitivo de la distribución de las células microgliales en la retina murina, tal y como aparece en el adulto, se alcanza durante el desarrollo postnatal, de forma simultánea con la formación de las capas retinianas definitivas. Sin embargo, la densidad de células microgliales alcanzaba su máximo en el estadio P7 y resultaba significativamente menor en P14 y P21 (Fig. 5). Estos resultados podrían explicarse por un efecto de “dilución” de las células microgliales presentes dentro de la retina, debido al progresivo crecimiento de la retina en combinación con una estabilización del número de estas células tras el cese de la entrada de precursores microgliales procedentes del vítreo. La distribución de los somas de las células microgliales en la retina durante el desarrollo postnatal y adulto se ha resumido en la figura 9. Como puede observarse en esta figura, las células microgliales aparecían solamente en la zona de transición entre NFL y GCL de las retinas de P0, mientras que en P3 ya habían alcanzado las capas IPL y NbL y en P7 alcanzaron la INL. Este patrón de distribución sugiere un proceso de migración radial desde las capas más vitreales a las más profundas o esclerales de la retina. Resulta interesante, además, que algunos somas de células microgliales estaban presentes en la INL no sólo durante los estadios iniciales de desarrollo postnatal, sino también en la retina adulta.

### **Extensiones de retinas completas**

Se realizaron extensiones totales de retinas de ratones neonatos (con edades comprendidas entre P0 y P4) inmunomarcadas con el anticuerpo anti-Iba-1 para determinar si se podía observar una colonización progresiva de las diferentes áreas de la retina como se observa en la codorniz.

En estas extensiones se pudo apreciar que las células microgliales Iba-1 positivas ocupaban ya gran parte de la superficie vitreal de retinas P0. Dichas células se observaron en dos planos de foco. El primero de estos planos correspondía al nivel NFL/GCL, mientras que el segundo pertenecía al estrecho

espacio situado entre la NbL y el epitelio pigmentario, el llamado espacio subretiniano. Las células localizadas en el primer nivel mostraban una morfología más o menos alargada y se orientaban hacia la periferia de la retina en las regiones más próximas a la salida del nervio óptico, es decir, seguían una orientación centro-periférica (Fig.10C); sin embargo, esta orientación clara de los somas microgliales no se observó en las células microgliales situadas en regiones más periféricas de la retina (Fig. 10E).

A nivel del espacio subretiniano de las extensiones de retinas de P0 se observaron muchas menos células que en el nivel NFL/GCL, contabilizándose únicamente unas 10 células microgliales por retina a nivel del espacio subretiniano. Las células marcadas en este espacio mostraban un soma pequeño con prolongaciones finas, largas y ramificadas. Aparentemente, estas células se encuentran comprimidas en el pequeño espacio disponible entre la futura retina neural y el epitelio pigmentario (Fig. 10G).

En los días siguientes (estadios P1-P4), el número de células microgliales marcadas en las extensiones de retina se incrementaba de manera progresiva. Este hecho era especialmente patente en las regiones más cercanas a la cabeza del nervio óptico, aunque el incremento en el número de células era también evidente en zonas periféricas de la retina. Como resultado, el número de células marcadas en la retina se vio incrementado en los primeros días de desarrollo postnatal, tanto en áreas centrales como periféricas. Tal y como ya se ha descrito en P0, las células marcadas de la parte central de la retina presentaban una morfología alargada y se orientaban hacia la periferia (Fig. 10D); esta orientación centro-periferia se hacía progresivamente menos patente conforme nos alejábamos de la cabeza del nervio óptico, región en la que abundaban las células redondeadas o escasamente ramificadas (Fig. 10F). Aún teniendo en cuenta el considerable incremento en el tamaño de las retinas con la edad, las células marcadas continuaban siendo frecuentes en las regiones más periféricas y, consecuentemente, no aparecían zonas desprovistas de microglía en las retinas de estas edades.

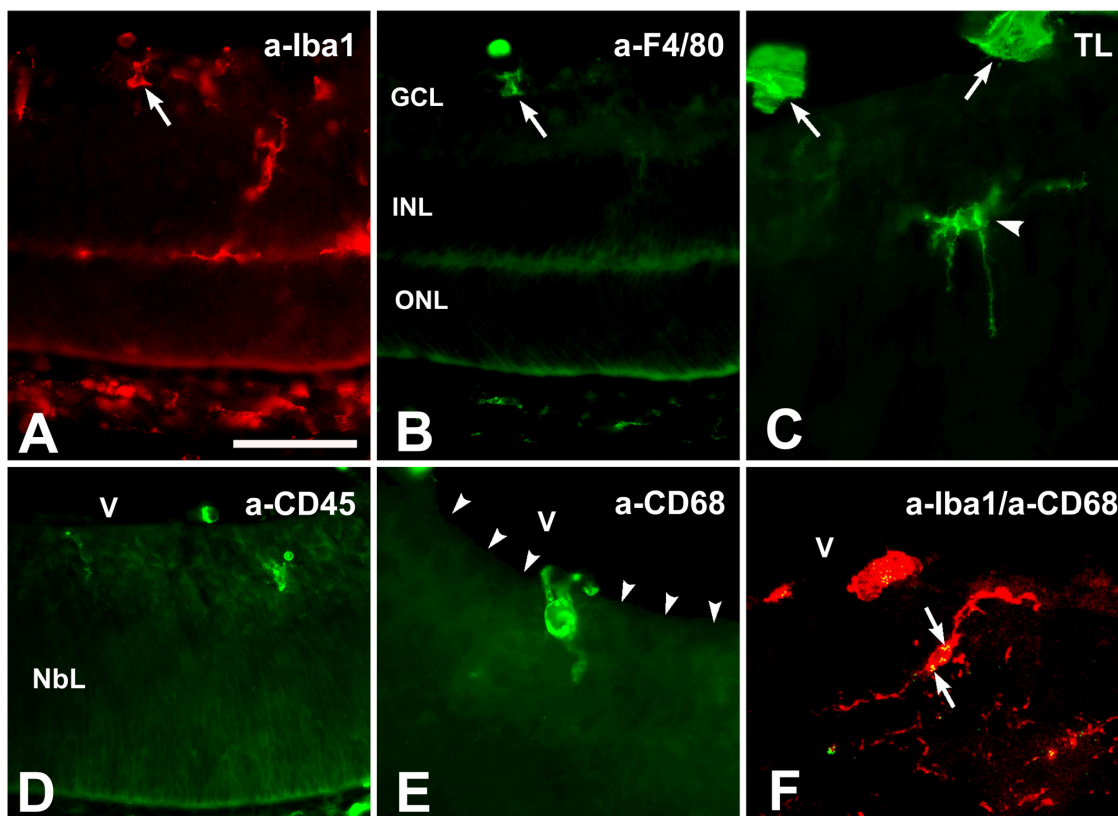
En el espacio subretiniano seguían apareciendo células marcadas hasta P4 (Fig. 10H), último estadio examinado en extensiones totales de retina.



Dichas células aparecían en número semejante y su morfología era similar a la descrita en extensiones P0. Hay que señalar que las células microgliales del espacio subretiniano aparecían en regiones más apartadas del centro de la retina concomitantemente con el crecimiento de la retina.

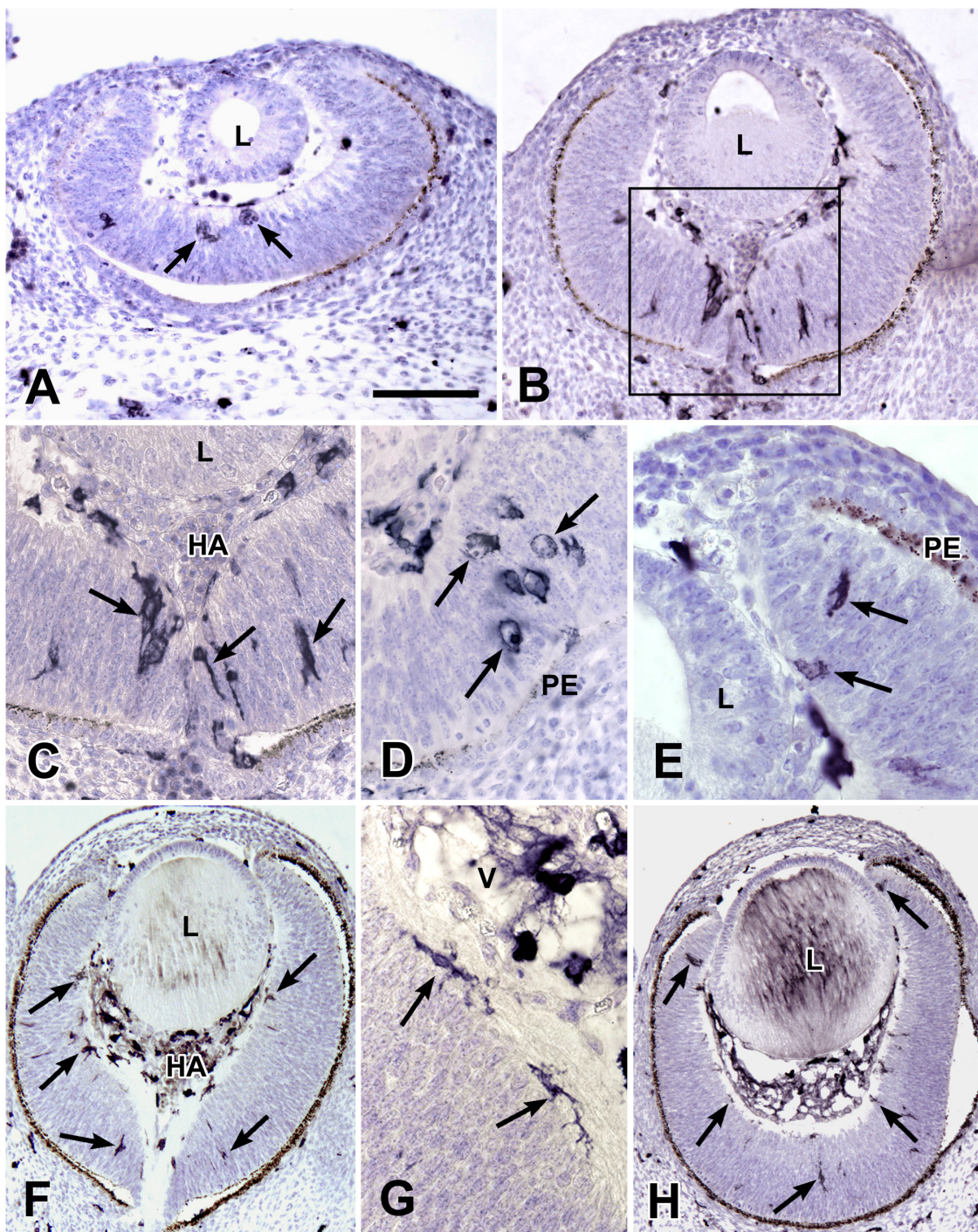
### **Distribución de la microglía en las retinas de ratones albinos y pigmentados**

El patrón de distribución de la microglía retiniana a lo largo del desarrollo descrito fue realizado en ratones pigmentados C57BL/6. No se encontraron diferencias evidentes en la distribución de las células microgliales en las retinas de cepas de ratones albinos (BALB/c) y pigmentados (C57BL/6), ni durante el desarrollo ni en las retinas adultas (Fig. 11). Por tanto, los cambios en la distribución de la microglía durante el desarrollo de la retina que se han descrito en el apartado anterior son aplicables a ambas cepas de ratón.



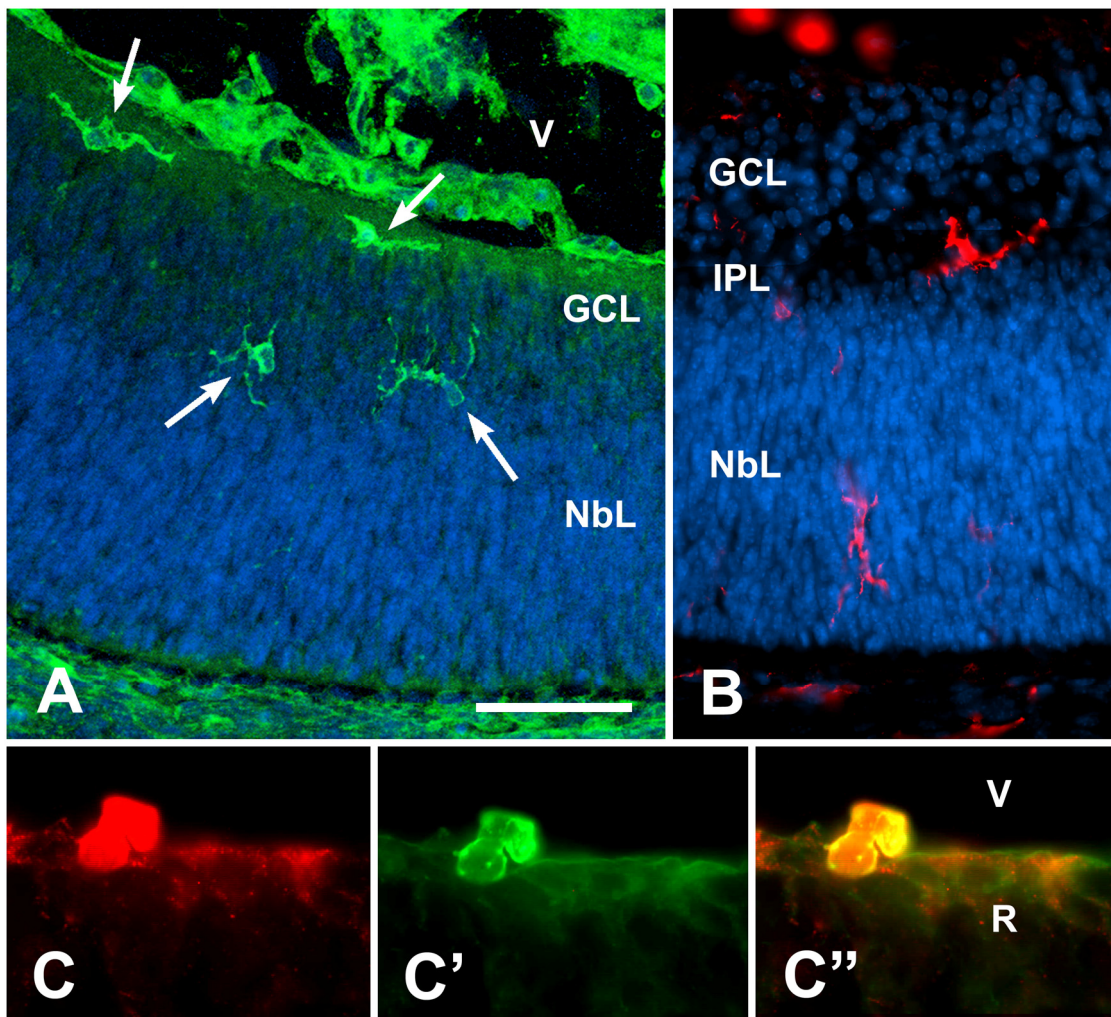
**Fig. 1.** Marcaje de células macrófago/microgliales en retinas de ratón de diferentes estadios de desarrollo. El marcaje se ha llevado a cabo mediante inmunocitoquímica con diferentes anticuerpos (A, B y D-F) y con histoquímica para la lectina de tomate (C). **A, B:** Doble inmunocitoquímica en una sección de retina de P7 con los anticuerpos anti-Iba-1 (rojo) y anti-F4/80 (verde). El anticuerpo anti-Iba-1 pone de manifiesto numerosas células microgliales, mientras que sólo algunas de ellas aparecen también marcadas con el anticuerpo anti-F4/80 (flechas). **C:** Marcaje histoquímico con lectina de tomate (TL) de una célula microglial (punta de flecha) en una retina de 17.5 días de gestación (E17.5); las flechas indican los vasos sanguíneos del vítreo, que también se marcan con la lectina de tomate. **D:** El marcaje con el anticuerpo anti-CD45 pone de manifiesto un escaso número de células en las retinas de embriones de E18.5. Sin embargo, el anticuerpo anti-Iba-1 revela la presencia de más células microgliales en este estadio (véase Fig. 4A, para un marcaje de inmunocitoquímica con anti-Iba-1 en una retina de la misma edad). **E:** Una célula microglial intensamente marcada con el anticuerpo anti-CD68 que parece estar atravesando la membrana limitante interna (puntas de flecha) en una retina P0. **F:** Imagen de microscopio confocal de una célula microglial doblemente marcada con los anticuerpos anti-Iba-1 (rojo) y anti-CD68 (verde) en una sección de retina de P21. El marcaje con anti-CD68 se reduce a unos pocos puntos (flechas) correspondientes a los lisosomas del soma de la célula microglial. GCL, capa de células ganglionares; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa; V, vítreo; NbL, capa neuroblástica. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$  en A, B y D; 25  $\mu\text{m}$  en C; 37  $\mu\text{m}$  en E; 62  $\mu\text{m}$  en F.

**Fig. 2.** Marcaje de células macrófago/microgliales en retinas de ratón de los estadios E11.5 a E14.5 realizado mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-F4/80, revelado con peroxidasa. **A:** células macrófago/microgliales (flechas) en la región central de una retina del estadio E11.5. **B:** células F4/80 positivas en una retina del estadio E12.5; el área enmarcada en el recuadro se muestra ampliada en la imagen C. **C:** región del disco óptico (área recuadrada en la imagen B) de una retina de E12.5, que muestra numerosas células macrófago/microgliales F4/80 positivas (flechas). **D:** células redondeadas F4/80 positivas que muestran en su interior numerosos cuerpos picnóticos (algunos de ellos marcados con flechas) en una retina del estadio E12.5. **E:** células F4/80 positivas (flechas) en la región periférica de una retina de E12.5. **F:** células F4/80 positivas en las regiones central y periférica de una retina del estadio E13.5. **G:** dos células inmunomarcadas (flechas) de morfología ramificada localizadas en las proximidades del disco óptico de una retina del estadio E13.5. **H:** vista general de una retina del estadio E14.5 en la que se han marcado las células F4/80 positivas (algunas están señaladas con flechas). HA, arteria hialoidea; L, primordio de la lente o cristalino; PE, epitelio pigmentario; V, vítreo. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A; 135  $\mu\text{m}$  en B; 47  $\mu\text{m}$  en C; 45  $\mu\text{m}$  en D; 21  $\mu\text{m}$  en E; 153  $\mu\text{m}$  en F; 25  $\mu\text{m}$  en G; 183  $\mu\text{m}$  en H.

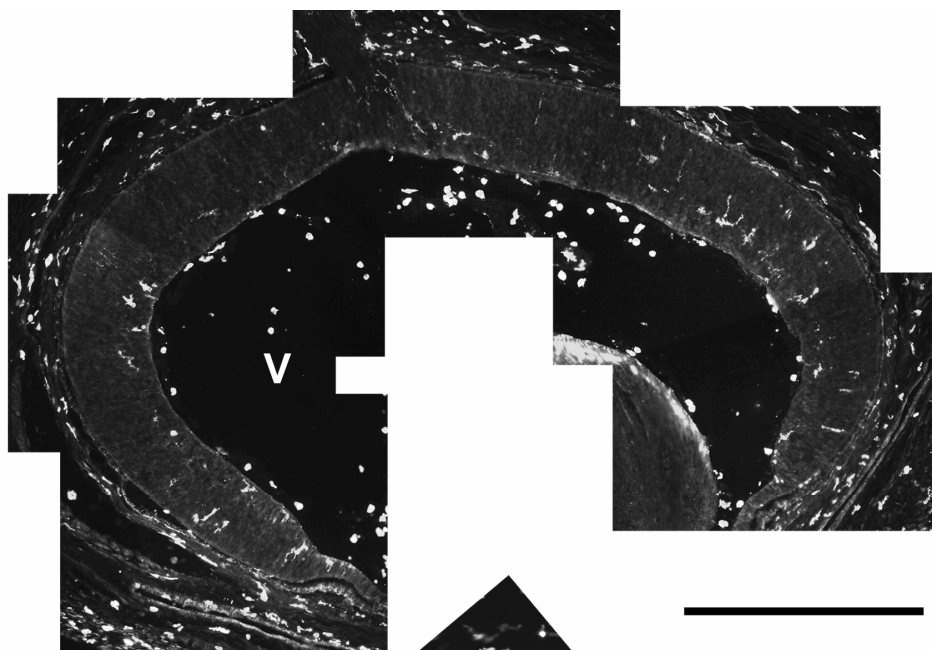




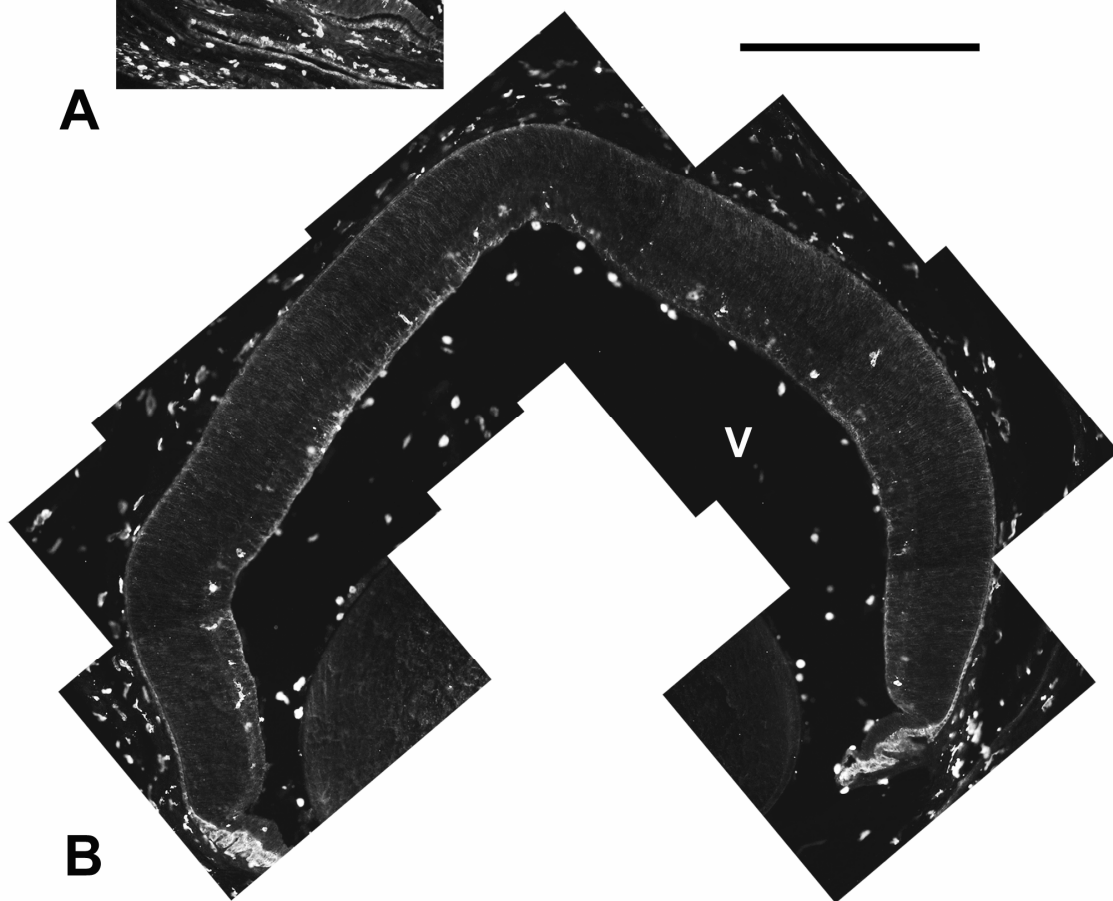
**Fig. 3.** Células macrófago/microgliales en retinas de ratón de los estadios finales del desarrollo embrionario. **A:** Marcaje histoquímico con lectina de tomate (verde) en una retina de 15.5 días de gestación (E15.5); las flechas indican las células microgliales marcadas. Los núcleos celulares (azul) de la retina están marcados con Hoechst. La lectina de tomate también pone de manifiesto la vasculatura hialoidea del vítreo (V). **B:** células Iba-1 positivas (rojo) en una retina de E17.5. Los núcleos celulares (azul) están marcados con Hoechst. **C-C'':** Una célula microglial doblemente marcada con el anticuerpo anti-Iba-1 (C, rojo) y lectina de tomate (C', verde), que parece estar atravesando el límite entre la retina (R) y el vítreo (V) de una retina de E18.5. En la imagen C'' (merged) se muestran las estructuras celulares (amarillo-anaranjado) teñidas con ambos marcadores. GCL, capa de células ganglionares; V, vítreo; NbL, capa neuroblástica; IPL, capa plexiforme interna. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  en A, 62  $\mu\text{m}$  en B; 29  $\mu\text{m}$  en C-C''.



**Fig. 4.** Secciones transversales de retinas de ratón de los estadios E17.5 (**A**) y P0 (**B**) que muestran la distribución de las células macrófago/microgliales Iba-1 positivas en retinas de los últimos días del desarrollo embrionario y retinas de ratones neonatos. Ambas secciones tienen idéntica orientación temporal-nasal y corresponden, aproximadamente, al mismo nivel de la retina. Nótese que en la retina embrionaria (**A**) aparece un mayor número de células marcadas que en la retina neonatal (**B**). V, vítreo. Barra de escala: 200  $\mu\text{m}$ .



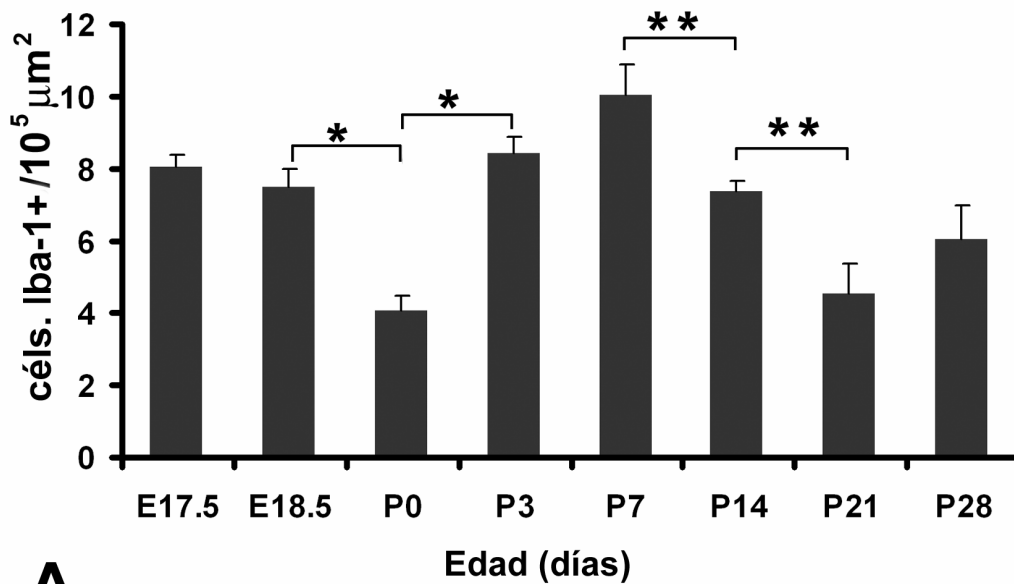
**A**



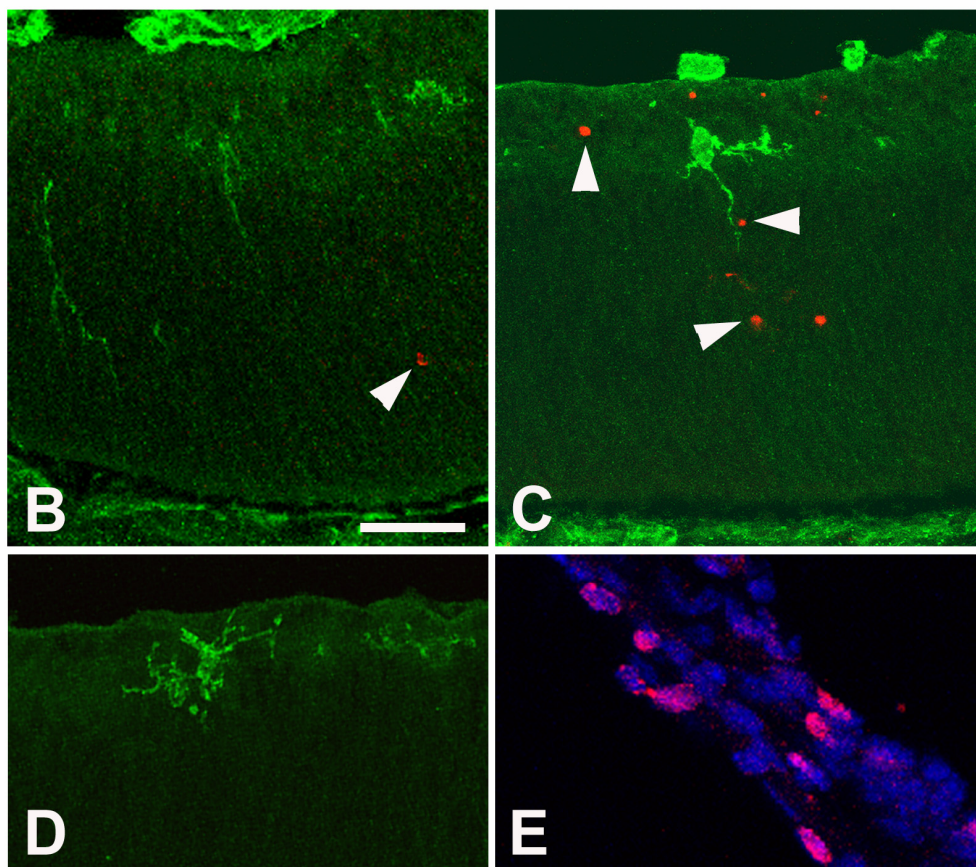
**B**



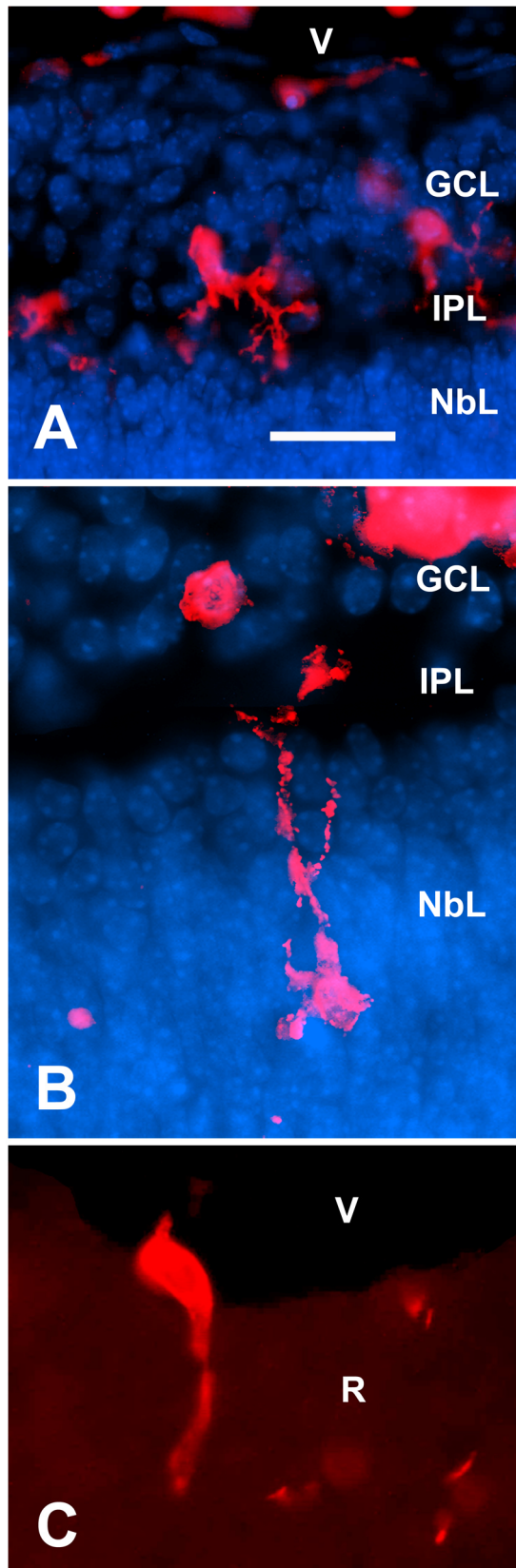
**Fig. 5.** Cambios en la densidad de células microgliales de la retina murina a lo largo del desarrollo. **A:** Densidades de células Iba-1 positivas en la retina de ratón a diferentes estadios embrionarios y postnatales. Los datos se presentan como las medias  $\pm$  SD de los valores obtenidos para al menos 4 retinas de cada edad representada. Los asteriscos señalan las diferencias estadísticamente significativas entre los valores de diferentes edades (test t-Student, \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.05$ ). **B, C:** doble marcaje con lectina de tomate (verde) y TUNEL (rojo) de secciones de retinas correspondientes a las edades E18.5 y P0. Las células microgliales (positivas para el marcaje con lectina de tomate) no muestran núcleos TUNEL positivos; las puntas de flecha señalan algunos núcleos TUNEL positivos en el parénquima de la retina. **D, E:** secciones de retina (D) y de esclera (E), correspondientes al estadio P3 en las que se muestra un doble marcaje realizado con anti-Ki67 (rojo) y lectina de tomate (verde). Las células microgliales, lectina de tomate positivas, no muestran núcleos Ki67 positivos, que sí aparecen en algunas células de la esclera de la misma retina, utilizadas como control positivo. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst. Barra de escala: 30  $\mu\text{m}$  en B; 32  $\mu\text{m}$  en C-D; 44  $\mu\text{m}$  en E.



**A**

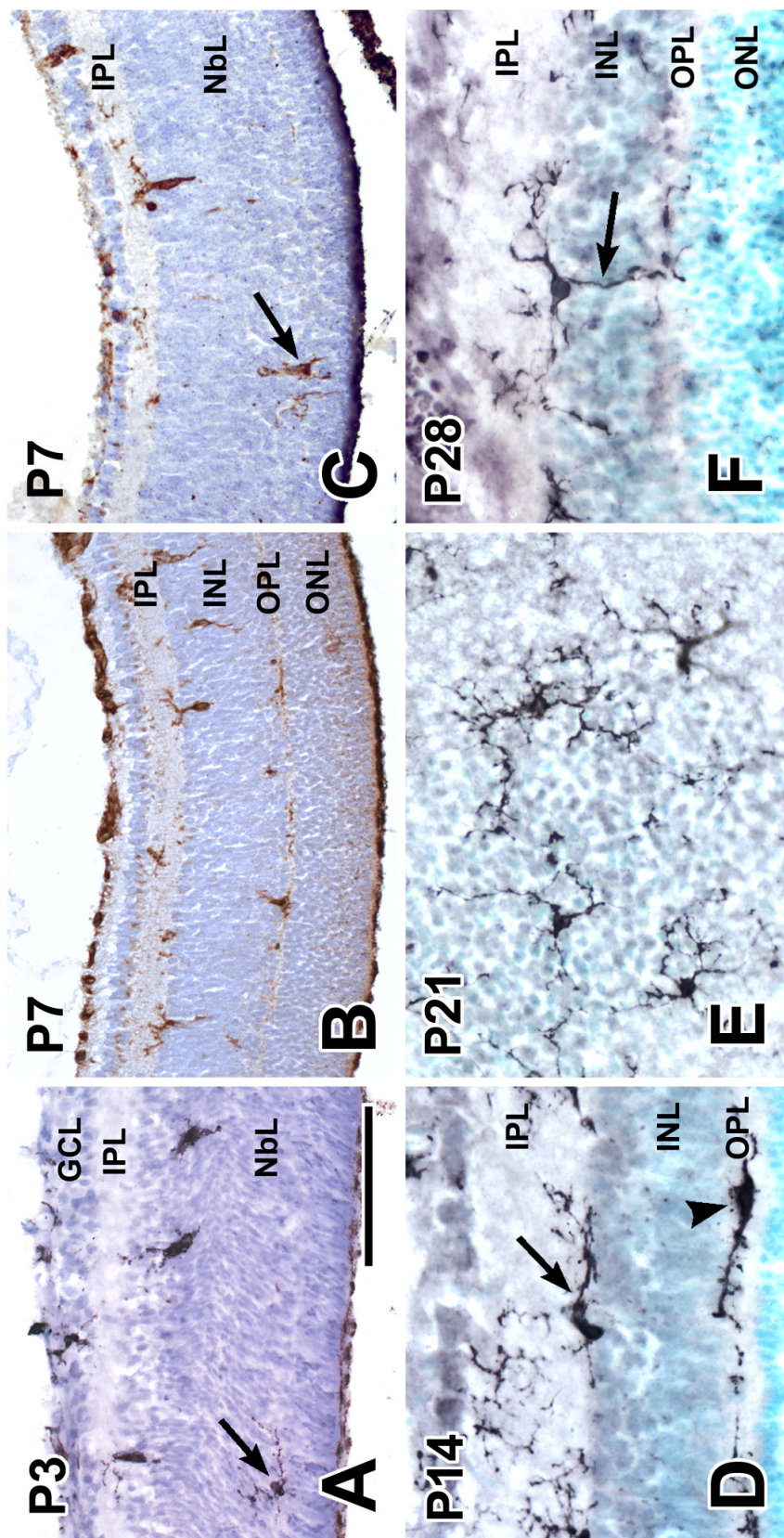


**Fig. 6.** Células Iba-1 positivas (rojo) en retinas de ratones del estadio P0. Las capas celulares de las retinas se distinguen en A y B gracias al marcaje de los núcleos celulares con Hoechst (azul). **A:** células microgliales en la capa de células ganglionares en desarrollo (GCL) cuyos procesos se extienden hasta alcanzar la capa plexiforme interna en desarrollo (IPL). **B:** una célula microglial, cuyo soma se localiza en la capa neuroblástica (NbL), emite un proceso celular que alcanza la IPL. **C:** célula Iba-1 positiva aparentemente atravesando el límite entre la retina (R) y el vítreo (V). Barra de escala: 30  $\mu\text{m}$  en A; 34  $\mu\text{m}$  en B; 25  $\mu\text{m}$  en C.

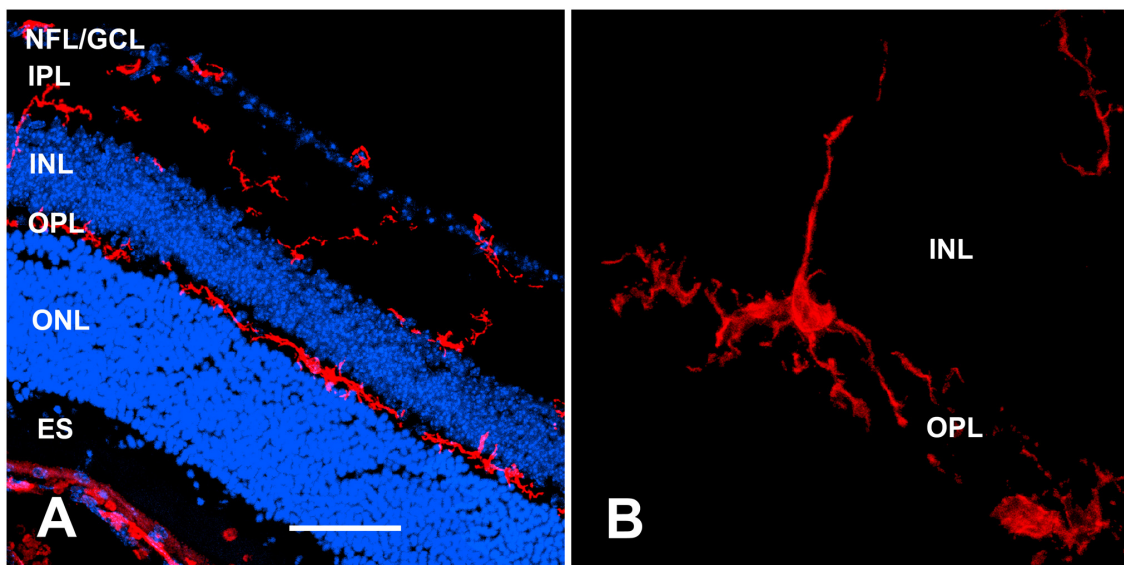


**Fig. 7.** Distribución de las células microgliales en retinas de ratón de diferentes edades postnatales marcadas con el anticuerpo anti-Iba-1 (A, D-F) o con lectina de tomate (B, C). El marcaje está revelado con peroxidasa. **A:** región central de una retina del estadio P3 que muestra células Iba-1 positivas en las capas neuroblástica (NbL) y de células ganglionares (GCL). La célula señalada por la flecha se localiza en la zona que posteriormente será ocupada por la capa plexiforme externa (OPL). IPL, capa plexiforme interna. **B:** región central de una retina del estadio P7. Se puede distinguir una fina capa plexiforme externa (OPL), entre las capas nucleares interna (INL) y externa (ONL), que contiene células microgliales. Hay abundantes células marcadas en la INL, mientras que están ausentes de la ONL. En la ONL se observa el marcaje de material extracelular, pero no la presencia de microglía. **C:** región periférica de la misma retina mostrada en B. La capa neuroblástica (NbL) contiene células microgliales marcadas, una de las cuales (la señalada por la flecha) se localiza en la zona que será ocupada por la aún no definida ONL, puesto que en la región periférica, la OPL progresa más lentamente. **D:** retina del estadio P14. Las células Iba-1 positivas muestran una morfología bastante ramificada y orientan la mayor parte de sus procesos en el plano horizontal. Una célula microglial (flecha) se localiza en el límite entre IPL e INL, mientras que otra (punta de flecha), se localiza en la OPL. **E:** retina del estadio P21. Se pueden observar células Iba-1 positivas ramificadas en una sección horizontal de la retina a nivel del límite entre IPL e INL. **F:** retina del estadio P28. Detalle de una célula microglial, Iba-1 positiva, que muestra el soma y dos de sus procesos en el límite entre la IPL y la INL, mientras que un tercer proceso (flecha) atraviesa la INL y alcanza la OPL, donde se ramifica. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$  en A; 77  $\mu\text{m}$  en B, 63  $\mu\text{m}$  en C; 49  $\mu\text{m}$  en D y F; 53  $\mu\text{m}$  en E.



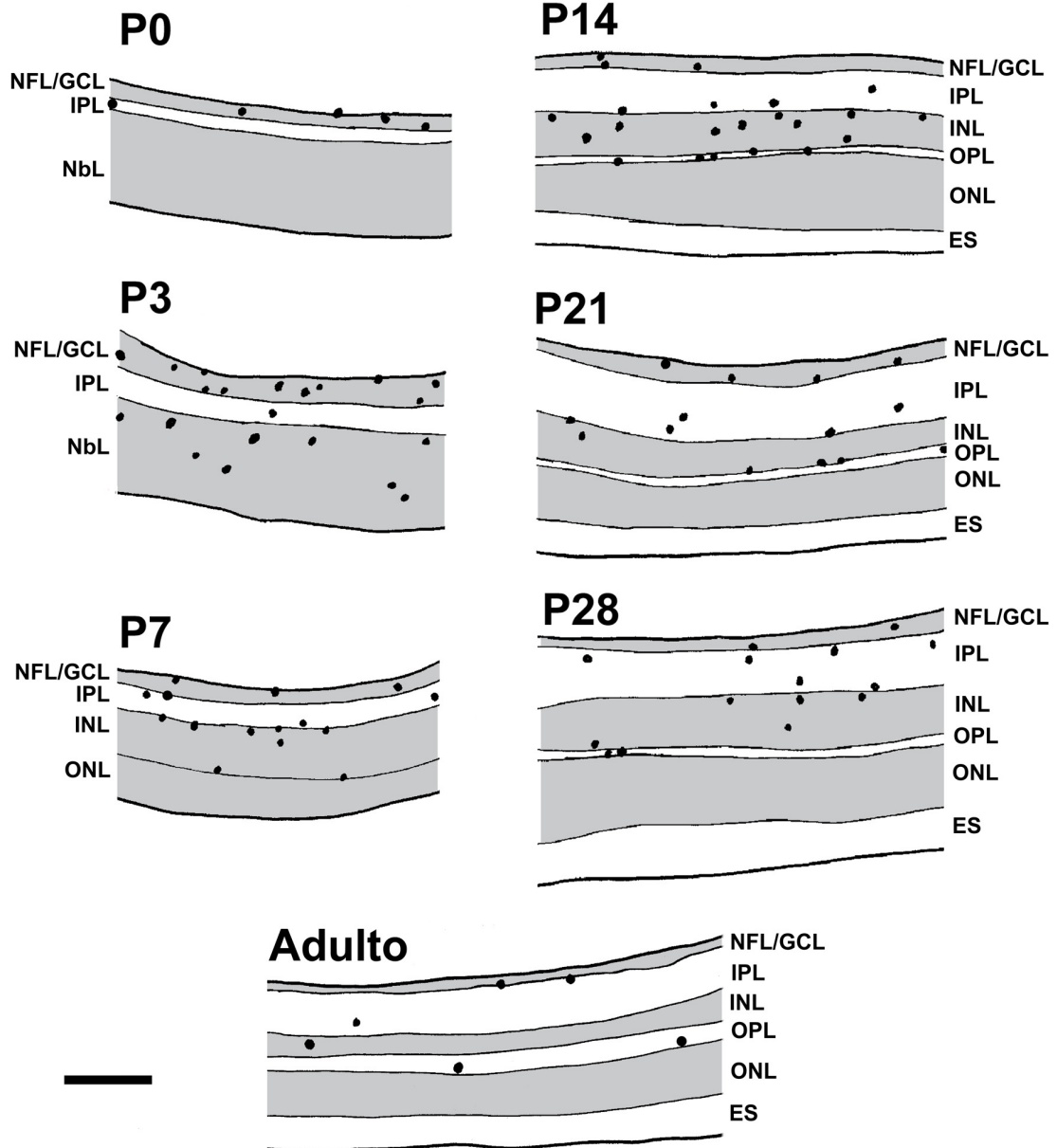


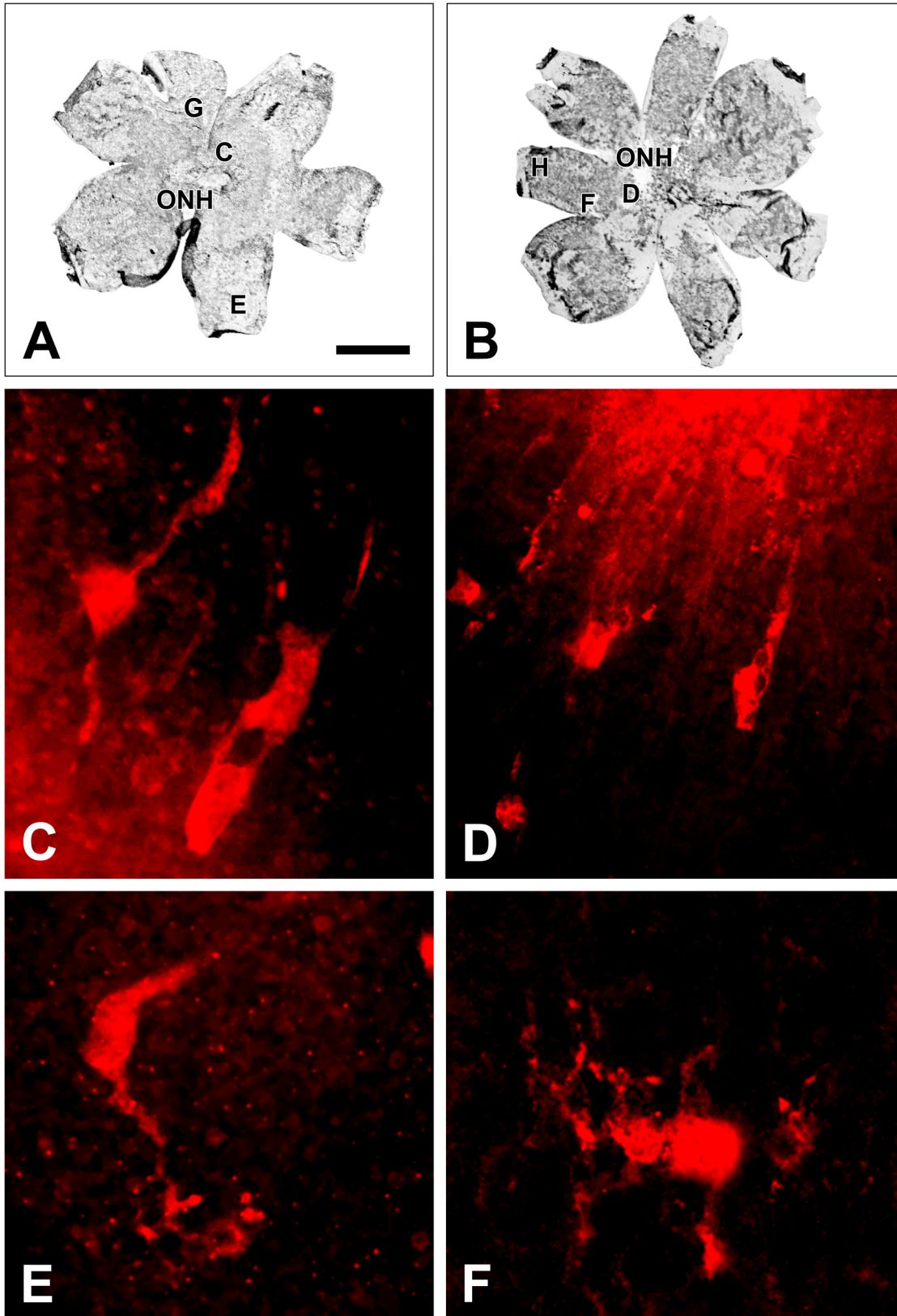
**Fig. 8.** Distribución de las células microgliales en retinas de ratones adultos (P60). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. **A:** las células microgliales, Iba-1 positivas, están presentes en la capa de fibras nerviosas/ capa de células ganglionares (NFL/GCL), capa plexiforme interna (IPL) y capa plexiforme externa (OPL), pero no en las capas nucleares interna (INL) y externa (ONL). El marcaje con Hoechst (azul) tiñe todos los núcleos celulares y revela la localización de las capas de la retina. ES, segmentos externos de los fotorreceptores. **B:** Detalle de una célula microglial ramificada, Iba-1 positiva (rojo), con su soma y varios procesos horizontales en la OPL; un proceso vertical se puede observar en la INL. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  en A; 16  $\mu\text{m}$  en B.

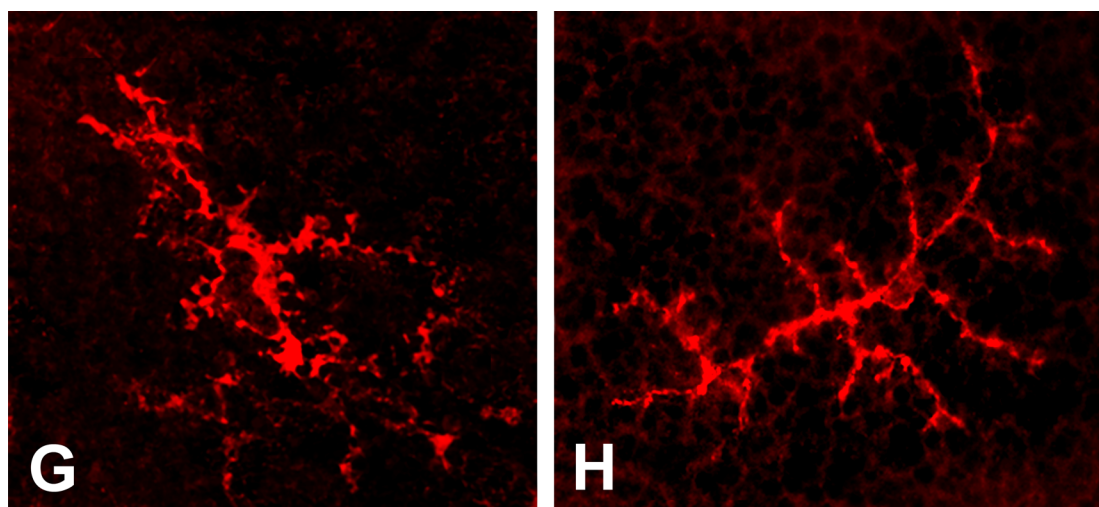




**Fig. 9.** Dibujos de cámara clara de secciones de retinas de ratón marcadas con anti-Iba-1 a diferentes edades postnatales, desde P0 a P60 (la edad se indica en cada una de ellas). Los puntos muestran la localización de los somas de las células microgliales. Las capas nucleares de las retinas se han sombreado en gris. NFL/GCL, capa de las fibras nerviosas/capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa; ES, segmentos externos de los fotorreceptores; NbL, capa neuroblástica. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

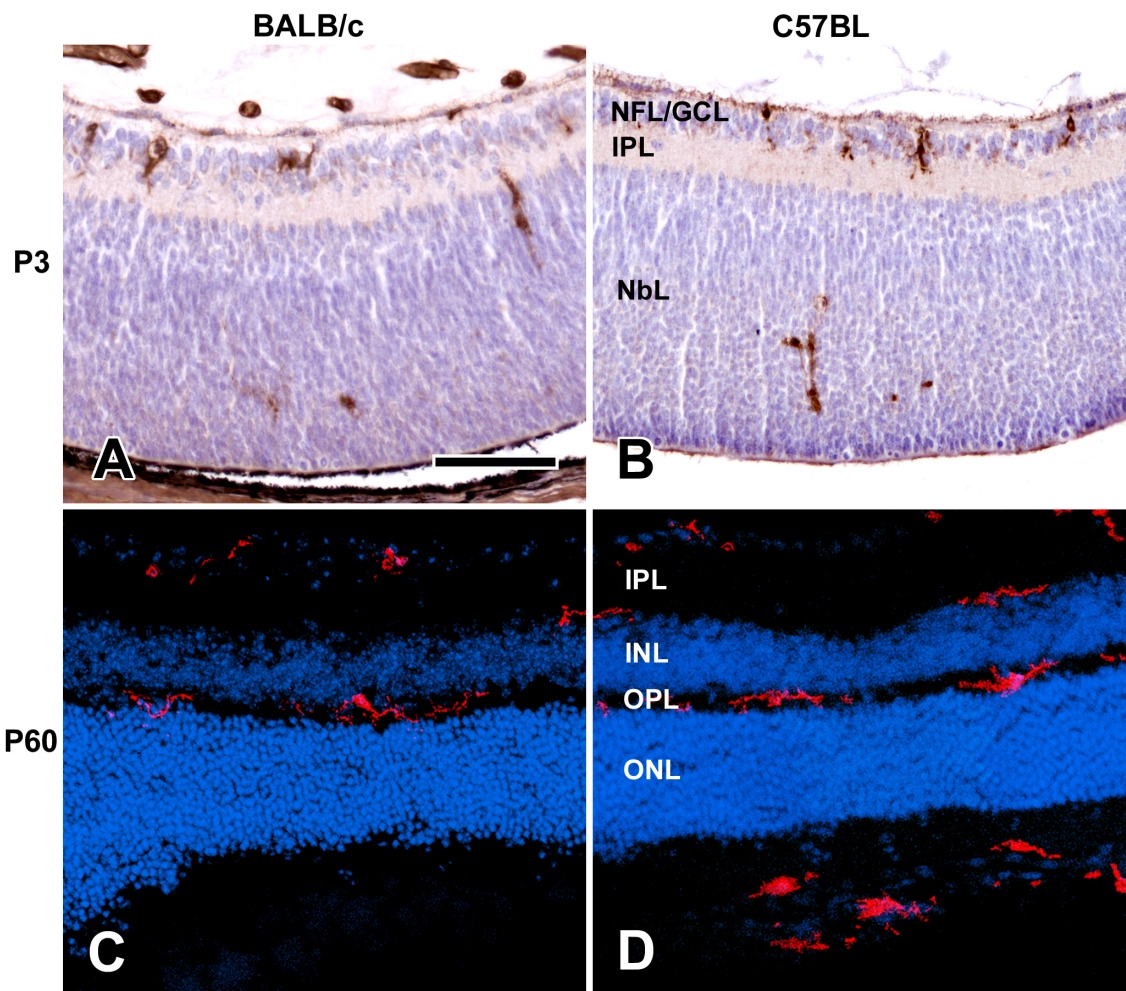






**Fig. 10.** Distribución de las células microgliales en extensiones de retinas de ratón marcadas con el anticuerpo anti-Iba-1. **A, B:** Imágenes obtenidas mediante contraste de interferencia de las retinas completas en los estadios P0 (A) y P3 (B), en las que se muestra la localización de las regiones aumentadas en C-H. **C-F:** células Iba-1 positivas en las proximidades de la cabeza del nervio óptico (C, D) o en zonas más periféricas (E, F), de retinas de P0 (C, E) y P3 (D, F), respectivamente; las zonas donde aparece un fuerte marcaje de fondo (en C y D) corresponden a regiones que contienen numerosas fibras, alrededor de ONH. **G, H:** células Iba-1 positivas en el espacio subretiniano de retinas de P0 (G) y P3 (H). ONH, cabeza del nervio óptico. Barra de escala: 500  $\mu\text{m}$  en A, B; 8.5  $\mu\text{m}$  en C; 33  $\mu\text{m}$  en D; 17  $\mu\text{m}$  en E-G; 22  $\mu\text{m}$  en H.

