

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



**Activación de la microglía inmadura y muerte  
neuronal durante el desarrollo de la retina de  
codorniz**

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

**TESIS DOCTORAL**

**Ana Sierra Martín**

Granada, 2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Ana Sierra Martín  
ISBN: 978-84-9125-109-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40208>

Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Celular

**Activación de la microglía inmadura y muerte neuronal  
durante el desarrollo de la retina de codorniz**

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

Memoria presentada por **ANA SIERRA MARTÍN**, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada.

**Directores**

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

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

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



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 2014.

Granada a 3 de Marzo de 2015

Fdo. Ana Sierra Martín



El doctorando Ana Sierra Martín y los directores de la tesis José Luis Marín Teva, Julio Navascués Martínez y Ruth Calvente Iglesias garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 03 de marzo de 2015

Director/es de la Tesis



Fdo.: José Luis Marín Teva



Fdo.: Julio Navascués Martínez



Fdo.: Ruth Calvente Iglesias

Doctorando



Fdo.: Ana Sierra Martín





Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por la que suscribe en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, gracias a la concesión de una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) adscrita al Proyecto BFU2007-61659/BFI. La investigación desarrollada ha sido parcialmente financiada por los siguientes proyectos:

REFERENCIA DEL PROYECTO: BFU2007-61659/BFI

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Educación y Ciencia

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Julio Navascués Martínez

REFERENCIA DEL PROYECTO: BFU2010-19981

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Ciencia e Innovación.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Julio Navascués Martínez



## AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis, ha sido posible gracias al apoyo, tanto académico como personal, de muchas personas, sin las cuales hubiese sido imposible completar este trabajo. Siempre estaré en deuda con vosotros y quiero agradecer vuestra colaboración y ayuda.

A mis directores de tesis:

José Luis Marín, primordial para la realización de esta tesis doctoral. Por su empeño y dedicación a nivel científico y por su apoyo a nivel personal. Gracias por tus charlas infinitas, por tus consejos y por hacerme ver las cosas desde prismas con diferentes ángulos. Por animarme a aprender cada día, a tener autonomía e independencia en el laboratorio. Por enseñarme y demostrarme que lo que parece imposible no lo es tanto y que querer es poder.

Julio Navascués, por contar conmigo en su grupo de investigación y brindarme la oportunidad de iniciar mi carrera en el campo del fascinante mundo del Sistema Nervioso y concretamente en el estudio de las peculiares e impredecibles células microgliales. Por su comprensión y por su apoyo. Por su interés, cuidado, dedicación y entrega en la elaboración, revisión y corrección de esta tesis.

Ruth Calvente, por estar siempre dispuesta a ayudar, por su disponibilidad y amabilidad siempre que la he necesitado.

A mis compañeros del Departamento de Biología Celular:

Miguel Ángel Cuadros, Ramón Carmona, Paco Abadía, Mari Carmen Fernández, David Martín, Rosario Sepúlveda, Cristina Trenzado, Esperanza López, Mari Asun Abaurrea, Antonio Almendros, María del Valle Ostos y Juanjo Megías. Quiero hacer mención especial a David Martín, por su apoyo constante en la parte experimental, por sus sugerencias siempre útiles, por transmitirme la pasión con la que hace su trabajo y por los buenos momentos que hemos pasado juntos, sobre todo en la primera etapa de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio:

A Rosa, por enseñarme que con tesón, perseverancia, constancia y prudencia se pueden conseguir grandes cosas. A María, por escucharme y

aconsejarme, por ser tan clara y madura, y, sobre todo, por su compañía. A Nazaret, gracias por tu hospitalidad, por tu apoyo desinteresado, por tu ayuda, consejos y charlas y en definitiva por tu amistad. A Mari Carmen, gracias en mayúsculas. Gracias por enseñarme a dar mis primeros pasos en la ciencia, por tu paciencia, por estar siempre dispuesta a echarme una mano en todo, por servirme de ejemplo en lo profesional, y, en cuanto a lo personal, gracias por todos esos momentos compartidos y que tanto significaron para mí.

A David Porcel, responsable del Servicio de Microscopía del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por el buen trato recibido, por resolver las dudas que me iban surgiendo y por su disponibilidad.

A Jaime Lazuén, responsable del Servicio de Citometría del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por sus siempre acertados consejos, por escucharme, por su eficacia y rapidez enviando los resultados, por su gran capacidad resolutoria y por las risas que nos hemos echado. Gracias, Jaime.

A mis amigas accitanas de toda la vida, a las que les encantaría verme defendiendo la tesis pero que han respetado que yo prefiera que no estén allí ese día, porque saben que la emoción y los nervios no son buena combinación para mí. Gracias por todos estos años de amistad.

A David, por su apoyo y amor. Por ver el lado positivo siempre. Por animarme a superarme, por creer en mi, y sobre todo por hacer que yo lo haga. Por sacarme una sonrisa incluso en los momentos de más desánimo. Por devolverme la ilusión y las ganas y por quedarte a mi lado sin pedir nada y a pesar de todo. Gracias.

A mi querida familia, me quedaría muy corta si sólo dijera gracias. Sois el pilar de mi vida. Por eso, comprenderéis que no escriba nada más. Vosotros ya sabéis lo que significáis para mí. Sería injusto que describiera sólo en unas pocas letras lo agradecida que estoy de tener unos padres, hermanas y sobrinos como vosotros. Lo que soy os lo debo. Os quiero.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Estructura de la retina de vertebrados.....	4
Células gliales de la retina de los vertebrados.....	7
<i>Células de Müller</i> .....	7
<i>Astrocitos</i> .....	9
<i>Oligodendrocitos</i> .....	10
<i>Células microgliales</i> .....	10
Estados morfofuncionales de la microglía.....	12
Origen de la microglía.....	19
<i>Origen monocítico</i> .....	20
<i>Origen pial</i> .....	22
<i>Origen de progenitores generados en el saco vitelino</i> .....	24
Desarrollo de las células microgliales.....	28
<i>Entrada de progenitores microgliales en el SNC</i> .....	29
<i>Propagación de la microglía en el SNC: migración y proliferación</i> .....	30
<i>Diferenciación de la microglía</i> .....	36
Funciones de las células microgliales.....	39
<i>Funciones en el SNC adulto</i> .....	39
<i>Funciones en el SNC en desarrollo</i> .....	45
Mantenimiento del estado ramificado de la microglía: señales "off".....	49
Activación de la microglía: características morfofuncionales.....	51
Señales de activación microglial y receptores relacionados.....	54
Dualidad funcional de la microglía activada: neuroprotección frente a neurotoxicidad.....	59
<i>Papel neuroprotector de la microglía</i> .....	60
<i>Papel neurotóxico de la microglía</i> .....	62

Estados de activación de la microglía: clásica y alternativa.....	63
<i>Activación clásica (M1) de la microglía</i> .....	65
<i>Activación alternativa (M2) de la microglía</i> .....	65
Producción de radicales libres por la microglía activada.....	67
El LPS como modelo experimental de activación microglial.....	71
Los cultivos organotípicos de retina como modelo experimental para el estudio de la microglía.....	74
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	77
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	85
Animales.....	87
Aislamiento de retinas y cultivo in vitro de ERECs.....	87
Tratamiento de ERECs con LPS.....	89
Anticuerpos.....	90
Inmunocitoquímica.....	91
<i>Inmunocitoquímica en montajes totales</i> .....	92
<i>Inmunocitoquímica en criosecciones</i> .....	93
Cuantificación de la intensidad de fluorescencia anti-iNOS en la microglía.....	94
Análisis de la expresión del ARNm de iNOS mediante PCR a tiempo real.....	95
<i>Extracción, purificación y cuantificación del ARN</i> .....	95
<i>Retrotranscripción de ARN a ADN complementario (ADNc)</i> .....	96
<i>PCR a tiempo real</i> .....	96
Determinación de la presencia de iNOS mediante western blot.....	98
<i>Extracción y cuantificación de proteínas</i> .....	98
<i>Western blot</i> .....	99
Análisis morfométrico de los caracteres morfológicos de las células microgliales.....	100
Determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo.....	101

Cuantificación de células apoptóticas mediante marcaje con anexina V y análisis con citometría de flujo.....	103
Detección y cuantificación de fragmentos apoptóticos mediante TUNEL.	105
<i>TUNEL en montajes totales de ERECs.....</i>	106
<i>TUNEL en criosecciones de ERECs.....</i>	106
<i>Cuantificación de perfiles TUNEL-positivos en la CCG.....</i>	107
Análisis cuantitativo de células Islet-1-positivas.....	107
<i>Cuantificación de células Islet-1-positivas mediante citometría de flujo.....</i>	107
<i>Cuantificación de células ganglionares Islet-1-positivas en criosecciones.....</i>	108
Determinación del porcentaje de células ganglionares caspasa 3-positivas que muestran contactos con células microgliales.....	109
Detección de ROS en células microgliales.....	110
<i>Detección de carboxi-DCF mediante microscopía confocal.....</i>	110
<i>Detección de carboxi-DCF mediante citometría de flujo.....</i>	111
Detección de aniones O <sub>2</sub> <sup>-</sup> mediante marcaje con dihidroetidio y análisis con citometría de flujo.....	112
Detección de la producción de óxido nítrico por células microgliales.....	113
Inhibición de la actividad de iNOS mediante tratamiento con L-NMMA...	114
Análisis estadístico.....	115
<b>RESULTADOS.....</b>	117
La microglía ameboide de la retina embrionaria de codorniz muestra un intenso inmunomarcaje de iNOS.....	119
Disminución del inmunomarcaje de iNOS en las células microgliales ramificadas de la retina de codorniz en desarrollo y adulta.....	127
Expresión del ARNm de iNOS durante el desarrollo de la retina de codorniz.....	132
Aumento de la activación de la microglía ameboide tras el tratamiento de ERECs de E8 con LPS.....	134

El tratamiento con LPS no altera la estructura básica de la retina en ERECs de E8+24hiv, aunque induce una disminución del espesor de la CCG.....	145
El tratamiento con LPS disminuye la viabilidad celular e incrementa la apoptosis en ERECs de E8 cultivados in vitro.....	152
El tratamiento con LPS provoca una disminución de la población de células ganglionares en ERECs de E8+24hiv.....	160
Los contactos fagocíticos de células microgliales con células ganglionares caspasa 3-positivas se incrementan tras el tratamiento con LPS de ERECs de E8+12hiv.....	166
El tratamiento con LPS de ERECs de E8+12hiv incrementa la producción microglial de ROS, pero no de anión $O_2^-$ .....	172
Incremento de la expresión de iNOS en la microglía ameboide activada de ERECs de E8+12hiv tratados con LPS.....	176
La inhibición de iNOS con L-NMMA rescata de la muerte a un número significativo de células ganglionares en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS.....	181
<b>DISCUSIÓN</b> .....	191
Expresión de iNOS y producción de óxido nítrico por la microglía ameboide de la retina de codorniz.....	193
Activación de la microglía ameboide en respuesta al tratamiento con LPS.....	200
La sobreactivación de la microglía ameboide con LPS induce un incremento en la muerte de células ganglionares: papel de la fagoptosis y las ROS.....	206
<b>REFERENCIAS</b> .....	211
<b>CONCLUSIONES</b> .....	253



## ABREVIATURAS

ACAMPs: patrones moleculares asociados a células apoptóticas  
ADNc: ADN complementario  
AF: alexa fluor  
ATP: adenosina 5'-trifosfato  
BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro  
BSA: albúmina de suero bovino  
CCG: capa de células ganglionares  
CNE: capa nuclear externa  
CFN: capa de fibras nerviosas  
CNI: capa nuclear interna  
CNO/BP: cabeza del nervio óptico/base del pecten  
CPE: capa plexiforme externa  
CPI: capa plexiforme interna  
CSF-1: factor estimulante de colonias 1  
Ct: ciclo umbral  
CX<sub>3</sub>CL1: fractalquina  
CX3CR1: receptor de fractalquina  
DAMPs: patrones moleculares asociados a daño  
DCF: 2',7'-dicloro-fluoresceína  
DHE: dihidroetidio  
DAR-4M AM: diaminorodamina-4M acetoximetil ester  
E: día de incubación  
EGFP: proteína fluorescente verde mejorada  
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial  
EP: epitelio pigmentario  
ERECs: explantes de retina embrionaria de codorniz  
FDA: diacetato de fluoresceína  
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos  
GMPc: guanosín monofosfato cíclico

H<sub>2</sub>DCFDA: diacetato de 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína  
H<sub>2</sub>DCF: 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína  
IKK: quinasa del inhibidor de NFκβ  
IL: interleuquina  
IFN-γ: interferón γ  
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible  
Irf8: factor regulador de interferón 8  
IP: yoduro de propidio  
L-NMMA: NG-monometil-L-arginina monoacetato  
LPS: lipopolisacárido bacteriano  
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1  
MIP: proteína inflamatoria de macrófagos  
MyD88: factor de diferenciación mieloide 88  
NADPHox: NADPH oxidasa  
NFκB: factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas  
NGF: factor de crecimiento nervioso  
NGS: suero normal de cabra  
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal  
NOS: óxido nítrico sintasa  
NT-3: neurotrofina 3  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido  
P: día postnatal  
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos  
PBS: tampón fosfato salino  
PBS-0,1%T: tampón fosfato salino con Tritón X-100 0,1%  
PBS-1%T: tampón fosfato salino con Tritón X-100 1%  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PRRs: receptores de reconocimiento de patrones  
RANTES: citoquina quimiotáctica para linfocitos T memorísticos y monocitos  
ROS: especies reactivas de oxígeno

RT-PCR: PCR a tiempo real

SDS: dodecilsulfato sódico

SNC: sistema nervioso central

TdT: enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal

TGF- $\beta$ 1: factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1

TLRs: receptores tipo Toll

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

TUNEL: Técnica “terminal deoxynucleotidil transferase dUTP nick-end labeling”



# Introducción

---



El Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados está constituido básicamente por neuronas, que generan y transmiten impulsos nerviosos, y células gliales, cuyas funciones específicas son decisivas para la función neuronal y la homeostasis del tejido nervioso. Las funciones generales de los astrocitos y oligodendrocitos son relativamente bien conocidas ya que han sido ampliamente investigadas a lo largo de más de un siglo. Sin embargo, la microglía constituye un tipo celular de la glía del SNC cuyas funciones son mucho menos comprendidas y han empezado a desvelarse más recientemente. Desde su descubrimiento por Pío del Río-Hortega (del Río-Hortega, 1919), se había considerado que las células microgliales estaban exclusivamente implicadas en mecanismos de defensa, siendo frecuentemente denominadas macrófagos del SNC, y estrechamente emparentadas con los macrófagos de otros tejidos y órganos, con los que compartían un origen común. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la microglía es una población celular específica del SNC, diferente de los macrófagos, que se origina en etapas tempranas del desarrollo a partir de progenitores provenientes del saco vitelino que colonizan el esbozo de SNC y persisten en el SNC adulto, donde se autoperpetúan mediante proliferación (Ginhoux et al., 2013). En los últimos diez años otras funciones microgliales, de gran trascendencia para el desarrollo y homeostasis del SNC, se han añadido a la función defensiva inicialmente aceptada. Así, la microglía participa en procesos de desarrollo esenciales, tales como: a) muerte y supervivencia de neuronas inmaduras, b) neurogénesis, c) oligodendrogénesis, d) crecimiento y eliminación de axones, e) formación, maduración y remodelación de sinapsis durante el establecimiento de circuitos neurales, y f) vasculogénesis (Arnold y Betsholtz, 2013; Eyo y Dailey, 2013; Harry y Pont-Lezica, 2014; Marín-Teva et al., 2014; Salter y Beggs, 2014; Schafer et al., 2013; Shigemoto-Mogami et al., 2014; Tremblay et al., 2014; Ueno y Yamashita, 2014). La microglía también parece estar implicada en el funcionamiento normal de las neuronas en el SNC maduro, habiéndose descrito que es capaz de modular la plasticidad sináptica que contribuye a la modificación de circuitos neurales y

también tiene un papel en la transmisión sináptica basal gabaérgica y glutamatérgica (Salter y Beggs, 2014; Schafer et al., 2013; Tremblay et al., 2011). Además, ahora se sabe que la neurogénesis adulta es un proceso fisiológico normal necesario para el aprendizaje y la memoria y la microglía interviene en dicho proceso, entremezclándose con los progenitores neurales y neuronas recién formadas y fagocitando muchas de ellas (Sierra et al., 2010; Sierra y Tremblay, 2014).

Por todo ello, el interés por la microglía se ha disparado en los últimos años y los estudios sobre ella son cada vez más numerosos (Rezaie y Hanisch, 2014). En el presente trabajo de tesis doctoral hemos centrado nuestra atención en la participación de la microglía en la muerte neuronal durante el desarrollo de la retina, ya que estudios previos han demostrado que durante el desarrollo del cerebelo y el hipocampo tiene lugar un proceso de muerte de neuronas promovido por microglía (Marín-Teva et al., 2004; Wakselman et al., 2007) y pretendemos comprobar si este mecanismo está generalizado en otras partes del sistema nervioso de vertebrados, como la retina.

En esta Introducción, primero se hace una breve exposición de la estructura y componentes de la retina de los vertebrados, para facilitar la comprensión del modelo de estudio al lector no familiarizado con el mismo. Seguidamente se hace una extensa revisión bibliográfica sobre diferentes aspectos de la biología de la microglía, incluyendo su origen y funciones, así como la activación de la misma y la producción de radicales libres. Finalmente, en los dos últimos apartados de la Introducción se resumen los conocimientos relacionados con el lipopolisacárido bacteriano (LPS) como inductor de activación microglial y con la utilización de cultivos organotípicos de retina para el estudio de la microglía, que son modelos experimentales empleados en esta Tesis.

### **Estructura de la retina de los vertebrados**

La retina forma parte del SNC y, como éste, se diferencia a partir del neuroepitelio del tubo neural. Concretamente, se origina a partir de evaginaciones



bilaterales del prosencéfalo denominadas vesículas ópticas, que posteriormente se invaginan para dar lugar a las copas ópticas. Cada copa óptica permanece conectada con el cerebro a través del tallo óptico, que es colonizado por fibras nerviosas procedentes de la retina para constituir finalmente el nervio óptico.

La retina es la capa más interna de las tres tunicas concéntricas que forman el globo ocular (esclera, coroides y retina) y está compuesta de dos láminas básicas, la retina neural y el epitelio pigmentario, que se originan durante la invaginación de la vesícula óptica para dar lugar a la copa óptica. La lámina más interna es la retina neural, o retina propiamente dicha, y está constituida por varios estratos de células que incluyen los fotorreceptores, que captan la señal luminosa que genera impulsos nerviosos, y diversos tipos neuronales, que colaboran en la transmisión de los impulsos generados por los fotorreceptores, los cuales se propagan hacia el cerebro a través de los axones del nervio óptico. La lámina más externa de la retina es el epitelio pigmentario y se compone de una sola lámina de células cúbicas, las células pigmentarias, que se encuentran firmemente adheridas a la coroides a través de la membrana de Bruch. Entre la retina neural y el epitelio pigmentario existe un espacio virtual denominado espacio subretiniano.

La retina neural está constituida por un conjunto de neuronas y células gliales con una disposición estratificada relativamente sencilla, sobre todo cuando se compara con otras partes del SNC. Esta organización la convierte en un modelo muy útil para el estudio del desarrollo y diferenciación de las células que la constituyen. Las células gliales de la retina de los vertebrados son las células de Müller, los astrocitos, los oligodendrocitos y la microglía, aunque astrocitos y oligodendrocitos pueden estar ausentes en la retina de algunos grupos de vertebrados. Las neuronas se pueden clasificar en tres tipos funcionales: a) células fotorreceptoras (conos y bastones), sensibles a los estímulos lumínicos; b) células ganglionares, que son las neuronas que conducen el estímulo nervioso desde la retina al cerebro a través de las fibras nerviosas del nervio óptico; y c) neuronas de asociación o integración, que están dispuestas entre los fotorreceptores y las células ganglionares, integrando los impulsos recibidos de los fotorreceptores y

transmitiéndolos a las células ganglionares. Existen tres tipos de neuronas de asociación en la retina: células bipolares, células horizontales y células amacrinas.

Los diferentes tipos celulares de la retina se organizan formando diez capas o estratos fácilmente identificables con el microscopio óptico. Desde la parte externa del ojo (parte escleral) hacia la interna (parte vítrea), dichas capas son las siguientes (Fig. 1):

1. *Epitelio pigmentario (EP)*, que no pertenece a la retina neural y es la capa más externa de la retina dispuesta exteriormente a los fotorreceptores.

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

3. *Membrana limitante externa*, que constituye el límite apical de las células de Müller, muy próximo al EP.

4. *Capa nuclear externa (CNE)*, que contiene los somas de los conos y bastones.

5. *Capa plexiforme externa (CPE)*, en la que se localizan las prolongaciones axónicas de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células horizontales, amacrinas y bipolares que conectan con ellas.

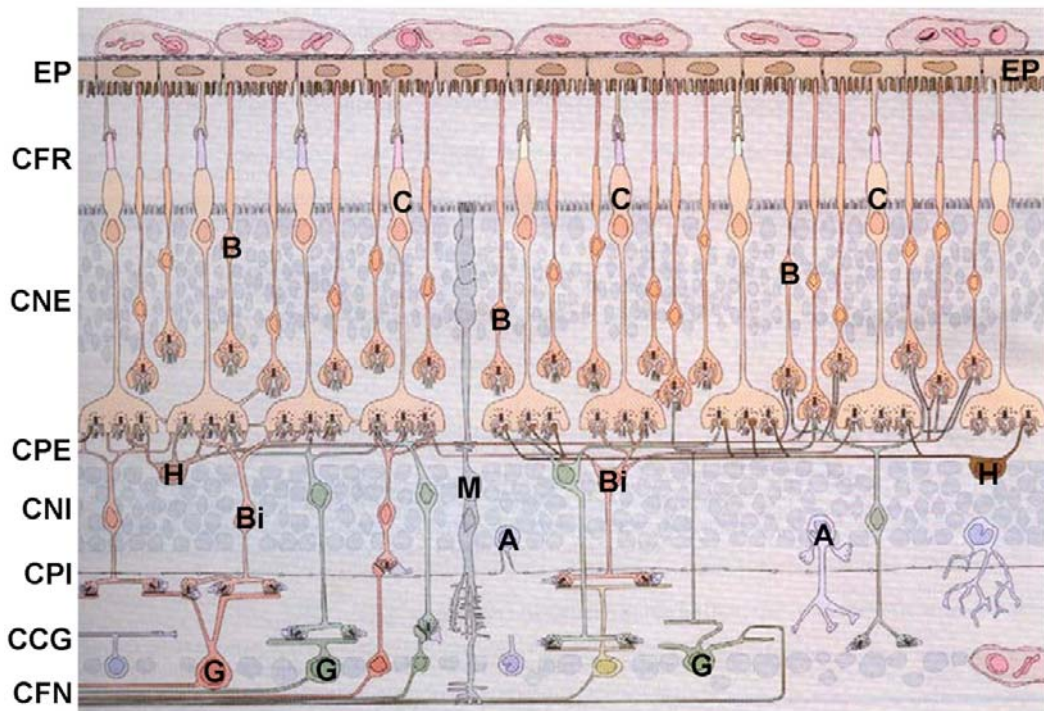
6. *Capa nuclear interna (CNI)*, que contiene los somas de las células horizontales, amacrinas, bipolares y de las células de Müller.

7. *Capa plexiforme interna (CPI)*, en la que se localizan las prolongaciones de las células horizontales, amacrinas y bipolares que conectan con las prolongaciones dendríticas de las células ganglionares.

8. *Capa de células ganglionares (CCG)*, que contiene los somas de las células ganglionares.

9. *Capa de fibras nerviosas (CFN)*, formada por las prolongaciones axónicas de las células ganglionares, que salen de la retina y se incorporan al nervio óptico, a través del cual se dirigen hasta el encéfalo.

10. *Membrana limitante interna*, formada por la lámina basal que se localiza bajo la porción terminal de las células de Müller.



**Fig. 1.** Representación gráfica de las capas de la retina, en la que se muestran los diferentes tipos celulares (G: células ganglionares; A: células amacrinas; Bi: células bipolares; H: células horizontales; M: células de Müller; B: bastón; C: cono) y las distintas capas de la retina (CFN: capa de fibras nerviosas; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; CFR: capa de fotorreceptores; EP: epitelio pigmentario). Modificado de Rodieck (1998).

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

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

#### ***Células de Müller***

Las células de Müller han sido consideradas por algunos autores como astrocitos modificados, atendiendo a sus características estructurales, moleculares y funcionales (Holländer et al., 1991; Magalhaes y Coimbra, 1973), aunque también se las puede considerar elementos de la glía radial, dada la disposición

que adoptan en la retina (Bernardos et al., 2007; Reichenbach et al., 1993). Las células de Müller ocupan todo el espesor de la retina y están en contacto con todos los tipos de neuronas de la misma. El núcleo de estas células, albergado en el soma, se localiza a nivel de la CNI, mientras que sus prolongaciones radiales se extienden desde la membrana limitante externa, justo por debajo del EP, hasta la CCG/CFN, donde se ramifican en varias prolongaciones que terminan en expansiones denominadas pies terminales, los cuales descansan sobre una lámina basal que constituye la membrana limitante interna de la retina.

Las células de Müller dan soporte estructural y funcional a la retina, ya que contactan y envuelven los somas y las prolongaciones de las neuronas retinianas formando unidades funcionales a modo de columnas (Bringmann et al., 2006; Reichenbach y Bringmann, 2010; Reichenbach y Robinson, 1995). Además, las células de Müller ejercen una diversidad de funciones específicas. Así, proporcionan sustancias tróficas a las neuronas, intervienen en la eliminación de los desechos metabólicos y juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis del volumen extracelular, de los iones y del agua (Bringmann et al., 2006; Newman y Reichenbach, 1996). Las células de Müller también sustentan la supervivencia de los fotorreceptores y neuronas, son las responsables de la estabilidad estructural de la retina (Bringmann et al., 2009; Reichenbach y Bringmann, 2010), contribuyen a guiar la luz hasta los fotorreceptores (Franze et al., 2007) y amortiguan las deformaciones mecánicas que puede sufrir la retina (Lu et al., 2006). Las células de Müller son capaces de activarse frente a estímulos patógenos y modulan las respuestas inmunes e inflamatorias, dando lugar a células reactivas (Bringmann et al., 2009; Reichenbach y Bringmann, 2010), que son neuroprotectoras pero también pueden contribuir a la degeneración neuronal (Bringmann y Wiedemann, 2012). Por otra parte, frente a una lesión, las células de Müller pueden desdiferenciarse hacia células progenitoras multipotentes que posteriormente se diferencian en fotorreceptores y otros tipos neuronales de la retina (Bernardos et al., 2007). Las células de Müller también participan en el

control de la angiogénesis en retinas vascularizadas y en la regulación del flujo sanguíneo.

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

### ***Astroцитos***

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

Al igual que en el resto del SNC, los astroцитos en la retina madura de mamíferos son esenciales para el soporte trófico y metabólico de las neuronas, la supervivencia y la diferenciación neuronal, la génesis de las sinapsis y la homeostasis cerebral. Sus prolongaciones, junto con las de las células microgliales, contribuyen a la formación de la glía limitante perivascular, que separa el compartimento vascular del parénquima nervioso (Choi y Kim, 2008; Provis, 2001). Además, los astroцитos controlan la migración, proliferación y

supervivencia de las células endoteliales de los vasos a través de la liberación del factor de crecimiento de endotelios vasculares VEGF (Fruttiger, 2002; Kubota y Suda, 2009; Provis, 2001; Stone et al., 1995; West et al., 2005).

### ***Oligodendrocitos***

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

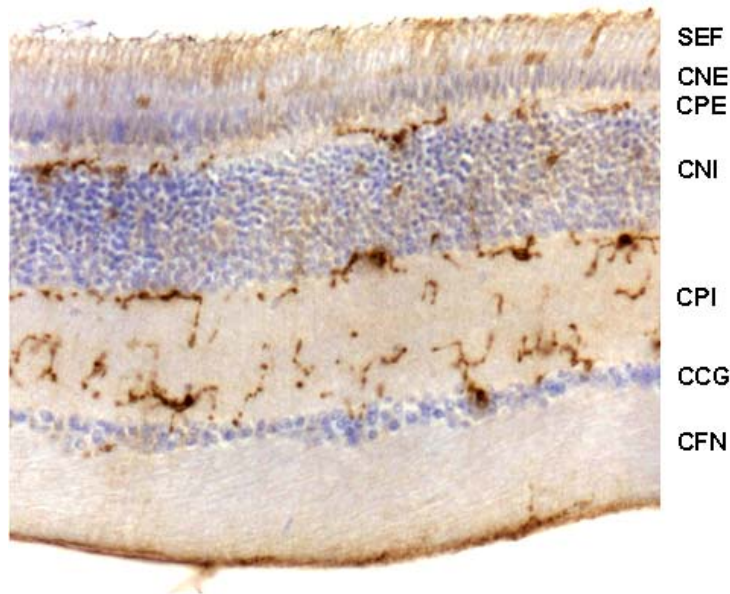
### ***Células microgliales***

La presencia de células microgliales en la retina de mamíferos es conocida desde hace casi noventa años (López-Enríquez, 1926), poco después de los primeros estudios de del Río-Hortega. Después de más de cuarenta años de ausencia de nuevos estudios, los trabajos de Vrabec (1970) y Gallego (1976) reanudaron el interés por el conocimiento de la microglía de la retina. Desde

entonces, diferentes estudios han descrito el patrón de distribución de la microglía en la retina normal de varias especies de mamíferos, como hombre, mono, gato, conejo, rata y ratón (Ashwell, 1989; Boycott y Hopkins, 1981; Harada et al., 2002; Hume et al., 1983; Penfold et al., 1991; Santos et al., 2008; Schnitzer, 1985, 1989; Terubayashi et al., 1984; Thanos, 1991; Wohl et al., 2011). Estudios en otras clases de vertebrados, como peces (Salvador-Silva et al., 2000; Velasco et al., 1999), anfibios (Goodbrand y Gaze, 1991) y aves (Navascués et al., 1994; Won et al., 2000), han demostrado que dicho patrón de distribución es básicamente similar en la retina de todos los vertebrados.

La mayoría de células microgliales ramificadas de la retina se localizan en la CPI y CPE (Fig. 2), aunque algunas también se pueden observar entre los somas neuronales de la CCG y en la CFN (Navascués et al., 1994; Santos et al., 2008). Teniendo en cuenta que la CPE suele ser muy delgada, las células microgliales se distribuyen dentro de ella en un único plano horizontal, pudiendo emitir prolongaciones perpendiculares a dicho plano que penetran en las capas nucleares adyacentes, estableciendo contactos con los fotorreceptores de la CNE o con neuronas de la CNI. Sin embargo, estas capas nucleares de la retina normal están generalmente desprovistas de somas de células microgliales. La CPI es mucho más gruesa que la CPE, por lo que la microglía es más abundante en la primera y se distribuye en tres niveles diferentes que corresponden al límite entre la CPI y la CNI, a la parte central de la CPI y al límite de la CPI con la CCG. En las capas plexiformes, cada célula microglial tiene su propio territorio de parénquima nervioso en el que se distribuye, es decir no existe solapamiento entre las áreas ocupadas por las ramificaciones de las diferentes células.

En esta Tesis se estudia el efecto de las células microgliales de la retina en desarrollo sobre la muerte de las células ganglionares. Por tanto, en los apartados siguientes de esta Introducción vamos a exponer una visión más detallada de los conocimientos actuales sobre la microglía.



**Fig. 2.** Sección transversal de retina de codorniz adulta que muestra la distribución de las células microgliales (en marrón) en las capas plexiformes externa e interna. SEF: capa de los segmentos externos de los fotorreceptores; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de las células ganglionares; CFN: capa de las fibras nerviosas. Tinción inmunocitoquímica con el anticuerpo QH1, que marca la microglía, revelado con peroxidasa.

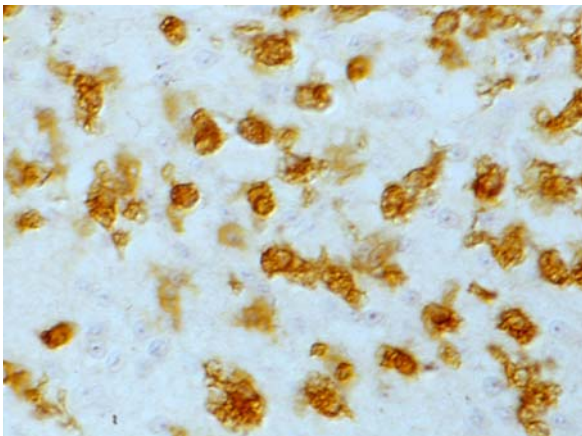
### Estados morfofuncionales de la microglía

Las células microgliales, identificadas y caracterizadas por primera vez por Pío del Río Hortega (1919), constituyen entre el 10 y 20% del total de células gliales del SNC de vertebrados. Son células del sistema fagocítico mononuclear que residen en el SNC y se originan a partir de elementos de origen mesodérmico que lo invaden durante el desarrollo embrionario (Boya et al., 1979; Cuadros y Navascués, 1998; Pont-Lezica et al., 2011; Rezaie y Male, 1999; Swinnen et al., 2013; Tambuyzer et al., 2009). Del Río Hortega estudió estas células usando la técnica de impregnación argéntica con carbonato de plata y, en la actualidad, numerosos estudios han confirmado los resultados de sus investigaciones: las células microgliales ameboides entran en el SNC durante los estadios tempranos del desarrollo embrionario y utilizan los vasos sanguíneos y los axones de la sustancia blanca como estructuras que guían su entrada y dispersión en todas las



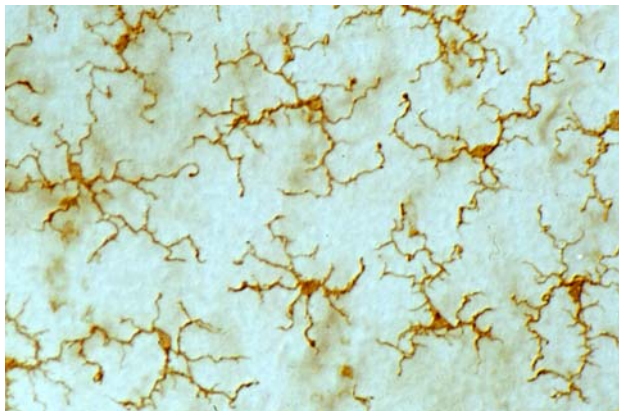
regiones del SNC. Cuando alcanzan sus localizaciones finales, adquieren una morfología ramificada y son conocidas como microglía ramificada. La microglía ramificada se encuentra distribuida por todas las partes del SNC adulto y cada célula parece ocupar un territorio definido que no se solapa con los territorios de células microgliales adyacentes. Después de un proceso patológico, estas células sufren una transformación morfofuncional, conocida como activación microglial. La microglía activada adquiere una morfología ameboide, similar a la de las células presentes en el SNC en desarrollo, y muestra una gran capacidad para migrar, proliferar y fagocitar. Por lo tanto, ya desde los estudios de del Río-Hortega, se conocen tres estados morfofuncionales de la microglía, que reciben los nombres de microglía ameboide, microglía ramificada y microglía activada.

La **microglía ameboide** o inmadura (Fig. 3) es la microglía indiferenciada que migra en el SNC durante el desarrollo del mismo. Las células microgliales ameboides tienen forma redondeada y se desplazan en el seno del parénquima nervioso mediante la emisión de pseudópodos y lamelipodios (Carrasco et al., 2011; Marín-Teva et al., 1998; Swinnen et al., 2013), adaptando su morfología a las condiciones del microambiente en el que están migrando (Amadio et al., 2013). Además, tienen gran capacidad proliferativa, por lo que, conforme avanza el desarrollo, incrementan considerablemente su número dentro del SNC (Marín-Teva et al., 1999a; Rigato et al., 2011).



**Fig. 3.** Microglía ameboide inmunoteñida con el anticuerpo QH1 en la sustancia blanca del cerebelo de un embrión de codorniz. Modificada de Cuadros et al. (1997).

Cuando tiene lugar la maduración del SNC, las células microgliales ameboides se diferencian, emitiendo delgadas prolongaciones que se ramifican progresivamente, para dar lugar a la **microglía ramificada** (Fig. 4), que constituye el estado natural de la microglía en el SNC adulto en situación normal (Cuadros y Navascués, 1998; Eyo y Dailey, 2013; Hanisch y Kettenmann, 2007; Kongsui et al., 2014). Las prolongaciones de la microglía ramificada son cortas y delgadas, incrementando la superficie de interacción con otros componentes del SNC y favoreciendo la detección de las posibles alteraciones de dichos componentes (Boche et al., 2013).

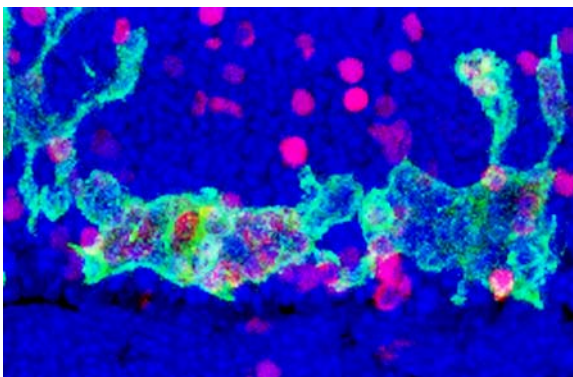


**Fig. 4.** Microglía ramificada de la capa plexiforme externa de la retina de codorniz adulta. Tinción inmunocitoquímica con el anticuerpo QH1 en una extensión de retina. Modificada de Navascués et al. (1994).

La percepción de la microglía ramificada ha cambiado radicalmente en los últimos diez años. Antes se creía que sus prolongaciones permanecían inmóviles, a la espera de ser estimuladas por señales procedentes del microambiente que las rodea (Kreutzberg, 1996). Por esta razón, la microglía ramificada también era denominada microglía quiescente (“resting microglia”). Sin embargo, dos estudios más o menos simultáneos, aunque independientes (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005) demostraron que las células microgliales ramificadas están dotadas de una gran motilidad, emitiendo y retrayendo continuamente sus prolongaciones, para conseguir una activa inspección de su entorno. Estos estudios se llevaron a cabo *in vivo* mediante la observación con microscopía bifotónica de células microgliales que expresan la proteína fluorescente verde

(GFP) en el cerebro intacto de ratones transgénicos que llevan el gen de la GFP insertado en el locus que codifica para el receptor de la fractalquina, el cual se expresa específicamente en la microglía. Otros estudios posteriores (Davalos et al., 2008; Salter y Beggs, 2014; Wake et al., 2009) han confirmado la naturaleza dinámica de las prolongaciones microgliales. La nueva percepción de la microglía ramificada como células con prolongaciones dinámicas que inspeccionan el ambiente que las rodea ha hecho aconsejable modificar la vieja denominación de “microglía quiescente” (resting microglia) por la de “microglía vigilante” (“surveying microglia” o “surveillant microglia”) (Raivich, 2005; Hanisch y Kettenmann, 2007; Eyo y Dailey, 2013; Gomez-Nicola y Perry, 2014; Ransohoff y Cardona, 2010).

Mediante el continuo movimiento de sus prolongaciones, las células microgliales ramificadas vigilan permanentemente el estado funcional del parénquima nervioso. Cuando la microglía vigilante detecta alteraciones en el mismo, responde con rapidez, retrayendo sus prolongaciones y transformándose en **microglía activada** (Fig. 5), constituida por células de forma redondeada, capaces de migrar activamente dentro del tejido nervioso mediante la emisión de pseudópodos (Boche et al., 2013; Hanisch y Kettenmann, 2007; Kreutzberg, 1996). Esta morfología y su capacidad fagocítica asemejan las células microgliales activadas con los macrófagos de otros tejidos. Además, la microglía activada comparte la expresión de numerosas moléculas con los macrófagos periféricos. Por todo ello, con relativa frecuencia se ha utilizado el término macrófagos residentes del SNC para referirse a la microglía activada.



**Fig. 5.** Microglía activada en la capa nuclear externa de un explante de retina de ratón postnatal de 10 días cultivado *in vitro*. La microglía ha sido inmunoteñida con anti-CD45 (verde) y está englobando algunos fotorreceptores TUNEL-positivos (rojo). Modificada de Ferrer-Martín et al. (2014).

Además de la morfología redondeada, la microglía activada puede mostrar otras morfologías, como la hiper-ramificada o la de bastón (Boche et al., 2013; Ladeby et al., 2005; Ziebell et al., 2014). La microglía activada hiper-ramificada muestra prolongaciones más gruesas que las de la microglía ramificada, que le dan un aspecto parecido a un arbusto (bushy-like). Se ha considerado que este tipo de microglía corresponde a una fase inicial de la activación microglial y es una transición entre el fenotipo ramificado de la microglía no activada y el fenotipo redondeado de las etapas finales del proceso de activación (Ladeby et al., 2005). La microglía activada con forma de bastón muestra un aspecto muy alargado, con algunas prolongaciones cortas y delgadas que emergen lateralmente, y es relativamente abundante en patologías crónicas y difusas (Boche et al., 2013; Ziebell et al., 2014).

Además de migrar dentro del parénquima nervioso, la microglía activada también posee una gran actividad proliferativa (Garden y Möller, 2006; Gómez-Nicola et al., 2013; Gomez-Nicola y Perry, 2014; Raivich et al., 1998; Yamamoto et al., 2010; Zusso et al., 2012), características que la asemejan a la microglía ameboide presente en el SNC durante su desarrollo embrionario y postnatal. La similitud de la microglía activada con la microglía ameboide ha dado lugar a una cierta confusión en la literatura, en la que a veces se ha utilizado el término microglía ameboide para referirse a la microglía activada (Beynon y Walker, 2012; Boche et al., 2013; Christensen et al., 2006; Karlstetter et al., 2010; Kawabori y Yenari, 2014; Rojas et al., 2014; Smith et al., 2012). En nuestro estudio, este término lo hemos utilizado como nombre propio, reservado exclusivamente para la microglía indiferenciada que migra en el SNC en desarrollo. Aunque algunos autores emplean indistintamente este nombre para referirse a la microglía indiferenciada y a la activada, como un término meramente descriptivo que resalta la morfología redondeada de ambos estados de la microglía, existen fundadas razones de tipo histórico para reservar el término a la microglía indiferenciada. Así, Ling y Tan (1974) describieron una colonia de células redondeadas en el cuerpo calloso de ratas perinatales, que denominaron

microglía ameboide y que se correspondían con las ya descritas por del Río-Hortega (1932). Estudios posteriores evidenciaron que la microglía ameboide tiene propiedades similares a macrófagos y se transforma en microglía ramificada (Ling y Wong, 1993). Desde los estudios del laboratorio de Ling, otros autores han seguido utilizando el nombre de “microglía ameboide” para referirse a las células de morfología ameboide, precursoras de la microglía ramificada, que están presentes en prácticamente todas las regiones del SNC en desarrollo (Choi et al., 2004; Cuadros et al., 1997; Ellison y De Vellis, 1995; Hurley et al., 1999; Lenz et al., 2013; Marín-Teva et al., 1998; Rezaie et al., 2005; Rezaie y Male, 1999; Streit, 2001; Zusso et al., 2012).

La microglía activada muestra cambios en la expresión de algunos genes, ocasionando la aparición de nuevas moléculas que no estaban presentes en la microglía ramificada y que favorecen la realización de nuevas funciones (ver más adelante en esta Introducción), favoreciendo su participación en la respuesta frente a alteraciones del SNC, como lesiones traumáticas, infecciones o infartos. Entre estas funciones, destacan la actividad fagocítica, la presentación de antígenos a los linfocitos T y la secreción de una gran diversidad de factores difusibles, como citoquinas, quimioquinas, factores neurotróficos y mediadores inflamatorios (Garden y Möller, 2006).

Las alteraciones del SNC que inducen la activación de la microglía también pueden desencadenar la infiltración en el parénquima nervioso de **macrófagos periféricos**, que proceden de monocitos circulantes que sufren un proceso de extravasación (Rawji y Yong, 2013). La microglía activada es morfológica e inmunofenotípicamente parecida a los macrófagos periféricos presentes en otros tejidos y órganos, aunque ambas poblaciones celulares tienen diferente origen (ver más adelante). Un problema planteado en muchas investigaciones relacionadas con las células activadas que participan en la respuesta del SNC frente a lesiones o enfermedades neurodegenerativas es la procedencia de dichas células (microglía endógena frente a macrófagos periféricos), ya que no existen marcadores específicos que permitan distinguir las

células microgliales activadas de los macrófagos periféricos infiltrados en el parénquima nervioso (Harry y Kraft, 2012; Prinz et al., 2011; Schmid et al., 2009; Tambuyzer et al., 2009). Por este motivo, frecuentemente se utiliza el término microglía/macrófagos (Singhal et al., 2010; Rawji y Yong, 2013) para referirse a las células activadas con apariencia macrofágica que se observan en el parénquima nervioso lesionado, sin especificar la procedencia de las mismas. En algunos estudios se han utilizado métodos que permiten distinguir ambas poblaciones de células (Joly et al., 2009). Así, teniendo en cuenta que los macrófagos periféricos se originan de la médula ósea, se pueden trasplantar células de médula ósea de ratones donantes transgénicos fluorescentes, cuyas células expresan la GFP, en ratones receptores normales (no fluorescentes). Con esta metodología, la población de macrófagos que se infiltran en el parénquima nervioso (procedentes de precursores de médula ósea) se distingue claramente de la microglía activada endógena, ya que los primeros muestran fluorescencia de la que carece la microglía endógena. Las funciones de ambas poblaciones celulares parecen ser sustancialmente diferentes (Prinz y Mildner, 2011). Por ejemplo, en la encefalomiелitis autoinmune experimental, que es un modelo animal de la esclerosis múltiple humana, la infiltración de macrófagos periféricos induce un agravamiento de los síntomas de la enfermedad, que no tiene lugar por la acción de la microglía endógena activada (Mildner et al., 2009).

En los últimos años se ha descrito otro estado morfofuncional de la microglía conocido como **microglía distrófica** (Boche et al., 2013; Luo et al., 2010; Streit et al., 2004; Streit, 2006). Ésta es considerada un estado disfuncional de la microglía, relacionado con el envejecimiento, cuyos caracteres fenotípicos constituyen un signo de senescencia celular (Luo et al., 2010; Olah et al., 2011). Se trata de células microgliales ramificadas con prolongaciones relativamente gruesas y, a veces, fragmentadas o arrosariadas, que se observan con relativa frecuencia en cerebros de individuos de edad avanzada. Algunas de estas características estructurales pueden ser interpretadas como signos de activación. La microglía distrófica de animales envejecidos muestra niveles elevados de

expresión de citoquinas pro-inflamatorias y factores inductores de estrés oxidativo, tales como especies reactivas de oxígeno (ROS), así como una disminución de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias y factores de crecimiento y antioxidantes (Jurgens y Johnson, 2012; Njie et al., 2012). Además, en el cerebro envejecido aumenta la reactividad de la microglía, por lo que ésta es capaz de responder más rápida e intensamente frente a estímulos patológicos (Czeh et al., 2011). Así, el mantenimiento de un cierto grado de activación de la microglía distrófica en el cerebro envejecido induce un incremento de factores nocivos para las neuronas y una disminución de la expresión de factores neurotróficos y moléculas reguladoras de la fisiología neuronal, contribuyendo a una neuroinflamación crónica y al deterioro neuronal relacionado con la edad.

### **Origen de la microglía**

El origen de la microglía es un tema ampliamente debatido a lo largo de casi cien años, habiendo sido objeto de atención en numerosas revisiones (Chan et al., 2007; Cuadros y Navascués, 1998; Ginhoux et al., 2013; Kaur et al., 2001; Ling y Wong, 1993; Rezaie et al., 1999; Schlegelmilch et al., 2011; Streit, 2001; Tambuyzer et al., 2009; Ueno y Yamashita, 2014). Desde los estudios de del Río-Hortega (1932), que ya defendían el origen mesodérmico de la microglía, hasta la actualidad se han postulado básicamente tres hipótesis para explicar la procedencia mesodérmica de la microglía: a) origen monocítico, b) origen pial, y c) origen del saco vitelino. Algunos autores también han defendido el origen neuroectodérmico de la microglía, siendo el laboratorio de Fedoroff el más reciente valedor de esta hipótesis (Fedoroff et al., 1997), pero esta posibilidad está actualmente desechada, por lo que solo se comentarán las tres hipótesis relacionadas con el origen mesodérmico de la microglía. Tanto la hipótesis del origen pial como la del origen monocítico fueron esbozadas inicialmente por del Río-Hortega, que propuso que la microglía se origina a partir de progenitores presentes en las meninges, pero también admitía que ocasionalmente podría proceder de mononucleares sanguíneos.

### ***Origen monocítico***

Según esta hipótesis, aceptada mayoritariamente hasta hace pocos años, la microglía procedía de monocitos circulantes que atravesaban las paredes de los vasos sanguíneos y se infiltraban en el SNC a lo largo del desarrollo, de forma parecida a como parecen originarse los macrófagos de diferentes órganos. Las similitudes observadas entre microglía y macrófagos, que comparten numerosos caracteres inmunofenotípicos, parecían avalar que la microglía, igual que los macrófagos, procedía de monocitos circulantes. Así, la morfología y la ultraestructura de las células microgliales inmaduras son muy semejantes a las de los macrófagos periféricos (Murabe y Sano, 1982). Por otra parte, ambas estirpes celulares muestran una elevada expresión de las enzimas nucleósido-difosfatasa, esterasas no específicas y fosfatasa ácida (Almolda et al., 2013; Castellano et al., 1991; Oehmichen et al., 1980) y se marcan histoquímicamente con lectinas (Colton et al., 1992; Guillemín y Brew, 2004; Villacampa et al., 2013; Wu et al., 1997). El inmunofenotipo de microglía y macrófagos también muestra coincidencias, ya que ambas poblaciones celulares son reconocidas por diversos anticuerpos, como anti-F4/80, anti-CD45, anti-CD11b y anti-CD68, entre otros (Chugani et al., 1991; Cuadros et al., 2006; Ghosh, 2010; Kettenmann et al., 2011; Perry et al., 1985; Tambuyzer et al., 2009). Además, tanto la microglía como los macrófagos periféricos expresan una variedad de receptores específicos y moléculas secretoras, que permiten su especialización en diversas funciones comunes, tales como fagocitosis, presentación de antígenos a linfocitos T y regulación de la respuesta inflamatoria (Garden y Möller, 2006; Kettenmann et al., 2011).

El origen monocítico de la microglía también encontró apoyo en los estudios del laboratorio de Ling (Ling et al., 1980), en los que se inyectaba una suspensión de partículas de carbono en el torrente sanguíneo, las cuales eran incorporadas por los monocitos circulantes, permitiendo seguir su rastro durante el desarrollo del SNC de rata. Pasado un tiempo tras la inyección de carbono en el sistema circulatorio, la microglía amebode aparecía marcada y, más tarde,



algunas células microgliales ramificadas también mostraban el marcaje con carbono, sugiriendo así la infiltración en el parénquima nervioso de monocitos circulantes que atravesarían el endotelio de los vasos sanguíneos y terminarían transformándose en microglía ameboide primero y en microglía ramificada, con posterioridad. Sin embargo, los autores de este estudio reconocían que el número de microglía marcada con carbono era muy escaso, sin llegar a cuantificar la proporción de células microgliales marcadas, limitando así la posibilidad de generalizar las conclusiones obtenidas al conjunto de la población de células microgliales.

En resumen, los apoyos a favor de la hipótesis del origen monocítico de la microglía son meras sugerencias y no hay pruebas experimentales que la hayan podido probar de manera irrefutable. Además, la presencia de microglía ameboide en el cerebro en desarrollo antes de que se inicie la vascularización del mismo (Ashwell, 1991; Cuadros et al., 1993; Wang et al., 1996) y de que los monocitos estén presentes en los tejidos hematopoyéticos (Naito et al., 1996; Sorokin et al., 1992) es un hecho que se contrapone a dicha hipótesis. Los estudios de Kurz y Christ (1998) y Kurz et al. (2001) también concluían que la microglía no procede de monocitos circulantes que penetran a través de la pared de los vasos cerebrales. Dichos estudios utilizaban un sistema experimental basado en la creación de anastomosis entre los vasos sanguíneos de las membranas corioalantoideas de un embrión de pollo y otro de codorniz (parabiosis), permitiendo que las células sanguíneas de codorniz se mezclaran con las del embrión de pollo en el interior de los vasos sanguíneos de éste. Los autores no encontraron la presencia de microglía procedente de codorniz (reconocida por su marcaje con el anticuerpo QH1) en el interior del SNC del embrión de pollo de la parabiosis, demostrando la incapacidad de las células sanguíneas circulantes de infiltrarse en el SNC. Conclusiones similares eran obtenidas en experiencias de parabiosis con ratones en los que sus sistemas circulatorios eran conectados quirúrgicamente, en las que no se observaba reclutamiento de progenitores microgliales desde la circulación sanguínea hacia el cerebro (Ajani et al., 2007) y en experiencias de reconstitución

de la médula ósea de ratones con células fluorescentes procedentes de la médula ósea de ratones transgénicos fluorescentes (Mildner et al., 2007).

En realidad, la hipótesis del origen monocítico de la microglía era una simple evocación de la idea predominante hasta hace poco tiempo, establecida por van Furth y Cohn (1968) al introducir el concepto de sistema fagocítico mononuclear, según la cual los macrófagos residentes de los tejidos periféricos proceden de progenitores indiferenciados de la médula ósea que se diferencian en monocitos, pasan a la sangre y se infiltran en los tejidos atravesando la pared endotelial de los vasos sanguíneos. Sin embargo, este marco conceptual ha cambiado radicalmente en la actualidad. Así, recientes descubrimientos indican que: a) los monocitos no contribuyen sustancialmente a las poblaciones de macrófagos de los tejidos periféricos adultos en condiciones normales (aunque sí lo hacen en situaciones patológicas), b) dichas poblaciones de macrófagos derivan de progenitores embrionarios que colonizan los tejidos durante el desarrollo, y c) los macrófagos derivados de progenitores embrionarios se autoperpetúan en los tejidos periféricos mediante proliferación (ver la revisión de Ginhoux y Jung, 2014). Este cambio en las ideas sobre el origen de los macrófagos periféricos ha venido impulsado por un cambio previo en el conocimiento del origen de la microglía, derivado de evidencias experimentales que han demostrado su procedencia de progenitores generados en el saco vitelino (ver más adelante).

### ***Origen pial***

Esta hipótesis fue inicialmente expuesta por del Río-Hortega (1932), que observó la presencia de numerosas células de aspecto redondeado, parecidas a leucocitos, en diferentes regiones de la superficie pial del cerebro en desarrollo (las telas coroideas y la pía del pedúnculo cerebral). Consideró que estas zonas de la piamadre eran los centros de génesis de las células microgliales, que denominó “fuentes de la microglía”. Desde ellas, los progenitores microgliales de las meninges invadían el SNC, dando lugar a la microglía ameboide, que se propagaba por todo el cerebro a través de la sustancia blanca, siguiendo diferentes

fascículos de fibras nerviosas, como el cuerpo caloso. Estudios posteriores basados en observaciones microscópicas del SNC en desarrollo de mamíferos y aves han apoyado esta hipótesis (Ashwell, 1991; Boya et al., 1979, 1991; Cuadros et al., 1993, 1994, 1997; Hirasawa et al., 2005). Otro apoyo indirecto al origen pial de la microglía deriva del estudio experimental llevado a cabo en parabiosis de embriones de pollo y codorniz comentado con anterioridad (Kurz y Christ, 1998).

La observación de células ameboides de la piamadre sorprendidas en el momento de atravesar la lámina basal de la superficie cerebral para incorporarse al parénquima nervioso (Boya et al., 1987; Cuadros et al., 1993, 1997; Cuadros y Navascués, 1998; Kaur et al., 2001; Navascués et al., 1996) constituye una evidencia más directa que avala el origen pial de la microglía. Otra evidencia directa de la entrada de precursores microgliales a través de la superficie pial del cerebro ha sido descrita en una investigación llevada a cabo en embriones de pez cebra, cuya transparencia permite observaciones *in vivo* mediante video-microscopía de interferencia diferencial (Herbomel et al., 2001). Este estudio permitió la observación de macrófagos que se diseminaban por el mesénquima cefálico que rodea al esbozo de cerebro y se adherían a la superficie pial, invadiendo seguidamente el parénquima nervioso. Con posterioridad, los macrófagos sufrían una transformación fenotípica para dar microglía ameboide.

En la hipótesis formulada por del Río-Hortega se defendía que las fuentes de la microglía corresponden a zonas muy restringidas de la superficie pial del cerebro. Sin embargo, observaciones posteriores sugieren que la entrada de progenitores microgliales no parece estar limitada a unas zonas tan restringidas, sino que hay una entrada difusa por toda la superficie pial de ciertas regiones cerebrales, añadida a la masiva entrada de progenitores en regiones específicas (Cuadros y Navascués, 1998).

La hipótesis del origen pial de la microglía propone que progenitores microgliales están presentes en el esbozo de piamadre en etapas tempranas del desarrollo, desde donde penetran en el SNC y lo colonizan. Sin embargo, esta

hipótesis no aclara la procedencia última de estos progenitores, una cuestión que ha sido abordada en recientes estudios que han propuesto la hipótesis del origen microglial a partir de progenitores generados en el saco vitelino.

### ***Origen de progenitores generados en el saco vitelino***

Aunque el origen de la microglía no es monocítico, su procedencia a partir de progenitores hematopoyéticos de tipo mieloide está sólidamente apoyada por diferentes estudios en ratones nulos para diferentes genes. Estos estudios, que son referidos seguidamente, demuestran la ausencia o drástica disminución de la microglía cuando no están presentes los factores y moléculas que intervienen en la generación y desarrollo de células mieloides. Por ejemplo, los ratones mutantes nulos para PU.1, que codifica un factor de transcripción necesario para el desarrollo de células mieloides, son incapaces de producir células mieloides y también carecen de microglía (Beers et al., 2006; Kierdorf et al., 2013; McKercher et al., 1996). El factor regulador de interferón 8 (Irf8) es otro factor de transcripción que participa en la regulación de los procesos de determinación y maduración de células mieloides y los ratones nulos para Irf8 también muestran alteraciones en el número de células microgliales, que está significativamente reducido (Kierdorf et al., 2013).

El factor de transcripción PU.1 interviene en los mecanismos de expresión del receptor del factor estimulante de colonias-1 (CSF-1, también conocido M-CSF), que es un factor de crecimiento hematopoyético implicado en la proliferación y diferenciación de células mieloides. Los ratones nulos para CSF-1 tienen disminuido el número de células microgliales (Kondo et al., 2007; Kondo y Duncan, 2009; Wegiel et al., 1998), mientras que los ratones nulos para el receptor de CSF-1 están totalmente desprovistos de microglía (Erblich et al., 2011; Ginhoux et al., 2010; Wieghofer et al., 2015). Un interesante estudio ha descrito recientemente la casi total eliminación de microglía en ratones adultos de una cepa normal tratados con inhibidores selectivos del receptor de CSF-1 y la recuperación de la misma mediante proliferación de progenitores nestina-positivos

después del cese del tratamiento con dichos inhibidores (Elmore et al., 2014). Así, este estudio demuestra que la señalización a través del receptor de CSF-1 es necesaria, no solo para la diferenciación de la microglía, sino también para su supervivencia en la edad adulta y que progenitores microgliales continúan estando presentes en el cerebro adulto. Por otra parte, el receptor de CSF-1 tiene un papel en el mecanismo de entrada de los progenitores microgliales en el SNC, ya que los progenitores microgliales se generan normalmente en un mutante de pez cebra desprovisto del gen para el receptor de CSF-1, pero la mayoría son incapaces de penetrar en el cerebro y la retina (Herbomel et al., 2001).

Los estudios anteriores demuestran el origen mieloide de la microglía, pero no ponen de manifiesto la naturaleza de los progenitores concretos de la misma. Sin embargo, los resultados de Alliot et al. (1999) apoyaban que la microglía deriva de células originadas en el saco vitelino y esta hipótesis se ha visto confirmada por recientes evidencias (Ginhoux et al, 2010; Kierdorf et al., 2013; Mizutani et al., 2012; Schulz et al., 2012). Así, está plenamente aceptado en la actualidad que la microglía deriva de progenitores mieloides generados en el saco vitelino en etapas muy tempranas del desarrollo, que dan lugar a los llamados macrófagos primitivos, los cuales penetran en el embrión e invaden el esbozo de SNC poco después de su generación en el saco vitelino, llegando a diferenciarse en microglía ramificada, que persiste hasta la edad adulta y se autopropaga mediante proliferación (ver revisiones de Arnold y Betsholtz, 2013; Ginhoux et al., 2013; Gomez-Perdiguero et al., 2013; Greter y Merad, 2013; Prinz y Mildner, 2011; Prinz y Priller, 2014; Ransohoff y Cardona, 2010; Saijo y Glass, 2011).

Los macrófagos primitivos son similares a los macrófagos de los tejidos adultos en su morfología, ultraestructura y actividad funcional, pero están presentes en el seno del mesénquima cefálico en etapas muy tempranas del desarrollo de peces (Herbomel et al., 1999, 2001), aves (Cuadros et al., 1992a, 1993; Martín-Partido et al., 1991) y mamíferos (Ginhoux et al., 2010; Sorokin et al., 1992), anteriores a la aparición del hígado y la médula ósea como órganos hematopoyéticos. Los macrófagos primitivos se diferencian a partir de células

madre hematopoyéticas del saco vitelino sin pasar por la fase de monocitos (Chan et al., 2007; Herbomel et al., 1999; Lichanska y Hume, 2000; Naito et al., 1996; Takahashi et al., 1989, 1996), lo que los distingue de los macrófagos que aparecen en etapas más avanzadas del desarrollo, cuando los órganos hematopoyéticos intraembrionarios ya están en funcionamiento.

Los macrófagos primitivos han recibido esta denominación en diferentes estudios (Andjelkovic et al., 1998; Bertrand et al., 2005; Gomez-Perdiguero et al., 2013; Ginhoux et al., 2010; Ransohoff y Perry, 2009), aunque otros autores los han referido con otros nombres, como macrófagos tempranos (Cuadros et al., 1993; Herbomel et al., 2001), macrófagos fetales (Streit, 2001), macrófagos primitivos/fetales (Sorokin et al., 1992) o microglía temprana (Schlegelmilch et al., 2011). Takahashi et al. (1996) han distinguido dos etapas en la formación de este tipo de macrófagos dentro del saco vitelino, denominando macrófagos primitivos a los que se encuentran en fase inmadura y macrófagos fetales a los que ya han madurado. Estudios más recientes indican que precursores eritromieloides del saco vitelino, negativos para el antígeno F4/80, dan lugar a progenitores mieloides inmaduros, negativos para F4/80 y el receptor CX<sub>3</sub>CR1, los cuales originan macrófagos primitivos maduros, positivos para F4/80 y CX<sub>3</sub>CR1 (Kierdorf et al., 2013), que colonizan el SNC. Nosotros aplicamos el nombre genérico de macrófagos primitivos a los macrófagos derivados del saco vitelino, independientemente de su grado de madurez.

Además de no pasar por la etapa de monocito durante su proceso de diferenciación, los macrófagos primitivos derivados del saco vitelino también se distinguen de los macrófagos del adulto porque la diferenciación de los primeros es independiente del factor de transcripción hematopoyético Myb, mientras que la génesis de los macrófagos definitivos sí depende de Myb (Gomez-Perdiguero et al., 2013; Schulz et al., 2013). Por otra parte, aunque inicialmente se pensaba que la generación de los macrófagos primitivos es independiente del factor PU.1 (Lichanska et al., 1999; Lichanska y Hume, 2000), recientes estudios han demostrado que los macrófagos primitivos son PU.1-dependientes, de forma

similar a los macrófagos adultos (Gomez-Perdiguero et al., 2013; Kierdorf et al., 2013; Schulz et al., 2013).

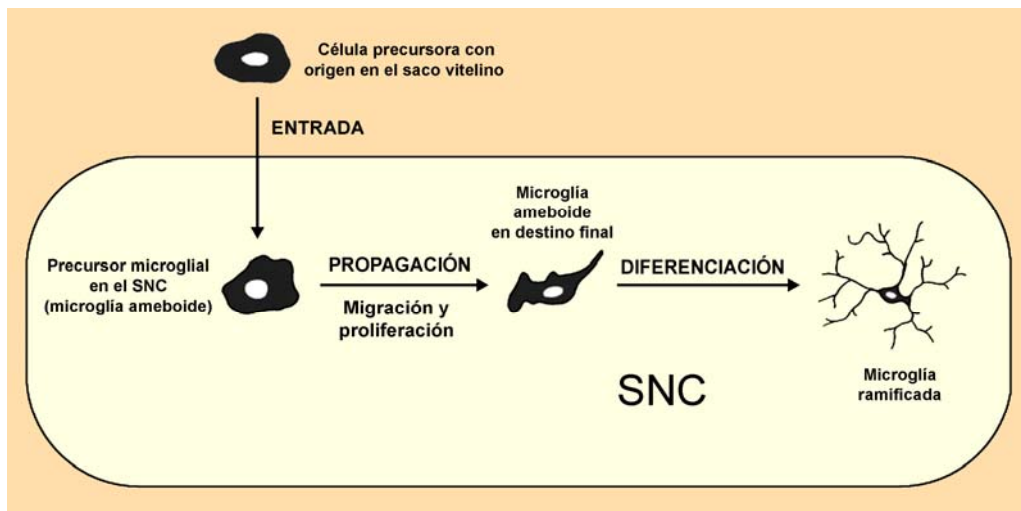
Los macrófagos primitivos se generan en etapas muy tempranas del desarrollo. Concretamente, en el ratón, comienzan a observarse en el saco vitelino a los 9 días de gestación (E9) (Takahashi et al., 1989), aunque un estudio posterior indica que su génesis se inicia en E8 (Bertrand et al., 2008). Con posterioridad, los macrófagos primitivos migran desde el saco vitelino a los tejidos intraembrionarios, incluyendo el mesénquima cefálico, y penetran en diferentes órganos (Cuadros et al., 1992a, 1993; Gomez-Perdiguero et al., 2013; Herbomel et al., 2001; Lichanska y Hume, 2000; Sorokin et al., 1992), comenzando por el SNC. Concretamente, empiezan a observarse en la cabeza del embrión de ratón en E9,75 (Gomez-Perdiguero et al., 2013) y están presentes en el interior de la retina neural en E10,5 (Rodríguez-Gallardo et al., 2005), justo después de la invaginación de las copas ópticas, mientras que en el cerebelo y cerebro anterior aparecen en E11 (Ashwell, 1990, 1991). En aves, la entrada de macrófagos primitivos en el rudimento cerebral ocurre en el estadio 15 de Hamburger y Hamilton (1992) (HH15), poco después de la primera observación de los mismos en el mesénquima cefálico, que tiene lugar en HH13 (Cuadros et al., 1993). Observaciones similares se han efectuado en embriones de pez cebra, en los que los macrófagos primitivos ya se observan en el mesénquima cefálico a las 22 horas post-fertilización y comienzan a colonizar la retina y el cerebro a las 35 horas post-fertilización (Herbomel et al., 2001).

Los macrófagos primitivos tienen gran capacidad proliferativa (Takahashi et al., 1989, 1996) que conservan después de penetrar en el SNC (Alliot et al., 1999; Cossman et al., 1997; Cuadros et al., 1993; Martín-Partido y Navascués, 1990; Sorokin et al., 1992; Svahn et al., 2013), permitiendo así el rápido incremento de esta población celular dentro del mismo. En etapas más avanzadas del desarrollo, los macrófagos primitivos del SNC se diferencian en microglía ramificada, tal como se ha comprobado *in vivo* mediante videomicroscopía del cerebro de pez cebra (Svahn et al., 2013), y continúan manteniendo su capacidad

proliferativa, que permite su autorenovación en la edad adulta (Ajami et al., 2007; Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2013; Greter y Merad, 2013; Lawson et al., 1992).

### Desarrollo de las células microgliales

El desarrollo de la microglía en el SNC puede dividirse en tres etapas: 1) entrada de los progenitores microgliales en el SNC en desarrollo; 2) propagación de los mismos dentro del SNC; y 3) diferenciación de los progenitores microgliales después de que hayan alcanzado su localización final (Navascués et al., 1996) (Fig. 6). Estos procesos han sido analizados en diferentes revisiones (Cuadros y Navascués, 1998; Harry y Kraft, 2012; Navascués et al., 1996, 2000; Pont-Lezica et al., 2011; Rezaie y Male, 1999; Tambuyzer et al., 2009).



**Fig. 6.** Esquema que representa las diferentes etapas del desarrollo de las células microgliales en el SNC. Tras entrar en el parénquima nervioso, las células microgliales ameboides colonizan todas las regiones del SNC mediante mecanismos de migración y proliferación. Finalmente, las células microgliales se diferencian, dando lugar a la microglía ramificada del SNC adulto (modificado de Cuadros y Navascués, 1998).



### ***Entrada de progenitores microgliales en el SNC***

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar las vías de entrada de los progenitores microgliales en el SNC. Una primera vía, que coincide con la propuesta inicialmente por del Río-Hortega, sería desde las meninges que rodean al SNC. En efecto, fagocitos presentes en las meninges atraviesan la superficie pial durante ciertas etapas del desarrollo, incorporándose al parénquima nervioso donde terminan diferenciándose en microglía. Estas observaciones han sido comentadas en el apartado anterior, al describir el posible origen pial de la microglía. Conviene destacar que la entrada de progenitores microgliales desde las meninges es perfectamente compatible con el origen microglial a partir de progenitores del saco vitelino, plenamente aceptado en la actualidad. Así, células procedentes del saco vitelino pueden colonizar inicialmente el tejido precursor de las meninges que rodea el esbozo del SNC y, desde allí, penetrar en el parénquima nervioso en etapas posteriores del desarrollo, tal como se ha observado *in vivo* en larvas de pez cebra (Herbomel et al., 2001) .

El ventrículo del SNC en desarrollo contiene numerosos fagocitos (Moos, 1995; Perry et al., 1985) que también pueden incorporarse al parénquima nervioso a través de la superficie apical del neuroepitelio (Cuadros et al., 1997; Kaur et al., 2001; Li et al., 1997), dando lugar a microglía ameboide. Estos fagocitos penetran en la cavidad ventricular en etapas muy tempranas del desarrollo, procedentes del mesénquima que rodea el esbozo cerebral (Martín-Partido y Navascués, 1990). Por lo tanto, las cavidades ventriculares del SNC constituyen una segunda vía de entrada de progenitores microgliales en el parénquima nervioso.

Los vasos sanguíneos pueden constituir una tercera vía de entrada de progenitores microgliales en el SNC. En apoyo de esta tercera vía, numerosos estudios han descrito una estrecha asociación topográfica entre vasos sanguíneos y células microgliales ameboides durante el desarrollo del SNC (Ashwell et al., 1989; Graeber et al., 1989; Kaur et al., 2001; Perry et al., 1985; Thomas, 1999). Esta asociación también puede ser reflejo de una función angiogénica de la microglía ameboide (ver más adelante en esta introducción) o de la utilización de

la red vascular como un sustrato para la migración de los progenitores microgliales desde el mesénquima cefálico (Navascués et al., 1996; Rezaie et al., 2005). Sin embargo, no es descartable que la asociación entre microglía ameboide y vasos sanguíneos en etapas tempranas del desarrollo esté relacionada con la entrada de progenitores microgliales derivados del saco vitelino a través de la circulación. En efecto, la colonización del SNC de ratón por macrófagos primitivos es dependiente de una circulación sanguínea funcional, ya que dichos macrófagos están ausentes en el SNC de embriones de ratón nulos para *Ncx-1*, los cuales carecen de circulación sanguínea funcional por falta de latido cardíaco (Ginhoux et al., 2010). Por el contrario, el transporte de macrófagos primitivos desde el saco vitelino hasta el rudimento de SNC parece ser independiente de la circulación sanguínea en el pez cebra y en aves (Ginhoux et al., 2013). Por lo tanto, no está suficientemente aclarado si los progenitores microgliales derivados del saco vitelino pueden entrar directamente en el parénquima nervioso a través de la circulación sanguínea o ésta solo es necesaria para la colonización del mesénquima cefálico, desde el que dichos progenitores tienen acceso al SNC a través de la superficie pial (Ginhoux et al., 2013).

### ***Propagación de la microglía en el SNC: migración y proliferación***

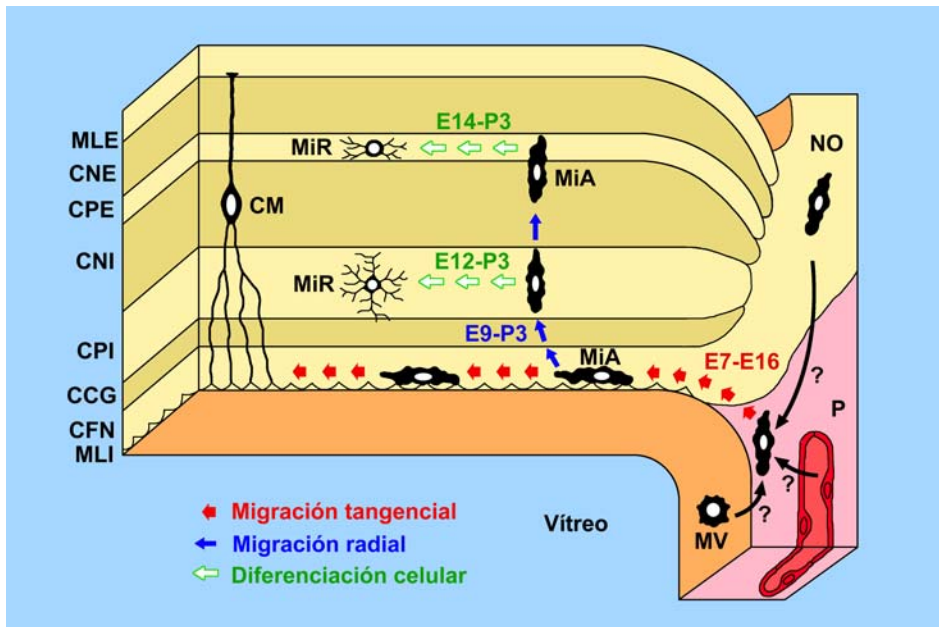
Una vez que los progenitores microgliales entran en el SNC, son conocidos como microglía ameboide y se propagan dentro del mismo hasta alcanzar sus localizaciones finales. La migración y la proliferación de la microglía ameboide son los dos mecanismos que contribuyen a dicha propagación. Estudios de nuestro laboratorio, llevados a cabo en regiones del SNC de embriones de codorniz con citoarquitectura laminar, tales como el techo óptico (Cuadros et al., 1994), el cerebelo (Cuadros et al., 1997) y la retina (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004), han demostrado que la **migración microglial** transcurre en dos etapas, que han sido denominadas migración tangencial y radial (Cuadros y Navascués, 2001; Navascués et al., 1996, 2000). La migración tangencial ocurre en primer lugar, es paralela a la

superficie pial y permite que las células microgliales se dispersen en un determinado nivel de profundidad de toda la extensión de la región colonizada. Seguidamente, la microglía ameboide sufre migración radial, que permite a las células microgliales moverse perpendicularmente desde la capa colonizada mediante migración tangencial hacia los diferentes niveles de profundidad de cada región del SNC.

La migración microglial está influenciada por el sustrato del SNC en desarrollo, algunos de cuyos elementos pueden actuar como guía mecánica (Cuadros y Navascués, 2001). En efecto, la microglía ameboide interacciona con distintos componentes del SNC, como fascículos axónicos, vasos sanguíneos y glía radial. Por ejemplo, las células microgliales migran con frecuencia a través de regiones de sustancia blanca que contienen numerosos axones orientados en la dirección de la migración, como ocurre en el techo óptico (Cuadros et al., 1994), cerebelo (Cuadros et al., 1997; Navascués et al., 1996), cerebro anterior (Verney et al., 2010) y retina (Cuadros y Navascués, 2001; Marín-Teva et al., 1998). La microglía ameboide también puede migrar asociada a la pared de vasos sanguíneos (Ashwell et al., 1989; Cuadros et al., 1993; Graeber et al., 1989; Grossmann et al., 2002; Kaur et al., 2001; Navascués et al., 1996; Perry et al., 1985; Rezaie y Male, 1999; Rezaie et al., 2005; Thomas, 1999; Svahn et al., 2013) y a la glía radial (Dalmau et al., 1997; Rezaie y Male, 1999; Rigato et al., 2011). La asociación de la microglía con axones, vasos sanguíneos y glía radial sugiere que estos tres elementos podrían actuar como guía mecánica durante la migración microglial (Cuadros y Navascués, 1998, 2001; Rezaie y Male, 1999).