**Fig. 11.** Distribución de las células microgliales en secciones transversales de retinas de ratones pigmentados (cepa C57BL/6, **A, C**) y albinos (cepa BALB/c, **B, D**). **A, B:** Células microgliales marcadas con lectina de tomate y reveladas con peroxidasa en retinas del estadio P3. **C, D:** Imágenes de confocal que muestran la distribución de las células microgliales en la retina adulta (P60), marcadas con el anticuerpo anti-Iba-1 (rojo); la tinción nuclear con Hoechst (azul) revela la localización de las capas retinianas. La distribución de las células microgliales es semejante en ambas cepas durante el desarrollo postnatal y en el adulto. NFL/GCL, capa de las fibras nerviosas/capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa; NbL, capa neuroblástica. Barras de escala: 75  $\mu\text{m}$  en A, B; 51  $\mu\text{m}$  en C, D.





## DISCUSIÓN

La utilización conjunta de diferentes marcadores microgliales a lo largo de este trabajo nos permiten suponer que la mayor parte, si no todas, las células microgliales presentes en la retina murina han sido tenidas en cuenta en este estudio. Por ello, este trabajo ofrece una visión completa de la presencia y los cambios en la distribución de la microglía a lo largo del desarrollo de la retina en el ratón.

### **Entrada de las células macrófago/microgliales en la retina murina**

Las células macrófago/microgliales ya estaban presentes en las retinas del estadio embrionario más temprano considerado en este estudio, E11.5. Sus características morfológicas y distribución son similares a las previamente descritas durante los estadios embrionarios tempranos en la retina de rata (Ashwell *et al.*, 1989) y la retina de aves (Cuadros *et al.*, 1991).

Estas células parecen proceder del vítreo y deben atravesar la superficie vitreal de la retina para entrar en el neuroepitelio. La observación frecuente de células marcadas en las proximidades del borde vitreal de la retina y las numerosas células marcadas presentes en el vítreo cercanas a la retina apoyan esta hipótesis.

El número de células microgliales en la retina murina aumenta desde el estadio de E12.5 hasta el final del desarrollo embrionario. Durante este periodo, las células marcadas se observaban muy cerca de la superficie vitreal, aparentemente entrando en el neuroepitelio de la retina. Las células microgliales también pueden observarse en zonas periféricas de la retina, cercanas al cuerpo ciliar, a partir del estadio de E12.5. Estas observaciones sugieren que las células microgliales entran en la retina embrionaria siguiendo dos rutas: (1) cruzando la superficie vitreal de la retina y (2) entrando en la retina periférica tras migrar desde regiones no neurales del cuerpo ciliar. La



entrada de células microgliales a través del margen ciliar ha sido descrita también en la retina humana y en la de codorniz (Díaz-Araya *et al.*, 1995; Provis *et al.*, 1996; Marín-Teva *et al.*, 1999b). La entrada de células microgliales por ambas rutas podría contribuir al incremento en el número de células marcadas observado a lo largo del desarrollo embrionario.

La densidad de células microgliales desciende notablemente coincidiendo con el nacimiento (P0), lo que plantea interrogantes acerca del destino de la gran cantidad de células microgliales observadas en los últimos estadios de desarrollo embrionario. Podría suponerse que esta disminución en la densidad de microglía pudiera ser consecuencia del incremento de tamaño de la retina en edades postnatales. Sin embargo, también aparecen diferencias evidentes en cuanto a la distribución de las células microgliales entre las retinas embrionarias y las postnatales (Fig. 4). Así, hay muchas menos células en la capa NBL de las retinas de los ratones recién nacidos que en las retinas de animales antes del nacimiento. Por tanto, la densidad microglial parece descender no sólo a causa del crecimiento retiniano sino también como consecuencia de la desaparición de algunas de las células marcadas en las retinas embrionarias. Un descenso similar de la densidad microglial en la retina durante los estadios perinatales ha sido descrito en la rata (Ashwell *et al.*, 1989) y el conejo (Ashwell, 1989). Una de las causas posibles de esta disminución es la degeneración masiva de células microgliales; sin embargo, no observamos núcleos de células microgliales marcados con TUNEL, lo que parecía descartar esta posibilidad. En este contexto, el trabajo de Dalmau *et al.* (2003) también muestra una escasa frecuencia de células microgliales en degeneración en diferentes regiones del cerebro de rata en desarrollo. La salida de células microgliales de la retina, por tanto, parece ser la causa más probable para explicar el acusado descenso en la densidad microglial en P0.

Un hallazgo importante de nuestro estudio fue que la densidad microglial en la retina vuelve a incrementarse durante la primera semana de desarrollo postnatal, alcanzando su máximo al final de la primera semana de desarrollo postnatal. A partir de P7, la densidad de células microgliales en la retina murina volvía a descender. Resultados similares han sido descritos en la retina de rata (Ashwell *et al.*, 1989). Puesto que no se había observado una proliferación

llamativa de las células microgliales durante la primera semana de desarrollo postnatal, el incremento en la densidad de células microgliales presente entre P0 y P7 debe estar relacionado con la entrada de nuevas células microgliales en el parénquima de la retina. La observación de abundantes células microgliales que aparentemente están cruzando el borde vitreal de la retina entre P0 y P7 apoyaría esta hipótesis. A partir de P7, sin embargo, el número de células microgliales observadas entrando a la retina desde el vítreo es muy escaso.

Las variaciones en la densidad de células microgliales pueden, por tanto, estar relacionadas con tres factores: (1) la aparición de nuevas células microgliales, bien por proliferación de las existentes o bien por entrada de nuevas células desde el exterior de la retina neural; (2) el incremento de tamaño del parénquima retiniano y (3) la desaparición de células microgliales debido a la muerte celular. No hemos logrado determinar qué factores conducen a la brusca disminución de la densidad microglial en la retina observada en P0, ya que como se ha dicho no observamos células microgliales en degeneración (factor 3). Durante la primera semana postnatal, sin embargo, se observa un aumento de la densidad microglial seguramente debido a que la incorporación de nuevas células a la retina (factor 1) compensaría el incremento de tamaño que sufre la retina (factor 2) durante ese periodo. Por el contrario, en etapas más avanzadas del desarrollo postnatal hay una disminución (o completo cese) de la entrada de nuevas células microgliales en la retina, de forma que el factor 1 no logra compensar el notable incremento del tamaño de la retina (factor 2) con lo que se produce una mayor “dilución” de las células microgliales y su densidad disminuye.

Se había propuesto que las células microgliales entran en la retina desde los vasos sanguíneos antes del establecimiento de la barrera sangre-retina (Thanos *et al.*, 1996) y que esta entrada está relacionada con fenómenos de muerte celular que ocurren en la retina (Hume *et al.*, 1983). Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró ninguna correlación clara entre la entrada de células microgliales y la vascularización. De hecho, se observaron células microgliales en la retina antes de su invasión por vasos sanguíneos (véase Dorrell y Friedlander (2006) y Fruttiger (2007), para una revisión acerca de la

vascularización de la retina de ratón), lo que excluye que esas células entrasen en la retina desde la sangre. Estas observaciones están de acuerdo con las obtenidas en la retina avascular de la codorniz, que muestran que los precursores microgliales colonizan el parénquima retiniano a pesar de la ausencia de vasos sanguíneos (Navascués *et al.*, 1995). Nuestras observaciones, por el contrario, sugieren que numerosos precursores microgliales provienen del vítreo; estas células pueden alcanzar el vítreo desde los numerosos vasos de la vasculatura hialoidea, formación transitoria que desaparece al final de la segunda semana postnatal (Ito y Yoshioka, 1999).

Respecto a la posible relación entre muerte celular y penetración de la microglía en la retina, hay que decir que los fenómenos de muerte celular no son frecuentes en las retinas de E15-P1 (Péquignot *et al.*, 2003) edades en las que se observaron nuevas células microgliales en la retina. La entrada de células microgliales en ausencia de muerte celular sugiere que los dos procesos son independientes. En estadios perinatales hay abundante muerte celular en la retina de ratón (Young, 1984) y algunas células microgliales situadas en las proximidades del borde vitreal estaban en relación topográfica con fragmentos de células muertas, pero muchas otras células en esa localización parecían ignorar la presencia de células muertas en las proximidades.

### **Patrón de distribución de las células microgliales en la retina murina durante el desarrollo y en el adulto**

En la retina murina en desarrollo se han observado dos tipos diferentes de células macrófago/microgliales. Las primeras tienen aspecto de macrófago, están ya presentes en las retinas de E11.5 y E12.5, y parecen estar en estrecha relación con los procesos de muerte celular asociada al curso de los axones de las células ganglionares y su incorporación al nervio óptico. La presencia de células de tipo macrófago relacionadas con la muerte celular en la retina había sido descrita previamente durante el desarrollo embrionario

temprano del ratón (Rodríguez-Gallardo *et al.*, 2005), y otros mamíferos (Knabe y Kuhn, 1999) y las aves (Cuadros *et al.*, 1991; Frade y Barde, 1998).

A partir de E12.5, en la retina neural aparecen otras células marcadas con una morfología diferente y sin una relación evidente con los restos celulares de células en proceso de muerte. Es posible, por tanto, que existan dos oleadas diferentes de células macrófago/microgliales con funciones diferentes que entren en la retina de forma sucesiva durante el desarrollo, la primera oleada hacia E11.5-E12.5 y la segunda, a partir del estadio de E12.5. Este fenómeno se aprecia claramente en la retina de codorniz, que contiene células de tipo macrófago entre E3 y E5 que desaparecen hacia E6, antes de que la retina sea re-colonizada por los precursores microgliales, hacia E7 (Navascués *et al.*, 1995). La distinción entre las dos oleadas de invasión de la retina por células de tipo macrófago y precursores microgliales es más difícil de establecer en la retina murina que en la de codorniz ya que las dos oleadas parecen estar, en el caso del ratón, solapadas en el tiempo y en el espacio, dado el pequeño tamaño de la retina murina y su diferente programa de desarrollo. En cualquier caso, la retina murina hacia E13.5 contiene células marcadas que pueden considerarse precursores microgliales, puesto que su destino puede ser trazado durante todo el desarrollo hasta la aparición de la microglía madura.

Nuestros resultados muestran que las células microgliales están fundamentalmente restringidas a las capas más vitreales en los estadios inmediatos al nacimiento, pero progresivamente van colonizando las capas más esclerales en los siguientes días de desarrollo postnatal. Por tanto, podemos proponer que las células microgliales se desplazan desde las capas vitreales a las esclerales siguiendo un proceso de migración radial vítreo-escleral similar al ya descrito para la microglía de la retina en desarrollo de la codorniz (Navascués *et al.*, 1995; Sánchez-López *et al.*, 2004). Durante esta migración, las células microgliales que inicialmente están localizadas en la capa NFL/GCL tras su entrada en la retina, colonizan sucesivamente las capas IPL, INL y OPL sin llegar nunca a entrar en la ONL. Las células microgliales abandonarían por tanto la capa NFL/GCL durante el proceso de migración radial, lo que explicaría el escaso número de microglía en estas capas a partir

de P14, aunque algunas de ellas persisten en la capa NFL/GCL en la retina adulta.

En la retina murina adulta, las células microgliales se localizan en las capas NFL, GCL, IPL, OPL y, ocasionalmente, en la INL, pero no se observan somas de microglía en la ONL, aunque ocasionalmente aparecen prolongaciones de células microgliales en esta capa. Este patrón de distribución es comparable al descrito previamente en varias especies (Schnitzer, 1989; Navascués *et al.*, 1994; Harada *et al.*, 2002; Hughes *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008). Aunque la presencia de microglía en la capa OPL de algunas especies ha sido materia de debate (véase Schnitzer, 1989), nuestros resultados muestran claramente su presencia en la OPL de la retina murina, al igual que ocurre en la de aves (Navascués *et al.*, 1994; Sánchez-López *et al.*, 2004) y en el conejo (Schnitzer, 1989). Cabe destacar la presencia de algunos somas en la INL de la retina murina adulta, mientras que en la retina de codorniz sólo están presentes en esta capa durante el desarrollo, pero no en la retina adulta (Navascués *et al.*, 1994; Marín-Teva *et al.*, 1999c).

No es extraño que los patrones de migración en las retinas de mamíferos y aves sean diferentes, debido a las grandes diferencias existentes en la vascularización de la retina en ambos grupos. En las aves no existen vasos sanguíneos en la retina y en el vítreo, sino que éstos están concentrados en un órgano vascular, el pecten, que aparece en fases iniciales del desarrollo y proyecta en el cuerpo vítreo, en la región central del ojo; las células microgliales en las aves migran tangencialmente desde esta región.

### **Observación de extensiones totales de retina**

Los resultados obtenidos mediante el uso de las extensiones totales de retinas en los primeros días de desarrollo postnatal no han podido confirmar la existencia de una migración tangencial (Navascués *et al.*, 1995) de las células microgliales desde el centro a la periferia de la retina murina. Las características morfológicas de las células microgliales cercanas al disco óptico, tal y como se aprecian en las extensiones de retina, sugieren que se

mueven desde el centro a la periferia. Sin embargo, no se observan frentes de invasión ni zonas libres de células microgliales en ninguno de los estadios estudiados. Por tanto, no podemos concluir que exista una migración tangencial centro-periférica de las células microgliales en la retina murina, fenómeno que sí se ha demostrado en aves (Navascués *et al.*, 1995; Marín-Teva *et al.*, 1999c).

Dadas las marcadas diferencias existentes entre aves y mamíferos en cuanto al tamaño de la retina y su modo de vascularización, no deben sorprender las posibles diferencias respecto al patrón de migración de la microglía entre estos dos grupos taxonómicos. Así, en el ojo de las aves, los vasos sanguíneos están organizados en el pecten y, tal y como ya se ha comentado en el apartado anterior, los precursores microgliales migran tangencialmente desde esta región central. Sin embargo, durante el desarrollo del ojo del ratón, la vasculatura hialoidea está presente en el vítreo y muy cercana a la superficie vitreal de la retina neural. Este estudio muestra la presencia de numerosas células del linaje macrofágico que, localizadas entre los vasos hialoideos en el vítreo, atraviesan el borde vitreal de la retina neural durante la primera semana de desarrollo postnatal para dar lugar a la microglía retiniana. Esta entrada de precursores microgliales desde el vítreo parece tener lugar en toda la superficie de la retina, por lo que parece que no sería necesaria una migración de precursores microgliales desde una región específica para colonizar la retina completa.

### **Diferencias en la distribución de las células microgliales en retinas albinas y pigmentadas**

Nuestro estudio no ha revelado diferencias en el patrón de distribución de las células microgliales entre las retinas de ratones pigmentados (C57BL) y albinos (BALB/c) en ninguno de los estadios estudiados, es decir, que no se han encontrado diferencias entre estas dos cepas en cuanto a la distribución de la microglía retiniana ni durante el desarrollo ni en animales adultos. Otros autores han mostrado diferencias en el número de células macrófago /microglía

presentes en el espacio subretiniano entre cepas pigmentadas y no pigmentadas de ratones, durante la primera semana de desarrollo postnatal (Ng y Streilein, 2001). La ausencia de diferencias en cuanto al número de células microgliales en el espacio subretiniano entre estas dos cepas podría achacarse al hecho de que los anticuerpos utilizados para marcar microglía son distintos. El marcador utilizado por Ng y Streilein (2001), anti-5D4, no marca los estadios más iniciales de desarrollo de las células microgliales y, por tanto, las diferencias entre cepas podrían atribuirse a este hecho. A favor de esta hipótesis también se muestran los resultados de Zhang *et al.* (2005b), que describen que la microglía marcada con el anticuerpo anti-5D4 sólo se hace abundante en el espacio subretiniano tras la aparición previa de células microgliales marcadas con lectina pero negativas para anti-5D4. No podemos descartar, sin embargo, que estudios cuantitativos más exhaustivos revelen algunas diferencias en cuanto al número de células microgliales retinianas de ratones albinos y pigmentados.

Aunque no se hayan encontrado diferencias significativas en el patrón de distribución de las células microgliales retinianas entre las dos cepas de ratón estudiadas y, por ello, se puedan utilizar ambas cepas indistintamente para el estudio de la distribución general de la microglía en la retina murina, sería necesario un estudio cuantitativo más detallado para verificar la existencia o no de diferencias en el número de células microgliales entre las dos cepas.

### **Factores que afectan la migración de las células microgliales en la retina**

La distribución de las células microgliales en la retina muestra un claro esquema a lo largo de su desarrollo; dichas células adquieren diferentes morfologías durante su migración a través de las diferentes capas retinianas (Sánchez-López *et al.*, 2004), hasta alcanzar el patrón de distribución observado en la retina adulta. El resultado final de esta pauta de migración es que las células microgliales no quedan, finalmente, distribuidas de forma homogénea por toda la retina (estando la ONL, por ejemplo, desprovista de

células microgliales en las retinas adultas sanas). Diferentes factores han sido propuestos, por tanto, como candidatos implicados en el desarrollo de este patrón de distribución de las células microgliales en la retina.

Dado que las células microgliales participan en la eliminación de restos celulares, se propuso que la distribución de los fenómenos de muerte celular en el SNC podría afectar al patrón de distribución de la microglía (Hume *et al.*, 1983; Wong y Hughes, 1987). Sin embargo, nuestras observaciones no nos han permitido establecer una relación directa entre la distribución de la muerte celular en la retina (Young, 1984; Péquignot *et al.*, 2003) y la colonización de la misma por las células microgliales. La presencia de muerte celular no es un fenómeno muy frecuente en la retina murina entre los estadios de E15 y P1 (Péquignot *et al.*, 2003), edades a las que hemos observado la presencia de nuevas células microgliales dentro de la retina. La entrada de células microgliales en ausencia de muerte celular sugiere que los dos procesos son independientes. En estadios perinatales, cuando la muerte celular en la retina se hace mucho más frecuente (Young, 1984), se observan algunas células microgliales, cercanas al borde vitreal, en contacto con fragmentos de células muertas, aunque muchas otras células microgliales parecen ignorar por completo células en proceso de muerte relativamente próximas. Por tanto, la hipótesis de que la presencia de muerte celular programada contribuiría al establecimiento del patrón de distribución de la microglía no ha podido ser corroborada por nuestros resultados. En retinas patológicas, sin embargo, las células microgliales migran hacia regiones que presentan degeneración neuronal (Thanos, 1992; Thanos *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 2003).

De igual manera, otros autores han sugerido que la migración de las células microgliales estaría relacionada con el desarrollo de los vasos sanguíneos dentro de la retina. Se ha propuesto que las células microgliales colonizarían la retina a partir de los vasos sanguíneos, antes del establecimiento de la barrera hematoencefálica (Thanos *et al.*, 1996) y que esta llegada de microglía estaría relacionada con procesos de muerte celular en la retina (Hume *et al.*, 1983). Sin embargo, la colonización de la retina neural por la microglía antecede al desarrollo de los plexos vasculares en el ratón (Fruttiger, 2002), y no hemos encontrado correlación entre la entrada de



microglía y la vascularización de la retina en desarrollo en el presente trabajo. De hecho, las células microgliales ya están presentes en el interior de la retina antes de que ésta sea invadida por los vasos sanguíneos (véase el trabajo de Dorrell y Friedlander, 2006, para una detallada revisión de la vascularización de la retina murina), descartando la posible entrada de células microgliales vía sanguínea. Otras observaciones llevadas a cabo en la retina avascular de la codorniz y en las regiones avasculares de la retina de conejo, muestran que los precursores microgliales colonizan el parénquima de la retina a pesar de la ausencia de vasos sanguíneos (Navascués *et al.*, 1995; Schnitzer, 1989). El establecimiento del patrón de distribución de las células microgliales en la retina humana ha sido descrito como un proceso que ocurre en dos fases, la primera de ellas independiente de la vascularización y la segunda, asociada al desarrollo de los vasos sanguíneos de la retina (Diaz-Araya *et al.*, 1995).

Recientemente se ha planteado una nueva visión de la relación entre microglía y vascularización, al sugerir que el desarrollo de la vasculatura de la retina dependería de la presencia de células microgliales, de tal manera que no se podrían generar vasos sanguíneos normales en ausencia de microglía (Checchin *et al.*, 2006; Ritter *et al.*, 2006).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que la mayor parte de los precursores microgliales entran en la retina en desarrollo desde el vítreo, que a su vez habría sido colonizado desde los numerosos vasos sanguíneos de la vasculatura hialoidea, formación transitoria que desaparece hacia el final de la segunda semana de desarrollo postnatal (Ito y Yoshioka, 1999).

Otros factores, además de la muerte celular y la vascularización, pueden condicionar la migración y la distribución de las células microgliales en la retina. Por ejemplo, se ha propuesto que la disposición de algunas células retinianas podría servir como sustrato para la migración de las células microgliales y condicionar su distribución, de forma semejante a como ocurre con las células endoteliales, que se desplazan sobre los astrocitos (Dorrell y Friedlander, 2006). Así, se ha descrito que las células microgliales de la retina en desarrollo de codorniz migran adheridas a las prolongaciones de las células de Müller (Marín-Teva *et al.*, 1998; Sánchez-López *et al.*, 2004).

En contraste con la gran cantidad de estudios acerca de moléculas que determinan la migración de las células endoteliales (Dorrell y Friedlander, 2006), poco se sabe sobre las moléculas implicadas en la migración de la microglía en la retina del ratón en desarrollo. La tenascina, molécula de localización extracelular, parece jugar un papel en la regulación de la migración y la ramificación de las células microgliales (Sánchez-López *et al.*, 2004). En la retina murina, sin embargo, se desconocen mecanismos de este tipo. En el caso de retinas dañadas sí se ha propuesto que la migración de la microglía hacia las regiones donde se produce la degeneración celular está relacionada con el incremento en la expresión de moléculas de señalización, como las quimioquinas (Zeng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005b), pero la implicación de este tipo de moléculas en la migración y establecimiento de las células microgliales durante el desarrollo normal de la retina no ha sido aún investigado.



## **CAPÍTULO II**

### **RESPUESTA MICROGLIAL A LA FOTODEGENERACIÓN INDUCIDA POR LUZ INTENSA**

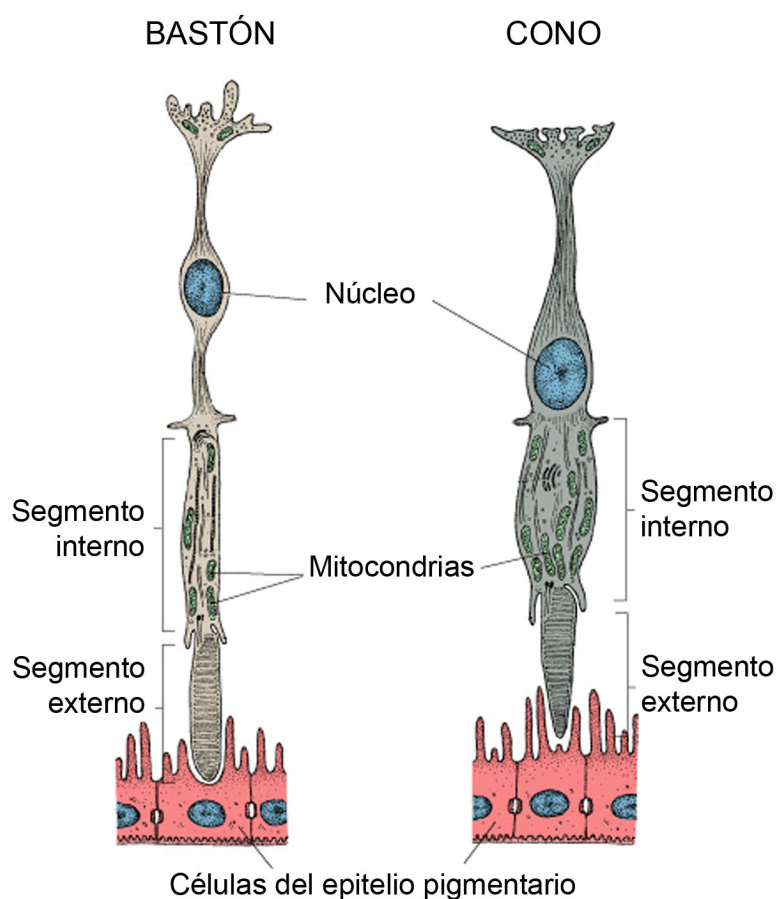


## INTRODUCCIÓN

En la retina de los mamíferos hay dos tipos diferentes de fotorreceptores, los conos y los bastones. En concreto, en la retina humana, hay alrededor de 120 millones de bastones, mientras que sólo hay unos 6 millones de conos (Junqueira y Carneiro, 1996). Conos y bastones presentan sensibilidades diferentes a los estímulos luminosos; los bastones son muy sensibles a la luz, y se piensa que son los fotorreceptores que funcionan en condiciones de luz baja (visión escotópica); los conos, por su parte, son sensibles a la luz de intensidad media-alta y permiten una visión precisa y la percepción de los colores (visión fotópica), debido a que existen por lo menos tres tipos diferentes de conos (rojos, verdes y azules), con sensibilidades distintas para las longitudes de onda y, por tanto, para los diferentes colores.

Conos y bastones presentan una estructura similar (Fig. I), con una prolongación celular gruesa que proyecta hacia el epitelio pigmentario desde la región que contiene el núcleo. Esta prolongación tiene dos regiones bien definidas, denominadas segmento externo e interno, que se encuentran unidas por un cilio estrecho y corto. Los segmentos externos de los fotorreceptores están constituidos por discos de membrana plasmática estrechamente apilados que contienen los pigmentos fotosensibles. En los segmentos internos, por otra parte, radica gran parte de la maquinaria biosintética y de producción de energía que requieren estas células para la transducción de los estímulos visuales. Parte importante de los requerimientos nutricionales y energéticos de estas células se debe a que los segmentos externos sufren una renovación constante, de forma que los discos de membrana *viejos* son eliminados en la porción distal de los segmentos externos y los discos *nuevos* se incorporan simultáneamente en la porción proximal (más cercana al núcleo) del segmento. Por ello es necesaria la síntesis continuada de componentes de membrana (incluidos los componentes específicos de la función fotorreceptora, tales como pigmentos visuales y proteínas de la cascada de transducción) y un sistema de transporte eficaz que conduzca los diferentes componentes recién formados hasta su localización en los segmentos externos. Las células del epitelio

pigmentario juegan un papel imprescindible en el mantenimiento y renovación de los segmentos externos (Bazan, 2006).



Copyright 2003 Lippincott Williams and Wilkins

**Fig. I.-** Diagrama esquemático de la estructura de los fotorreceptores de la retina. Los segmentos externos están estrechamente asociados con el epitelio pigmentario adyacente (tomado de Ross y Pawlina, 2007).

Mantener el estado funcional de los fotorreceptores requiere un alto aporte energético que posibilite el correcto funcionamiento de los sistemas biosintético y de transporte (Lev, 2001). Esto hace que los fotorreceptores sean un tipo celular especialmente sensible a los factores internos y externos que interfieran en su función de transducción de la señal luminosa en señal nerviosa (Fain, 2006). A pesar de sus elevados requerimientos energéticos, los fotorreceptores no reciben vascularización directa, ya que los vasos

sanguíneos retinianos no penetran en la ONL para no interferir en la captación de la señal luminosa (Fruttiger, 2007); el aporte de nutrientes y de oxígeno que precisan les llega por difusión desde los plexos vasculares situados en la coroides y en la capa plexiforme externa, OPL (Stone *et al.*, 1999).

Esta comprometida situación, altos requerimientos energéticos pero limitado aporte de nutrientes y oxígeno, hace que los fotorreceptores sean células especialmente sensibles. Por ello no es de extrañar que este tipo celular esté implicado en un buen número de enfermedades degenerativas que afectan a la retina, como la retinosis pigmentaria, la degeneración macular asociada a la edad y el síndrome de Usher (Delyfer *et al.*, 2004; Bazan, 2006; Kremer *et al.*, 2006), en las que se produce degeneración de los fotorreceptores antes de que se observen alteraciones en otros tipos neuronales de la retina. La retinosis pigmentaria está constituida por un grupo de retinopatías hereditarias, genéticamente heterogéneas y actualmente incurables, que constituyen la principal causa de ceguera en individuos adultos, con una incidencia de 1 por cada 3000-5000 individuos (Kalloniatis y Fletcher, 2004; Haim, 2002). Los afectados pierden progresivamente la visión periférica debido a la degeneración de los bastones y, posteriormente, se produce la muerte de los conos y la degeneración del epitelio pigmentario hasta la pérdida total de la visión. Por otra parte, un elevado número de personas ancianas sufre la pérdida de visión como consecuencia de la degeneración macular asociada a la edad, contra la que no existe prevención. La mácula proporciona la visión central y la agudeza visual necesarias para numerosas actividades cotidianas, como la lectura, imposibles de realizar cuando degeneran los fotorreceptores de esta región de la retina. El síndrome de Usher, también incurable, es una enfermedad hereditaria que implica un trastorno de la audición y un deterioro de la visión similar a la retinosis pigmentaria, que puede comenzar en la infancia o en la adolescencia y que termina en ceguera, como consecuencia de la muerte de los fotorreceptores.

El desarrollo de estas retinopatías está asociado a mutaciones de genes que intervienen en la transducción de la señal visual. En algunos casos, se ha podido determinar que estas enfermedades se deben a mutaciones de los genes que participan en la producción de los pigmentos visuales, como genes



que codifican la rodopsina (genes *rho*); en otros casos, son mutaciones que afectan a otros elementos de la cascada de fototransducción, como son las mutaciones que afectan a kinasas de rodopsina (genes *rhok*) o a la guanilato ciclasa (genes *retgc-1*); finalmente, también se ha visto que pueden ser producidas por mutaciones que afectan al funcionamiento normal de las células del epitelio pigmentario (Lev, 2001; Pierce, 2001). En la actualidad, se dispone de diferentes modelos animales que reproducen enfermedades degenerativas humanas (Chang *et al.*, 2001; Pierce, 2001; Chader, 2002). En el caso del ratón, se han descrito cepas con mutaciones espontáneas (como los alrededor de 15 tipos de ratones *rd* descritos hasta el momento o los ratones *rd*s) y cepas transgénicas que muestran degeneración de fotorreceptores (Pierce, 2001; Chang *et al.*, 2002, 2005a). En otras especies también se han caracterizado mutaciones que desencadenan la degeneración de fotorreceptores (Pierce, 2001), como las ratas RCS, en las que el epitelio pigmentario muestra una capacidad reducida de fagocitar las porciones eliminadas de los segmentos externos (Mullen y La Vail, 1976).

Se ha propuesto que los mecanismos de acción posibles de las diferentes mutaciones están incluidos en cuatro grandes grupos (Pierce, 2001): (i) mutaciones que producen la disrupción de la morfogénesis de los segmentos externos, (ii) mutaciones que ocasionan una sobrecarga metabólica de los fotorreceptores, (iii) mutaciones que provocan la disfunción de las células del epitelio pigmentario y, finalmente, (iv) mutaciones que conducen a la activación crónica de la fototransducción. Los fenómenos de degeneración relacionados con rasgos genéticos propios de las células del organismo se consideran factores intrínsecos de degeneración.

Además de por factores intrínsecos, los fotorreceptores también pueden degenerar por factores ambientales, externos e independientes del propio organismo. En este caso estamos ante una degeneración de fotorreceptores inducida por factores extrínsecos. Ya se ha hecho referencia a uno de estos factores, la concentración de oxígeno disponible para los fotorreceptores. Curiosamente, tanto la disminución de la cantidad de oxígeno disponible (hipoxia) como el aumento de la concentración de este gas (hiperoxia) desencadenan la degeneración de fotorreceptores en el adulto (Stone *et al.*,

1999; Wellard *et al.*, 2005). Determinados tratamientos químicos inducen la degeneración específica de los fotorreceptores en la retina; entre dichos tratamientos se incluye la administración de nitroprusiato de sodio (Osborne *et al.*, 2004; Fawcett y Osborne, 2007) o de N-metil-N-nitrosourea (Kiuchi *et al.*, 2002; Doonan *et al.*, 2003).

## Fotodegeneración

Otro factor intrínseco que desencadena la degeneración de fotorreceptores es la exposición a la luz. Lo mismo que sucede con otras células sensoriales, los fotorreceptores sufren degeneración tras una estimulación excesiva. Incluso niveles normales de intensidad luminosa pueden producir la degeneración de cierto número de fotorreceptores (Jacobson y McInnes, 2002). En definitiva, está bien establecido que tanto exposiciones de corta duración a luz intensa como exposiciones continuadas a luz de intensidad normal provocan degeneración de fotorreceptores (Noell *et al.*, 1966; Fain, 2006).

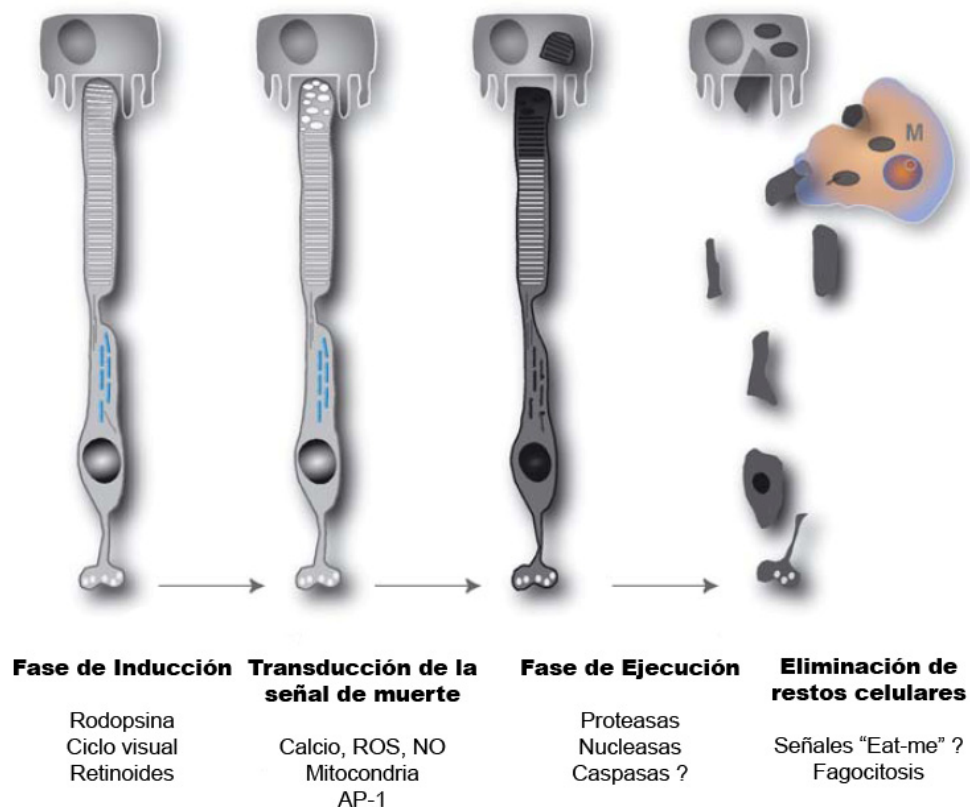
El proceso de fotodegeneración inducido por luz ha sido dividido en cuatro fases diferentes que van desde la inducción de la apoptosis en los fotorreceptores hasta la eliminación de los restos celulares (Wenzel *et al.*, 2005) (Fig. II):

1. **Inducción de la fotodegeneración.** Se ha visto que la sensibilidad a los factores que inducen fotodegeneración no es la misma en el caso de un tratamiento con luz intensa que en el caso de exposición prolongada a luz de intensidad moderada. En el primer caso, exposición a luz intensa, es necesaria la regeneración de la rodopsina de los bastones en el ciclo visual para que su continua activación produzca subproductos tóxicos para la célula. En concreto, los bastones de ratones knockout del gen *Rpe65*, en los que no se puede producir el ciclo visual debido a que carecen casi totalmente del pigmento visual rodopsina, son resistentes a la fotodegeneración; un efecto parecido se consigue inhibiendo la regeneración de la rodopsina durante el ciclo visual mediante la administración del anestésico

halotano (Keller *et al.*, 2001; Wenzel *et al.*, 2005). Por el contrario, la fotodegeneración asociada a la exposición continuada a luz moderada precisa que se dé el proceso de fototransducción, como se ha puesto de manifiesto en animales carentes de transduccina, proteína que acopla la excitación de rodopsina a la cascada de transducción de la señal (Hao *et al.*, 2002). En resumen, esta primera fase consiste en la recepción del estímulo luminoso que inicia el proceso de fotodegeneración.

2. **Transducción de la señal de muerte.** Las señales recibidas descritas anteriormente inducen en los fotorreceptores una serie de fenómenos que acaban con la activación del programa de muerte celular. Entre estos fenómenos están:
  - El incremento de los niveles de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que, entre otros efectos, produce la activación de la sintetasa de óxido nítrico (NOS), que libera óxido nítrico (NO), tóxico para la célula.
  - Cambios en la actividad y permeabilidad mitocondriales, aunque no está claro que haya liberación de citocromo c.
  - Producción de especies reactivas del oxígeno.
  - Expresión de factores de transcripción, como *c-fos*, cuyo papel no está bien determinado, pero cuya expresión aumenta con la exposición a la luz.
3. **Ejecución de la señal de muerte.** En esta fase se produce la actuación de efectores, como nucleasas y proteasas, que directamente producen la degradación de elementos claves del metabolismo celular. Cabe destacar que la implicación de las caspasas en el proceso de fotodegeneración no está clara (Nicotera, 2002): mientras que la caspasa-3 se encuentra incrementada en la fotodegeneración producida por luz intensa en la retina de rata (Perche *et al.*, 2007), estudios en el ratón han producido resultados contradictorios acerca del papel jugado por las caspasas en la fotodegeneración (Donovan y Cotter, 2002; Lohr *et al.*, 2006).
4. **Eliminación de los restos celulares.** Como consecuencia de la muerte de los fotorreceptores, se producen fragmentos celulares que

son fundamentalmente eliminados mediante fagocitosis. Las células que realizan esa fagocitosis pueden ser tanto células microgliales residentes de la retina como macrófagos reclutados en la capa de fotorreceptores por factores liberados durante la fotodegeneración. En cualquier caso, los fragmentos celulares producidos pueden presentar señales que estimulen la ingestión por parte de las células fagocíticas (*eat-me signals*, Grimsley y Ravichandran, 2003).



**Fig. II.** Esquema que recoge las cuatro fases propuestas en el proceso de degeneración de los fotorreceptores inducido por luz intensa, desde la fase de inducción de la apoptosis hasta la eliminación de los restos celulares por parte de los macrófagos infiltrados (M) y de las células del epitelio pigmentario (Wenzel *et al.*, 2005. Reproducido con permiso del editor).

### Tipos de muerte celular de los fotorreceptores

La degeneración de los fotorreceptores inducida por luz, al igual que la que se observa en animales con degeneración intrínseca de fotorreceptores, ha sido descrita como apoptosis (Shahinfar *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993;

Portera-Cailliau *et al.*, 1994; Remé *et al.*, 1998; Donovan *et al.*, 2001; Wenzel *et al.*, 2005), en base a la producción de fragmentos internucleosomales de ADN (observados en electroforesis de ADN) y marcaje de las células en degeneración con la técnica de TUNEL. Sin embargo, el proceso de apoptosis puede ocurrir según, al menos, dos modalidades: la dependiente de la activación de caspasa-3, como ejecutora del proceso de degeneración, y la independiente de caspasa-3. Ambas modalidades han sido descritas en la degeneración de los fotorreceptores, ya sea ésta debida a factores intrínsecos o inducida por exposición a una fuente luminosa.

En la retina de rata parece claro que la caspasa-3 juega un papel relevante en el proceso (Katai *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002; Leonard *et al.*, 2007; Perche *et al.*, 2007, 2008). En la retina de ratón, por el contrario, hay una amplia discusión acerca de la participación de la caspasa-3 y su importancia en el proceso degenerativo. En el caso de la degeneración inducida por factores intrínsecos hay artículos que muestran un incremento de la expresión del gen que codifica para esta caspasa y la presencia de caspasa-3 activada (Jomary *et al.*, 2001; Bode y Wolfrum, 2003), mientras que otros autores mantienen que no hay un aumento significativo de la expresión de caspasa-3 o de la producción de caspasa-3 activada (Sanges *et al.*, 2006; Sano *et al.*, 2006; Doonan *et al.*, 2003, 2007). Se han obtenido ratones en los que se ha eliminado o disminuido la actividad de la caspasa-3, ya sea mediante la administración de inhibidores o empleando animales con deficiencia genética para sintetizarla, en los que se produce un retraso o una disminución parcial de la degeneración de los fotorreceptores, pero no su abolición (Donovan *et al.*, 2001; Donovan y Cotter, 2002; Zeiss *et al.*, 2004).

Por tanto, diversos autores sostienen que la apoptosis de los fotorreceptores es independiente de la caspasa-3 y asocian la muerte de estas células a mecanismos alternativos. Por ejemplo, varios estudios ligan la degeneración a la presencia de caspasa-1 (Wu *et al.*, 2003; Samardzija *et al.*, 2006). También se han relacionado los fenómenos de degeneración con niveles elevados del factor inductor de la apoptosis (AIF; Sanges *et al.*, 2006) y de calpaínas (Donovan y Cotter, 2002; Sanges *et al.*, 2006). Asimismo se ha propuesto que durante la degeneración de los fotorreceptores también se

producen procesos de autofagia (Wenzel et al., 2005; Lohr et al., 2006; Kuntchithapautham et al., 2007a). De todo esto se concluye que la degeneración de los fotorreceptores se lleva a cabo por la combinación de diferentes mecanismos (Marigo, 2007; Kuntchithapautham y Rohrer, 2007b); aparentemente, cuando los mecanismos “limpios” (apoptosis y autofagia) son bloqueados se produce necrosis, proceso que origina una distorsión mucho mayor de la organización del SNC.

### **Degeneración progresiva de los fotorreceptores**

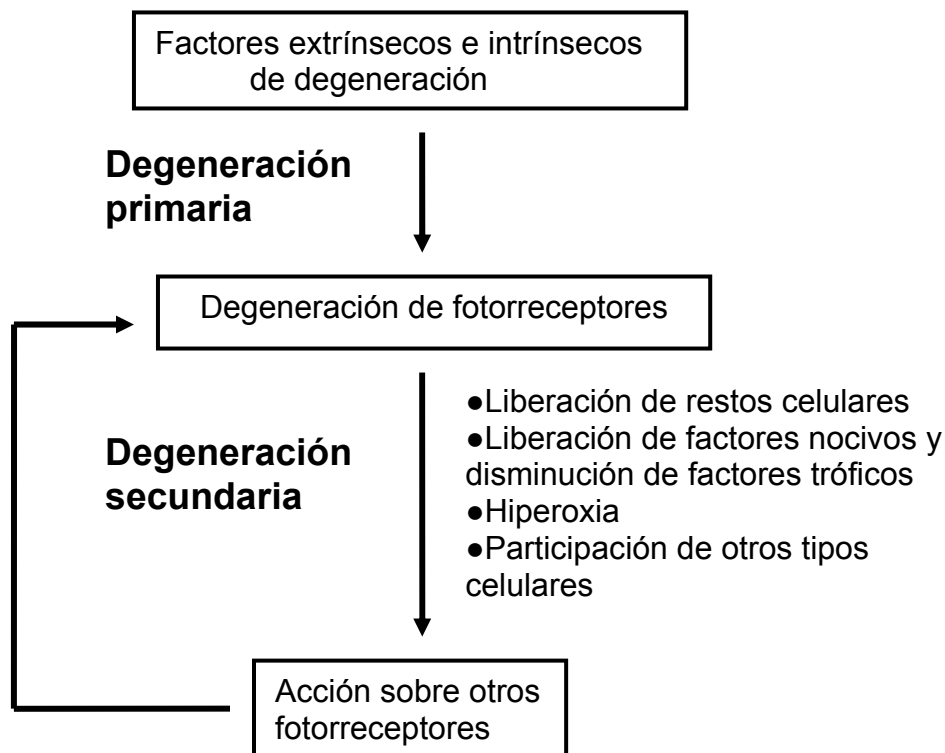
La fotodegeneración no afecta, inicialmente, a todas las regiones de la retina por igual. Sin embargo, de forma parecida a como ocurre en retinopatías humanas tales como la retinosis pigmentaria, el proceso de degeneración afecta progresivamente más y más fotorreceptores. De este modo, degeneran fotorreceptores bastante tiempo después de que el estímulo desencadenante del daño haya desaparecido. Esto permite hablar de dos fases de degeneración: degeneración primaria, asociada al estímulo desencadenante de la degeneración, y degeneración secundaria, aparentemente relacionada con la primera oleada de degeneración, pero que puede suceder por causas diferentes. Esta idea es similar a la hipótesis formulada por Ripps para explicar el efecto *bystander* (Ripps, 2002), cuyo objetivo es explicar por qué se producía la degeneración de conos sanos tras la degeneración de bastones portadores de modificaciones genéticas inductoras de degeneración en las diversas modalidades de retinosis pigmentaria. Ripps (2002) propone que la degeneración inicial de bastones produce una liberación de sustancias tóxicas o una falta de producción de sustancias neurotróficas que, una vez transmitidas a las células vecinas (conos, en el caso de los bastones) a través de las uniones *gap*, provocan la muerte de estas últimas de forma colateral o indirecta, a modo de efecto secundario (*bystander effect*) del daño inicial. La idea de que la degeneración inicial de un tipo celular conduzca a la degeneración de otro tipo ha sido reforzada por el resultado del análisis de los genes asociados a la degeneración de fotorreceptores en las retinas de los ratones *rd* (Rohrer et al., 2004): la dotación genética que se encuentra activada

en fases iniciales de la degeneración (los llamados *early genes*), es diferente de la que se encuentra activada en fases posteriores (*late genes*), lo que permite pensar que los mecanismos que operan en la degeneración primaria no son los mismos que los que actúan posteriormente y que no todos los fotorreceptores degeneran mediante el mismo mecanismo.

Por tanto, la degeneración primaria de los fotorreceptores se produciría como consecuencia directa del estímulo nocivo (en el caso de la degeneración por factores extrínsecos) o de una alteración del metabolismo celular que conduzca la célula a la muerte (en el caso de la degeneración por factores intrínsecos). Estos factores extrínsecos o intrínsecos, a su vez, provocan fenómenos secundarios de degeneración (Fig. III). La degeneración secundaria puede deberse a la liberación de sustancias tóxicas, como glutamato y productos de la apoptosis, por parte de los fotorreceptores que degeneran inicialmente, pero también a la menor producción de factores tróficos, debido a la disminución en el número de fotorreceptores que los producen (Ripps, 2002). También se ha propuesto que la degeneración puede propagarse debido al estrés oxidativo generado por las condiciones de hiperoxia creadas por la degeneración inicial de los fotorreceptores: cuando un fotorreceptor degenera, las células vecinas quedan expuestas a una mayor tensión de oxígeno, por el exceso de oxígeno que se crea al no consumirlo las células que degeneran (Stone *et al.*, 1999); de esta forma, se genera una situación de hiperoxia en determinadas regiones de la ONL que conduce a la degeneración de los fotorreceptores sometidos a este estrés oxidativo. En cualquier caso, se produce una degeneración que se expande en el espacio (afectando a zonas más extensas de la retina) y en el tiempo (produciéndose degeneración mucho después de que el estímulo nocivo inicial haya desaparecido).

Es preciso tener en cuenta que estas dos fases de degeneración, primaria y secundaria, pueden estar solapadas de tal forma que no sea fácil distinguir la una de la otra. También hay que considerar que no es fácil establecer diferencias entre distintas fases de degeneración en enfermedades genéticas, ya que, aunque la degeneración afecta a regiones cada vez más extensas de la retina y por tanto a nuevos fotorreceptores, muchos de ellos contienen el defecto genético que conduce a la degeneración.

En la fotodegeneración se puede distinguir más fácilmente entre la muerte de fotorreceptores debida ala estímulo inicial y la que se produce por un proceso posterior de degeneración: los fotorreceptores que degeneran varios días después de que el estímulo luminoso haya finalizado, deben hacerlo por degeneración secundaria. Es de destacar que, en la fotodegeneración, se observan fotorreceptores que degeneran más de 10 días después de haber cesado el estímulo luminoso (Wenzel *et al.*, 2005).



**Fig. III.-** Degeneración primaria y secundaria de fotorreceptores

La retina no es la única región del SNC en la que se ha descrito que un estímulo nocivo desencadene una primera oleada de degeneración a la que siguen otras en regiones vecinas. En algunas lesiones del SNC, como las producidas en la isquemia-reperfusión, se han descrito dos regiones claramente diferenciadas: el centro, directamente afectado por la lesión y en el



que se observan numerosos casos de necrosis y la penumbra, constituida por regiones vecinas en las que predominan los procesos apoptóticos (Ferrer y Planas, 2003; Ueda y Fujita, 2004). Los procesos degenerativos en ambas zonas no solo se diferencian espacialmente, sino también temporalmente (Ueda y Fujita, 2004), y la degeneración en la penumbra parece estar mediada por factores liberados por las células que degeneran en el centro de la lesión (Kaushal y Schlichter, 2008). Todo esto permite pensar que los procesos degenerativos que se producen en la penumbra son consecuencia de procesos anteriores en el centro de la lesión, de forma similar a lo que ocurre en la fotodegeneración.

### **Papel de las células gliales en la degeneración de los fotorreceptores**

Los agentes nocivos responsables de la posterior oleada de muerte, ya estén representados por la producción de factores tóxicos o por la falta de factores tróficos, podrían también provenir de células que sean activadas por la degeneración inicial de los fotorreceptores. Dos tipos celulares de la retina sufren modificaciones importantes a la vez que se produce la degeneración de los fotorreceptores: las células de Müller y las células microgliales, y, por tanto, se puede pensar que estas células juegan un cierto papel en los procesos degenerativos.

#### **Células de Müller**

Las células de Müller muestran gliosis ante diferentes tipos de lesiones; la gliosis de las células de Müller comprende tanto respuestas no-específicas (que aparecen siempre que este tipo celular se activa, sea cual sea el estímulo causal) y específicas (cuya expresión depende de la naturaleza del estímulo causal). Entre las no-específicas se encuentra la sobre-expresión de GFAP, que es utilizada con frecuencia para caracterizar cualquier situación patológica de la retina (Bringmann *et al.*, 2006). Entre las respuestas específicas generadas tras el tratamiento con luz, se encuentra la modificación de la distribución de los canales iónicos que intervienen en la regulación de la osmo-homeostasis de la retina (Iandiev *et al.*, 2008a). Estos autores proponen que

parte de la degeneración observada en la fotodegeneración es consecuencia de esta alteración en la distribución de iones y agua en la retina (Iandiev *et al.*, 2008b). Otros autores proponen que las células de Müller responden a diversos factores, como la presencia de factores neurotróficos, con la producción de factores secundarios que actuarían sobre los fotorreceptores (Harada *et al.*, 2003).

### **Células microgliales**

Las células microgliales también sufren importantes modificaciones coincidiendo con la degeneración de los fotorreceptores. Las células microgliales muestran una distribución muy clara en la retina adulta normal; en concreto, están ausentes de la ONL (Ashwell *et al.*, 1989; Navascués *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008). En respuesta a fenómenos degenerativos en la retina, cambian su distribución y aparecen en la ONL, coincidiendo con la degeneración de fotorreceptores que se da en diferentes situaciones patológicas: en distintos tipos de retinopatías humanas (Gupta *et al.*, 2003), en la degeneración intrínseca de fotorreceptores (Thanos, 1992; Roque *et al.*, 1996; Hughes *et al.*, 2003; Zeiss y Johnson, 2004a,b; Zeng *et al.*, 2005), en la degeneración inducida por luz intensa (Harada *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005), en el desprendimiento de retina (Lewis *et al.*, 2005), en la retinopatía diabética (Zeng *et al.*, 2000) y en la uveítis (Rao *et al.*, 2003). También se produce una concentración de células microgliales en regiones de degeneración en patologías que no afectan primariamente a los fotorreceptores, como es el caso de la deafferenciación de la retina por axotomía del nervio óptico (Schnitzer y Scherer, 1990; Thanos *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 2003; Engelsberg *et al.*, 2004; García-Valenzuela *et al.*, 2005) o el glaucoma (Wang *et al.*, 2000; Naskar *et al.*, 2002; Inman y Horner, 2007; Bosco *et al.*, 2008).

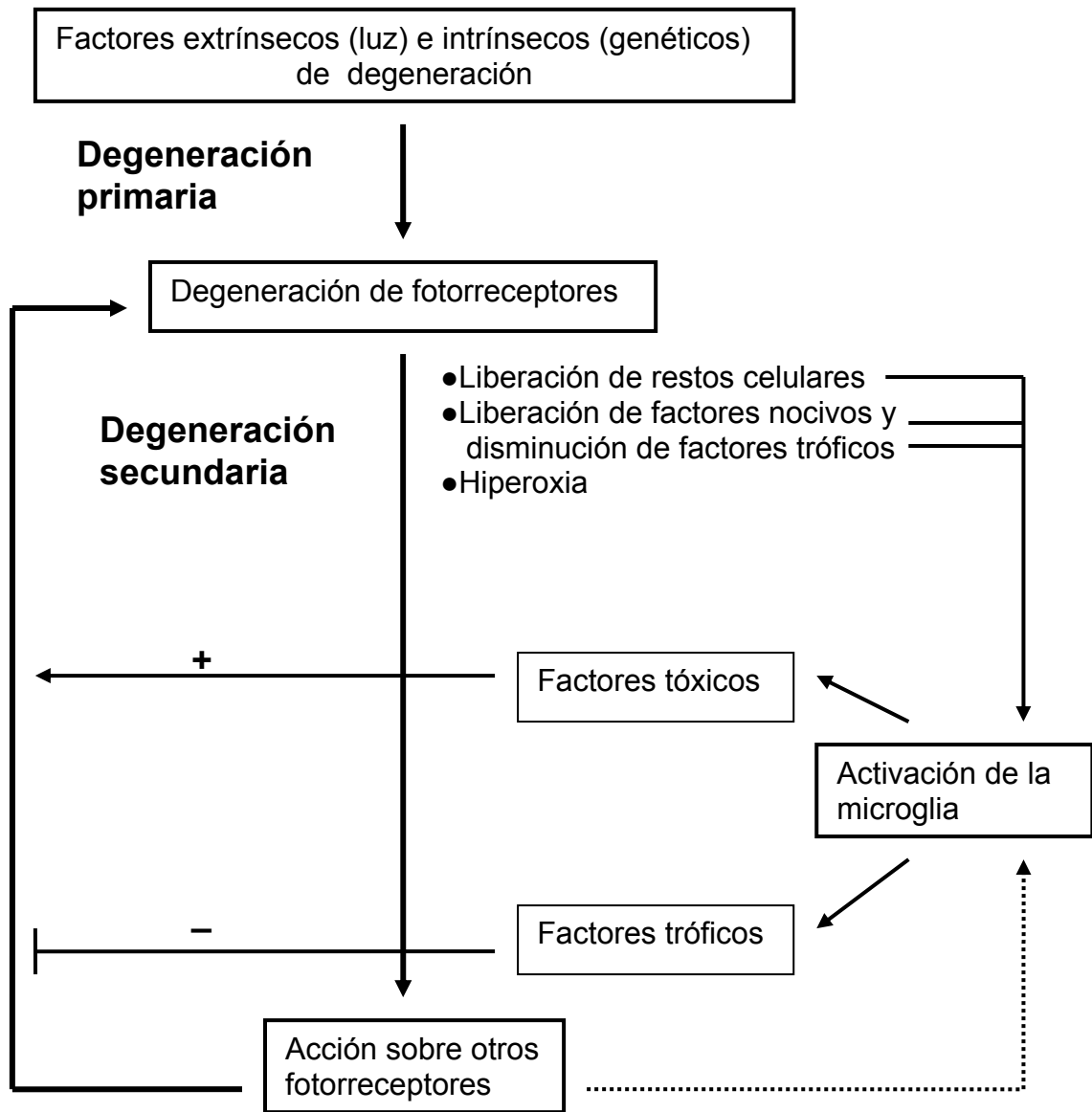
Las células microgliales de estas regiones se encuentran activadas (Langmann, 2007). Las células activadas presentan una morfología más o menos ameboide, en lugar de la ramificada de la microglía quiescente (Gupta *et al.*, 2003; Jeon *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005b; Sobrado-Calvo *et al.*, 2007) y muestran un aumento de la expresión de algunas

moléculas de membrana que se refleja en el aumento de reactividad para marcadores como el anticuerpo F4/80, los anticuerpos que reconocen el receptor 3 del complemento (Mac-1 o CD11b, en ratón; OX42, en rata) y diferentes lectinas, como la isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia*. La microglía activada muestra un incremento de la capacidad proliferativa (Jeon *et al.*, 2004; Zeiss y Johnson, 2004a; Inman y Horner, 2007). Finalmente, la microglía activada en la retina también produce y/o libera una serie de moléculas bioactivas, como factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , BDNF), citoquinas (IL-1, IL-6,...), quimioquinas (MCP-1, TNF- $\alpha$ ,...), NO y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Langmann, 2007).

La acumulación de microglía que se produce en la degeneración de los fotorreceptores inducida por desprendimiento de retina está mediada por la quimioquina MCP-1, ya que en ratones que carecen del gen que codifica para la MCP-1, apenas hay reclutamiento de células microgliales (Nakazawa *et al.*, 2007). La expresión de MCP-1 también aparece aumentada en otros modelos de degeneración retiniana (Nakazawa *et al.*, 2007), como la degeneración intrínseca de fotorreceptores que ocurre en los ratones *rd* (Zeng *et al.*, 2005). Las células microgliales retinianas expresan CCR-2, el receptor al que se une MCP-1 (Langmann, 2007). Hay datos contradictorios acerca de la participación de MCP-1 en la degeneración inducida por luz, ya que algunos autores describen un notable aumento de la expresión del gen que la codifica en las retinas que han sufrido fotodegeneración (Chen *et al.*, 2004), mientras que otros no detectan un incremento significativo de su expresión (Zhang *et al.*, 2005b). Las quimioquinas MCP-3 y RANTES también parecen estar implicadas en el reclutamiento de células microgliales hacia las zonas afectadas por la lesión (Marella y Chabry, 2004; Zeng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005b).

La concentración de microglía activada en zonas de lesión sugiere que estas células participan de alguna manera en los procesos de muerte celular que se dan en esas regiones. Clásicamente, se ha atribuido a las células microgliales el papel de fagocitar los restos celulares liberados durante la degeneración neuronal, una vez que eran atraídas por los fotorreceptores en fotodegeneración (Hisatomi *et al.*, 2003), por lo que su papel se limitaría a ejercer de “barrenderas” o “carroñeras”, eliminando los restos que se producen

durante el proceso degenerativo. Sin embargo, también existe la posibilidad de que las células microgliales, cuya activación coincide temporalmente con la degeneración, desempeñen un papel más activo en el proceso, induciendo incluso la muerte de los fotorreceptores; según esta hipótesis, la eliminación o disminución de las células microgliales o de su activación aumentaría la supervivencia de los fotorreceptores. En la figura IV se recoge el posible papel de la microglía en la degeneración secundaria de los fotorreceptores.



**Fig. IV:** Posible papel de la microglía en la degeneración de fotorreceptores. La degeneración primaria de los fotorreceptores libera restos celulares, factores nocivos y otras señales que activan a la microglía. Las células microgliales activadas liberan factores tóxicos o tróficos que, o bien pueden propagar la degeneración secundaria de nuevas células fotorreceptoras o, por el contrario, promoverían la supervivencia de los fotorreceptores restantes. A su vez, estos fotorreceptores aún presentes en la retina, generarían señales de activación de la microglía, promoviendo o inhibiendo la liberación de factores tróficos o tóxicos, respectivamente.

Son varias las observaciones que apoyan la idea de que la microglía puede jugar un papel activo en el proceso de degeneración y muerte de los fotorreceptores retinianos:

1. Las células microgliales aparecen en el lugar de la degeneración coincidiendo temporalmente con el inicio de los procesos de muerte.

Este hecho fue observado en la degeneración de fotorreceptores que tiene lugar en las retinas de las ratas RCS (Roque *et al.*, 1996), lo que permitió proponer que las células microgliales *pueden ser responsables* de la inducción de la muerte de los fotorreceptores. En otro modelo, la uveítis autoinmune experimental en ratas, se vio que las células microgliales se acumulaban en la ONL antes de que hubiese signos de degeneración de los fotorreceptores (Rao *et al.*, 2003). Resultados aparentemente semejantes se han observado en retinopatías humanas (Gupta *et al.*, 2003), en las que se propone que las células microgliales son atraídas hacia la ONL por los restos celulares de los primeros fotorreceptores que mueren y, a su vez, liberan moléculas citotóxicas (como el NO) que expanden el daño a nuevos fotorreceptores. El aumento del número de células microgliales activadas también se produce en ratones *rd*s (portadores de un tipo de degeneración intrínseca de los fotorreceptores), con posterioridad al comienzo de la degeneración de los fotorreceptores, por lo que las células microgliales no deben ser responsables de la oleada inicial de muerte, aunque tal vez sí de prolongarla y perpetuarla (Hughes *et al.*, 2003).

La degeneración de los fotorreceptores que se observa en ratones deficiente en catepsina D no está mediada por el óxido nítrico, al contrario que la muerte de las neuronas de la INL que ocurre posteriormente (Koike *et al.*, 2003); las células microgliales, aparentemente activadas por la degeneración en la ONL, liberan NO y producen el daño secundario a las neuronas de la INL.

En dos modelos de degeneración de fotorreceptores en la retina de ratón, la degeneración intrínseca que ocurre en ratones *rd* (Zeng *et al.*, 2005) y la inducida por luz (Zhang *et al.*, 2005b), se ha visto que la concentración de células microgliales en la ONL y su activación estaba relacionada con la presencia de quimioquinas (fundamentalmente, RANTES y MCP-1 o MCP-3); niveles elevados de estas quimioquinas se producen al mismo tiempo que

aparecen células marcadas con TUNEL en la ONL y un poco antes de la invasión de esta capa por las células microgliales. Estos autores proponen que la microglía atraída hacia la ONL por las quimioquinas amplifica la degeneración a través de la secreción de una mayor cantidad de quimioquinas, que reclutan nuevas células microgliales e incluso células de linaje monocítico, de la sangre y / o de la coroides, y la producción de factores citotóxicos, como el TNF- $\alpha$ .

El comportamiento dinámico de la microglía retiniana en respuesta a las lesiones ha sido estudiado en explantes de retina a los que se provocaba un daño focal con láser (Lee *et al.*, 2008). Se observó que las células microgliales incrementaron la longitud de sus prolongaciones, que además presentaban una clara polarización hacia la zona de la lesión. Las células microgliales también mostraron capacidad migratoria, determinada por el desplazamiento del soma, aunque en este último caso no se pudo demostrar que las células se dirigieran predominantemente hacia la lesión (lo que no excluyó que se acumularan finalmente en la zona lesionada) (Lee *et al.*, 2008).

La acumulación y activación de las células microgliales en la retina no se produce exclusivamente en situaciones de degeneración de los fotorreceptores. En un modelo de retinopatía diabética en rata se ha descrito que la activación microglial precede a la muerte de las neuronas (Gaucher *et al.*, 2007). Tras la axotomía del nervio óptico se produce la degeneración de gran parte de las células ganglionares de la retina y las zonas más internas de la misma son invadidas poco después por células microgliales (García-Valenzuela *et al.*, 2005). Una correlación semejante entre la degeneración de células ganglionares y la presencia de microglía activada ha sido también descrita en un modelo de glaucoma (Naskar *et al.*, 2002).

Para investigar el papel de las células microgliales en algunos procesos patológicos retinianos, se ha analizado la expresión génica que acompaña y precede a la degeneración de fotorreceptores en un modelo murino de retinosquiasis, un tipo de desprendimiento retiniano. En esta situación, la expresión de genes relacionados con la activación de la microglía precede en varios días al inicio de la muerte celular, por lo que la activación de la microglía

podría actuar como desencadenante de los procesos degenerativos que se observan en este modelo de daño retiniano (Gehrig *et al.*, 2007).

Las células microgliales pueden ejercer un efecto neurotóxico a través de algunos de los factores que secretan, como TNF- $\alpha$ , IL-1, NO y ROS (Rao *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2005; Langmann, 2007). Además, la microglía activada también secreta otras citoquinas y quimioquinas que aumentan y prolongan la degeneración. Harada y colaboradores (Harada *et al.*, 2002), han propuesto que la activación microglial regula la producción de bFGF por parte de las células de Müller necesaria para la supervivencia de los fotorreceptores.

En resumen, la localización de la microglía activada y su producción de factores neurotóxicos (o la ausencia de expresión de factores neurotróficos) permiten suponer que estas células participan activamente en el proceso de degeneración de los fotorreceptores. Las células microgliales no parecen jugar un papel determinante en los procesos de degeneración inicial pero, por su potencialidad neurotóxica, pueden incrementar y propagar la degeneración inicial. Para reforzar esta idea sería conveniente determinar si la activación microglial afecta o no a la viabilidad de los fotorreceptores.

## 2. Estudios in vitro demuestran una asociación clara entre la presencia de microglía activada (o de factores liberados por la microglía activada) y la muerte de los fotorreceptores.

Roque y colaboradores (Roque *et al.*, 1999), demostraron que las células de la línea celular 661w, derivada de fotorreceptores murinos, experimentaban degeneración cuando eran expuestas a medio de cultivo condicionado proveniente de cultivos de células microgliales de retinas de ratas RCS. Por el contrario, los fotorreceptores no sufrían modificaciones apreciables cuando eran sometidos a medio condicionado de cultivos de células de Müller normales. Aparentemente, el efecto citotóxico de la microglía de retinas RCS se debe a la liberación de pro-NGF (Srinivasan *et al.*, 2004)

Utilizando la misma línea celular de fotorreceptores murinos, 661w, se comprobó que la adición de LPS directamente al medio de cultivo de las células 661w no tenía ningún efecto sobre la viabilidad de las mismas; sin embargo, se observaba abundante muerte celular cuando lo que se añadía era medio de



cultivo recogido de cultivos primarios de microglía estimulada por LPS (Yang *et al.*, 2007c). El mismo trabajo muestra que las células microgliales del cultivo primario se activan cuando se añade medio de células 661w fotodegeneradas. Todo esto permite suponer que hay una influencia mutua entre los fotorreceptores y las células microgliales: mientras que la degeneración de los fotorreceptores induce la activación de las células microgliales, los productos liberados por la microglía activada desencadenarían la muerte de los fotorreceptores.

Por tanto, estos trabajos sugieren que los productos liberados por la microglía activada inducen la degeneración de los fotorreceptores. Para verificar esta idea sería conveniente verificar si la disminución de la activación microglial se correlaciona con la disminución de la muerte de los fotorreceptores.

### 3. La muerte de los fotorreceptores se reduce (o incluso desaparece) en animales con activación microglial disminuida.

La aparente relación entre la activación microglial y la degeneración de células de la retina se puso de manifiesto mediante la inyección vitreal de un factor inhibidor de macrófagos que interfiere en la activación de las células de origen monocítico; este tratamiento retrasaba la degeneración de las células ganglionares tras la axotomía del nervio óptico, con lo que los autores concluían que las células microgliales intervenían en el reconocimiento y eliminación de las neuronas afectadas (Thanos *et al.*, 1993).

La administración intraocular de inhibidores de caspasas reduce, alrededor de un 35%, la muerte de las células ganglionares tras la transacción del nervio óptico; simultáneamente, se observaba una reducción en el número de microglía reactiva, lo que plantea la posibilidad de que la acción de estos inhibidores se produzca a través de la activación microglial (Chaudhary *et al.*, 1999).

La minociclina, un derivado sintético de la tetraciclina, es utilizada en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Yrjänheikki *et al.*, 1998). Se ha descrito que uno de los efectos de esta molécula es inhibir la activación microglial (Yrjänheikki *et al.*, 1998; Tikka *et al.*, 2001); otro de los efectos de la

minociclina es la inhibición de la activación de las caspasas (Chen *et al.*, 2000). La administración sistémica de minociclina produce una disminución transitoria de los procesos de muerte que ocurren en diferentes células de la retina (Baptiste *et al.*, 2005; Krady *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2007; Bosco *et al.*, 2008), incluyendo la degeneración intrínseca de fotorreceptores (Hughes *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007b), y la inducida por luz (Zhang *et al.*, 2004; CJ Chang *et al.*, 2005b; Leung *et al.*, 2007).

En la retina, como en el resto del SNC, la minociclina inhibe la expresión de caspasa-3 (Hughes *et al.*, 2004; CJ Chang *et al.*, 2005b). También se ha podido comprobar que este antibiótico inhibe la activación de las células microgliales retinianas (Yang *et al.*, 2007a), y algunos estudios muestran una disminución de la presencia de microglía activada tras el tratamiento con minociclina, lo que ha llevado a sugerir que, al menos, parte del efecto neuroprotector de la minociclina se debe a que inhibe la activación microglial (Zhang *et al.*, 2004; Baptiste *et al.*, 2005; Krady *et al.*, 2005; Bosco *et al.*, 2008). Un estudio realizado en ratones *rds* muestra que la minociclina disminuye la expresión de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), que interviene en las fases iniciales de la degeneración de los fotorreceptores, aunque señalan que esta iNOS no se localiza en las células microgliales (Yang *et al.*, 2007b). Otro trabajo realizado también en ratones *rds* destaca que el efecto de la minociclina sobre la muerte de fotorreceptores se produce a través de un mecanismo independiente de la activación microglial (Hughes *et al.*, 2004); sin embargo, el mismo trabajo muestra que el tratamiento con minociclina produce un retraso en la respuesta de las células microgliales.

El compuesto naxolona, un antagonista de los receptores opiáceos, resulta eficaz en la inhibición de la liberación de sustancias citotóxicas, como TNF- $\alpha$  y NO (Liu *et al.*, 2000). Este compuesto también protege de la degeneración de los fotorreceptores inducida por luz, aparentemente a través de su acción sobre las células microgliales (Ni *et al.*, 2008).

Otro tipo de observaciones apoyan también que las células microgliales juegan un papel activo en la degeneración de las neuronas retinianas. En la retina de ratones transgénicos que expresan la proteína priónica en múltiples tipos celulares (incluidas las células microgliales), se produce degeneración de

las células retinianas, mientras que ratones transgénicos que expresan dicha proteína sólo en neuronas (también las de la retina), no muestran degeneración. Además, mientras que en las retinas con degeneración se observaba una clara activación de las células microgliales, ésta no se producía en retinas sanas, con lo que los autores concluían que la activación microglial es necesaria para que se produzca la degeneración (Kercher *et al.*, 2007).

Todas estas observaciones muestran que existe una cierta correlación entre activación microglial y degeneración celular en la retina y, por tanto, se puede pensar que ambos fenómenos están ligados.

En resumen, los estudios descritos sugieren que aparentemente hay relación entre las células microgliales y los procesos degenerativos de la retina, ya que las células microgliales: (i) aparecen en las zonas de degeneración coincidiendo con estos procesos, (ii) la microglía activada o sus productos inducen degeneración, y (iii) los procesos degenerativos se reducen o retrasan si se inhibe la activación microglial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

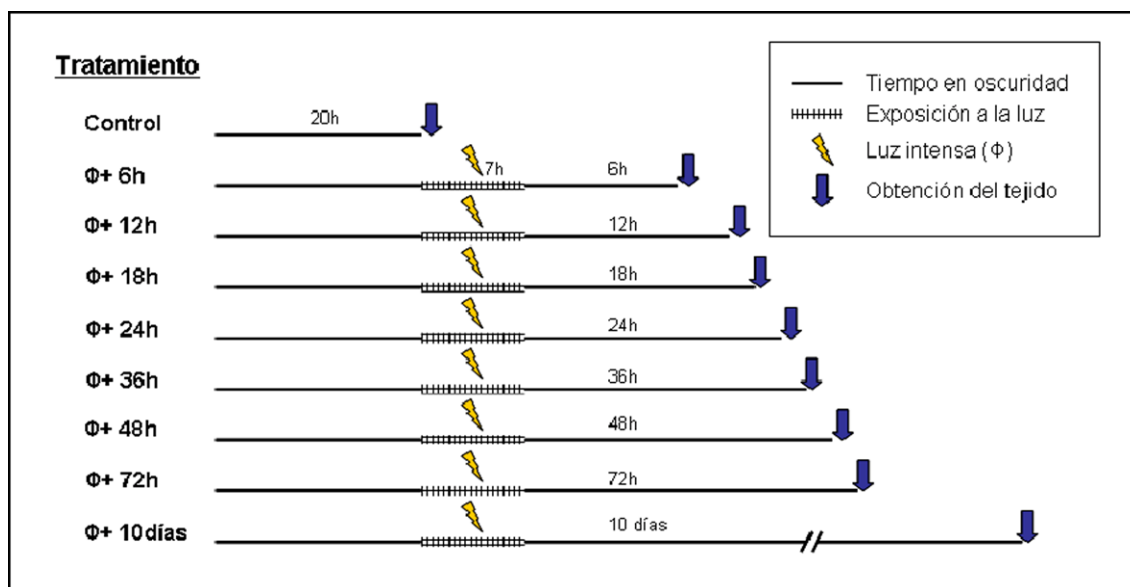
### Animales

Se emplearon retinas obtenidas a partir de ratones (*Mus musculus*) de edad adulta (P60) de la cepa albina BALB/c, procedentes del *Servicio de Producción y Experimentación Animal* de la Universidad de Granada. Los animales fueron mantenidos, hasta la realización de los experimentos, bajo condiciones de luz normales, con ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h, con acceso a agua y comida *ad libitum* durante todo el proceso. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, dado que el anestésico halotano parece tener efectos protectores en los fotorreceptores de la retina (Keller *et al.*, 2001; Remé *et al.*, 2003). Durante todo el procedimiento experimental se siguieron las directrices establecidas por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

### Protocolo de inducción de fotodegeneración

Para el estudio de la respuesta microglial a la fotodegeneración inducida por luz intensa se utilizaron 60 ratones machos de la cepa albina BALB/c de dos meses de edad (P60). El primer paso de nuestro protocolo de fotodegeneración, adaptado del de Grimm *et al.*, 2000, fue la adaptación a la oscuridad de los ratones, en la cual los animales fueron mantenidos en total oscuridad durante las 20 horas que precedían a la exposición luminosa. Seguidamente, fueron expuestos a una intensidad lumínica de 10.000 lux durante 7 horas (Tabla I). Para este paso del protocolo, los animales se mantuvieron en jaulas transparentes que eran iluminadas cenitalmente por cuatro bombillas de luz blanca fría (Master PL Electronic 23W, 230-240V Cool Daylight, Royal Philips Electronics, Holanda). La intensidad de luz se comprobó mediante un luxómetro (HD 9021, Delta Ohm SRL, Italia). Tras la exposición a la luz, los animales fueron mantenidos en oscuridad durante diferentes

períodos de tiempo y sacrificados 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 horas y 10 días tras el tratamiento con luz (Tabla I). El grupo de animales control, fue mantenido en oscuridad durante las 20 horas de acostumbramiento previas a la exposición a la luz y sacrificado inmediatamente después.



**Tabla I.** Diagrama esquemático que recoge los diferentes tratamientos de fotodegeneración empleados en este estudio.

### Obtención de secciones histológicas de retina

Inmediatamente después de la dislocación cervical de los animales, los ojos enucleados fueron fijados en PLP durante 6 horas. Tras la fijación, se lavaron en PBS 0.1M y se sumergieron en sacarosa 30% en PBS 0.1M durante 24 horas. A continuación, se incluyeron en crioprotector (OCT compound, Sakura Finitek Europe, Zoeterwoude, Holanda), y se congelaron en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Las retinas congeladas se almacenaron a  $-40^{\circ}\text{C}$ , hasta su utilización para la preparación de secciones histológicas. Los ojos se cortaron en secciones transversales de  $20\ \mu\text{m}$  de grosor con un criostato Leica CM 1850 y los cortes fueron extendidos sobre portaobjetos *Superfrost* (Menzel-Glasser, Braunschweig, Alemania), que facilitaban su adhesión.

## Inmunocitoquímica

Se realizó marcaje inmunocitoquímico de las secciones mediante los anticuerpos primarios que se recogen en la tabla II.

Anticuerpo	Procedencia	Tipo, hospedador	Dilución de uso
Anti-F4/80	Serotec, Oxford, UK (# MCA 497GA)	Monoclonal, rata	1:200
Anti-CD45	Serotec, Oxford, UK (# MCA 1388)	Monoclonal, rata	1:40
Anti-CD68	Serotec, Oxford, UK (# MCA 1957)	Monoclonal, rata	1:40
Anti-SRA (CD204)	Serotec, Oxford, UK (# MCA 1322)	Monoclonal, rata	1:30

**Tabla II.** Anticuerpos utilizados en este estudio. Se indican las casas comerciales, así como el origen del anticuerpo y la dilución de uso.

El anticuerpo anti-F4/80 reconoce una glicoproteína de superficie de los macrófagos y células microgliales del ratón, que tiene un peso molecular de unos 160 kDa, cuando se detecta por inmunoprecipitación y Western Blot (Hume y Gordon, 1983).

Los anticuerpos anti-CD45 y anti-CD68 reconocen las proteínas homólogas CD45 y CD68 en el ratón, respectivamente. CD45 es una tirosinafosfatasa presente en la membrana de todas las células del linaje de los macrófagos y monocitos (Sedgwick *et al.*, 1991; Penninger *et al.*, 2001) y el anticuerpo utilizado reconoce una sola banda de unos 170 kDa en los Western Blots de extractos de cerebro en el ratón (Cuadros *et al.*, 2006). CD68 (macrosialina) es una glicoproteína de membrana presente en los lisosomas de las células del linaje macrofágico (Da Silva y Gordon, 1999; Galea *et al.*, 2005); el anticuerpo utilizado en nuestros experimentos reconoce una serie de bandas de entre 87 y 115 kDa, correspondientes a diferentes grados de glicosilación de la proteína (Da Silva y Gordon, 1999).

El anticuerpo anti-SRA/CD204 reconoce el receptor *scavenger* de clase A en fagocitos y células dendríticas (Yamada *et al.*, 1998). Como el resto de

miembros de la familia de receptores *scavenger* juega un papel esencial en la respuesta inmunitaria innata (Block *et al.*, 2007; Peiser *et al.*, 2002). En el sistema nervioso adulto se expresa en los macrófagos perivasculares pero no en la microglía en reposo (Mato *et al.*, 1996) y sus niveles disminuyen con la edad. La expresión de SRA en el adulto se incrementa tras la administración intracerebral de LPS o ácido kaínico (Bell *et al.*, 1994; Herber *et al.*, 2006) y en respuesta a un amplio número de ligandos que provocan la activación microglial (Plüddemann *et al.*, 2007). Es, por tanto, un marcador de activación de la microglía (Alarcón *et al.*, 2005; Block y Hong, 2005; Husemann *et al.*, 2002).

Como control negativo, los anticuerpos primarios fueron omitidos en algunas secciones, con la consecuente ausencia de marcaje. Además, las células marcadas con los diferentes anticuerpos mostraron la distribución y morfología esperadas en todas las secciones procesadas para inmunocitoquímica. La presencia de células fuertemente marcadas con anti-SRA, anti-F4/80, anti-CD45 y anti-CD68, que aparecían en el interior de los vasos sanguíneos, el vítreo y los tejidos periorbitales fue utilizada como control positivo de los diferentes marcadores.

Para el marcaje con los diferentes anticuerpos mencionados, las secciones de retina se hidrataron durante 30 minutos en PBS 0.1M, se permeabilizaron durante 10 minutos en PBS 0.1M con Tritón X-100 (Sigma) al 0.1%, para facilitar la penetración de los anticuerpos y se incubaron durante 45-60 minutos con suero normal de cabra (NGS, Sigma) diluido 1:30 en PBS 0.1M. Seguidamente, las secciones fueron incubadas durante 24-48 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS 0.1M con 1% de BSA (Sigma), a las concentraciones indicadas en la tabla II. Tras la incubación en el anticuerpo primario, las secciones fueron lavadas por tres veces con PBS 0.1M e incubadas durante 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:1000 en PBS 0.1M con 1% de BSA. El anticuerpo secundario utilizado para todos los anticuerpos primarios fue un anti-IgG de rata conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 488 (*Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rat IgG*, A11006. Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Las secciones fueron teñidas con Hoechst 33342 (Sigma), diluido 1:1000 en PBS 0.1M, durante 2 minutos,

para marcar los núcleos celulares, lavadas en PBS 0.1M y montadas con el medio de montaje para fluorescencia *Fluoromount G* (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA).

El marcaje inmunocitoquímico fue revelado en algunas secciones con la técnica de la Extravidina-Biotina Peroxidasa. Para ello se eliminó la actividad peroxidasa endógena mediante incubación con peróxido de hidrógeno al 0.3% en PBS 0.1M durante 30 minutos, previamente a la incubación con el anticuerpo primario (anti-SRA). Tras la incubación en anticuerpo secundario conjugado a biotina (anti-rat IgG, Sigma, B7139), las secciones fueron incubadas con el complejo extravidina-peroxidasa (Sigma, E2886) diluido 1:30 durante 1h a temperatura ambiente. La presencia de peroxidasa fue puesta de manifiesto por incubación de las secciones con diaminobencidina (Sigma), a una concentración de 10mg /mL. Finalmente, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina, para marcar los núcleos celulares y diferenciar las capas de la retina y montadas con el medio de montaje DePeX (DHB, Poole, UK).

### **Detección de fenómenos de muerte celular mediante TUNEL**

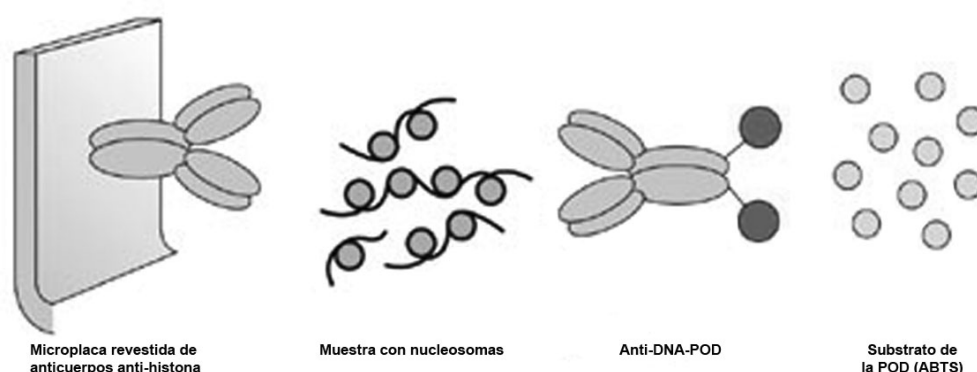
La técnica TUNEL (Gavrieli *et al.*, 1992), marca los núcleos y restos nucleares en los que ha ocurrido fragmentación del DNA, característica de las células apoptóticas. Para la técnica de TUNEL, las secciones fueron lavadas en PBS 0.1M, permeabilizadas en PBS con 0.1% de Tritón e incubadas en una solución que contenía un 2% de enzima TdT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*, M1875, Promega, Madison, WI, USA) en tampón TdT pH 6.8 (M1893, Promega) y 0.03% del nucleótido dUTP conjugado con Tetrametilrodamina (*Tetramethylrhodamine-dUTP*, Cat. No. 11534378910, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), durante 1 hora, a 37°C. Tras la incubación con la enzima y su sustrato, las secciones fueron lavadas en PBS 0.1M, se marcaron los núcleos celulares con Hoechst 33342 (Sigma) y se montaron con el medio de montaje *Fluouromount G* (Southern Biotech) para su observación en el microscopio de fluorescencia.



En los dobles marcajes anti-SRA/TUNEL se realizó primero el marcaje con el anticuerpo mencionado, tal y como se ha descrito anteriormente y, posteriormente, las secciones fueron procesadas para la técnica TUNEL, tal y como se acaba de describir.

### Detección de fenómenos de muerte celular por cuantificación de nucleosomas citosólicos mediante ELISA

La determinación cualitativa y cuantitativa de la muerte celular que ocurre en las retinas de ratón sometidas al protocolo de fotodegeneración por luz intensa, se realizó mediante el kit comercial *Cell Death Detection ELISA* (Roche Diagnostics, Cat. No. 11544675001). Este kit es muy sensible y permite detectar fragmentos de DNA asociados a histonas (mono y oligonucleosomas) en extractos derivados de muestras de retina homogenizadas. Aunque la información proporcionada con el kit afirma que detecta específicamente células que sufren apoptosis, seguramente también detecte otras formas de degeneración en las que exista cierta fragmentación del DNA. El esquema adjunto (Fig. V) muestra el funcionamiento del kit, basado en la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; Van Weemen y Schuurs, 1971), para la detección de nucleosomas.



**Fig. V.-** Principio teórico del protocolo para detección de nucleosomas por la técnica de ELISA (Roche Diagnostics, Cat. No. 11544675001).

Se obtuvieron los ojos de los animales control y tratados (cepa BALB/c, P60) y se procedió a diseccionar las retinas en tampón PBS 1X a 4°C. Las dos retinas de cada animal se introdujeron en un homogenizador de vidrio tipo Dounce con émbolo no esmerilado (Pobel S.A., Madrid, España), para no romper las membranas nucleares de las células, en 150µl de cocktail inhibidor de proteasas 1X (*Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche Diagnostics; Cat. No. 11836170001) preparado de forma extemporánea. Después de homogeneizar las retinas en el inhibidor de proteasas se recogió todo el volumen y se centrifugó a 13.200 rpm durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga 5415R, Eppendorf), para hacer precipitar todos los restos celulares y liberar las proteínas al sobrenadante. El sobrenadante, conteniendo los nucleosomas citosólicos, se mantuvo congelado a -20°C hasta su utilización. Para la ELISA se siguieron las instrucciones del fabricante del kit: los sobrenadantes de las diferentes retinas se diluyeron 1:9 en el tampón de muestra proporcionado por el fabricante para ser utilizados como soluciones problema (sample solutions). Finalmente, la densidad óptica de cada muestra se midió en un lector de placas (Multiskan Ascent, Thermo Scientific) con el filtro de 405nm.

Para poder referir los resultados de absorbancia obtenidos en la ELISA de nucleosomas a la concentración de proteínas de cada muestra, se llevó a cabo una cuantificación de la cantidad de proteína presente en cada extracto mediante el método colorimétrico de Bradford (BioRad). Para ello, se realizó una recta patrón de concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma), desde 2 µg/ml a 20 µg/ml y se añadieron 2 µl de extracto de cada muestra a 200 µl de solución Bradford 1X. La densidad óptica resultante se midió en un lector de placas (Multiskan Ascent, Thermo Scientific) con el filtro de 595nm. Para cada muestra se obtuvo así un valor de densidad óptica que fue transformado en concentración tomando como referencia la densidad óptica proporcionada por las muestras de concentración conocida de la recta patrón. Estos valores sirvieron de referencia para determinar el valor relativo de apoptosis obtenido mediante ELISA de nucleosomas. Para cada tratamiento se realizaron mediciones por triplicado, utilizando retinas de tres animales

independientes; en cada muestra se realizaron tres réplicas, tanto en la ELISA como en la cuantificación de proteínas de los extractos.

Finalmente, la cuantificación de la muerte celular en las retinas control y tratadas se expresó como un cociente entre la absorbancia (D.O.) media obtenida de las muestras de la ELISA de nucleosomas y la concentración de proteínas de las mismas, calculada por extrapolación a partir de la recta patrón de albúmina. Los cocientes obtenidos se representaron, junto con sus barras de error correspondientes al error estándar de la media, en un histograma realizado con la aplicación Excel de Microsoft Office 2003. Los valores obtenidos fueron analizados mediante la prueba de la t-Student para determinar el grado de significación de las diferencias observadas. Valores de  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  se consideraron significativos.

### **Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)**

Para los estudios de TEM, se utilizaron ratones BALB/c machos de dos meses de edad sometidos a los tratamientos de fotodegeneración siguientes:  $\Phi + 6h$ ,  $\Phi + 24h$  y  $\Phi + 10días$  (véase la Tabla I, en el segundo apartado de esta sección). Otro animal de la misma edad y cepa se utilizó como control. Tras realizar la enucleación, los ojos fueron fijados durante 45 minutos a  $4^{\circ}C$  en una mezcla de glutaraldehído al 2% y formaldehído al 1% en tampón cacodilato 0.05M (pH 7.4) que contenía una concentración 2mM de  $Cl_2Mg$ . Tras este tiempo, se diseccionaron los globos oculares para aislar las retinas, que se cortaron en cuatro cuartos. Las piezas de retina cortadas permanecieron en la mezcla fijadora durante 2 horas más. Tras la fijación, las muestras fueron lavadas en tampón cacodilato (0.1M + 2mM de  $Cl_2Mg$  y sacarosa 0.03 g/l; pH 7.4), post-fijadas en tetróxido de osmio al 1% en agua destilada durante 1h, deshidratadas mediante sucesivos pasos por etanol de concentraciones crecientes e incluidas en resina Epon. Se realizaron secciones semifinal (de 0.5  $\mu m$  de grosor) y ultrafinas (500-700 Å). Las primeras fueron teñidas con azul de toluidina, mientras que las segundas fueron montadas en rejillas de cobre y contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación

con un microscopio Zeiss EM10C. Las secciones semifinal fueron observadas en un microscopio óptico *AxioPhot* (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y fotografiadas con una cámara digital *AxioCam* (Zeiss) acoplada a este mismo microscopio.

### **Microscopía y análisis cuantitativo**

Tanto las secciones de retina preparadas para inmunofluorescencia como aquéllas marcadas con peroxidasa, fueron observadas en un microscopio *AxioPhot* (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y fotografiadas con una cámara digital *AxioCam* (Zeiss) acoplada a este mismo microscopio.

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con un microscopio *Leitz DMRB* equipado con el sistema de barrido láser confocal *Leica TCS-SP5* (Leica). En cada campo seleccionado se obtuvieron series de secciones ópticas confocales en el plano horizontal (XY) de observación, es decir, perpendiculares a la superficie vítrea de la retina. El grosor de las secciones ópticas realizadas oscilaba entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$ . Seguidamente, se obtuvo la proyección de todas las secciones ópticas mediante el software de barrido láser confocal de Leica.

Las imágenes obtenidas, ya sea mediante microscopía de campo claro, microscopía de fluorescencia o microscopía confocal, se almacenaron en formato TIFF y se les ajustó el brillo y el contraste con *Adobe Photoshop* (Adobe Systems, San José, CA, USA). Las leyendas de las imágenes obtenidas también fueron añadidas con este software.

La presencia de células microgliales activadas en la ONL y el espacio subretiniano de las retinas de ratones sometidos al protocolo de fotodegeneración ( $\Phi+6\text{h}$ ,  $\Phi+24\text{h}$ ,  $\Phi+48\text{h}$ ,  $\Phi+72\text{h}$  y  $\Phi+10\text{días}$ ) y de ratones control fueron cuantificadas para calcular la densidad de células microgliales. El análisis se restringió a estas regiones, desprovistas de vasos sanguíneos, para evitar confusiones por el marcaje de algunas células endoteliales y/o células perivasculares. Para realizar los recuentos se utilizaron secciones transversales de retina de 20  $\mu\text{m}$  de grosor, que contenían tanto retina central como retina periférica, marcadas con el anticuerpo anti-SRA. En dichas

secciones, se contaron únicamente los cuerpos celulares (somas) de las células microgliales que mostraron inmunorreactividad para el anticuerpo anti-SRA. Un mínimo de cuatro retinas, procedentes de al menos tres animales diferentes, fueron utilizadas para cada tiempo analizado y fueron analizadas cuatro secciones diferentes en cada retina. Para calcular la superficie ocupada por la ONL y el espacio subretiniano en cada sección y poder estimar la densidad de células microgliales SRA positivas (número de células marcadas por  $10^5 \mu\text{m}^2$ ), se utilizó el software Image J (NHI). Los valores obtenidos para cada tiempo de supervivencia, junto con sus barras de error correspondientes al error estándar de la media, se representaron en un histograma realizado mediante la aplicación Excel de Microsoft Office 2003. El grado de significación de las diferencias observadas entre los valores obtenidos fue analizado mediante la prueba de la t-Student de dos colas. Valores de  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  se consideraron significativos.

## RESULTADOS

### Efecto de la exposición a la luz sobre la retina

Está bien documentado que la exposición continuada a una intensidad luminosa moderada o la exposición breve a luz intensa provoca degeneración en la retina y que, lo mismo que en la degeneración debida a una anomalía genética, las células que mueren inicialmente son fundamentalmente fotorreceptores (Noell *et al.*, 1966; LaVail *et al.*, 1998; Remé *et al.*, 1998; Organisciak *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005b). Por ello estudiamos diferentes parámetros indicadores del daño histológico en las retinas expuestas al protocolo de fotodegeneración y comprobamos el efecto de nuestro protocolo de fotodegeneración mediante la demostración de fenómenos de muerte celular entre los fotorreceptores de la retina, cuyos núcleos se encuentran en la ONL.

No todas las regiones de la retina se afectan de igual modo después de que se haya producido el daño debido a la exposición a luz intensa, especialmente tras tiempos cortos de supervivencia. Las regiones más dañadas de las retinas tratadas ocupan zonas discretas de la retina, a modo de “parches”, que van haciéndose progresivamente más extensos con tiempos mayores de supervivencia tras el tratamiento lumínico.

### Manifestaciones morfológicas en las retinas lesionadas

Las retinas expuestas al protocolo de fotodegeneración mostraron alteraciones morfológicas patentes, observables tanto a microscopía óptica (Fig. 1) como a microscopía electrónica de transmisión (TEM; Fig. 2 y 3) (Noell *et al.*, 1966; LaVail *et al.*, 1998; Remé *et al.*, 1998; Organisciak *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005b).

El adelgazamiento progresivo de la ONL se puede utilizar como indicador del daño morfológico provocado por la exposición a la luz, ya que manifiesta una disminución en el número de fotorreceptores y, por tanto, es una consecuencia de la degeneración de este tipo celular. El adelgazamiento de la

ONL era observable tanto en secciones de criostato, en las que los núcleos celulares habían sido marcados con Hoechst, como en secciones semifinas, teñidas con azul de toluidina. Se observa que la ONL adelgaza gradualmente hasta hacerse muy delgada en los dos últimos tiempos de supervivencia:  $\Phi+72h$  y  $\Phi+10$  días, en los que algunas zonas sólo constan de 2-3 hileras de núcleos. (Fig.1). Sin embargo, las regiones periféricas de las retinas, cercanas a la *ora serrata*, conservaban en los estadios finales un mayor número de hileras de núcleos en la ONL. En las secciones semifinas de las retinas tratadas se podía observar que el grado de picnosis de los núcleos de la ONL era significativamente mayor que en las retinas control (Fig.1), en las que sólo de forma ocasional aparecían núcleos de fotorreceptores picnóticos (Fig. 2A).

En las retinas de animales sacrificados en los tiempos de supervivencia más cortos no se observaba una disminución clara del grosor de la ONL, aunque sí era aparente una cierta desorganización estructural. En concreto, se observaron regiones discretas de la ONL, que hemos denominado festones, con menor número de núcleos y en las que los segmentos de los fotorreceptores restantes se disponían en forma semicircular, dando lugar a la aparición de ondulaciones en el borde escleral de la ONL. (Fig.1). En el tratamiento de  $\Phi+6h$  ya aparecían festones en el borde escleral de la ONL y, mediante TEM, se veía que los segmentos externos de los fotorreceptores aparecían algo desorganizados (Fig.2F), desorganización que aumentaba en los siguientes estadios estudiados (Fig. 2G y 2H); también se podía apreciar que los núcleos de la ONL, que se encontraban perfectamente ordenados en las retinas control, mostraban cierta desorganización y aparecían núcleos con características anómalas que aparentemente estaban degenerando (Fig.2B-D y Fig.3A-D) La desorganización nuclear en la ONL y el número de núcleos de fotorreceptores que sufrían procesos de muerte aumentaba con tiempos de supervivencia mayores, siendo frecuentes núcleos con morfologías particulares (Fig. 3A-D), como anillos de cromatina y grupos de cuerpos picnóticos de distintas morfologías. Las células del epitelio pigmentario también se alteraban respecto a las retinas control y presentaban un aspecto hipertrofiado, que se ponía de manifiesto en el aumento del número de inclusiones de tipo fagocítico en su citoplasma (Fig. 2I-L).

En la ONL, la zona que se afectaba inicialmente, se observaba una infiltración de células microgliales ya en los primeros estadios estudiados (Fig.3G y 3H). Estas células, tal y como se recoge en los apartados siguientes, mostraban signos claros de activación, frecuentemente abrazaban núcleos de fotorreceptores en degeneración y contenían en su citoplasma restos de pigmentos.

También se observó infiltración de células con características de macrófagos/microglía en el espacio subretiniano de las retinas tratadas (Fig. 3E-F), mientras que estas células estaban prácticamente ausentes del espacio subretiniano de las retinas control. La infiltración de fagocitos en el espacio subretiniano seguía siendo visible en  $\Phi+10$ días. Con TEM se apreciaba que tanto los fagocitos del espacio subretiniano (Fig.3F) como las células del epitelio pigmentario (Fig. 2J-L) contenían en su interior fagosomas con restos de segmentos externos de los fotorreceptores en diferente estado de degradación.

### **Cuantificación de la muerte celular mediante detección de nucleosomas libres por ELISA**

La muerte celular en las retinas tras la inducción de la fotodegeneración fue cuantificada mediante la técnica de ELISA para determinación de nucleosomas libres. Hay que señalar que este método muestra la variación de la muerte celular en toda la retina y no da información topográfica sobre la capa en que se sitúan las células que mueren. Tras la inducción de la fotodegeneración, tal y como se puede ver en la figura 4, las retinas recuperadas tras 6h de supervivencia ( $\Phi+6$ h) muestran un número significativamente mayor de nucleosomas libres que las retinas control, lo que indica que hay mayor número de células que mueren en el primer tratamiento. La determinación de nucleosomas libres indicaba que la muerte celular en las retinas de animales que habían sobrevivido hasta 48 horas ( $\Phi+48$ h), mostraba valores semejantes. Sin embargo, en los tiempos de supervivencia más prolongados que hemos estudiado,  $\Phi+48$ h,  $\Phi+72$ h y  $\Phi+10$ días, se observaba una tendencia a la disminución de la cantidad de muerte celular en la retina,



tendencia que resultó estadísticamente significativa entre los tratamientos de  $\Phi+48h$  y  $\Phi+10días$  (Fig.4).

### **Detección de apoptosis en la retina mediante la técnica de TUNEL**

Ya se observaban núcleos TUNEL positivos en  $\Phi+6h$  (Fig.5B). En este tiempo de supervivencia, los núcleos TUNEL positivos eran escasos y se localizaban casi exclusivamente en la ONL. En los siguientes tiempos de estudio, el número de núcleos TUNEL positivos en las retinas tratadas se incrementó progresivamente, siendo más numerosos en los tratamientos de  $\Phi+24h$ ,  $\Phi+36h$  y  $\Phi+48h$  (Fig.5). En  $\Phi+24h$  y  $\Phi+36h$ , la mayoría de los núcleos TUNEL positivos se localizaron en la ONL, pero, a partir de  $\Phi+36h$ , se observaban núcleos TUNEL positivos en la INL (Fig.5F), seguramente indicando la degeneración secundaria de interneuronas en esta capa. A partir de  $\Phi+72h$  disminuía el marcaje con TUNEL (Fig.5H).

El marcaje con TUNEL no era homogéneo a lo largo de la retina, sino que en algunas zonas aparecían acúmulos de cuerpos TUNEL positivos, que recordaban los “parches” de degeneración descritos anteriormente. Por el contrario, no aparecía ningún marcaje positivo con la técnica TUNEL en las retinas control (Fig.5A).

### **Estudio inmunofenotípico de las células microgliales y macrófagos que aparecen en la ONL y el espacio subretiniano de las retinas con fotodegeneración**

Las células microgliales de la retina tras la fotodegeneración expresaban marcadores no presentes en la microglía de las retinas control. La expresión de nuevos marcadores, en algunos casos relacionados con el desarrollo de la capacidad fagocítica, es un síntoma claro de la activación microglial junto a la migración hacia la zona de la lesión (que será descrita en detalle posteriormente).

A continuación pasamos a describir en detalle la evolución de los diferentes marcadores utilizados.

### **Expresión de anti-CD45 tras la inducción de la fotodegeneración**

CD45 está presente en la membrana de todas las células del linaje de los macrófagos y monocitos (Penninger *et al.*, 2001); al ser un antígeno de superficie, permite delimitar el contorno y la forma de las células marcadas en mayor medida que otros marcadores. Como controles positivos de este anticuerpo se han empleado macrófagos del vítreo y de la coroides, que expresan fuertemente CD45. Especialmente en las retinas control, se observaba que la intensidad del marcaje era más débil en el parénquima de la retina que en los tejidos extra-retinianos; dentro de la retina el marcaje era más intenso en las proximidades del borde vitreal y disminuía conforme nos alejábamos de él.

En las retinas control aparecían células CD45 positivas en la IPL, OPL y GCL, aunque teñidas con menor intensidad que en las retinas que habían sufrido fotodegeneración (Fig.6A); con mucha menor frecuencia se observaba alguna célula marcada en el espacio subretiniano. Las células marcadas con anti-CD45 presentaban prolongaciones finas y ramificadas, mostrando la misma apariencia que la microglía adulta de la retina normal del ratón descrita en el primer capítulo de esta tesis.

Ya en  $\Phi+6h$ , primer tiempo de supervivencia estudiado, se observaban células CD45 positivas en el espacio subretiniano y en el interior de los huecos que quedaban entre los festones del borde escleral de la ONL y el epitelio pigmentario. Estas células presentaban una morfología macrofágica y un cuerpo compacto. En la OPL aparecían células ramificadas que expresaban bajos niveles de CD45 y cuyas prolongaciones invadían la ONL y, con menor frecuencia, la INL. También aparecían células CD45 fuertemente positivas, muchas de ellas con apariencia de monocitos y algunas con una cierta ramificación y de morfología microglial, en el borde vitreal de la retina y la GCL (Fig.6B). En este estadio se hace evidente que las células macrófago/microgliales han iniciado ya su respuesta al daño retiniano, ya que los núcleos de algunas células microgliales se encuentran dentro de la ONL. En

esta capa se observó que los somas de las células microgliales en muchos casos se disponían rodeando los núcleos de los fotorreceptores, por lo que adoptaban un aspecto de “panales” de abeja (*honeycombs*, en la literatura). Por tanto, la apariencia y distribución de las células macrófago/microgliales en retinas de  $\Phi+6h$  resulta totalmente diferente a la de las retinas control, ya que su morfología era diferente, habían invadido la ONL, capa donde no se sitúan en la retina normal (véase capítulo I y Fig.6A) y el número de macrófagos del espacio subretiniano se había incrementado. El aspecto de las retinas tras 12 horas de supervivencia ( $\Phi+12h$ ; Fig.6C) era comparable al estadio inmediatamente anterior.

Por el contrario, en las retinas de  $\Phi+18h$  (Fig.6D), las zonas con degeneración patente eran más extensas, por lo que la respuesta microglial era también más evidente. Las células *en panal* de la ONL, fuertemente positivas para CD45, eran de gran tamaño, lo que llevaba a plantearse si no se trataba del resultado de la fusión de varias células, aunque no se pudo establecer este punto. Dentro de la ONL se diferenciaba otro tipo de células CD45 positivas que emitían prolongaciones en forma de maza ensanchada que contenían un núcleo fagocitado en su interior (Fig.7A). Otras células CD45 positivas mostraban un soma situado en la OPL, mientras que sus prolongaciones se dirigían hacia las dos capas nucleares (especialmente la ONL), lo que les daba un aspecto cruciforme (Fig.6D). Los macrófagos del espacio subretiniano seguían mostrando una morfología compacta y, en algunas zonas, estaban situados próximos entre ellos, entre otras razones porque la región de los segmentos externos de los fotorreceptores se iba haciendo cada vez más delgada. Algunas de estas células del espacio subretiniano, fuertemente positivas para CD45, emitían un proceso hacia la ONL.

En los tratamientos de  $\Phi+24h$ ,  $\Phi+36h$  y  $\Phi+48h$  (Fig.6E-G), al igual que en el estadio anterior, se observaba que las regiones más dañadas de la retina coincidían con las zonas donde había un mayor número de células CD45 positivas. Muchas de estas células aparecían en la ONL y en el espacio subretiniano. En la IPL se observaba que las células CD45 positivas, muy ramificadas, se localizaban fundamentalmente a dos niveles de esta capa: uno vitreal, cercano a la GCL y otro, escleral, cerca de la INL. Estas células de la

IPL no presentaban morfología fagocítica aunque sí debían presentar cierto grado de activación, ya que expresaban altos niveles de CD45 (Fig.7B). En el borde vitreal de las retinas de estos tratamientos, aparecía alguna célula marcada, aparentemente entrando a la retina.

Tras 72 horas de supervivencia ( $\Phi+72h$ ; Fig.6H), se observaban células microgliales marcadas en la OPL que emitían prolongaciones hacia ambas capas nucleares, aunque los de la ONL estaban más desarrollados y generalmente envolvían núcleos de fotorreceptores. Un cambio importante que se observó en este estadio fue la presencia de células ramificadas en el espacio subretiniano que emitían prolongaciones hacia la ONL; los fagocitos de morfología compacta de tratamientos anteriores dejaron de ser frecuentes. También se observaban numerosas células microgliales fuertemente positivas para CD45 en la IPL, en los dos niveles (vitreal y escleral) mencionados anteriormente; eran células con aspecto más activado que las descritas a  $\Phi+48h$ , pues las prolongaciones celulares eran más gruesas y más cortas.

En el último tratamiento estudiado,  $\Phi+10$ días (Fig.6I), las células CD45 positivas no eran tan frecuentes en la ONL como en tiempos más cortos de supervivencia, en parte debido a que la ONL presentaba un grosor reducido (Fig.7D). Los macrófagos del espacio subretiniano mostraban normalmente una apariencia aplanada, aparentemente confinados entre las células del epitelio pigmentario (RPE) y los fotorreceptores aún presentes en la ONL; tanto estos macrófagos como las células del RPE contenían con frecuencia restos de pigmento visual (lipofuscina), resultante de la degradación de los segmentos externos de los fotorreceptores (Fig.7C). Las células microgliales ramificadas de la IPL seguían siendo abundantes (Fig.6I), aparentemente en respuesta a la degeneración secundaria de interneuronas. Con cierta frecuencia se observaban en esta misma capa hileras de núcleos que parecían corresponder a vasos sanguíneos; algunas células microgliales parecían estar usando estos vasos para desplazarse a través de la IPL (Fig.16). En  $\Phi+10$ días era frecuente observar, en las regiones más periféricas de las retinas, células ramificadas fuertemente positivas para CD45 atravesando la GCL (Fig.6J).

### **Expresión de anti-CD68 tras la inducción de la fotodegeneración**

Hay que tener en cuenta que el anticuerpo anti-CD68 marca una proteína de la membrana lisosomal y, por tanto, no da un patrón de tinción semejante a otros marcadores de activación de la microglía utilizados en este estudio, que reconocen proteínas de la membrana celular. Hasta que no se produce una activación considerable de la célula, el marcaje anti-CD68 se limita a los lisosomas del citoplasma (Yamada *et al.*, 1998). Al igual que para el anticuerpo anti-CD45, los macrófagos y monocitos de la coroides y del vítreo son fuertemente positivos para este marcador, por lo que la tinción de estas células ha servido como control positivo de la reacción inmunológica. Los lisosomas deben sufrir modificaciones durante el proceso de activación microglial, y CD68 aparentemente refleja esos cambios.

En las retinas control (Fig.8A y Fig.9A-B), aparecían marcados los lisosomas de algunas células del vítreo, y de los escasos macrófagos presentes en el espacio subretiniano. Dentro de la retina sólo aparecía marcado un leve punteado en la OPL, INL e IPL, que correspondería al aparato lisosómico de las células microgliales localizadas en dichas capas (véase también la Fig. 1F del capítulo I de esta tesis).

El marcaje con anti-CD68 revelaba que ya en  $\Phi+6h$  (Fig.8B), aparecían células microgliales activadas en la ONL; prolongaciones de estas células rodeaban núcleos de fotorreceptores, dando lugar a las estructuras *en panal* descritas anteriormente. En el espacio subretiniano aparecía un mayor número de macrófagos, algunos con morfología compacta y otros con prolongaciones dirigidas hacia el interior de la ONL; estas prolongaciones se marcaban intensamente con el anticuerpo anti-CD68, lo que sugiere una elevada actividad lisosómica. Muchos macrófagos del espacio subretiniano aparecían en los huecos dejados por las ondulaciones o festones del borde escleral de la ONL. Las células microgliales del resto de la retina mostraban un marcaje lisosómico punteado más patente que en las retinas control, mientras que los monocitos y macrófagos del vítreo aparecían intensamente marcados con anti-CD68.

En las retinas de  $\Phi+12h$  y  $\Phi+18$  (Fig.8C y 8D), el marcaje con anti-CD68 presentaba un aspecto semejante a las de  $\Phi+6h$  en cuanto a la morfología y

localización de las células marcadas con este anticuerpo, aunque se apreciaba que las zonas de retina con daño intenso eran de mayor tamaño, lo mismo que las células *en panal* de la ONL. En el espacio subretiniano, el marcaje de los macrófagos era muy intenso, de forma que aparecía marcada toda la superficie celular (Fig.9C).

En  $\Phi+24h$  y  $\Phi+36h$  (Fig.8E y 8F), el marcaje con anti-CD68 presentaba un aspecto semejante a los descritos con anterioridad. Las células marcadas se localizaban fundamentalmente en el espacio subretiniano, la ONL, la OPL y la GCL.

En las retinas de animales que habían sobrevivido 48 y 72 horas tras la fotodegeneración (tratamientos de  $\Phi+48h$  y  $\Phi+72h$ ; Fig.8G y 8H), se observaba un ligero incremento en la expresión de CD68, especialmente notorio por el mayor desarrollo de las células *en panal* de la ONL (Fig.9D) y por la presencia de células marcadas en la INL, capa donde no aparecían células CD68 positivas inicialmente. En cuanto a las otras localizaciones de células CD68 positivas descritas anteriormente, estas células seguían apareciendo en el espacio subretiniano y la GCL.

Las retinas de  $\Phi+10$  días (Fig.8I), mostraban un descenso en la expresión de CD68, haciéndose muy escasa la presencia de células microgliales marcadas en las capas internas de la retina. Continuaban apareciendo algunos macrófagos fuertemente positivos para anti-CD68 en el espacio subretiniano, que introducían prolongaciones filiformes en la ya muy reducida ONL (Fig.9E).

### **Expresión de anti-F4/80 tras la inducción de la fotodegeneración**

El anticuerpo anti-F4/80 reconoce una glicoproteína de superficie de los macrófagos y células microgliales murinos (Hume y Gordon, 1983); al igual que anti-CD45 y anti-SRA, es un marcador que delimita las membranas celulares.

En las retinas control, se observaban algunas células fusiformes F4/80 positivas, dispuestas radialmente, entre los segmentos externos de los fotorreceptores, dentro del espacio subretiniano. Eran células bipolares, una de cuyas prolongaciones podía introducirse en la ONL, aunque con mayor

frecuencia la célula entera se localizaba fuera de dicha capa, entre los segmentos externos. Algunas de estas células contenían restos de pigmento visual en su interior (Fig.10A). En el resto de la retina, casi no se observó marcaje con anti-F4/80 y, cuando se observaba, este marcaje era mucho más débil que el revelado con anti-CD45.

En  $\Phi+6h$  (Fig. 10B) ya se observaban diferencias fundamentales con respecto al estadio control. Era muy llamativo el marcaje de grandes macrófagos en la coroides (Fig.11A). En el interior de la retina neural, aparecían macrófagos F4/80 positivos en las ondulaciones formadas en la cara escleral de la ONL tras la fotodegeneración y sus prolongaciones se introducían frecuentemente en la ONL. En la ONL también se observaban algunas células microgliales débilmente marcadas con anti-F4/80 y localizadas fundamentalmente en la porción más vitreal de la ONL; muchas de ellas presentaban una morfología *en panal* semejante a la observada con otros marcadores. Algunas prolongaciones de las células microgliales presentes en la OPL también se marcaban con anti-F4/80; parecía tratarse de parte de la microglía de la OPL que emitía prolongaciones F4/80 positivas dentro de la ONL y hacia la INL. No se observaba apenas marcaje para anti-F4/80 en las regiones más vitreales de la retina.

En las retinas de  $\Phi+12h$  y  $\Phi+18h$  (Fig.10C y 10D, respectivamente) se observó un incremento en la intensidad del marcaje con anti-F4/80. En el espacio subretiniano aparecían macrófagos fuertemente marcados con anti-F4/80 (Fig.11B y 11C), mientras que en la ONL se incrementaba notablemente el número, tamaño e intensidad del marcaje de las células reconocidas por el anticuerpo anti-F4/80. Muchas de estas células presentaban morfología *en panal* y envolvían simultáneamente varios núcleos de fotorreceptores (Fig.11D). Con frecuencia se observaba que el soma de las células marcadas se encontraba en la cercana OPL, desde dónde emitía prolongaciones hacia la zona lesionada. En la retina interna aparecían algunas células microgliales F4/80 positivas de morfología ramificada.