La retina de codorniz ha sido utilizada en nuestro laboratorio como un modelo idóneo para estudiar la migración de la microglía ameboide, ya que carece de vasos sanguíneos, su distribución en capas facilita la identificación de los diferentes niveles de migración y el anticuerpo QH1 (que solo funciona en codorniz) permite el reconocimiento específico de las células microgliales. La microglía ameboide entra en la retina desde la zona central, ocupada por la CNO/BP, entre 7 y 16 días de incubación (E7-E16) y migra tangencialmente en

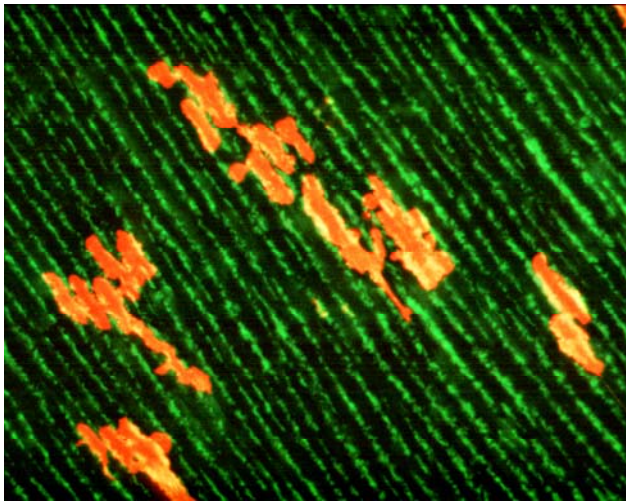
dirección centro-periférica (Navascués et al., 1995), desplazándose sobre fascículos axónicos de la CFN y sobre los pies terminales de las células de Müller (Marín-Teva et al., 1998). Desde E9 hasta la mitad de la primera semana post-eclosión, la microglía ameboide migra radialmente en dirección vítreo-escleral para alcanzar la CPI, primero, y la CPE, después, donde se diferencia en microglía ramificada (Marín-Teva et al., 1999c; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004) (Fig. 7).



**Fig. 7.** Esquema que representa la entrada de progenitores microgliales en la retina de codorniz desde el pecten (P) y cabeza del nervio óptico (NO), así como la cronología (E: día de incubación; P: día post-eclosión) y las capas retinianas donde tiene lugar la migración tangencial (flechas rojas) y radial (flechas azules) de la microglía ameboide (MiA) y la diferenciación (flechas verdes) de la microglía ramificada (MiR). CM: célula de Müller; MLI: membrana limitante interna; CFN: capa de fibras nerviosas; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; MLE: membrana limitante externa. Modificado de Navascués et al. (1995).

Las células microgliales ameboides que migran tangencialmente en la parte vítreo de la retina embrionaria de codorniz muestran una morfología alargada característica, frecuentemente orientada en el sentido de la migración,

con extensos lamelipodios que emergen desde el soma o desde prolongaciones cortas y gruesas (Marín-Teva et al., 1998) (Fig. 8). Los lamelipodios muestran una distribución polarizada, predominando en uno u otro extremo de la célula, lo que sugiere un mecanismo de migración parecido al de los fibroblastos en cultivo, que incluye la extensión polarizada de lamelipodios en el borde delantero de la célula, anclaje de la célula al sustrato, traslocación hacia delante del soma celular y retracción de la parte trasera de la célula. Además, aunque la migración es, en conjunto, centro-periférica, una célula microglial concreta muestra movimientos estocásticos hacia delante y hacia atrás e interacciones repulsivas con células microgliales vecinas (Marín-Teva et al., 1998; Carrasco, 2012), similares a las descritas en las células de Cajal-Retzius de la corteza cerebral (Villar-Cerviño et al., 2013).



**Fig. 8.** Células microgliales ameboides (rojo), provistas de extensos lamelipodios, que están migrando en la parte vítrea de la retina de un embrión de codorniz, siguiendo la dirección de los surcos limitados lateralmente por prolongaciones radiales de células de Müller (verde). Tomada de Marín-Teva et al. (1999b).

En el transcurso de su migración, la microglía ameboide interacciona con las células de Müller de la retina, tanto durante la migración tangencial como durante la migración radial. Así, las células microgliales migran tangencialmente a través de los surcos ocupados por fascículos de axones, que están delimitados lateralmente por las prolongaciones radiales de las células de Müller y tapizados por los pies terminales de las mismas, con los que establecen estrechos contactos (Marín-Teva et al., 1998). Este microambiente geométricamente estructurado de

la retina es responsable de la ya citada morfología alargada de la microglía ameboide en proceso de migración tangencial, ya que la microglía cultivada sobre un sustrato artificial microestructurado en forma de líneas muestra una morfología similar (Amadio et al., 2013). Además, el microambiente orientado actúa como una guía mecánica de la microglía ameboide, facilitando la dispersión de ésta en toda la extensión de la retina. Esta hipótesis está avalada por el hecho de que la microglía ameboide del margen de la retina migra circunferencialmente en vez de centro-periféricamente, coincidiendo con un cambio en la orientación de los surcos, que también es circunferencial en esta región marginal (Marín-Teva et al., 1999b). Por otra parte, la distribución radial de la glía de Müller en forma de empalizada contribuye a la migración radial de las células microgliales, que utilizan las prolongaciones de dicha glía como sustrato al que se adhieren para saltar desde la parte vítrea hacia las capas plexiformes (Navascués et al., 1996; Sánchez-López et al., 2004). La microglía ameboide del cerebro y la médula espinal migra adherida a la glía radial (Rezaie y Male, 1999), que es equivalente a la glía de Müller de la retina, sugiriendo que los conocimientos sobre la migración microglial descubiertos en el modelo de la retina podrían ser extensibles a otras partes del SNC.

Además de su actividad migratoria, la microglía ameboide muestra una considerable **actividad proliferativa**, que también contribuye a su propagación por toda la extensión del SNC. Dicha actividad proliferativa ha sido evidenciada por: a) la observación de células microgliales ameboides en mitosis (Marín-Teva et al., 1999a; Schnitzer, 1989; Svahn et al., 2013; Wu et al., 1996); b) la observación *in vivo* mediante videomicroscopía de células microgliales que se están dividiendo (Ginhoux et al., 2010); c) la expresión de los antígenos de proliferación PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”) (Alliot et al., 1999; Dalmau et al., 2003; Marín-Teva et al., 1999a; Rezaie y Male, 1999; Vela-Hernández et al., 1997) y Ki67 (Monier et al., 2006; Zusso et al., 2012) en la microglía ameboide; y d) el análisis de la cinética de crecimiento de la población microglial a lo largo del desarrollo (Alliot et al., 1999). La actividad proliferativa

de la microglía inmadura se va reduciendo progresivamente conforme avanza el desarrollo (Marín-Teva et al., 1999a; Zusso et al., 2012), llegando a ser muy limitada en el SNC adulto, cuando la microglía está totalmente diferenciada (Ginhoux et al., 2010; Lawson et al., 1992).

Los mecanismos moleculares que regulan la proliferación microglial durante la colonización del SNC en desarrollo no han sido suficientemente aclarados hasta el momento, aunque diversos estudios sugieren la participación de diferentes factores moleculares solubles en dicha regulación. Entre las moléculas que estimulan la proliferación microglial durante el desarrollo del SNC destacan algunas citoquinas, como CSF-1, GM-CSF (“granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”) e interleuquina 3 (IL-3, también llamada “multipotential-CSF”). La implicación de CSF-1 en la proliferación microglial está apoyada por el hecho de que los ratones nulos para CSF-1 muestran un número de células microgliales significativamente menor que la cepa silvestre (Kondo et al., 2007; Kondo y Duncan, 2009; Wegiel et al., 1998), lo que puede ser explicado por una menor tasa de proliferación microglial durante el desarrollo. En concordancia con este hecho, ratones transgénicos que sobreexpresan CSF-1 tienen un número de células microgliales que duplica el de los controles, aparentemente promovido por la estimulación de la proliferación microglial (De et al., 2014). Estudios *in vitro* han demostrado que el CSF-1 induce proliferación de células microgliales, mientras que ésta se ve significativamente reducida por el tratamiento con antisuero anti-CSF-1 (Alliot et al., 1991; Sawada et al., 1990). El efecto mitogénico de otras citoquinas, como GM-CSF e IL-3, sobre la microglía ameboide aislada de ratas recién nacidas también ha sido demostrado *in vitro* (Giulian e Ingeman, 1988). Por otra parte, neurotrofinas, como BDNF (“brain-derived neurotrophic factor”) y neurotrofina 3 (NT-3) son expresadas por la microglía ameboide pero no por la microglía ramificada (Elkabes et al., 1996) y podrían tener un papel en la proliferación microglial durante el desarrollo. Diferentes estudios *in vitro* ofrecen resultados parcialmente contradictorios, ya que BDNF siempre promueve la proliferación microglial (Elkabes et al., 1996;

Zhang et al., 2003; Gomes et al., 2013), mientras que NT-3 puede estimularla (Elkabetz et al., 1996) o no (Zhang et al., 2003) dependiendo del modelo *in vitro* utilizado. Un reciente estudio *in situ* ha demostrado que la proliferación de la microglía ameboide en la médula espinal de embriones de ratón está mediada por el receptor purinérgico P2X7R (Rigato et al., 2012), sugiriendo la posible implicación de su ligando, el ATP, en dicha proliferación.

La mayor o menor proliferación de la microglía ameboide durante el desarrollo del SNC probablemente depende de la acción combinada de diferentes factores, que pueden ser estimulantes, como los ya indicados, pero también inhibidores (Navascués et al., 2000). Un reciente estudio ha demostrado que el factor de transcripción Runx1, que regula la proliferación y diferenciación de células mieloides, es expresado en la microglía ameboide del telencéfalo de ratón durante las dos primeras semanas postnatales y participa en los mecanismos de inhibición de la proliferación microglial (Zusso et al., 2012).

### ***Diferenciación de la microglía***

Aunque la relación entre microglía ameboide y microglía ramificada llegó a ser objeto de debate, actualmente se acepta que esta última deriva de la diferenciación de las células microgliales ameboides (Barron, 1995; Cuadros y Navascués, 1998; Hirasawa et al., 2005; Ling y Wong, 1993; Perry y Gordon, 1991; Rezaie y Male, 1999). Este hecho es apoyado por la existencia de formas intermedias entre ambos estados de la microglía (Ling y Wong, 1993; Navascués et al., 1995; Perry et al., 1985; Rezaie y Male, 1999; Wu et al., 1994) y ha sido confirmado en el cerebro en desarrollo del pez cebra mediante observación con videomicroscopía a lapsos de tiempo de la transición entre microglía ameboide y ramificada (Svahn et al., 2013). La diferenciación microglial se completa cuando las células microgliales ameboides ya han alcanzado su localización definitiva, pero el comienzo del proceso de ramificación tiene lugar coincidiendo con los momentos finales de su migración (Sánchez-López et al., 2004). Una vez diferenciada, la microglía ramificada muestra una distribución territorial, en la que



cada célula extiende sus prolongaciones en un territorio definido que no se solapa con territorios de células adyacentes (Davalos et al., 2005; Fontainhas et al., 2011; Jinno et al., 2007; Navascués et al., 1994; Nimmerjahn et al., 2005; Walker et al., 2014). Esta distribución parece estar mediada por la existencia de fuerzas repulsivas basadas en la inhibición por contacto mostrada por la microglía (Carrasco et al., 2011; Jinno et al., 2007).

Durante su diferenciación, las células microgliales sufren cambios de expresión génica responsables de modificaciones de su inmunofenotipo, con la desaparición o disminución de ciertas moléculas y la aparición o el aumento de otras. Así, por ejemplo, la expresión de diferentes marcadores antigénicos, como CD11b, CD45 o CD68, que es elevada en la microglía ameboide, disminuye durante su transformación en microglía ramificada (Cuadros y Navascués, 1998; Hutchins et al., 1990; Ling y Wong, 1993; Monier et al., 2006; Rezaie et al., 2005; Rezaie y Male, 1999; Salimi y Humpel, 2002; Tambuyzer et al., 2009). Lo mismo ocurre con las glicoproteínas puestas de manifiesto por la isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* (Wu et al., 1994) y con ciertas enzimas, como la 5'-nucleotidasa (Dalmau et al., 1998). Por el contrario, otras moléculas, como el queratán-sulfato, que no están presentes en la microglía ameboide, sí aparecen en la microglía ramificada (Bertolotto et al., 1995). Por otra parte, la transición de microglía ameboide a ramificada va acompañada de una profunda reorganización del citoesqueleto microtubular (Fanarraga et al., 2009; Ilschner y Brandt, 1996).

En un interesante estudio, el transcriptoma de la microglía del cuerpo calloso de la rata era recientemente analizado, comparando el de la microglía ameboide de crías postnatales con el de la microglía ramificada de animales adultos (Parakalan et al., 2012). Dicho estudio demuestra que la microglía ameboide expresa genes relacionados con la proliferación (Myc), muerte (Apaf-1) y migración (Dcx) celular, que no se expresan en la microglía ramificada. Por el contrario, genes relacionados con la transmisión sináptica (Grin2c) y la ramificación (Lsp1), que no se expresan en la microglía ameboide, sí lo hacen en la microglía ramificada. Además, los genes Mcl1 e Id2, implicados en la

diferenciación celular, se expresan en la microglía ameboide, pero no en la ramificada, sugiriendo su participación en el proceso de maduración de la microglía. Los cambios de expresión génica durante la diferenciación microglial están controlados por la acción de factores de transcripción, como Runx1 (Zusso et al., 2012). A su vez, los factores de transcripción implicados en los mecanismos de diferenciación de las células microgliales parecen estar regulados por microRNAs, como miR-124 (Ponomarev et al., 2013).

La diferenciación de la microglía está influenciada por las condiciones microambientales del SNC, lo que explica que distintas regiones cerebrales muestren diferencias en la morfología y densidad de la microglía madura (Jinno et al., 2007; Lawson et al., 1990; Vela et al., 1995) y en el momento de maduración microglial (Wu et al., 1993). Los factores microambientales que intervienen en la señalización de la diferenciación microglial no están suficientemente aclarados. Entre dichos factores, se han señalado moléculas del suero, astrocitos, matriz extracelular y neuronas (ver revisiones de Lima et al., 2009; Navascués et al., 2000; Tambuyzer et al., 2009). Los componentes del suero inhiben la ramificación microglial (Chamak y Mallat, 1991; Fujita et al., 1996), lo que explicaría que las células microgliales de regiones cerebrales expuestas a dichos componentes sean menos ramificadas que la microglía de regiones con una barrera hematoencefálica hermética (Perry y Gordon, 1991). Por lo tanto, la maduración de la barrera hematoencefálica podría favorecer la diferenciación de la microglía ameboide en microglía ramificada. Los resultados de diversos estudios *in vitro* sugieren que los astrocitos también podrían ejercer una influencia reguladora de la diferenciación microglial durante el desarrollo del SNC. Así, la microglía ameboide aislada adquiere un fenotipo ramificado cuando es co-cultivada con astrocitos (Giulian et al., 1995; Kalla et al., 2003; Rosenstiel et al., 2001). La inducción de la ramificación microglial depende tanto de un contacto directo con astrocitos (Tanaka y Maeda, 1996) como de la liberación de factores solubles por parte de éstos (Schilling et al., 2001; Walker et al., 2014). Además, los astrocitos pueden segregar moléculas de matriz extracelular, como fibronectina, que parecen

estimular la ramificación microglial (Tanaka et al., 1999). No obstante, el efecto de las moléculas de matriz extracelular sobre la microglía todavía no está suficientemente aclarado. Por ejemplo, la fibronectina parece promover la ramificación microglial en algunos modelos experimentales *in vitro* (Chamak y Mallat, 1991) pero no en otros (Pöttler et al., 2006). Por último, el estado ramificado de la microglía también es inducido y mantenido mediante contacto con neuronas a través de interacciones entre moléculas expresadas en la superficie de éstas (como CD200 o CX<sub>3</sub>CL1) y sus correspondientes receptores de la membrana microglial (ver más adelante en esta Introducción).

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

La microglía ha sido tradicionalmente relacionada con funciones propias del sistema inmune, tales como la fagocitosis de microorganismos patógenos y de restos de células muertas. Según esta concepción, la actividad microglial estaba básicamente asociada a estados patológicos. Sin embargo, en la actualidad, está claramente establecido que, además de estas funciones, la microglía desempeña otros papeles no asociados a patologías, de gran importancia para la fisiología del SNC en estado de salud, tanto en la edad adulta como durante el desarrollo embrionario y postnatal. Seguidamente se hace un breve resumen de las diferentes funciones que las células microgliales desempeñan en el SNC adulto y en desarrollo.

#### ***Funciones en el SNC adulto***

##### **1. Vigilancia del estado funcional del SNC.**

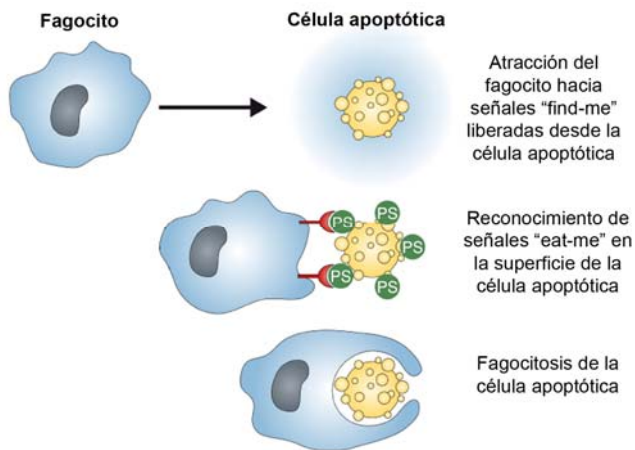
En el cerebro adulto normal, las células microgliales ramificadas muestran una continua actividad de vigilancia del microambiente que las rodea mediante la extensión y retracción de finas prolongaciones extremadamente móviles (Dávalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Mediante este mecanismo, la microglía ramificada es capaz de vigilar el buen funcionamiento de los diferentes componentes celulares del SNC para mantener la homeostasis cerebral (Fetler y

Amigorena, 2005; Kettenmann et al., 2013; Nayak et al., 2014; Wake et al., 2011). Las células microgliales presentan en su superficie una gran variedad de receptores (Kettenmann et al., 2011) que les permiten reconocer una gran diversidad de señales procedentes del medio extracelular, tales como moléculas de superficie y ADN/ARN de origen viral, bacteriano o fúngico, péptidos endógenos anormales, factores del complemento, anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, factores neurotróficos, moléculas relacionadas con la neurotransmisión, componentes del plasma, etc. (Hanisch y Kettenmann, 2007; Pocock y Kettenmann, 2007). Una vez reconocidas las diferentes señales, la microglía proporciona la respuesta adecuada a la situación funcional detectada, que puede implicar su activación en el caso de situaciones patológicas o la conservación del estado ramificado en situaciones homeostáticas. Así, la microglía es considerada en la actualidad como un sensor microambiental del SNC, que actúa tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Barres, 2008; Hanisch y Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2013).

## 2. Fagocitosis de patógenos y células muertas.

Una de las funciones atribuidas tradicionalmente a la microglía es su participación en la defensa inmune del cerebro frente a una situación patológica. La defensa inmune innata del SNC incluye la identificación y eliminación mediante fagocitosis de agentes extraños o potencialmente nocivos. Así, las células microgliales son consideradas como los fagocitos del SNC, capaces de activarse en respuesta a un patógeno o un daño, cambiando su fenotipo morfofuncional para facilitar la eliminación mediante fagocitosis de los agentes desencadenantes de la activación. La eficiencia fagocítica de la microglía tras un episodio de infección o daño juega un papel esencial para desencadenar la posterior reparación y reorganización de circuitos neurales (Eyo y Dailey, 2013), de manera que una insuficiente fagocitosis microglial parece contribuir a ciertas enfermedades degenerativas crónicas (Lauber et al., 2004; Napoli y Neumann, 2009; Neumann et al., 2009). Las células diana (microorganismos o células dañadas) liberan moléculas conocidas como señales “find-me” (Lauber et al.,

2004; Ravichandran, 2010, 2011), capaces de atraer células microgliales al foco de infección o daño, facilitando una mayor eficiencia en la eliminación fagocítica de dichas células diana gracias al incremento del número de fagocitos. Cuando alcanza a las células diana, la microglía reconoce señales de superficie de las mismas, conocidas como señales “eat-me” (Fig. 9), que inducen el proceso de fagocitosis (Brown y Neher, 2012). La señal “eat-me” mejor caracterizada es la externalización de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática de células apoptóticas (Fadok et al., 2001; Gardai et al., 2005; Ravichandran, 2010, 2011), que es reconocida por receptores específicos de las células microgliales (ver el apartado “señales de activación microglial y receptores relacionados” de esta introducción).



**Fig. 9.** Etapas de la fagocitosis de células apoptóticas llevada a cabo por fagocitos, como la microglía. Las células apoptóticas liberan señales “find-me”, que atraen a los fagocitos, y seguidamente muestran señales “eat-me” que inducen la fagocitosis. Modificada de Ravichandran (2010).

La dinámica de la fagocitosis microglial de células muertas ha sido estudiada mediante videomicroscopía de los movimientos de la microglía en cultivos organotípicos de rebanadas de tejido cerebral (Brockhaus et al., 1996; Petersen y Dailey, 2004) y en el cerebro de larvas de pez cebra (Peri y Nüsslein-Volhard, 2008), cuya transparencia permite la observación microscópica directa. Estos estudios han comprobado que las células microgliales engloban los restos de células muertas con las que establecen contacto, dando lugar a fagosomas. A veces, las células microgliales pueden extender una fina prolongación hacia una

célula muerta localizada a considerable distancia, la cual es englobada en el extremo de la prolongación microglial. Seguidamente, la prolongación se retrae y la vesícula fagosómica queda incorporada en el soma de la célula microglial. Diferentes fagosomas de una misma célula microglial se fusionan entre sí, antes de que el fagosoma resultante se fusione con lisosomas para dar una vacuola digestiva (Peri y Nüsslein-Volhard, 2008).

Aunque lo más frecuente es que la fagocitosis de células diana tenga lugar tras la activación microglial, ésta no parece ser un requisito imprescindible para la fagocitosis. Esta idea está avalada por el hecho de que las células microgliales ramificadas del hipocampo adulto son capaces de fagocitar una gran cantidad de neuroblastos apoptóticos en la zona subgranular del giro dentado, donde la neurogénesis se mantiene en la edad adulta (Sierra et al., 2010). La fagocitosis de los neuroblastos apoptóticos se lleva a cabo mediante englobamiento de los mismos en los extremos de finas prolongaciones de la microglía ramificada, sin que ésta sufra activación. El descubrimiento de Sierra et al. (2010) también demuestra que la fagocitosis microglial tiene un papel decisivo en la homeostasis de la neurogénesis adulta.

### 3. Inducción de muerte de neuronas viables (fagoptosis).

La microglía activada también puede fagocitar neuronas viables, que son inducidas a morir como consecuencia de la fagocitosis, un proceso que ha sido denominado fagoptosis (Brown y Neher, 2012, 2014). El proceso de la fagoptosis es reversible, como se ha demostrado en experiencias *in vitro*, en las que el bloqueo de la vía fagocítica es suficiente para rescatar de la muerte a la mayoría de las neuronas que mueren (Neher et al., 2011). La fagoptosis parece ser consecuencia de la exposición de señales “eat-me”, como la fosfatidilserina, en la cara externa de la membrana plasmática de neuronas estresadas, aunque todavía viables (Jitkaew et al., 2009; Kim et al., 2010; Neher et al., 2011; Tyurina et al., 2007). Dicha exposición está mediada por ROS liberadas por la microglía activada bajo condiciones inflamatorias (Neher et al., 2011; Neniskyte et al., 2011). Aunque la fagoptosis por parte de macrófagos parece contribuir a la

renovación fisiológica de muchos tipos celulares del organismo, la fagoptosis de neuronas favorecida por un estado de inflamación en el SNC puede contribuir al desarrollo de patologías neurodegenerativas (Brown y Neher, 2012). Así, por ejemplo, la microglía parece inducir la muerte de motoneuronas en la esclerosis lateral amiotrófica (Frakes et al., 2014).

#### 4. Regulación de la plasticidad sináptica.

En los últimos años, diferentes estudios han demostrado la existencia de interacciones entre las células microgliales y las sinapsis neuronales, que son esenciales para la homeostasis y remodelación de los circuitos neurales (revisado en Morris et al., 2013; Salter y Beggs, 2014; Schafer et al., 2013; Tremblay et al., 2011; Wake et al., 2011, 2013). La permanente motilidad de las finas prolongaciones de la microglía ramificada (o vigilante) (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005) permite el establecimiento de contactos transitorios con sinapsis de sus inmediaciones, a través de los cuales la microglía examina el estado funcional de la neurotransmisión, actuando como un sensor sináptico (Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2009). A su vez, la transmisión sináptica es capaz de influir en la motilidad de las prolongaciones de la microglía ramificada. Así, la neurotransmisión glutamatérgica incrementa la motilidad microglial, mientras que la GABAérgica la disminuye (Fontainhas et al., 2011). Cuando la actividad neurotransmisora es alterada experimentalmente, la motilidad microglial también se ve afectada. Por ejemplo, la privación visual induce una disminución de la motilidad microglial y una mayor frecuencia de los contactos microglía-sinapsis en la corteza visual (Tremblay et al., 2010), mientras que los episodios isquémicos incrementan la duración de dichos contactos (Wake et al., 2009). Todos estos descubrimientos han llevado a cambiar la noción de sinapsis, en la que, junto a los tradicionales componentes presináptico, postsináptico y astrocítico, se ha propuesto incluir un componente microglial (Schafer et al., 2013; Ziebell et al., 2014).

Cuando la eficacia sináptica es muy baja, la microglía puede llegar a eliminar la sinapsis mediante englobamiento y fagocitosis de los componentes

neuronales de la misma (Morris et al., 2013; Tremblay et al., 2010, 2011), contribuyendo así a la llamada plasticidad sináptica disparada por actividad que permite modificar circuitos neurales durante los procesos de aprendizaje y memoria (Morris et al., 2013; Salter y Beggs, 2014; Tremblay et al., 2010, 2011, 2014; Wake et al., 2013). Además de su participación en la eliminación de sinapsis, la microglía también contribuye en los mecanismos de aprendizaje y memoria promoviendo la formación de nuevas sinapsis a través de la liberación de factores neurotróficos como BDNF (Parkhurst et al., 2013). En apoyo de la participación de la microglía en la regulación de la plasticidad sináptica disparada por actividad, ésta se ve seriamente alterada en ratones transgénicos en los que la microglía también ha sido alterada. Esto ocurre tanto en ratones deficientes en factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) en el SNC (Koeglsperger et al., 2013), que carecen de microglía (Butovsky et al., 2014), como en ratones nulos para el receptor CX<sub>3</sub>CR1 (Rogers et al., 2011), en los que la microglía carece de este receptor específico. Por otra parte, un exceso de actividad sináptica, como la que tiene lugar en situaciones de estrés, también contribuye a alterar la estructura y función microglial (Walker et al., 2013).

#### 5. Desnudamiento (“stripping”) sináptico de neuronas dañadas.

Otra forma de interacción de la microglía con las sinapsis neuronales es el llamado desnudamiento (“stripping”) sináptico, que lleva a cabo la microglía activada en situaciones de daño neuronal (ver revisiones de Salter y Beggs, 2014; Wake et al., 2013). Mediante este mecanismo, la microglía activada elimina los contactos sinápticos de la superficie del soma de neuronas dañadas, contribuyendo a evitar la hiperactivación de las mismas para facilitar su supervivencia (Chen et al., 2014; Trapp et al., 2007; Wake et al., 2013). El “stripping” sináptico ha sido estudiado principalmente en el núcleo del nervio facial tras axotomía del nervio (Blinzinger y Kreutzberg, 1968; Moran y Graeber, 2004; Sajjan et al., 2014), aunque también ha sido demostrado en otras regiones cerebrales lesionadas, como la corteza cerebral inflamada (Trapp et al., 2007). Sin embargo, en modelos de



patologías neurodegenerativas crónicas, la microglía no parece llevar a cabo el “stripping” sináptico (Perry y O’Connor, 2010).

### ***Funciones en el SNC en desarrollo***

La microglía ameboide o inmadura, con morfología redondeada y provista de numerosos lamelipodios, predomina durante el desarrollo del SNC. Además de su intensa actividad migratoria, que facilita su propagación por todas las regiones del SNC, la microglía ameboide desempeña funciones esenciales para el desarrollo de éste, que se describen seguidamente.

#### **1. Fagocitosis de células muertas.**

Una de las primeras funciones reconocidas a la microglía ameboide durante el desarrollo del SNC ha sido la rápida fagocitosis y eliminación de las células que sufren apoptosis durante el proceso de muerte celular programada. Cuando las células mueren, liberan al medio sustancias citotóxicas que pueden dañar células cercanas. Por lo tanto, la rápida y eficiente fagocitosis de estas células es esencial para el correcto desarrollo del SNC. Numerosos estudios han demostrado que las células microgliales eliminan neuronas apoptóticas en diferentes etapas del desarrollo, aunque la contribución microglial a esta función varía en diferentes especies, etapas del desarrollo y regiones del SNC (revisado en Marín-Teva et al., 2014). Además, la fagocitosis microglial ha sido analizada *in vivo* mediante videomicroscopía durante el desarrollo de larvas de pez cebra (Peri y Nüsslein-Volhard, 2008; Svahn et al., 2013). La señalización molecular implicada en la fagocitosis microglial durante el desarrollo normal del SNC no es conocida con exactitud, pero se ha supuesto que las señales “find-me” y “eat-me” son similares a las que participan en la fagocitosis llevada a cabo por otros fagocitos en otros órganos, incluyendo la microglía activada en situaciones patológicas del SNC adulto (ver Marín-Teva et al., 2014).

#### **2. Inducción de la apoptosis neuronal.**

La microglía inmadura no solo fagocita restos de células muertas sino que es capaz de inducir activamente la apoptosis neuronal. Durante el desarrollo, se

generan más neuronas de las que sobreviven en el adulto, como consecuencia de que muchas de ellas mueren durante el proceso de muerte celular programada, que es clave para el correcto desarrollo del SNC (Oppenheim, 1991; Kuan et al., 2000; Yuan y Yankner, 2000). La activa implicación de la microglía en la inducción de la muerte neuronal ha sido demostrada en diferentes regiones del SNC en desarrollo (ver revisiones de Bessis et al., 2007; Mallat et al., 2005; Marín-Teva et al., 2011, 2014; Schlegelmilch et al., 2011). Numerosos estudios han demostrado que la llegada de la microglía inmadura al SNC coincide cronológicamente con la presencia de neuronas apoptóticas (Ashwell, 1989; Dalmau et al., 1998; Marín-Teva et al., 2004; Peri y Nüsslein-Volhard, 2008; Rigato et al., 2011; Svahn et al., 2013; Wakselman et al., 2008). Aunque este hecho no demuestra que la microglía tenga un papel inductor en la muerte neuronal, varios estudios experimentales sí lo han apoyado. Así, cuando la retina del embrión de pollo es aislada y cultivada antes de la entrada y colonización de la microglía, la muerte celular que ocurre durante el desarrollo normal de la retina se reduce sustancialmente (Frade y Barde, 1998). El NGF (“nerve growth factor”) segregado por la microglía inmadura y adherido a su superficie parece participar en los mecanismos de inducción de la muerte de células retinianas (Frade y Barde, 1998). En el cerebelo de ratón en desarrollo, un número significativo de células de Purkinje sufren muerte celular apoptótica durante la primera semana posnatal. En explantes de cerebelo en desarrollo cultivados *in vitro*, la eliminación de la microglía mediante tratamiento con liposomas cargados de clodronato incrementa drásticamente la supervivencia de las células de Purkinje, sugiriendo la implicación de la microglía en la muerte de las mismas (Marín-Teva et al., 2004). En este caso, la liberación de ión superóxido ( $O_2^-$ ) por la microglía participa en el mecanismo de la muerte neuronal. La participación de la microglía en la muerte neuronal también se ha demostrado en el hipocampo de roedores, en donde hay un pico de muerte neurotrófica en etapas perinatales, coincidiendo con una estrecha relación topográfica entre células microgliales y neuronas caspasa 3-positivas (Wakselman et al., 2008). Los resultados de este estudio demostraron que la microglía requiere

de la integrina CD11b y del inmunoreceptor DAP12 para inducir la muerte de las neuronas y que, igual que en el cerebelo, la producción de  $O_2^-$  por la microglía está implicada en el mecanismo de muerte. Recientes evidencias también han mostrado una estrecha correlación entre la acumulación de microglía y la muerte neuronal durante el desarrollo de la médula espinal (Rigato et al., 2011) y la corteza cerebral (Swinnen et al., 2013), aunque los factores implicados en el mecanismo de muerte no han sido analizados en estas regiones del SNC.

### 3. Participación en la sinaptogénesis.

La microglía inmadura ejerce un papel en el proceso de poda (“pruning”) de las sinapsis neuronales, que tiene lugar durante el desarrollo normal del SNC. En etapas tempranas del desarrollo se forman muchas más sinapsis inmaduras de las funcionalmente necesarias. El exceso inicial de sinapsis es posteriormente eliminado mediante un proceso de poda de sinapsis inapropiadas, facilitando el establecimiento de circuitos neurales funcionales (Hua y Smith, 2004). En los últimos años, diferentes estudios han demostrado la participación de la microglía inmadura en este proceso (ver revisiones de Kettenmann et al., 2013; Miyamoto et al., 2013; Salter y Beggs, 2014; Schafer et al., 2013; Stephan et al., 2012; Tremblay et al., 2011, 2014; Wake et al., 2013). Durante el desarrollo del hipocampo, se ha comprobado que la microglía elimina sinapsis mediante fagocitosis (Paolicelli et al., 2011). Además, en ratones nulos para el receptor  $CX_3CR1$ , específico de la microglía, el número de células microgliales se reduce transitoriamente coincidiendo con una disminución de la poda sináptica (Paolicelli et al., 2011). Estos resultados sugieren que la interacción de la quimioquina  $CX_3CL1$  con su receptor  $CX_3CR1$  juega un papel importante en el control de la poda sináptica. Otros estudios llevados a cabo en el sistema retino-geniculado del ratón (Bialas y Stevens, 2013; Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007) han demostrado que la interacción de los componentes C3 y C1q del complemento, que son abundantes en los componentes sinápticos, con su receptor específico, expresado en la superficie de las células microgliales, también participa en los mecanismos de fagocitosis de los terminales presinápticos por parte de la

microglía. Se ha sugerido que una disfunción de la microglía en la poda sináptica podría ser causa de enfermedades neurales (Miyamoto et al., 2013). Recientes estudios apoyan que esta disfunción microglial podría participar en diferentes enfermedades nerviosas como el autismo (Nardone et al., 2014; Zhan et al., 2014) y el retraso mental causado por la fenilcetonuria (Horling et al., 2014).

La microglía tiene un papel esencial no solo en la poda sináptica sino también en la maduración de la transmisión sináptica excitadora (Salter y Beggs, 2014). Dos estudios en ratones nulos para el receptor CX<sub>3</sub>CR1 de la microglía apoyan esta idea. En uno de ellos, la ausencia del receptor en la microglía provoca alteraciones en la transmisión sináptica excitadora pero no en la inhibitoria (Zhan et al., 2014). En el otro estudio, llevado a cabo en corteza cerebral somatosensorial, los ratones nulos para el CX<sub>3</sub>CR1 muestran un retraso en la llegada de célula microgliales a las zonas corticales donde se desarrollan las conexiones sinápticas tálamo-corticales, que se ve correspondido con un retraso en la maduración funcional de los receptores de glutamato post-sinápticos (Hoshiko et al., 2012).

#### 4. Participación en la angiogénesis cerebral.

La microglía también tiene funciones relacionadas con la formación y remodelamiento de los vasos sanguíneos durante el desarrollo del SNC (ver revisiones de Arnold y Betsholtz, 2013; da Fonseca et al., 2014; Harry y Pont-Lezica, 2014; Pont-Lezica et al., 2011). La estrecha relación topográfica entre la microglía y los vasos sanguíneos durante el desarrollo es bien conocida desde hace muchos años (Ashwell et al., 1989; Graeber et al., 1989; Thomas, 1999). Inicialmente se pensó que esta relación podría reflejar simplemente la entrada de microglía al cerebro a través de la circulación sanguínea. Sin embargo, algunas células microgliales están presentes en el parénquima nervioso antes de su vascularización (Cuadros et al., 1993; Checchin et al., 2006; Ginhoux et al., 2010), lo que sugiere que, al menos en parte, la invasión microglial es independiente de la vasculatura cerebral y que la microglía podría facilitar la angiogénesis durante el desarrollo (Checchin et al., 2006). Diferentes estudios

posteriores parecen apoyar esta hipótesis. Por ejemplo, secuencias de videomicroscopía en lapsos cortos de tiempo, tomadas durante el desarrollo cerebral del pez cebra, han proporcionado evidencias directas de que la microglía promueve la fusión de vasos sanguíneos cercanos (Fantin et al., 2010). Una investigación posterior confirmó la relación entre la microglía y la formación de la red vascular durante la primera semana del desarrollo postnatal de la retina de ratón (Rymo et al., 2011). En este estudio se utilizaron ratones deficientes en CSF-1, que carecen de microglía, mostrando que la ausencia de microglía inducía una disminución en la ramificación de los vasos sanguíneos. Por otra parte, la activación microglial promovida por la administración postnatal de LPS también induce un desarrollo vascular anormal en la retina (Tremblay et al., 2013).

#### 5. Interacción con la glía radial.

La estrecha relación topográfica entre la microglía y la glía radial ha sido documentada en varias regiones del SNC (Dalmau et al., 1997; Pont-Lezica et al., 2011; Rigato et al., 2011; Santos et al., 2008). Durante etapas iniciales de la invasión microglial de la médula espinal de ratón, más de la mitad de la microglía de la zona ventral está en estrecho contacto con la glía radial (Rigato et al., 2011). Una asociación similar ha sido descrita en retinas de ratón y codorniz (Santos et al., 2008; Sánchez-López et al., 2004). La asociación entre los dos tipos celulares sugiere que la glía radial y la microglía podrían interactuar funcionalmente, habiéndose propuesto que el óxido nítrico producido por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), uno de los principales marcadores inflamatorios, puede regular la diferenciación de la glía radial para dar lugar a astrocitos (Béchade et al., 2011).

#### **Mantenimiento del estado ramificado de la microglía: señales “off”**

Las células microgliales tienen receptores de superficie específicos de señales que se expresan constitutivamente en el SNC adulto normal y contribuyen a mantener el estado ramificado de la microglía. Estas señales han recibido el nombre de señales “off” (Biber et al., 2007), ya que evitan la activación

microglial, estando constituidas por moléculas que se expresan en la superficie de neuronas en condiciones de normalidad y que se ligan a sus receptores específicos de la superficie microglial. Entre las señales “off” mejor conocidas, destacan la molécula de superficie CD200 y la quimioquina CX<sub>3</sub>CL1.

CD200 (también llamada OX2) es una molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa constitutivamente en la membrana de neuronas sanas (Barclay et al., 2002; Hoek et al., 2000; Wright et al., 2001). El receptor de esta molécula (CD200R) se expresa en las células de linaje mielóide (Barclay et al., 2002), de manera que las células microgliales son el único tipo celular del SNC en estado de salud que lo expresan (Griffiths et al., 2010; Kierdorf y Prinz, 2013). La interacción entre CD200 y CD200R altera el umbral de respuesta de las células mieloides frente a los estímulos que las activan, manteniendo así el estado ramificado (no activado) de la microglía (Biber et al., 2007; Kierdorf y Prinz, 2013). Los estudios en ratones transgénicos nulos para CD200, en los que la microglía muestra un fenotipo activado y una respuesta acelerada frente a estímulos activadores (Griffiths et al., 2010; Hoek et al., 2000), están de acuerdo con esta idea.

CX<sub>3</sub>CL1, también conocida con los nombres de fractalquina y neurotactina, es una quimioquina expresada en la membrana de diferentes poblaciones neuronales del SNC adulto (Biber et al., 2007; Harrison et al., 1998; Kim et al., 2011; Sunnemark et al., 2005). Por otra parte, la microglía es la única población celular del SNC en condiciones de salud que expresa CX<sub>3</sub>CR1, el receptor específico de CX<sub>3</sub>CL1 (Biber et al., 2007; Cardona et al., 2006; Hughes et al., 2002; Tremblay et al., 2014). Las neuronas sanas interactúan con la microglía mediante señalización a través de la unión de CX<sub>3</sub>CL1 neuronal con CX<sub>3</sub>CR1 microglial, inhibiendo la activación microglial y contribuyendo a mantener el estado ramificado de la microglía (Bachstetter et al., 2011; Biber et al., 2007; Kierdorf y Prinz, 2013; Sheridan y Murphy, 2013). Esta hipótesis está apoyada por estudios llevados a cabo en ratones deficientes para el receptor CX<sub>3</sub>CR1, en los que esta deficiencia provoca un incremento de la activación

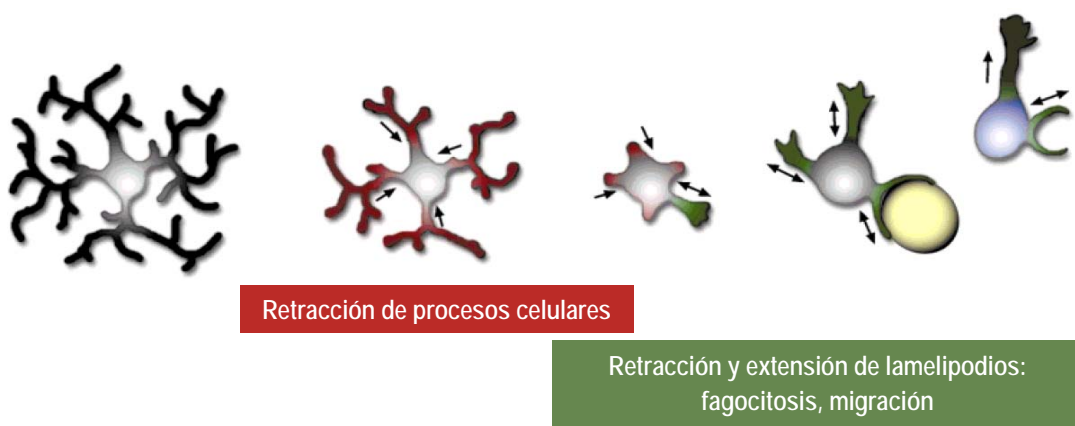
microglial (Peng et al., 2014; Wang et al., 2014). La idea de que la interacción CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1 contribuye a mantener el estado ramificado de la microglía, aunque básicamente cierta, es demasiado simplista y la situación real en el SNC es mucho más compleja, como se deduce de algunos estudios que han propuesto que, en patologías degenerativas del SNC, dicha interacción puede provocar la activación de la microglía en vez de contribuir a conservar su estado ramificado (Sheridan y Murphy, 2013; Tang et al., 2014). CX<sub>3</sub>CL1 puede encontrarse unida a la membrana neuronal o ser secretada al medio extracelular (Garton et al., 2001; Hughes et al., 2002; Paolicelli et al., 2014). No se conoce la participación exacta de cada una de estas formas de expresión en la interacción neuronas-microglía (Biber et al., 2007; Tremblay et al., 2014), aunque algunos estudios han apuntado que el fragmento soluble de CX<sub>3</sub>CL1 es liberado durante la apoptosis y puede actuar como molécula que atrae fagocitos (Paolicelli et al., 2014; Ravichandran, 2011).

La molécula CD47, implicada en procesos de inhibición de fagocitosis, también parece ejercer un papel en el mantenimiento del estado ramificado de la microglía. Las células sanas del SNC expresan CD47 en su superficie, que se liga a su receptor específico SIRP $\alpha$  (también conocido como CD172a), presente en la superficie de fagocitos como las células microgliales (Christensen et al., 2014; Gitik et al., 2011, 2014). La unión CD47-SIRP $\alpha$  produce la señalización que inhibe la fagocitosis, protegiendo así a las células no dañadas de la acción fagocítica de la microglía y contribuyendo a mantener el estado ramificado no fagocítico de ésta (Biber et al., 2007; Gitik et al., 2014).

### **Activación de la microglía: características morfofuncionales**

La microglía activada aparece en el SNC maduro en respuesta a una agresión o patología del mismo (Raivich et al., 1999; Streit et al., 1999) y procede de células ramificadas que retraen sus prolongaciones, se redondean y migran a los lugares en los que se ha producido el daño (Fig. 10) (Dihne et al., 2001; Eugenin et al., 2001; Giordana et al., 1994; Kreutzberg, 1996; Stence et al., 2001).

La activación de la microglía se caracteriza por la ejecución de una serie de actividades cuyo objetivo final es contribuir a la defensa del SNC frente a agresiones de naturaleza diversa y a la reparación del daño causado por la agresión. Las principales características morfofuncionales de la microglía activada son: a) cambios morfológicos desde un estado ramificado a una forma redondeada; b) migración quimiotáctica; c) incremento de la proliferación; d) elevada actividad fagocítica; y e) liberación de una variedad de moléculas que ejercen su acción sobre una diversidad de tipos celulares.



**Fig. 10.** Esquema que representa la transformación morfológica de la microglía ramificada en microglía activada (modificado de Stence et al., 2001).

La migración de la microglía activada hacia los focos de agresión se lleva a cabo mediante un mecanismo quimiotáctico en el que la emisión polarizada de lamelipodios es de trascendental importancia. Los lamelipodios microgliales contienen estructuras diminutas, llamadas podosomas, que participan en la adhesión al sustrato y la disolución de matriz extracelular (Siddiqui et al., 2012; Vincent et al., 2012). Los podosomas también tienen un papel en los mecanismos que regulan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Los cambios de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  activan cascadas de señalización que regulan la actividad de múltiples moléculas efectoras de la migración microglial, tales como MAP-quinasas y la GTPasa Rac1 (Imai y Kohsaka, 2002; Persson et al., 2014; Wei et al., 2012), que



interaccionan con componentes del citoesqueleto, controlando los cambios del mismo responsables de la migración.

La microglía activada también incrementa su capacidad proliferativa (Cross y Woodroffe, 2001; Ladeby et al., 2005; Nakamura, 2002; Raivich et al., 1999; Wohl et al., 2010) mediante la estimulación de mecanismos de señalización en los que pueden participar diferentes receptores, tales como los receptores purinérgicos P2X7R (Monif et al., 2010) y A2AR (Gomes et al., 2013) y el receptor de CSF-1 (De et al., 2014).

Igualmente, la activación de la microglía provoca un incremento de su actividad fagocítica, en paralelo con un gran desarrollo de su compartimento lisosómico (Huizinga et al., 2012; Otani et al., 2011; Rotshenker, 2009). Así, las células microgliales activadas son capaces de fagocitar microorganismos patógenos, células completas en proceso de degeneración, prolongaciones celulares dañadas y restos de células muertas (Brown y Neher, 2014; Neher et al., 2011; Neumann, 2009; Petersen y Dailey, 2004; Rajbhandari et al., 2014).

La activación de la microglía también induce la síntesis y liberación al medio extracelular de una gran variedad de moléculas (Colton, 2009; Czeh et al., 2011; Kim y de Vellis, 2005; Tambuyzer et al., 2009), algunas con un papel neuroprotector y otras con acción neurotóxica, dando lugar a una dualidad funcional que será tratada más adelante.

Por otra parte, la microglía activada podría tener la capacidad de presentar antígenos gracias a la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Becher et al., 2000; Hanisch, 2013; McKay et al., 2007; Tambuyzer et al., 2009). Sin embargo, las células microgliales *in vivo* expresan bajos niveles de las moléculas accesorias requeridas para una eficiente presentación de antígeno y no parecen ser capaces de abandonar el SNC y transportar los antígenos hasta los nódulos linfoides para su presentación a linfocitos T (ver revisiones de Hanamsagar et al., 2014; Ransohoff y Engelhardt, 2012). No obstante, la microglía podría presentar antígenos a linfocitos T que se infiltran en el

parénquima nervioso en determinadas circunstancias patológicas (Hanamsagar et al., 2014).

### **Señales de activación microglial y receptores relacionados**

La microglía dispone de un amplio repertorio de receptores específicos de multitud de ligandos diferentes (ver revisiones de Kettenmann et al., 2011 y Walter y Neumann, 2009). Algunos de estos receptores, que reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Harry, 2013; Kettenmann et al., 2011; Kigerl et al., 2014), son capaces de reconocer moléculas que actúan como señales de agresión en el SNC. Las moléculas señalizadoras de agresión han sido clasificadas en dos tipos principales: a) PAMPs (“pathogen-associated molecular patterns”), que son indicadores de infección bacteriana o vírica y están constituidos por una gran variedad de motivos estructurales altamente conservados en los microorganismos, tales como componentes de la pared celular de bacterias o secuencias repetidas del ADN de bacterias o virus (Kumar et al., 2011); y b) DAMPs (damage-associated molecular patterns”), que son indicadores de daño de las células del SNC e incluyen moléculas liberadas por células dañadas y moléculas que han sufrido modificaciones como consecuencia del daño tisular, tales como lipoproteínas oxidadas o fragmentos de moléculas de matriz extracelular (Kono y Rock, 2008; Piccinini y Midwood, 2010; Saijo y Glass, 2011).

Los PRRs permiten a las células microgliales detectar la mayoría de señales patológicas. Tras su unión al ligando específico, estos receptores activan vías de señalización intracelular, así como determinados factores de transcripción y moléculas post-transcripcionales, tales como NFκB (“nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”), AP-1 (“activator protein 1”) o IRF (“interferon regulatory factor”). Finalmente, estas moléculas son responsables de la respuesta microglial frente a la agresión, regulando la expresión de genes pro-inflamatorios que codifican una variedad de factores liberados por la microglía activada, tales como citoquinas, quimioquinas, enzimas, ROS y otras moléculas

necesarias para combatir los patógenos o suprimir el daño (Akira et al., 2006; Harry, 2013).

Por otra parte, numerosas células del SNC sufren apoptosis a lo largo de la vida, ya sea como consecuencia de una agresión o patología o bien como resultado del proceso fisiológico de muerte celular programada que tiene lugar durante el desarrollo normal. La superficie de las células apoptóticas sufre alteraciones moleculares que son detectadas por células microgliales y desencadenan el proceso de fagocitosis, típico de la microglía activada. Las moléculas alteradas en la superficie de células apoptóticas han sido denominadas ACAMPs (“apoptotic cell-associated molecular patterns”) (Nakanishi et al., 2009; Wu et al., 2006) y contribuyen a la rápida eliminación de las mismas para evitar que sus restos puedan desencadenar la muerte de células vecinas sanas y una respuesta pro-inflamatoria. El concepto de ACAMPs es equivalente al de señales “eat-me” indicadas por otros autores (Brown y Neher, 2014; Marín-Teva et al., 2014; Ravichandran, 2011) para referirse a las moléculas que la microglía es capaz de identificar en la superficie de células apoptóticas antes de fagocitarlas.

Entre los receptores de membrana relacionados con la activación microglial destacan: a) receptores de DAMPs, como los receptores purinérgicos, que reconocen ATP y sus derivados (unos de los principales DAMPs); b) receptores tipo Toll (TLRs: “Toll-like receptors”), que reconocen tanto PAMPs como DAMPs; c) receptores de ACAMPs, responsables del reconocimiento de células apoptóticas y de su fagocitosis; y d) receptores de quimioquinas, que participan en la migración quimiotáctica de la microglía activada.

El ATP es la molécula energética por excelencia de los organismos vivos y normalmente se localiza en el interior de las células, aislada del exterior por la membrana plasmática. Cuando las células sufren un daño, se produce la rotura de su membrana y el ATP es liberado en el medio extracelular. Por lo tanto, la presencia de ATP en el medio extracelular del SNC actúa como una señal DAMP (Boucsein et al., 2003; Inoue, 2008; Kettenmann et al., 2011; Kobayashi et al., 2013; Koizumi et al., 2013). Aunque el ATP liberado por las células dañadas es

rápidamente degradado por la acción de ectonucleotidasas, parece constituir un estímulo para la liberación activa de nuevas cantidades de ATP por parte de astrocitos (Yenari et al., 2010). Además, la degradación extracelular del ATP da lugar a derivados como ADP y AMP. El ATP y sus derivados, presentes en el medio extracelular del SNC dañado, son detectados por la microglía gracias a los receptores purinérgicos de su membrana. Estos receptores reconocen el ATP y otros nucleótidos y son de dos tipos: ionotrópicos, que se conocen como receptores P2XR y están constituidos por canales iónicos regulados por ligando, y metabotrópicos, denominados receptores P2YR, que están acoplados a proteína G (Inoue, 2008; Kettenmann et al., 2011; Kobayashi et al., 2013; Koizumi et al., 2013; Trang et al., 2012).

Los TLRs reciben este nombre porque fueron inicialmente descubiertos en *Drosophila*, donde se denominaron receptores Toll, y posteriormente se demostró la existencia de sus análogos en mamíferos (Medhitov et al., 1997). Los TLRs están ampliamente expresados en las células microgliales (Kettenmann et al., 2011; Lehnardt, 2010), aunque también se pueden expresar en otros tipos celulares. Constituyen una familia de diversos receptores transmembrana (TLR1 a TLR13), algunos localizados en la membrana plasmática y otros en membranas intracelulares de endosomas (Kigerl et al., 2014). Los distintos tipos de TLRs son específicos para diferentes PAMPs presentes en bacterias o virus (Kawai y Akira, 2010; Kettenmann et al., 2011; Lehnardt, 2010). Por ejemplo, TLR4 se activa mediante su unión con el lipolisacárido (LPS) bacteriano (Regen et al., 2011), mientras que TLR3 reconoce RNA de doble cadena específico de virus. Así, la estimulación de los TLRs mediante su unión con el ligando específico es esencial para desencadenar la respuesta inmune frente a una infección, activando vías de señalización que provocan la activación microglial y la secreción de diversas citoquinas y quimioquinas (Aravalli et al., 2007; Okun et al., 2009). Los diferentes tipos de TLRs activan diferentes vías de señalización que disparan programas de activación heterogéneos, cada uno de los cuales induce la liberación de distintos tipos de citoquinas o quimioquinas, vía activación de factores de

transcripción como NF $\kappa$ B y AP-1 (Akira y Takeda, 2004). Por ejemplo, la estimulación de TLR4 dispara la liberación de IL-6 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Okun et al., 2009). Recientemente, se ha propuesto que los diferentes programas de activación microglial están determinados, no solo por la naturaleza del agente activador, sino también por la existencia de distintas subpoblaciones microgliales con diferentes perfiles funcionales (Scheffel et al., 2012). Por otra parte, aunque los TLRs reconocen los PAMPs propios de la infección bacteriana o viral, también pueden interactuar con una amplia variedad de DAMPs (Kawai y Akira, 2010; Lehnardt, 2010; Regen et al., 2011).

Los receptores de ACAMPs (o de señales “eat-me”) son muy diversos. La fosfatidilserina es la señal “eat-me” mejor estudiada, ya que el cambio de ubicación de la misma desde la capa interna a la externa de la membrana plasmática es clave para que las células apoptóticas puedan ser reconocidas por los fagocitos (Ravichandran, 2011). Esta señal es percibida por receptores “scavenger”, constituidos por una familia de receptores de células de linaje macrófágico que median la unión de un grupo heterogéneo de ligandos, entre los que se incluyen las lipoproteínas de baja densidad modificadas (acetiladas u oxidadas) y la fosfatidilserina (Husemann et al., 2002). Los principales componentes de la familia de receptores “scavenger” son los de clase A (SR-A) y clase B tipo I (SR-BI), así como CD36 (Husemann et al., 2002). SR-A se expresa en la microglía del cerebro de ratones neonatales, mientras que CD36 lo hace en la microglía del cerebro humano adulto (Husemann et al., 2002), habiéndose demostrado la participación de este último en el reconocimiento y fagocitosis de células apoptóticas (Stolzinger y Grune, 2004). Además de los receptores “scavenger”, otros receptores microgliales son capaces de reconocer la externalización de la fosfatidilserina en la superficie de células apoptóticas y de mediar la fagocitosis de éstas, tales como TIM (“T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule”) 1 y 4, integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , BAI1 (“brain-specific angiogenesis inhibitor 1”), TREM-2 (“triggering receptor expressed by myeloid cells-2”), tirosin-quinazas de la familia Mer-TK y estabilinas 1 y 2 (Kobayashi et

al., 2007; Mazaheri et al., 2014; Neher et al., 2012; Neumann et al., 2009; Park et al., 2009b; Ravichandran, 2011; Sierra et al., 2013). Todos estos receptores tienen capacidad de reconocimiento directo de la fosfatidilserina, pero también hay otras moléculas, como MFG-E8 (“milk fat globule EGF-like factor 8”), que actúan como puente de unión entre la fosfatidilserina y su receptor (Hanayama et al., 2002; Neher et al., 2011; Ravichandran, 2011; Spittau et al., 2015). En resumen, diversos receptores microgliales permiten el reconocimiento de señales en la superficie de células apoptóticas que aseguran la fagocitosis de las mismas.

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas que participan en la entrada y migración de leucocitos y otras células mieloides en el SNC (Babcock et al., 2003; Bajetto et al., 2001; Kettenmann et al., 2011; Schilling et al., 2009). Existen diversos tipos de quimioquinas que han sido clasificados en cuatro familias (C, CC, CXC y CX3CL) que tienen sus correspondientes receptores (CR, CCR, CXCR y CX3CR) (Bajetto et al., 2001; Cartier et al., 2005). Los receptores de quimioquinas están presentes en la microglía, aunque también en otras células del SNC, como astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Cartier et al., 2005). La expresión de diferentes quimioquinas y sus receptores en estados patológicos (Bacon y Harrison, 2000; Bajetto et al., 2001; Mennicken et al., 1999) y su incremento tras la activación *in vitro* de células microgliales (Bianchi et al., 2011; Kremlev et al., 2004) son evidencias indirectas de la implicación de dichas quimioquinas y sus receptores en la migración de la microglía activada. Otros estudios han demostrado de forma directa esta implicación. Entre las quimioquinas que participan en la regulación de la migración de células microgliales activadas destacan CCL2 (también conocida como MCP-1: “monocyte chemoattractant protein 1”) (Cross y Woodroffe, 1999; Eugenin et al., 2005; Jiang et al., 2012; Rezaie et al., 2002; Zeng et al., 2005), CCL3 (o MIP-1 $\alpha$ : “macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ) (Bianchi et al., 2011; Cross y Woodroffe, 1999; Rezaie et al., 2002; Zeng et al., 2005), CCL4 (o MIP-1 $\beta$ : “macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ ) (Cross y Woodroffe, 1999; Zeng et al., 2005), CCL5 (o RANTES: “regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted”)

(Bianchi et al., 2011; Cross y Woodroffe, 1999; Zeng et al., 2005) y CXCL12 (o SDF-1: “stromal cell-derived factor 1”) (Bianchi et al., 2011; Lazarini et al., 2003; Lipfert et al., 2013; Wang et al., 2008). La unión de quimioquinas con sus receptores muestra una cierta redundancia, ya que una misma quimioquina puede activar diferentes receptores y un mismo receptor puede ser activado por diferentes quimioquinas (Cartier et al., 2005; Kettenmann et al., 2011). Por ejemplo, CCR5 puede ser activado por CCL3, CCL4 y CCL5 (Carbonell et al., 2005; Cartier et al., 2005; Louboutin y Strayer, 2013). No obstante, algunas quimioquinas solo tienen capacidad de unirse a un único receptor, como CCL2, que se une exclusivamente a CCR2 (Cartier et al., 2005; Eugenin et al., 2005; Jiang et al., 2012), aunque este receptor también puede unirse a otras quimioquinas. En el caso de CXCL12, su único receptor es CXCR4 (Cartier et al., 2005; Muessel et al., 2013; Wang et al., 2008) y no existen otras quimioquinas que puedan unirse al mismo.

La regulación de los movimientos celulares que tienen lugar durante la migración de la microglía activada es de una gran complejidad (Cartier et al., 2005; Kettenmann et al., 2011) y muestra variabilidad en respuesta a diferentes estímulos (Carbonell et al., 2005). La activación de receptores de quimioquinas desencadena una cascada de señalizaciones de diferentes vías intracelulares, en las que la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) tiene un papel preponderante (Cartier et al., 2005; Muessel et al., 2013; Shideman et al., 2006), así como la elevación de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Hegg et al., 2000; Kettenmann et al., 2011; Shideman et al., 2006). Finalmente, dicha cascada de señalizaciones termina dando lugar a una reorganización del citoesqueleto de actina (Cross y Woodroffe, 1999), último responsable de la migración microglial.

### **Dualidad funcional de la microglía activada: neuroprotección frente a neurotoxicidad**

Numerosos estudios han demostrado que la activación de la microglía puede desempeñar un doble papel, incrementando la muerte neuronal en algunos

casos y reduciéndola en otros (Hanisch y Kettenmann, 2007). Este doble papel ha sido motivo de que la microglía sea considerada como “buena” y “mala” en numerosas revisiones (Cherry et al., 2014; Henkel et al., 2009; Loane y Byrnes, 2010; Luo y Chen, 2012). En general, la activación de la microglía cumple una función beneficiosa para el SNC, ya que participa decisivamente en los mecanismos de protección y regeneración del tejido neural (Garden y Möller, 2006). Así, tiene un papel primordial tanto en la defensa frente a infecciones, fagocitando y eliminando patógenos, como en la eliminación de restos de células nerviosas muertas, que facilita la posterior remodelación de circuitos neurales. Sin embargo, la microglía activada también puede inducir o potenciar la degeneración neuronal, ejerciendo así un papel perjudicial. Esta dualidad funcional de la microglía activada es consecuencia de su capacidad de producir una gran variedad de moléculas, algunas de las cuales tienen un papel neuroprotector, como neurotrofinas o citoquinas anti-inflamatorias, mientras que otras pueden ser neurotóxicas, como radicales libres, citoquinas pro-inflamatorias o diferentes tipos de proteasas (Bessis et al., 2007; Biber et al., 2007; Cross y Woodroffe, 2001; Dringen, 2005; Hanisch, 2002; Hanisch y Kettenmann, 2007; Kim y de Vellis, 2005; Nakajima et al., 2007). El papel neurotóxico o neuroprotector de la microglía activada parece depender del balance entre las moléculas neuroprotectoras y neurotóxicas liberadas por la misma, así como del contexto microambiental en el que actúan (Marín-Teva et al., 2011).

### ***Papel neuroprotector de la microglía***

Debido a su elevada capacidad fagocítica, la microglía activada es capaz de eliminar microorganismos patógenos, con efectos beneficiosos evidentes. Además, se ha demostrado un papel beneficioso de la microglía activada en diferentes patologías no infecciosas del SNC (Biber y Block, 2014; Gomes-Leal, 2012; Kawabori y Yenari, 2014). Este papel beneficioso de la microglía activada parece ser debido tanto a su actividad fagocítica como a la secreción de moléculas con efectos neurotróficos.



La actividad fagocítica de la microglía es responsable de la eliminación de productos tóxicos y restos de células muertas generados en situaciones patológicas del SNC, que pueden ejercer una acción inhibitoria sobre procesos regenerativos. Por ejemplo, los restos de mielina generados en patologías desmielinizantes tienen un efecto inhibitorio sobre la diferenciación de oligodendrocitos maduros con capacidad mielinizante (Kotter et al., 2006), impidiendo la regeneración axonal del tejido dañado. Por lo tanto, la función fagocítica de la microglía tiene efectos favorables en ciertas patologías (Napoli y Neumann, 2009; Polazzi y Monti, 2010; Voss et al., 2012) y su inhibición desencadena importantes efectos negativos en la fisiología del SNC (Derecki et al., 2013).

Otro efecto beneficioso de la microglía activada es la estimulación de la supervivencia de neuronas dañadas reversiblemente mediante la liberación de citoquinas anti-inflamatorias y factores neurotróficos (Lambertsen et al., 2009; Streit, 2002). Además, la microglía activada favorece la neurogénesis en regiones cerebrales en las que ésta se mantiene en la edad adulta, como el hipocampo (Gomes-Leal, 2012; Ziv et al., 2006), probablemente mediante la secreción de factores solubles (Walton et al., 2006). Entre las principales citoquinas anti-inflamatorias, con efecto neuroprotector, segregadas por la microglía activada se encuentran las interleuquinas 4, 10 y 13 (IL-4, IL-10, IL-13) y TGF- $\beta$ 1 (Colton, 2009; Kawabori y Yenari, 2014; Loane y Byrnes, 2010; Park et al., 2005; Raivich et al., 1999). Numerosas evidencias han demostrado que la microglía activada también segrega una diversidad de factores neurotróficos, tales como NGF, BDNF, NT-3, CNTF (“ciliary neurotrophic factor”), GDNF (“glial cell line-derived neurotrophic factor”), IGF-1 (“insulin-like growth factor 1”) y FGF-2 (“fibroblast growth factor 2”) (Batchelor et al., 1999; Harada et al., 2002; Liang et al., 2010; Miao et al., 2012; Nakajima et al., 2007; Voss et al., 2012).

Es de destacar que algunas citoquinas como TNF- $\alpha$ , tradicionalmente considerada neurotóxica, puede ejercer una doble función (neurotóxica o neuroprotectora) dependiendo de su concentración y de la región cerebral específica en la que actúa. Así, el TNF- $\alpha$  tiene efectos neurotóxicos a

concentraciones elevadas, pero desempeña una acción neuroprotectora a bajas concentraciones (Bruce et al., 1996) y promueve neurodegeneración en el cuerpo estriado, mientras que es neuroprotector en el hipocampo (Sriram et al., 2006).

La microglía no solo tiene efectos beneficiosos directos sobre las neuronas sino que también puede afectar a las células gliales para que éstas estimulen la supervivencia neuronal. Por ejemplo, es capaz de inducir la expresión de factores neurotróficos por astrocitos y células de Müller (Chen et al., 2015; Harada et al., 2002; Savli et al., 2004) y parece estimular un efecto protector de los astrocitos contra el estrés oxidativo, tras inducir la expresión de enzimas antioxidantes (Röhl et al., 2010).

### ***Papel neurotóxico de la microglía***

La microglía activada tiene un papel neurotóxico en algunas circunstancias como se ha demostrado en estudios en los que la eliminación de la microglía o el bloqueo de su activación provoca una disminución de la muerte neuronal (Brown y Neher, 2010; Gao et al., 2011; Hanisch y Kettenmann, 2007; Mount et al., 2007), la cual es inducida por la acción del medio condicionado por microglía (Flavin et al., 2000; Hur et al., 2010). Además, la activación microglial en la sustancia negra de ratas, inducida mediante inyección de LPS, origina una pérdida de neuronas dopaminérgicas similar a la observada en la enfermedad de Parkinson (Castaño et al., 1998). Se ha propuesto que la activación de la microglía ejerce un papel negativo en diversas enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la existencia de muerte neuronal crónica y progresiva y la presencia de elevados niveles de factores pro-inflamatorios (Block et al., 2007; Hanisch y Kettenmann, 2007; Lull y Block, 2010; Luo y Chen, 2012; Prinz y Mildner, 2011; Saijo y Glass, 2011; Smith et al., 2012). Así, la neurodegeneración se inicia por un determinado estímulo neurotóxico, como  $\alpha$ -sinucleína en la enfermedad de Parkinson o  $\beta$ -amiloide en la de Alzheimer. Los DAMPs liberados al medio extracelular por las neuronas muertas contribuyen a estimular la activación de la microglía que, a su vez, libera moléculas pro-inflamatorias que inducen la muerte

de nuevas neuronas. Se completa así un ciclo neurotóxico que mantiene un estado de activación microglial crónica y degeneración neuronal progresiva (Block y Hong, 2007; Gao et al., 2011; Lull y Block, 2010).

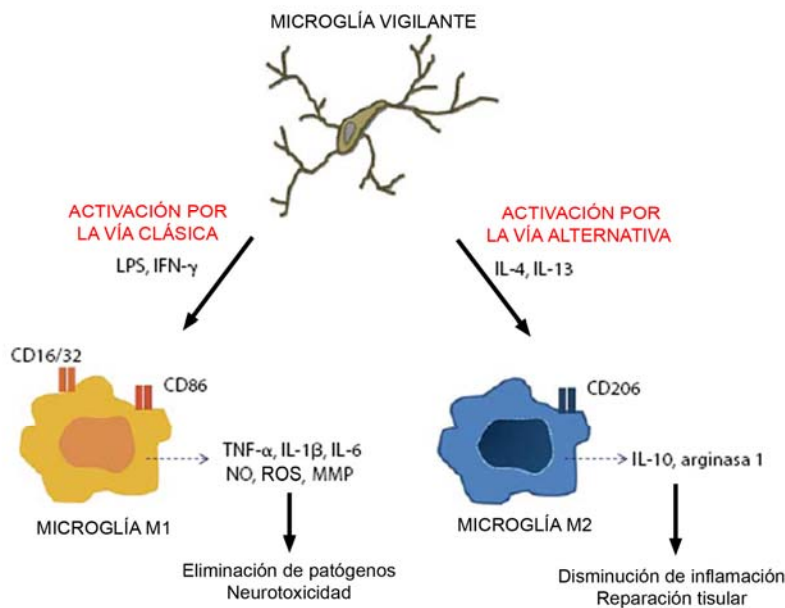
Los efectos neurotóxicos de la microglía se llevan a cabo mediante la actuación de una amplia variedad de moléculas neurotóxicas liberadas tras su activación. Estas moléculas incluyen citoquinas pro-inflamatorias y radicales libres, tales como ROS. Las principales citoquinas pro-inflamatorias liberadas por la microglía activada son TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (interferón  $\gamma$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Block et al., 2007; Czeh et al., 2011; Smith et al., 2012; Walter y Neumann, 2009), que ejercen su efecto neurotóxico mediante su unión a receptores específicos de la superficie neuronal, interacción con otras proteínas accesorias y activación de cascadas de señalización (revisado en Smith et al., 2012). La producción de radicales libres por la microglía activada se describe con más profundidad en otro apartado de esta Introducción, ya que está más estrechamente relacionada con los objetivos de la presente Tesis.

### **Estados de activación de la microglía: clásica y alternativa**

Estudios llevados a cabo en tejidos no neurales han demostrado que los macrófagos periféricos pueden adquirir diferentes estados de activación, dependiendo de la naturaleza de los estímulos que la desencadenan (revisado por Martinez y Gordon, 2014). Se han descrito dos estados de activación de los macrófagos, conocidos como activación clásica o M1 y activación alternativa o M2. La activación microglial no es un proceso de “todo o nada” (Kettenmann et al., 2011; Raivich et al., 1999), sino que la microglía activada también presenta un rango de fenotipos funcionales que se asemejan a los estados de activación de los macrófagos periféricos, por lo que el concepto de activación clásica y alternativa, desarrollado inicialmente para los macrófagos periféricos, ha sido extrapolado a la microglía del SNC (Cherry et al., 2014; Colton, 2009; Crain et al., 2013; Herber et al., 2006). Los estados de activación M1 y M2 representan los extremos de un rango de estados intermedios entre ambos y los macrófagos y células microgliales

pueden cambiar de un estado a otro (Perry et al., 2010), un proceso conocido como polarización de la microglía activada, que puede ser controlado por la propia microglía mediante señalización autocrina o paracrina (Cherry et al., 2014).

La microglía adopta un estado de activación u otro dependiendo de una variedad de factores como el tipo de estímulo que la desencadena, la duración del mismo, la interacción con otras células y la edad del organismo (Luo y Chen, 2012; Olah et al., 2011; Perry et al., 2010; Sawada et al., 2008; Walter y Neumann, 2009). El tipo de activación adoptado por la microglía es responsable de las funciones concretas que llevará a cabo, ya que si se activa por la vía clásica (M1) produce citoquinas pro-inflamatorias y ROS, con un efecto básicamente neurotóxico, mientras que si se activa por la vía alternativa (M2) libera citoquinas anti-inflamatorias y factores neurotróficos, con funciones neuroprotectoras (Fig. 11). Por lo tanto, la dualidad funcional de la microglía anteriormente descrita depende de las moléculas producidas cuando es activada por una u otra vía, según la naturaleza del estímulo desencadenante del proceso de activación.



**Fig. 11.** Estados de activación de la microglía. Modificado de Czeh et al. (2011).

### ***Activación clásica (M1) de la microglía***

Las señales que desencadenan la activación clásica de macrófagos y microglía son diversas (Cherry et al., 2014; Colton, 2009; Czeh et al., 2011; Dale et al., 2008). Entre estas señales destacan las que activan los receptores microgliales que participan en la respuesta inmune innata. Así, esta vía de activación microglial puede ser iniciada por la acción de las moléculas presentes en la superficie de microorganismos patógenos (como LPS) que interaccionan con sus receptores específicos, tales como TLRs. También puede ser estimulada por citoquinas pro-inflamatorias, como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , liberadas por microglía previamente activada. Las moléculas señalizadoras de daño, como el ATP, también son capaces de disparar la activación M1 de la microglía.

La microglía activada por la vía M1 produce mediadores citotóxicos, tales como ROS, así como citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Cao y He, 2013; David y Kroner, 2011; Liao et al., 2012). El incremento en la expresión de la enzima iNOS, que utiliza arginina para la síntesis de óxido nítrico, es una característica que permite reconocer la vía de activación M1 (Cherry et al., 2014). Mediante la acción de las moléculas citotóxicas, las células microgliales adquieren capacidad microbicida que, junto con su actividad fagocítica, les permite eliminar los microorganismos patógenos que hayan penetrado en el SNC. Por lo tanto, el estado de activación M1 es de naturaleza “destruktiva” y también puede ocasionar daños en las propias neuronas del SNC, siendo potencialmente neurotóxico.

### ***Activación alternativa (M2) de la microglía***

La activación M2 de la microglía es iniciada por señales diferentes a las que disparan la activación M1. Concretamente, varias citoquinas anti-inflamatorias, como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$ 1, han sido identificadas como inductoras de este tipo de activación (Cherry et al., 2014; Colton, 2009; David y Kroner, 2011; Gordon y Taylor, 2005; Ponomarev et al., 2007; Spittau et al., 2015). Estos factores antagonizan con las vías de activación clásica e inician vías de señalización que inducen la expresión de genes diferentes a los implicados en

la activación M1, lo cual se traduce en la producción de otro tipo de moléculas, básicamente neuroprotectoras, que participan en la reparación y reconstrucción tisular, así como en la protección contra la inflamación.

Entre las moléculas producidas por la microglía activada alternativamente, una de las mejor caracterizadas es la arginasa 1, enzima que convierte la L-arginina en poliaminas, prolina y ornitinas, metabolitos que favorecen la reparación tisular (Munder, 2009). La L-arginina es el mismo sustrato usado por la iNOS, por lo que la arginasa 1 compite con ella, contribuyendo a reducir la producción de óxido nítrico y de peroxinitritos citotóxicos derivados del mismo, que se producen durante la activación M1. Así, iNOS y arginasa 1 constituyen enzimas marcadoras de los estados de activación M1 y M2, respectivamente (Cherry et al., 2014). Otras moléculas liberadas durante la activación M2 de la microglía son las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- $\beta$ 1 y otros factores neurotróficos (Bessis et al., 2007; David y Kroner, 2011; Liao et al., 2012).

La activación alternativa ha sido clasificada en los subtipos M2a, M2b y M2c, basándose en estudios llevados a cabo en macrófagos periféricos (ver revisiones de Cherry et al., 2014; David y Kroner, 2011; Martinez y Gordon, 2014). La activación M2a es inducida por la señalización a través de IL-4 e IL-13 y se caracteriza por la expresión de arginasa 1 y la secreción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- $\beta$ , entre otras moléculas. La función de este tipo de activación es fundamentalmente anti-inflamatoria y de contribución a la reparación tisular mediante la expresión de arginasa 1. La activación M2c, también conocida como desactivación adquirida (Luo y Chen, 2012), es inducida por la exposición a IL-10 o TGF- $\beta$  y también expresa la arginasa 1, aunque no parece liberar citoquinas. Los macrófagos M2c están implicados en funciones de reparación tisular después de que haya cesado la inflamación. La activación M2b es la peor conocida y es inducida por la doble exposición a complejos inmunes (que activan receptores Fc) y ligandos de TLRs (como LPS). Los macrófagos activados M2b guardan semejanza con los M1, puesto que no expresan la arginasa 1, y parecen tener un papel en la iniciación y regulación de la activación M2

(Cherry et al., 2014). En la actualidad, no está suficientemente aclarado si estos diferentes subtipos de activación M2 de los macrófagos periféricos también están presentes en la microglía (Cherry et al., 2014).