En líneas generales, el marcaje con anti-F4/80 presentaba, en las retinas de los tratamientos  $\Phi+24h$  y  $\Phi+36h$  (Fig. 10E y 10F), un aspecto semejante al de las retinas de tiempos más cortos de supervivencia, excepto por el hecho de

que aumentaba el número de prolongaciones F4/80 positivas en la INL. El marcaje de los macrófagos del espacio subretiniano y de los monocitos del vítreo con anti-F4/80 continuaba siendo más fuerte que el de las células microgliales del interior de la retina, aunque las células microgliales de la ONL presentaban un aspecto desarrollado, envolviendo varios núcleos de fotorreceptores simultáneamente (Fig.11E). Numerosas células microgliales F4/80 positivas presentaban prolongaciones que se extendían desde la ONL hasta la IPL, atravesando la INL (Fig.11G y 11H). En el espacio subretiniano, los macrófagos F4/80 positivos ocupaban los festones de la ONL y contenían en su interior restos de pigmento visual (Fig.10E).

Las retinas obtenidas 48 horas tras la fotodegeneración ( $\Phi+48h$ ; Fig.10G) mostraban un elevado grado de expresión de F4/80 en comparación con las de tiempos de supervivencia menores, dando la impresión de que la expresión de este marcador se incrementaba más lentamente que la de los otros marcadores empleados. Aparecían células F4/80 positivas de tamaño considerable y morfología compacta en el espacio subretiniano; estas células con frecuencia contenían restos fagocitados de pigmentos procedentes de los segmentos externos de los fotorreceptores. El desarrollo de las células microgliales *en panal* F4/80 positivas de la ONL se hizo más patente, ya que dichas células englobaban un número muy elevado de núcleos de fotorreceptores y ocupaban zonas extensas de la retina (Fig.10G y 11F). Por el contrario, las células F4/80 positivas eran escasas en las capas más vitreales de la retina; sólo se observaban células marcadas en la GCL con apariencia de monocitos y no se observaban células, que aparentemente estaban entrando en la retina, atravesando el borde vitreal.

El marcaje con anti-F4/80 continuaba siendo patente en retinas de los tratamientos  $\Phi+72h$  y  $\Phi+10$  días (Fig.10H y 10I), aunque también se observaban cambios en la distribución de las células marcadas. La mayor parte de las células F4/80 positivas se localizaban en las capas más vitreales o internas de la retina: fundamentalmente en la IPL, pero también en la OPL, INL y GCL. En  $\Phi+72h$ , los macrófagos del espacio subretiniano y las células F4/80 positivas de la ONL seguían siendo frecuentes, pero en  $\Phi+10$  días su número disminuía, en parte debido a la disminución de grosor de la ONL; en este último



tratamiento, las células marcadas presentaban prolongaciones celulares más finas y somas más alargados. Todo esto sugiere que las células presentan a  $\Phi+10$  días un menor grado de activación que en tiempos de supervivencia más cortos. También en este último tratamiento se observaban células microgliales, en la IPL, asociadas a los vasos presentes en esta capa, aparentemente utilizados como sustrato de migración (Fig.16).

### **Expresión de anti-SRA tras la inducción de la fotodegeneración**

El anticuerpo anti-SRA (CD204) reconoce el receptor *scavenger* de clase A en la membrana celular de fagocitos y células dendríticas (Yamada *et al.*, 1998). En el SNC adulto parece expresarse en los macrófagos perivasculares pero no en la microglía en reposo (Mato *et al.*, 1996) y, en ocasiones, se observa su expresión en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Plüddemann *et al.*, 2007). Su expresión se incrementa en respuesta a un amplio número de ligandos que provocan la activación microglial (Plüddemann *et al.*, 2007). Es considerado, por tanto, como un marcador de activación de la microglía (Alarcón *et al.*, 2005; Block y Hong, 2005; Husemann *et al.*, 2002).

En las retinas control (Fig.12A), sólo se apreciaba marcaje con el anticuerpo anti-SRA en algunas células endoteliales y tal vez en finas prolongaciones microgliales en las regiones donde se distribuye normalmente la microglía retiniana. Los macrófagos del vítreo y de la coroides eran SRA positivos y se utilizaron como control positivo de la reacción.

Ya se apreciaban células microgliales marcadas con anti-SRA en retinas de  $\Phi+6h$  (Fig.12B). En las ondulaciones de la ONL, dentro del espacio subretiniano, aparecían macrófagos marcados, mientras que en la ONL se observaban algunas células *en panel*; también se observaban en la ONL fragmentos de prolongaciones marcadas que provenían de células en la OPL. Por el contrario, muy pocas estructuras aparecían marcadas con anti-SRA en las capas más vitreales de la retina.

El marcaje de las células microgliales con anti-SRA era más evidente tras 12 horas de supervivencia (tratamiento  $\Phi+12h$ ; Fig.12C) en las regiones más afectadas de la retina. También se observaba que los macrófagos del

espacio subretiniano expresaban SRA más intensamente, lo mismo que en la ONL. Como ya hemos descrito, sólo esporádicamente aparecía marcaje con anti-SRA en las capas vitreales de la retina, poniendo sobre todo de manifiesto la presencia de células microgliales ramificadas de la IPL. Con cierta frecuencia se observaban macrófagos aplanados que parecían estar atravesando el borde vitreal de la retina; en algunos casos, estas células presentaban prolongaciones gruesas que se introducían en la retina neural; estas prolongaciones parecían adelgazarse y ramificarse una vez dentro de la retina, donde disminuía su nivel de expresión de SRA.

En las retinas de los tratamientos  $\Phi+18h$  y  $\Phi+24h$  (Fig.12D y 12E), las regiones con alteraciones patentes eran más extensas, al mismo tiempo que se observaba que la expresión de SRA se incrementaba. El anticuerpo anti-SRA permitía reconocer todo el contorno de las células marcadas, incluidas prolongaciones más finas. En el espacio subretiniano aparecía un gran número de macrófagos fuertemente positivos para anti-SRA, mientras que en la ONL se observaban numerosas células microgliales SRA positivas con morfología *en panel*. En retinas de  $\Phi+18h$ , además de en las localizaciones anteriormente descritas, era frecuente la presencia de células microgliales ramificadas en dos niveles de la retina: (i) OPL e IPL e (ii) INL. En ambos tiempos tras la fotodegeneración, aparecían, con mayor frecuencia que en  $\Phi+12h$ , células SRA positivas aplanadas sobre el borde vitreal que introducían prolongaciones en el interior de la retina, atravesando la GCL (Fig.13A y 13B).

En las retinas de los tiempos siguientes de supervivencia,  $\Phi+36h$ ,  $\Phi+48h$  y  $\Phi+72h$  (Fig.12F-H), seguían apareciendo numerosas células marcadas con anti-SRA. Los macrófagos del espacio subretiniano, fuertemente positivos para anti-SRA y conteniendo con mucha frecuencia restos de pigmentos fagocitados, eran abundantes y de gran tamaño (Fig.12F y 12G). En la ONL había numerosas células microgliales SRA positivas que, en muchos casos, aparecían rodeando los núcleos de los fotorreceptores (Fig.13F). En la OPL también se observaban células SRA positivas muy ramificadas, con prolongaciones que a veces atravesaban la INL y llegaban a contactar con las prolongaciones de otras células situadas en la IPL (Fig.13D-G). También se observaban células marcadas en regiones más vitreales de la retina: en la IPL

había numerosas células microgliales SRA positivas que presentaban un aspecto ramificado. En las retinas de los tratamientos  $\Phi+36h$ ,  $\Phi+48$  y  $\Phi+72h$  se observaban frecuentemente células SRA positivas en el borde vitreal de la retina, introduciendo prolongaciones en el parénquima retiniano (Fig.13C), como ya se ha descrito más arriba.

Finalmente, la expresión de SRA había disminuido de forma notoria en retinas del tratamiento  $\Phi+10días$  (Fig.12I), de manera que sólo había un marcaje claro con anti-SRA en los macrófagos vitreales y de la coroides, del exterior de la retina, mientras que en el interior de la misma únicamente aparecían marcados algunos fragmentos de prolongaciones delgadas.

### **Análisis cuantitativo de la presencia de células microgliales y macrófagos en la ONL y espacio subretiniano tras la fotodegeneración**

Como se ha descrito, tras la inducción de la fotodegeneración se modificó la distribución de las células microgliales en las diferentes capas de la retina respecto a lo observado en retinas normales. Las células microgliales invaden la ONL (es decir, la retina externa) a la vez que se acumulan en gran número en el espacio subretiniano. Hay que decir que en las retinas control aparecen algunos macrófagos, de pequeño tamaño, en el espacio subretiniano, justo por debajo del epitelio pigmentario. Macrófagos de mayor tamaño y mucho más numerosos se observan poco después del tratamiento con luz intensa.

Con objeto de obtener una medida de la cantidad de células microgliales y macrófagos que invaden la retina externa como respuesta a nuestro protocolo de fotodegeneración, se realizó un recuento del número de células SRA positivas en las capas ONL y espacio subretiniano en diferentes tiempos de supervivencia. Las capas vitreales de la retina son invadidas por vasos sanguíneos, que, por una parte, contienen células circulantes que expresan SRA (Husemann *et al.*, 2002), y, por otra, tienen asociadas células perivasculares, que también expresan SRA (Mato *et al.*, 1996); para evitar que el marcaje de estas células interfiriera en el recuento de las células microgliales

SRA-positivas, no se consideraron en nuestro estudio más que las regiones de la retina libres de vascularización.

Otra razón para emplear el anticuerpo anti-SRA en nuestro estudio cuantitativo es que reconoce únicamente microglía con cierto grado de activación, de forma que también proporciona una idea del curso de la reacción microglial.

Los resultados obtenidos se reflejan en la figura 14, en la que se aprecia que el número de microglía activada se incrementa rápidamente tras la lesión; se mantiene en los mismos niveles alrededor de dos días y posteriormente disminuye hasta reducirse casi a los niveles control a los diez días de supervivencia tras el tratamiento con luz (en este caso hay que tener en cuenta la disminución del grosor de la ONL y espacio subretiniano observado en esos animales).

### **Relación espacial entre la muerte celular y las células microgliales**

La correlación espacial entre la muerte celular y la presencia de células microgliales fue establecida en secciones sometidas a doble marcaje anti-SRA/TUNEL. Mientras que el marcaje con TUNEL pone de manifiesto las células que se encuentran en proceso de degeneración o que han degenerado recientemente (Fig.5), el anticuerpo anti-SRA muestra las células microgliales activadas, diferenciándolas de la microglía no activada (Fig.12 y 13).

Estas secciones mostraron que muchos fragmentos marcados con la técnica de TUNEL no se encontraban en contacto o en las proximidades de células microgliales activadas (Fig. 15).

**Fig. 1.** Alteraciones morfológicas de las retinas sometidas al protocolo de fotodegeneración. Micrografías de la región central de las retinas obtenidas a partir de secciones semifinas y contrastadas con azul de toluidina.

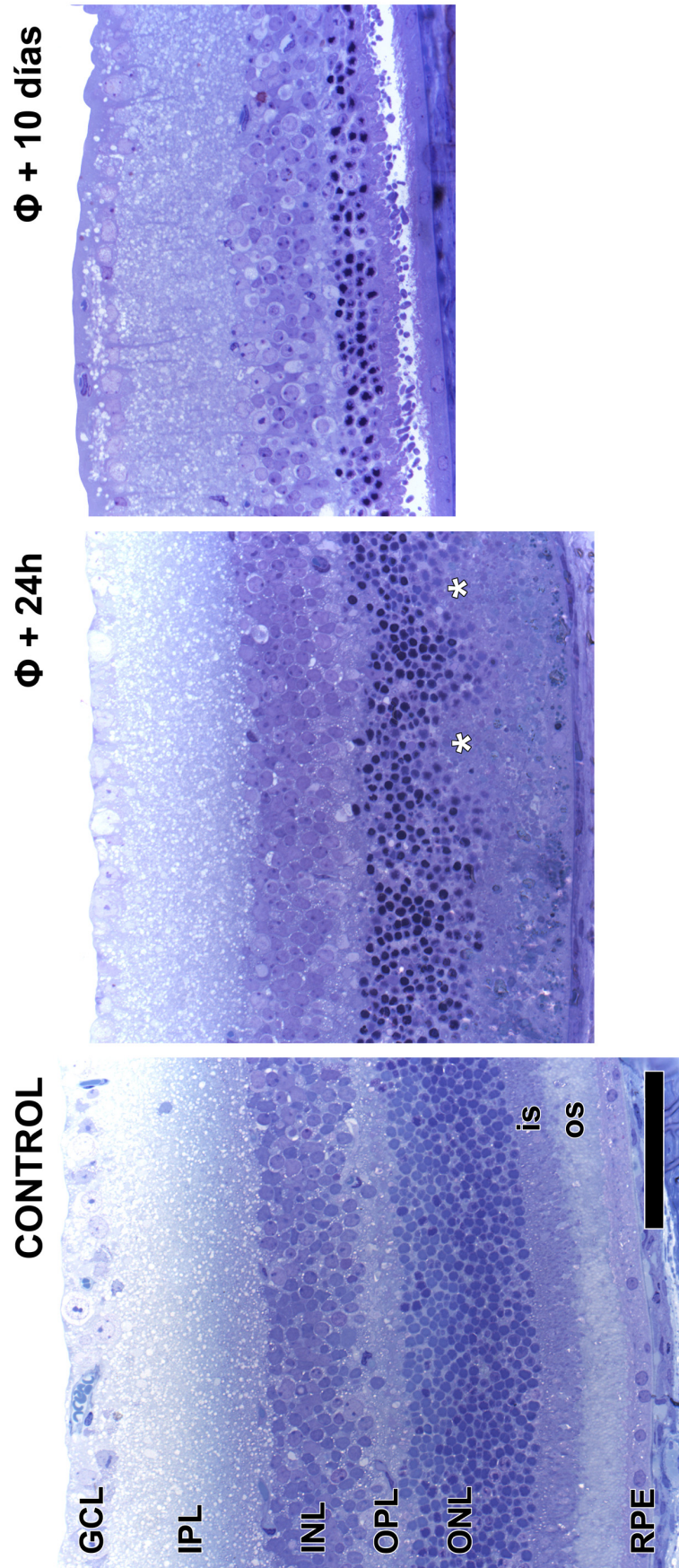
En las retinas control, tanto el grosor de la ONL como el grado de organización de los núcleos de los fotorreceptores son normales; el resto de capas de la retina y el RPE tienen también una apariencia normal.

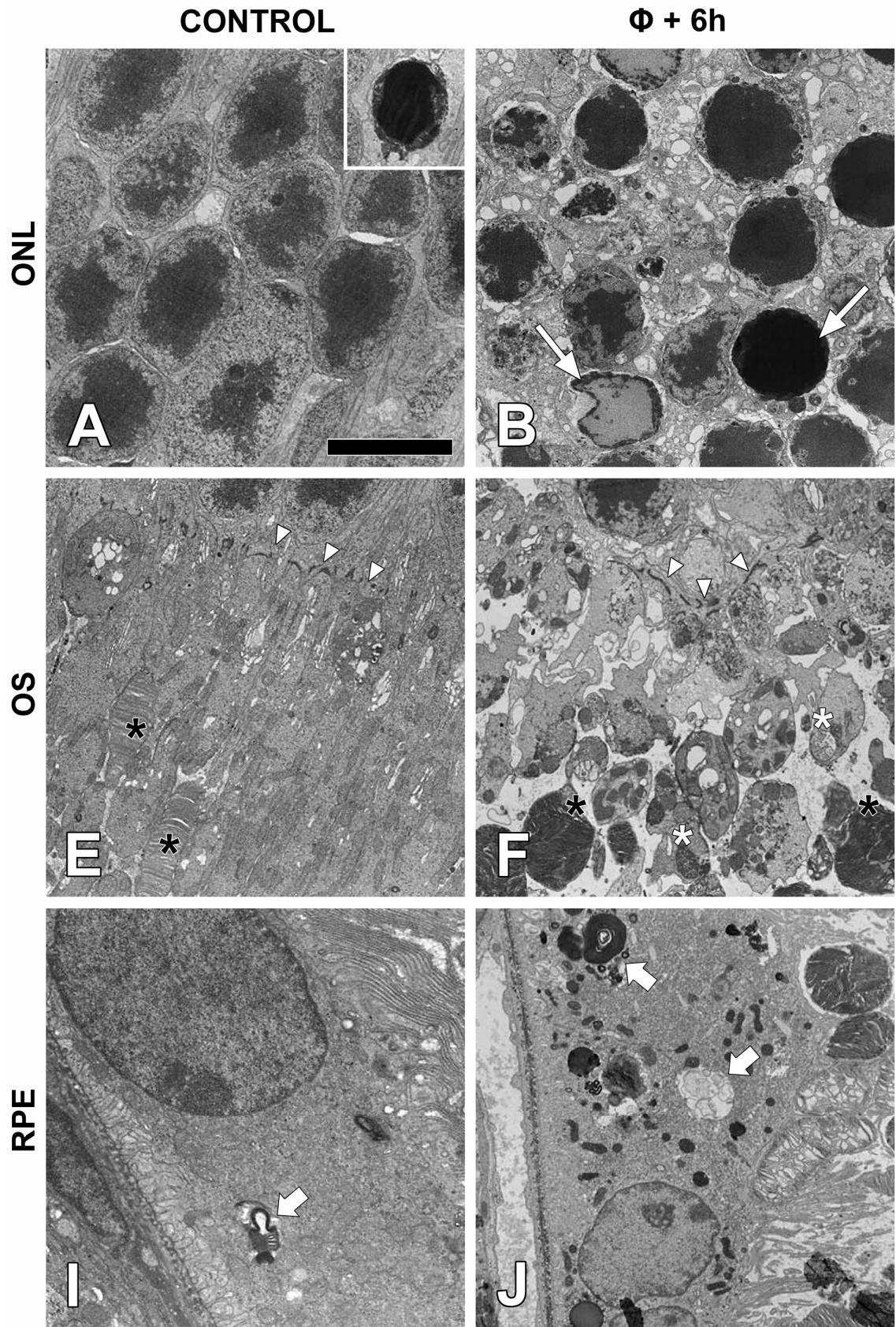
Un día después de la exposición a la luz intensa ( $\Phi+24h$ ), las células del RPE están hipertrofiadas (véase también figura 2), los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (IS y OS) muestran cierta desorganización y aparece un gran número de núcleos picnóticos en la ONL, especialmente en su región más interna. El borde escleral de la ONL exhibe un aspecto ondulado, con festones (asteriscos), característico de las retinas expuestas a la luz. El grosor de la ONL disminuye ligeramente en comparación con las retinas control.

Diez días después de la fotodegeneración ( $\Phi+10$  días), las células del RPE vuelven a aplanarse (véase también Fig.2). El grosor de la ONL disminuye considerablemente, quedando esta capa reducida a dos o tres hileras de núcleos, en su mayoría picnóticos y los segmentos internos y externos son escasos. Las capas más internas de la retina aparentemente no muestran cambios patentes durante este periodo, aunque sí se puede apreciar la gliosis de las células de Müller, cuyos procesos terminales se tiñen intensamente con el azul de toluidina y forman una capa por encima de la GCL.

GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa; IS, segmentos internos de los fotorreceptores; OS, segmentos externos de los fotorreceptores; RPE, epitelio pigmentario;  $\Phi$ , fotodegeneración.

Barra de escala: 50  $\mu m$ .

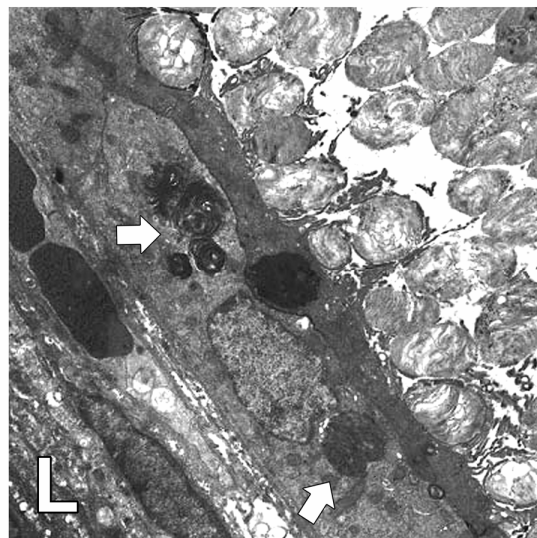
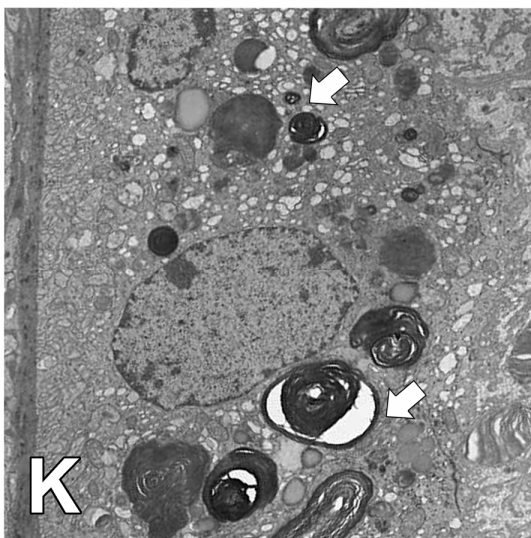
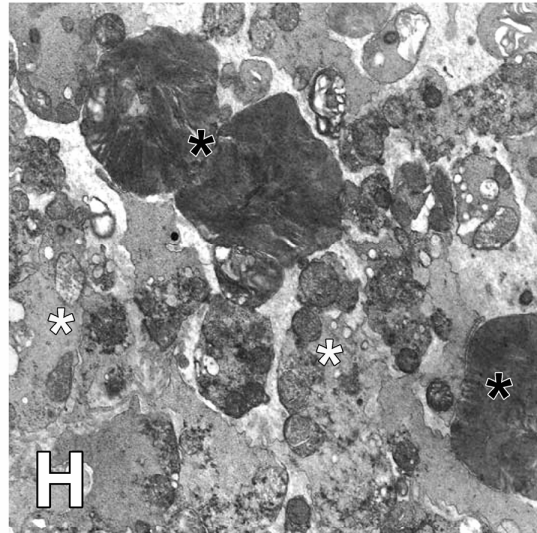
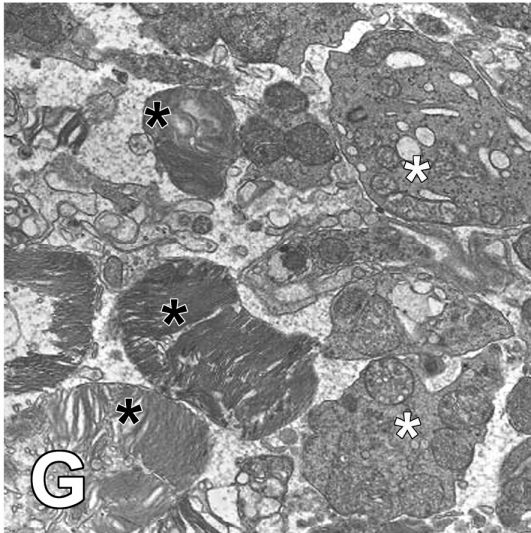
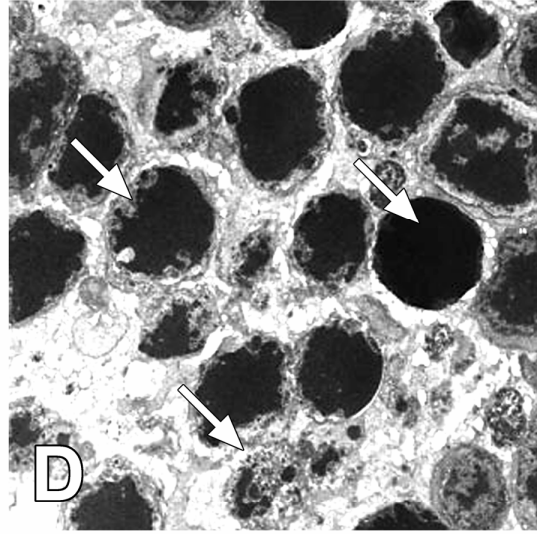
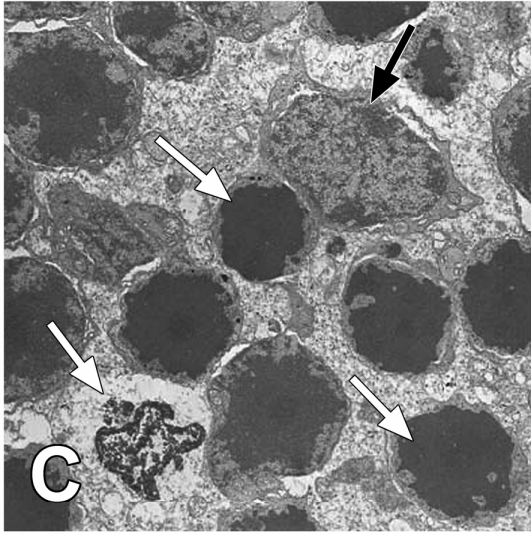






$\Phi + 24h$

$\Phi + 10 \text{ días}$





**Fig. 2.** (←, **doble página anterior**) Alteraciones ultraestructurales de las retinas sometidas al protocolo de fotodegeneración ( $\Phi$ ). En cada una de las cuatro columnas de micrografías de TEM se recogen diferentes zonas de las retinas de cada tratamiento (control,  $\Phi+6h$ ;  $\Phi+24h$  y  $\Phi+10días$ ) (de arriba abajo, ONL, zona de segmentos externos de los fotorreceptores (OS) y RPE).

**A-D:** Como puede apreciarse en las figuras, la ONL muestra un aspecto normal en las retinas de los animales control, con los núcleos de los fotorreceptores densamente empaquetados y heterocromáticos; Ocasionalmente, en las retinas control, se observaba algún núcleo picnótico (ver inserto en A), hecho relativamente frecuente en retinas de animales albinos. Tras los distintos tiempos de supervivencia empleados, se hace muy patente la desorganización estructural en esta capa: los núcleos dejan de estar ordenados y aparecen espacios libres; numerosos núcleos de fotorreceptores presentan morfologías relacionadas con fenómenos de muerte celular (flechas finas blancas en B-D) y aparecen células infiltradas en dicha capa (flecha fina negra en C).

**E-H:** La región de los segmentos externos (OS) de los fotorreceptores también muestra alteraciones muy patentes tras la exposición a la luz. En las retinas de animales control, se pueden apreciar los cilios de conexión perfectamente alineados (puntas de flecha en E), en la base de las pilas de discos, perfectamente ordenadas (asteriscos negros en E). Conforme avanza la degeneración en las retinas tratadas, los segmentos externos se deterioran y los restos de membranas/ antiguos discos apilados (asteriscos negros en F) se reparten por el espacio subretiniano. Los cilios de conexión también se desorganizan (puntas de flecha en F). En el espacio subretiniano aparecen numerosos restos de citoplasma rodeados de membrana plasmática en cuyo interior se pueden apreciar tanto discos desorganizados (asteriscos negros en F-H) como orgánulos, especialmente mitocondrias, en procesos de degeneración (véanse asteriscos blancos en F-H).

**I-L:** Las células que constituyen el epitelio pigmentario (RPE) también experimentan cambios tras la exposición de las retinas a la luz intensa. A partir del estadio de  $\Phi+6h$  (J) se puede apreciar el aumento del número y el tamaño de las inclusiones fagocitadas (flechas gruesas blancas) por estas células, que en condiciones normales (I) sólo muestran escasas inclusiones. Las células del RPE se hipertrofian considerablemente tras la fotodegeneración y, 10 días tras el daño (L), vuelven a aplanarse.

Barra de escala: 5  $\mu m$  en A-F y J-L; 2.25  $\mu m$  en G, I; 2.8  $\mu m$  en H.

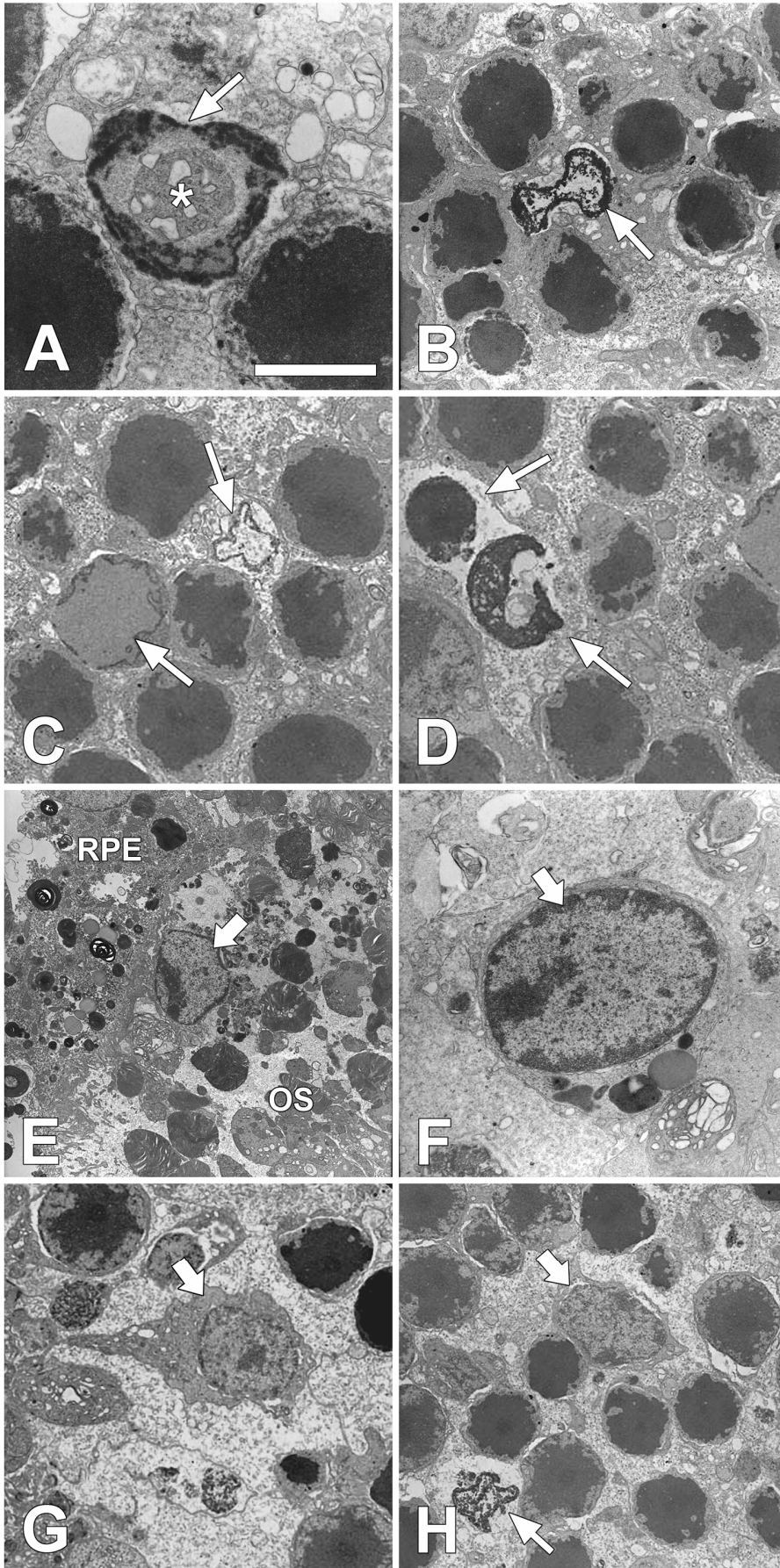
**Fig. 3** (→, **página siguiente**) Desorganización nuclear e infiltración de células fagocíticas en la retina externa tras la fotodegeneración inducida por luz intensa. Micrografías de TEM.

**A-D:** núcleos de fotorreceptores con morfologías anómalas provocadas por la exposición a la luz. Son muy frecuentes los núcleos picnóticos, con un tono mucho más oscuro que el de los núcleos sanos. También aparecen núcleos con morfologías particulares: anillos de cromatina (asterisco en A) y cuerpos picnóticos de distintas morfologías (flechas finas, en A-D y H).

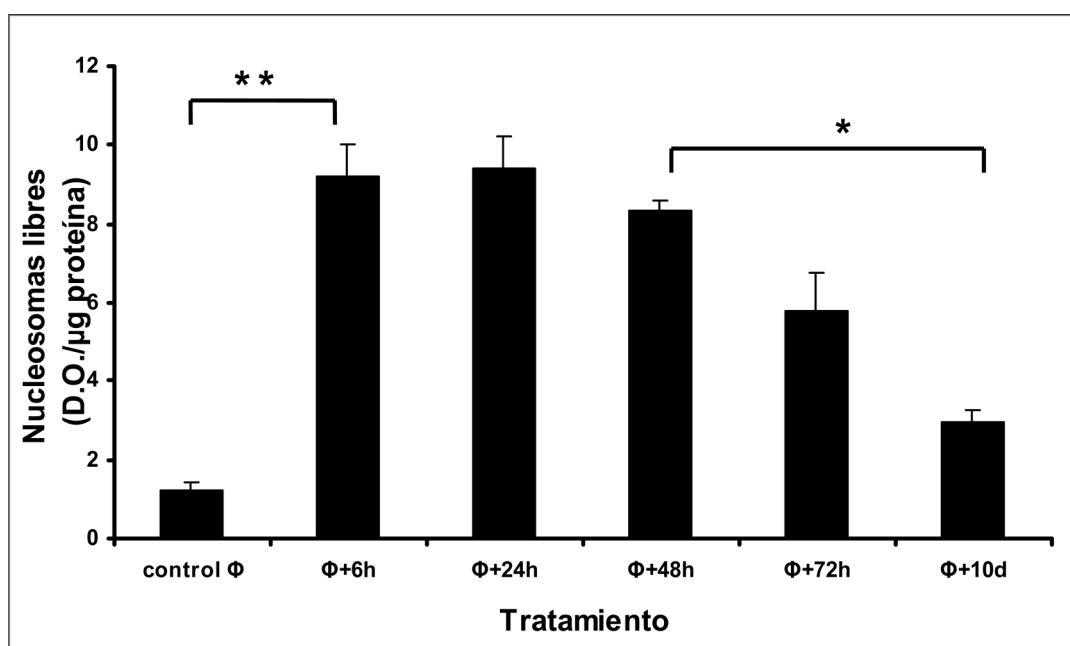
**E-H:** infiltración de células macrófago/microgliales en las retinas afectadas tras la fotodegeneración (flechas gruesas en E-H). En las retinas tratadas aparecen células infiltradas en el espacio subretiniano (E-F) y en la ONL (G-H), entre los núcleos de los fotorreceptores en degeneración. Estas células infiltradas presentan aspecto de células macrófago/microgliales y, con bastante frecuencia, portan fagosomas en su interior (flecha gruesa en F).

ONL, capa nuclear externa; RPE, epitelio pigmentario; OS, segmentos externos de los fotorreceptores.

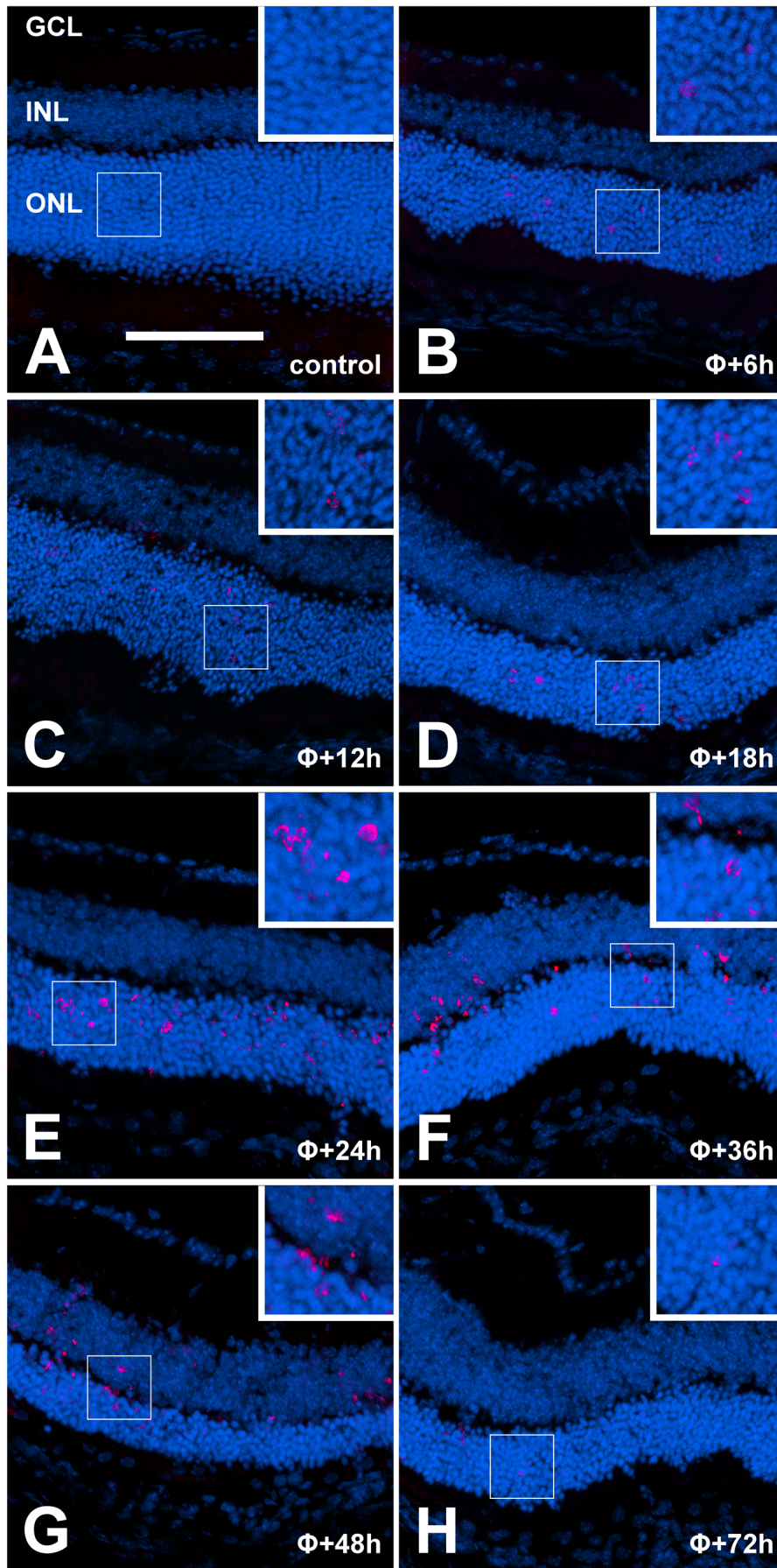
Barra de escala: 2  $\mu m$  en A; 4  $\mu m$  en B; 10.7  $\mu m$  en C y D; 7  $\mu m$  en E y H; 2.5  $\mu m$  en F; 8.6  $\mu m$  en G.



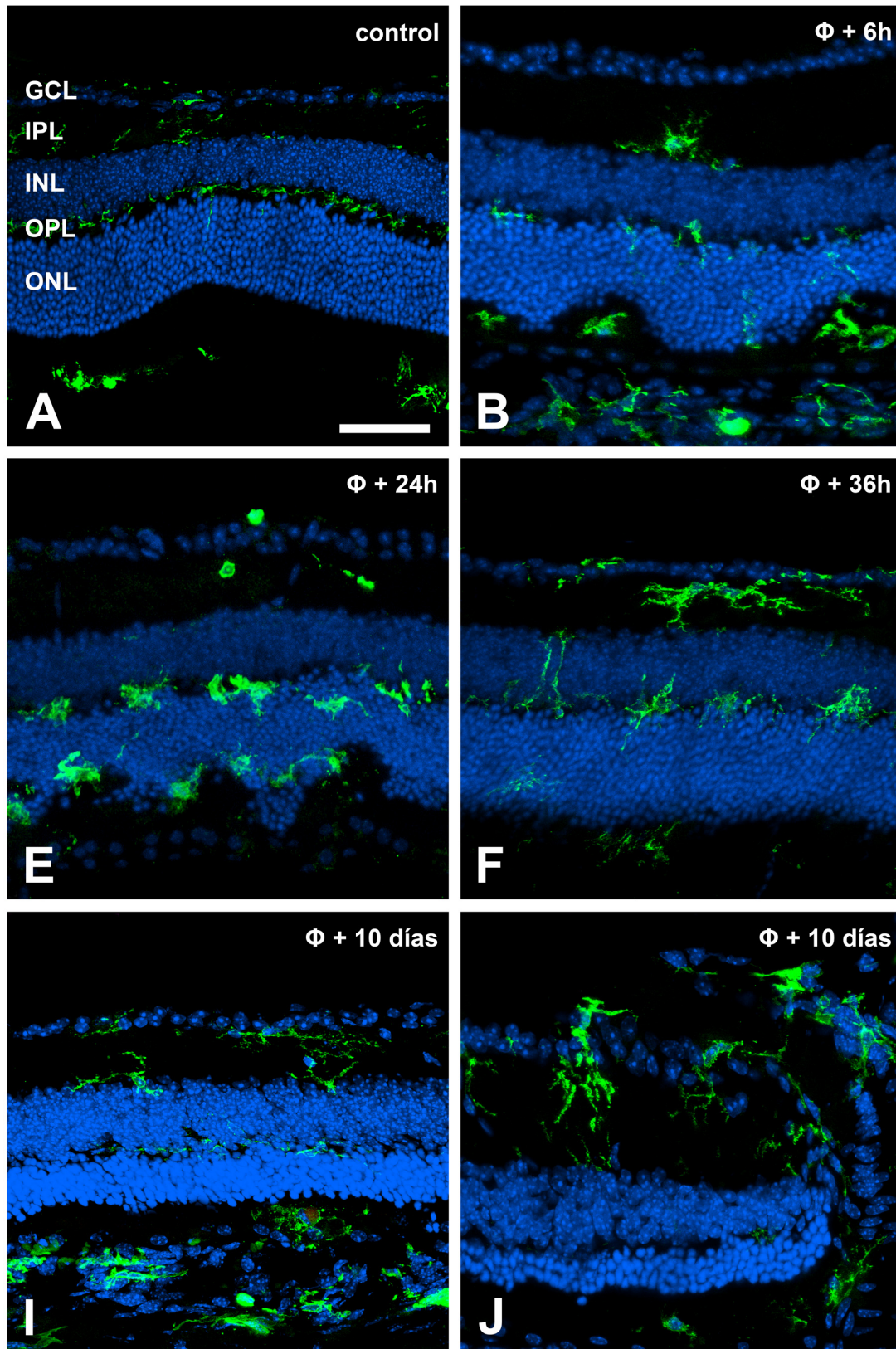
**Fig. 4.** Cuantificación de la muerte celular en las retinas control y tratadas mediante ELISA de nucleosomas libres citosólicos. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .  
 $\Phi$ = fotodegeneración. D.O.= densidad óptica.

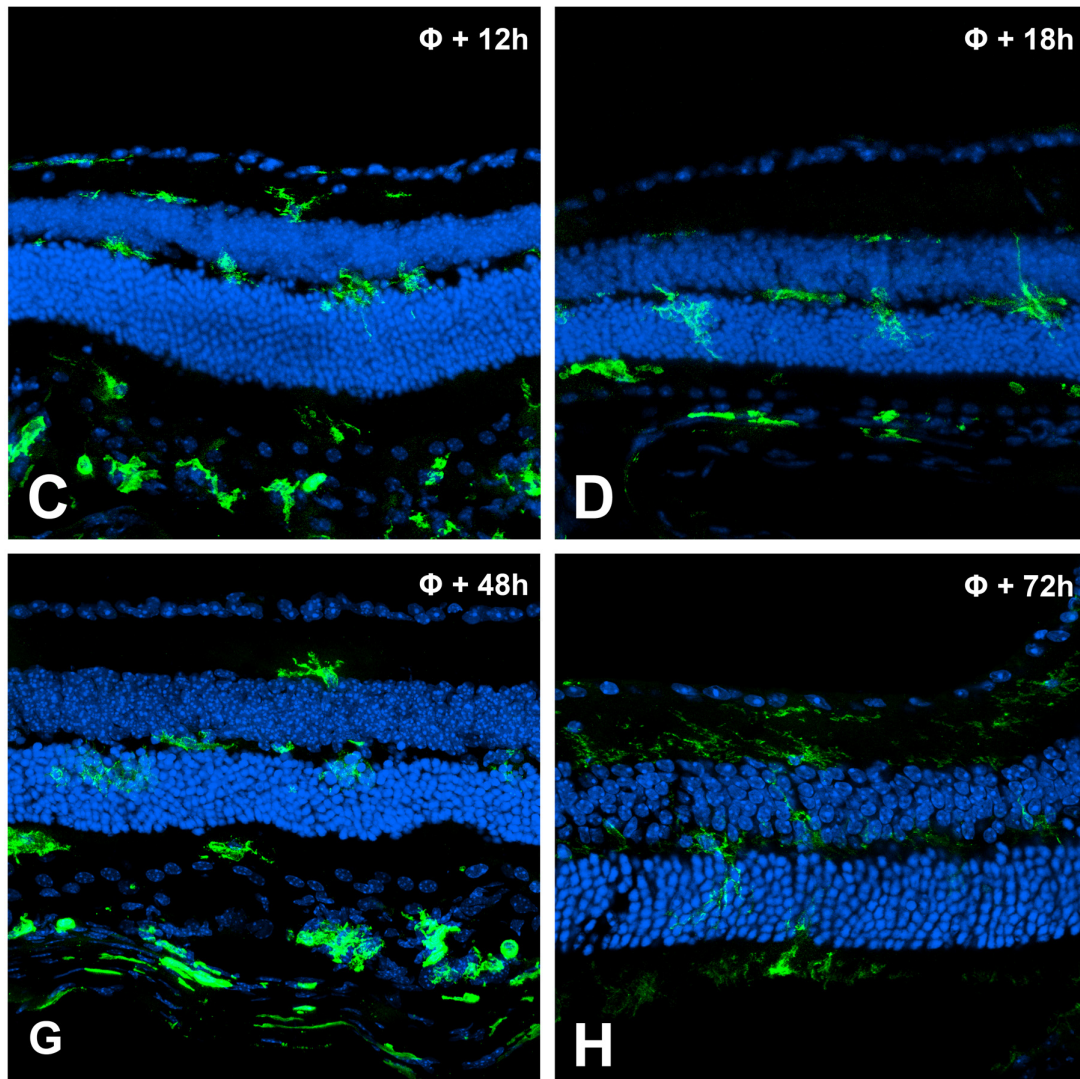


**Fig. 5.** Detección de núcleos TUNEL positivos (rojo) en las retinas tras la fotodegeneración inducida por luz intensa. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal. En los insertos de cada una de las figuras se muestra un aumento a doble escala de la región de la retina señalada por el recuadro blanco. Los núcleos celulares se han contrastado con Hoechst. Las retinas de los animales control no presentan núcleos TUNEL positivos (**A**). Éstos empiezan a aparecer, en la ONL, 6 horas tras la exposición a luz intensa (**B**), aunque son muy escasos en los primeros tiempos de post-tratamiento estudiados:  $\Phi+6h$ ,  $\Phi+12h$  y  $\Phi+18h$  (figuras **B**, **C** y **D**, respectivamente). El marcaje con TUNEL se incrementa progresivamente a partir del tratamiento de  $\Phi+24h$  (**E**); en  $\Phi+36h$  (**F**), además de la presencia de núcleos marcados en la ONL, comenzaron a aparecer también núcleos TUNEL positivos en la INL. A partir del tratamiento de  $\Phi+48h$  (**G**), descendía nuevamente el marcaje con TUNEL en las retinas tratadas, para volver a hacerse muy escaso en  $\Phi+72h$  (**H**). GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa;  $\Phi$ , fotodegeneración. Barra de escala: 58  $\mu m$  en A; 75  $\mu m$  en B, D, F, G y H; 92  $\mu m$  en C y 97  $\mu m$  en E.









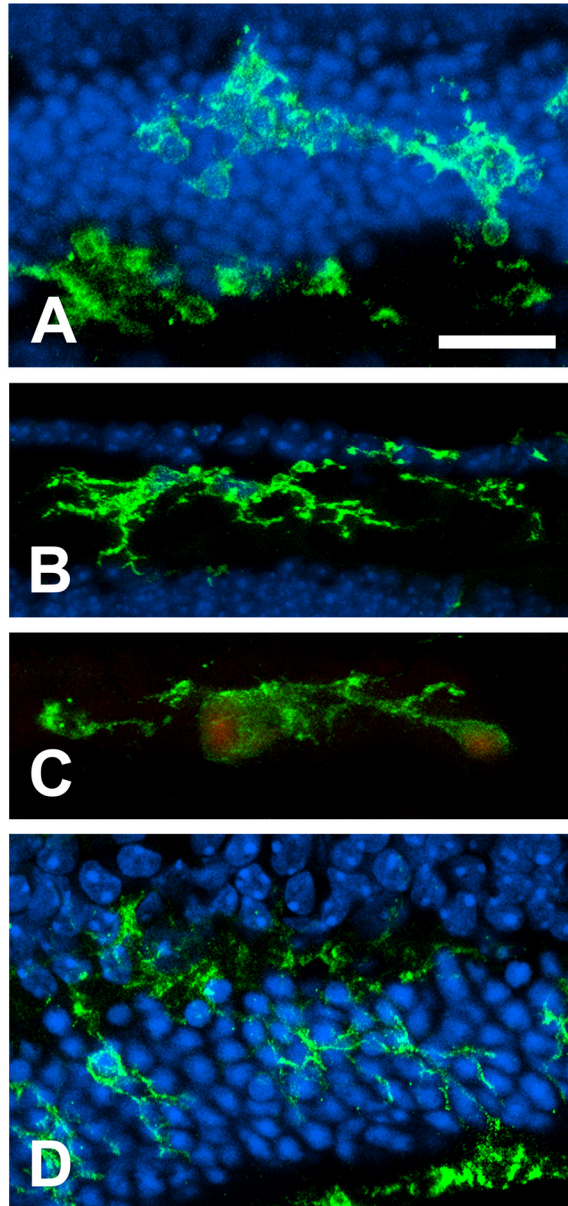
**Fig. 6.** Evolución temporal de la expresión de CD45 (verde) en la región central de las retinas murinas control (**A**) y sometidas a los diferentes tratamientos de fotodegeneración empleados en este estudio (**B-J**). Imágenes de microscopía confocal. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul).

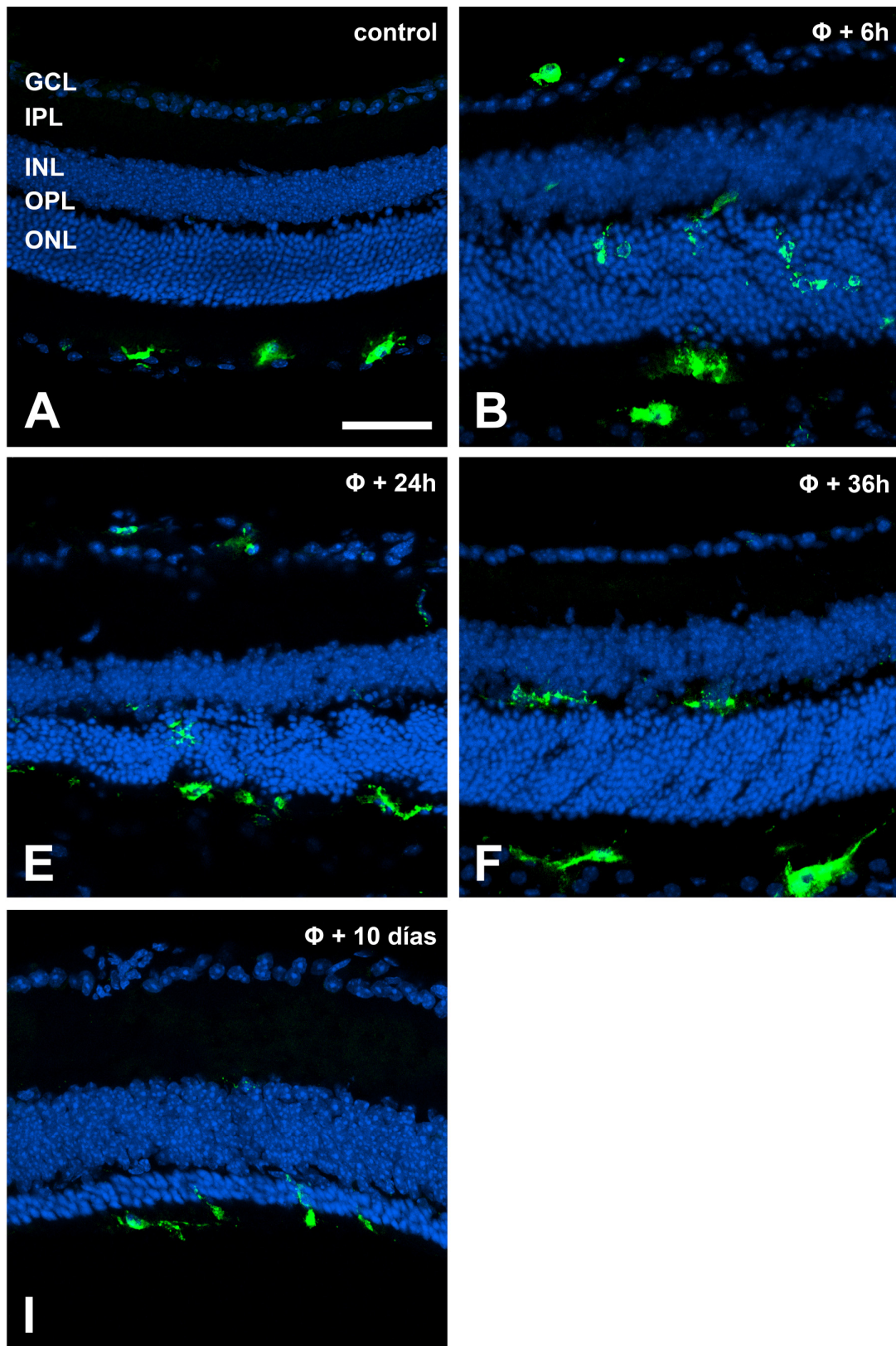
**A:** En las retinas control, anti-CD45 marca células microgliales en las capas GCL, IPL y OPL, distribución típica de la microglía madura en la retina murina. Los macrófagos y monocitos del vítreo y la coroides se emplean como control positivo, puesto que expresan fuertemente CD45. Tras la fotodegeneración (**B-J**), se observan numerosas células marcadas en el espacio subretiniano y en el interior de la ONL, donde engloban los núcleos de los fotorreceptores dañados. A partir de  $\Phi+48h$  (**G-J**), aparecen numerosas células microgliales ramificadas CD45 positivas en la retina interna (INL, IPL y GCL) y es frecuente observarlas atravesando la GCL para entrar en el parénquima en la región periférica y cuerpo ciliar de retinas de  $\Phi+10$  días (**J**). GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa;  $\Phi$ , fotodegeneración.