### **Producción de radicales libres por la microglía activada**

La microglía activada puede producir la muerte de neuronas mediante mecanismos inflamatorios que incluyen la producción de moléculas oxidantes, como  $O_2^-$  y óxido nítrico, que se producen mediante la activación de la NADPH oxidasa (NADPHox) y la inducción de la iNOS, respectivamente (Block et al., 2007; Murphy, 2000).

La NADPHox es una enzima de membrana compuesta por varias subunidades que incluyen subunidades NOX y phox (Bedard y Krause, 2007; Sorce y Krause, 2009). La subunidad NOX2 se localiza en neuronas y microglía, y su estimulación depende de la formación de un complejo activado por varias subunidades phox (p47phox, p67phox, p40phox) y Rac1, que se transportan desde el citoplasma a la membrana plasmática para formar el complejo NADPHox activado (Bedard y Krause, 2007; Serrano et al., 2003). En el cerebro sano, la microglía expresa altos niveles de NADPHox, mientras que astrocitos y neuronas la expresan en niveles más bajos (Brown, 2007). Sin embargo, la NADPHox no se activa hasta que no es estimulada por moléculas pro-inflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , quimioquinas, ATP o LPS. El primer producto de la reacción catalizada por la NADPHox es  $O_2^-$ , que puede ser convertido a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa o a radical hidroxilo y aniones hidroxilo por la reacción de Haber-Weiss, catalizada por hierro.

La síntesis del óxido nítrico se produce por la acción catalítica de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Se han identificado tres isotipos de esta enzima: NOS neuronal (nNOS), iNOS y NOS endotelial (eNOS). La nNOS y la eNOS son isoformas constitutivas que se expresan en neuronas y células endoteliales respectivamente, mientras que la iNOS se expresa principalmente en macrófagos y microglía de forma inducida, en respuesta a estímulos inflamatorios

como LPS o citoquinas (Brown y Neher, 2010; Förstermann y Sessa, 2012; Garden y Möller, 2006; Govers y Oess, 2004; Pacher et al., 2007; Saha y Pahan, 2006). La iNOS está fuertemente asociada a calmodulina, (MacMicking et al., 1997), activándose a concentraciones de calcio intracelular presentes en la célula en reposo, lo que le permite estar activa de forma sostenida durante mucho tiempo. Está regulada a nivel transcripcional y postranscripcional, con la implicación de numerosas rutas y moléculas de señalización, como Jak1/Stat1 $\alpha$ /IRF-1, I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B, proteína quinasa C, etc. La iNOS utiliza O<sub>2</sub> y NADPH como co-sustratos para oxidar la L-arginina y producir óxido nítrico y L-citrulina (Förstermann y Sessa, 2012; Kang et al., 2004; Pacher et al., 2007). La actividad de iNOS se localiza en el citosol ligada a proteínas del citoesqueleto, pero puede encontrarse también en vesículas o en las mitocondrias (Bogdan et al., 2000). Aunque la iNOS parece ser expresada por la microglía principalmente cuando ésta se activa por algún factor inflamatorio (Brown y Neher, 2010; Garden y Möller, 2006; Saha y Pahan, 2006), recientemente se ha demostrado que la microglía ameboide también expresa iNOS durante el desarrollo normal del SN (Crain et al., 2013; Cunningham et al., 2013).

La amplia distribución de las isoformas de NOS (nNOS, iNOS y eNOS) en el cerebro, indica que el óxido nítrico es un importante mensajero biológico en multitud de procesos que tienen lugar en el SNC. El óxido nítrico es una pequeña molécula hidrofóbica, que atraviesa las membranas celulares por simple difusión, sin necesidad de canales o receptores (Pacher et al., 2007). La mayoría de sus acciones fisiológicas son mediadas por su unión al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, causando la activación de ésta y la producción de GMPc. El óxido nítrico puede contribuir a la supervivencia neuronal (Brown, 2010; Kang et al., 2004). Por ejemplo, desempeña un papel importante en la regulación de las vías de señalización implicadas en la supervivencia de las neuronas de la retina (Mejía-García y Paes-de-Carvalho, 2007), promueve la protección neuronal después de un proceso de isquemia (Cho et al., 2005) y puede contribuir a la supervivencia de células endoteliales (Shen et al., 1998). También contribuye a la regulación de la



transmisión y plasticidad sináptica (Amitai, 2010; Hardingham et al., 2013; Izumi et al., 1992) y algunas evidencias indican que el óxido nítrico formado en el SNC participa en la regulación de la presión sanguínea (Togashi et al., 1992).

Además de las citadas funciones, el óxido nítrico desempeña un papel en los mecanismos de la inmunidad no específica, ejerciendo acciones citostáticas o citotóxicas frente a microorganismos, parásitos y células tumorales. De hecho, en macrófagos activados se induce la expresión de iNOS, produciendo grandes cantidades de óxido nítrico capaz de inhibir enzimas de la cadena de transporte mitocondrial (Bal-Price y Brown, 2001) y de fragmentar el ADN de las células diana (Fehsel et al., 1993). La combinación de estas acciones constituye la base del efecto citostático y citotóxico de la microglía sobre microorganismos. Además de sus efectos citotóxicos sobre organismos patógenos, el óxido nítrico también puede ejercer los mismos efectos sobre las propias células del organismo en situaciones patológicas, principalmente en procesos inflamatorios (Alderton et al., 2001; Bogdan, 2001; Brown y Bal-Price, 2003; Dawn y Bolli, 2002; Moncada y Higgs, 1991). Por ejemplo, la producción de concentraciones elevadas de óxido nítrico por parte de la microglía activada puede causar apoptosis celular en sistemas *in vivo* (Donovan et al., 2001; Nishikawa et al., 1998), así como en cultivos *in vitro* de diferentes tipos celulares, como células neuronales (Brown, 2010; Golde et al., 2002; Wei et al., 2000), macrófagos (D'Acquisto et al., 2001) miocitos cardíacos (Andreka et al., 2001), células endoteliales (Shen et al., 1998), linfocitos y timocitos (Zhou et al., 2000). Por otra parte, el óxido nítrico también está implicado en la muerte neuronal en varias enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson o la esclerosis múltiple (Brown, 2010).

Aunque la microglía contribuye a la neurodegeneración a través de la producción de  $O_2^-$  y óxido nítrico, cada uno de ellos es necesario pero no suficiente para causar la muerte celular. Así, la activación exclusiva de la iNOS o de la NADPHox causa muy poca o ninguna muerte neuronal, pero cuando ambas enzimas se activan conjuntamente ocasionan la muerte masiva de neuronas

(Brown, 2007; Mander y Brown, 2005; Pacher et al., 2007). Dicha muerte está mediada por la formación de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), un poderoso oxidante que resulta de la combinación de  $\text{O}_2^-$  y óxido nítrico, con gran capacidad citotóxica (Afanas'ev, 2007; Radi, 2013). La citotoxicidad del peroxinitrito es consecuencia de sus efectos sobre una gran variedad de moléculas presentes en las células. Por ejemplo, puede causar peroxidación lipídica, nitración y oxidación de proteínas, daño oxidativo en el ADN, activación de metaloproteasas e inactivación de enzimas, en especial las enzimas mitocondriales (Pacher et al., 2007; Radi, 2013).

El óxido nítrico puede promover la formación de peroxinitrito a través de su acción inhibitoria de la citocromo oxidasa, la cual provoca la inhibición reversible de la respiración mitocondrial y el incremento de la producción de radicales libres, contribuyendo a la formación de peroxinitrito. Éste, a su vez, ocasiona la inhibición irreversible de la respiración mitocondrial y una producción adicional de oxidantes, cerrando un circuito que contribuye a la muerte celular (Brown y Borutaite, 2002; Riobó et al., 2001). La producción de peroxinitrito también favorece la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial en la membrana interna de la mitocondria, provocando la interrupción del transporte electrónico y de la formación de ATP. La apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial también ocasiona el hinchamiento de la mitocondria y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, facilitando la liberación de moléculas pro-apoptóticas como citocromo c y AIF (“apoptosis-inducing factor”). Estas moléculas activan una serie de efectores que finalmente provocan la fragmentación del ADN nuclear y la apoptosis celular (Brown y Borutaite, 2002; Choi et al., 2002; Pacher et al., 2007). Además, la inhibición de la respiración mitocondrial desencadena la liberación de glutamato y activación de los receptores NMDA en las neuronas. Esta activación conduce a una despolarización de la membrana plasmática, entrada masiva de calcio y muerte neuronal por excitotoxicidad (Bal-Price y Brown, 2001). En resumen, el peroxinitrito formado a partir de la acción inhibitoria del óxido nítrico

sobre la respiración mitocondrial dispara diferentes mecanismos que terminan provocando la muerte celular.

### **El LPS como modelo experimental de activación microglial**

Numerosas investigaciones han utilizado diferentes estímulos inflamatorios para inducir la activación de la microglía. Uno de los estímulos más ampliamente usado es el LPS bacteriano, también conocido como endotoxina bacteriana, que es capaz de desencadenar una reacción inflamatoria promovida por fagocitos. Se trata de un glicolípido complejo, de naturaleza anfipática, con seis cadenas de ácidos grasos, que constituye el principal componente de la cara externa de la membrana de las bacterias Gram-negativas y es uno de los más potentes estimuladores microbianos de la respuesta inmune innata.

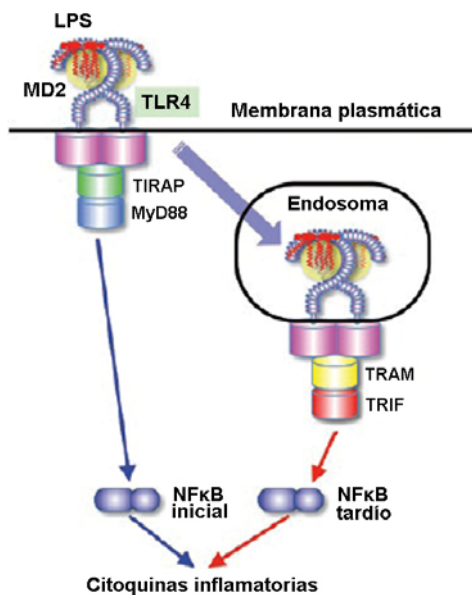
El LPS es habitualmente usado para inducir la activación de la microglía en experimentos llevados a cabo en cultivos *in vitro* de células microgliales (Calderó et al., 2009; di Penta et al., 2013; Lijia et al., 2012; Neher et al., 2011; Polazzi y Contestabile, 2006). Aunque los modelos *in vitro* de activación con LPS no pueden imitar con precisión las condiciones en las que la microglía se activa en situaciones patológicas y enfermedades degenerativas, la administración *in vivo* de LPS también induce activación microglial y causa neuroinflamación y daño neuronal (Block et al., 2007; Lehnardt et al., 2002, 2003; Ling et al., 2006; Qin et al., 2007). Además, diferentes estudios demuestran que el LPS solo es neurotóxico en presencia de microglía, indicando que ésta es la responsable del daño neuronal (Gao et al., 2002, Gibbons y Dragunow, 2006).

La estimulación de la microglía con LPS produce cambios en la morfología de las células, que dependen del modelo experimental utilizado, y provoca un cambio drástico de la función microglial, induciendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, prostaglandinas, óxido nítrico y  $O_2^-$ . Entre las citoquinas pro-inflamatorias liberadas por la microglía estimulada con LPS se incluyen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Chauvet et al., 2001; Dai et al., 2011; Frank et al., 2010; Lund et al., 2006; Mertsch et al., 2001; Minogue et al., 2012;

Qin et al., 2007; Rankine et al., 2006; Wang et al., 2005), mientras que las principales quimioquinas segregadas por la misma son MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y RANTES (Lund et al., 2006; Mertsch et al., 2001; Olson y Miller, 2004; Qin et al., 2007; Zhang et al., 2009). La activación por LPS también induce la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2) encargada de la producción de prostaglandinas (Akira y Sato, 2003; Akira y Takeda, 2004; Dai et al., 2011; McCoy y O'Neill, 2008), las cuales participan en la respuesta inflamatoria. Así mismo, el LPS induce la expresión de iNOS en las células microgliales y la consiguiente producción de óxido nítrico (Arias-Salvatierra et al., 2012; Brown 2007; Lijia et al., 2012; Neher et al., 2012; Wang et al., 2005), así como la activación de NADPHox, que produce O<sub>2</sub><sup>-</sup> (He et al., 2013; Kaneko et al., 2012; Li et al., 2005; Lijia et al., 2012; Neher et al., 2012; Wang et al., 2012), contribuyendo a la muerte de neuronas y oligodendrocitos.

El mecanismo molecular mediante el cual se produce la activación microglial inducida por LPS está mediado por el receptor TLR4 (Kaway y Akira, 2010; Lehnardt et al., 2003; Parajuli et al., 2012; Takeda et al., 2003). La funcionalidad de TLR4 requiere su asociación con la proteína MD2 (Fig. 12), que interacciona con el dominio extracelular de TLR4 (Kaway y Akira, 2010; Miyake, 2004; Park et al., 2009a; Takeda et al., 2003). Cinco de las seis cadenas lipídicas del LPS se unen a MD2, mientras que la cadena restante se asocia con TLR4. Tras la unión al LPS, se forma un dímero del complejo TLR4-MD2-LPS, permitiendo así la unión de las proteínas adaptadoras TIRAP y MyD88 (“myeloid differentiation factor 88”) al dominio citoplasmático de TLR4. La unión de estas proteínas adaptadoras al complejo TLR4-MD2-LPS es capaz de iniciar la ruta de señalización dependiente de MyD88 que termina induciendo la activación inicial del factor NF $\kappa$ B. En esta ruta de señalización se activan algunas quinasas, como MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) e IKK (quinasa del inhibidor de NF $\kappa$ B). Seguidamente, IKK fosforila al inhibidor de NF $\kappa$ B, activando este factor de transcripción que es transportado al núcleo. Además, el complejo TLR4-MD2-LPS es internalizado en la membrana de endosomas (Arroyo et al., 2011; Kawai y

Akira, 2010), donde atrae otras moléculas como TRAM y TRIF (“toll-interleukin-1 receptor domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$  factor”), cuya unión al complejo dispara la ruta de señalización dependiente de TRIF que permite la activación tardía de NF $\kappa$ B. Finalmente, la activación temprana y tardía de este factor de transcripción es requerida para inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, como las anteriormente mencionadas (Kawai y Akira, 2010).



**Fig. 12.** Vías de señalización del receptor TLR4 asociado a la proteína MD2 y activado por LPS. Ver explicación en el texto. Modificado de Kawai y Akira (2010).

Por otra parte, el reconocimiento del LPS también puede requerir la participación de otras proteínas que interaccionan con TLR4. Así, el LPS se puede unir a una proteína presente en el suero, la proteína ligadora del LPS, y el complejo formado es reconocido por el antígeno de diferenciación monocítico (CD14), una molécula anclada a glicosil-fosfatidil-inositol expresada por los macrófagos. Seguidamente, hay un acercamiento entre CD14 y TLR4 que interaccionan antes de iniciar las rutas de señalización mediadas por LPS (Nadeau y Rivest, 2000; Takeda et al., 2003).

## **Los cultivos organotípicos de retina como modelo experimental para el estudio de la microglía**

Desde los trabajos pioneros de del Río Hortega, numerosas investigaciones han profundizado en el estudio del comportamiento y las funciones de las células microgliales del SNC en estado normal y en situaciones patológicas. Muchos aspectos de este estudio requieren el empleo de ensayos experimentales, difíciles de llevar a cabo en animales *in situ* pero facilitados mediante la utilización de técnicas de cultivo *in vitro*. En las investigaciones en neurociencias se han utilizado dos tipos principales de cultivos *in vitro*, los cultivos de células disociadas (o cultivos celulares) y los cultivos de partes más o menos extensas de tejido nervioso intacto (denominados cultivos organotípicos). En los primeros, el tejido nervioso es disgregado y las neuronas o células gliales individualizadas son aisladas y cultivadas sobre una superficie permisiva sobre la que se adhieren y crecen. Sin embargo, las células microgliales son un tipo celular que responde intensamente a cambios en el microambiente de forma casi inmediata, por lo que la microglía cultivada se redondea rápidamente y adquiere caracteres similares a microglía activada (Hurley et al., 1999; Lee et al., 2002; Slepko y Levi, 1996). En los cultivos organotípicos, a diferencia de los cultivos de células disociadas, se realizan rebanadas de 200-400  $\mu\text{m}$  de espesor de diferentes regiones del SNC en las que se preserva parcialmente la citoarquitectura del tejido originario, de forma que el microambiente celular conserva un alto grado de organización y diferenciación celular, semejante al que existe *in vivo* (Gähwiler et al., 1997; Lossi et al., 2009). La introducción de un método simple, que permite cultivar rebanadas de hipocampo sobre membranas semiporosas en una interfase aire-líquido (Stoppini et al., 1991), incrementó drásticamente el uso de los cultivos organotípicos en el estudio de las funciones y disfunciones del SNC. Así, los cultivos organotípicos de diferentes regiones del SNC adulto y en desarrollo se han convertido en una técnica habitual para el estudio de algunos aspectos de la biología de las células microgliales, como su activación en situaciones patológicas o de daño del SNC (Dailey y Waite, 1999; Grossmann et al., 2002; Kurpius et al.,

2006; Mitrasinovic et al., 2005; Petersen y Dailey, 2004; Stence et al., 2001), sus funciones durante el desarrollo (Czapiga y Colton, 1999; Marín-Teva et al., 2004), su proceso de diferenciación (Hailer et al., 1996, 1997) o su comportamiento migratorio bajo diferentes condiciones experimentales (Czapiga y Colton, 1999; Dailey y Waite, 1999; Grossmann et al., 2002; Hailer et al., 1997; Heppner et al., 1998; Kurpius et al., 2007; Petersen y Dailey, 2004; Stence et al., 2001).

La retina embrionaria es un modelo útil para el análisis de la biología de la microglía inmadura y la utilización de cultivos organotípicos de retina facilita el tratamiento experimental con diferentes moléculas. El escaso espesor de la retina permite cultivar explantes más o menos extensos sin tener que seccionar el tejido para obtener rebanadas, como sucede en los cultivos de otras regiones del SNC. Esto favorece que las superficies superior e inferior de los explantes cultivados coincidan con las superficies escleral y vítrea de la retina, imitando así las condiciones naturales de la retina *in situ*. Los cultivos organotípicos de retina de roedores han sido extensamente usados en diferentes estudios (Broderick et al., 2000; Carter y Dick, 2003, 2004; Engelsberg et al., 2004; Ferrer-Martín et al., 2014; Mertsch et al., 2001) y, aunque en su preparación no se efectúa la sección del tejido, sigue habiendo una respuesta rápida de la microglía a las condiciones de cultivo, activándose desde el comienzo del mismo. Sin embargo, las células microgliales de los cultivos organotípicos de retina embrionaria de aves no parecen responder de la misma manera, ya que se ha puesto a punto en nuestro laboratorio un modelo de cultivos organotípicos de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) (Carrasco et al., 2011), en los que la microglía no muestra signos de activación. Por el contrario, las células microgliales mantienen su comportamiento migratorio en la superficie vítrea de la retina durante las primeras 24 horas de cultivo *in vitro*, mostrando morfologías ameboides alargadas y polarizadas en la dirección de la migración, igual que sucede en la retina *in situ*. Esto hace que nuestro modelo de cultivo de ERECs sea una excelente herramienta para analizar el proceso de activación de las células

microgliales inmaduras (no activadas previamente) inducido por diferentes moléculas o estímulos.



# **Hipótesis y Objetivos**

---



La activación microglial es un proceso tradicionalmente referido a la reacción de la microglía madura (ramificada) frente a un daño o una patología del SNC adulto, que se manifiesta morfológicamente mediante una transición desde el estado ramificado hasta un fenotipo redondeado. La activación de la microglía inmadura (ameboide) durante el desarrollo normal del SNC es mucho menos evidente, ya que no muestra drásticos cambios de morfología, pero su estudio ha empezado a cobrar protagonismo en los últimos años. Así, la activación de la microglía ameboide ha sido implicada en la acción de ésta sobre mecanismos de desarrollo tan importantes como neurogénesis (Cunningham et al., 2013; Shigemoto-Mogami et al., 2014) y sinaptogénesis (Arnoux et al., 2013; Schafer et al., 2012).

La microglía ameboide del SNC inmaduro en situación normal muestra una morfología redondeada y gran actividad migratoria, proliferativa y fagocítica (Cuadros y Navascués, 1998; Ling y Wong, 1993; Marín-Teva et al., 1998, 1999a; Rezaie y Male, 1999; Rigato et al., 2011; Streit, 2001; Swinnen et al., 2013), características similares a las de la microglía activada del SNC adulto en situación patológica (Boche et al., 2013; Garden y Möller, 2006; Hanisch y Kettenmann, 2007; Kreutzberg, 1996; Streit y Xue, 2009). Esta semejanza entre los estados ameboide y activado de la microglía sugiere que la microglía ameboide tiene un cierto grado de activación, que nosotros hemos denominado activación basal (Sierra-Martín et al., 2014), aunque Goings et al. (2006) han utilizado el término de activación constitutiva. Esta idea es apoyada por una diversidad de estudios. Así, Shigemoto-Mogami et al. (2014) han demostrado que la microglía ameboide de zonas neurogénicas del cerebro postnatal de rata expresa altos niveles de CD11b y CD68, que disminuyen drásticamente tras la inhibición de la activación microglial mediante administración de minociclina. Así mismo, la minociclina también induce una disminución significativa de la secreción de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  por parte de la microglía ameboide (Shigemoto-Mogami et al., 2014). Un interesante estudio en el área preóptica de ratas recién nacidas (Lenz et al., 2013) ha demostrado que los machos muestran un nivel de activación de la

microglía inmadura mayor que las hembras y estas diferencias son revertidas tras la inhibición de la activación microglial en machos mediante tratamiento con minociclina. La presencia de marcadores de activación también ha sido demostrada en la microglía ameboide de las columnas motoras laterales de la médula espinal de embriones de ratón (Rigato et al., 2011) y de la sustancia blanca subcortical del cerebro de ratones postnatales (Hristova et al., 2010). Por otra parte, una proporción de la microglía ameboide de la corteza cerebral de ratones postnatales muestra propiedades electrofisiológicas (mediadas por la presencia de los canales de potasio regulados por voltaje Kv1.3), que son características de la microglía activada (Arnoux et al., 2013). Además, el estudio de Crain et al. (2013) revela que la microglía inmadura del cerebro postnatal de ratón expresa niveles de moléculas marcadoras de activación, como iNOS, TNF- $\alpha$  y arginasa 1, mucho más elevados que la microglía madura del cerebro adulto. En conjunto, todos estos estudios apoyan la idea de que la microglía ameboide, o al menos una proporción de la misma, se encuentra en estado de activación basal durante el desarrollo normal del SNC.

La expresión de iNOS es considerada como uno de los principales marcadores de activación microglial (Bal-Price y Brown, 2001; Cherry et al., 2014) y ha sido demostrada en algunas células microgliales ameboides durante el desarrollo del SNC de roedores (Crain et al., 2013; Cunningham et al., 2013). La retina embrionaria de codorniz es un modelo de estudio habitualmente utilizado en nuestro laboratorio y el patrón de desarrollo microglial en la misma es bien conocido (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004). Aprovechándonos de este conocimiento, el primer objetivo de esta Tesis ha sido comprobar la hipótesis de que la microglía ameboide adopta un estado de activación basal durante el desarrollo de la retina, manifestado por la fuerte expresión de iNOS y la consiguiente síntesis de óxido nítrico.

La microglía ameboide en estado de activación basal es capaz de incrementar su nivel de activación, en respuesta a diferentes estímulos que producen daño en el SNC inmaduro (Acarin et al., 1996; Czeh et al., 2011;

Ferrazzano et al., 2013; Fiske y Brunjes, 2000; Fukui et al., 2006; Graeber et al., 1998; Hao et al., 2001; Hutton et al., 2008; Li et al., 2011; Manivannan et al., 2014; Sánchez-López et al., 2005; Sivakumar et al., 2011). El aumento del grado de activación microglial ha sido denominado sobreactivación (Sierra-Martín et al., 2014). La sobreactivación de la microglía ameboide incrementa su actividad fagocítica y proliferativa (Hao et al., 2001) y la liberación de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Czeh et al., 2011; Deng et al., 2008; Ferrazzano et al., 2013; Fukui et al., 2006; Hristova et al., 2010; Li et al., 2011; Sivakumar et al., 2011), quimioquinas, como CSF-1 (Deng et al., 2009; Hao et al., 2001; Sivakumar et al., 2011), prostaglandinas (Li et al., 2010) y factores citotóxicos, como óxido nítrico (Chao et al., 1992; Hao et al., 2001). Por lo tanto, la sobreactivación de la microglía ameboide en respuesta a un daño del SNC inmaduro tiene efectos similares a los descritos en la activación de la microglía ramificada del SNC adulto. No obstante, la respuesta de la microglía ameboide no es homogénea en todo el SNC (Ferrazzano et al., 2013; Hutton et al., 2008), siendo más rápida y transitoria en algunas regiones, como el hipocampo, y más lenta y persistente en otras, como la corteza cerebral (Ferrazzano et al., 2013). La microglía de la retina de ratas postnatales también es capaz de sobreactivarse en respuesta a hipoxia (Sivakumar et al., 2011). En la presente Tesis, hemos analizado la capacidad de sobreactivación de la microglía ameboide de la retina embrionaria de codorniz en respuesta al tratamiento con LPS, utilizando un modelo de cultivo organotípico puesto a punto en nuestro laboratorio con anterioridad (Carrasco et al., 2011).

En los explantes de retina embrionaria de codorniz cultivados *in vitro*, la microglía ameboide muestra un comportamiento fisiológico, similar al observado en la retina *in situ* (Carrasco et al., 2011). Por lo tanto, los cultivos organotípicos de este tipo de explantes constituyen un excelente modelo para el análisis de los efectos de diferentes tratamientos experimentales sobre la microglía ameboide. El tratamiento con LPS, tanto *in vivo* como *in vitro*, es uno de los procedimientos más utilizados para inducir la activación microglial (Block et al., 2007; Broderick

et al., 2000; Calderó et al., 2009; Carter y Dick, 2003; Chang et al., 2001; Lehnardt et al., 2003; Lijia et al., 2012; Ling et al., 2006; Lund et al., 2006; Neher et al., 2011; Wang et al., 2011; Woo et al., 2008) y el consiguiente incremento en la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico (di Penta et al., 2013; Kumar et al., 2014; Mander y Brown, 2005; Possel et al., 2000; Wen et al., 2011; Zhao et al., 2006). El LPS también se ha utilizado en algunos estudios para inducir la sobreactivación de la microglía inmadura (Cunningham et al., 2013; Hristova et al., 2010; Hutton et al., 2008; Li et al., 2010). Por lo tanto, el segundo objetivo de esta Tesis ha consistido en estudiar la sobreactivación de la microglía ameboide tras el tratamiento con LPS de explantes de retina embrionaria de codorniz cultivados *in vitro*. Este estudio se ha realizado mediante el análisis de los cambios sufridos por la microglía ameboide en su morfología y en su compartimento lisosómico, así como en la expresión de iNOS y formación de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos en el primer objetivo de esta Tesis demuestran que las células microgliales ameboides expresan iNOS y producen óxido nítrico durante el desarrollo normal de la retina embrionaria de codorniz. El desarrollo del segundo objetivo revela que la expresión de iNOS y la consiguiente producción de óxido nítrico se incrementan significativamente en cultivos organotípicos de retina embrionaria en respuesta a la acción del LPS. El óxido nítrico puede contribuir tanto a la supervivencia (Mejía-García y Paes-de-Carvalho, 2007; Mejía-García et al., 2013; Oldreive et al., 2012; Wang y Zhu, 2014) como a la muerte neuronal (Mander y Brown, 2005; Rathnasamy et al., 2014; Wang et al., 2000), dependiendo de su concentración y del estado de oxidación celular (Brown, 2010; Kang et al., 2004). Un reciente estudio demuestra que el aporte exógeno de óxido nítrico puede tener efectos contrarios en la retina del embrión de pollo en diferentes momentos del desarrollo, induciendo un incremento de la muerte celular en E6 y una disminución de la misma en E8 (Socodato et al., 2014). Por lo tanto, el tercer objetivo de la Tesis ha pretendido desentrañar el papel del óxido nítrico tras la sobreexpresión de iNOS inducida por

LPS en la microglía ameboide de cultivos organotípicos de retina embrionaria de codorniz.

Los resultados de este objetivo podrían contribuir al conocimiento de los mecanismos de muerte neuronal durante el desarrollo normal de la retina de aves, ya que hemos utilizado cultivos organotípicos de explantes de retina central de embriones de codorniz de E8, en los que está teniendo lugar la muerte programada de células ganglionares (Marín-Teva et al., 1999c). Además, en estos explantes, la microglía ameboide está migrando tangencialmente en la parte vítrea de la retina, en estrecha relación topográfica con las células ganglionares. Por lo tanto, el objetivo se ha centrado en el análisis de los efectos del óxido nítrico producido por la microglía ameboide sobreactivada sobre la muerte de células ganglionares en los explantes de retina cultivados *in vitro*. En la retina neonatal de ratas sometidas a hipoxia, la sobreactivación de la microglía ameboide incrementa la producción de las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que parecen inducir la muerte de células ganglionares (Sivakumar et al., 2011), pero este estudio no ha analizado si el óxido nítrico participa en el mecanismo de muerte celular. Por otra parte, las células microgliales inducen la muerte neuronal durante el desarrollo del cerebelo y el hipocampo mediante un mecanismo dependiente del establecimiento de contactos fagocíticos y de la liberación de aniones O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Marín-Teva et al., 2004, Wakselman et al., 2008). Se desconoce si la liberación de óxido nítrico por la microglía ameboide podría participar en un mecanismo similar que pudiera inducir la muerte de células ganglionares en la retina. Los resultados obtenidos en nuestro tercer objetivo pueden contribuir a aclarar esta cuestión.

En resumen, el objetivo general de la presente Tesis ha sido comprobar la hipótesis de que la microglía ameboide de la retina embrionaria de codorniz posee una activación basal durante el desarrollo normal y es capaz de sobreactivarse en respuesta a un estímulo agresivo, induciendo la muerte de células ganglionares. Este objetivo general se ha desglosado en los siguientes objetivos concretos:

**Primero:** Estudio del estado de activación de la microglía, mediante análisis de la expresión de iNOS y síntesis de óxido nítrico, a lo largo del desarrollo *in situ* de la retina de codorniz, desde etapas tempranas del desarrollo embrionario hasta la edad adulta.

**Segundo.** Análisis del nivel de activación de la microglía ameboides (mediante estudio de los cambios en su morfología, compartimento lisosómico, expresión de iNOS y formación de óxido nítrico) en explantes de retina embrionaria de codorniz cultivados *in vitro* en condiciones control y tras el tratamiento con LPS.

**Tercero.** Estudio de la participación del óxido nítrico producido por la microglía ameboides sobreactivada en la muerte de células ganglionares que tiene lugar en cultivos organotípicos de retina embrionaria de codorniz.

Los tres objetivos se han expuesto en una sola unidad, con los clásicos apartados de un artículo científico (materiales y métodos, resultados y discusión). No obstante, los dos primeros objetivos han dado lugar a la publicación de un artículo (Sierra-Martín et al., 2014), mientras que el último objetivo se incluye en otro artículo cuyo manuscrito está actualmente en preparación.



# **Materiales y Métodos**

---



## **Animales**

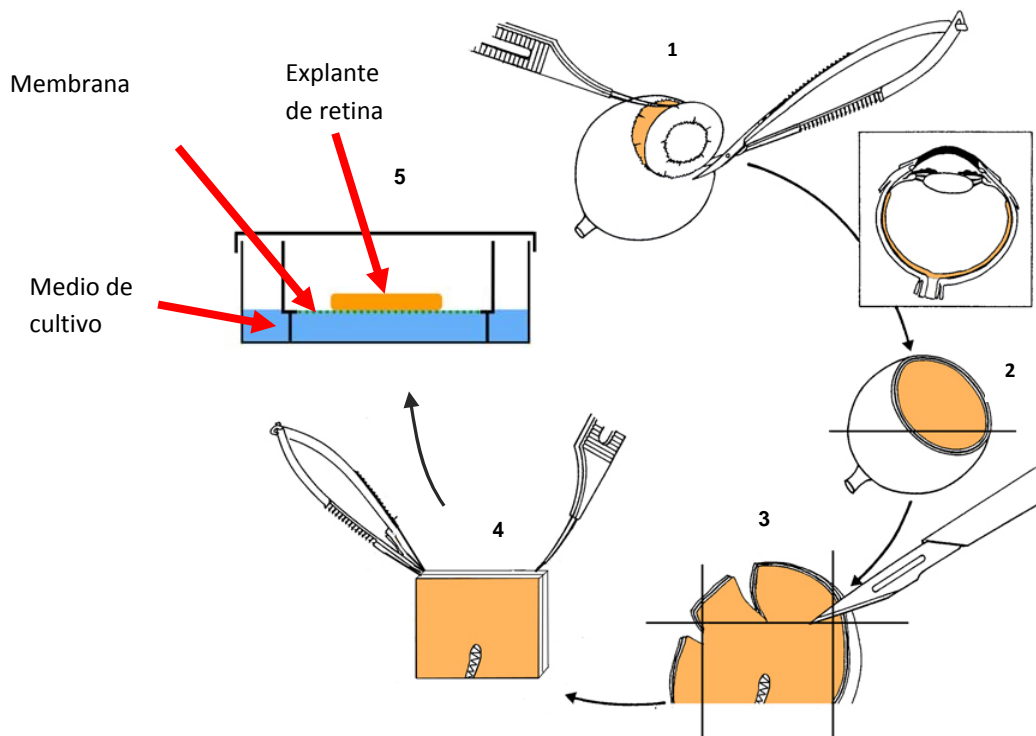
En el presente estudio se han empleado retinas de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) de E8, E9, E14 y E16, así como retinas de codornices de 4 días post-eclosión (P4) y adultas (P60), para determinar la expresión de iNOS y síntesis de óxido nítrico desde etapas tempranas del desarrollo hasta la edad adulta. También se han utilizado cultivos *in vitro* de ERECs de E8 para realizar diferentes tipos de pruebas tras la activación experimental de la microglía inmadura. La elección de la edad embrionaria (E8) de los explantes de retina se hizo teniendo en cuenta el patrón de colonización de la retina por las células microgliales, las cuales entran desde la cabeza del nervio óptico/base del pecten (CNO/BP) entre E7 y E16 (Navascués et al., 1995; Martín-Teva et al., 1999c). En E7, la retina es aún muy inmadura y han penetrado en ella pocas células microgliales, mientras que desde E9 en adelante el número de células microgliales distribuidas en la superficie vítrea de la retina es demasiado elevado y algunas de ellas han comenzado a migrar radialmente hacia niveles más esclerales. Así, se optó por analizar la activación de la microglía inmadura en explantes de retina de E8, en los que ya hay un número suficiente de células microgliales localizadas exclusivamente en la parte más vítrea de los mismos.

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Granada, siguiendo las directrices de la Directiva de la Unión Europea 2010/63/EU y la normativa legal española sobre protección de animales utilizados para fines científicos.

## **Aislamiento de retinas y cultivo *in vitro* de ERECs**

Las retinas eran aisladas y desprovistas de epitelio pigmentario mediante disección de los ojos en solución salina balanceada de Gey (Sigma), suplementada con 5 mg/ml de glucosa (Sigma) y 50 UI- $\mu$ g/ml de penicilina-estreptomina (Gibco) y enfriada en hielo. Se utilizaron retinas completas no cultivadas de E8, E9, E14, E16, P4 y P60 para el estudio de la expresión de iNOS y síntesis de óxido nítrico contemplado en el primer objetivo. Por otra parte, en los objetivos

segundo y tercero se utilizaron ERECs obtenidos a partir de retinas aisladas de E8, que eran cultivados *in vitro*. Para la obtención de ERECs, se recortaba un explante cuadrado de 3 mm de lado en la zona central de cada retina aislada. Dicho explante incluía la parte dorsal de la CNO/BP (Fig. 13) y contenía células microgliales ameboides que estaban migrando en su parte vítrea.



**Fig. 13.** Método de aislamiento y cultivo *in vitro* de un EREC siguiendo el método de Stoppini et al., (1991) con algunas modificaciones. El ojo, aislado en solución salina de Gey enfriada con hielo, se disecaba, eliminando la córnea, el cuerpo ciliar, el cristalino, la esclera y el cuerpo vítreo (1). A continuación, se aislaba la parte central de la retina (3) y se obtenía un explante cuadrado de unos 3 mm de lado que contenía la parte dorsal de la CNO/BP (4). Seguidamente, el explante era desprovisto de epitelio pigmentario y se cultivaba, con la parte vítrea hacia abajo, sobre una membrana semipermeable colocada en un pocillo con medio de cultivo. La superficie de éste estaba en contacto con la parte inferior del explante (5).

Los ERECs de E8 se cultivaban *in vitro* siguiendo el método de Stoppini et al. (1991) con algunas modificaciones (Marín-Teva et al., 2004). Con la ayuda de

una pipeta de vidrio de bordes no cortantes, cada explante era situado, con la parte vítrea hacia abajo, sobre la membrana porosa de 0,4  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro de un dispositivo Millicell de 30 mm (Millipore). Cada dispositivo Millicell, con su respectivo explante, se disponía en un pocillo (de una placa de 6 pocillos) con 1 ml de medio de cultivo. Para evitar que el explante pudiera desprenderse de la membrana porosa y flotar en el medio, se procuraba que la superficie del mismo quedase en contacto con la membrana, sin llegar a cubrirla. Así, cada EREC tenía acceso al medio de cultivo por su parte inferior (vítrea) y al aire por su parte superior (Fig. 13). El medio de cultivo estaba compuesto por 50% de medio basal de Eagle con sales de Earle, 25% de solución salina de Hanks (Gibco), 25% de suero de caballo (Gibco), L-glutamina 1 mM, 10 UI- $\mu\text{g/ml}$  de penicilina-estreptomicina (Gibco) y 5 mg/ml de glucosa. Los explantes se incubaban en estufa de cultivo a 37°C, con atmósfera saturada de humedad y 5% de  $\text{CO}_2$ , entre 1 y 24 horas *in vitro* (hiv) de acuerdo con las necesidades del experimento.

### **Tratamiento de ERECs con LPS**

Para inducir la activación de las células microgliales, los ERECs de E8 eran tratados con LPS (*Escherichia coli* OB4:1111, Sigma), a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , que se añadía al medio de cultivo desde el inicio de cada experimento. En diferentes experimentos, los ERECs de E8 se cultivaban entre 1 (E8+1hiv) y 24 hiv (E8+24hiv). El tratamiento con LPS se realizaba en los ERECs procedentes del ojo derecho de cada embrión (E8+1hiv-LPS a E8+24hiv-LPS), mientras que los ERECs obtenidos del ojo izquierdo eran usados como controles no tratados (E8+1hiv-CT a E8+24hiv-CT). También se utilizaban explantes de retina de E9 sin cultivar, con objeto de comparar los resultados de los ERECs de E8+24hiv con los obtenidos en la retina *in situ* de una edad equivalente.

## **Anticuerpos**

Las células microgliales de la retina de codorniz eran identificadas mediante marcaje inmunocitoquímico con el anticuerpo monoclonal QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB], University of Iowa), que reconoce todas las células de línea hemangioblástica de codorniz, excepto eritrocitos maduros (Pardanaud et al., 1987), y todas las fases del desarrollo de las células microgliales (Cuadros et al., 1992b). Por otra parte, el anticuerpo monoclonal Lep100 (DSHB) se empleaba para marcar el compartimento lisosómico de las células microgliales (Sánchez-López et al., 2005).

Las células en proceso de apoptosis eran identificadas con un anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 activada (R&D Systems), tal como ha sido descrito en la retina de embriones de pollo (Borsello et al., 2002).

La iNOS era reconocida mediante inmunomarcaje con dos anticuerpos policlonales anti-iNOS de diferente procedencia (Abcam, ref. ab3523; Thermo Fisher Scientific, ref. PA1-036). Estos dos anticuerpos reconocen la iNOS de ratón (pero no otras isoformas de NOS, como eNOS y nNOS) y tienen reactividad para la iNOS de pollo, tal como se especifica en la ficha técnica de ambos anticuerpos. La especificidad del marcaje anti-iNOS se comprobó mediante comparación entre el inmunomarcaje simple con este anticuerpo y el obtenido tras el doble tratamiento con anti-iNOS y QH1. También se realizaron controles negativos, omitiendo el anticuerpo primario.

El anticuerpo monoclonal 39.4D5 (DSHB) reconoce el factor de transcripción Islet-1 y era utilizado para identificar diferentes subpoblaciones neuronales de la retina que lo expresan, entre las que se incluyen las células ganglionares (Fischer et al., 2002). Las células de Müller se identificaban mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo monoclonal H5 (DSHB), que reconoce la vimentina, muy abundante en el citoesqueleto de dichas células. El anticuerpo monoclonal M1B4 (DSHB), que reconoce la proteína de matriz extracelular tenascina, se utilizaba para marcar las capas plexiformes de la retina

embrionaria (Belmonte et al., 2000; Pérez y Halfter, 1993; Sánchez-López et al., 2005).

### **Inmunocitoquímica**

El marcaje inmunocitoquímico con diferentes anticuerpos se llevó a cabo en montajes totales de retinas completas y de explantes de retina, así como en criosecciones de los mismos.

Los montajes totales de retinas completas se obtenían mediante aislamiento de éstas y posterior fijación en paraformaldehído 4% en tampón fosfato (PB) 0,1M (pH 7,4), durante 1 hora, a 4° C. Los montajes totales de ERECs de E8 cultivados *in vitro* se despegaban de la membrana Millicell al final del cultivo y se fijaban igual que las retinas completas. El posterior tratamiento inmunocitoquímico de los montajes totales (tanto de retinas completas como de ERECs) se realizaba *in toto*.

Las criosecciones eran obtenidas en algunos ERECs de E8+12hiv-LPS y E8+24hiv-LPS y en sus respectivos controles no tratados, así como en algunas retinas completas no cultivadas. Los explantes o las retinas completas se fijaban en paraformaldehído 4% en PB 0,1M, durante 1 hora, a 4° C, se lavaban varias veces en PBS 0,01M con Tritón X-100 0,1% (PBS-0,1%T) y se incubaban a 4° C, durante toda la noche, en sacarosa 20% en PBS-0,1%T. A continuación, las muestras se sumergían en una solución de gelatina 7,5% y sacarosa 20% en PBS-0,1%T enfriada sobre hielo y, seguidamente, se congelaban en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se almacenaban a -40° C hasta la obtención de criosecciones en un criostato Leica CM1850. Las criosecciones, de 15 µm de espesor y perpendiculares a la línea del pecten, se obtenían seriadamente y se montaban alternativamente sobre diferentes portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Scientific), a fin de que secciones adyacentes pudieran ser sometidas a procedimientos inmunocitoquímicos con distintos anticuerpos.

### ***Inmunocitoquímica en montajes totales***

Los montajes totales de retinas o de ERECs eran sometidos a dobles inmunomarcajes con QH1 (para identificar la microglía) y uno de los anticuerpos anti-iNOS, anti-caspasa 3 o Lep100.

Para el doble marcaje anti-iNOS/QH1, los montajes totales eran fijados en paraformaldehído 4% en PB 0,1M (pH 7,4), durante 1 hora, a 4° C, y lavados en PBS-0,1%T. Para mejorar la penetración de los anticuerpos, las muestras se permeabilizaban en PBS 0,01M con Tritón X-100 1% (PBS-1%T), durante 4 horas, a 4° C, con agitación. Después de un lavado en PBS-0,1%T, se incubaban durante toda la noche, a 4° C, en el anticuerpo policlonal anti-iNOS diluido a 1:500 en PBS 0,01M con albúmina de suero bovino (BSA) 1% y Triton X-100 0,25% (PBS-1%BSA-0,25%T). Tras lavarlos en PBS-0,1%T, se incubaban en el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (AF-594, Molecular Probes, dilución 1:1000), durante 4 horas, a temperatura ambiente. Después de un nuevo lavado en PBS-0,1%T, los montajes totales eran incubados en el anticuerpo QH1 (dilución 1:4), durante toda la noche, a 4° C, y seguidamente en el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (AF-488, Molecular Probes, dilución 1:1000), durante 4 horas, a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaban en PBS-0,1%T y se incubaban durante 5 minutos en Hoechst 33342 (Hoechst, Sigma) diluido en PBS 0,01M (10 µg/ml), con objeto de marcar los núcleos celulares. Después de un nuevo lavado, las muestras se extendían sobre un portaobjetos con la parte vítrea hacia arriba y se montaban con Fluoromount G (Southern Biotech).

Para el doble marcaje anti-caspasa 3/QH1, tras fijar con paraformaldehído 4% en PB 0,1M y lavar en PBS-0,1%T, los sitios antigénicos no específicos se bloqueaban en suero normal de cabra (NGS) diluido al 10% en PBS-1%BSA-0,25%T, durante 1 hora, a temperatura ambiente, con agitación. Seguidamente, tras un nuevo lavado, la incubación en los dos anticuerpos primarios se hacía simultáneamente, utilizando una mezcla de los anticuerpos QH1 (dilución 1:4) y anti-caspasa 3 (dilución 1:100), en la que los montajes totales se incubaban



durante 48 horas, a 4° C, con agitación. Tras lavar en PBS-0,1%T, la incubación en los dos anticuerpos secundarios también se llevaba a cabo simultáneamente, durante 4 horas, en una mezcla de anti-IgG de ratón conjugado con AF-488 (para revelar el anticuerpo monoclonal QH1) y anti-IgG de conejo conjugado con AF-594 (para revelar el anticuerpo policlonal anti-caspasa 3), ambos diluidos a 1:1000. Tras un nuevo lavado, la tinción de los núcleos celulares con Hoechst y el montaje de las muestras se hacían como se ha descrito antes.

Para el doble marcaje Lep100/QH1, los montajes totales se fijaban y permeabilizaban con metanol, durante 10 minutos, a -20° C, con posterior lavado en PBS-0,1%T y bloqueo de los sitios antigénicos no específicos con NGS 10% en PBS-1%BSA-0,25%T, durante 1 hora, a temperatura ambiente, con agitación. Para evitar marcajes cruzados entre los dos anticuerpos monoclonales, las muestras se incubaban primero con el anticuerpo monoclonal Lep100 (dilución 1:1 en PBS-1%BSA-0,25%T), durante 72 horas, a 4° C, con agitación, y a continuación con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con AF-594 (dilución 1:1000), durante 4 horas, a temperatura ambiente, con agitación. Después de lavar el anticuerpo secundario durante toda la noche en PBS-0,1%T, los montajes totales se trataban de nuevo con NGS en las condiciones ya descritas y se incubaban con el anticuerpo monoclonal QH1 (dilución 1:4), durante 24 horas, a 4° C, con agitación. Seguidamente, se incubaban en el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con AF-488 (dilución 1:1000), durante 4 horas, a temperatura ambiente, con agitación. Finalmente, el marcaje de los núcleos celulares con Hoechst y el montaje con Fluoromount G se llevaba a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente.

### ***Inmunocitoquímica en criosecciones***

En criosecciones de algunas retinas y ERECs, tras su hidratación con PBS 0,01M, se realizaba un doble inmunomarcaje anti-iNOS/QH1 y tinción con Hoechst. Para ello, se seguía el procedimiento descrito para el mismo inmunomarcaje en montajes totales, excepto que no se llevaba a cabo

permeabilización y que la incubación en cada uno de los dos anticuerpos secundarios se reducía a 2,5 horas. Además, la tinción de los núcleos celulares con Hoechst se reducía a 3 minutos.

Las criosecciones de otros ERECs eran sometidas a un doble inmunomarcaje anti-caspasa 3/QH1 y tinción con Hoechst durante 3 minutos. Después de hidratar las secciones en PBS 0,01M, se seguía el protocolo descrito para el mismo inmunomarcaje en montajes totales, excepto que no se realizaba permeabilización, que la incubación en la mezcla de los dos anticuerpos primarios se reducía a una noche y que la incubación en la mezcla de anticuerpos secundarios se reducía a 2,5 horas.

En otras criosecciones de ERECs se hacía un inmunomarcaje simple con uno de los anticuerpos H5 (anti-vimentina), M1B4 (anti-tenascina) o 39.4D5 (anti-Islet-1), seguido de la tinción con Hoechst. En estos inmunomarcajes simples, las criosecciones no se permeabilizaban, se incubaban durante una noche en el correspondiente anticuerpo primario (dilución 1:10 para H5 y M1B4 y 1:100 para 39.4D5) y durante 2,5 horas en el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón conjugado con AF-488 a dilución 1:1000). Los núcleos celulares se teñían con Hoechst durante 3 minutos.

### **Cuantificación de la intensidad de fluorescencia anti-iNOS en la microglía**

La cantidad de iNOS presente en las células microgliales era evaluada mediante cuantificación de la intensidad de fluorescencia de anti-iNOS en células de montajes totales de retinas de E8, E9, E14, P4 y P60, doblemente inmunomarcadas con anti-iNOS/QH1. El análisis cuantitativo se realizó por separado en la CFN, CPI y CPE, excepto para retinas de E8 y E9, en las que la CPI y CPE estaban desprovistas de microglía. Se seleccionaron al azar 30 células microgliales QH1-positivas para cada edad y capa de la retina, de las que se obtenía la correspondiente imagen confocal en un microscopio Leitz DMRB equipado con el sistema de barrido láser confocal Leica TCS-SP5 (Leica). En la imagen de cada célula analizada, el contorno celular era perfilado en el canal

QH1. Seguidamente, el canal anti-iNOS se pasaba a escala de grises y se medía en él la intensidad media de los píxeles contenidos dentro del perfil celular, usando para ello el software Image J 1.48i (NIH, USA). La intensidad de los píxeles oscilaba entre 0 y 255, desde el tono más oscuro al más claro, respectivamente. Finalmente, a partir de las intensidades medidas en las diferentes células analizadas, se obtenían los valores medios de la intensidad de fluorescencia anti-iNOS de la microglía para cada edad y capa de la retina, que eran analizados estadísticamente (ver último apartado de Materiales y Métodos).

### **Análisis de la expresión del ARNm de iNOS mediante PCR a tiempo real**

La expresión de iNOS era analizada mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) en retinas no cultivadas de E8, E9, E14, E16, P4 y P60, así como en ERECs de E8+12hiv-LPS y sus controles.

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

Para la extracción del ARN total, las muestras se almacenaban a -80° C en 1 ml de Trizol. Tras su descongelación, se disgregaban en un homegeneizador manual de vidrio tipo Dounce de ranura estrecha (Pobel), para romper las células. Una vez disgregado el tejido, el extracto se pasaba a un tubo eppendorf de 1,5 ml libre de ARNasas, se añadía 0,2 ml de cloroformo y se centrifugaba a 13000 rpm, durante 15 minutos, a 4° C, en una ultracentrífuga refrigerada (Eppendorf 5415R). Tras la centrifugación, el sobrenadante se pasaba a un nuevo tubo eppendorf libre de ARNasas, donde se incubaba con 0,5 ml de isopropanol, y se volvía a centrifugar a 13000 rpm, durante 10 minutos, a 4° C. Seguidamente, se eliminaba el sobrenadante y se conservaba el precipitado, que contenía el ARN total aislado. Dicho precipitado se lavaba con etanol 70% libre de ARNasas, dejándolo secar durante 15-20 minutos, a temperatura ambiente. Una vez seco, el precipitado se resuspendía en 20 µl de agua libre de ARNasas (QIAGEN) y se incubaba durante 10 minutos en un bloque térmico (Accublock, Labnet), a 55-60° C, para facilitar la resuspensión del ARN total. Por último, 1 µl de la solución de ARN de cada

muestra se diluía 1:100 en agua destilada, para su cuantificación en un espectrofotómetro (Biophotometer Plus, Eppendorf). La concentración de ARN se calculaba sabiendo que cada unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN. También se obtenía la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm ( $ABS_{260}/ABS_{280}$ ) para determinar el grado de pureza de las muestras.

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

Para llevar a cabo la retrotranscripción del ARN a ADNc se utilizó el kit QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN), con el que se conseguía la eliminación de ADN genómico contaminante, además de la síntesis de ADNc.

En primer lugar, se procedía a la eliminación de ADN genómico presente en los extractos. Para ello, en un tubo eppendorf estéril, se mezclaban 2 µl de reactivo gDNA Wipeout Buffer 7x, un volumen variable de ARN (hasta 1 µg) según la concentración de la muestra y agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 14 µl. La mezcla se incubaba durante 10 minutos a 42° C en un bloque térmico (Accublock, Labnet) e inmediatamente se colocaba en hielo.

Para la reacción de retrotranscripción propiamente dicha, se utilizaba 1 µl de enzima (Quantiscript Reverse Transcriptase), 4 µl de tampón Quantiscript RT 5x, 1 µl de “primers” (oligo-dt and random primers Mix) y, por último, los 14 µl de ARN libre de ADN obtenidos en el paso anterior. Se utilizaban controles negativos en los que la enzima era sustituida por 1 µl de agua. El programa térmico definido por el fabricante consistía en una incubación de 15 minutos a 42° C (retrotranscripción), seguida de una incubación de 3 minutos a 9° C (inactivación del enzima) y refrigeración a 4° C.

### ***PCR a tiempo real***

La reacción de PCR a tiempo real se llevaba a cabo usando el kit comercial QuantiTect SYBR Green PCR (QIAGEN) en el termociclador iCycler iQ (Bio-Rad). Cada reacción se realizaba por triplicado, utilizando cada vez 10 µl de

reactivo SYBR Green Master Mix 2x, 2  $\mu$ l de “primer” (Gg\_NOS2\_1\_SG, QuantiTect primer Assay, QIAGEN), 1  $\mu$ l de ADNc y agua hasta completar un volumen de 20  $\mu$ l. Además, se utilizaban controles negativos de la reacción de amplificación, añadiendo 1  $\mu$ l de ARN sin retrotranscribir en lugar de ADNc. También se utilizaban muestras “blanco” en las que el ADNc era sustituido por agua. El perfil térmico utilizado para la reacción era el preestablecido en el software iCycler iQ detection system (Bio-Rad), con las modificaciones incorporadas por el fabricante del kit QuantiTect SYBR Green PCR. Dicho perfil consistía en 15 minutos a 95° C para la activación del enzima y 40 ciclos de 15 segundos a 95° C (desnaturalización), 30 segundos a 55° C (alineamiento) y 30 segundos a 72° C (amplificación). Para verificar que el fluorocromo SYBR Green sólo detectaba un producto de PCR, todas las reacciones se sometían a un ciclo adicional de disociación por calor después de los 40 ciclos de la PCR a tiempo real (Ririe et al., 1997). La detección de los productos de la PCR se realizaba midiendo el incremento de fluorescencia causado por la unión del colorante SYBR Green al ADN de doble cadena y calculando el valor Ct (ciclo de la PCR en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia) para cada una de las muestras. Todas las muestras eran estandarizadas respecto al gen de referencia ARNr 18S (Mn-Rn18s\_2\_SG, QuantiTect Primer Assay, QIAGEN), usado como control interno para la normalización de datos. La comparación del Ct de una muestra con el Ct del gen de referencia permitía calcular el incremento de Ct ( $\Delta$ Ct) en la citada muestra. Para la cuantificación de la expresión de iNOS en retinas no cultivadas de E8, E9, E14, E16, P4 y P60 se determinaban los  $\Delta$ Ct en una muestra de retina de E8 ( $\Delta$ Ct<sub>E8</sub>), que se utilizaba como unidad relativa de expresión, y en cada una de las muestras de diferentes edades ( $\Delta$ Ct<sub>E9</sub>,  $\Delta$ Ct<sub>E14</sub>,  $\Delta$ Ct<sub>E16</sub>,  $\Delta$ Ct<sub>P4</sub>,  $\Delta$ Ct<sub>P60</sub>). Según el método de comparación de las Ct de Livak y Schmittgen (2001), la diferencia de expresión del gen de iNOS respecto a E8 (N) se obtenía mediante la fórmula  $N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{edad problema}} - \Delta Ct_{E8}$ . Para la cuantificación de la expresión de iNOS en ERECs de E8 tratados con LPS,

el  $\Delta Ct$  en el control no tratado ( $\Delta Ct_{\text{EREC-CTRL}}$ ) se utilizaba como unidad relativa de expresión, de manera que  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{EREC-LPS}} - \Delta Ct_{\text{EREC-CTRL}}$ .

Se realizaban al menos tres experimentos diferentes de cuantificación del nivel de expresión de iNOS, tanto en retinas de diferentes edades como en ERECs de E8 tratados con LPS (con sus controles), determinando la media del nivel relativo de expresión en cada edad de la retina respecto de E8 o en ERECs tratados con LPS respecto de sus controles. Finalmente, las medias obtenidas eran comparadas estadísticamente (ver último apartado de Materiales y Métodos).

Tras la reacción de PCR, se preparaban alícuotas de carga de 24  $\mu\text{l}$  de volumen final (que contenían 20  $\mu\text{l}$  de muestra y 4  $\mu\text{l}$  de buffer de carga Blue/Orange 6x) para su separación electroforética en un gel de agarosa 1,5%, a fin de comprobar que sólo se detectaba un producto de PCR. Para su visualización y digitalización, se utilizó un sistema de adquisición de imágenes PhotoDoc-It (UVP).

### **Determinación de la presencia de iNOS mediante western blot**

El análisis mediante western blot era utilizado para determinar la presencia de la proteína iNOS en ERECs de E8+12hiv-LPS y en sus controles.

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

Los ERECs se sumergían en PBS y se centrifugaban a 1600 rpm durante 3 minutos a 4° C en una ultracentrífuga refrigerada (Eppendorf 5415R). A continuación, se eliminaba el PBS y las muestras se resuspendían en 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM [pH 8,0], EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,5% y  $\beta$ -2-mercaptoetanol 12,5 mM) que contenía un cocktail de inhibidores de proteasas 1X (Roche Applied Science). Las proteínas eran extraídas mediante incubación de los ERECs en dicho tampón durante 45 minutos, sobre hielo y agitando en vortex cada 5 minutos. Tras la centrifugación a 13200 rpm, durante 15 minutos, a 4° C, se obtenía el sobrenadante que contenía las proteínas totales, el cual se colocaba en un nuevo tubo eppendorf para determinar la concentración de

proteínas mediante el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad).

### ***Western blot***

Una vez cuantificadas las proteínas, se preparaban alícuotas de 70 µg de proteínas en un volumen final de 30 µl, a los que se añadían 5 µl de tampón de carga 6X (50 mM Tris-HCl [pH 6,8], urea 6 M, β-2-mercaptoetanol 6%, SDS 3% y azul de bromofenol 0,003%). Las alícuotas se incubaban durante 5 minutos, a 95° C, en un bloque térmico (Accublock, Labnet), consiguiendo así la desnaturalización de las proteínas. Seguidamente, las alícuotas se cargaban en un gel de poliacrilamida en tampón dodecilsulfato sódico (SDS) 7,5% que se sometía a electroforesis en el sistema Mini-Gel (Bio-Rad). Tras la separación electroforética de las proteínas, éstas se transferían a una membrana de difluoruro de polivinilo (Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad), utilizando un equipo de transferencia semiseco (Trans-Blot SD, Bio-Rad) para realizar el inmunoblotting. Dicha transferencia se llevaba a cabo durante 50 minutos a 100 mA. Los sitios inespecíficos de la membrana se bloqueaban mediante incubación durante 30 minutos en leche en polvo diluida al 5% en Tween-20 (Sigma) 0,1% en PBS. Seguidamente, la membrana se incubaba con el anticuerpo policlonal anti-iNOS (Abcam) diluido 1:500 en solución de bloqueo, durante toda la noche, a 4° C, con agitación, se lavaba con PBS-Tween-20 0,1% y se incubaba con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma), en dilución 1:1000, durante 2 horas, a temperatura ambiente. Tras un último lavado con PBS-Tween-20 0,1%, la membrana se revelaba con el reactivo quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore) y la quimioluminiscencia era detectada con el sistema de adquisición de imágenes ChemiDoc-It (UVP). La β-tubulina era utilizada como referencia de carga de las muestras.

### **Análisis morfométrico de los caracteres morfológicos de las células microgliales**

Las células microgliales inmunomarcadas con QH1 eran analizadas morfométricamente en ERECs de E8+24hiv-LPS, en sus correspondientes controles no tratados y en ERECs de E9 no cultivados, a fin de determinar las posibles diferencias en el número y los caracteres morfológicos de dichas células (indicativas de la activación de las mismas) inducidas por el tratamiento con LPS.

Se analizaron la densidad de las células microgliales, así como diferentes indicadores de su morfología, concretamente el área del perfil celular, el índice de elongación celular y el índice de redondeamiento celular. El índice de elongación de una célula se define como el cociente entre la longitud de su eje mayor y la de su eje menor, mientras que el índice de redondeamiento se calcula mediante la fórmula  $4\pi A/P^2$ , donde A es el área del perfil celular en  $\mu\text{m}^2$  y P es el perímetro celular en  $\mu\text{m}$ . Los valores medios de estos parámetros celulares eran determinados en 10 ERECs de E8+24hiv-LPS, en sus respectivos controles no tratados y en 10 ERECs de E9 no cultivados. En cada EREC, el análisis morfométrico de dichos parámetros se realizaba en tres campos microscópicos diferentes, de forma cuadrada y área de  $0,25 \text{ mm}^2$  ( $500 \times 500 \mu\text{m}$ ), seleccionados en las zonas dorsal, nasal y temporal, a una distancia de  $100 \mu\text{m}$  de la CNO/BP. El citado análisis se llevaba a cabo sobre micrografías de los campos microscópicos seleccionados, obtenidas con el objetivo 10x, utilizando el software Image Tool (University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas).

El área relativa del perfil del compartimento lisosómico en relación con el área del perfil de la célula microglial completa también se determinó en ERECs doblemente inmunomarcados con Lep100/QH1, ya que el incremento del compartimento lisosómico es considerado como un indicador de activación microglial. Para ello, se seleccionaban tres campos microscópicos de  $240 \times 240 \mu\text{m}$  en las partes dorsal, nasal y temporal de cada explante y se medía el área de los perfiles de todas las células microgliales (QH1-positivas) contenidas en los mismos, así como el área de los perfiles de los respectivos compartimentos



lisosómicos (Lep100-positivos). A partir de estos valores, se determinaba el porcentaje del área microglial (área relativa) ocupado por el compartimento lisosómico en cada campo microscópico analizado. Finalmente, se obtenían los valores medios de las áreas relativas de los compartimentos lisosómicos en 15 ERECs de E8+24hiv-LPS, en sus controles no tratados y en 15 ERECs de E9 no cultivados, que eran analizados estadísticamente (ver último apartado de Materiales y Métodos).

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

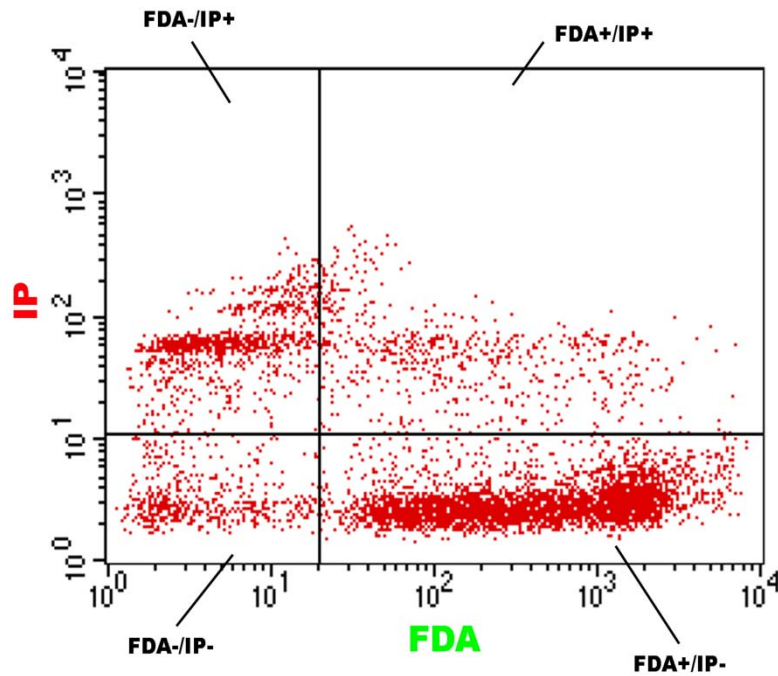
La viabilidad celular en los ERECs se analizaba mediante citometría de flujo efectuada en suspensiones celulares de los mismos marcadas con diacetato de fluoresceína (“fluorescein diacetate”, FDA, Sigma) y yoduro de propidio (IP, Sigma) (Darzynkiewicz et al., 1994). El FDA es un indicador de la actividad de esterasas inherente a las células vivas, mientras que el IP es un marcador de células muertas.

El FDA es una molécula no fluorescente, permeable a la membrana de las células. Tras penetrar en las células viables, es hidrolizado por esterasas intracelulares, que lo transforman en fluoresceína, que emite fluorescencia verde cuando se excita con luz de longitud de onda de 495 nm. La fluoresceína es retenida en el interior de las células vivas, que mantienen la integridad de su membrana, mientras que las células muertas son incapaces de conservarla en su interior. Por lo tanto, las células vivas emiten fluorescencia verde tras ser marcadas con FDA. El IP es un fluorocromo que se une al ADN y es incapaz de atravesar la membrana funcional de las células vivas, pero sí atraviesa la membrana deteriorada de células no viables. Así, el IP sólo se une al ADN de las células no viables (muertas o en proceso de muerte) y, tras ser excitado con luz de longitud de onda de 536 nm, emite fluorescencia roja. En resumen, tras la incubación con FDA e IP de la suspensión celular de un EREC, las células viables del mismo emitían fluorescencia verde en el citómetro de flujo, mientras que los núcleos de las células muertas emitían fluorescencia roja. En el citómetro de flujo

también se detectaba un porcentaje de partículas doblemente marcadas con FDA e IP, que correspondían a células que, aun siendo viables (por lo que incorporaban FDA), habían sufrido daño en su membrana como consecuencia del proceso de disgregación celular (por lo que también incorporaban IP).

El estudio de viabilidad celular se realizaba en tres experiencias diferentes, utilizando un total de 9 ERECs de E8+24hiv-LPS, con sus respectivos controles no tratados, y 9 ERECs de E9 no cultivados. Cada explante se disgregaba en PBS 0,01M con la ayuda de un homogeneizador manual de vidrio tipo Dounce de ranura ancha (Pobel). A la suspensión celular obtenida se añadía IP (10 µg/ml) y FDA (15 µg/ml), incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación de células viables se realizaba en un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton-Dickinson), utilizando el software CellQuest v 3.1 (Becton-Dickinson) para la adquisición y el análisis de los datos.

Las cuatro subpoblaciones de partículas representadas en los cuadrantes de la gráfica de puntos de la citometría de flujo, definidos en función de sus respectivas fluorescencias (Fig. 14), se correspondían con: a) restos celulares obtenidos durante la disgregación del explante (FDA-negativos e IP-negativos, cuadrante inferior izquierdo); b) células vivas con membrana intacta (FDA-positivas e IP-negativas, cuadrante inferior derecho); c) células muertas (FDA-negativas e IP-positivas, cuadrante superior izquierdo); y d) células vivas cuya membrana se había afectado durante el proceso de disgregación del explante (FDA-positivas e IP-positivas, cuadrante superior derecho). El porcentaje de células viables de cada explante se obtenía sumando los porcentajes obtenidos en los cuadrantes inferior derecho y superior derecho (células FDA-positivas) respecto del total de células analizadas (suma de los cuadrantes inferior derecho, superior izquierdo y superior derecho). Finalmente, se determinaban los porcentajes medios de células viables en los ERECs de E8+24hiv-LPS, en sus respectivos controles no tratados y en ERECs de E9 no cultivados, y los resultados eran analizados estadísticamente (ver último apartado de Materiales y Métodos).



**Fig. 14.** Gráfica de puntos representativa de las obtenidas en la citometría de flujo para la determinación de la viabilidad celular en suspensiones celulares de explantes de retina marcadas con diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (IP). Las células representadas en los cuadrantes inferior derecho (FDA+/IP-) y superior derecho (FDA+/IP+) son viables, mientras que las del cuadrante superior izquierdo (FDA-/IP+) son no viables. Los elementos representados en el cuadrante inferior izquierdo son considerados restos celulares obtenidos durante la disgregación del explante.

### **Cuantificación de células apoptóticas mediante marcaje con anexina V y análisis con citometría de flujo**

Durante las etapas iniciales del proceso de apoptosis, se produce la externalización de la fosfatidilserina en la membrana plasmática de las células que mueren. La anexina V es una proteína dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que se une a fosfolípidos cargados negativamente, con alta afinidad por la fosfatidilserina (Vermes et al., 1995). Por lo tanto, la anexina V es un excelente marcador de células apoptóticas, cuya superficie exterior muestra abundante fosfatidilserina. En el presente estudio se comparaba la proporción de células apoptóticas en ERECs de E8 tratados con LPS con la de sus respectivos controles, mediante análisis con citometría de flujo de suspensiones celulares de dichos explantes tras

el marcaje con anexina V fluorescente. Esta comparación se efectuaba en ERECs de E8+1hiv, E8+3hiv, E8+6hiv, E8+12hiv y E8+24hiv. Una hora antes del final del cultivo, el medio era suplementado con anexina V conjugada con GFP mejorada (anexina V-EGFP, BioVision, dilución 1:500) y 0,4 µg/ml de QH1 conjugado con AF-594 (QH1-AF594).

La conjugación del anticuerpo QH1 con AF-594 se llevaba a cabo en nuestro laboratorio, tras purificar la inmunoglobulina a partir del sobrenadante suministrado por el DSHB, utilizando un kit que contiene una columna HiTrap-MabTrap con Protein G Sepharose (Healthcare Europe). Tras la purificación, la inmunoglobulina se mantenía en una cabina de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific) de 0,5-3 ml, durante 1 día, a 4° C, con agitación. A continuación, la inmunoglobulina se concentraba mediante centrifugación a través de un filtro Amicon Ultra-4 de 10 kDa de peso molecular límite (Millipore) y se conjugaba con AF-594, mediante la utilización de un kit de marcaje de anticuerpos monoclonales (Molecular Probes). Finalmente, la inmunoglobulina se mantenía durante 1 día, a 4°C, en una cabina de diálisis Slide-A-Lyzer (Thermo Scientific), a fin de eliminar la azida sódica. La solución stock de QH1-AF594 (0,4 µg/µl) se almacenaba a -20° C en alícuotas de 5 µl.

Tras incubar cada explante con los marcadores fluorescentes de células apoptóticas (anexina V-EGFP) y de células microgliales (QH1-AF594), se procedía a la disgregación del mismo en PBS 0,01M, utilizando un homegeneizador manual de vidrio tipo Dounce de ranura ancha. La suspensión celular obtenida se analizaba en un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton-Dickinson) para determinar el porcentaje de células anexina V-positivas. La adquisición y análisis de los datos se hacía utilizando el software FACS Diva v 6.1.3 (Becton-Dickinson). En los cuatro cuadrantes de la gráfica de puntos obtenida en el citómetro de flujo se incluían: a) partículas anexina V-negativas y QH1-negativas (cuadrante inferior izquierdo), correspondientes a neuronas vivas de la retina; b) células anexina V-positivas y QH1-negativas (cuadrante inferior derecho), que correspondían a neuronas en proceso de apoptosis; c) células

anexina V-negativas y QH1-positivas (cuadrante superior izquierdo), correspondientes a células microgliales que no habían fagocitado restos de células muertas; y d) células anexina V-positivas y QH1-positivas (cuadrante superior derecho), que eran consideradas células microgliales que habían fagocitado restos de células muertas (anexina V-positivas), como se podía comprobar mediante microscopía confocal de explantes marcados con anexina V-EGFP y QH1-AF594. Algunas de estas células positivas para anexina V y QH1 también podrían ser células microgliales que estaban muriendo y, por lo tanto, exponían fosfatidilserina en su superficie exterior.

La determinación de la proporción de neuronas anexina V-positivas en los explantes de cada uno de los tiempos de cultivo analizados (E8+1hiv, E8+3hiv, E8+6hiv, E8+12hiv y E8+24hiv) se realizaba en tres experiencias diferentes, que incluían un total de 6 ERECs tratados con LPS y sus respectivos controles no tratados. Los valores medios de los porcentajes de células del cuadrante inferior derecho (anexina V-positivas y QH1-negativas) obtenidos en los explantes de cada tiempo de cultivo tratados con LPS eran comparados estadísticamente (ver último apartado de Materiales y Métodos) con los de sus respectivos controles, a fin de evaluar la variación en la proporción de neuronas apoptóticas tras el tratamiento con LPS.

### **Detección y cuantificación de fragmentos apoptóticos mediante TUNEL**

La técnica TUNEL (“Terminal deoxynucleotidil transferase dUTP nick-end labeling”, Gavrieli et al., 1992), marca los núcleos y fragmentos nucleares en los que ha tenido lugar la fragmentación del ADN, característica de la fase final del proceso de apoptosis. Mediante esta técnica, se ponen de manifiesto extremos 3’OH libres que se generan en la fragmentación de ADN, mediante la incorporación en dichos extremos de nucleótidos marcados con biotina gracias a la acción de una enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT). La técnica TUNEL se utilizaba tanto en montajes totales de ERECs de E8+24hiv-LPS y de sus respectivos controles no tratados, como en criosecciones de los mismos.

### ***TUNEL en montajes totales de ERECs***

Los fragmentos apoptóticos eran detectados en montajes totales de ERECs mediante una modificación de la técnica TUNEL para adaptarla a montajes totales de retina (Díaz et al., 1999). Para ello, los ERECs se fijaban en paraformaldehído 4% en PB 0,1M (pH 7,4) durante toda la noche. Tras permeabilizar con PBS-1%T durante 3 horas, a 4° C, con agitación, los ERECs se lavaban con PBS-0,1%T y se trataban, durante 15 minutos, a 37° C, con una solución de proteinasa K (Sigma) en tampón tris-HCl (20 µgr/ml), con el fin de eliminar las proteínas de los núcleos celulares, haciéndolos más accesibles a la reacción. Tras lavar con PBS-0,1%T, los explantes se volvían a fijar con paraformaldehído 4% durante 3 horas adicionales. Seguidamente, se incubaban durante 2 horas, a 37° C, con la solución de reacción, compuesta por 8 nmol/ml del nucleótido biotina-16-dUTP (Roche Diagnostics) y 20 unidades/ml de TdT (Promega) en tampón TdT (Promega), a pH 6,8. Después de un lavado en PBS-0,1%T para detener la reacción, los ERECs se incubaban en estreptavidina conjugada con AF-488 (Molecular Probes) durante 45 minutos, a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado, los explantes se teñían con Hoechst, para poner de manifiesto los núcleos celulares, y se montaban con Fluoromount G sobre portaobjetos, para su observación en el microscopio confocal.

### ***TUNEL en criosecciones de ERECs***

Siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad, se obtenían criosecciones de 15 µm de espesor de ERECs de E8+24hiv y de sus controles. Las criosecciones eran hidratadas en PBS 0,01M y permeabilizadas con PBS-1%T durante 2 minutos. Después de un lavado en PBS 0,01M, se incubaban durante 1 hora, a 37° C, en la solución de reacción, a una dilución doble de la utilizada en los montajes totales (4 nmol/ml de biotina-16-dUTP y 10 unidades/ml de TdT). Tras lavar con PBS 0,01M, las criosecciones se incubaban en estreptavidina conjugada con AF-488, se teñían con Hoechst para marcar los núcleos celulares y se montaban con Fluoromount G.