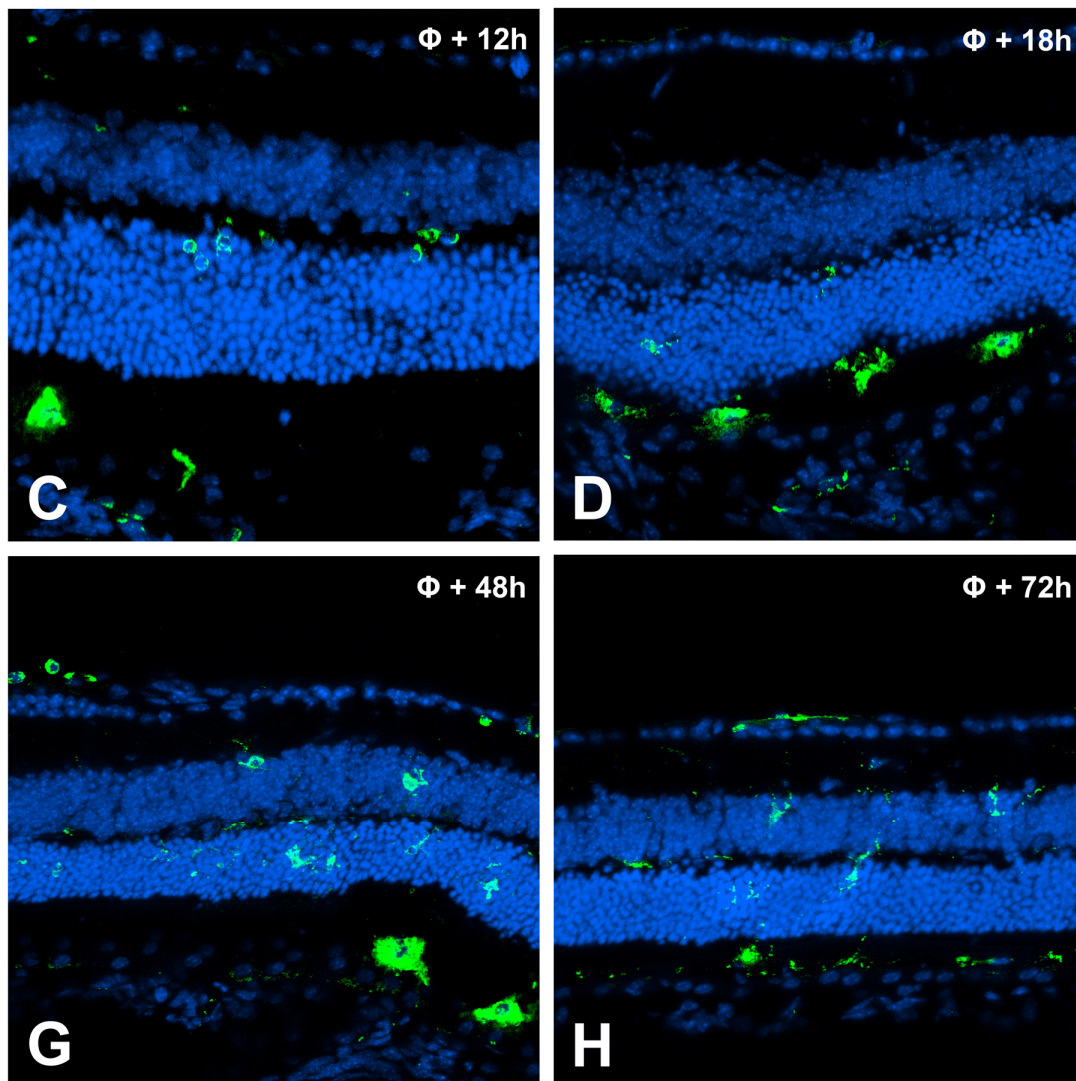
Barra de escala: 50  $\mu m$  en A; 41  $\mu m$  en B; 48  $\mu m$  en C-E y G; 43  $\mu m$  en F; 42  $\mu m$  en H-J.



**Fig. 7.** Detalle de células CD45 positivas (verde) en diferentes regiones de la retina. Imágenes de microscopía confocal. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul). **A:** célula ramificada *en panal* en la ONL con varias prolongaciones cuyos extremos terminan en “maza” y engloban núcleos de fotorreceptores (retina de  $\Phi+18h$ ); **B:** células ramificadas CD45 positivas en la IPL (retina de  $\Phi+36h$ ). **C:** célula con fagosomas (autofluorescencia roja) en el espacio subretiniano (retina de  $\Phi+10$  días). **D:** células ramificadas en la OPL cuyas prolongaciones se introducen en la ONL, englobando los núcleos de varios fotorreceptores (retina de  $\Phi+10$  días).  
Barra de escala: 18  $\mu m$  en A; 25  $\mu m$  en B; 16  $\mu m$  en C; 17  $\mu m$  en D.







**Fig. 8.** Evolución temporal de la expresión de CD68 (verde) en la región central de retinas control (**A**) y sometidas a los diferentes tratamientos de fotodegeneración empleados en este estudio (**B-I**). Imágenes de microscopía confocal. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul).

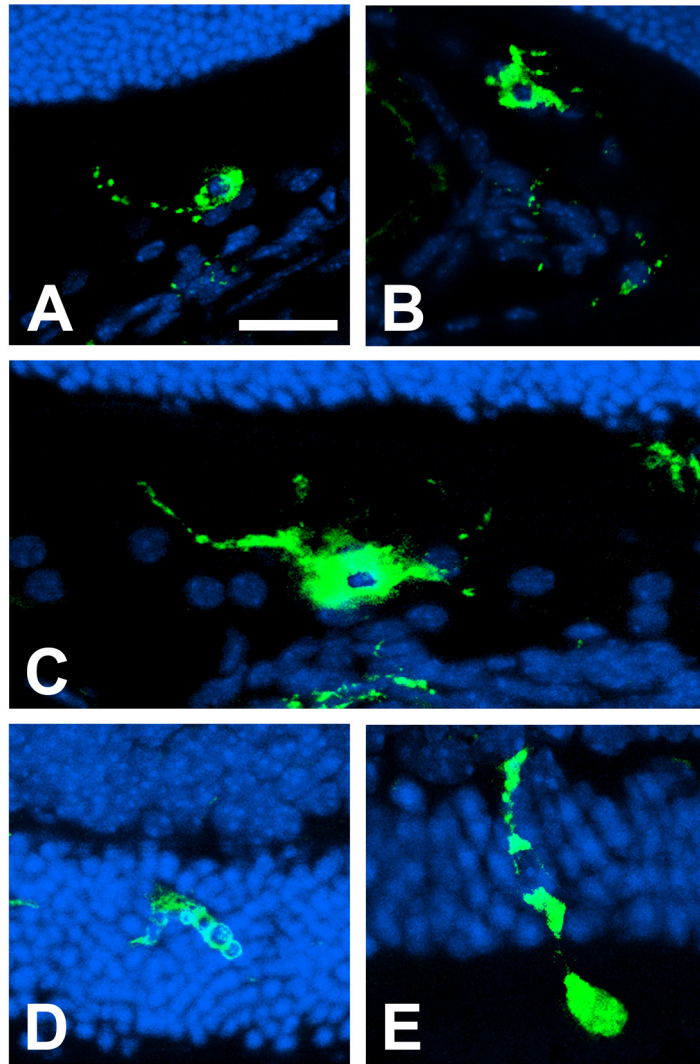
**A:** En las retinas control, anti-CD68 marca los macrófagos del espacio subretiniano y del vítreo; en el interior de la retina se observa en ocasiones un leve marcaje punteado que correspondería al aparato lisosómico de las células microgliales de las capas GCL, IPL y OPL. Tras la fotodegeneración (**B-I**), se observan células marcadas en el interior de la ONL, englobando núcleos de los fotorreceptores; los macrófagos del espacio subretiniano aumentan de tamaño y su grado de expresión de CD68 de forma progresiva. Conforme avanza el tiempo de supervivencia tras la exposición a la luz, las células CD68 positivas del interior de la retina se hacen más patentes, apareciendo en ambas plexiformes, además de en la ONL y el espacio subretiniano. En  $\Phi+10$  días (**I**) las retinas mostraban un descenso claro de la expresión de CD68, aunque aparecían aún macrófagos en el espacio subretiniano que, en ocasiones, introducían prolongaciones filiformes en la ya muy reducida ONL.

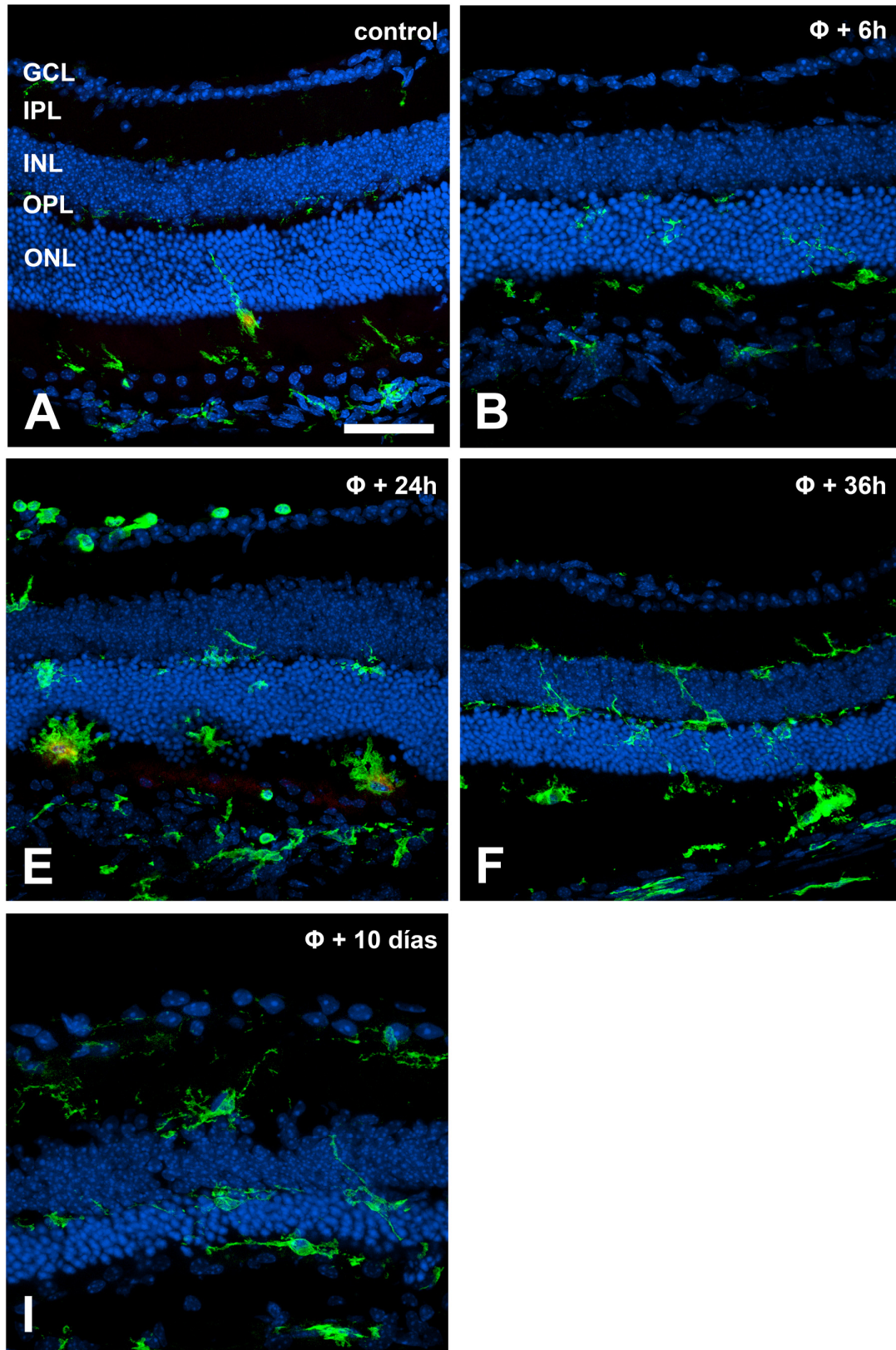
GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa;  $\Phi$ , fotodegeneración.

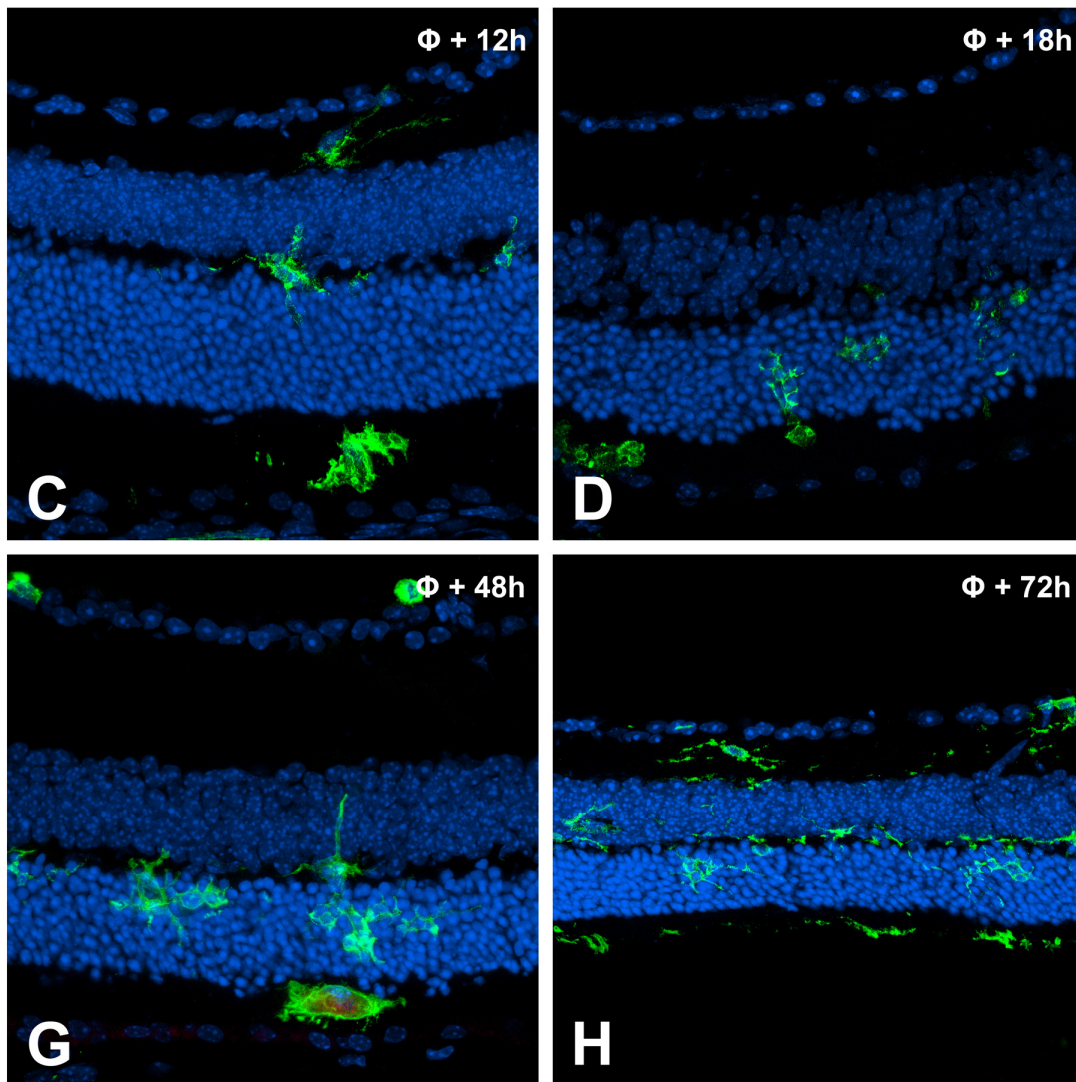
Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  en A; 37  $\mu\text{m}$  en B y C; 47  $\mu\text{m}$  en D-E y H; 40  $\mu\text{m}$  en F; 54  $\mu\text{m}$  en G; 35  $\mu\text{m}$  en I.

**Fig. 9.** Detalle de células CD68 positivas (verde) en diferentes regiones de la retina. Imágenes de microscopía confocal. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul). **A:** marcaje lisosómico (patrón punteado) de un macrófago en el espacio subretiniano (retina control); **B:** dicho marcaje con anti-CD68 se extiende a la célula completa conforme aumenta su grado de activación (retina control). **C:** célula CD68 positiva en el espacio subretiniano; el marcaje de los macrófagos tras la fotodegeneración es intenso y se marca toda la superficie celular (retina de  $\Phi+12h$ ). **D:** célula ramificada *en panal* en la ONL, englobando los núcleos de varios fotorreceptores (retina de  $\Phi+48h$ ). **E:** célula CD68 positiva del espacio subretiniano que introduce una prolongación filiforme en la ONL (retina de  $\Phi+10$  días). Barra de escala: 25  $\mu m$  en A; 27  $\mu m$  en B; 20  $\mu m$  en C y D; 13  $\mu m$  en E.









**Fig. 10.** Evolución temporal de la expresión de F4/80 (verde) en la región central de retinas control (**A**) y sometidas a los diferentes tratamientos de fotodegeneración empleados en este estudio (**B-I**). Imágenes de microscopía confocal. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul).

**A:** En las retinas control, anti-F4/80 marca levemente las células microgliales maduras en las capas GCL, IPL, INL y OPL y más intensamente los macrófagos del espacio subretiniano, que con frecuencia contienen en su interior restos de pigmentos (autofluorescencia roja) e introducen prolongaciones en la ONL. Tras la fotodegeneración (**B-I**), se observan numerosas células marcadas en el espacio subretiniano, que adquieren gradualmente un gran desarrollo y contienen en su interior restos de pigmentos (autofluorescencia roja). Tras la fotodegeneración, la microglía invade la ONL, capa en la que estas células adquieren morfologías *en panal*, englobando simultáneamente los núcleos de varios fotorreceptores. A partir de  $\Phi+36h$  (**F-I**), aparecen numerosas células microgliales ramificadas F4/80 positivas en la retina interna (IPL, INL) y es frecuente observar células que se localizan en la OPL y cuyas prolongaciones se extienden por ambas nucleares (ONL e INL).

GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa;  $\Phi$ , fotodegeneración.

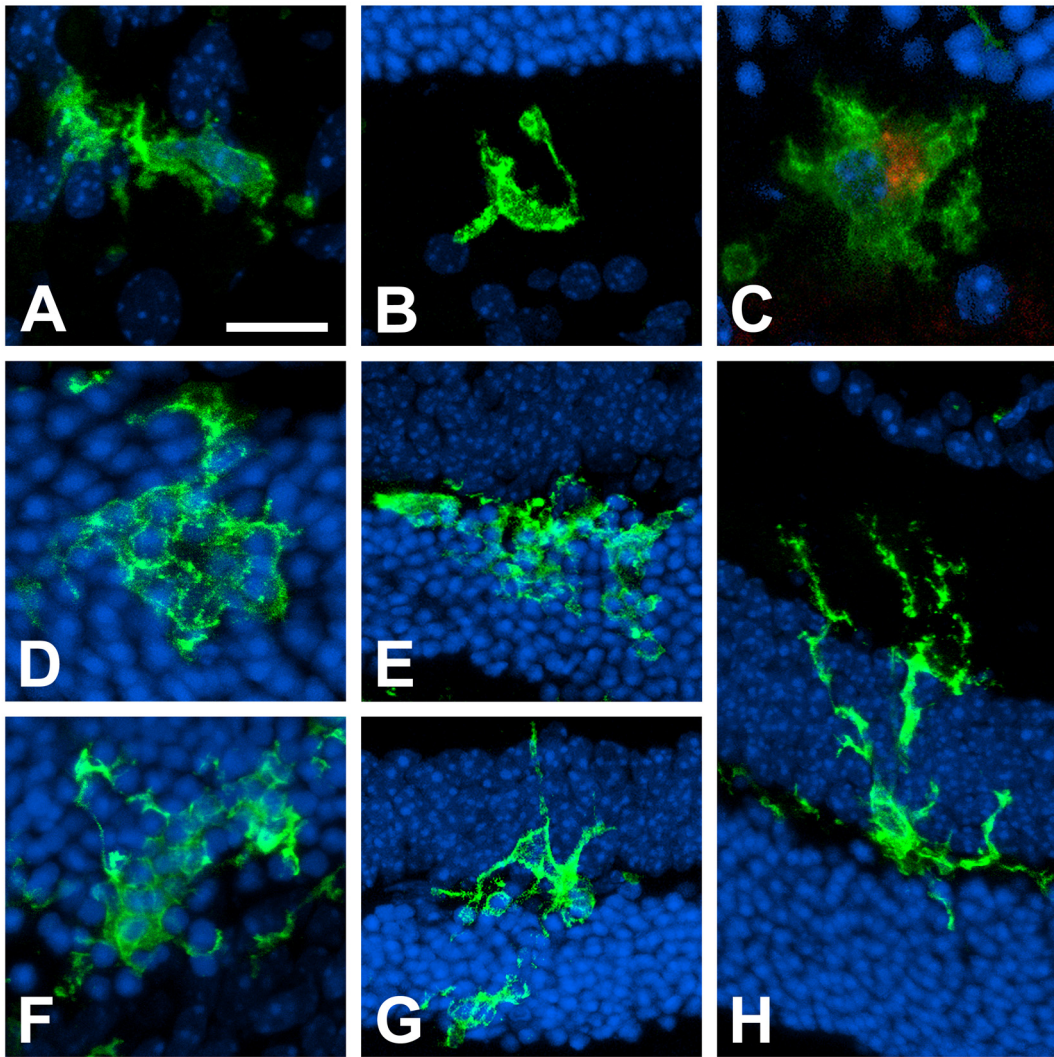
Barra de escala: 50  $\mu m$  en A, E y F; 42  $\mu m$  en B; 35  $\mu m$  en C-D e I; 34  $\mu m$  en G; 40  $\mu m$  en H.

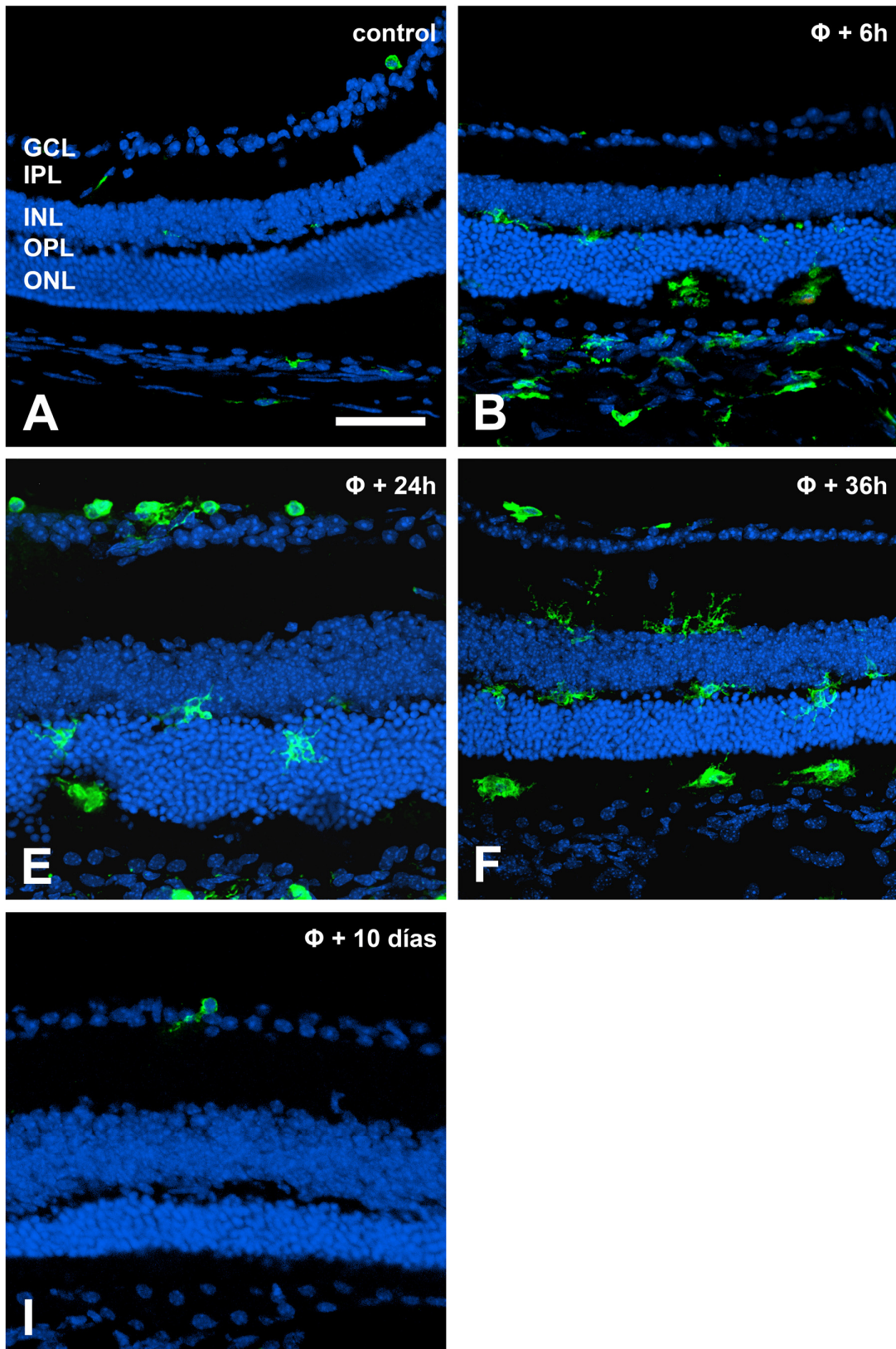


**Fig. 11.** Detalle de células F4/80 positivas (verde) en diferentes regiones de la retina. Imágenes de microscopía confocal. Los núcleos se han marcado con Hoechst (azul).

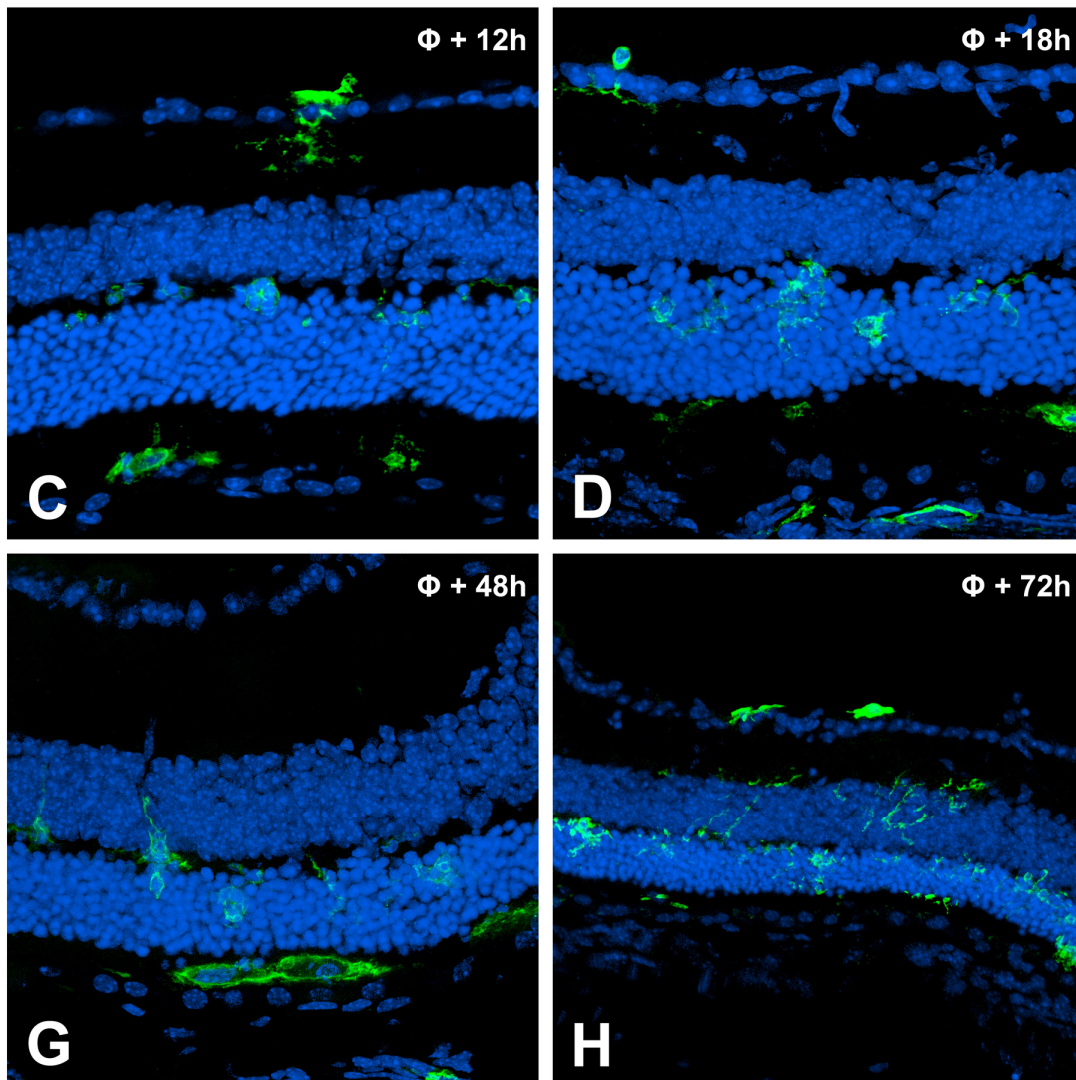
**A:** macrófago F4/80 positivo en la coroides (retina de  $\Phi+6h$ ); **B-C:** macrófagos fuertemente marcados en el espacio subretiniano; en **C**, la célula contiene uno o varios fagosomas con restos de pigmentos (autofluorescencia roja) (retinas de  $\Phi+12h$  y  $\Phi+18h$ , respectivamente); **D-F:** células microgliales F4/80 positivas de la ONL con morfología *en panal*, englobando los núcleos de varios fotorreceptores (retinas de  $\Phi+12h$ ,  $\Phi+24h$  y  $\Phi+48h$ , respectivamente). **G-H:** células ramificadas en la OPL, cuyas prolongaciones se extienden por ambas capas nucleares (INL y ONL) (retinas de  $\Phi+24h$  y  $\Phi+36h$ ).

Barra de escala: 15  $\mu m$  en A y F; 18  $\mu m$  en B; 12  $\mu m$  en C; 10  $\mu m$  en D; 20  $\mu m$  en E y G; 35  $\mu m$  en H.









**Fig. 12.** Evolución temporal de la expresión de SRA (verde) en la región central de las retinas murinas control (**A**) y sometidas a los diferentes tratamientos de fotodegeneración empleados en este estudio (**B-I**). Imágenes de microscopía confocal. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul).

**A:** En las retinas control, anti-SRA marca los macrófagos del espacio subretiniano y del vítreo, que se utilizan como control positivo; en el interior de la retina se observa el marcaje de algunas células endoteliales. Tras la fotodegeneración (**B-I**), se observan células microgliales SRA positivas en la OPL y la ONL, donde adquieren un gran desarrollo y engloban núcleos de varios fotorreceptores. En el espacio subretiniano de las retinas tratadas aparecen grandes macrófagos SRA positivos, ocupando frecuentemente las ondulaciones del borde escleral de la ONL y con restos de pigmentos fagocitados (autofluorescencia roja en B). A partir de  $\Phi+36h$  (**F-H**), aparecen células ramificadas en la retina interna y es muy frecuente la presencia de células marcadas, aplanadas sobre la GCL, que emiten procesos dentro del parénquima retiniano (C-D, I). **I:** En  $\Phi+10$  días, el marcaje con anti-SRA ha vuelto prácticamente a niveles control.

GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa;  $\Phi$ , fotodegeneración.

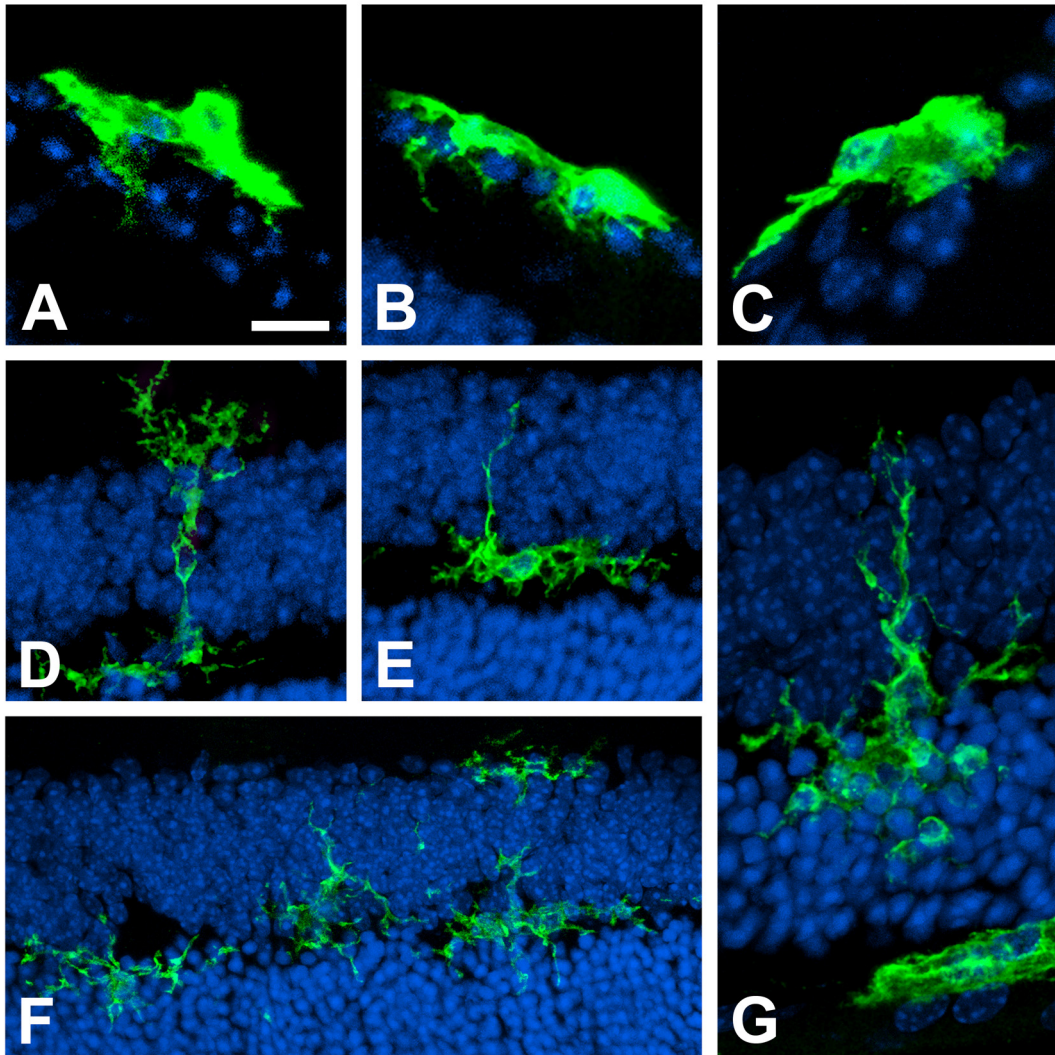
Barra de escala: 50  $\mu m$  en A, B y F; 31  $\mu m$  en C y D; 39  $\mu m$  en E e I; 33  $\mu m$  en G; 53  $\mu m$  en H.

**Fig. 13.** Detalle de células SRA positivas (verde) en diferentes regiones de la retina. Imágenes de microscopía confocal. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul).

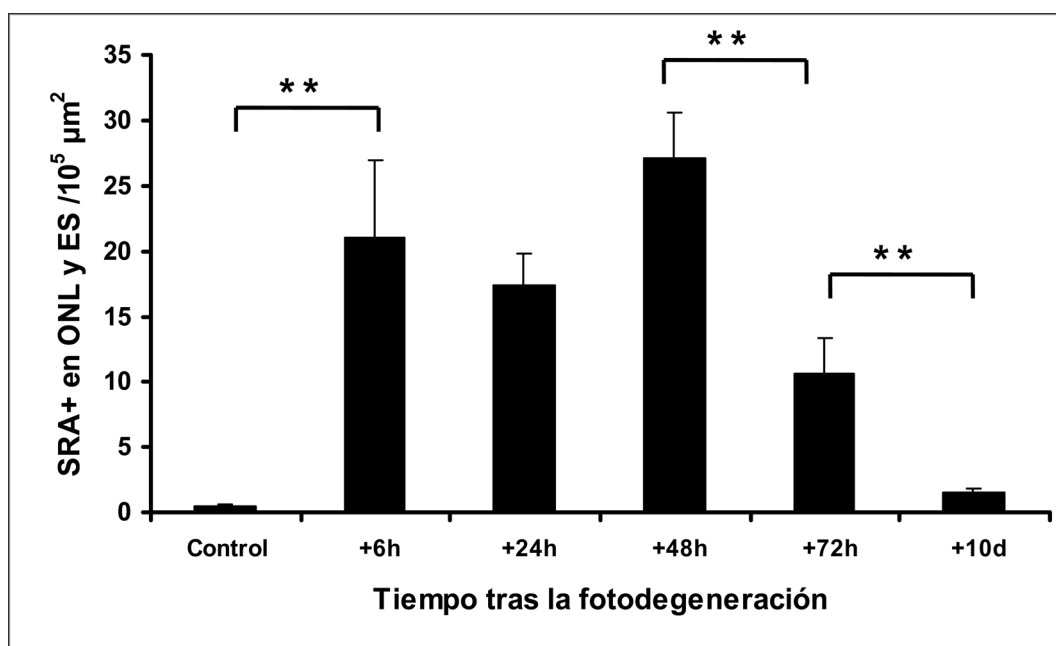
**A-C:** células marcadas en el borde vitreal de la retina, con prolongaciones que se introducen en la GCL; el grado de expresión de SRA disminuye en las prolongaciones que ya se han introducido en el parénquima, con respecto al marcaje del resto de la célula (retinas de  $\Phi+18h$ ,  $\Phi+24h$  y  $\Phi+36h$ , respectivamente). **D-G:** células SRA positivas en la OPL, cuyas prolongaciones se extienden por ambas capas nucleares (INL y ONL), llegando incluso a contactar con otras células presentes en la IPL (**D** y **F**). En la ONL, las células SRA positivas engloban los núcleos de varios fotorreceptores de forma simultánea (**G**), adquiriendo un gran desarrollo (retinas de  $\Phi+36h$  y  $\Phi+48h$ ).

GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa;  $\Phi$ , fotodegeneración.

Barra de escala: 15  $\mu m$  en A; 14  $\mu m$  en B; 11  $\mu m$  en C y G; 16  $\mu m$  en D-E; 20  $\mu m$  en F.

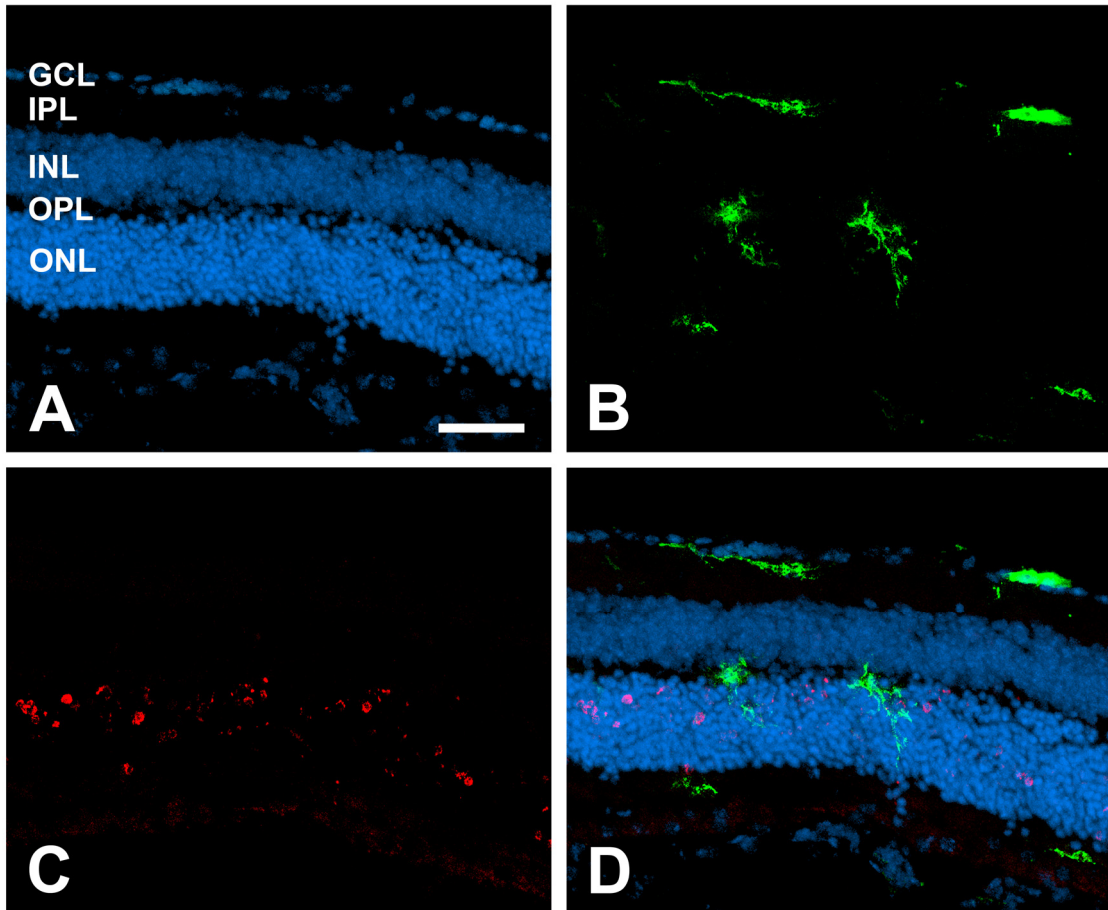


**Fig. 14.-** Estudio cuantitativo de la invasión de la retina externa por parte de macrófagos y células microgliales SRA positivos. En retinas control, la retina externa permanece libre de células fagocíticas, mientras que, a partir del primer estadio tras la fotodegeneración (+6h), el número de estas células se incrementó de forma significativa, para descender nuevamente a partir del tercer día de supervivencia (+72h). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). \*\*  $p < 0.01$ . ONL, capa nuclear externa; ES, espacio subretiniano.

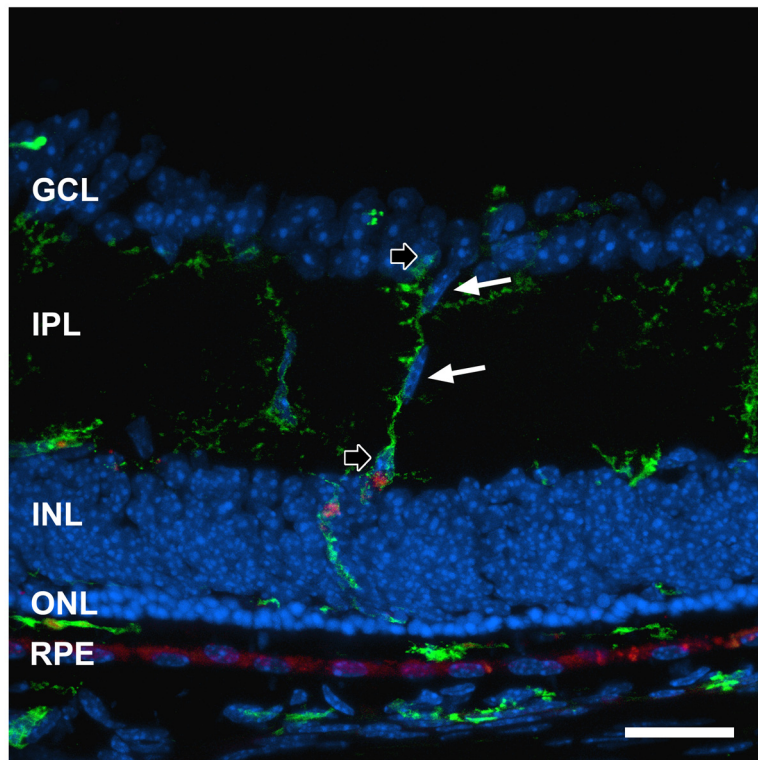




**Fig. 15.** Doble marcaje anti-SRA / TUNEL de una retina expuesta a la luz y obtenida 24 horas tras la exposición ( $\Phi$ +24h). Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul). **A:** marcaje de las capas retinianas con Hoechst (azul). **B:** células SRA positivas (verde). **C:** marcaje de núcleos TUNEL positivos (rojo), localizados fundamentalmente en la ONL. **D:** merged. Los fragmentos TUNEL positivos no coinciden espacialmente con la presencia de células microgliales SRA positivas en la retina.  
GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa;  $\Phi$ , fotodegeneración.  
Barra de escala: 35  $\mu$ m.



**Fig. 16.** Vasos como guía de migración de las células microgliales, inmunomarcadas con el anticuerpo anti-F4/80 (verde) en la retina interna. Imagen de microscopía confocal. Los núcleos celulares se han marcado con Hoechst (azul). Retina del tratamiento de  $\Phi$ +10 días. Las células microgliales (flechas gruesas) de la IPL aparentemente utilizan los vasos sanguíneos (las flechas finas blancas marcan los núcleos de las células endoteliales del vaso) para su migración hacia la retina externa. Los restos de pigmentos y membranas (lipofuscina) procedentes de los segmentos externos de los fotorreceptores que han degenerado (nótese el grosor mínimo de la ONL en este estadio), muestran autofluorescencia en el canal rojo. Tanto las células macrófago/microgliales F4/80 positivas (verde) como las células del RPE portan fagosomas de lipofuscina (rojo). GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa;  $\Phi$ , fotodegeneración. Barra de escala: 25  $\mu$ m.





## DISCUSIÓN

En esta Discusión se hace referencia, en primer lugar, a los procesos degenerativos que ocurren en la retina de ratones albinos (BALB/c) como consecuencia del tratamiento con luz intensa. A continuación, se discute la reacción macrófago/microglial que se produce como consecuencia de la lesión; en esta última parte, se considerarán las modificaciones observadas en las células microgliales, el posible origen de estas células, y el papel que pueden desempeñar en la degeneración retiniana.

### **Fotodegeneración inducida por luz visible**

Noell y colaboradores mostraron, durante los años 60, que la luz visible de intensidad normal podía dañar los fotorreceptores de la retina. Las longitudes de onda de la luz que resultaban dañinas para la retina coincidían, además, con el espectro de absorción de la rodopsina, pigmento visual de los bastones que es activado por la luz (Noell *et al.*, 1966), lo que sugería que la activación de la rodopsina podría desencadenar el daño retiniano producido por la luz. Un estudio muy posterior (Hao *et al.*, 2002) muestra que el daño retiniano inducido por la luz puede seguir, al menos, dos rutas diferentes según el tipo de exposición. Por una parte, la degeneración que ocurre por exposición a luz intensa precisa de la activación del pigmento visual rodopsina. Por el contrario, el mecanismo que interviene en la degeneración que ocurre tras una exposición prolongada a luz de intensidad moderada requiere la activación de la transducina y la cascada de fototransducción (Hao *et al.*, 2002; Jacobson y McInnes, 2002). Nosotros hemos utilizado un protocolo de exposición de la retina a luz intensa que, por tanto, depende de la activación de la rodopsina y es independiente de la activación de la transducina y la cascada de fototransducción.

Los procesos de degeneración retinianos que se producen en la fotodegeneración y en retinopatías debidas a diferentes anomalías genéticas tienen rasgos semejantes (Noell *et al.*, 1966; LaVail *et al.*, 1998; Remé *et al.*, 1998; Organisciak *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005b). Por ello, se considera que el protocolo de fotodegeneración por exposición a luz intensa es un modelo adecuado para el estudio de algunos procesos degenerativos en la retina humana, como los que ocurren en las diferentes formas de retinosis pigmentarias y en la degeneración macular asociada a la edad.

### **Características morfológicas de las retinas expuestas a la luz**

Las retinas de los animales expuestos a luz intensa mostraban alteraciones que no se observaban en las retinas de los animales control. Las alteraciones en la retina dependían de la raza de los animales que habían sufrido fotodegeneración, ya que mientras que en los ratones BALB/c (albinos) había degeneración evidente de la retina, los ratones C57Bl (pigmentados) no mostraban signos evidentes de degeneración después de ser sometidos al mismo tratamiento. Ya había sido descrito anteriormente que la luz de alta intensidad causa un daño irreversible en las retinas de animales albinos (Noell *et al.*, 1966). La exposición a altas intensidades de luz puede ocasionar que la mayoría de las células fotorreceptoras de la retina hayan desaparecido a partir de una semana (Noell *et al.*, 1966; La Vail *et al.*, 1987; Remé *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 1999; Remé *et al.*, 2000; Wenzel *et al.*, 2005; Landiev *et al.*, 2008a; Marc *et al.*, 2008).

La exposición a luz intensa no produce inicialmente una degeneración homogénea en toda la retina. Al contrario, y sobre todo con tiempos cortos de supervivencia, se observan regiones discretas más dañadas en la retina, a modo de “parches” de degeneración, que aumentan progresivamente de tamaño hasta que, en tiempos de supervivencia avanzados, ocupan la práctica totalidad de la retina. La existencia de regiones retinianas con diferente grado de degeneración ha sido descrita anteriormente, tanto en la degeneración

producida por luz como en la degeneración retiniana intrínseca (por ejemplo, en los ratones *rd1*) que ocurre como consecuencia de diferentes anomalías genéticas (Remé *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 1999; Zeiss y Johnson, 2004a,b; Marc *et al.*, 2008).

El adelgazamiento de la ONL se ha utilizado como indicador morfológico del daño sufrido por la retina, ya que es consecuencia de la disminución en el número de los fotorreceptores presentes en la misma y, por tanto, refleja la degeneración de este tipo celular. A lo largo de los diferentes tiempos de supervivencia se observa un adelgazamiento progresivo de la ONL, que queda reducida únicamente a 2-4 hileras de núcleos en las regiones centrales de las retinas fijadas en los últimos tiempos de supervivencia estudiados, tal y como ha sido descrito en numerosos trabajos previos sobre fotodegeneración (Noell *et al.*, 1966; Stone *et al.*, 1999; Wenzel *et al.*, 2005; Landiev *et al.*, 2008a).

En las retinas de animales sometidos a fotodegeneración y sacrificados en los tiempos más cortos de supervivencia (entre 6 y 24 horas tras la exposición a la luz), el adelgazamiento de la ONL no era aún patente, pero sí se observaban alteraciones estructurales en esta capa. En concreto, se podía apreciar una cierta desorganización en el grado de empaquetamiento de los núcleos de los fotorreceptores, que en los animales control se encontraban dispuestos ordenadamente. Además, el borde escleral de la ONL no presentaba un contorno más o menos recto como en las retinas control, sino que aparecía *festoneado*, debido aparentemente a la disminución de núcleos en la región más central de cada festón; estas formaciones ya fueron observadas en los primeros estudios sobre fotodegeneración, llevados a cabo por Noell y colaboradores durante la década de 1960 (Noell *et al.*, 1966). Además de la aparición de festones y de la desorganización estructural de la ONL, en estos tiempos de supervivencia también se podía observar que tanto el espacio subretiniano como la ONL habían sido colonizados por células con características de macrófagos/microglía, como ya ha sido documentado anteriormente (Thanos, 1992; Roque *et al.*, 1996; Langmann *et al.*, 2007).

La frecuencia de fenómenos de muerte celular en las retinas sometidas a fotodegeneración es mucho mayor que en las retinas de animales control. En estas últimas, se observaron en secciones semifinas algunos núcleos muy



condensados de fotorreceptores que aparentemente se encontraban en degeneración, y que deben reflejar casos de muerte espontánea entre los fotorreceptores. En las retinas con fotodegeneración, sin embargo, estas estructuras eran frecuentes en toda la extensión de la retina y, especialmente, en la ONL. Las observaciones de retinas sometidas al protocolo de fotodegeneración realizadas con microscopía electrónica de transmisión (TEM) ponen de manifiesto la presencia núcleos de fotorreceptores en degeneración de diferente morfología, lo que sugiere que no todos los fotorreceptores degeneran mediante el mismo mecanismo y que coexisten procesos de apoptosis, de necrosis y tal vez de alguna otra forma de degeneración.

La cuantificación de nucleosomas libres mediante la técnica de ELISA ha sido empleada como indicador de la muerte celular en la retina y otras regiones (Frade y Barde, 1999; Samardzija *et al.*, 2006; White *et al.*, 2007). Esta técnica confirmó que la muerte celular se incrementa grandemente en las retinas con fotodegeneración, aunque no proporcionaba información acerca de la naturaleza de las células que degeneraban. No obstante, ya que los fotorreceptores constituyen, con diferencia, la población celular más numerosa de la retina, puede inferirse que numerosos fotorreceptores degeneran como consecuencia de la exposición a luz intensa. Esta deducción fue corroborada por las observaciones morfológicas (tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica) y las realizadas mediante la técnica de TUNEL.

En general, se considera que la técnica TUNEL marca solamente aquellas células que sufren apoptosis, aunque en algunos trabajos (Fujikawa *et al.*, 2000) se ha afirmado que también marca ciertas células necróticas. En cualquier caso, esta técnica nos ha permitido establecer que la mayoría de las células que degeneran en las retinas con fotodegeneración se localizan en la ONL. Sólo con tiempos de supervivencia prolongados (más de 48h) se aprecia un número notable de estructuras marcadas con TUNEL en capas más internas de la retina, reflejando tal vez el hecho de que la degeneración de fotorreceptores induce la degeneración secundaria de interneuronas que contactan con ellos (Marc *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos con las diferentes técnicas empleadas para poner de manifiesto los procesos de muerte celular (TEM, cuantificación de

nucleosomas libres y TUNEL) revelan que ya se observan fenómenos de degeneración en la ONL de retinas de animales que han sobrevivido sólo 6 horas tras la exposición a la luz intensa. Sin embargo, mientras que la técnica de TUNEL indica un incremento en la degeneración celular en estadios sucesivos, la cuantificación por ELISA de los nucleosomas libres muestra un incremento rápido de la degeneración (ya visible en el tratamiento de  $\Phi+6h$ ) que se mantiene en los mismos niveles hasta  $\Phi+48h$ . Estas discrepancias seguramente se deben a razones metodológicas, ya que ambas técnicas detectan muerte celular utilizando diferentes procesos (la formación de extremos libres en el ADN, en el caso del TUNEL, y la presencia de nucleosomas libres, en la técnica basada en la ELISA de nucleosomas). En cualquier caso, ambas metodologías muestran que los fenómenos de muerte celular están presentes poco tiempo después de la exposición a la luz.

Otros procedimientos han sido empleados para detectar daños celulares en la retina, como el aumento de los niveles de calcio intracelulares (Donovan *et al.*, 2001), la disminución de la actividad enzimática de la glutamina sintetasa (Grosche *et al.*, 1995; Hartig *et al.*, 1995; Acosta *et al.*, 2005; Bringmann *et al.*, 2006; Iandiev *et al.*, 2008a, b) o la detección de la entrada de agmatina en los fotorreceptores dañados, que se produce antes incluso de que los marcadores de apoptosis se hagan evidentes (Marc *et al.*, 2003). Los resultados derivados de estas técnicas no muestran diferencias sustanciales con los obtenidos durante este trabajo.

### **Activación de las células microgliales retinianas tras la fotodegeneración**

El principal objeto de este trabajo es el estudio de las células microgliales en retinas sometidas a nuestro protocolo de fotodegeneración. Mediante la utilización de diferentes marcadores se ha pretendido visualizar los distintos tipos microgliales de la retina y su respuesta a la fotodegeneración inducida por luz intensa. Trabajos previos han revelado la existencia de diferentes subpoblaciones de células microgliales y es bastante probable que

las diferentes subpoblaciones muestren distinta expresión de los mismos marcadores y moléculas de superficie (Streit y Graeber, 1993; Mander y Morris, 1995; Provis *et al.*, 1996; Mittelbronn *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005a; Xu *et al.*, 2007). Por tanto, con el empleo de varios marcadores se intenta poner de manifiesto la mayor cantidad posible de células microgliales, tanto en las retinas control como en las sometidas a fotodegeneración, para dar una visión lo más completa posible de la reacción microglial tras la exposición a la luz intensa.

De hecho, nuestras observaciones muestran que el patrón de marcaje obtenido con los diferentes marcadores microgliales empleados no es equivalente:

### **1. Localización celular del marcaje**

Mientras que los anticuerpos anti-CD45, anti-F4/80 y anti-SRA son marcadores de membrana plasmática, anti-CD68 es un marcador lisosómico (de membrana lisosomal). Esta diferencia se pone de manifiesto en los respectivos patrones de marcaje: anti-CD45, anti-F4/80 y anti-SRA delimitan claramente el contorno celular y las prolongaciones ramificadas de las células que marcan; por el contrario, el anticuerpo anti-CD68 revela un marcaje puntuado y no marca células completas hasta que éstas muestran un considerable grado de activación (Yamada *et al.*, 1998) (véase Fig. 9).

### **2. Intensidad y número de células marcadas**

El marcaje con anti-CD45, anti-F4/80 y anti-SRA es más intenso que el obtenido con anti-CD68. Esto se traduce en que, con los primeros, aparece en general un mayor número de células marcadas y que éstas se muestran bien definidas, incluyendo sus prolongaciones más delgadas.

### **3. Evolución temporal de la distribución de células marcadas**

Todos los marcadores microgliales utilizados mostraban un significativo grado de activación en el primer tiempo de supervivencia (tratamiento de  $\Phi+6h$ ). En general, las primeras células activadas eran visibles en el espacio subretiniano y ONL. La presencia de células marcadas en estas

regiones continúa siendo patente durante los siguientes tratamientos ( $\Phi+12h$ ,  $\Phi+18h$  y  $\Phi+24h$ ). A partir de  $\Phi+36h$  también aparecían células marcadas en la retina interna, donde eran especialmente abundantes a partir de  $\Phi+72h$ . La expresión de CD68 y de SRA disminuía bastante en las retinas de  $\Phi+10$  días, mientras que persistía la de CD45 y F4/80.

#### 4. Marcaje de células “entrando” a la retina desde el vítreo/cuerpo ciliar

Mientras que tales células no eran visualizadas con otros marcadores, los anticuerpos anti-CD45 y anti-SRA marcaban células que, aparentemente, estaban pasando desde el vítreo o desde el cuerpo ciliar al parénquima de la retina. En concreto, anti-CD45 permitía observar la presencia de numerosas células marcadas en la retina periférica y cuerpo ciliar, dando la impresión de que algunas células CD45 positivas pasaban del cuerpo ciliar a la retina (véase Fig. 6J). En retinas inmunomarcadas con anti-SRA, se encontraron numerosos macrófagos aplanados sobre la GCL que emitían prolongaciones hacia el interior de la retina (véase Fig. 13); la intensidad de la expresión del marcador disminuye en dichas prolongaciones con respecto a la de la parte de la célula que permanece en el vítreo.