### ***Cuantificación de perfiles TUNEL-positivos en la CCG***

El área relativa ocupada por los perfiles TUNEL-positivos en la CCG era determinada a partir de las medidas obtenidas en 17 montajes totales de ERECs de E8+24hiv-LPS y de sus correspondientes controles. Para ello, utilizando el objetivo 63X del microscopio confocal, se obtenían imágenes del nivel correspondiente a la CCG en tres zonas diferentes (dorsal, nasal y temporal) de cada explante analizado. Dichas imágenes confocales tenían unas dimensiones de 240x240  $\mu\text{m}$  y eran proyecciones máximas sobre el plano XY de la serie de secciones ópticas obtenidas en el eje Z a través del espesor de la CCG. Cada imagen confocal se pasaba a escala de grises con el programa Adobe Photoshop CS y se determinaba en ella el área relativa ocupada por los perfiles TUNEL-positivos, mediante cálculo del porcentaje de píxeles TUNEL-positivos obtenido con la ayuda del software Image Tools. Los valores medios del área relativa de perfiles TUNEL-positivos obtenidos en los 17 ERECs tratados con LPS eran comparados estadísticamente con los obtenidos en los controles no tratados (ver último apartado de Materiales y Métodos).

### **Análisis cuantitativo de células Islet-1-positivas**

A fin de comprobar si el tratamiento con LPS afectaba a la población de neuronas que expresan el factor de transcripción Islet-1, entre las que se incluyen las células ganglionares, se hizo un estudio cuantitativo de las neuronas Islet-1-positivas, tanto mediante citometría de flujo como en criosecciones de ERECs inmunomarcadas.

### ***Cuantificación de células Islet-1-positivas mediante citometría de flujo***

En las experiencias de citometría de flujo, se determinaban los porcentajes de células de la retina que eran Islet-1-positivas, tanto en explantes de E8+24hiv-LPS como en sus respectivos controles. Para ello, los explantes se fijaban con paraformaldehído 4% en PB 0,1M durante 10 minutos y se inmunomarcaban con una mezcla del anticuerpo 39.4D5 (anti-Islet-1, dilución 1:100) y NGS 1% en

PBS-1%BSA-0,25%T, durante toda la noche, a 4° C, con agitación. Seguidamente, se lavaban en PBS-0,1%T y se incubaban en el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con AF-488, a una dilución de 1:1000, durante 3 horas, a temperatura ambiente. Finalmente, los explantes se disgregaban en un homegeneizador manual de vidrio tipo Dounce de ranura ancha y la suspensión celular obtenida se analizaba en un citómetro de flujo FACS Canto II, utilizando el software FACS Diva v 6.1.3, tanto para la adquisición de datos como para su análisis. Se determinaban los valores medios de los porcentajes de células Islet-1-positivas en 8 ERECs de E8+24hiv-LPS y en sus respectivos controles no tratados, que eran comparados estadísticamente (ver último apartado de Materiales y Métodos).

#### ***Cuantificación de células ganglionares Islet-1-positivas en criosecciones***

Mientras que la cuantificación efectuada con citometría de flujo era referida a la población total de células Islet-1-positivas de la retina, el estudio llevado a cabo en criosecciones permitía limitar el análisis cuantitativo a la subpoblación de células ganglionares. Para ello, se utilizaban criosecciones inmunomarcadas con el anticuerpo 39.4D5 (anti-Islet-1) de 8 ERECs de E8+24hiv-LPS y de sus respectivos controles. En cada explante, se analizaban tres criosecciones, una de la parte dorsal del explante, otra de la parte central y otra de la parte ventral. De cada criosección analizada se obtenía una micrografía, utilizando el objetivo de 40X de un microscopio Zeiss Axiophot, dotado de cámara digital Zeiss AxioCam. En cada micrografía, cuya anchura era de 250  $\mu\text{m}$ , se contaba el número de células Islet-1-positivas presentes en la CCG. De esta forma, se determinaba el número de células ganglionares Islet-1-positivas por cada 250  $\mu\text{m}$  de longitud de la CCG, que es proporcional al número total de dichas células en cada explante. A partir de los recuentos efectuados en los 8 ERECs tratados con LPS, se determinaba el número medio de células ganglionares Islet-1-positivas por unidad de longitud (50  $\mu\text{m}$ ), que se comparaba



estadísticamente con el obtenido en los controles no tratados (ver último apartado de Materiales y Métodos).

### **Determinación del porcentaje de células ganglionares caspasa 3-positivas que muestran contactos con células microgliales**

Durante el proceso de muerte celular, la enzima caspasa 3 es activada por las caspasas iniciadoras, iniciando así la vía efectora de la apoptosis (Chinnaiyan, 1999; Hill et al., 2004; Huerta et al., 2007), por lo que la caspasa 3 activada se ha utilizado como un marcador de células apoptóticas. Para comprobar si el tratamiento con LPS de los ERECs inducía un incremento de contactos fagocíticos entre la microglía y las células ganglionares en proceso de muerte, dichos contactos eran cuantificados en montajes totales de ERECs de E8+12hiv-LPS y sus correspondientes controles no tratados, que habían sido doblemente inmunomarcados con QH1 y anti-caspasa 3 y teñidos con Hoechst. Con el objetivo 63X del microscopio confocal, se obtenían imágenes en tres zonas diferentes (dorsal, nasal y temporal) de cada explante. Cada imagen confocal era la proyección máxima de una serie de secciones ópticas realizadas en el eje Z a través de todo el espesor de la CCG y en ella se contabilizaban las células ganglionares caspasa 3-positivas que tenían contactos con células microgliales (QH1-positivas), así como las que no mostraban estos contactos. Para asegurar la existencia o no de dichos contactos, se hacía un detallado análisis de todas las secciones ópticas integradas en cada proyección máxima a través del espesor de la CCG. De los datos obtenidos en las imágenes confocales analizadas en cada explante, se calculaba el porcentaje de células ganglionares caspasa 3-positivas contactadas por la microglía en dicho explante. Finalmente, el porcentaje medio de células ganglionares caspasa 3-positivas con contactos microgliales obtenido en 6 ERECs tratados con LPS era comparado estadísticamente con el evaluado en los controles no tratados (ver último apartado de Materiales y Métodos).

### **Detección de ROS en células microgliales**

El diacetato de 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes) es una forma acetilada no fluorescente de la fluoresceína que difunde al interior de las células. Allí, las esterasas intracelulares escinden los grupos acetato del H<sub>2</sub>DCFDA, convirtiéndolo en 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (H<sub>2</sub>DCF). En presencia de ROS, la H<sub>2</sub>DCF, que no muestra fluorescencia, es rápidamente oxidada y se convierte en 2',7'-dicloro-fluoresceína (DCF), altamente fluorescente. Por lo tanto, la H<sub>2</sub>DCF permite detectar la presencia de ROS, tales como radicales peróxido, óxido nítrico y peroxinitrito (Gabriel et al., 1997; Jakubowski y Bartosz, 2000). Sin embargo, el producto de oxidación de la H<sub>2</sub>DCF (la DCF) escapa rápidamente de las células, no siendo retenido en el interior de las mismas durante un tiempo prolongado, lo que dificulta su detección. Este inconveniente se puede evitar utilizando un análogo de H<sub>2</sub>DCFDA carboxilado (carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes) que, tras la escisión de los grupos acetato y la oxidación dentro de las células, se convierte en carboxi-DCF, de propiedades fluorescentes similares a la DCF, el cual permanece retenido durante algún tiempo en el interior celular, facilitando su detección.

En nuestro estudio, las experiencias para detectar la producción de ROS por la microglía se realizaban en ERECs de E8+12hiv-LPS y en sus respectivos controles. La presencia de ROS era evidenciada en las células microgliales mediante tratamiento de los explantes con la sonda carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA y el anticuerpo QH1-AF594 y la posterior detección de carboxi-DCF en células QH1-positivas, utilizando tanto microscopía confocal de montajes totales de ERECs como citometría de flujo de suspensiones celulares obtenidas tras la disgregación de ERECs.

#### ***Detección de carboxi-DCF mediante microscopía confocal***

Para la detección de ROS en el microscopio confocal, los explantes se trataban con carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA 20  $\mu$ M y 0,4  $\mu$ g/ml de QH1-AF594, que se añadían al medio durante la última hora de cultivo. Seguidamente, los explantes se

lavaban con PBS 0,01M, se fijaban durante 10 minutos en paraformaldehído 4% en PB 0,1M y se montaban sobre portaobjetos con Fluoromount G. Las observaciones se hacían en el microscopio confocal inmediatamente después del montaje de los explantes, ya que la señal fluorescente del carboxi-DCF se mantenía durante muy poco tiempo. Antes de la desaparición de dicha señal, se obtenían imágenes confocales (proyecciones máximas) de las células microgliales (QH1-positivas) con el objetivo de 63X.

### ***Detección de carboxi-DCF mediante citometría de flujo***

Para la detección de ROS mediante citometría de flujo, cada explante se trataba con carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA 20  $\mu$ M y 0,4  $\mu$ g/ml de QH1-AF594 durante la última hora de cultivo, igual que para microscopía confocal. Tras lavar con PBS 0,01M, el explante sin fijar se disgregaba con un homogeneizador tipo Dounce de ranura ancha. La suspensión celular obtenida se analizaba de forma inmediata en el citómetro de flujo FACS Canto II, utilizando el software FACS Diva v 6.1.3, para detectar la fluorescencia de la carboxi-DCF con el láser azul y la de QH1-AF594 con el láser rojo. Las cuatro subpoblaciones de partículas representadas en los cuadrantes de la gráfica de puntos de la citometría de flujo se correspondían con los siguientes tipos de células. Los cuadrantes inferiores izquierdo y derecho incluían neuronas de la retina (QH1-negativas) que no producen ROS (carboxi-DCF-negativas) o sí las producen (carboxi-DCF-positivas), respectivamente. Los cuadrantes superiores mostraban células microgliales (QH1-positivas), estando incluidas las que no producen ROS (carboxi-DCF-negativas) en el cuadrante superior izquierdo y las productoras de ROS (carboxi-DCF-positivas) en el superior derecho. De los datos obtenidos en el citómetro de flujo, se calculaba en cada explante el porcentaje de células microgliales que producen ROS (células del cuadrante superior derecho) con relación a la población total de microglía (células de los cuadrantes superiores izquierdo y derecho).

El citado análisis mediante citometría de flujo se realizó en 12 ERECs de E8+12hiv-LPS, con sus correspondientes controles. Los porcentajes medios de

células microgliales productoras de ROS obtenidos en los ERECs tratados con LPS eran comparados estadísticamente con los de sus respectivos controles (ver último apartado de Materiales y Métodos) para comprobar si el tratamiento con LPS incrementaba la proporción de células microgliales productoras de ROS.

### **Detección de aniones $O_2^-$ mediante marcaje con dihidroetidio y análisis con citometría de flujo**

El dihidroetidio (DHE) es la forma química reducida del bromuro de etidio y ha sido utilizado para detectar la presencia intracelular de aniones  $O_2^-$  en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo la microglía (Marín-Teva et al., 2004), mediante análisis de la fluorescencia de su producto final (Chen et al., 2013; Robinson et al., 2006; Zhao et al., 2003). La membrana plasmática es permeable al DHE, permitiendo su entrada en las células. En el interior celular, el DHE interactúa con aniones  $O_2^-$ , siendo oxidado a 2-hidroetidio y productos intermedios, los cuales reaccionan para formar etidio, que se intercala en el ADN nuclear. El etidio proporciona fluorescencia de longitudes de onda de excitación y emisión de 500-530 y 590-620 nm, respectivamente, que puede ser detectada mediante citometría de flujo con el láser rojo.

Para determinar si las células microgliales de los explantes modificaban la producción de aniones  $O_2^-$  tras el tratamiento con LPS, ERECs de E8+12hiv-LPS y sus controles no tratados se marcaban con DHE y QH1 conjugado con AF-488 (QH1-AF488) y, seguidamente, las suspensiones celulares de los mismos se analizaban mediante citometría de flujo. Para ello, cada explante se trataba con DHE 5  $\mu$ M y 0,4  $\mu$ g/ml de QH1-AF488 durante la última hora de cultivo. Tras lavar con PBS 0,01M, el explante sin fijar se disgregaba con un homogeneizador tipo Dounce de ranura ancha y la suspensión celular obtenida se analizaba en el citómetro de flujo FACS Canto II, utilizando el láser azul para detectar la fluorescencia del QH1-AF488 y el láser rojo para detectar el DHE.

Las partículas representadas en los cuadrantes izquierdos de la gráfica de puntos de la citometría de flujo de cada explante analizado correspondían a

neuronas (QH1-negativas) que no producen aniones  $O_2^-$  (DHE-negativas, cuadrante inferior izquierdo) o sí los producen (DHE-positivas, cuadrante superior izquierdo). Las partículas de los cuadrantes derechos representaban células microgliales (QH1-positivas) productoras de aniones  $O_2^-$  (DHE-positivas, cuadrante superior derecho) o no (DHE-negativas, cuadrante inferior derecho). De los datos obtenidos en los cuadrantes derechos se determinaba el porcentaje de células microgliales productoras de  $O_2^-$  (cuadrante superior derecho) de cada explante en relación con la población total de microglía (suma de los cuadrantes inferior derecho y superior derecho). El porcentaje medio obtenido tras el análisis de 6 ERECs de E8+12hiv-LPS se comparaba con el obtenido en sus respectivos controles no tratados (ver último apartado de Materiales y Métodos), para comprobar si el tratamiento con LPS incrementaba la proporción de células microgliales productoras de aniones  $O_2^-$ .

### **Detección de la producción de óxido nítrico por células microgliales**

El óxido nítrico producido por las células microgliales era detectado en montajes totales de ERECs de E8+12hiv-LPS y en sus respectivos controles mediante la sonda fluorescente diaminorodamina-4M acetoximetil ester (DAR-4M AM, Calbiochem), que es permeable a la membrana plasmática y ha sido utilizado como un indicador de la presencia de óxido nítrico (Kojima et al., 2001; Pandit et al., 2009). Los explantes eran tratados con DAR-4M AM 5  $\mu$ M y 0,4  $\mu$ g/ml de QH1-AF488, que se añadían al medio durante la última hora de cultivo. El anticuerpo QH1-AF488 identificaba las células microgliales con fluorescencia verde, mientras que la sonda DAR-4M AM marcaba con fluorescencia roja las células que producen óxido nítrico. Tras el tratamiento con DAR-4M AM y QH1-AF488, los explantes eran fijados durante 45 minutos en paraformaldehído 4% en PB 0,1M y montados sobre portaobjetos con Fluoromount G. Las observaciones de los montajes totales de ERECs se realizaban en el microscopio Zeiss Axiophot, obteniendo micrografías con una cámara digital Zeiss AxioCam.

### **Inhibición de la actividad de iNOS mediante tratamiento con L-NMMA**

Se realizaron experiencias de inhibición de la actividad de iNOS en ERECs de E8+12hiv-LPS y E8+24hiv-LPS, en las que se pretendía analizar si dicha inhibición inducía una disminución de la producción de radicales libres por la microglía y un paralelo descenso de la muerte de células ganglionares. La inhibición de la actividad de iNOS se conseguía mediante tratamiento de los ERECs con el inhibidor NG-monometil-L-arginina monoacetato (L-NMMA, Calbiochem) (Kakita et al., 2013; Semmler et al., 2005), añadido al tratamiento con LPS. En este tipo de experiencias, los ERECs de E8+12hiv y E8+24hiv obtenidos de ojos izquierdos se trataban con LPS (5  $\mu$ gr/ml) y L-NMMA 1 mM (E8+12hiv-LPS+LNMMA, E8+24hiv-LPS+LNMMA), que se añadían al medio de cultivo desde el inicio de cada experimento, mientras que los explantes obtenidos de ojos derechos se trataban exclusivamente con LPS y se utilizaban como controles para la comparación de resultados con los tratados simultáneamente con LPS y L-NMMA.

Primeramente, se analizaba la morfología de las células microgliales en ERECs de E8+12hiv-LPS+LNMMA, con sus correspondientes controles (E8+12hiv-LPS), inmunomarcados con QH1. El objetivo de este análisis morfológico era comprobar si el tratamiento con L-NMMA afectaba a los cambios morfológicos de la microglía, indicativos de activación, inducidos por el tratamiento con LPS.

En otras experiencias se pretendía probar que la inhibición de iNOS en ERECs de E8+12hiv-LPS+LNMMA inducía realmente una disminución de la producción de ROS, entre las que se incluye el óxido nítrico, por la microglía. El procedimiento seguido en estas experiencias era el anteriormente descrito para la detección de carboxi-DCF mediante citometría de flujo, tras el tratamiento de los explantes con carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA. Se realizaron tres experimentos diferentes, en los que se analizaron un total de 6 ERECs de E8+12hiv-LPS+LNMMA, con sus respectivos controles tratados exclusivamente con LPS.

Para comprobar si la inhibición de iNOS afectaba de algún modo a la muerte celular inducida por el tratamiento con LPS, se determinó el porcentaje de células anexina V-positivas mediante citometría de flujo, así como el área relativa de perfiles TUNEL-positivos mediante análisis cuantitativo con microscopía confocal, en explantes tratados con LPS y L-NMMA. En ambos tipos de determinaciones se seguían los mismos procedimientos descritos en apartados anteriores. En la determinación del área relativa de perfiles TUNEL-positivos, se emplearon 8 ERECs de E8+24hiv-LPS+LNMMA, con sus correspondientes controles tratados únicamente con LPS. Para determinar el porcentaje de células anexina V-positivas, se realizaron tres experiencias diferentes en las que se utilizaron suspensiones celulares de un total de 6 ERECs de E8+12hiv-LPS+LNMMA y sus respectivos controles. Además, también se determinó el porcentaje de células anexina V-positivas en 6 explantes tratados exclusivamente con L-NMMA (E8+12hiv-LNMMA), utilizando como controles explantes no tratados.

Con el objetivo de comprobar cómo afectaba la inhibición de iNOS a la población de células Islet-1-positivas, se determinaban los porcentajes de este tipo de células mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de ERECs de E8+24hiv-LPS+LNMMA inmunomarcados con el anticuerpo 39.4D5. En estos estudios de citometría de flujo se seguía el procedimiento descrito en un apartado anterior y se realizaron tres experimentos diferentes, analizando un total de 10 ERECs de E8+24hiv-LPS+LNMMA y sus controles tratados con LPS.

### **Análisis estadístico**

Cada parámetro analizado cuantitativamente en el presente estudio se expresaba como el valor medio obtenido en las diferentes muestras analizadas  $\pm$  error estándar de la media. En aquellos estudios en los que se comparaban las medias de un parámetro en más de dos poblaciones (ERECs de E8 tratados con LPS, controles no tratados y ERECs de E9 no cultivados), el nivel de significación de las diferencias obtenidas se determinaba mediante análisis de la

varianza (ANOVA) de un factor, seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. Cuando la comparación de las medias se hacía únicamente entre dos poblaciones (por ejemplo, ERECs tratados con LPS y ERECs control), el nivel de significación de las diferencias se determinaba mediante el test de la t de Student. Todos los análisis se llevaban a cabo utilizando el software estadístico IBM SPSS, versión 20.0.0 para Windows. Se consideraba que las diferencias eran significativas con un nivel de confianza de  $P < 0,05$ .



# Resultados

---

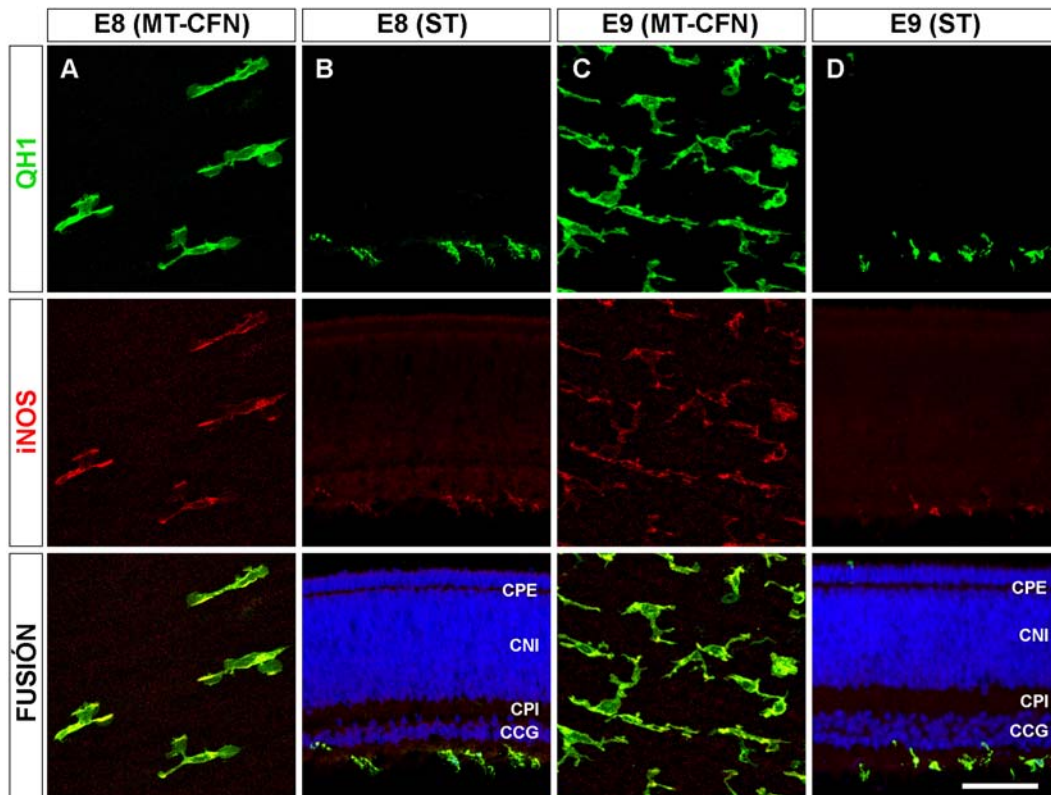


### **La microglía ameboide de la retina embrionaria de codorniz muestra un intenso inmunomarcaje de iNOS**

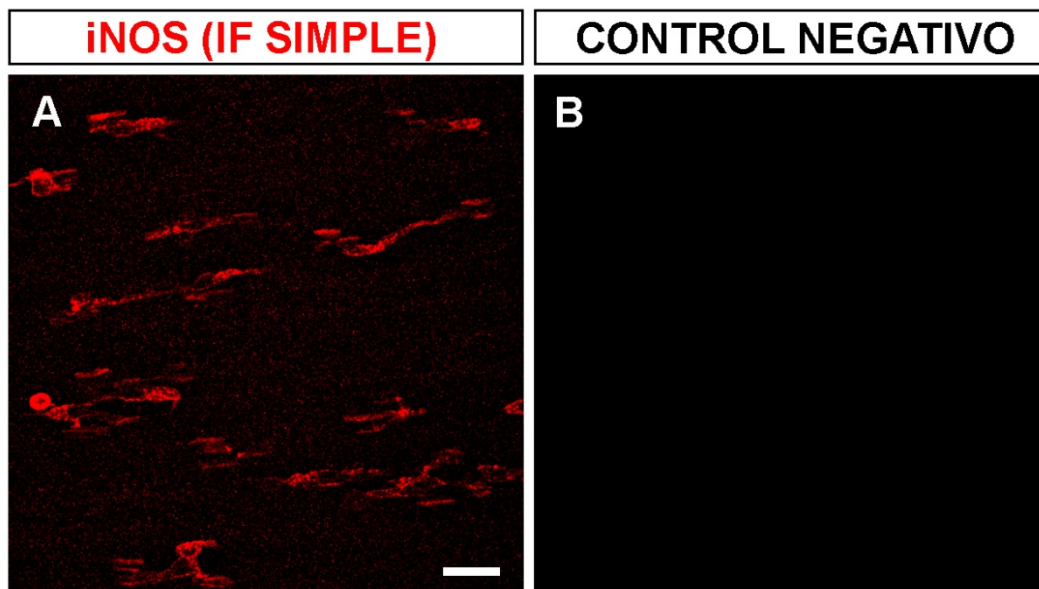
Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que las células microgliales ameboides entran en la retina embrionaria de codorniz desde la zona de la CNO/BP entre E7 y el momento de la eclosión (E16), y migran tangencialmente en dirección centro-periférica sobre la parte vítrea de la retina embrionaria (Marín-Teva et al., 1998, 1999c; Navascués et al., 1995). El presente estudio demuestra que las células marcadas con el anticuerpo monoclonal QH1 (que reconoce células microgliales) en retinas de embriones de codorniz de E8 y E9, se marcaban simultáneamente con un anticuerpo policlonal anti-iNOS, el cual no marcaba ni las neuronas ni las células de Müller de la retina (Fig. 15). Los resultados obtenidos con dos anticuerpos policlonales anti-iNOS distintos (ver Materiales y Métodos) no mostraban diferencias. Además, el marcaje celular de iNOS en los dobles inmunomarcajes QH1/anti-iNOS era idéntico al observado en una inmunotinción anti-iNOS simple (Fig. 16A) y los controles negativos que omitían el anticuerpo primario no mostraban células marcadas (Fig. 16B). De estos resultados se puede concluir que las células microgliales ameboides de la retina embrionaria de codorniz muestran un inmunomarcaje de iNOS específico.

Las células microgliales en retinas de E8 y E9 presentan una morfología ameboide y se localizan en la CFN, donde están migrando tangencialmente desde el centro hacia la periferia de la retina (Marín-Teva et al., 1998, 1999c; Navascués et al., 1995). En E8, las células microgliales ameboides aparecían fuertemente marcadas con anti-iNOS tanto en explantes (Fig. 15A) como en secciones transversales de retina (Fig. 15B). En E9, las células microgliales eran más abundantes que en E8 y mostraban menor intensidad de fluorescencia con anti-iNOS (Fig. 15 y 17). El inmunomarcaje con anti-iNOS de las células microgliales ameboides tenía cierta semejanza con el obtenido con el anticuerpo QH1, aunque ambos inmunomarcajes eran claramente diferentes (compárense las micrografías de QH1 e iNOS en Fig. 15). Así, el marcaje con QH1 mostraba todo el perfil de cada célula microglial incluyendo los lamelipodios (imágenes de QH1 en Fig.

15A y C), ya que este anticuerpo marca tanto estructuras citoplasmáticas como la membrana plasmática de las células microgliales (Marín-Teva et al., 1998). Sin embargo, el marcaje anti-iNOS era exclusivamente citoplasmático en algunas zonas del soma y de las prolongaciones celulares, pero los lamelipodios no aparecían marcados (imágenes de iNOS en Fig. 15A y C). Los componentes iNOS-positivos del citoplasma microglial siempre eran QH1-positivos. Otras diferencias adicionales entre los inmunomarcajes con QH1 y anti-iNOS eran observadas en el pecten (Fig. 18). Concretamente, los macrófagos del vítreo adheridos a la superficie del pecten, que eran QH1-positivos, se marcaban intensamente con iNOS, mientras que las células endoteliales de los vasos sanguíneos del pecten, que también son QH1-positivas, aparecían débilmente marcadas con anti-iNOS.



**Fig. 15. Inmunomarcaje de iNOS en células microgliales ameboides de retinas embrionarias de codorniz de 8 (E8) y 9 (E9) días de incubación.** Las imágenes confocales muestran células microgliales ameboides doblemente inmunomarcadas con QH1 (verde) y anti-iNOS (rojo) en montajes totales (MT) y secciones transversales (ST) de retinas de embriones de codorniz de E8 (**A, B**) y E9 (**C, D**). En las secciones transversales (**B, D**), los núcleos celulares se han teñido con Hoechst 33342 (azul) para distinguir las capas retinianas. Cada hilera de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales verde (arriba) y rojo (centro) y tras la fusión de canales, incluido el azul (abajo). Las imágenes de montajes totales (**A, C**) son proyecciones máximas de series de secciones ópticas obtenidas a través de la capa de fibras nerviosas (CFN), en la que se localizan las células microgliales QH1-positivas, tal como se aprecia en **B** y **D**. Tanto en E8 como en E9, toda la microglía está inmunomarcada con el anticuerpo anti-iNOS, observándose ligeras diferencias entre los marcajes anti-iNOS y QH1. Así, el anticuerpo QH1 marca intensamente la totalidad de los perfiles de las células microgliales, mientras que el marcaje anti-iNOS es exclusivamente citoplasmático y se localiza en distintas zonas del soma y de las prolongaciones celulares. CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. Barra de escala: 50  $\mu$ m para **A** y **C**; 60  $\mu$ m para **B** y **D**.

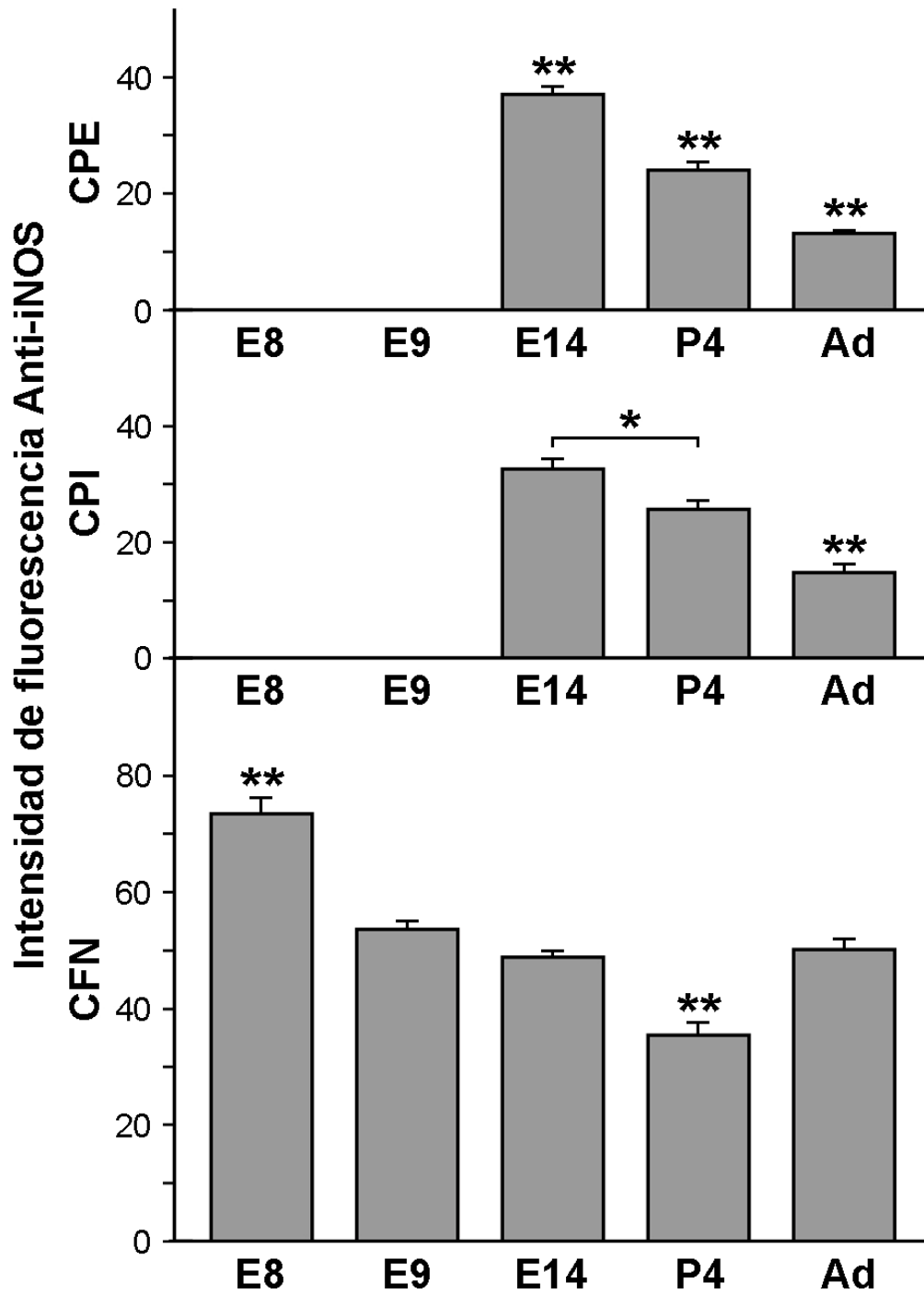


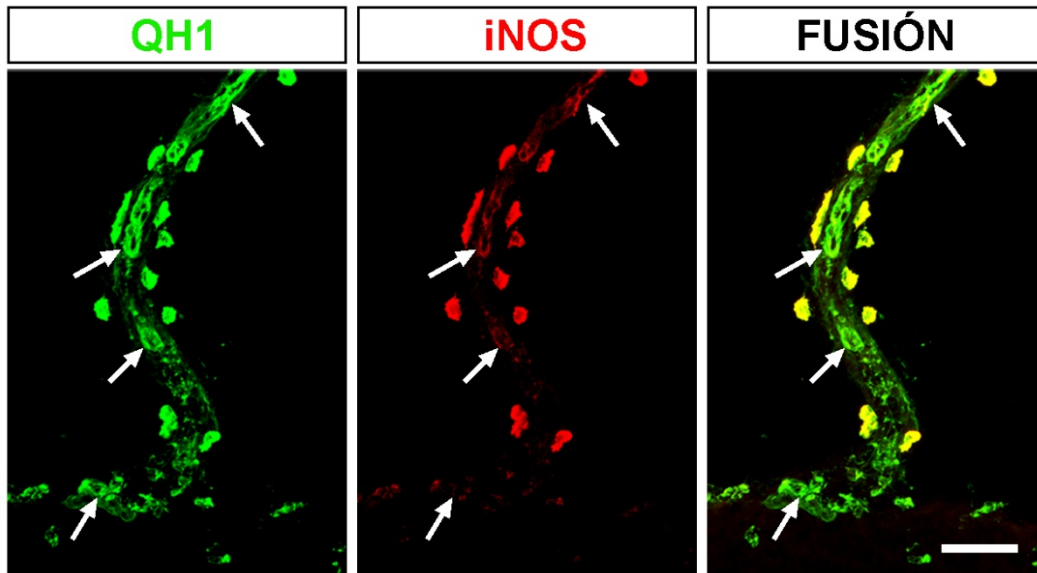
**Fig. 16. Control negativo del inmunomarcaje de iNOS en células microgliales de retina embrionaria de codorniz de 8 días de incubación (E8).** Las imágenes confocales mostradas son proyecciones máximas de una serie secciones confocales obtenidas en la capa de fibras nerviosas de un montaje total de la retina derecha de un embrión de E8 que ha sido inmunomarcado exclusivamente con anti-iNOS (**A**) y de su control negativo (**B**), que corresponde a la retina izquierda del mismo embrión tratada con el mismo procedimiento inmunocitoquímico, excepto que se ha omitido el anticuerpo primario. Nótese que el inmunomarcaje simple con anti-iNOS (**A**) es similar al observado tras el doble inmunomarcaje con anti-iNOS y QH1, que se muestra en la Fig. 15A, mientras que el control (**B**) no muestra ningún marcaje. Barra de escala: 25  $\mu$ m.



**Fig. 17. Intensidad de inmunofluorescencia anti-iNOS en células microgliales de retinas de codorniz de diferentes edades del desarrollo embrionario y post-eclosión.** En los diagramas de barras se representan las intensidades medias de fluorescencia anti-iNOS por célula microglial en la capa de fibras nerviosas (CFN), capa plexiforme interna (CPI) y capa plexiforme externa (CPE), obtenidas a partir de las medidas efectuadas en imágenes confocales de montajes totales de retina de codorniz doblemente inmunomarcados con QH1 y anti-iNOS. Las medidas se realizaron en retinas de embriones de codorniz de 8 (E8), 9 (E9) y 14 (E14) días de incubación y en retinas de codornices de 4 días post-eclosión (P4) y adultas (Ad). La intensidad de fluorescencia oscila entre 0, que es el tono más oscuro (células no fluorescentes) y 255, que es el tono más claro (máxima fluorescencia en todos los píxeles de la célula). Los datos se expresan como medias  $\pm$  error estándar (n=30 células por cada edad y capa retiniana). Los asteriscos indican diferencias significativas (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ) tras realizar ANOVA de un factor seguida de un test de Tukey para comparaciones múltiples. Nótese que la intensidad de fluorescencia anti-iNOS de las células microgliales es más elevada en la CFN que en la CPI y CPE. En la CFN, la mayor intensidad se observa en E8, disminuye progresivamente hasta P4 y se incrementa ligeramente en la edad adulta. En la CPI y CPE, la mayor intensidad de fluorescencia se observa en E14, con un significativo descenso hasta la edad adulta. No se muestran datos de la intensidad de inmunofluorescencia en la CPI y CPE de retinas de E8 y E9 porque las células microgliales no están presentes en dichas capas a esas edades.







**Fig. 18. Los macrófagos vitreales adheridos al pecten muestran intenso inmunomarcaje con anti-iNOS.** Imagen confocal (proyección máxima) de una sección transversal de pecten de un embrión de codorniz de 8 días de incubación doblemente inmunomarcada con QH1 (verde) y anti-iNOS (rojo). Las tres imágenes muestran el mismo campo microscópico en los canales verde (izquierda) y rojo (centro) y tras la fusión de ambos canales (derecha). Nótese que los macrófagos vitreales QH1-positivos adheridos a la superficie del pecten son fuertemente iNOS-positivos, mientras que las células endoteliales de los vasos sanguíneos (flechas) del interior del pecten muestran un fuerte marcaje QH1-positivo pero están débilmente inmunomarcados con anti-iNOS. Barra de escala: 25  $\mu$ m.