Por consiguiente, las células microgliales de la retina muestran claros signos de activación después de la fotodegeneración. El estado de activación se traduce en modificaciones morfológicas (acortamiento y engrosamiento de las prolongaciones de las células microgliales) y funcionales (incremento de la producción y secreción de citoquinas, actividad fagocítica, etc.) (Banati *et al.*, 1993; Amat *et al.*, 1996; Raivich *et al.*, 1999; Streit *et al.*, 1999; Stence *et al.*, 2001; Rock *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2006; Hanisch y Kettenmann, 2007; Langmann, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007). En concreto, las células microgliales de la retina responden a la muerte de los fotorreceptores:

- i) migrando a la zona de lesión inicial, es decir la ONL y espacio subretiniano;

- ii) cambiando su morfología, que se hace más redondeada y con prolongaciones más cortas y gruesas; e
- iii) incrementando la expresión de diferentes proteínas reconocidas por los marcadores de activación que hemos utilizado; algunos de estos marcadores están relacionados de forma directa con el incremento de la capacidad fagocítica, como es el caso de la proteína lisosomal CD68.

Estas modificaciones son semejantes a las descritas durante el proceso de activación de la microglía en otros modelos de daño neuronal en diferentes regiones del SNC, (Stoll y Jander, 1999; Garden y Möller, 2006; Hailer, 2008). En concreto, las células microgliales aparecen activadas en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, en las que parecen intervenir activamente (Streit, 2005; Kim y Joh, 2006). En la retina también se ha descrito la activación de las células microgliales en diversas situaciones patológicas (Yuan y Neufeld, 2001; Gupta *et al.*, 2003; Langmann, 2007; Kaneko *et al.*, 2008).

Como ya se ha comentado, las células microgliales se acumulan en las regiones afectadas primariamente, es decir, en la ONL, donde se localizan los núcleos de los fotorreceptores que degeneran, y en el espacio subretiniano, donde se produce la degeneración de muchos segmentos externos. Esta situación contrasta con lo que ocurre en la retina adulta normal, en la que la microglía se localiza en las capas GCL, IPL, INL y OPL (ver capítulo I de esta tesis), pero no en las capas más externas de la misma.

Las células microgliales comenzaban a invadir la ONL sólo algunas horas después de la exposición a la luz (en  $\Phi+6h$ ). En estas células se observaban cambios morfológicos y de expresión de moléculas que sugerían que se encontraban activadas: sus somas estaban ligeramente hipertrofiados y presentaban prolongaciones engrosadas y acortadas. También se observaban cambios en la expresión de inmunomoléculas. La expresión de todos los marcadores microgliales empleados se incrementaba en las retinas fotodegeneradas respecto a las control, pero el cambio de expresión era más llamativo en el caso de SRA ya que, mientras que la expresión de SRA era casi

imperceptible en las retinas control, las retinas fotodegeneradas mostraban niveles de expresión considerables.

Los cambios morfológicos y de distribución de la microglía retiniana se hicieron más evidentes con tiempos más largos de supervivencia. Las células microgliales que habían invadido la ONL en respuesta al daño inducido en los fotorreceptores mostraban prolongaciones desarrolladas y de gran extensión que rodeaban los núcleos de varios fotorreceptores, dando lugar a estructuras semejantes a un panal (los *honeycombs* descritos anteriormente, Mato *et al.*, 1996; Plüddemann *et al.*, 2007). Por su parte, las células infiltradas en el espacio subretiniano de las retinas con fotodegeneración, mostraban un aspecto compacto; muchas veces eran de gran tamaño, presentaban escasas prolongaciones celulares y frecuentemente contenían restos de pigmentos visuales, probablemente de rodopsina, en su interior; estos restos de pigmentos se han denominado, con carácter general, lipofuscina (Gaugler, 1997; Terman y Brunk, 1999; Gray y Woulfe, 2005).

Nuestras observaciones muestran activación de las células microgliales, pero no se ha determinado si todas las células microgliales de la retina poseen el mismo grado de activación, aunque la observación de diferencias en la expresión de los distintos marcadores utilizados permite suponer que no es así. Las células microgliales observadas en las retinas fotodegeneradas pueden asignarse a alguna de las diferentes fases de activación descritas por Raivich y colaboradores (Raivich *et al.*, 1999; véase la figura 5 de la *Introducción General* de esta tesis). Así, las células que presentan un incremento de su inmunomarcaje, aunque con una morfología más o menos ramificada, y localizadas fuera del sitio primario de la lesión, pueden encontrarse en la fase 1 (de alerta) de activación descrita por estos autores. La acumulación de células microgliales en la ONL debe estar relacionada con la fase 2 de activación (*homing*). Por último, las células que realizan una fagocitosis activa deben encontrarse ya en la fase 3a (fagocitosis). Las diferencias morfológicas observadas entre las células microgliales de la retina, por tanto, sugieren que no todas las células microgliales de la retina se encuentran en la misma fase de activación al mismo tiempo.

Ng y Streilein (2001) han sugerido que la distribución de las células macrófago/microgliales en la retina externa de animales de cepas albinas podría verse afectada por la simple exposición a la luz ambiental. Según estos autores, las retinas de animales albinos mantenidos en oscuridad presentaban un menor número de células microgliales que las de los animales mantenidos en condiciones normales de luminosidad y los sometidos a iluminación constante de baja intensidad. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los fagocitos profesionales invaden la retina externa en respuesta a la toxicidad ejercida por la luz. En consonancia con esta idea, en nuestro trabajo sólo se observaba la presencia de algunos macrófagos de pequeño tamaño en el espacio subretiniano, justo por debajo del RPE, de las retinas control, mientras que macrófagos de mayor tamaño y más numerosos estaban presentes en el espacio subretiniano pocas horas después de someter las retinas a luz intensa.

Evidentemente, los procesos de fotodegeneración pueden no ser los únicos factores implicados en la migración de la microglía hacia las capas más externas de la retina, sino que cualquier proceso que induzca un daño a las células situadas en esa región debe de producirla. Por ejemplo, con la edad hay una pérdida de fotorreceptores que se refleja en la reducción del grosor de la ONL (Lai *et al.*, 1978; Kunert *et al.*, 1999) y, concomitantemente, un incremento de la microglia presente en esa capa (Kunert *et al.*, 1999). Por tanto la degeneración de fotorreceptores puede estimular de forma directa, o indirecta a través de otras células como las del RPE, la quimiotaxis de la microglía desde las capas más internas de la retina hasta la ONL y el espacio subretiniano (Thanos, 1992; Ng y Streilein, 2001). Puesto que ha sido descrito que las células microgliales sufren modificaciones estructurales y funcionales en el SNC envejecido (Conde y Streit, 2006; Streit, 2006), se ha procurado no utilizar en nuestros experimentos ratones de edad avanzada.

## **Origen de las células macrófago/microgliales que invaden la retina externa tras la exposición a la luz intensa**

Mediante quimeras de médula ósea se ha establecido que la mayor parte de las células microgliales que existen en la retina normal no provienen de células hematopoyéticas circulantes, sino de células residentes en la retina (Kaneko *et al.*, 2008; Sasahara *et al.*, 2008), aunque un estudio señala que células procedentes de la médula ósea terminan reemplazando a la población microglial de la retina en un plazo de 6 meses (Xu *et al.*, 2007). Como ya se ha descrito, tanto la cantidad de células microgliales presentes en la retina como su patrón de distribución, se modifican en las retinas lesionadas.

Las variaciones observadas en el número de microglia activada tras la fotodegeneración no han recibido aún una explicación definitiva. Por una parte, pueden deberse simplemente al incremento de células macrófago/microgliales que se hacen visibles con un determinado marcador: por ejemplo, numerosas células en las retinas con fotodegeneración expresan SRA, mientras que en la retina normal, a pesar de haber células microgliales reconocidas por otros marcadores, apenas hay expresión de SRA; por tanto, el incremento en el número de células marcadas con anti-SRA que se observa en retinas con fotodegeneración puede tratarse de un aumento en la cantidad de células que expresan SRA y no de un incremento real del número de células. Sin embargo, también debe producirse una incorporación de nuevas células microgliales a la retina que muestren esta expresión. Seguramente, el incremento observado en la expresión de SRA se deba a ambos fenómenos.

Las nuevas células macrófago/microgliales que aparecen en la ONL y en el espacio subretiniano tras la fotodegeneración pueden tener varias procedencias:

- 1 Provenir de células que migran desde otras regiones del SNC, ya sea desde capas vitreales de la misma retina o desde fuera de la retina.
- 2 Ser fruto de proliferación, y posterior migración, de células ya presentes en el parénquima retiniano;
- 3 Originarse por la entrada de nuevas células provenientes de fuera del SNC que se diferenciarían como células microgliales una vez en el parénquima nervioso; en este caso pueden suponerse cuatro vías de



entrada en la retina: (i) desde la sangre circulante, atravesando la pared de los vasos sanguíneos, (ii) por entrada de células que se encontraban en la coroides, (iii) por células que migran al interior de la retina desde el vítreo y (iv) por migración celular desde el cuerpo ciliar.

Estas tres posibilidades no son excluyentes y todas, o más de una, pueden darse al mismo tiempo, de manera que complementen su efecto. Por ejemplo, células microgliales procedentes de las capas vitreales de la retina pueden invadir la ONL (posibilidad 1) y el territorio que dejan “vacío” podría ser ocupado por células que provienen del vítreo (posibilidad 3). Vamos a considerar ahora, en más detalle, cada una de las posibilidades expuestas.

### **1. Migración desde otras regiones del SNC.**

Una parte de las células macrófago/microgliales infiltradas en la retina externa (ONL y espacio subretiniano) tras la fotodegeneración proceden de células microgliales de las capas más internas de la retina, que han migrado hacia la retina externa como respuesta a la muerte desencadenada entre los fotorreceptores. Para demostrarlo, Thanos (1992) utilizó un trazador fluorescente para marcar las células ganglionares de retinas de ratas RCS (que presentan degeneración espontánea de fotorreceptores); se seccionó el nervio óptico de estos animales a fin de inducir la degeneración de las células marcadas. En las capas más internas de la retina aparecían células microgliales fluorescentes debido a la fagocitosis de restos de células ganglionares marcadas que habían degenerado tras la axotomía del nervio óptico; posteriormente también aparecía microglía marcada en la ONL, a donde había migrado, aparentemente, en respuesta a la degeneración de fotorreceptores.

Utilizando una estrategia similar, Ng y Streilein (2001) encontraron también células microgliales marcadas en la ONL y el espacio subretiniano de retinas de ratones sometidos a fotodegeneración con luz intensa. Estos experimentos apoyarían la posibilidad de que parte de las células macrófago/microgliales observadas en la retina externa tras la degeneración de

fotoreceptores provengan de las células microgliales presentes previamente en las capas más internas de la retina

Aunque otros trabajos no incluyan experimentos tan concluyentes como los descritos, diversas observaciones sugieren que las células fagocíticas que se observan durante la degeneración retiniana provienen de la microglia residente en la retina (Roque *et al.*, 1996; García-Valenzuela y Sharma, 1999; Zeng *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007b).

Nuestras observaciones también sugieren que las células microgliales activadas en la ONL son resultado de la migración celular a partir de capas más internas de la retina. Por ejemplo, ya en los tiempos más cortos de supervivencia tras el tratamiento con luz intensa, se observaban prolongaciones SRA positivas en la ONL pertenecientes a células de la OPL. La rapidez con que aparecen células microgliales en la ONL parece descartar que esas células hayan migrado a partir de regiones neurales más alejadas, como el nervio óptico.

En las retinas sometidas a fotodegeneración y con tiempos más largos de supervivencia, fundamentalmente  $\Phi+72h$  y  $\Phi+10$  días, se observaba que las células microgliales activadas, identificables por ser reconocidas por los marcadores de activación anti-F4/80 y anti-CD45, se disponían con frecuencia junto a las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Aparentemente, estas células migraban hacia regiones más externas de la retina utilizando la pared de los vasos como sustrato para su migración, como ha sido propuesto con anterioridad en otros sistemas (Navascués *et al.*, 1996; Monier *et al.*, 2007).

## **2. Proliferación de células microgliales preexistentes**

La proliferación de células residentes en la retina es otro origen posible de las células microgliales que aparecen en las retinas que han sufrido fotodegeneración.

Las células microgliales que migran durante el desarrollo en retinas normales tienen capacidad proliferativa (Marín-Teva *et al.*, 1999a) lo mismo que las células microgliales en otras regiones del SNC en desarrollo (Dalmau *et al.*, 2003). En la retina adulta apenas hay proliferación de estas células (Xu *et al.*, 2007). Por contra, hay abundante proliferación de células en algunas

situaciones patológicas, tanto en la retina en desarrollo (Zeiss y Johnson, 2004a) como en el adulto (Jeon *et al.*, 2004; Langmann, 2007).

Diversos estudios, sin embargo, concluyen que la proliferación local de células microgliales no parece ser un factor importante para el incremento observado en el número de células en las retinas dañadas por diferentes situaciones patológicas. Así, Kaneko *et al.* (2008) describe que a pesar de que numerosos monocitos circulantes y células adheridas a la pared de los vasos aparecían marcados con BrdU, es decir estaban proliferando, escasas células microgliales del parénquima retiniano mostraban ese marcaje. Por otra parte, la microglia retiniana muestra niveles bajos de proliferación en la retinopatía inducida por hipoxia (Davies *et al.*, 2006). El proceso patológico crónico de la retina que ocurre en un modelo murino de glaucoma desencadena una gliosis no proliferativa (Inman y Horner, 2007); las únicas células que muestran una proliferación apreciable (medida por la incorporación de BrdU) en este modelo son las células microgliales, aunque su tasa de división es de alrededor del 20% después de 10 meses. Por tanto, la proliferación de las células microgliales no parece ser un fenómeno universal en la activación de la microglia retiniana.

Trabajos realizados en otras regiones del SNC han demostrado que la proliferación de las células microgliales no es imprescindible para que estas células tengan un efecto neurotóxico (Rogove *et al.*, 2002; Gowing *et al.*, 2008). Por lo tanto, las células microgliales de la retina podrían estar implicadas en los procesos degenerativos que ocurren tras la fotodegeneración sin necesidad de mostrar actividad proliferativa. En cualquier caso, este punto será verificado en trabajos posteriores.

### **3. Entrada de nuevas células provenientes de fuera del SNC**

Algunos precursores de células microgliales se introducen en la retina desde compartimentos no neurales. Se ha propuesto que muchas de estas células son de origen hematopoyético y provienen de la médula ósea. Este planteamiento se ha investigado utilizando ratones quiméricos que han recibido un trasplante de médula ósea. Con estos animales se ha observado que solamente un número reducido de precursores microgliales entran en la retina

de ratones normales (Albini *et al.*, 2005; Caicedo *et al.*, 2005a; Kaneko *et al.*, 2008; Sasahara *et al.*, 2008), aunque hay un estudio (Xu *et al.*, 2007) que afirma que todas células macrófago/microgliales de la retina son reemplazadas por precursores procedentes de la médula transplantada alrededor de 6 meses después del establecimiento del quimerismo, y que, por tanto, no se trata de una población estable. En las retinas patológicas, sin embargo, hay un reclutamiento masivo de células microgliales derivadas de la médula ósea (Sasahara *et al.*, 2008; Kaneko *et al.*, 2008; Ritter *et al.*, 2006; Caicedo *et al.*, 2005). Por tanto, es probable que las retinas sometidas a fotodegeneración, sobre todo en los tiempos más prolongados de supervivencia, contengan un número apreciable de células de origen exógeno.

Otras experiencias también apoyan que al menos una parte de las células microgliales de la retina provienen de células hematopoyéticas circulantes. Se ha descrito una disminución de la microglia retiniana en retinas con degeneración intrínseca de fotorreceptores tras un tratamiento con liposomas-clodronato, sustancia que destruye células de la línea monocítica fuera del SNC (Hughes *et al.*, 2004). Por otra parte, el trabajo de García-Valenzuela y Sharma (1999) muestra, mediante la inyección de peroxidasa o bolitas marcadas en la circulación, que hay reclutamiento de monocitos pero que éstos están en mucho menor número que la microglía y sólo intervienen en fenómenos de fagocitosis en la NFL tras la transección del nervio óptico.

El camino más directo para que estas células de origen hematopoyético entren en la retina sería la extravasación desde los vasos sanguíneos de la retina. En nuestro material no hemos encontrado imágenes que apoyen esta posibilidad, aunque con cierta frecuencia hemos observado células marcadas alargadas adosadas a la pared de vasos retinianos, que pueden ser interpretadas como células perivasculares o como células microgliales que utilizan la pared de los vasos sanguíneos como sustrato de su migración.

Es posible que la extravasación de precursores microgliales ocurra fuera de la retina, por ejemplo en la coroides, y que estas células migren hasta introducirse en la retina de forma independiente al sistema vascular.

Así, el incremento de células macrófago/microgliales observado en el espacio subretiniano y la ONL de las retinas sometidas a los tratamientos de

foto degeneración podría provenir de la coroides, envuelta conjuntiva del globo ocular ricamente vascularizada. Algunos trabajos, como el de Ng y Streilein (2001), afirman que es poco probable que las células observadas en el espacio subretiniano de las retinas expuestas a la luz intensa provengan de macrófagos o monocitos de la coroides; en primer lugar, porque los macrófagos del espacio subretiniano son fenotípicamente más parecidos a las células microgliales de la retina al no expresar MHC-II, al contrario que muchos macrófagos o monocitos de la coroides (Kezic y McMenamin, 2008); en segundo lugar, el marcaje con un trazador fluorescente de los axones de células ganglionares que sufrían posteriormente degeneración, provocaba la aparición de macrófagos con marcaje fluorescente en el espacio subretiniano (Ng y Streilein, 2001), lo que apoya que estas células procedan de la retina interna. En otra situación patológica de la retina, la neo-vascularización coroidea experimental (CNV), se ha apreciado un notable aumento de la densidad de células macrófago/microgliales F4/80 positivas (Caicedo *et al.*, 2005a) muchas de las cuales son de origen sanguíneo. Sin embargo, la mayor parte de las células F4/80 positivas infiltradas invadían la INL, mientras que pocas aparecían en la ONL; esto supone que la localización final de las células infiltradas está gobernada por factores específicos, como la degeneración de ciertas conexiones sinápticas (Caicedo *et al.*, 2005b), que las atraen a unas capas concretas y no a otras.

En el cuerpo vítreo del ratón existen numerosos vasos sanguíneos durante el desarrollo y, aunque la mayoría desaparece durante las primeras semanas de desarrollo postnatal, otros permanecen hasta el estado adulto, lo que plantea la posibilidad de que precursores microgliales alcancen el ojo dentro del torrente sanguíneo y lo abandonen en el vítreo, para introducirse en el parénquima retiniano atravesando la membrana limitante interna de la retina. Esta ruta de entrada en la retina parece ser utilizada por las células microgliales hasta la primera semana de desarrollo postnatal, pero desaparece posteriormente y en el adulto normal no aparecen células microgliales situadas en el borde vitreal de la retina (Capítulo I; Santos *et al.*, 2008). Sin embargo, en retinas con foto degeneración nuevas células macrófago/microgliales parecen incorporarse al parénquima retiniano desde el vítreo, ya que con diversos

marcadores, fundamentalmente anti-CD45 y anti-SRA, se observaron células microgliales marcadas situadas en el borde vitreal.

Finalmente, también es posible que nuevas células se incorporen al parénquima retiniano migrando desde el cuerpo ciliar. Esta entrada ha sido propuesta para explicar la presencia de microglia en la retina periférica durante el desarrollo de diferentes mamíferos (Diaz-Araya *et al.*, 1995; McMenamin, 1999) y descrita en la retina embrionaria de aves (Marin-Teva *et al.*, 1999b). Nuestras observaciones corroboran esta posibilidad, al mostrar células marcadas próximas al borde de la retina/cuerpo ciliar o aparentemente cruzando dicho borde.

### **Papel de las células microgliales durante tras la fotodegeneración**

En la *Introducción* de este capítulo se trató ampliamente la función (o funciones) que la microglia retiniana puede desempeñar durante el proceso degenerativo, tanto eliminando los restos producidos durante la degeneración retiniana como induciendo activamente fenómenos de degeneración celular. Para no reiterar la misma argumentación, aquí se hará referencia exclusivamente a los datos aportados por nuestra experimentación.

La aparición de células microgliales en las regiones afectadas era concomitante con la presencia de degeneración celular. Sin embargo, no se podía establecer una relación directa entre la presencia de fragmentos marcados con TUNEL y la de las células microgliales, como mostraban imágenes en que se había realizado doble marcaje: aunque se podían observar algunas células microgliales en las regiones que presentaban fragmentos marcados con TUNEL, no todos los fragmentos TUNEL positivos estaban en contacto con células microgliales (véase Fig.15).

Algunas células microgliales presentaban signos claros de realizar fagocitosis de restos celulares de la degeneración. Así, varias imágenes de TEM mostraban células, identificadas como macrófagos/microglía, con inclusiones fagocíticas en su interior (véase Fig 3F). Por otra parte, células marcadas presentes en el espacio subretiniano y la ONL mostraban en su

interior acúmulos con fluorescencia roja que presumiblemente correspondían a fagosomas de lipofuscina, procedentes de los pigmentos visuales de los fotorreceptores que degeneran; esta imagen ha sido interpretada de forma similar por otros autores (Kezic y McMenamin, 2008).

Otros restos, sin embargo, no se encontraban en relación directa con células microgliales. Esta observación puede interpretarse de dos formas: (i) que los procesos degenerativos comienzan independientemente de las células microgliales; y (ii) que las células microgliales no precisan un contacto directo célula-célula para inducir la degeneración, sino que pueden desencadenar procesos de muerte celular a través de factores difusibles que, como TNF- $\alpha$  u óxido nítrico, son liberados por la microglia retiniana (Zeng *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007b, c; Zhang *et al.*, 2007).

Por tanto, nuestras observaciones corroboran el papel fagocítico de la microglía tras la fotodegeneración pero no demuestran que estas células la provoquen directamente. Cabe la posibilidad, no obstante, de que aunque las células microgliales no tengan una participación activa en el desencadenamiento de los procesos de degeneración, sí actúen prolongando dichos procesos en el tiempo.

## **BIBLIOGRAFÍA**





- Acarin L, Vela JM, González B, Castellano B (1994), Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 42:1033-1041.
- Acosta ML, Fletcher EL, Azizoglu S, Foster LE, Farber DB, Kalloniatis M (2005), Early markers of retinal degeneration in rd/rd mice. *Molecular Vision*, 11:717-728.
- Ajami B, Bennet JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV (2007), Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, 10(12):1538-1543.
- Alarcón R, Fuenzalida C, Santibáñez M, von Bernhardi R (2005), Expression of Scavenger receptors in Glial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (34):30406-30415.
- Albini TA, Wang RC, Reiser B, Zamir E, Wu GS, Rao NA (2005), Microglial stability and repopulation in the retina. *British Journal of Ophthalmology*, 89(7):901-903.
- Aloisi F (2001), Immune function of microglia. *Glia*, 36:165-179.
- Amat JA, Ishiguro H, Nakamura K, Norton WT (1996), Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia*, 16(4):368-382.
- Ashwell KW (1989), Development of microglia in the albino rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology*, 287: 286-301.
- Ashwell KW, Hollander H, Streit W, Stone J (1989), The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Visual Neuroscience*, 2:437-448.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993), Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7(1):111-118.
- Banati RB (2003), Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptative change in the brain. *British Medical Bulletin*, 65:121-131.
- 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.

- Barron KD (1995), The microglial cell. A historical review. *Journal of the Neurological Sciences* 134(Suppl.):57-68.
- Bazan NG (2006), Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends in Neurosciences*, 29:263-271.
- Bell MD, Lopez-Gonzalez R, Lawson L, Hughes D, Fraser I, Gordon S, Perry VH (1994), Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *Journal of Neurocytology*, 23: 605-613.
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR y Raymond PA (2007), Late-Stage Neuronal Progenitors in the Retina Are Radial Müller Glia That Function as Retinal Stem Cells. *The Journal of Neuroscience*, 27(26):7028-7040.
- Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007), Microglial Control of Neuronal Death and Synaptic Properties. *Glia*, 55:233-238.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HWGM (2007), Neuronal On and Off signals control microglia. *TINS Trends in Neuroscience*, 30(11):596-602.
- Block ML y Hong J-S (2005), Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76:77-98.
- Block ML, Hong JS (2007), Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochemical Society Transactions*, 35(5):1127-1132.
- Block ML, Zecca L, Hong J-S (2007), Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8:57-69.
- Bode C, Wolfrum U (2003), Caspase-3 inhibitor reduces apoptotic photoreceptor cell death during inherited retinal degeneration in tubby mice. *Molecular Vision*, 9:144-150.
- Boehme SA, Lio FM, Maciejewski-Lenoir D, Bacon KB, Conlon PJ (2000), The Chemokine Fractalkine Inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *The Journal of Immunology*, 165:397-403.
- 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. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(4):1437-46.

- Boycott BB, Hopkins JM (1981), Microglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience*, 6:679-688.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. (2006), Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25:397-424.
- Buttery RG, Hinrichsen CFL, Weller WL y Haight JR (1991), How thick should a retina be? A comparative study of mammalian species with and without intraretinal vasculature. *Vision Research*, 31(2):169-187.
- Caicedo A, Espinosa-Heidmann DG, Piña Y, Hernandez EP, Cousins SW (2005a), Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Muller glial cells under experimental choroidal neovascularization. *Experimental Eye Research*, 81:38-47.
- Caicedo A, Espinosa-Heidmann DG, Hamasaki D, Piña Y, Cousins SW (2005b), Photoreceptor Synapses Degenerate Early in Experimental Choroidal Neovascularization. *The Journal of Comparative Neurology*, 483:263-277.
- Cardona A, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang DR, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM (2006), Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*, 9(7):917-924.
- Carson MJ, Bilousova TV, Puntambekar SS, Melchior B, Doose JM, Ethell IM (2007), A Rose by Any Other Name? The Potential Consequences of Microglial Heterogeneity During CNS Health and Disease. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4:571-579.
- Chader GJ. (2002), Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope. *Vision Research*, 42(4):393-399.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007), The origin and cell lineage of microglia - New concepts. *Brain Research Reviews*, 53:344-354.
- Chang GQ, Hao Y and Wong F (1993), Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron*, 11: 595-605.
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR (2002), Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*, 42:517-525.

- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Wang J, Howell D, Davisson MT, Roderick TH, Nusinowitz S, Heckenlively JR. (2005a), Mouse models of ocular diseases. *Visual Neuroscience*, 22:587-593.
- Chang CJ, Cherng CH, Liou WS, Liao CL. (2005b), Minocycline partially inhibits caspase-3 activation and photoreceptor degeneration after photic injury. *Ophthalmic Research*, 37:202-213.
- Chaudhary P, Ahmed F, Quebada P, Sharma SC. (1999), Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 67(1):36-45.
- Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S (2006), Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47:3595-3602.
- 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. *Nature Medicine*, 6:797-801.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocular Immunology and Inflammation*, 10:27-39.
- Chen L, Wu W, Dentchev T, Zeng Y, Wang J, Tsui I, Tobias JW, Bennett J, Baldwin D, Dunaief JL (2004), Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Experimental Eye Research*, 79:239-47.
- Conde JR, Streit WJ (2006), Microglia in the aging brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(3):199-203.
- Cuadros MA, García-Martín M, Martín C, Ríos A (1991), Haemopoietic phagocytes in the early differentiating avian retina. *Journal of Anatomy*, 177: 145-158.
- Cuadros MA, Martín 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. *Journal of Comparative Neurology*, 330:113-129.
- Cuadros MA, Navascués J (1998), The origin and differentiation of microglial cells during development. *Progress in Neurobiology*, 56:173-189.
- Cuadros MA, Martín D, Pérez-Mendoza D, Navascués J, Clarke PGH (2000), Response of macrophage/microglial cells to experimental neuronal degeneration

- in the avian isthmo-optic nucleus during development. *The Journal of Comparative Neurology*, 423:659-669.
- Cuadros MA, Navascués J (2001), Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Progress in Brain Research*, 132:51-59.
- 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 developing and mature chick Central Nervous System. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54:727-738.
- Cullheim S, Thams S (2007), The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Research Reviews*, 55:89-96.
- Da Silva RP, Gordon S (1999), Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. *Biochemical Journal*, 338:687-694.
- Dalmau I, Vela JM, González B, Finsen B, Castellano B (2003), Dynamics of microglia in the developing rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 458:144-157.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim J V, Zuo Y, Jung S, Littman D R, Dustin M L, Gan W-B (2005), ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nature Neuroscience*, 8(6):752-758.
- Davies MH, Eubanks JP, Powers MR (2006), Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Molecular Vision*, 12:467-477.
- Davoust N, Vuillat C, Androdias G, Nataf S (2008), From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends in Immunology*, 29(5):227-234.
- De Haas AH, Boddeke HWGM, Biber K (2008), Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia*, 56(8):888-894.
- Del Río Hortega, P (1920), La microglía y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas*, 18:37-82.
- Del Río Hortega, P (1932), Microglia, pp. 483-534. En W. Penfield (ed.), *Cytology and cellular pathology of the nervous system Vol. II*. PB Hoebaer, Nueva York.

- Delyfer MN, Leveillard T, Mohand-Said S, Hicks D, Picaud S, Sahel JA (2004), Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Biology of the Cell*, 96:261-269.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, Billson FA (1995a), Development of microglial topography in human retina. *Journal of Comparative Neurology*, 363:53-68.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL (1995b), Ontogeny and cellular expression of MHC and leukocyte antigens in human retina. *Glia*, 15:458-470.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 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 and Differentiation*, 9:1220-1231.
- Doonan F, Donovan M, Cotter TG. (2003) Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration. *Journal of Neuroscience*, 23:5723-5731.
- Doonan F, Donovan M, Gomez-Vicente V, Bouillet P, Cotter TG, (2007), Bim expression indicates the pathway to retinal cell death in development and degeneration. *Journal of Neuroscience*, 27(40):10887-10894.
- Dorrell MI, Friedlander M (2006), Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25:277-295.
- Dowding AJ, Maggs A, Scholes J (1991), Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS: Immunohistochemical characterization using FL.1, an anti-macrophage monoclonal antibody. *Glia*, 4:345-364.
- Engelsberg K, Ehinger B, Wasselius J, Johansson K (2004), Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 242:229-239.
- Fain G.L. (2006), Why photoreceptors die (and why they don't), *BioEssays*, 28(4):344-354.
- Fawcett RJ, Osborne NN. (2007), Flupirtine attenuates sodium nitroprusside-induced damage to retinal photoreceptors, *in situ*. *Brain Research Bulletin*, 73:278-88.

- Fedoroff S (1995), Development of microglia. En: Neuroglia. Kettenmann H, Ransom BR, eds. Oxford University Press, New York, pp.162-181.
- Ferrer I, Planas AM. (2003), Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(4):329-339.
- Frade JM, Barde YA (1998), Microglial-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron*, 20:35-41.
- Frade JM, Barde YA (1999), Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development*, 126(4):683-690.
- Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A y Guck J (2007), Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy USA*, 104(20):8287-8292.
- Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, Marchetti V, Moreno SK, El-Kalay M, Bird A, Banin E, Aguilar E (2007), Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis*, 10:89-101.
- Fruttiger M (2002), Development of the Mouse Retinal Vasculature: Angiogenesis Versus Vasculogenesis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(2):522-527.
- Fruttiger M (2007), Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*, 10:77-88.
- Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B (2000), Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience*, 98(1):41-53.
- Galea I, Palin K, Newman TA, van Rooijen N, Perry VH y Boche D (2005), Mannose Receptor expresión Specifically Reveals Perivascular Macrophages in Normal, Injured, and Diseased Mouse Brain. *Glia*, 49:375-384.
- Gao H-M, Hong J-S, Zhang W, Liu B (2002), Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience*, 22(3):782-790.
- Gao L, Macklin W, Gerson J y Miller RH (2006), Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Developmental Biology*, 290:277-286.



- Garcia-Valenzuela E, Sharma SC (1999), Laminar restriction of retinal macrophagic response to optic nerve axotomy in the rat. *Journal of Neurobiology*, 40:55-66.
- Garcia-Valenzuela E, Sharma SC, Pina AL (2005), Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Molecular Vision*, 11:225-231.
- Garden GA, Möller T (2006), Microglia biology in health and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(2):127-137.
- Gaucher D, Chiappore JA, Pâques M, Simonutti M, Boitard C, Sahel JA, Massin P, Picaud S (2007), Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy. *Vision Research*, 47:612-623.
- Gaugler C (1997), Lipofuscin. *Stanislaus Journal of Biochemical Reviews*, May 1997. (<http://wwwchem.csustan.edu/chem4400/SJBR/lipofus.htm>)
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992), Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119:493-501.
- Gehrig A, Langmann T, Horling F, Janssen A, Bonin M, Walter M, Poths S, Weber BH (2007), Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(2):891-900.
- Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB (1988), Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *Journal of Neuroscience*, 8(7):2485-2490.
- Goodbrand IA, Gaze RM. (1991), Microglia in Tadpoles of *Xenopus laevis*: Normal Distribution and the Response to Optic Nerve Injury. *Anatomy and Embryology*, 184:71-82.
- Gowing G, Philips T, Van Wijmeersch B, Audet JN, Dewil M, Van Den Bosch L, Billiau AD, Robberecht W, Julien JP (2008), Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *Journal of Neuroscience*, 28(4):10234-10244.
- Graeber MB y Kreutzberg GW (1994), Microglia, cell of the brain decade. *Brain Pathology*, 4: 337-9.
- Graeber MB, López-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka K (1998), The microglia / macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Research*, 813:241-253.

- Gray DA, Woulfe J (2005), Lipofuscin and Aging: A Matter of Toxic Waste. *SAGE KE Science of Aging Knowledge Environment*, pp. 1-5. (<http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/2005/5/re1>).
- Grimm C, Wenzel A, Hafezi F y Remé C (2000), Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light. *Molecular Vision*, 6:252-260.
- Grimm C, Wenzel A, Stanescu D, Samardzija M, Hotop S, Groszer M, Naash M, Gassmann M y Remé C (2004), Constitutive overexpression of Human Eritropoietin Protects the Mouse Retina against Induced but not Inherited Retinal Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 24(25):5651-5658.
- Grimsley C, Ravichandran KS (2003), Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me signals. *TRENDS in Cell Biology*, 13(12):648-656.
- Grosche J, Hartig W, Reichenbach A (1995), Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller glial cells in retinal light damaged rats. *Neuroscience Letters* 185:119-122.
- Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003), Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 76:463-471.
- Hailer NP (2008), Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Progress in Neurobiology*, 84(3):211-233.
- Haim M (2002), Epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark. *Acta Ophthalmologica Scandinavica Supplement*, 233:1-34.
- Hanisch UW (2002), Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40:140-155.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007), Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11):1387-1394.
- Hao W, Wenzel A, Obin MS, Chen CK, Brill E, Krasnoperova N V, Eversole-Cire P, Kleyner Y, Taylor A, Simon MI, Grimm C, Remé CE y Lem J (2002), Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nature genetics*, 32:54-260.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 22:9228-9236.

- Harada C, Harada T, Quah HM, Maekawa F, Yoshida K, Ohno S, Wada K, Parada LF, Tanaka K. (2003), Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience*, 122(1):229-235.
- Hartig W, Grosche J, Distler C, Grimm D, El-Hifnawi E, Reichenbach A (1995), Alteration of Müller (glial) cells in dystrophic retinæ of RCS rats. *Journal of Neurocytology* 24:507-517.
- Herber DL, Maloney JL, Roth LM, Freeman MJ, Morgan D, Gordon MN (2006), Diverse microglial responses after intrahippocampal administration of lipopolysaccharide. *Glia*, 53:382-391.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C (2001), Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Developmental Biology*, 238: 274-288.
- Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, Uchino S, Kohsaka S (2005), Visualization of microglia in living tissues using Iba 1-EGFP transgenic mice. *Journal of Neuroscience Research*, 81:357-362.
- Hisatomi T, Sakamoto T, Sonoda KH, Tsutsumi C, Qiao H, Enaida H, Yamanaka I, Kubota T, Ishibashi T, Kura S, Susin SA, Kroemer G (2003), Clearance of apoptotic photoreceptors: elimination of apoptotic debris into the subretinal space and macrophage-mediated phagocytosis via phosphatidylserine receptor and integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *American Journal of Pathology*, 162:1869-1879.
- Holländer 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 Müller cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4):587-603.
- Holländer H, Makarov F, Stefani FH y Stone J (1995), Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribosa in the normotensive eye in humans and other mammals. *Ophthalmic Research*, 27(5):296-309.
- Hughes EH, Schlichtenbrede FC, Murphy CC, Sarra GM, Luthert PJ, Ali RR, Dick AD (2003), Generation of activated sialoadhesin-positive microglia during retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44:2229-2234.

- 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. *Experimental Eye Research*, 78(6):1077-84.
- Hume DA, Gordon S (1983), Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtglomerular complex. *Journal of Experimental Medicine*, 157:1704-1709.
- Hume DA, Perry VH, Gordon S (1983), Immunochemical 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. *Journal of Cell Biology*, 97:253-257.
- Humphrey MF, Moore SR (1996), Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and microglial reactions. *Glia*, 16:325-341.
- Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein SC (2002), Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*, 40:195-205.
- Iandiev I, Pannicke T, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Grimm C, Remé CE, Bringmann A. (2008a), Localization of glial aquaporin-4 and Kir4.1 in the light-injured murine retina. *Neuroscience Letters*, 434(3):317-321.
- Iandiev I, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann PP, Grimm C, Reme CE, Reichenbach A, Pannicke T, Bringmann A. (2008b), Muller Cell Response to Blue Light Injury of the Rat Retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(8):3559-3567.
- Igarashi T, Miyake K, Hayakawa J, Kawabata K, Ishizaki M, Takahashi H y Shimada T (2007), Apoptotic Cell Death and Regeneration in the Newborn Retina After Irradiation Prior to Bone Marrow Transplantation. *Current Eye Research*, 32:543-553.
- Ilschner S y Brandt R (1996), The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and deetyrosinated microtubules. *Glia*, 18(2):129-140.
- Inman DM, Horner PJ. (2007), Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia*, 55(9):942-53.

- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998), Microglia specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba-1. *Molecular Brain Research*, 57:1-9.
- Ito M, Yoshioka M (1999), Regression of the hyaloid vessels and papillary membrane of the mouse. *Anatomy and Embryology*, 200:403-411.
- Jacobson SG, McInnes RR (2002), Blinded by the light. *Nature Genetics*, 32:215-216.
- Jeon CJ y Masland RH (1993), Selective accumulation of diamidino yellow and chromomycin A3 by retinal glial cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41(11):1651-1658.
- Jeon GS, Kang TC, Park SW, Kim DW, Seo JH, Cho SS. (2004), Microglial responses in the avascular quail retina following transection of the optic nerve. *Brain Research*, 1023:15-23.
- Jomary C, Neal MJ, Jones SE. (2001), Characterization of cell death pathways in murine retinal neurodegeneration implicates cytochrome c release, caspase activation, and bid cleavage. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 18:335-346.
- Junqueira LC, Carneiro J (1996), *Histología básica*, 4ª ed. Masson, Barcelona.
- Kalloniatis M y Fletcher EL (2004), Retinitis pigmentosa: understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options. *Clinical and Experimental Optometry*, 87(2):65-80.
- Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H (2008), Characteristics of Bone Marrow-Derived Microglia in the Normal and Injured Retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(9):4162-4168.
- Katai N, Kikuchi T, Shibuki H, Kuroiwa S, Arai J, Kurokawa T, Yoshimura N. (1999), Caspase-like proteases activated in apoptotic photoreceptors of Royal College of Surgeons rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40:1802-1807.
- Kaur C, Hao AJ, Wu C-H, Ling EA (2001), Origin of microglia. *Microscopy Research and Technique* 54:2-9.
- Kaushal V, Schlichter LC (2008), Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *Journal of Neuroscience*, 28:2221-2230.
- Keller C, Grimm C, Wenzel A, Hafezi F y Remé C (2001), Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(2): 476-480.

- Kercher L, Favara C, Striebel JF, LaCasse R, Chesebro B. (2007), Prion protein expression differences in microglia and astroglia influence scrapie-induced neurodegeneration in the retina and brain of transgenic mice. *Journal of Virology*, 81:10340-10351.
- Kezic J, McMenamin PG (2008), Differential turnover rates of monocyte-derived cells in varied ocular tissue microenvironments. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(3):721-729.
- Kim SU, de Vellis J (2005), Microglia in Health and Disease. *Journal of Neuroscience Research* 81: 302-313.
- Kim YS, Joh TH (2006), Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental and Molecular Medicine*, 38(4):333-347.
- Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Matsumura M, Tsubura A. (2002), Nicotinamide prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in Sprague-Dawley rats and C57BL mice. *Experimental Eye Research*, 74:383-392.
- Knabe W, Kuhn HJ (1999), The earliest invasion of macrophages into the developing brain and eye of the tree shrew *Tupaia belangeri*. *Anatomy and Embryology*, 200:393-402.
- Koike M, Shibata M, Ohsawa Y, Nakanishi H, Koga T, Kametaka S, Waguri S, Momoi T, Kominami E, Peters C, Figura K, Saftig P, Uchiyama Y. (2003), Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 22:146-161.
- Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, Levison SW. (2005), Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 54:1559-1565.
- Kremer H, van Wijk E, Marker T, Wolfrum U, Roepman R (2006). Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Human Molecular Genetics*, 15 Spec No 2:R262-270.
- Kreutzberg GW (1996), Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8):312-318.
- Kunchithapautham K, Rohrer B. (2007a), Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress. *Autophagy*, 3:433-441.

- Kunchithapautham K, Rohrer B. (2007b), Autophagy is one of the multiple mechanisms active in photoreceptor degeneration. *Autophagy*, 3:65-66.
- Kunert KS, Fitzgerald ME, Thomson L, Dorey CK (1999), Microglia increase as photoreceptors decrease in the aging avian retina. *Current Eye Research*, 18(6):440-447.
- Kurpius D, Nolley EP, Dailey ME (2007), Purines Induce Directed Migration and Rapid Homing of Microglia to Injured Pyramidal Neurons In Developing Hippocampus. *Glia*, 55:873-884.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B (2005), Microglial cell population dynamics in injured adult central nervous system. *Brain Research Reviews*, 48:196-206.
- Lai Y-L, Jacoby RO, Jonas AM (1978), Age-related and light-associated retinal changes in Fischer rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 17(7):634-638.
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J (2007), Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. *The Journal of Neuroscience*, 27(10):2596-2605.
- Langmann T. (2007), Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of Leukocyte Biology*, 81:1345-1351.
- Lassmann H, Zimprich F, Vass K y Hickey WF (1991), Microglial cells are components of the perivascular *glia limitans*. *Journal of Neuroscience Research*, 28(2):236-243.
- LaVail MM (1976), Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Investigative Ophthalmology*, 15(1):64-70.
- LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA, Thomas LA, Ginsberg HM (1987), Genetic regulation of light damage to photoreceptors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 28:1043-1048.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH y Steinberg RH (1998), Protection of Mouse Photoreceptors by Survival Factors in Retinal Degenerations. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 39(3):592-602.
- 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.
- Lay AY, Todd KG (2008), Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia*, 56(3):259-270.
- Lee JE, Liang KJ, Fariss R, Wong WT (2008), Ex vivo Dynamic Imaging of Retinal Microglia using Time-lapse Confocal Microscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(9):4169-4176.
- Leonard KC, Petrin D, Coupland SG, Baker AN, Leonard BC, LaCasse EC, Hauswirth WW, Korneluk RG, Tsilfidis C. (2007), XIAP protection of photoreceptors in animal models of retinitis pigmentosa. *PLoS ONE*, 2(3):e314.
- 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. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48:412-21.
- Lev S (2001), Molecular aspects of retinal degenerative diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 21:575-589.
- Lewis GP, Sethi CS, Carter KM, Charteris DG, Fisher SK (2005), Microglial cell activation following retinal detachment: a comparison between species. *Molecular Vision*, 11:491-500.
- Ling EA (1981), The origin and nature of microglia. En: *Advances in Cell Neurobiology*. Fedoroff S, Hertz L, eds. Academic Press, London, pp. 33-82.
- Ling T, Stone J (1988), The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve. *Developmental Brain Research*, 44:73-85.
- Ling T, Mitrofanis J y Stone J (1989), Origin of Retinal Astrocytes in the Rat: Evidence of Migration from the Optic Nerve. *The Journal of Comparative Neurology*, 286:345-352.
- Ling EA, Wong WC (1993), The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7(1):9-18.
- Liu B, Du L, Kong LY, Hudson PM, Wilson BC, Chang RC, Abel HH, Hong JS (2000), Reduction by naloxone of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mouse cortical neuron-glia co-cultures. *Neuroscience*, 97:749-756.



- Lohr HR, Kuntchithapautham K, Sharma AK, Rohrer B. (2006), Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death. *Experimental Eye Research*, 83:380-389.
- Mack AF (2007), Evidence for a columnar organization of cones, Müller cells, and neurons in the retina of a cichlid fish. *Neuroscience*, 144:1004-1014.
- Magalhães MM y Coimbra A (1973), Electron microscope autoradiographic detection of sites of protein synthesis in the rabbit retina Müller cells. *Journal of Cell Biology*, 57:77-87.
- Maier K, Merkler D, Gerber J, Taheri N, Kuhnert AV, Williams SK, Neusch C, Bähr M, Diem R. (2007), Multiple neuroprotective mechanisms of minocycline in autoimmune CNS inflammation. *Neurobiology of Disease*, 25:514-525.
- Mallat M, Marín-Teva JL, Chéret C (2005), Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Current Opinion in Neurobiology*, 15:101-107.
- Mander TH, Morris JF (1995), Immunophenotypic evidence for distinct populations of microglia in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *Cell Tissue Research*, 280:665-673.
- Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E (2003), Neural remodeling in retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22:607-655.
- Marc RE, Jones BW, Watt CB, Vazquez-Chona F, Vaughan DK, Organisciak DT (2008), Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Molecular Vision*, 14:782-806.
- Marella M, Chabry J. (2004), Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *Journal of Neuroscience*, 24:620-627.
- Marigo V. (2007), Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration. *Cell Cycle*, 6:652-655.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J (1998), Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia*, 22:31-52.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J (1999a), Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anatomy and Embryology*, 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. *Journal of Comparative Neurology*, 412:255-275.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004), Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*, 41, 535-547.
- Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U, Masuzawa T, Suzuki H, Honda M, Yazaki Y, Watanabe E, Louma J, Yla-Herttuala S, Fraser I, Gordon S, Kodama T (1996), Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93:3269-3274.
- Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Li C, Takahashi H, Imai Y, Tanaka J (2007), Antibodies to CD11b, CD68, and Lectin label Neutrophils Rather than Microglia in Traumatic and Ischemic Brain Lesions. *Journal of Neuroscience Research*, 85:994-1009.
- McMenamin PG (1999), Subretinal macrophages in the developing eye of eutherian mammals and marsupials. *Anatomy and Embryology*, 200(5):551-558.
- Meyer DB (1977), The avian eye and its adaptations. En: *The Visual System in Vertebrates*. Crescitelli F, ed. Springer-Verlag, Berlín, pp. 549-611.
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2001), Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathologica*, 101:249-255.
- Monier A, Evrard P, Gressens P y Verney C (2006), Distribution and Differentiation of Microglia in the Human Encephalon during the First Two Trimesters of Gestation. *The Journal of Comparative Neurology*, 499:565-582.
- Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide AL, Evrard P, Gressens P, Verney C (2007), Entry and Distribution of Microglial Cells in Human Embryonic and Fetal Cerebral Cortex. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(5):372-382.
- Morcos Y y Chan-Ling T (1997), Identification of Oligodendrocyte Precursors in the Myelinated Streak of the Adult Rabbit Retina In Vivo. *Glia*, 21:163-182.

- Mullen RJ, LaVail MM. (1976), Inherited retinal dystrophy: primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science*, 192:799–801.
- Nakajima K, Kohsaka S (2004), Microglia: Neuroprotective and Neurotrophic Cells in the Central Nervous System. *Current Drug Targets- Cardiovascular and Hematological Disorders*, 4(1):65-84.
- Nakajima K, Tohyama Y, Maeda S, Kohsaka S, Kurihara T (2007), Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. *Neurochemistry International*, 50(6):807-820.
- Nakazawa T, Tachi S, Aikawa E y Ihnuma M (1993), Formation of the Myelinated Nerve Fiber Layer in the Chicken Retina. *Glia*, 8:114-121.
- Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, Noda K, Maruyama K, She H, Matsubara A, Miyahara S, Nakao S, Yin Y, Benowitz L, Hafezi-Moghadam A, Miller JW. (2007), Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104:2425-2430.
- Naskar R, Wissing M, Thanos S. (2002), Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43:2962-2968.
- Navascués J, Moujahid A, Quesada A, Cuadros MA (1994), Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *Journal of Comparative Neurology*, 350:171-186.
- 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. *Journal of Comparative Neurology*, 354:209-228.
- Navascués J, Cuadros MA, Almendros MA (1996), Development of microglia: evidence from studies in the avian central nervous system. En: *Topical Issues in Microglial Research*. Ling EA, Tan CK, Tan CBC, eds. Singapore Neuroscience Association, Singapur, pp. 43-64.
- Navascués J, Calvente R, Marín-Teva JL, Cuadros MA, (2000), Entry, Dispersión and Differentiation of Microglia in the Developing Central Nervous System. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72 (1):91-102.

- Newman E y Reichenbach A (1996), The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*, 19:307-312.
- Ng TF, Streilein JW (2001), Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42:3301-3310.
- 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. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(6):2589-2598.
- Nicotera P (2002), Apoptosis and age-related disorders: role of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Toxicology Letters*, 127:189-195.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005), Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*. *Science*, 308:1314-1318.
- Noell WK, Walker VS, Kang BS y Berman S (1966), Retinal damage by light in rats. *Investigative Ophthalmology*, 5:450-473.
- Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S (2000), Involvement of IBA1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages / microglia. *Journal of Cell Science*, 113:3073-3084.
- Ono K, Tsumori T, Kishi T, Yokota S y Yasui Y (1998), Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 398(3):309-322.
- Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Kutty RK y Wiggert B (2000), Circadian-Dependent Retinal Damage in Rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(12):3694-3701.
- Osborne N.N., Casson R.J., Wood J.P., Chidlow G, Graham M, Melena J, (2004), Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23:91–147.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S (2002), Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 14:123-128.
- Penfold PL, Provis JM, Madigan MC, van Driel D y Billson FA (1990), Angiogenesis in normal human retinal development: the involvement of astrocytes and macrophages. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 228 (3):255-263.

- Penfold PL, Madigan MC, Provis JM (1991), Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Visual Neuroscience*, 7:383-388.
- Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM (2001), Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20:385-414.
- Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos AJ (2001), CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nature Immunology*, 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. *Developmental Dynamics*, 228:231-238.
- Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I (2007), Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48:2753-2759.
- Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I.(2008), Transient protective effect of caspase inhibitors in RCS rat. *Experimental Eye Research*, 86(3):519-527.
- Peri F, Nüsslein-Volhard C (2008), Live Imaging of Neuronal Degradation by Microglia Reveals a Role for v0-ATPase a1 in Phagosomal Fusion In Vivo. *Cell*, 133:916-927.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985), Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, 15(2):313-326.
- Perry VH, Gordon S, (1991), Macrophages and the nervous system. *International Review of Cytology* 125:203-244.
- Perry VH, Matyszak MK, Fearn S (1993), Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia*, 7:60-67.
- Pierce EA (2001), Pathways to photoreceptor cell death in inherited retinal degenerations. *BioEssays*, 23:605-618.
- Plüddemann A, Neyen C, Gordon S (2007), Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*, 43:207-217.

- Polazzi E, Contestabile A (2002), Reciprocal Interactions Between Microglia and Neurons: From Survival to Neuropathology. *Reviews in the Neurosciences*, 13, 221-242.
- Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R (1994), Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91:974-978.
- 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.
- Provis JM, Penfold PE, Edwards AJ, Van Driel D (1995), Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the *glia limitans*. *Glia*, 14:243-256.
- Provis JM, Diaz CM, Penfold PL (1996), Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspectives on Developmental Neurobiology*, 3:213-222.
- Provis JM, (2001), Development of the Primate Retinal Vasculature. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(6):799-821.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999), Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research Reviews*, 30:77-105.
- Raivich G (2005), Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *TRENDS in Neuroscience*, 28(11):571-573.
- Rao NA, Kimoto T, Zamir E, Giri R, Wang R, Ito S, Pararajasegaram G, Read RW, Wu GS. (2003), Pathogenic role of retinal microglia in experimental uveoretinitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(1):22-31.
- Reichenbach A y Reichelt W (1986), Postnatal development of radial glia (Müller) cells of the rabbit retina. *Neuroscience Letters*, 71:125-130.
- Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chato TI, Dettmer D y Hertz L (1993), What retinal Müller (glial) cells do for their neuronal "small siblings"? *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6:201-213.

- Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A. (1998), Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Progress in Retinal & Eye Research*, 17:443-464.
- Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Wenzel A, Williams TP (2000), Apoptosis in the retina: the silent death of vision. *News Physiological Sciences*, 15:120-125.
- Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Iseli HP, Wenzel A (2003), Why study rod cell death in retinal degenerations and how?. *Documenta Ophthalmologica*, 106: 25-29.
- Rezaie P, Male D, (1999), Colonisation of the Developing Human Brain and Spinal Cord by Microglia: A Review. *Microscopy Research and Technique*, 45:359-382.
- Rezaie P, Male D (2002), Mesoglia & Microglia, A Historical Review of the Concept of Mononuclear Phagocytes Within the Central Nervous System. *Journal of the History of the Neurosciences*, 11 (4):325-374.
- Rezaie P (2003), Microglia in the human nervous system during development. *NeuroEmbriology*, 2:18-31.
- Rezaie P, Dean A, Male D, Ulfing N (2005), Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cerebral Cortex*, 15:938-949.
- Richardson A, Hao C, Fedoroff S (1993), Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia*, 7(1):25-33.
- Ripps H (2002), Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Experimental Eye Research*, 74:327-36.
- Ritter MR, Banin E, Moreno SK, Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander M (2006), Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(12):3266-3276.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, Peterson PK (2004), Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4):942-964.
- Rodríguez-Gallardo L, Lineros-Domínguez MC, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G (2005), Macrophages during retina and optic nerve development in the Mouse embryo: relationship to cell death and optic fibres. *Anatomy and Embryology*, 210:303-316.
- Rogove AD, Lu W, Tsirka SE (2002), Microglial activation and recruitment, but not proliferation, suffice to mediate neurodegeneration. *Cell Death and Differentiation*, 9:801-806.

- Rohrer B, Pinto FR, Hulse KE, Lohr HR, Zhang L, Almeida JS (2004), Multidestructive pathways triggered in photoreceptor cell death of the rd mouse as determined through gene expression profiling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40):41903-41910.
- Roque RR, Imperial CJ, Caldwell RB (1996), Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 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 Research*, 836(1-2):110-119.
- Ross MH y Pawlina W (2007), *Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular* (5ª edición). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires (pp. 894-927).
- Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2000), Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *Journal of Comparative Neurology*, 417:431-447.
- Samardzija M, Wenzel A., Thiersch M, Frigg R, Remé C, Grimm C (2006), Caspase-1 Ablation Protects Photoreceptors in a Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47:5181–5190.
- 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*, 463:261-273.
- Sánchez-López A, 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. *Journal of Comparative Neurology*, 492:20-33.
- Sandercoe TM, Madigan MC, Billson FA, Penfold PL y Provis JM (1999), Astrocyte Proliferation During Development of the Human Retinal Vasculature. *Experimental Eye Research*, 69:511-523.
- Sanges D, Comitato A, Tammaro R, Marigo V. (2006), Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 103(46):17366-17371.



- Sano Y, Furuta A, Setsuie R, Kikuchi H, Wang YL, Sakurai M, Kwon J, Noda M, Wada K (2006), Photoreceptor cell apoptosis in the retinal degeneration of Uchl3-deficient mice. *American Journal of Pathology*, 169(1):132-141.
- 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. *Journal of Comparative Neurology*, 506:224-239.
- 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 Retina Degeneration. *The American Journal of Pathology*, 172(6):1693-1703.
- Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y (2001), IBA1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/ microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286:292-297.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, 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. *Journal of Cell Biology*, 123:513-522.
- Schnitzer J (1985), Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *The Journal of Comparative Neurology*, 240(2):128-142.
- Schnitzer J (1987), Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neuroscience Letters*, 78(1):29-34.
- Schnitzer J (1988a), Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia*, 1(1):74-89.
- Schnitzer J (1988b), Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 44(1):59-72.
- Schnitzer J (1989), Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology*, 282:249-263.
- Schnitzer J, Scherer J. (1990), Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *Journal of Comparative Neurology*, 302(4):779-91.
- Schwartz M, Butovsky O, Brück W, Hanisch UK (2006), Microglial phenotype: is the commitment reversible?. *TRENDS in Neurosciences*, 29(2):68-74.

- Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Doréis R, Butcher GW, ter Meulen V (1991), Isolation and direct characterisation of resident microglial cells from the normal and inflamed nervous system. *Proceedings of the National Academy USA*, 88:7438-7442.
- Seo JH, Haam YG, Park SW, Kim DW, Jeon GS, Lee C, Hwang DH, Kim YS, Cho SS (2001), Oligodendroglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult bird. *Journal of Neuroscience Research*, 65(2):173-183.
- Shahinfar S, Edward DP, Tso MO (1991), A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury. *Current Eye Research*, 10:47-59.
- Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. (2007), Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *Journal of Comparative Neurology*, 501(6):866-878.
- Srinivasan B, Roque CH, Hempstead BL, Al-Ubaidi MR, Roque RS, (2004), Microglia-derived proneurite growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279:41839-41845.
- Stence N, Waite M, Dailey ME (2001), Dynamics of Microglial Activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33:256-266.
- Stoll G, Jander S (1999), The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in Neurobiology*, 58:233-247.
- Stone J y Dreher Z (1987), Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 255(1):35-49.
- Stone J y Maslim J, (1997), Mechanisms of Retinal Angiogenesis. *Progress in Retinal and Eye Research*, 16(2):157-181.
- Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, Barnett N, Provis J, Lewis G, Fisher SK, Bisti S, Gargini C, Cervetto L, Merin S, Peer J. (1999), Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18(6):689-735.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988), Functional plasticity of microglia: a review. *Glia*, 1:301-307.
- Streit WJ, Graeber MB (1993), Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia*, 7(1):68-74.

- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999), Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology*, 57:563-581.
- Streit WJ (2001), Microglia and Macrophages in the Developing CNS. *Neuro-Toxicology*, 22:619-624.
- Streit WJ, Conde JR, Harrison JK (2001), Chemokines and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 22(6):909-913.
- Streit WJ (2002), Microglial as Neuroprotective, Immunocompetent Cells of the CNS. *Glia*, 40:133-139.
- Streit WJ (2005), Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 48(2):234-239.
- Streit WS (2006), Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *TRENDS in Neurosciences*, 29(9):506-510.
- Terman A, Brunk UT (1999) Is Lipofuscin Eliminated from Cells? *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40(10):2463-2464.
- 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 Research*, 588:21-28.
- Thanos S, Mey J, Wild M (1993), Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience*, 13:455-466.
- Thanos S, Moore S, Hong YM (1996), Retinal microglia. *Progress in Retinal and Eye Research*, 15:331-361.
- Theele DP, Streit WJ (1993), A chronicle of microglial ontogeny. *Glia*, 7:5-8.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 21:2580-2588.
- Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Stohlman S, Ransohoff R (2007), Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia*, 55:360-368.
- Ueda H, Fujita R. (2004), Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(7):950-955.

- Ullrich O, Diestel A, Eyüpoglu IY, Nitsch R (2001), Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nature Cell Biology*, 3(12):1035-1042.
- Van Rossum D, Hanisch U-K (2004), Microglia. *Metabolic Brain Disease*, 19(Nos. 3/4):394-411.
- Van Weemen BK y Schuurs AHWM (1971), Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15(3):232-236.
- Vilhardt F (2005), Microglia : phagocyte and glia cell. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37:17-21.
- Vrabec FR (1970), Microglia in the monkey and rabbit retina. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 29:217-224.
- Wang X, Tay SS, Ng YK. (2000), An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma. *Experimental Brain Research*, 132(4):476-84.
- Watanabe T y Raff MC (1988), Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature*, 332:834-837.
- Wellard J, Lee D, Valter K, Stone J. (2005), Photoreceptors in the rat retina are specifically vulnerable to both hypoxia and hyperoxia. *Visual Neuroscience*, 22:501-517.
- Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE. (2005), Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24:275-306.
- White DA, Fritz JJ, Hauswirth WW, Kaushal S, Lewin AS (2007), Increased sensitivity to light-induced damage in a mouse model of autosomal dominant retinal disease. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(5):1942-1951.
- Won MH, Kang TC, Cho SS (2000), Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microscopy Research and Technique*, 50:151-160.
- Wong RO, Hughes A (1987), Role of cell death in the topogenesis of neuronal distributions in the developing cat retinal ganglion cell layer. *Journal of Comparative Neurology*, 262:496-511.

- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1994), Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal brain. *Journal of Neurocytology*, 23:258-269.
- Wu J, Gorman A, Zhou X, Sandra C, Chen E. (2002), Involvement of caspase-3 in photoreceptor cell apoptosis induced by in vivo blue light exposure. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(10):3349-3354.
- Wu T, Chiang SK, Chau FY, Tso MO. (2003), Light-induced photoreceptor degeneration may involve the NF kappa B/caspase-1 pathway in vivo. *Brain Research*, 967:19-26.
- Xu H, Chen M, Mayer EJ, Forrester JV, Dick AD (2007), Turnover of resident microglia in the normal adult mouse. *Glia*, 55:1189-1198.
- Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T (1998), Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54:628-640.
- Yamato S, Hirabayashi Y, Sugihara H (1984), An improved procedure for the histochemical demonstration of cathepsin D by the mercury-labeled pepstatin method. *Stain Technology*, 59:113-120.
- Yang P, Das PK, Kijlstra A (2000), Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocular Immunology and Inflammation*, 8:149-157.
- Yang LP, Zhu XA, Tso MO. (2007a) Minocycline and sulforaphane inhibited lipopolysaccharide-mediated retinal microglial activation. *Molecular Vision*, 13:1083-1093.
- Yang LP, Li Y, Zhu XA, Tso MO. (2007b), Minocycline delayed photoreceptor death in rds mice through iNOS-dependent mechanism. *Molecular Vision*, 13:1073-1082.
- Yang LP, Zhu XA, Tso MO. (2007c), A possible mechanism of microglia-photoreceptor crosstalk. *Molecular Vision*, 13:2048-2057.
- Yokoyama A, Yang L, Itoh S, Mori K, Tanaka J (2004), Microglia, a potential source of neurons, astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 45(1):96-104.
- Young RW (1984) Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 229:362-373.

- Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. (1998), Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95:15769-15774.
- Yuan L, Neufeld AH (2001), Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *Journal of Neuroscience Research*, 64(5):523-532.
- Zeiss CJ, Johnson EA. (2004a), Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(3):971-976.
- Zeiss CJ, Neal J, Johnson EA. (2004b), Caspase-3 in postnatal retinal development and degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(3):964-970.
- Zeng XX, Ng YK, Ling EA (2000), Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visual Neuroscience*, 17:463-471.
- 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. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 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. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45:2753-2759.
- Zhang C, Lam TT, Tso MO (2005a), Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Experimental Eye Research*, 81:700-709.
- Zhang C, Shen JK, Lam TT, Zeng HY, Chiang SK, Yang F, Tso MO (2005b), Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Molecular Vision*, 11:887-895.
- Zhang M, Zhou J, Marshall B, Xin B, Atherton SS (2007), Lack of iNOS facilitates MCMV spread in the retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(1):285-292.



## **CONCLUSIONS / CONCLUSIONES**





**First.** Macrophage/microglial cells are already present at the early stages of development of the mouse retina (E11.5).

**Second.** The antibody anti-iba-1 labels the macrophage/microglial cells present in the mouse retina along all their development.

**Third.** The number of microglial cells in the retina decreases significantly around birth (P0).

**Fourth.** The definitive pattern of microglia distribution in the retina is settled around the end of the second week of postnatal development. The establishment of this distribution pattern coincides with the development of the vascular plexuses and the end of the postnatal cell death period in the retina.

**Fifth.** Microglial cells migrate radially, from vitreal layers to scleral ones, in order to colonize the entire retina.

**Sixth.** No evident differences in microglial cell distribution are observed between albino and pigmented mice (strains BALB/c and C57BL, respectively).

**Seventh.** The photodegeneration treatment induces the degeneration of photoreceptors and, therefore, the thinning of the ONL which is reduced to two-three rows of photoreceptor nuclei in particular areas ten days after the light exposure. As a consequence, the complete retina also thins out.

**Eighth.** Free nucleosomes quantification with an ELISA methods shows that considerable cell death occurs in the retina in photodegeneration. Most part of the dying cells is located in the ONL, as revealed by TUNEL method and transmission electron microscopy.

**Ninth.** The outer retinal layers are severely affected in the animals exposed to intense light. In fact, the typical organization of the nuclei in the ONL is disturbed, and many cell debris accumulate in the subretinal space.

**Tenth.** Microglial cells activate following photodegeneration treatment, as showed by variations of their normal distribution pattern, morphological changes and modification in the expression of several molecules, as SRA and F4/80.

**Eleventh.** As a consequence of photodegeneration, macrophage/microglial cells invade the outer retinal layers, around the lesion site.

**Twelfth.** While microglial cells colonize the ONL and the subretinal space few hours after the photodegeneration treatment, an obvious increase of the presence of microglial cells in the inner layers of the retina is not seen before 48 hours after light exposure.

**Thirteenth.** Many microglial cells invading the ONL reach a large size and apparently engulf simultaneously several photoreceptor nuclei. The size of the macrophage/microglial cells in the subretinal space also increased significantly after the photodegeneration treatment and frequently contained phagosomes.

**Fourteenth.** Microglial cells still show a certain degree of activation in retinas obtained ten days after the light exposure, as revealed by their anti-CD45 and anti-F4/80 labeling. On the contrary, the expression of CD68 and SRA molecules in the retinas of these animals has returned to normal levels.

**Primera.** Las células macrófago/microgliales ya están presentes en la retina del ratón en estadios tempranos del desarrollo (E11.5).

**Segunda.** El anticuerpo anti-Iba-1 marca las células macrófago/microgliales de la retina murina a lo largo de todo el desarrollo.

**Tercera.** Coincidiendo con el momento del nacimiento (P0) se produce un descenso significativo del número de células microgliales.

**Cuarta.** El patrón definitivo de distribución de la microglía en la retina se establece hacia el final de la segunda semana de desarrollo postnatal. El establecimiento de este patrón es simultáneo al desarrollo de los plexos vasculares y coincide con el final del periodo de muerte celular programada en la retina.

**Quinta.** Las células microgliales colonizan la retina siguiendo un mecanismo de migración radial, desde las capas más vitreales a las más esclerales.

**Sexta.** No existen diferencias notables en cuanto a la distribución de las células microgliales en las retinas de los ratones albinos y pigmentados empleados en este estudio (BALB/c y C57BL/6 respectivamente).

**Séptima.** El tratamiento de fotodegeneración provoca la muerte de los fotorreceptores y, por tanto, el adelgazamiento de la ONL. En consecuencia, se produce el adelgazamiento de toda la retina.

**Octava.** La cuantificación de nucleosomas libres mediante ELISA muestra un incremento notable de la muerte celular en las retinas con fotodegeneración. La utilización de TUNEL y microscopía electrónica de transmisión permite comprobar que la mayor parte de dicha muerte se localiza en la ONL.

**Novena.** La ultraestructura de la retina externa en los animales expuestos a la luz muestra alteraciones evidentes con respecto a las retinas de los animales control. En concreto, la ONL pierde su organización típica, mientras que los restos de fotorreceptores se acumulan en el espacio subretiniano.

**Décima.** Como consecuencia de la fotodegeneración, la microglía se activa, lo que se manifiesta en: cambios en la distribución, morfología y expresión de moléculas marcadoras, como SRA y F4/80.

**Undécima.** El patrón de distribución normal de la microglía en la retina se altera como consecuencia de la fotodegeneración. Las células macrófago/microgliales invaden la retina externa, dirigiéndose hacia el foco primario de la lesión.

**Duodécima.** En las primeras horas tras la fotodegeneración, la microglía coloniza la ONL y el espacio subretiniano, mientras que su presencia en las capas más internas de la retina no se hace patente hasta 48 horas después de la exposición a la luz.

**Decimotercera.** Las células microgliales que invaden la ONL adquieren un gran desarrollo, englobando simultáneamente los núcleos de varios fotorreceptores. El número y el tamaño de las células macrófago/microgliales que aparecen en el espacio subretiniano se incrementa de forma notable después de la fotodegeneración y, frecuentemente, contienen fagosomas.

**Decimocuarta.** La microglía de las retinas obtenidas 10 días después de la fotodegeneración aún presenta un cierto grado de activación, como muestra su marcaje con anti-CD45 y anti-F4/80. Sin embargo, la expresión de SRA y CD68 ha vuelto a niveles normales.





**ANEXO I**  
**SUMMARY**





Microglial cells are involved in the surveillance and cleaning of the central nervous system (CNS), in the immune reactions taking place in the nervous parenchyma, and probably also in the building of the mature organization of the CNS (Kreutzberg, 1996; Aloisi, 2001; Mallat *et al.*, 2005). They are thought to originate from cells of mesodermal lineage that colonize the CNS (Cuadros and Navascués, 1998). Microglial cells adopt different morphological and immunophenotypical features in different situations, so it is useful to distinguish between three major types of microglial cells:

- Developing microglial cells, which are frequent during embryonic and postnatal development. Most of them are amoeboid cells and therefore are called amoeboid microglia.
- Mature microglial cells, which have a mature level of ramification, and are thought to be *quiescent* cells that survey the nervous parenchyma.
- Reactive microglial cells, which derive from mature microglial ones facing an insult in the CNS. The activation is accompanied by changes in shape, with retraction of cell processes, and increased immunoreactivity (Streit *et al.*, 1999).

These types are thought to correspond to different developmental and functional states of the same cell. Moreover, microglial cells do not distribute homogeneously throughout the CNS (Lawson *et al.*, 1990; Mittelbronn *et al.*, 2001), suggesting that local factors, either currently operating or acting in the past, influence the presence and state of differentiation of microglial cells.

They are evidences showing that microglial cells of the developing CNS are able to respond to several types of injuries, although the features of the microglial reaction is not the same in the developing and adult CNS (Graeber *et al.*, 1998; Cuadros *et al.*, 2000; Sánchez-López *et al.*, 2005).



## CHAPTER I: DEVELOPMENT OF MICROGLIAL CELLS IN THE MOUSE RETINA

While the presence of microglial cells in the adult retina has been described in several species, as fishes (Dowding *et al.*, 1991; Salvador-Silva *et al.*, 2000), amphibians (Goodbrand and Gaze, 1991), birds (Navascués *et al.*, 1994; Won *et al.*, 2000), rabbits (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989; Humphrey and Moore, 1996), mice (Zhang *et al.*, 2005b), rats (Ashwell *et al.*, 1989; Harada *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005a), monkeys (Vrabec, 1970; Boycott and Hopkins, 1981) and humans (Provis *et al.*, 1995; Penfold *et al.*, 1991, 2001; Yang *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003), the emergence of these pattern during development. has been far less investigated.

This process and some of the factors that can affect it have been extensively studied in our laboratory by using an antibody recognizing microglial cells in the quail (Navascués *et al.*, 1994, 1995; Marín-Teva *et al.*, 1998, 1999a, b; Sánchez-López *et al.*, 2004). These studies revealed that microglial cells colonize the quail retina by two different forms of migration, tangential and radial: first, microglial cells spread along the developing nerve fiber layer (NFL), and, subsequently, they reach other retinal layers by radial migration. Less data about microglial development in the retina exists for other species. So, detailed reports about the presence and distribution of microglia in the developing retina have been published in rats (Ashwell *et al.*, 1989) and rabbits (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989), whereas studies that only cover some stages of development are available for mice (Hume *et al.*, 1983; Hughes *et al.*, 2003) and humans (Diaz-Araya *et al.*, 1995a, b).

We considered that we needed a complete picture of the normal distribution of microglia during development before analyze the response of microglial cells to an injury in the retina: these data would give insights about how the normal distribution of microglial cells is affected by disturbances of the retina, and detect the migratory behaviour of microglial cells. Therefore, we tried to produce an accurate description of the development of microglial cells in the retina using several microglial markers (anti-Iba-1, anti-F4/80, anti-CD45, and

anti-CD68 antibodies and by tomato lectin histochemistry) expecting that most part of the retinal microglial cells should be labelled by at least one of these markers. Our results show that anti-iba1, that recognizes a calcium binding protein present in cells of monocytic lineage, is a convenient marker of microglial cells along their development, and, thus, we mainly used it along our study.

In addition, we compared the results obtained in two different strains of mice, the pigmented C57BL/6 mice, and the albino BALB/c mice for establishing if, as before reported by others, microglial distribution is not the same in albino and pigmented mouse retinas.

Macrophage/microglial cells were already present in the retina of embryos aged 11.5 days (E11.5) in association with cell death. At E12.5 some macrophage/microglial cells also appeared in peripheral regions of the retina with no apparent relationship with cell death.

Macrophage/microglial cells increased in number thereafter and sometimes showed some ramification. Immediately before birth microglial cells were present in the neuroblastic (NbL), inner plexiform (IPL), and ganglion cell (GCL) layers. Their distribution suggested that they entered the retina from the ciliary margin and the vitreous.

The distribution of retinal microglial cells changed greatly immediately after birth, as microglial cells were nearly restricted to the more vitreal part of the retina, while the outer part of it was devoid of them. Apparently, microglial cells move from this vitreal location in scleral direction in order to colonize other layers of the retina, and therefore, should colonize the retina by radial migration in a vitreal-to-scleral direction, like to that described during quail retina development.

Simultaneously, the density of microglia decreased greatly in early postnatal retinas compared with the density recorded before birth. The density of retinal microglia increased during the first postnatal week and decreased again afterward to finally gain the density levels of microglia observed in normal adults. These changes in density are likely due to variations in the appearance of new retinal microglial cells: whereas we have no explaining to the postnatal decrease in microglial density, the increase of this density during the first

postnatal week is apparently related to the incorporation of new macrophage/microglial cells to the retina, as suggested by the frequent observation of cells apparently traversing the vitreal border. The incorporation of vitreal cells to the retina seem to diminish after P7 and not enough microglial precursors should enter the retina to compensate for the retinal growth and, in consequence, the microglial density decreased in the retina.

After the changes in microglial cell distribution and density that occur during the first two postnatal weeks, it was seen that the mature distribution pattern of microglial cell distribution was already settled at P14. From this age on, it was seen that many microglial cells frequently showed thinner processes with more elaborated ramification.

In the adult retina, mature microglia appeared in the NFL, GCL, IPL, OPL and, sometimes, in the INL. Noteworthy, microglial cells never appeared in the ONL. No obvious differences could be observed between the distribution of microglia in albino and pigmented retinas, although it cannot be discarded that some differences exist at the quantitative level.

In an attempt to establish if tangential migration of microglial cells occurred in the developing mouse retina, retinal explants of P0-P3 retinas were labelled with ant-iba1 antibody. A clear tangential migration, like to that found in the quail, cannot be observed in these explants.

In summary, the mature topographical distribution pattern of microglia emerged during postnatal development of the retina and microglial cells were present within all layers of the retina except the ONL at the end of the second postnatal week. Once microglial cells reached their definitive location, they progressively increased their ramification.



## CHAPTER II: MICROGLIAL RESPONSE IN THE RETINA TO PHOTODEGENERATION INDUCED BY INTENSE LIGHT EXPOSURE

Both, continuous exposure to light of moderate intensity and brief exposure to intense light cause retinal degeneration. Similarly to the retinal degeneration caused by many genetic factors, the degeneration caused by light exposure (that will be called photodegeneration), first causes the death of photoreceptor cells (Noell *et al.*, 1966; LaVail *et al.*, 1998; Remé *et al.*, 1998; Organisciak *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005b). Because of this, the photoreceptor degeneration induced by intense light exposure is considered to be an useful model to study the degenerative process of photoreceptor cells occurring in the human retina, as those in retinitis pigmentosa and in age-related macular degeneration.

We wanted to study the response of microglia to retinal photoreceptor degeneration after intense light exposure. To analyze this issue, mice were exposed to intense light (10,000 lux) during 7 hours and afterwards were maintained in complete darkness for 6, 12, 18, 24, 36, 48 or 72 hours ( $\Phi+6h$ ,  $\Phi+12h$ ,  $\Phi+18h$ ,  $\Phi+24h$ ,  $\Phi+36h$ ,  $\Phi+48h$  and  $\Phi+72h$ , respectively) or 10 days ( $\Phi+10$  days).

Before carrying out the study of microglial response in retinal degeneration, it was need to establish that the light exposure procedure used by us was effective in producing photodegeneration in the mouse retina. To ascertain this point, several methods have been used.

In first term, the morphological features of control and light-treated retinas were considered. Semithin sections showed that retinas subjected to the photodegeneration protocol were clearly thinner than the control ones. This thinning was mainly due to the decrease of size of the ONL as consequence of the fall in photoreceptor number and, therefore, indicates the death of many of them.

More precise information about cell death phenomena in photodegeneration were obtained by other methods. So, the amount of cell death in the retina after photodegeneration was quantified by the determination



of the number of free nucleosomes, as revealed by ELISA, in retinal extracts obtained from control animals and from animals sacrificed at diverse times after light exposure. This procedure revealed that extensive cell death occurs in the photodegenerating retina during the 48 hours ( $\Phi+48h$ ) following light exposure; the amount of cell death reduces thereafter, although the cell death levels seen in the retinas ten days after the light exposure is by far greater than in control retinas.

Although this methodology gave information about the amount of retinal cell death, did not provide any insight about the distribution of the dying cells in the retina. In order to determine this point, the TUNEL technique was used. While hardly a labeled TUNEL nuclei was seen in control retinas, the presence of TUNEL labeled bodies was noticeable in  $\Phi+6$  retinas and became more numerous during the first 24 hours of survival time. This technique also revealed that most of the degenerating nuclei were detected in the ONL, where photoreceptor cell nuclei are located.

An study using transmission electron microscopy (TEM) also revealed the presence of degenerating photoreceptor cells in photodegenerating retinas shortly after the light exposure. Therefore, the three methods (ELISA quantification of free nucleosomes, TUNEL and TEM) gave comparable results and showed that significantly greater cell death occurs in the photodegenerating retinas than in the normal ones. In addition, TEM and TUNEL method showed that most of this cell death happened in the ONL.

Then, after setting up that the light exposure protocol used produced extensive photoreceptor cell death, we studied the features of retinal microglial cells in the photodegenerating retinas.

It was clearly seen that macrophage/microglial cells in the photodegenerating retinas were activated, as revealed by the following features:

- i) They migrate to the region of early injury, the ONL and subretinal space;
- ii) Instead of being more or less ramified cells, retinal microglia became rounded cells showing short and stout processes;

- iii) These cells also showed immunophenotypic changes, as revealed by increased expression of several immunomolecules.

Each one of these features will be discussed in the followings paragraphs.

### **Modification of the distribution of retinal microglial cells after photodegeneration**

The distribution pattern shown by microglial cells in the retinal layers of photodegenerating retinas was clearly different to that one in control retinas. In fact, microglial cells invade the ONL, where no microglial cells exist in normal retinas and many macrophages of considerable size appear in the subretinal space in contrast with the less frequent cells of smaller size that are present in the same location of normal eyes.

In order to quantify the increase in the number of macrophage/microglial cells in the ONL and subretinal space, the density of cells labeled by SRA (that reveals the activation of macrophage/microglial cells, see below) was determined at different survival times after light exposure. It was shown that the number of activated macrophage/microglial cells increase quickly and was already seen in retinas  $\Phi+6h$ ; the presence of activated cells did not change during two days, but decreased afterwards and was near control levels ten days after light exposure.

Therefore, macrophage/microglial cells appeared in the ONL coinciding with the degeneration of photoreceptor cells, as it has been described in different pathological situations of the retinal. (Thanos, 1992; Roque *et al.*, 1996; Harada *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2003; Zeiss y Johnson, 2004a,b; Zeng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005a, b).

The observed increase in microglial cells in the photodegenerating retina may be consequence of the increased expression of some molecules and not produced by a real increase in macrophage/microglial cell number. For example, no microglial cell labeling by anti-SRA was observed in the normal retinas, while many microglial cells labels with this antibody after photodegeneration; this may be due to an increase in the number of already

present microglial cells expressing the immunomolecule recognized by it. However, it is also probable that new cells showing SRA expression would incorporate to the retina. Likely, the two facts (the SRA expression by cells already present in the retina and the incoming of new SRA-expressing cells) contribute to the increase in SRA expression.

The new macrophage/microglial cells present in the ONL and subretinal space in photodegenerating retinas may have different origins:

1. They can originate from cells that migrate from other regions of the nervous system, either from inside the retina (e.g. inner layers of the retina), or from outside it (e.g. the optic nerve).
2. Be produced by proliferation of microglial precursors within the retina.
3. Come from cells that invade the retina from non-nervous locations, as the circulating blood, the choroids, the vitreous and the ciliary body. Concerning the two later origins, retinas immunostained with anti-CD68 and anti-SRA antibodies revealed that labelled cells were frequently seen on the vitreal margin of the retina and in the frontier between the peripheral retina and the ciliary body, and, therefore, some macrophage/microglial cells apparently enter the retina from the ciliary body and the vitreous, respectively.

The routes of entry in the retina above reported are not exclusive and probably more of one, or perhaps all, contribute to the increase in macrophage/microglial number. So, microglial cells from the inner retinal layers may move to the ONL and the “empty” space that they leave behind should be “replenished” by cells incoming from the vitreous.

### **Morphological changes in retinal microglial cells in photodegenerating retinas**

As seen in chapter one, microglial cells in the mature normal mouse retina were ramified cells bearing thin processes with elaborate ramification. The morphological appearance of these cells was greatly altered after light

exposure. Whereas microglial cells showed some ramification in layers outside the ONL, cells labeled by the markers used (see below) and located within this layer were more or less compact and in occasions, had processes that encircled several photoreceptor cells. This latter caused that the labeling in the ONL had sometimes a “honeycomb” appearance.

Labeled cells in the subretinal space had no processes or had short ones. Some of the cells in this location contained phagosomes that apparently included pigment debris from the degenerating outer segments of photoreceptor cells, as revealed both by confocal microscopy and TEM.

### **Timecourse of the expression of microglial markers**

The expression of several cell markers was observed in the activated macrophage/microglial cells. Specifically, the expression of the molecules recognized by the antibodies anti-CD45, anti-CD68, anti-4/80 and anti-SRA was studied. The employ of different markers sought to obtain a more complete picture of the response of macrophage/microglial cells in photodegeneration.

The expression of all these molecules within the outer layers of the retinas (ONL and subretinal space) was considerably increased shortly after the light exposure ( $\Phi+6h$ ) and augmented afterwards.

The anti-CD45 used marked microglial cells within the control retina in the IPL, OPL and GCL. The strength of the anti-CD45 label increased in photodegenerating retinas and intensely marked cells appeared in the ONL, although many other positive cells were present in innermost layers of the retina. Large labelled cells were also seen in the choroid and in the subretinal space.

Anti-CD68 is restricted in non activated cells to lysosomal membranes, and, therefore, does not mark the complete outline of the cell; therefore, only a sparse, punctuate anti-CD68 labelling appeared in normal retinas. However, greater intensity of the label was observed after light exposure, although this marker never revealed very complex cells with elaborate processes, as membrane markers did.

Scarce cells were weakly labelled by anti-F4/80 in the normal retinas, while stronger labelling was seen in some cells of the subretinal space. The number of labelled cells and the intensity of their label increased in degenerating retinas. In general, labelling with anti-F4/80 antibody was delayed in respect to that observed with anti-CD45, although, at later survival times, both antibodies showed a similar pattern of labelling.

Control retinas were nearly devoid of anti-SRA labelling as just some blood vessel-associate cells were marked by this antibody. Some augment of SRA expression was noticed at  $\Phi+6$  h, but it was more evident after 12 h of survival following light exposure.

Frequent cells immunopositive for the markers used were also seen in the internal layers of the retina after 36 hours of survival. Whereas the presence of labelled cells in the ONL and subretinal space should be related to the degeneration of different parts of the photoreceptor cells, labelled cells in the internal retina are probably related to the death of intermediate neurons in the INL caused by the primary degeneration of photoreceptor cells. In connection with this, cell fragments labelled by TUNEL were also apparent at the same time in photodegenerating retinas.

A noticeable decrease in anti-CD45 and anti-SRA labelling was observed in  $\Phi+10$  days retinas, but anti-CD45 and anti-F/80 labelling did not show any clear variation regarding the levels observed at shorter survival times.

Therefore, anti-CD45, anti-CD68, anti-SRA and anti-F4/80 may be considered as markers of microglial activation in the retina, as substantial differences are observed between the marking seen in normal retinas and those seen in photodegenerating ones.

### **Role of microglial cells during photodegeneration**

As described, activated macrophage/microglial cells accumulate in affected regions, suggesting that they play some function in the degeneration that occurs after light exposure. But, what is this role? It has been shown that macrophage/microglial cells phagocyte the debris produced during

degeneration, and some of our observations indicate that this also occurs during photodegeneration. An alternative view, however, propose that these cells should induce actively the death of photoreceptor cells by the release of cytotoxic factors or the non-release of cytoprotective ones. Our observations reveal that some cell death occurs before that microglial activation become obvious. In summary, is unlikely that microglial cells should participate actively in the death of the first photoreceptor that degenerate, but, as they shown clear signs of activation long after the light exposure, may be responsible of the death processes occurring at later times.



**ANEXO II**  
**ORIGINAL ARTICLE**





# Embryonic and Postnatal Development of Microglial Cells in the Mouse Retina

ANA M. SANTOS, RUTH CALVENTE, MOHAMED TASSI,  
MARIA-CARMEN CARRASCO, DAVID MARTÍN-OLIVA, JOSÉ L. MARÍN-TEVA,  
JULIO NAVASCUÉS, AND MIGUEL A. CUADROS\*

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada,  
E-18071 Granada, Spain

---

---

## ABSTRACT

Macrophage/microglial cells in the mouse retina during embryonic and postnatal development were studied by immunocytochemistry with Iba1, F4/80, anti-CD45, and anti-CD68 antibodies and by tomato lectin histochemistry. These cells were already present in the retina of embryos aged 11.5 days (E11.5) in association with cell death. At E12.5 some macrophage/microglial cells also appeared in peripheral regions of the retina with no apparent relationship with cell death. Immediately before birth microglial cells were present in the neuroblastic, inner plexiform (IPL), and ganglion cell (GCL) layers, and their distribution suggested that they entered the retina from the ciliary margin and the vitreous. The density of retinal microglial cells strongly decreased at birth, increased during the first postnatal week as a consequence of the entry of microglial precursors into the retina from the vitreous, and subsequently decreased owing to the cessation of microglial entry and the increase in retina size. The mature topographical distribution pattern of microglia emerged during postnatal development of the retina, apparently by radial migration of microglial cells from the vitreal surface in a vitreal-to-scleral direction. Whereas microglial cells were only seen in the GCL and IPL at birth, they progressively appeared in more scleral layers at increasing postnatal ages. Thus, microglial cells were present within all layers of the retina except the outer nuclear layer at the beginning of the second postnatal week. Once microglial cells reached their definitive location, they progressively ramified. *J. Comp. Neurol.* 506:224–239, 2008.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Indexing terms:** development; ameboid microglia; macrophage; cell death; vascularization

---

---

Microglial cells are involved in surveillance and cleaning of the central nervous system (CNS), in immune reactions in the nervous parenchyma, and probably also in the emergence of the mature organization of the CNS (Kreutzberg, 1996; Aloisi, 2001; Mallat et al., 2005). These cells adopt different morphological and immunophenotypical features in different situations. Immature microglial cells are frequent during embryonic and postnatal development. Most of them are ameboid cells (so-called ameboid microglia) and others show a primitive ramification. Mature microglial cells are fully ramified and were previously thought to be quiescent cells but recent studies have revealed them to be highly motile cells that continually survey their microenvironment by extension and retraction of processes (Nimmerjahn et al., 2005). Injury of CNS regions gives rise to the activation of ramified microglial cells, which acquire morphological and immunophenotypical features similar to macrophages (Streit et al., 1999). In addition, macrophages arising from mono-

cytes of the blood circulation also invade the nervous parenchyma in many CNS injuries. Hence, it is frequently difficult to distinguish between activated microglial cells and peripheral macrophages (Stoll and Jander, 1999; Cuadros et al., 2000) and they are often designated as macrophage/microglial cells. The same term is also used to refer to cells of macrophage lineage that appear during early CNS development (Cuadros et al., 1993; Herbomel et

---

Grant sponsor: Spanish Ministry of Education and Science; Grant number: BFU2004-01209.

\*Correspondence to: Miguel A. Cuadros, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain. E-mail: macuadro@ugr.es

Received 13 February 2007; Revised 21 June 2007; Accepted 11 September 2007

DOI 10.1002/cne.21538

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

TABLE 1. Antibodies Used

Antibody	Source	Type, Host	Dilution
Iba1	Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan #019-19741	Polyclonal, rabbit	1:100-1:200
F4/80	Serotec, Oxford, UK, #MCA 497	Monoclonal, rat	1:30
CD45	Serotec #MCA 1388	Monoclonal, rat	1:40
CD68	Serotec #MCA 1957	Monoclonal, rat	1:40
Ki 67	Abcam, Cambridge, UK, #ab15580	Polyclonal, rabbit	1:100

al., 2001) and whose final fate is not evident: they might become microglia as development advances or might disappear and be substituted by true microglial precursors. In this study the term macrophage/microglial cells is used to refer to macrophage-lineage cells whose final fate is not clearly established, while the term microglial cells is reserved for cells whose fate can be unequivocally traced during development until they become microglial cells.

Microglia originate from cells of mesodermal lineage that colonize the CNS (Cuadros and Navascués, 1998), including the retina, to achieve a mature distribution pattern that is specific to each CNS region (Lawson et al., 1990; Mittelbronn et al., 2001). The distribution of microglial cells in the adult retina has been described in fish (Dowding et al., 1991; Salvador-Silva et al., 2000), amphibians (Goodbrand and Gaze, 1991), birds (Navascués et al., 1994; Won et al., 2000; Cuadros et al., 2006), and mammals, including rabbits (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989; Humphrey and Moore, 1996), mice (Zhang et al., 2005b), rats (Ashwell et al., 1989; Harada et al., 2002; Zhang et al., 2005a), monkeys (Vrabec, 1970; Boycott and Hopkins, 1981), and humans (Penfold et al., 1991, 2001; Provis et al., 1995; Yang et al., 2000; Gupta et al., 2003). It has been observed in these species that microglial cells in the adult normal retina appear in the ganglion cell layer (GCL) and all fibrous layers, whereas they are scarce in the inner nuclear layer (INL) and absent in the outer nuclear layer (ONL). Many studies have demonstrated that these cells respond to different injuries in the retina (Humphrey and Moore, 1996; Roque et al., 1996; Chen et al., 2002; Harada et al., 2002; Zhang et al., 2005a,b), modifying this normal distribution pattern.

Emergence of the microglial distribution pattern during development has been far less investigated than its final outcome in the adult retina and has been extensively studied at our laboratory in the quail (Navascués et al., 1994, 1995; Marín-Teva et al., 1998, 1999a,c; Sánchez-López et al., 2004). These studies revealed that microglial cells colonize the quail retina by two different forms of migration, tangential and radial. Microglial cells spread on the vitreal surface of the retina by tangential migration along the developing nerve fiber layer (NFL). Subsequently, microglial cells reach other retinal layers by radial migration. There are few data on microglial development in the retina of other species. Detailed reports have been published on the presence and distribution of microglia in the developing retina of rats (Ashwell et al., 1989) and rabbits (Ashwell, 1989; Schnitzer, 1989), while only some development stages have been studied in mice (Hume et al., 1983; Hughes et al., 2003) and humans (Diaz-Araya et al., 1995a,b). It has also been reported that the distribution of microglial cells differs between pigmented and albino mouse retinas (Ng and Streilein, 2001).

In the present study different microglial markers were used to characterize the sequence of changes in the distri-

bution of microglial cells at each embryonic and postnatal developmental stage, comparing these changes between two different strains of mice (C57BL/6, pigmented, and BALB/c, albino).

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and histology

One hundred fifty embryos and postnatal mice of different ages were used in this study. Two different strains of mice were provided by the Animal Experimentation Service of the University of Granada: C57BL/6 pigmented and BALB/c albino mice. The age of embryos was determined by checking the presence of a vaginal plug in pregnant females; the morning of the day of plug detection was considered day 0.5 of gestation on the assumption that gestation had commenced the previous night. Embryos aged from 11.5 days of gestation (E11.5) to E18.5 were obtained from pregnant females subjected to deep halothane anesthesia (Fluothane, AstraZeneca Farmaceutica, Pontevedra, Spain). Ages of postnatal animals studied ranged from day of birth (P0) to adulthood (P45–60). Embryos and early postnatal animals were killed by decapitation. Older animals were killed by cervical dislocation or anesthetic overdose. In all cases experimental procedures followed guidelines issued by the Research Ethics Committee of our university.

The fixatives used in this study were 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP, Yamato et al., 1984), and Bouin's fluid. The entire head of embryos or enucleated eyes from postnatal animals were fixed in paraformaldehyde or PLP for 1–6 hours. Fixed material was cryoprotected in PBS (pH 7.4) containing 30% sucrose, soaked in OCT compound (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, The Netherlands), and frozen in liquid nitrogen. Blocks were stored at  $-40^{\circ}\text{C}$  until use. Twenty- $\mu\text{m}$ -thick transverse sections of retinas were obtained in a cryostat (Leica, Wetzlar, Germany) and collected on Superfrost slides (Menzel-Glasser, Braunschweig, Germany). Additional embryo heads and postnatal eyes were fixed in Bouin's fluid for 15–24 hours and embedded in paraffin wax. Paraffin blocks were cut in a rotatory microtome (Leica) at 10- $\mu\text{m}$  thickness.

### Immunocytochemistry

The antibodies used in this study and their sources and dilutions are summarized in Table 1. The Iba1 antibody was raised against the C-terminal end (sequence PTGP-PAKKAISELP) of the iba1 protein, a calcium-binding protein of macrophages and microglial cells present in rodents (Ito et al., 1998); this antibody recognizes a band of about 17 kDa on Western blot. F4/80 antibody binds to a surface glycoprotein of mouse macrophages and microglia

that have a mass of around 160 kDa in immunoprecipitation and Western blot experiments (Hume and Gordon, 1983; our unpubl. results); the immunogen was peritoneal activated macrophages from C57/BL mice. Anti-CD45 and anti-CD68 antibodies recognize mouse homologs of CD45 and CD68 molecules, respectively. CD45 is a tyrosine phosphatase protein present in the membrane of cells of monocyte/macrophage lineage (Penninger et al., 2001) and the antibody used, whose immunogen was purified B cells from mouse lymph nodes, recognizes a single band of >170 kDa in Western blot of mouse brain extracts (Cuadros et al., 2006). CD68 (macrosialin) is a membrane glycoprotein present in lysosomes of macrophage-lineage cells (Da Silva and Gordon, 1999); the antibody used in this study, raised against concavalin A acceptor protein from P815 cell line (manufacturer's technical information), recognizes bands of 87–115 kDa corresponding to different degrees of protein glycosylation related to cell activation and phagocytosis (Da Silva and Gordon, 1999). Finally, the immunogen for the Ki67 antibody was a peptide within residues 1200–1300 (sequence EDLAGFKELFQTP) of human Ki67 protein (manufacturer's technical information); it recognizes on Western blot a protein of 345–395 kDa present in the nucleus of proliferating cells (Schlüter et al., 1993; manufacturer's technical information) and is therefore used as a marker of cell proliferation. As negative control, primary antibodies were omitted in some sections, resulting in the abolition of immunostaining. In addition, immunolabeled cells showed the expected distribution and shape in immunostained sections. Thus, cells strongly labeled with Iba1, F4/80, anti-CD45, and anti-CD68 were observed within blood vessels, vitreous, and periorbital tissues, showing the morphological features of monocytes/macrophages. Ki67 immunopositive cells appeared in proliferative regions of the retina and periorbital tissues.

After permeabilization in 0.1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) in PBS (pH 7.4), sections were incubated with normal goat serum (Sigma) diluted 1:30 in PBS–1% bovine serum albumin (PBS-BSA) for 45–60 minutes. Then they were incubated with the primary antibody for 30–48 hours at 4°C, washed in PBS, and incubated with the corresponding secondary antibody diluted 1:1,000 in PBS-BSA for 2–3 hours at room temperature. The secondary antibodies used were Cy3-conjugated goat antirabbit IgG (Amersham Biosciences, UK) for Iba1 and Ki67, and Alexa Fluor 488-conjugated goat antirat IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) for the other primary antibodies. Sections were stained with Hoechst 33342 (Sigma) to label cell nuclei, washed, and mounted with Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, AL).

Some sections were double-labeled with Iba1 and another antibody (F4/80, anti-CD45, or anti-CD68), by incubating with mixtures of the two primary and two secondary antibodies at the same concentrations and similar times as for single immunolabelings.

The extravidin-biotin peroxidase technique was used in some sections for visualizing the label. Endogenous peroxidase activity was eliminated from these sections by incubating them with 0.3% hydrogen peroxide before their incubation with the primary antibody. After treatment with the corresponding biotinylated secondary antibody (either biotin-conjugated antirabbit IgG or biotin-conjugated antirat IgG, both from Sigma), sections were incubated with extravidin-peroxidase complex (Sigma) for

1 hour at room temperature. The presence of peroxidase was revealed by incubation with a diaminobenzidine solution, either with or without nickel enhancement. Finally, sections were counterstained with either hematoxylin or methyl green and coverslipped with DePeX (DHB, Poole, UK).

### Lectin histochemistry and TUNEL staining

Some cryostat and paraffin sections were treated with tomato lectin (TL) histochemistry, which labels microglial cells within the CNS of rodents (Acarin et al., 1994). Cryostat sections were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in 0.05 M Tris-buffered saline (TBS, pH 7.2) for 10 minutes, while paraffin sections were dewaxed in xylol. They were then incubated with biotin-conjugated TL (Sigma) diluted 1:10 in TBS with 0.1% Triton X-100 for 2 hours at 37°C. Sections were then washed in TBS without Triton and incubated in avidin complex conjugated with peroxidase, fluorescein isothiocyanate, or tetramethylrhodamine isothiocyanate (all three from Sigma) for 1 hour at room temperature. Peroxidase-labeled sections were developed with diaminobenzidine, counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted in DePeX. Fluorescence-labeled sections were mounted with Fluoromount G (Southern Biotech) after nuclear staining with Hoechst 33342 (Sigma).

Some sections were double-labeled with TL and either Iba1 or Ki67 antibodies. In these preparations, Iba1 or Ki67 immunolabeling was performed first followed by TL histochemistry as described above.

To investigate the possible incidence of cell death in microglial cells, some sections were double-labeled using TL and the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling (TUNEL) technique. In these cases the TL histochemistry (see above) was performed before extensive washing in PBS and sections were subsequently incubated in a solution containing 2% of TdT (Promega, Madison, WI) in TdT buffer (Promega, pH 6.8) and 0.03% of tetramethylrhodamine-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 1 hour at 37°C. After incubation, sections were washed with PBS, stained with nuclear dye Hoechst 33342 (Sigma), and mounted using Fluoromount G (Southern Biotech).

### Microscopy and cell counting

Fluorescence- and peroxidase-labeled sections were observed under an AxioPhot microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), and micrographs were obtained with an Axio-Cam digital camera (Zeiss). Confocal microscope pictures were obtained using a Leitz DMRB microscope equipped with a Leica TCS-SP5 scanning laser confocal imaging system (Leica). In confocal microscopy studies stacks of horizontal (xy) optical sections of selected fields in retinal sections were collected at 0.5–1- $\mu$ m intervals through the z-dimension. Leica confocal software was used to superimpose optical sections from each microscopic field onto projection images of microglial cells contained in the field. The images obtained using normal or confocal microscopy were stored in TIFF format and prepared digitally in Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) by adjusting contrast and brightness.

Drawings of some retinas from peroxidase-labeled sections were made using a camera lucida attachment. Location of microglial cells within the retina were marked on these drawings. In order to obtain complete images of



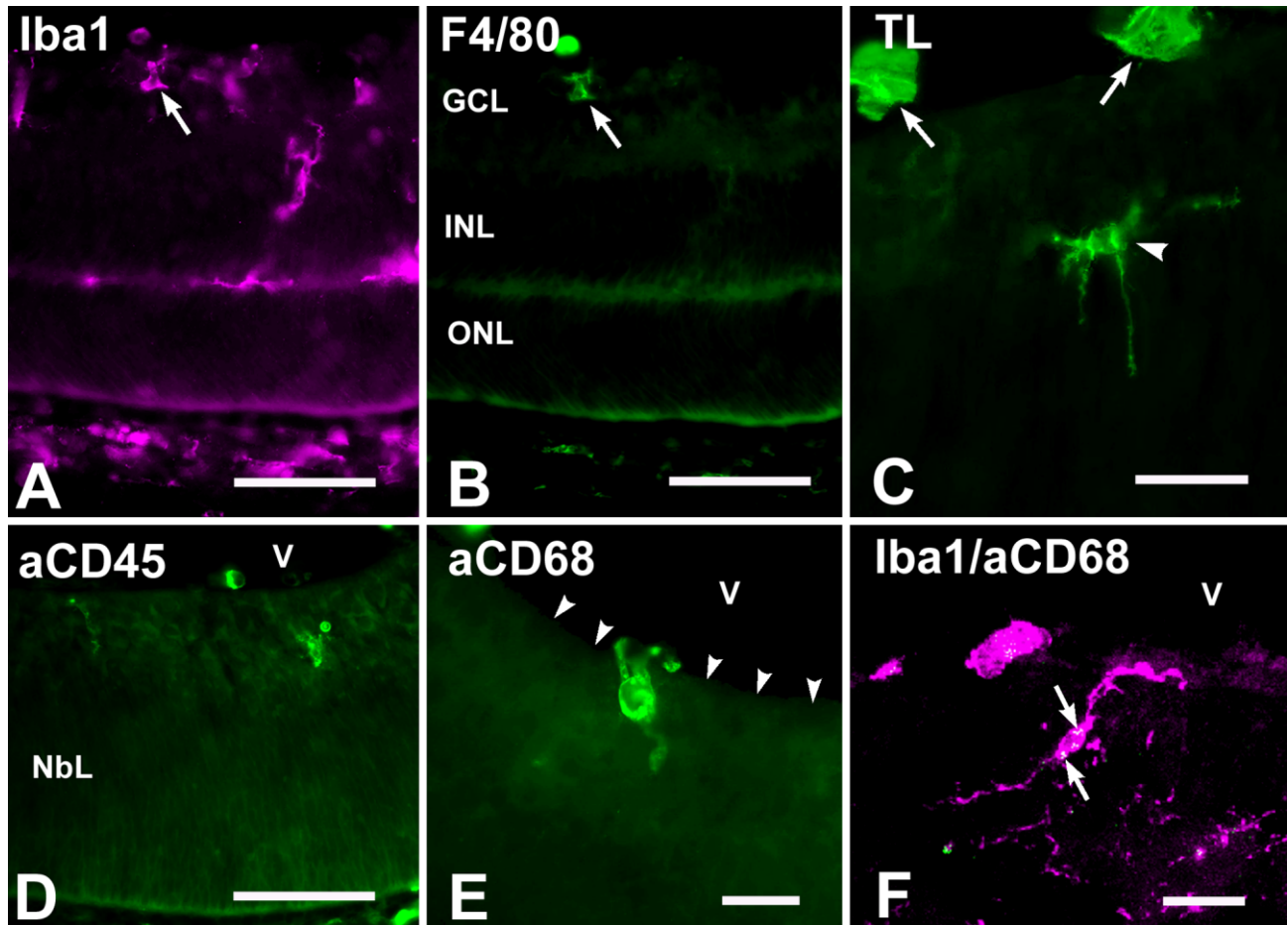


Fig. 1. Labeling of macrophage/microglial cells in developing mouse retinas by immunocytochemistry with different antibodies (A,B, D–F) and tomato lectin (TL) histochemistry (C). **A,B:** Double immunocytochemical labeling of a P7 retina section with antibodies Iba1 (magenta) and F4/80 (green). Numerous microglial cells are immunolabeled with Iba1 antibody, whereas only some of them (arrow) show F4/80 labeling. **C:** Histochemical labeling with TL of a microglia cell (arrowhead) in an E17.5 retina; arrows indicate labeled blood vessels in the vitreous. **D:** Very few microglial cells are labeled with antiCD45 antibody in an E18.5 retina, although Iba1 antibody

revealed the presence of more microglial cells (not shown, but see Fig. 4A for Iba1 immunostaining of a retina of similar age). **E:** A microglial cell is strongly labeled with antiCD68 antibody and appears to be in the act of traversing the inner limiting membrane (arrowheads) in a P0 retina. **F:** Confocal microscope image of a microglial cell double-immunolabeled with Iba1 (magenta) and antiCD68 (green) antibodies in a P21 retina. AntiCD68 labeling is reduced to a few spots (arrows) reminiscent of lysosomes within the cell body. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; V, vitreous; NbL, neuroblastic layer. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$  in A–E; 35  $\mu\text{m}$  in F.

some peroxidase-labeled cells, pictures taken at different levels of focus were combined by using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD) supplied with the “Extended depth of field” plug-in created at the Swiss Federal Institute de Technology Lausanne (EPFL, Lausanne, Switzerland).

Microglial cells were counted in retinas from embryonic (E17.5 and E18.5) and postnatal (P0–P28) mice. Cell bodies displaying Iba1 immunoreactivity were counted in 20- $\mu\text{m}$ -thick cryostat transverse retinal sections comprising both central and peripheral areas of the retina. Cells were only counted in every second section to avoid any double counting. At least four retinas from at least three animals were counted at each stage, and six different sections were counted in each retina. ImageJ (NIH) was used to measure the retinal surface in sections in order to estimate the density of Iba1-positive cells (number of labeled cells per  $\mu\text{m}^2$ ) at each developmental age.

## RESULTS

### Differences in microglial labeling among the markers

We used different microglial markers in an attempt to label all microglial cells in our preparations. The Iba1 antibody appeared to be the most reliable marker of microglia during development and adulthood (Fig. 1A). Therefore, our study mainly relied on observations made from material immunostained with this antibody. No apparent differences in Iba1 labeling were observed between paraformaldehyde- and PLP-fixed retinas, whereas no labeling was detected after Bouin fixation.

The present findings for F4/80 antibody did not reproduce previously published studies, in which all microglial cells were apparently marked by this antibody throughout the brain and retina (Hume et al., 1983; Lawson et al., 1990) In our study, F4/80 labeling was similar to Iba1

labeling during the initial embryonic stages considered here (see Fig. 2) but then decreased. The decrease in F4/80 immunolabeling was seen in retinas fixed with any of the fixatives (Bouin's fluid, paraformaldehyde, or PLP). In late embryonic and postnatal retinas, F4/80 antibody recognized ameboid microglia but did not mark ramified cells, which were strongly labeled with Iba1 (compare Fig. 1A,B). A recent report (Hughes et al., 2003) described extensive labeling of retinal microglia with this antibody after fixation by perfusion. Although we have no definitive explanation for this discrepancy, it may be attributable to our use of fixation by immersion.

TL staining (Fig. 1C) gave comparable results to those obtained with Iba1 in embryonic and P0–10 retinas. The TL labeling of microglial cells decreased after P10, when blood vessels, also labeled by TL, invaded the retina. This made it difficult to determine whether specific labeling profiles corresponded to microglial cells. Therefore, TL proved to be a useful marker of microglial cells until P10 but gave inconclusive results at later ages.

Anti-CD45 antibody strongly labeled the macrophage/microglial cells present in the retina of E11.5–12.5 embryos but gave a weak labeling thereafter (Fig. 1D), despite the fact that strongly labeled cells continued to be seen in mesenchymal tissues surrounding the eye. PLP fixation improved the intensity of CD45 immunostaining.

Microglial labeling with anti-CD68 antibody frequently showed a dotted staining, as expected for a marker that recognizes a lysosomal component. This antibody strongly marked cells within the retina of E11.5–12.5 embryos and cells close to the vitreal border until the end of the first postnatal week (Fig. 1E). As development advanced, expression of the antigen recognized by this antibody appeared to be downregulated in cells localized at some distance from the vitreal border, and CD68 labeling was usually reduced to a few spots within the body of retinal microglial cells (Fig. 1F). This finding contrasted with the presence of strong immunolabeled cells outside the retina. PLP fixation improved the intensity of anti-CD68 immunostaining, as also found with anti-CD45.

### Distribution of macrophage/microglial cells during embryonic development

Cells labeled with macrophage/microglial markers were already present in E11.5 retinas, mainly in their central regions (Fig. 2A), and they increased in number at E12.5 (Fig. 2B,C). Labeled cells were also present within the vitreous, both outside and inside blood vessels. Many labeled cells within the retina were macrophage-like cells, showing a rounded shape and frequently apoptotic bodies in their cytoplasm (Fig. 2D). At E12.5, macrophage-like cells were also seen at the peripheral retina (Fig. 2E). Rounded labeled cells containing cell debris were no longer present in the retina from E13.5 on, although labeled cells with ameboid profile or incipient ramification increased in number and became distributed throughout the retina between E13.5 and E15.5 (Figs. 2F–H, 3A).

From E16.5 on the GCL became segregated from the neuroblastic layer (NbL), and the IPL anlage appeared. Iba1-labeled cells were present in the IPL shortly after its emergence (Fig. 3B). Labeled cells were also present in the GCL and NbL (Figs. 3B, 4A). Iba1-labeled cells in the IPL and NbL of retinas at late embryonic development were poorly ramified cells, with a cell body and some broad processes emerging in different directions. Hence, their

morphological features were very different from those of labeled cells in E11.5–12.5 retinas. In late embryonic retinas some Iba1-labeled cells were localized near or across the vitreal border of the retina (Fig. 3C), suggesting that they passed from the vitreous, where numerous labeled cells were seen, to the retinal parenchyma.

At the end of embryonic development, therefore, microglial cells were located in the NFL, GCL, IPL, and NbL (Fig. 4A).

### Distribution of microglial cells during postnatal development

Many fewer microglial cells were present in P0 retinas than in retinas at the end of embryonic development (compare Fig. 4B with 4A). This was confirmed by determining the density of microglial (Iba1-positive) cells in the retina at different developmental stages. Microglial cell density in the mouse retina was reduced by around half between E18.5 and P0, although it increased again during the first postnatal week (Fig. 5A).

In order to determine whether the decrease in microglial cell density observed at birth was due to the death of microglial cells, we double-stained some sections from E18.5 embryos and P0 animals with TL, a microglial marker, and TUNEL, which labels degenerating cells. Although some TL-positive processes were apparently directed toward TUNEL-positive cell fragments, no microglial cell with TUNEL-positive nucleus was detected (Fig. 5B,C), suggesting that cell death does not decisively contribute to the perinatal decrease in the density of retinal microglia.

Numerous labeled cells were present at P0 in the NFL, GCL, and IPL, whereas very few labeled cells were observed in the NbL (Figs. 4B, 6A,B). This made it easier to monitor the migration of microglia from vitreal to scleral layers during subsequent development of the retina. Some microglial cells were located close to the vitreal border and others were seen across this border (Fig. 6C), suggesting that they were entering the retina from the vitreous. Many microglial cells at P0 were poorly ramified, with thick processes emerging from the cell body (Fig. 6A,B).

A clear change in the distribution of microglial cells was observed at P3 (Fig. 7A), with many Iba1-positive cells in the vitreal half of the NbL where almost none had been observed at P0. Labeled cells continued to be seen close to the vitreal border, as described at P0. Because microglial cell density increased during the first postnatal week, some sections of P0–7 retinas were double-labeled with TL and Ki67 (cell proliferation marker) to determine whether extensive proliferation of microglial cells occurs at this developmental time. In addition to labeling proliferating cells in the NbL of the retina, Ki67 also labeled endothelial cells and cells located outside the retina; however, no Ki67 labeling of microglial cell nuclei was found, indicating that retinal microglial cells were not proliferating (Fig. 5D,E).

At P7 the OPL became detectable within the NbL in central regions of the retina, allowing us to distinguish outer and inner nuclear layers. In regions with a well-defined ONL, microglial cells did not enter this layer but were localized throughout the other retinal layers (Fig. 7B). In contrast, microglial cells were observed in areas corresponding to the future ONL in retinal regions where the OPL had not differentiated (Fig. 7C). Far fewer labeled cells apparently penetrating the retina from the vitreous were observed at P7



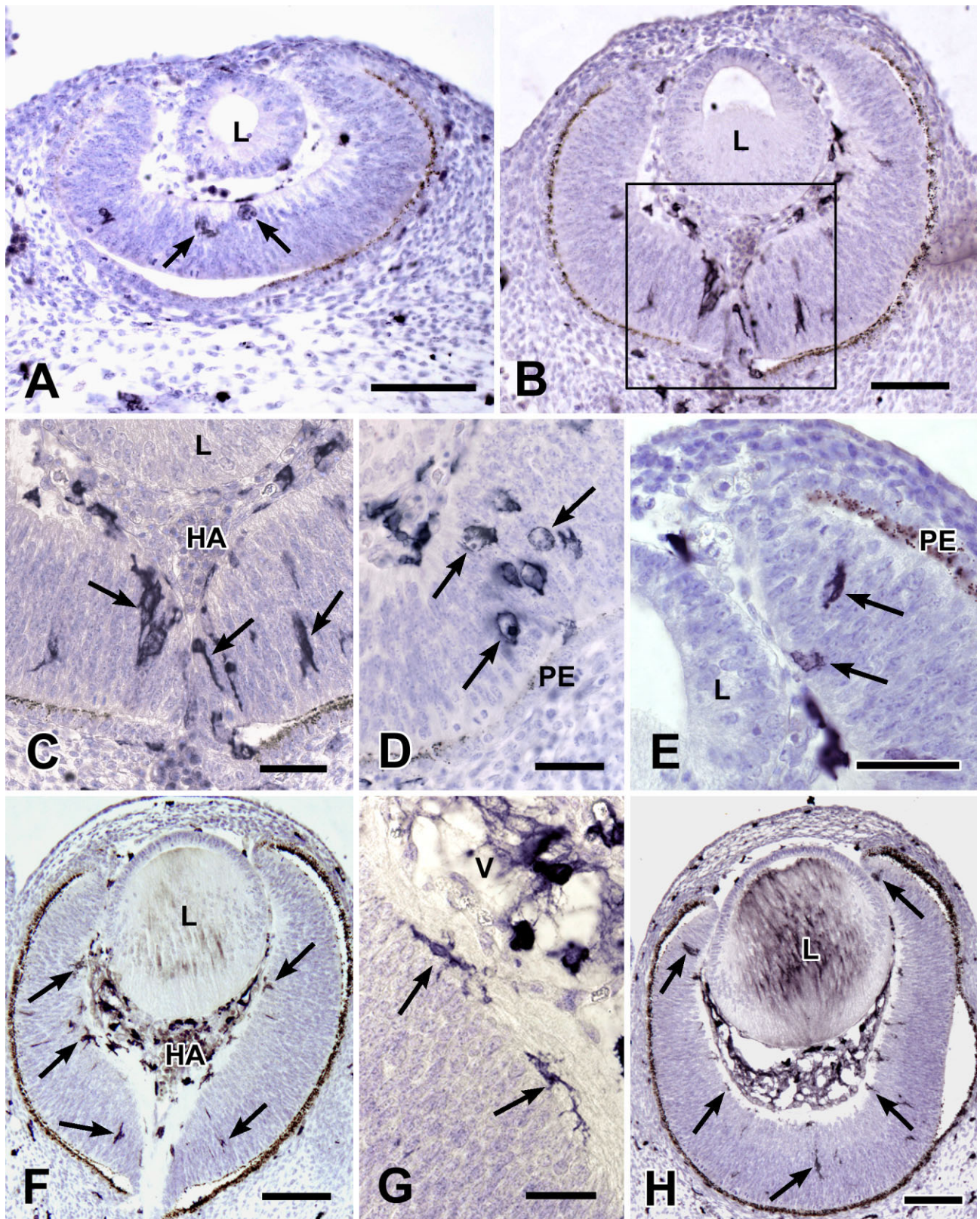


Fig. 2. F4/80 immunolabeling visualized with peroxidase in sections of E11.5–14.5 mouse retinas. **A:** Macrophage-like cells (arrows) in the central region of an E11.5 retina. **B:** F4/80 immunopositive cells in an E12.5 retina; the boxed area is shown at higher magnification in C. **C:** Region of the optic disk (boxed area in B) of an E12.5 retina, showing numerous F4/80-immunopositive macrophage/microglial cells (arrows). **D:** Rounded F4/80-immunopositive cells containing pyknotic bodies (some marked by arrows) in an E12.5 retina. **E:** F4/

80-immunopositive cells (arrows) in the peripheral area of an E12.5 retina. **F:** F4/80-immunopositive cells (arrows) in central and peripheral areas of an E13.5 retina. **G:** Two immunolabeled cells (arrows) with ramified morphology located near the optic disk of an E13.5 retina. **H:** General view of an E14.5 eye showing F4/80-immunolabeled cells (some marked by arrows) throughout the retina. HA, hyaloid artery; L, lens primordium; PE, pigment epithelium; V, vitreous. Scale bars = 100  $\mu$ m in A,B,F,H; 30  $\mu$ m in C,D,G; 20  $\mu$ m in E.



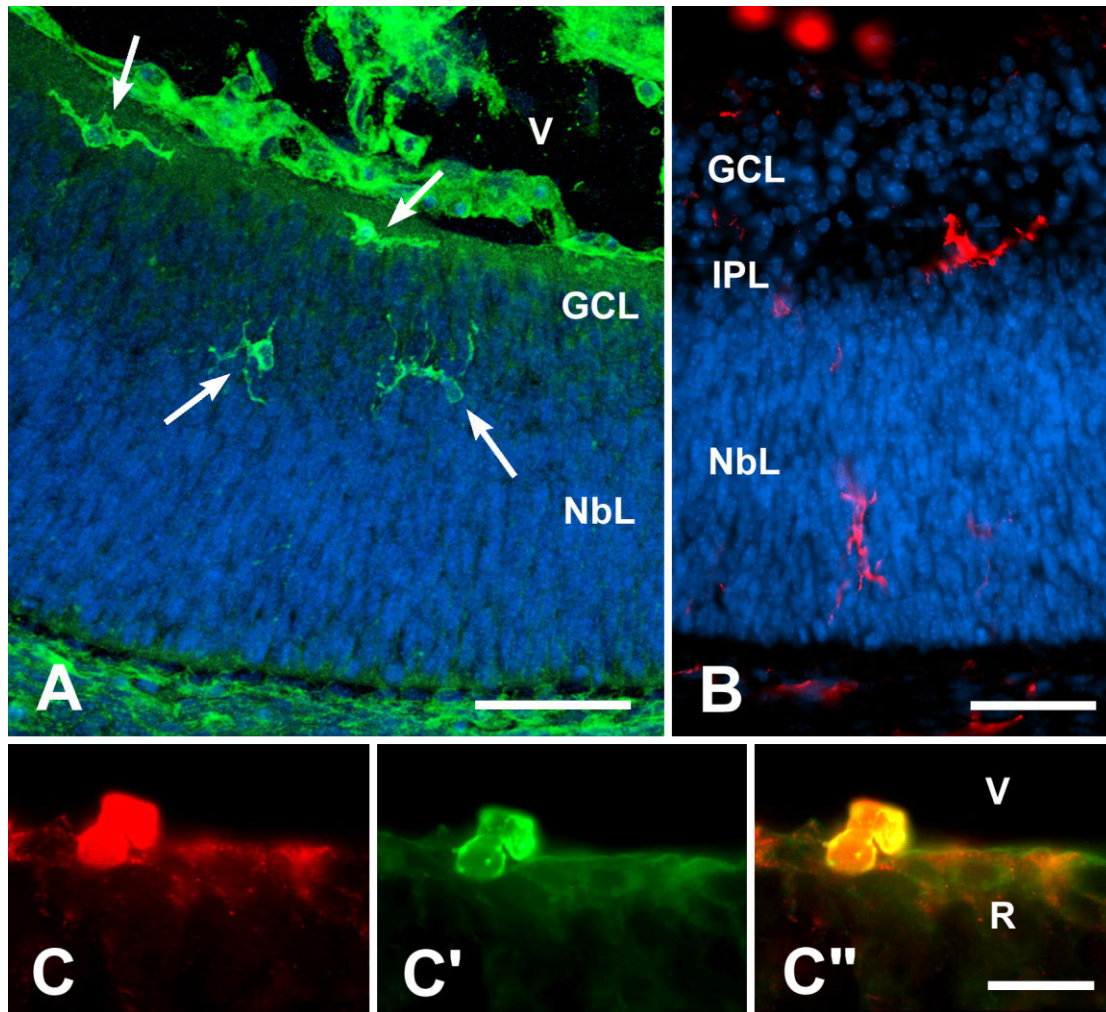


Fig. 3. Macrophage/microglial cells in mouse retinas at late embryonic development. **A:** Tomato lectin histochemical staining (green) of an E15.5 retina showing labeled microglial cells (arrows). Cell nuclei (blue) are stained with Hoechst. Hyaloid blood vessels within the vitreous (V) are also labeled. **B:** Iba1-immunopositive cells (red) in an E17.5 retina. Cell nuclei (blue) are stained with Hoechst. **C–C'':** A

double-labeled cell with iba1 antibody (C, red) and tomato lectin (C', green) (C'': merged, yellow-orange indicates double-stained structures) apparently traversing the border between retina (R) and vitreous (V) of an E18.5 eye. NbL, neuroblastic layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars = 50  $\mu$ m in A,B; 20  $\mu$ m in C–C''.

than at P0 or P3, and virtually no microglial cells were seen across the vitreal border of the retina after P7. Microglial cell ramification progressively increased during the first postnatal week (Fig. 7A–C).

At the beginning of the second postnatal week the OPL could be distinguished in almost the entire retina. Microglial cells continued to be seen in the NFL, GCL, IPL, and INL. In general, microglial cells were frequently ramified in plexiform layers, whereas they were more compact in the INL and GCL. Thus, many microglial cells in the INL were radially oriented compact cells with processes reaching the IPL, where they ramified.

At the end of the second postnatal week all retinal layers were clearly demarcated throughout the retina and their general organization was similar to that seen in adult retinas. After the emergence of all retinal layers, microglial cells continued to be excluded from the ONL. In contrast, microglial cells were frequent in the contiguous

OPL (Fig. 7D), where they had a ramified morphology, with most of their thin processes contained within the narrow limits of this layer. Microglial cells continued to be observed in the NFL, GCL, IPL, and INL, as described.

No modifications of the distribution pattern described at the end of the second postnatal week were observed during the following 2 weeks (P21 and P28 retinas). Usually, microglial cells in the plexiform layers of these retinas had an elaborated ramification pattern (Fig. 7E), with thin processes that sometimes entered the INL (Fig. 7F).

Microglial cells had a similar distribution in the adult retina to that described in retinas from P14 on. Thus, Iba1-positive microglial cells were located in the NFL, GCL, IPL, INL, and OPL (Fig. 8A). Most microglial cells showed an extensive ramification (Fig. 8B). As reported during postnatal development, no microglial cell bodies were observed within the ONL.



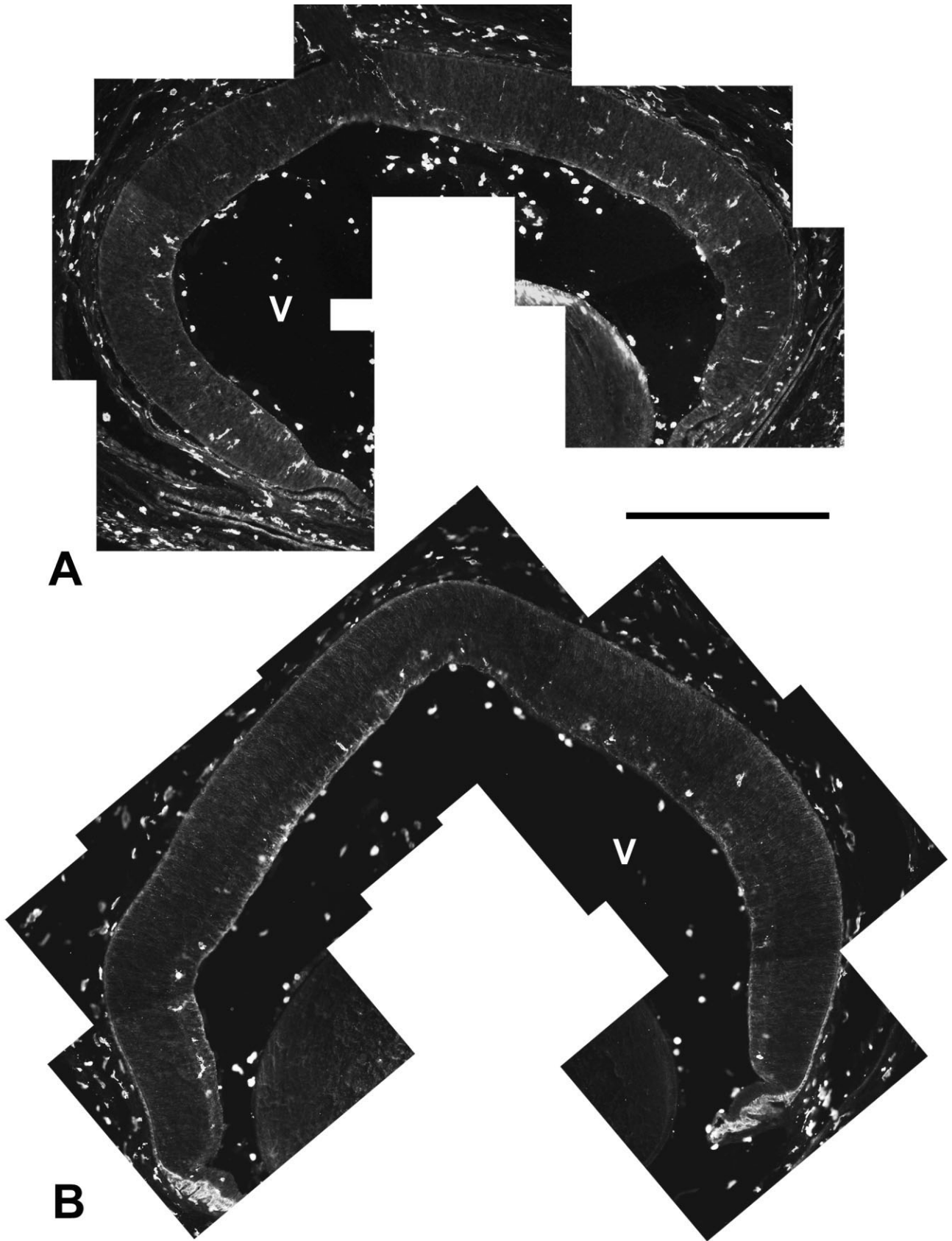
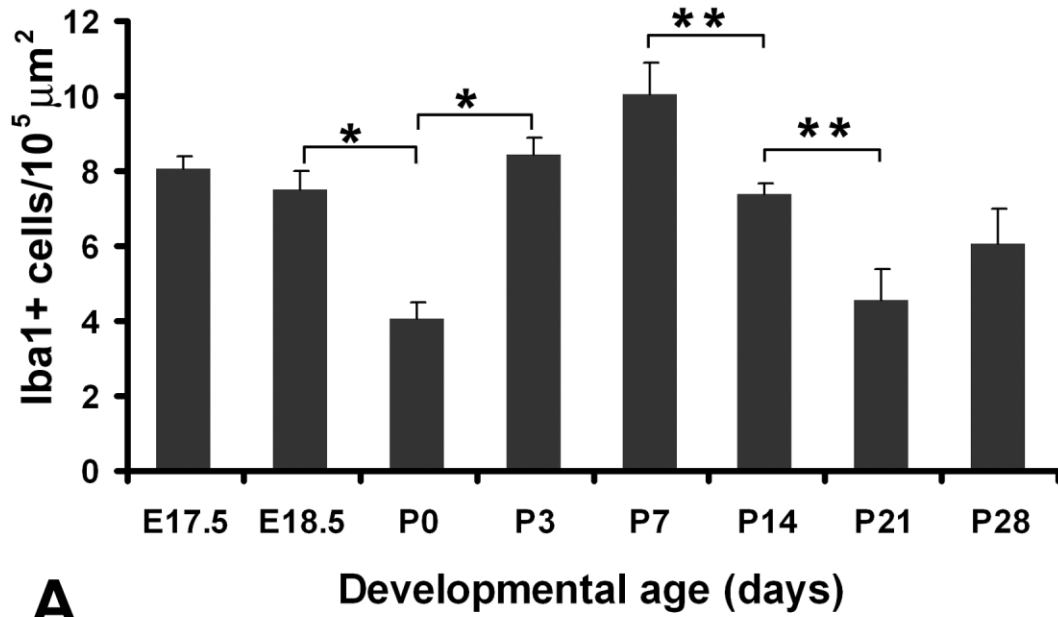


Fig. 4. Iba1-immunostained transverse sections of E17.5 (A) and P0 (B) mouse retinas showing the distribution of Iba1-positive macrophage/microglial cells in late embryonic and newborn retinas. Both sections were made with a temporal-to-nasal orientation at

approximately the same level of the retina. Numerous labeled cells are seen in the E17.5 retina (A), whereas only a few are present at P0 (B). V, vitreous. Scale bar = 200  $\mu$ m.

**A**

Developmental age (days)

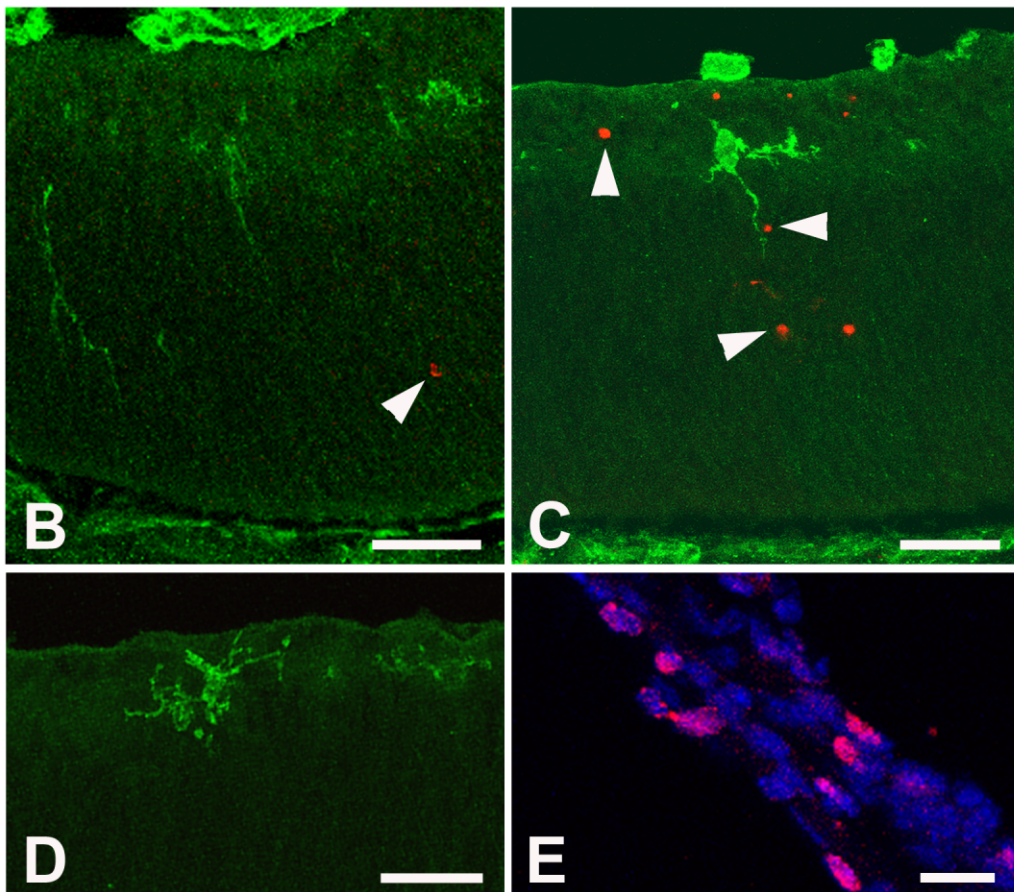
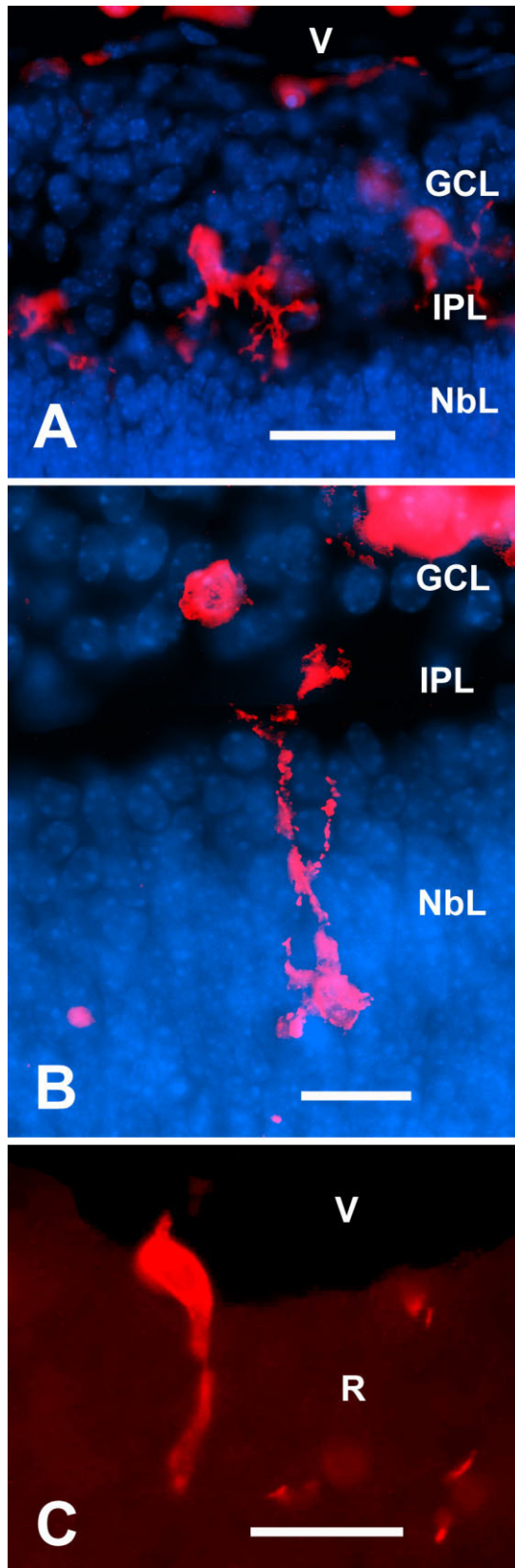


Fig. 5. Changes in microglial cell density during retinal development. **A:** Densities of Iba1-positive cells in the retina of mice at different embryonic and postnatal ages. Data are presented as means  $\pm$  SEM of values obtained in at least four retinas at each age. Asterisks depict statistically significant differences between data from different stages (Student's *t*-test, \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ ). **B,C:** TL (green) and TUNEL (red) double-labeled sections from E18.5 (B) and

P0 (C) retinas. TL-labeled microglial cells do not show TUNEL-positive nucleus; arrowheads point out some TUNEL-positive bodies. **D,E:** Ki67 (red) labeled sections from P3 retina (D) and sclera (E). TL-positive microglial cells (green) do not show Ki67 staining in the retina (D), whereas some nuclei are Ki67-positive in the sclera, used as positive control. Cell nuclei are stained in E with Hoechst 33342. Scale bars = 30  $\mu$ m.



In summary, the mature pattern of microglial cell distribution in the mouse retina (as seen at adulthood) appeared to be attained during development at the same time as the mature layer organization of the retina, i.e., immediately after the emergence of the OPL during the second postnatal week. However, microglial cell density peaked at P7 and was significantly lower at P14 and P21 (Fig. 5). This may be explained by an increasing “dilution” of microglial cells within the retina due to progressive retinal growth combined with a stabilization of their number after entry of microglial precursors at the vitreal border ceased. The distribution of microglial cell bodies in the retina during postnatal development and adulthood is summarized in Figure 9. It can be seen that microglial cells appear only in the NFL/GCL region of the retina at P0, whereas they are present in the IPL and NbL at P3 and in the INL at P7. This distribution pattern suggests a radial migration from vitreal to deeper layers of the retina. It is noteworthy that some microglial cell bodies are present in the INL not only during developmental stages but also in the adult retina.

#### Differences in microglial distribution in the retina of pigmented and albino mouse retinas

The embryonic and postnatal development of retinal microglia described above was studied in pigmented mice. However, no evident differences could be observed between the distribution of microglia in the retina of pigmented (C57BL/6) and albino (BALB/c) mice, either during development or at adulthood (Fig. 10). Therefore, the changes in microglial distribution pattern during retina development reported above apply to both strains of mice.

#### DISCUSSION

The use of different microglial markers allows us to claim that most or even all retinal microglial cells were considered in our study, offering a complete view of the distribution of these cells in the developing and adult mouse retina.

#### Entry of macrophage/microglial cells into the retina

Macrophage/microglial cells are already present within the mouse retina at E11.5, the earliest stage studied here. Their morphological features and distribution are similar to those previously described during early embryonic development of rat (Ashwell et al., 1989) and avian (Cuadros et al., 1991) retinas. These cells seem to proceed from the vitreous and enter the neuroepithelium by traversing the vitreal surface of the retina, since numerous labeled cells are seen within the vitreous near the retinal region, which contains macrophage/microglial cells.

Fig. 6. Iba1-positive cells (red) in P0 mouse retinas. Retinal layers are distinguished in A and B by staining of cell nuclei with Hoechst (blue). **A:** Labeled cells within the developing ganglion cell layer (GCL) with processes reaching the immature inner plexiform layer (IPL). **B:** Immunolabeled cell with its soma located in the neuroblastic layer (NbL), from which a process emerges and reaches the IPL. **C:** Iba1-positive cell apparently traversing the border between the retina (R) and vitreous (V). Scale bars = 30  $\mu$ m.



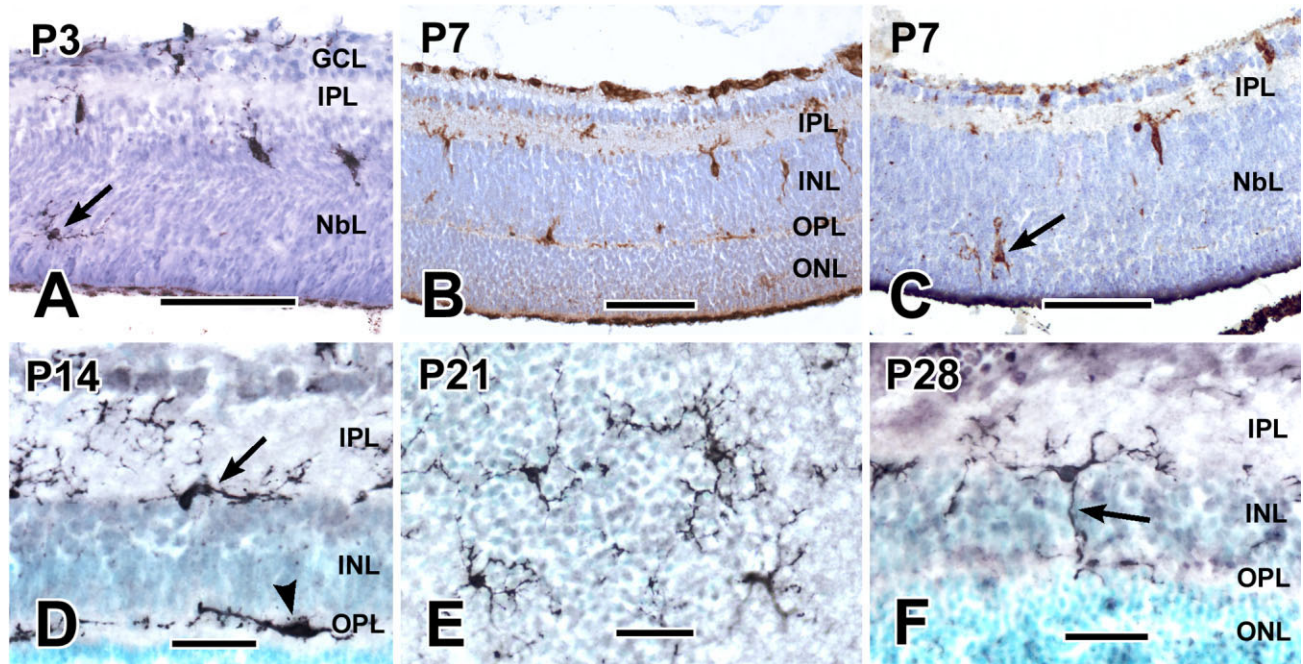


Fig. 7. Distribution of microglial cells in mouse retinas of different postnatal ages labeled with Iba1 immunostaining (A,D–F) or tomato lectin histochemistry (B,C). The label is visualized with peroxidase. **A:** Central part of a P3 retina showing Iba1-positive cells in neuroblastic layer (NbL) and ganglion cell layer (GCL). A labeled cell (arrow) is located in the region to be occupied by the future outer plexiform layer (OPL). IPL, inner plexiform layer. **B:** Central part of a P7 retina. A thin OPL containing microglial cells is discernible between the inner nuclear layer (INL) and outer nuclear layer (ONL). Abundant labeled cells are present in the INL, whereas no microglial cells are observed in the ONL, although labeling of some extracellular material can be seen in this layer. **C:** Peripheral region of the same P7 retina shown in B. The neu-

roblastic layer (NbL) contains labeled microglial cells, one of which (arrow) is seen in the region to be occupied by the still-undefined ONL. **D:** P14 retina. Iba1-labeled microglial cells show a well-ramified shape with most of their processes oriented horizontally. A microglial cell (arrow) is located in the border between the IPL and INL, whereas another (arrowhead) is contained in the OPL. **E:** P21 retina. Iba-1 labeled ramified microglial cells in a horizontal section at the level of the border between the IPL and INL. **F:** P28 retina. Iba-1-immunolabeled microglial cell showing its soma and two of its processes in the border between the IPL and INL, whereas another process (arrow) traverses the inner nuclear layer and reaches the OPL, where it ramifies. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$  in A; 50  $\mu\text{m}$  in B,C; 30  $\mu\text{m}$  in D–F.

The amount of microglial cells within the retina increases from E12.5 until the end of embryonic development. During this period, labeled cells are observed close to the vitreal surface, apparently entering the retina. Microglial cells can also be seen in peripheral areas of mouse retina near the ciliary margin from E12.5 on. These observations suggest that microglial cells enter the embryonic retina via two routes: by crossing the vitreal surface of the retina and by migration from nonneural ciliary regions after crossing the peripheral margin of the retina. Entry of microglial cells across the ciliary margin has also been described in human and quail retinas (Diaz-Araya et al., 1995a; Provis et al., 1996; Marín-Teva et al., 1999b). Microglial cell entry by either route would contribute to increasing the number of microglial cells observed during embryonic development.

The density of microglial cells decreases at birth, raising questions about the fate of some of the microglial cells observed at the end of embryonic development. It can be suggested that the decrease in density may be a consequence of the increase in size of the early postnatal retina. Nevertheless, there are evident differences in the distribution of labeled cells between embryonic and postnatal retinas (see Fig. 4). Thus, far fewer microglial cells are present in the NbL of the newborn mouse retina than

before birth. Therefore, microglial density appears to decrease not only because of the growth of retinal tissue but also as a consequence of the disappearance of some labeled cells. A similar decrease in microglial density at perinatal ages has also been described in rats (Ashwell et al., 1989) and rabbits (Ashwell, 1989). One plausible explanation for this disappearance could be the death of microglial cells, but TUNEL results ruled out this possibility. In this context, one study reported the presence of rare degenerating microglial cells in some regions of the developing rat brain and the apparent absence of any dying microglia in others (Dalmau et al., 2003), supporting the low frequency of cell death in the developing CNS of rodents. Egress of microglial cells from the retina may be involved in the decrease of microglial cell density at P0.

An important finding of our study was the increase in density of microglial cells in mouse retina during the first postnatal week, peaking at the end of this week and decreasing thereafter. Similar results were described in rat retina (Ashwell et al., 1989). Since no extensive proliferation of microglial cells was observed during the first postnatal week, the increase in microglial cell density between P0 and P7 would be related to the entry of new microglial cells into the retina. An indication of the migration of abundant microglial cells into the retina is the observation

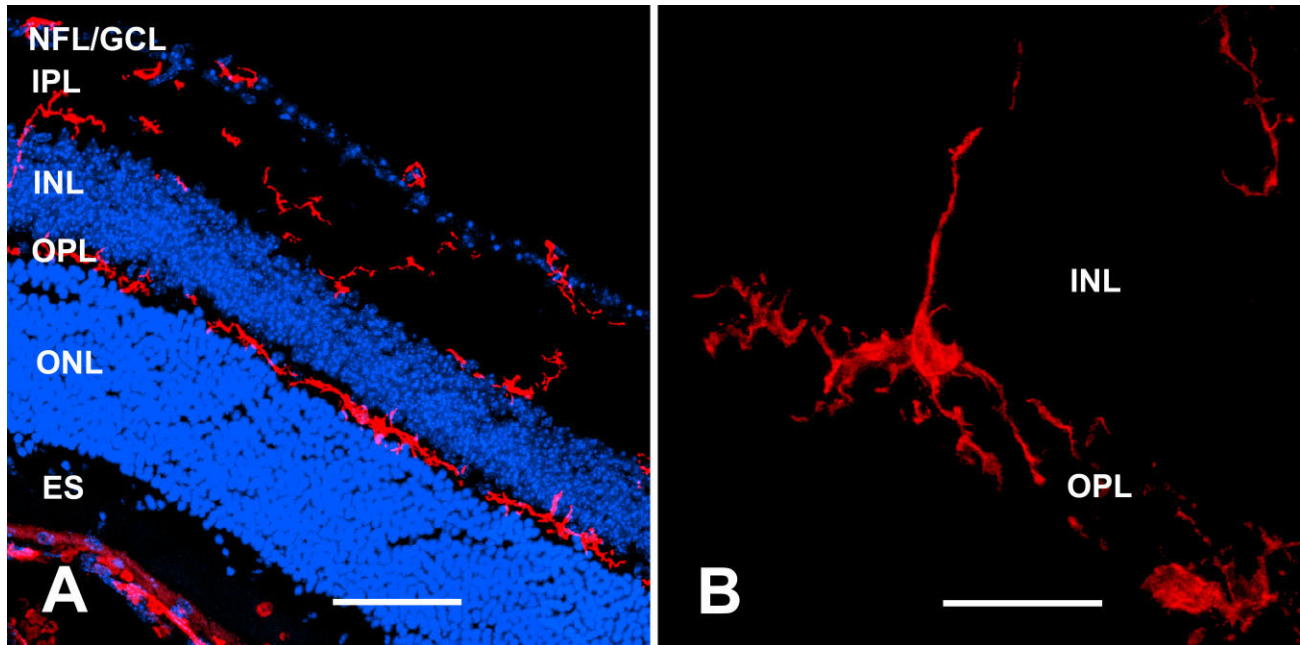


Fig. 8. Distribution of Iba1-immunolabeled microglia in adult (P60) retinas. **A:** Microglial cells are present in the nerve fiber layer/ganglion cell layer (NFL/GCL), inner plexiform layer (IPL), and outer plexiform layer (OPL) but not in the inner nuclear layer (INL) or outer

nuclear layer (ONL). Hoechst staining of all nuclei reveals the retinal layers. ES, external segments of photoreceptor cells. **B:** Ramified microglial cell with its soma and horizontal processes in the OPL. A vertical process is seen in the INL. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  in A; 20  $\mu\text{m}$  in B.

at P0–7 of numerous labeled cells apparently crossing the vitreal border. By contrast, only a few labeled cells are seen entering the retina from the vitreous at stages older than P7, and the entry of a small number of microglial cells would not compensate for the marked growth of retinal tissue at these stages, explaining the decrease in microglial density.

It was previously proposed that microglial cells enter the retina from blood vessels before formation of the blood–retinal barrier (Thanos et al., 1996) and are related to cell death (Hume et al., 1983). However, no correlation was found between microglial entry and vascularization of the developing mouse retina in the present investigation. In fact, microglial cells were observed within the retina before its invasion by blood vessels (see Dorrell and Friedlander, 2006, for a review on mouse retina vascularization), ruling out direct entry of these cells via the blood. In support of the present findings, a previous study of the avascular retina of quail showed that microglial precursors colonized the retinal parenchyma despite the absence of blood vessels (Navascués et al., 1995). Our observations suggest that many microglial precursors in the mouse retina enter from the vitreous, which might be colonized by these precursors from the numerous blood vessels of the transient hyaloid vasculature that regresses at around the end of the second postnatal week (Ito and Yoshioka, 1999).

With respect to the possible relationship of cell death with microglial entry into the retina, dying cells are not frequent in mouse retinas between E15 and P1 (Pequignot et al., 2003), ages at which new microglial cells were observed within the retina. The entry of microglial cells in absence of cell death suggests that the two processes are independent. At perinatal stages, when numerous cells

die in the mouse retina (Young, 1984), some microglial cells close to the vitreal border were in topographical relationship with dead cell fragments (not shown), but many others appeared to ignore dying cells in relatively close proximity.

#### Distribution pattern of retinal microglial cells during development and adulthood

Two different types of macrophage/microglial cells were found in the developing mouse retina. The first are macrophage-like cells present in the retina at E11.5 and E12.5, which appear to be related to cell death in the retinal region where optic axons exit to the optic nerve. The presence of cell death-related macrophage-like cells in the retina was previously described during the early development of mice (Rodríguez-Gallardo et al., 2005), other mammals (Knabe and Kuhn, 1999), and birds (Cuadros et al., 1991; Frade and Barde, 1998). From E12.5 on, other labeled cells that appear in the neural retina have a different morphology and no evident relationship with dead cell debris. It is therefore possible that two different waves of macrophage/microglial cells with distinct functional roles successively enter the retina during development, the first at E11.5–12.5 and the second from E12.5 on. This phenomenon is clearly seen in the quail retina, which contains macrophage-like cells between E3 and E5; these cells disappear at E6 before the retina is recolonized by cells that become microglia at E7 (Navascués et al., 1995). The distinction between two waves of invasion of the retina by macrophage-like cells and microglial precursors is more difficult to establish in mouse than in quail retina, since they appear to overlap in space and time, likely due to the smaller size of the mouse retina and its different development timetable. At any rate, the E13.5 retina con-

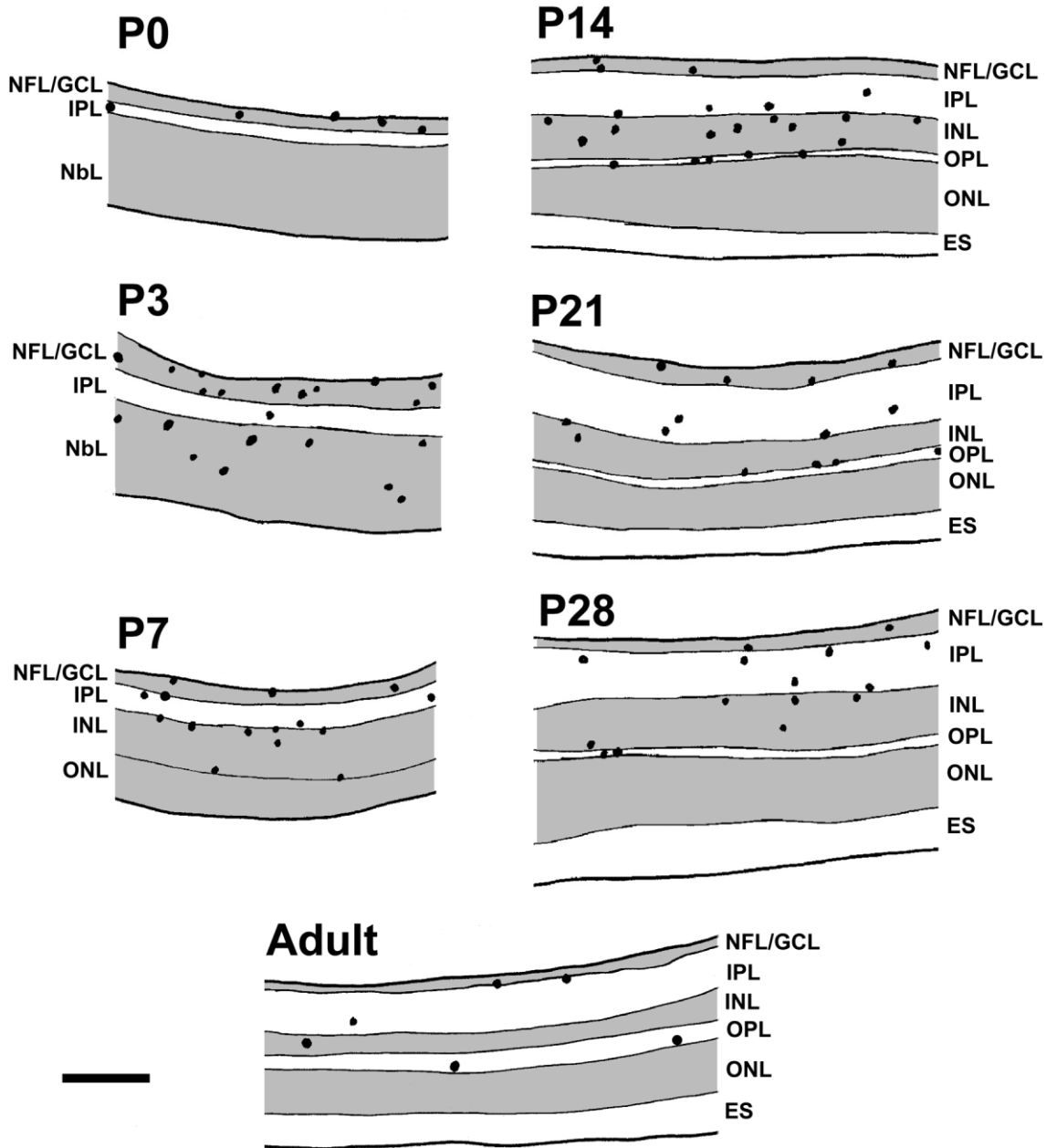


Fig. 9. Camera lucida drawings of Iba1-immunostained histological sections of mouse retinas at different ages from P0 to adulthood (indicated in each drawing) showing the location of microglial cell bodies (dots). Nuclear layers are shaded in gray. NFL/GCL, nerve

fiber layer and ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; ES, external segments of photoreceptors; NbL, neuroblastic layer. Scale bar = 100  $\mu$ m.

tains labeled cells that are probably microglial precursors, because their fate can be traced during development until the appearance of mature microglia.

Our results show that microglial cells are mainly restricted to vitreal layers immediately after birth but progressively appear at more scleral layers during the following days. Hence, it can be proposed that microglial cells move from vitreal toward scleral layers in a vitreal-to-scleral radial migration similar to that described in the developing quail retina (Navascués et al.,

1995; Sánchez-López et al., 2004). In this migration microglial cells, first located at the NFL/GCL after their entry into the retina, successively colonize the IPL, INL, and OPL but do not enter the ONL. Microglial cells would progressively leave the NFL/GCL during their radial migration, explaining their lower numbers in these layers after P14, although some persist in the NFL/GCL until adulthood.

In adult mouse retina microglial cells are localized in the NFL, GCL, IPL, OPL, and occasionally in the INL, but



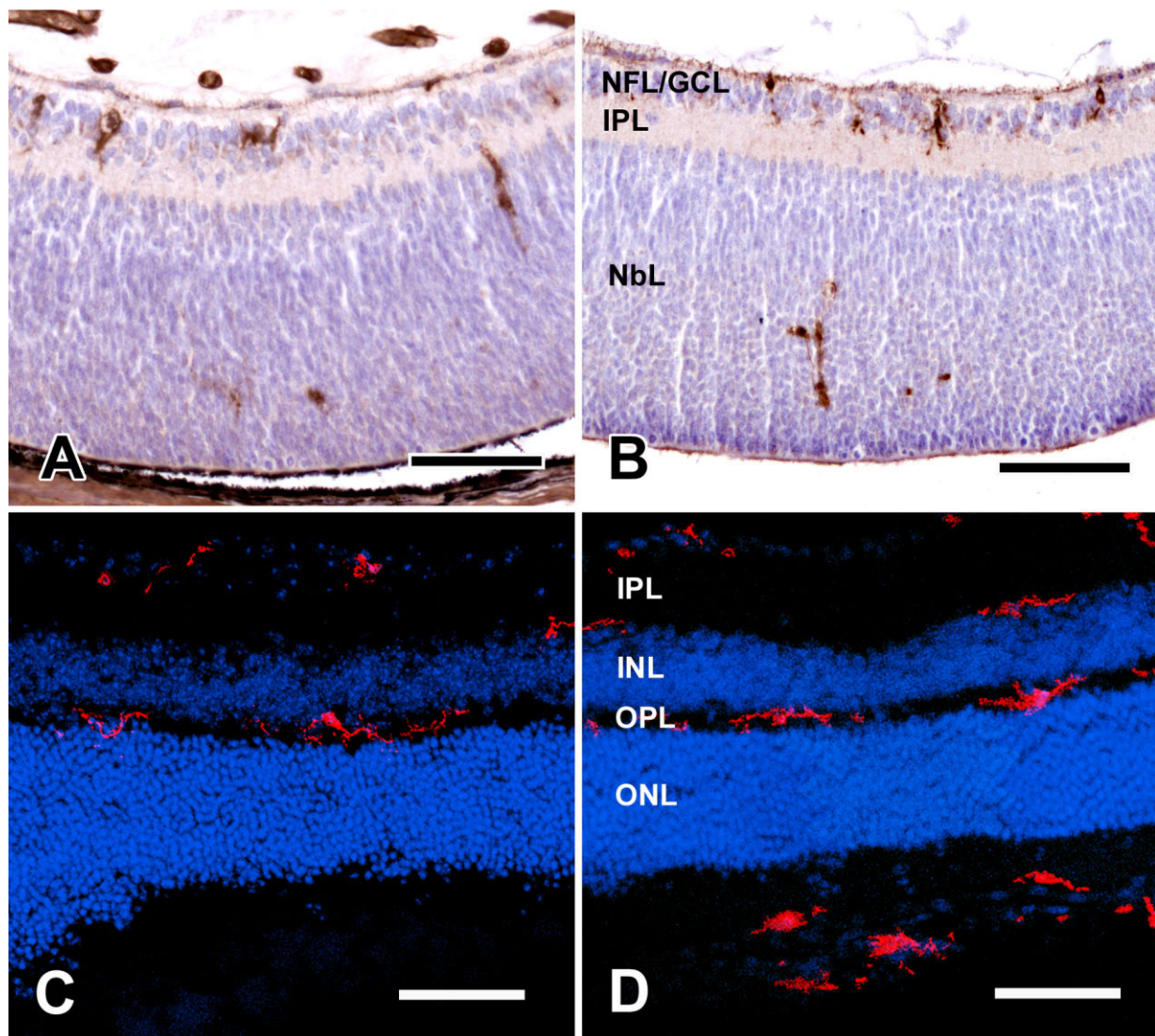


Fig. 10. Distribution of microglial cells in transverse sections of pigmented (C57BL/6 strain, A,C) and albino (BALB/c strain, B,D) retinas. **A,B**: Microglial cells stained with tomato lectin histochemistry revealed by immunoperoxidase in P3 retinas. **C,D**: Confocal images showing the distribution of microglial cells in adult (P60) retinas as revealed by Iba1 immunostaining (red); nuclear Hoechst stain

(blue) reveals the localization of retinal layers. Microglial distribution is similar in both strains during development (A,B) and at adulthood (C,D). NFL/GCL, nerve fiber layer and ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; NbL, neuroblastic layer. Scale bars = 75  $\mu$ m in A,B; 50  $\mu$ m in C,D.

no microglial cells are seen in the ONL, although some microglial processes can occasionally be observed in this layer. This distribution pattern is similar to previous reports on various species (Schnitzer, 1989; Navascués et al., 1994; Harada et al., 2002; Hughes et al., 2003). Although the presence of microglial cells in the OPL of some species has been debated (see Schnitzer, 1989), our results clearly demonstrate their presence in the OPL of the mouse retina, as reported in birds (Navascués et al., 1994; Sánchez-López et al., 2004) and rabbits (Schnitzer, 1989). We highlight the presence of some microglial cell bodies in the INL of the adult mouse retina, contrasting with descriptions in quail retina, in which microglial cells are

seen in the INL during development but not at adulthood (Navascués et al., 1994; Marín-Teva et al., 1999c).

Our results cannot confirm the existence of microglial cell tangential migration from the center toward the periphery in mouse retina beyond any reasonable doubt. The morphological features of microglial cells around the optic disc suggest that they move from the center to the periphery of the retina. Nevertheless, no microglial invasion front demarcating microglia-containing areas from microglia-free areas was seen at any stage of retinal development. Therefore, irrefutable evidence was not obtained of central-to-peripheral tangential migration of microglial cells, which has been demonstrated in birds

(Navascués et al., 1995; Marín-Teva et al., 1999c). Differences in microglial migration pattern between mammalian and avian retinas would not be surprising, given the marked differences in the vascularization pattern of the retina and vitreous between the two animal groups. Thus, in the avian eye, blood vessels are not present in the retina and the vitreous but are collected in a vascular organ, the pecten, which appears early in development and projects into the vitreous in the central region of the eye; microglial precursors migrate tangentially from this central region. By contrast, during development of the mouse eye hyaloid vessels are present in the vitreous close to the surface of the entire retina. The present study revealed that many macrophage-lineage cells localized among hyaloid vessels in the vitreous cross the vitreal border during the first postnatal week to become microglia in the retina. This entry of microglial precursors from the vitreous appears to take place at any point on the retinal surface; therefore, no migration from a specific region would be necessary for microglial precursors to colonize the entire retina.

Our study reveals no differences in the distribution pattern of microglial cells between pigmented (C57Bl/6) and albino (Balb/c) mouse retinas either during development or adulthood. Other authors reported that the number of macrophage/microglial cells appearing in the subretinal space differed between pigmented and nonpigmented strains of mice during the first postnatal week (Ng and Streilein, 2001). We cannot rule out that careful quantitative studies might reveal some differences in the number of microglial cells in the retina between albino and pigmented mice. Therefore, although the two strains of mouse can be indistinctly used for studies on the general distribution of microglial cells in the retina, further research is required to establish whether there are any differences in the number of microglial cells in the retinas of these strains.

The proposition that the topographical distribution of cell death contributes to shaping the distribution of microglia (Hume et al., 1983; Wong and Hughes, 1987) is not corroborated by the present observations, since no relationship could be established between the distribution of cell death (Pequignot et al., 2003) and that of microglial cells in mouse retina. Thus, these cells appear within the INL before extensive cell death occurs in this layer. Likewise, other authors reported that microglial cells migrated toward regions showing cell degeneration in pathological retinas (Thanos, 1992; Thanos et al., 1996; Gupta et al., 2003). Again, no relationship was found between the distribution of microglia and the development of blood vessels within the retina. Moreover, microglial cells are present in the avascular retina of birds (Navascués et al., 1995) and in regions of the rabbit retina that lack blood vessels (Schnitzer, 1989). In developing human retinas, establishment of microglial topography has been described as occurring in two phases, one that is independent from vascularization and a second associated with the development of retinal vessels (Diaz-Araya et al., 1995a). An alternative view has been suggested by a recent report that development of the retinal vasculature is dependent on the presence of microglial cells, since normal retinal vessels do not develop when the microglial cell population is depleted (Checchin et al., 2006).

The migration and distribution of microglial cells in the retina may be influenced by other factors. Thus, microglial cells in the developing quail retina migrate by adhering to

Müller cell processes (Marín-Teva et al., 1998; Sánchez-López et al., 2004), and the extracellular molecule tenascin appears to regulate microglial cell ramification (Sánchez-López et al., 2004). However, similar mechanisms have yet to be elucidated in the mouse retina.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Richard Davies for improving the English style of the article.

## LITERATURE CITED

- Acarin L, Vela JM, González B, Castellano B. 1994. Demonstration of poly-N acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* 42:1033–1041.
- Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36:165–179.
- Ashwell K. 1989. Development of microglia in the albino rabbit retina. *J Comp Neurol* 287:286–301.
- Ashwell KW, Hollander H, Streit W, Stone J. 1989. The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci* 2:437–448.
- Boycott BB, Hopkins JM. 1981. Microglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience* 6:679–688.
- Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. 2006. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3595–3602.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A. 2002. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 10:27–39.
- Cuadros MA, García-Martín M, Martín C, Ríos A. 1991. Hemopoietic phagocytes in the early differentiating avian retina. *J Anat* 177:145–158.
- Cuadros MA, Navascués J. 1998. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173–189.
- Cuadros MA, Martín 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, Santos AM, Martín-Oliva D, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J. 2006. Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in developing and mature chick central nervous system. *J Histochem Cytochem* 54:727–738.
- Da Silva RP, Gordon S. 1999. Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrophage mannose 6-phosphate receptor (CD68), a macrophage-specific endosomal protein. *Biochem J* 338:687–694.
- Dalmau I, Vela JM, González B, Finsen B, Castellano B. 2003. Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 458:144–157.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, Billson FA. 1995a. Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol* 363:53–68.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL. 1995b. Ontogeny and cellular expression of MHC and leukocyte antigens in human retina. *Glia* 15:458–470.
- Dorrell MI, Friedlander M. 2006. Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Prog Ret Eye Res* 25:277–295.
- Dowling AJ, Maggs A, Scholes J. 1991. Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS: immunohistochemical characterization using FL-1, an anti-macrophage monoclonal antibody. *Glia* 4:345–364.
- Frade JM, Barde YA. 1998. Microglial-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20:35–41.
- García-Valenzuela E, Sharma SC, Pina AL. 2005. Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Mol Vis* 11:225–231.
- 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.
- 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.
- 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 inter-



- actions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 22:9228–9236.
- Herbomel P, Thisse B, Thisse C. 2001. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol* 238:274–288.
- Hughes EH, Schlichtenbrede FC, Murphy CC, Sarra GM, Luthert PJ, Ali RR, Dick AD. 2003. Generation of activated sialoadhesin-positive microglia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2229–2234.
- Hume DA, Gordon S. 1983. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtglomerular complex. *J Exp Med* 157:1704–1709.
- Hume DA, Perry VH, Gordon S. 1983. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol* 97:253–257.
- Humphrey MF, Moore SR. 1996. Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. *Glia* 16:325–341.
- Ito M, Yoshioka M. 1999. Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. *Anat Embryol* 200:403–411.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. 1998. Microglia specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res* 57:1–9.
- Knabe W, Khun HJ. 1999. The earliest invasion of macrophages into the developing brain and eye of the tree shrew *Tupaia belangeri*. *Anat Embryol* 200:393–402.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312–318.
- 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.
- Mallat M, Marín-Teva JL, Cheret C. 2005. Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15:101–107.
- Marín-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascués J. 1998. Tangential migration of 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 amoeboid 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* 412:255–75.
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. 2001. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 101:249–255.
- Navascués J, Moujahid A, Quesada A, Cuadros MA. 1994. Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J Comp Neurol* 350:171–186.
- Navascués J, Moujahid A, Almendros A, 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.
- Ng TF, Streilein JW. 2001. Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:3301–3310.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314–1318.
- Penfold PL, Madigan MC, Provis JM. 1991. Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci* 7:383–388.
- Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. 2001. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Prog Ret Eye Res* 20:385–414.
- Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, Oliveira-dos Santos AJ. 2001. CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2:389–396.
- Pequignot MO, Provost AC, Salle 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.
- Provis JM, Penfold PE, Edwards AJ, Van Driel D. 1995. Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the *glia limitans*. *Glia* 14:243–256.
- Provis JM, Diaz CM, Penfold PL. 1996. Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect Dev Neurobiol* 3:213–222.
- Rodríguez-Gallardo L, Lineros-Domínguez MC, Francisco-Morcillo J, Martín-Partido G. 2005. Macrophages during retina and optic nerve development in the mouse embryo: relationship to cell death and optic fibres. *Anat Embryol* 210:303–316.
- Roque RR, 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.
- Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2000. Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol* 417:431–447.
- Sánchez-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 A, 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.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, 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. 1989. Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol* 282:249–263.
- Stoll G, Jander S. 1999. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58:233–247.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563–581.
- 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.
- Thanos S, Moore S, Hong YM. 1996. Retinal microglia. *Prog Ret Eye Res* 15:331–361.
- Vrabec FR. 1970. Microglia in the monkey and rabbit retina. *J Neuropathol Exp Neurol* 29:217–224.
- Won MH, Kang TC, Cho SS. 2000. Glial cells in the bird retina: immunohistochemical detection. *Microsc Res Tech* 50:151–160.
- Wong RO, Hughes A. 1987. Role of cell death in the topogenesis of neuronal distributions in the developing cat retinal ganglion cell layer. *J Comp Neurol* 262:496–511.
- Yamato S, Hirabayashi Y, Sugihara H. 1984. An improved procedure for the histochemical demonstration of cathepsin D by the mercury-labeled pepstatin method. *Stain Tech* 59:113–120.
- Yang P, Das PK, Kijlstra A. 2000. Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocul Immunol Inflamm* 8:149–157.
- Young RW. 1984. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 229:362–373.
- Zhang C, Lam TT, Tso MO. 2005a. Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Exp Eye Res* 81:700–709.
- Zhang C, Shen JK, Lam TT, Zeng HY, Chiang SK, Yang F, Tso MO. 2005b. Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis* 11:887–895.