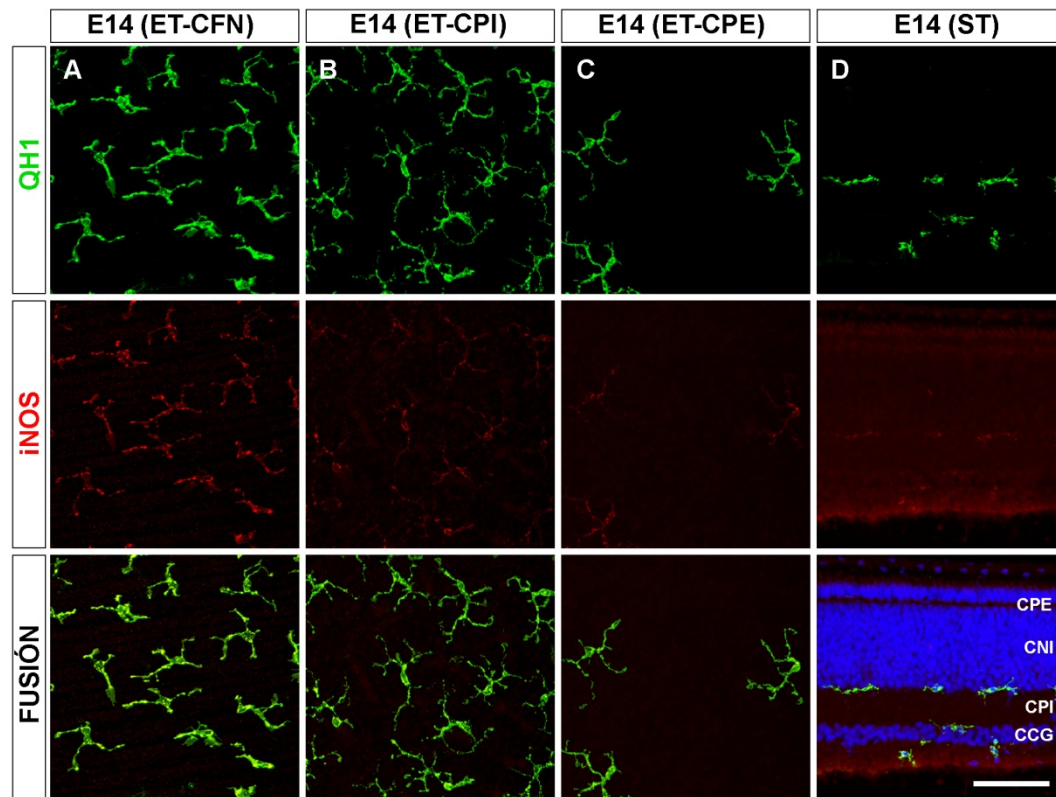
### **Disminución del inmunomarcaje de iNOS en las células microgliales ramificadas de la retina de codorniz en desarrollo y adulta**

Entre E9 y P3, las células microgliales migran radialmente hacia capas más profundas de la retina hasta alcanzar su localización final en la CPI y la CPE, donde se ramifican (Marín-Teva et al., 1999c; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004). Así, en retinas de embriones de codorniz de E14, muchas células microgliales ya habían alcanzado la CPI y la CPE (Fig. 19). En la CFN, las células microgliales continuaban teniendo un aspecto ameboide, con características morfológicas similares a las observadas en E8 y E9, y mostraban un fuerte inmunomarcaje anti-iNOS (Fig. 17 y 19A). En la CPI, se observaban abundantes células microgliales ramificadas con un marcaje de iNOS más débil que el de la microglia ameboide en la CFN (Fig. 17 y 19B), lo que sugiere que la expresión de iNOS disminuye cuando las células ameboides se diferencian a microglía ramificada. Resultados similares se observaban en la CPE, aunque las células microgliales de esta capa eran escasas y su grado de ramificación era menor que en la CPI (Fig. 17 y 19C).

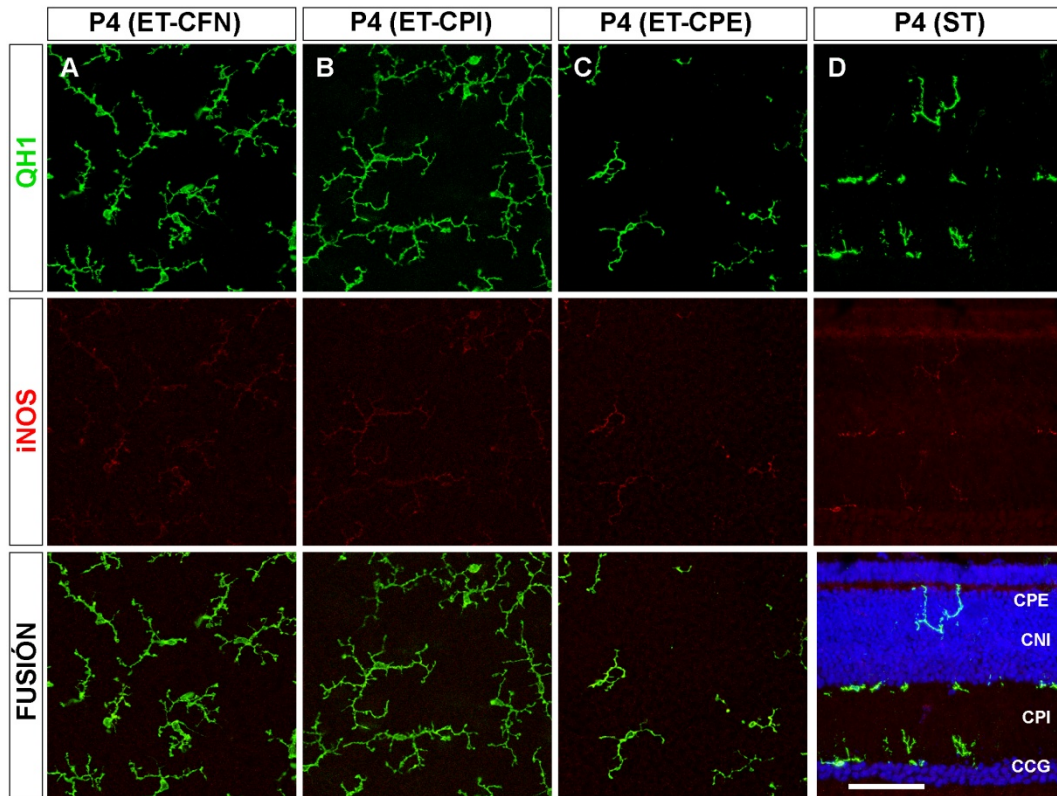
Las células microgliales en la CFN, CPI y CPE de retinas de P4 estaban más profusamente ramificadas que en E14 (Fig. 20). Es interesante destacar que el inmunomarcaje de iNOS de la microglía ramificada era significativamente menor en la CFN, CPI y CPE de retinas de P4 que en las mismas capas de retinas de E14 (Fig. 17 y 20).

En la retina adulta, las células microgliales de la CFN, CPI y CPE mostraban un patrón de ramificación maduro (Navascués et al., 1994) (Fig. 21). En la CFN, las prolongaciones celulares de la microglía ramificada se orientaban paralelamente al curso de los fascículos de axones de las células ganglionares (imagen de QH1 en Fig. 21A). Por el contrario, dichas prolongaciones estaban orientadas en todas direcciones tanto en la CPI (imagen de QH1 en Fig. 21B) como en la CPE (imagen de QH1 en Fig. 21C), donde las células microgliales mostraban una apariencia estrellada. El inmunomarcaje de iNOS de la microglía ramificada madura era significativamente menor en la CPI y CPE de retinas

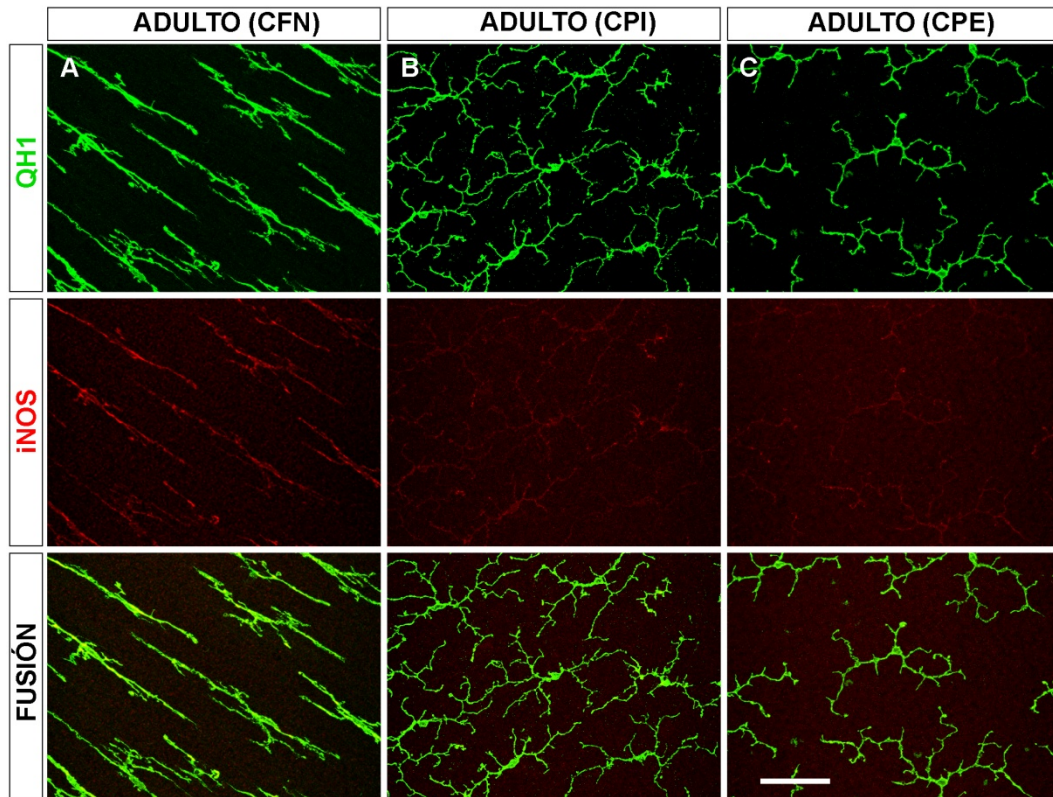
adultas que en las mismas capas de retinas de P4 (Fig. 17, imágenes de iNOS en Fig. 21B, C). Sin embargo, el marcaje anti-iNOS en las células microgliales alargadas de la CFN era más fuerte en retinas de codorniz adulta que en retinas de P4 (Fig. 17, imagen de iNOS en Fig. 21A).



**Fig. 19. Disminución del inmunomarcaje de iNOS en células microgliales parcialmente ramificadas durante las etapas finales del desarrollo embrionario de la retina de codorniz.** Las imágenes confocales mostradas en **A-C** son proyecciones máximas de series de secciones ópticas obtenidas a través de la capa de fibras nerviosas (CFN, **A**), capa plexiforme interna (CPI, **B**) y capa plexiforme externa (CPE, **C**) de una extensión total (ET) de retina de un embrión de codorniz de 14 días de incubación (E14) doblemente inmunomarcada con QH1 (verde) y anti-iNOS (rojo). La imagen confocal mostrada en **D** es una proyección máxima de una serie de secciones ópticas obtenidas en una sección transversal (ST) de retina de E14 doblemente inmunomarcada con QH1 y anti-iNOS y teñida con 33342 (azul) para poner de manifiesto las capas retinianas. Cada hilera de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales verde (arriba) y rojo (centro) y tras la fusión de canales, incluido el azul (abajo). En la CFN, las células microgliales tienen apariencia ameboides y muestran un inmunomarcaje de iNOS relativamente intenso (**A**, **D**). Sin embargo, en la CPI y CPE, el inmunomarcaje de iNOS de las células microgliales es mucho más débil (**B-C**), sugiriendo que la expresión de iNOS disminuye cuando la microglía ameboides se diferencia a microglía ramificada. CNI: capa nuclear interna; CCG: capa de células ganglionares. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  para **A-C**; 60  $\mu\text{m}$  para **D**.



**Fig. 20. Débil inmunomarcaje de iNOS en la microglía ramificada de la retina de codorniz durante la primera semana post-eclosión.** Las imágenes confocales mostradas en **A-C** son proyecciones máximas de series de secciones ópticas obtenidas a través de la capa de fibras nerviosas (CFN, **A**), capa plexiforme interna (CPI, **B**) y capa plexiforme externa (CPE, **C**) de una extensión total (ET) de retina de codorniz de 4 días post-eclosión (P4) doblemente inmunomarcada con QH1 (verde) y anti-iNOS (rojo). La imagen confocal mostrada en **D** es una proyección máxima obtenida en una sección transversal (ST) de retina de P4 doblemente inmunomarcada con QH1 y anti-iNOS y teñida con Hoechst 33342 (azul) para poner de manifiesto las capas retinianas. Cada hilera de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales verde (arriba) y rojo (centro) y tras la fusión de canales, incluido el azul (abajo). Las células microgliales localizadas en la CFN, CPI y CPE muestran una ramificación más profusa que la observada al final del desarrollo embrionario y un inmunomarcaje de iNOS débil, similar al existente en las capas plexiformes de retinas de embriones de 14 días de incubación (comparar con Fig. 19). En la sección transversal (**D**) se observan células microgliales en la capa nuclear interna (CNI), ya que dichas células atraviesan esta capa durante la primera semana post-eclosión, antes de acceder a la CPE. CCG: capa de células ganglionares. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  para **A-C**; 65  $\mu\text{m}$  para **D**.

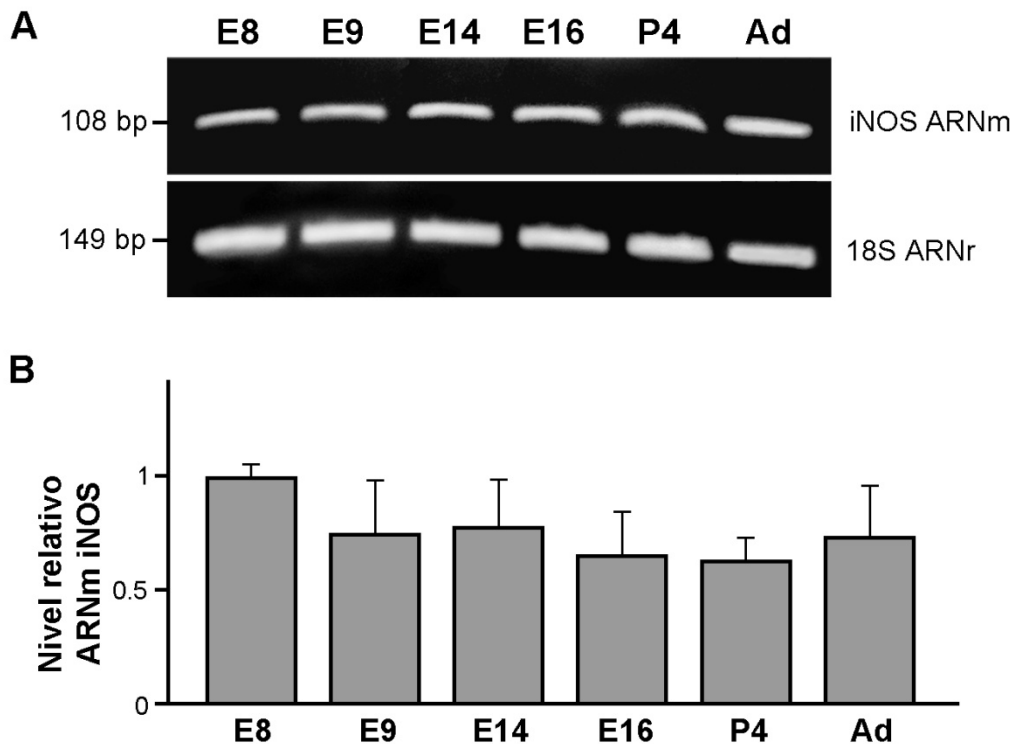


**Fig. 21.** Las células microgliales ramificadas de la retina de codorniz adulta muestran un inmunomarcaje de iNOS débil en las capas plexiformes y más fuerte en la capa de fibras nerviosas. Imágenes confocales (proyecciones máximas de series de secciones ópticas) obtenidas a través de la capa de fibras nerviosas (CFN, **A**), capa plexiforme interna (CPI, **B**) y capa plexiforme externa (CPE, **C**) de una extensión total de retina de codorniz adulta doblemente inmunomarcada con QH1 (verde) y anti-iNOS (rojo). Cada hilera de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales verde (arriba) y rojo (centro) y tras la fusión de ambos canales (abajo). En la CFN (**A**), las células microgliales ramificadas poseen prolongaciones paralelas al curso de los fascículos de axones de células ganglionares (no mostrados) y exhiben un inmunomarcaje de iNOS más intenso que el observado en las células microgliales ramificadas de la CPI (**B**) y CPE (**C**), cuyas prolongaciones están orientadas en todas direcciones. El inmunomarcaje de iNOS en la microglía de la CPI y CPE es similar al observado en retinas de embriones de codorniz de 14 días de incubación (ver Fig. 19) y de codornices de 4 días post-eclosión (ver Fig. 20). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

**Expresión del ARNm de iNOS durante el desarrollo de la retina de codorniz**

El análisis del ARNm de iNOS mediante RT-PCR a partir del ADNc obtenido de retinas de E8, E9, E14, E16, P4 y adultas demostró que el gen de iNOS se expresa en la retina de codorniz durante el desarrollo embrionario y postnatal así como en la edad adulta (Fig. 22A). Es de señalar que los niveles de ARNm de iNOS en retinas de E8 no diferían significativamente de los niveles encontrados en retinas en desarrollo entre E9 y P4 y en retinas adultas (Fig. 22B), lo que contrastaba con la disminución del inmunomarcaje de iNOS observado desde E9 en adelante (Fig. 17). Estos resultados, aparentemente contradictorios, pueden explicarse por la presencia de relativamente pocas células microgliales en retinas de E8 y el posterior aumento del número de estas células a medida que avanza el desarrollo (Navascués et al., 1995). Dado que la cantidad de ARN total utilizado para sintetizar y amplificar el ADNc del gen iNOS era siempre la misma, la cantidad de ARNm de iNOS obtenido en retinas de E8 con un bajo número de células microgliales y mayor concentración de ARNm por célula podría ser similar a la cantidad obtenida en retinas de etapas más avanzadas del desarrollo con un mayor número de células microgliales y menor concentración de ARNm por célula.





**Fig. 22. El gen de iNOS se expresa en la retina de codorniz durante el desarrollo embrionario y post-eclosión, hasta la edad adulta.** **A.** Gel representativo de tres experimentos independientes de electroforesis sobre gel de agarosa que muestra los productos de la RT-PCR correspondientes a la expresión del ARNm de iNOS en retinas de embriones de codorniz de diferentes edades (E8, E9, E14 y E16) y retinas de codornices de 4 días post-eclosión (P4) y adultas (Ad). El gen de ARNr 18S se ha usado como control endógeno de expresión. Se observa la expresión del gen de iNOS en las retinas de todas las edades analizadas (embrionarias, post-eclosión y adulta). **B.** Análisis cuantitativo de la expresión relativa del ARNm de iNOS en retinas de codorniz de las diferentes edades analizadas. Los resultados se han obtenido a partir de 6 experimentos diferentes de RT-PCR. El diagrama de barras muestra los niveles relativos de ARNm de iNOS (medias  $\pm$  error estándar) en las diferentes edades respecto del nivel hallado en E8. No se observan diferencias significativas de dichos niveles entre las diferentes edades analizadas, tras la comparación de las medias mediante ANOVA de un factor seguida del test de Tukey para comparaciones múltiples.

### **Aumento de la activación de la microglía ameboide tras el tratamiento de ERECs de E8 con LPS**

El fuerte inmunomarcaje con anti-iNOS de la microglía ameboide en retinas de embriones de codorniz E8 sugiere que estas células tienen un cierto grado de activación, como ha sido descrito anteriormente en el SNC de ratones en desarrollo (Hristova et al., 2010; Rigato et al., 2011). Con el fin de analizar si la microglía ameboide era capaz de aumentar su estado de activación en respuesta a factores exógenos, se realizaron experimentos de tratamiento con LPS de cultivos organotípicos de ERECs de E8+24hiv (E8+24hiv-LPS).

En explantes no cultivados de retina de E8, las células microgliales se encuentran localizadas exclusivamente en la CFN y muestran la morfología polarizada típica de la microglía ameboide en proceso de migración tangencial (Fig. 15A, B), con un soma alargado cuyos polos se continúan con prolongaciones celulares relativamente largas y provistas de amplios lamelipodios, como se ha descrito con anterioridad (Carrasco et al., 2011). Después del tratamiento con LPS, las células microgliales de los ERECs de E8+24hiv-LPS permanecían en la CFN (Fig. 23A) pero cambiaban sus características morfológicas, mostrando un soma más redondeado con escasas y cortas prolongaciones y pocos lamelipodios (Fig. 24A). Los explantes control cultivados en medio sin LPS (ERECs de E8+24hiv-CT) mostraban que las células microgliales también se localizaban en la CFN (Fig. 23B) pero conservaban la morfología alargada (Fig. 24B), similar a la de la microglía de la retina *in situ* de E8. También se utilizaban explantes no cultivados de retina de E9 con el fin de comparar la localización y el aspecto morfológico de la microglía de ERECs de E8+24hiv-CT (Figs. 23B y 24B) con los de la microglía de retinas no cultivadas de edad equivalente (Fig. 23C, 24C). La localización en la CFN y la morfología polarizada de las células microgliales eran similares en ERECs de E8+24 hiv-CT y de E9 no cultivados, aunque los lamelipodios eran manifiestamente menos abundantes en los explantes control (compárese B y C en Fig. 24).

El análisis morfométrico revelaba que el área ocupada por el perfil de las células microgliales era similar en explantes de E8+24hiv-LPS y en sus controles, pero significativamente mayor en las retinas no cultivadas de E9 (Fig. 24D). Estas diferencias del área celular podrían atribuirse a la presencia de amplios y abundantes lamelipodios en las células microgliales de retinas no cultivadas de E9, los cuales parecen retraerse durante el cultivo *in vitro* de los explantes de E8. El índice de elongación celular era significativamente menor en explantes de E8+24hiv-LPS que en explantes de E8+24hiv-CT y retinas de E9 (Fig. 24E), mientras que el índice de redondez celular era significativamente mayor en los primeros (Fig. 24F). Todos estos resultados demostraban que el tratamiento con LPS de ERECs de E8+24hiv inducía importantes cambios en el fenotipo de las células microgliales, que sugerían un incremento de la activación de dichas células.

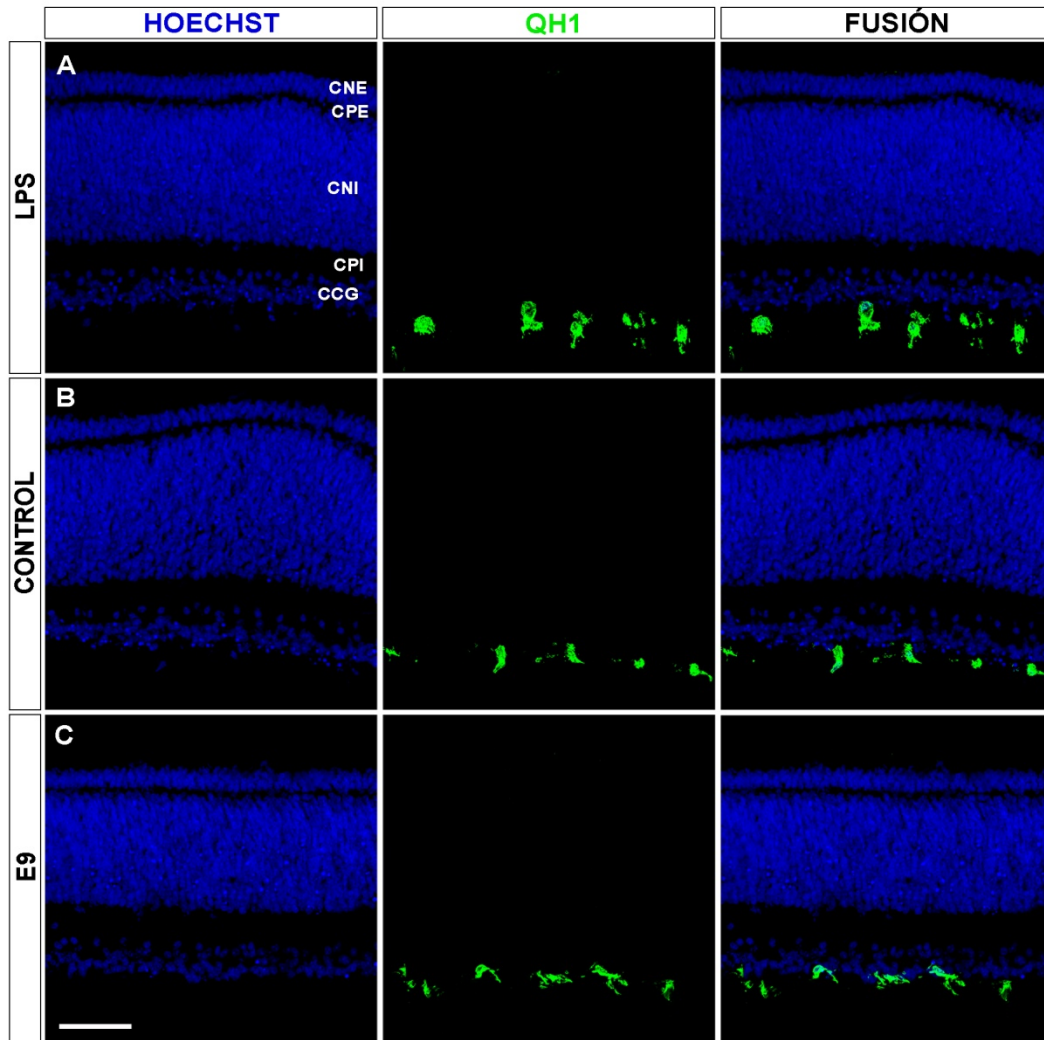
A fin de conocer el tiempo que el LPS tardaba en activar a la microglía en nuestro modelo de estudio, se analizaron las variaciones morfológicas de las células microgliales en ERECs de E8 tratados con LPS a lo largo de 24 horas de cultivo *in vitro*. Se observaba que el fenotipo redondeado, típico de células microgliales activadas, ya comenzaba a aparecer después de la primera hiv y se incrementaba durante el tiempo de cultivo restante, indicando que la activación microglial inducida por el LPS se iniciaba poco después de la adición de éste al medio de cultivo (Fig. 25).

Teniendo en cuenta que la activación es un proceso que induce un aumento en la síntesis de las proteínas lisosomales (Liu et al., 2008), también se analizó el compartimento lisosomal inmunomarcado con el anticuerpo Lep100 en las células microgliales de ERECs de E8+24hiv-LPS, comparándolo con el de la microglía de ERECs de E8+24hiv-CT y de retinas de E9 no cultivadas (Fig. 26). El compartimento lisosomal se localizaba principalmente en el soma de las células microgliales y era manifiestamente más extenso en ERECs de E8+24hiv-LPS (Fig. 26A, A') que en sus controles no tratados (Fig. 26B, B') o en retinas no cultivadas de E9 (Fig. 26C, C'). El análisis morfométrico confirmaba estas

observaciones, mostrando que el área relativa ocupada por el perfil del compartimento lisosomal con respecto al área total del perfil de las células microgliales era significativamente mayor (alrededor de un 15 %) en ERECs de E8+24hiv-LPS que en sus controles no tratados o en explantes no cultivados de retinas de E9 (Fig. 26D).

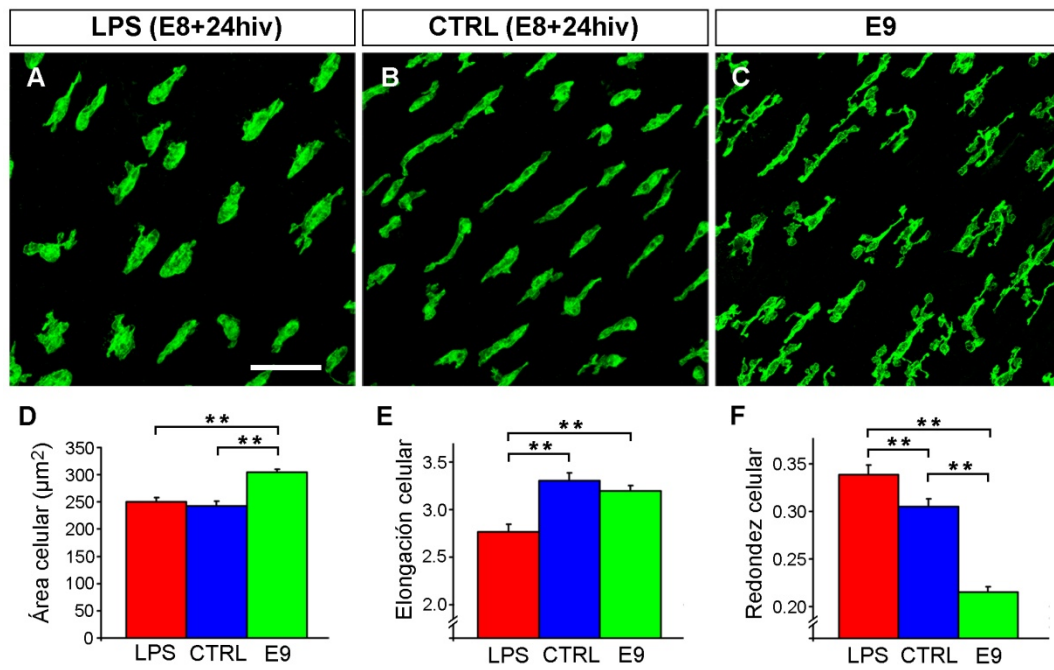
También se estudió si el tratamiento con LPS de los ERECs de E8+24hiv modificaba la proliferación de las células microgliales. Un estudio previo de nuestro grupo de investigación había demostrado que las células microgliales ameboides proliferan en la retina embrionaria de codorniz de forma simultánea a su proceso de migración tangencial en la CFN (Marín-Teva et al., 1999a). Otros estudios habían indicado que el tratamiento con LPS puede inducir un aumento de la proliferación microglial durante el desarrollo del SNC (Gomes et al., 2013; Smith et al., 2014). El análisis cuantitativo realizado en el presente estudio mostraba que no había diferencias significativas en la densidad de células microgliales entre los ERECs de E8+24hiv-LPS, sus controles no tratados y los explantes no cultivados de retina de E9 (Fig. 27). Considerando que en nuestro sistema experimental de cultivo *in vitro* de ERECs no hay posibilidad de entrada de nuevas células desde el exterior de la retina, esta igualdad de la densidad microglial en explantes tratados y no tratados con LPS demostraba que el LPS no afecta a la tasa de proliferación de la microglía.

En conclusión, todos estos resultados evidenciaban que el tratamiento con LPS de ERECs de E8+24hiv incrementa la activación de las células microgliales sin modificar su tasa de proliferación.



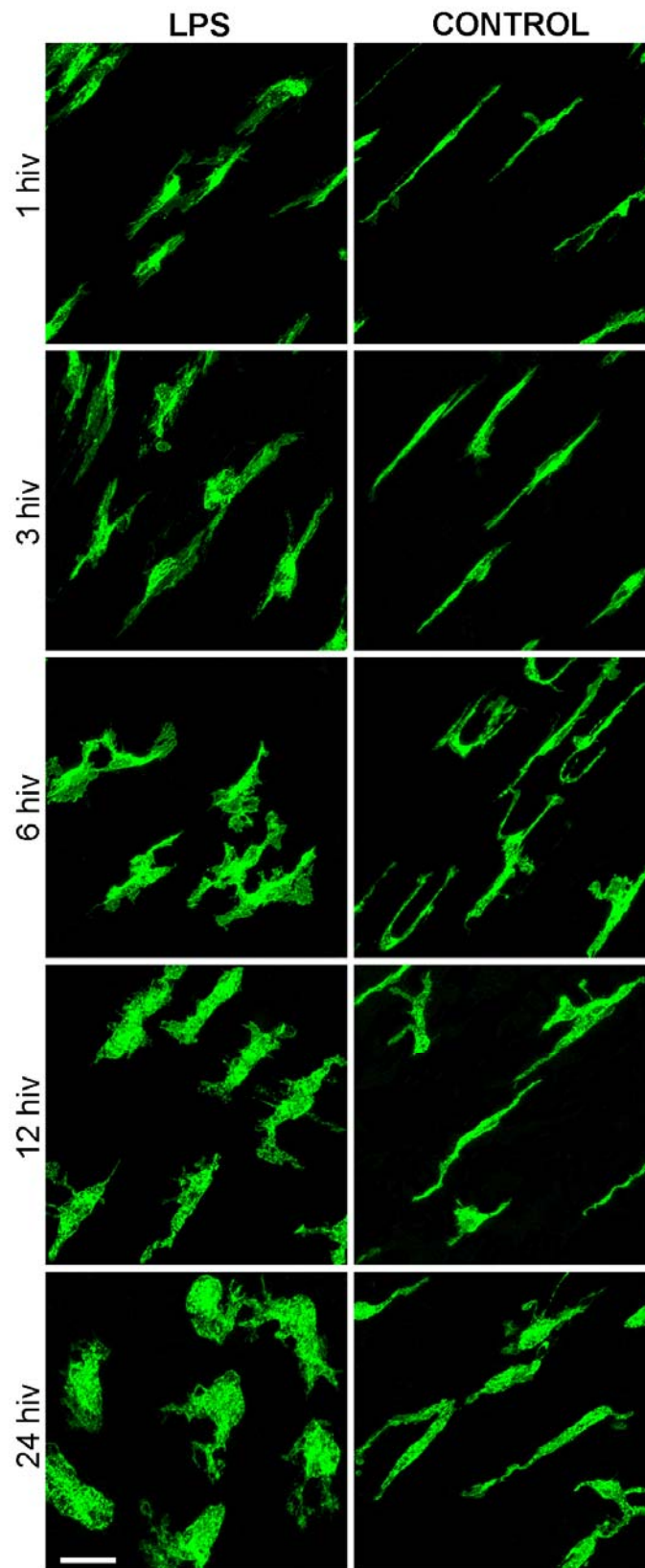
**Fig. 23.** El LPS induce cambios morfológicos indicativos de activación en la microglía ameboide de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 8 días de incubación (E8), tal como se evidencia en secciones transversales. Las imágenes confocales mostradas son proyecciones máximas obtenidas en secciones transversales de un EREC de E8 cultivado durante 24 horas *in vitro* en presencia de LPS (A), de su control cultivado sin LPS (B) y de un explante no cultivado de retina de E9 (C). Dichas secciones han sido inmunomarcadas con QH1 (verde), para evidenciar la microglía, y teñidas con Hoechst 33342 (azul), para poner de manifiesto las capas retinianas. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda) y verde (centro) y tras la fusión de ambos canales (derecha). En todos los casos las células microgliales se localizan en la capa de fibras nerviosas, pero son más voluminosas y redondeadas en el explante de E8 tratado con LPS (A) que en el control (B) o en el explante de E9 no cultivado (C). CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

**Fig. 24. El LPS induce cambios morfológicos indicativos de activación en la microglía ameboide de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 8 días de incubación (E8), tal como se evidencia tras el análisis morfométrico en montajes totales. A-C:** Imágenes de células microgliales ameboides inmunomarcadas con QH1 en montajes totales de un EREC de E8 cultivado durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en medio que contiene LPS (LPS, **A**), de su control cultivado en medio libre de LPS (CTRL, **B**) y de un explante no cultivado de retina de un embrión de 9 días de incubación (E9, **C**). Las células microgliales del explante de E8+24hiv tratado con LPS (**A**) son mucho más redondeadas que las de su control no tratado (**B**). En el explante de E9, se observa la típica morfología polarizada de la microglía ameboide que está migrando tangencialmente en la capa de fibras nerviosas, con cuerpos celulares alargados, procesos celulares polarizados y amplios lamelipodios (**C**). Nótese la similitud entre esta morfología y la de las células microgliales del control de E8+24hiv (**B**), aunque los lamelipodios son menos abundantes en este último. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . **D-F:** Análisis morfométrico del área celular (**D**), el índice de elongación (**E**) y el índice de redondez (**F**) de las células microgliales en ERECs de E8+24hiv tratados con LPS (barras rojas), explantes control de retina de E8+24hiv no tratados (barras azules) y explantes no cultivados de E9 (barras verdes). Los datos son expresados como medias ( $\pm$  error estándar) de los valores medidos en las células microgliales contenidas en tres campos microscópicos de 500x500  $\mu\text{m}$  de 10 explantes de cada tipo. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ , ANOVA de un factor seguida de un test de Tukey para comparaciones múltiples). El índice de elongación de las células microgliales en los ERECs de E8+24hiv tratados con LPS es significativamente menor que en sus controles o en los explantes de E9 no cultivados, mientras que el índice de redondez es más elevado.

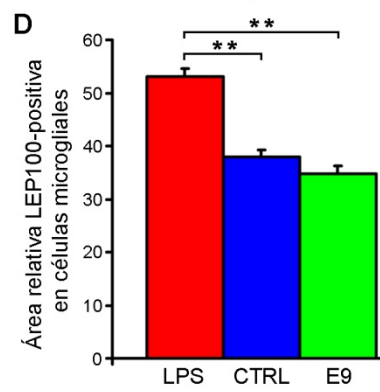
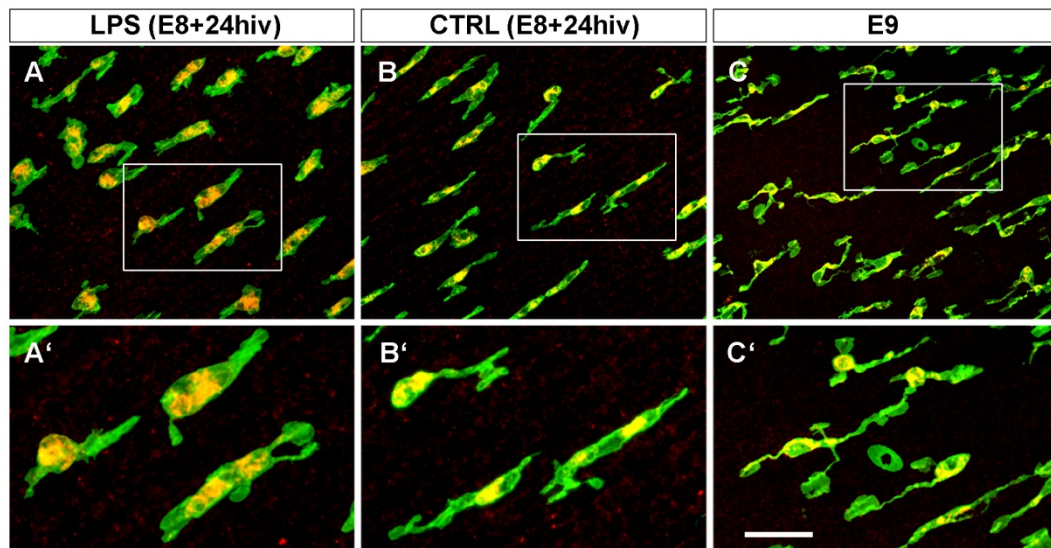


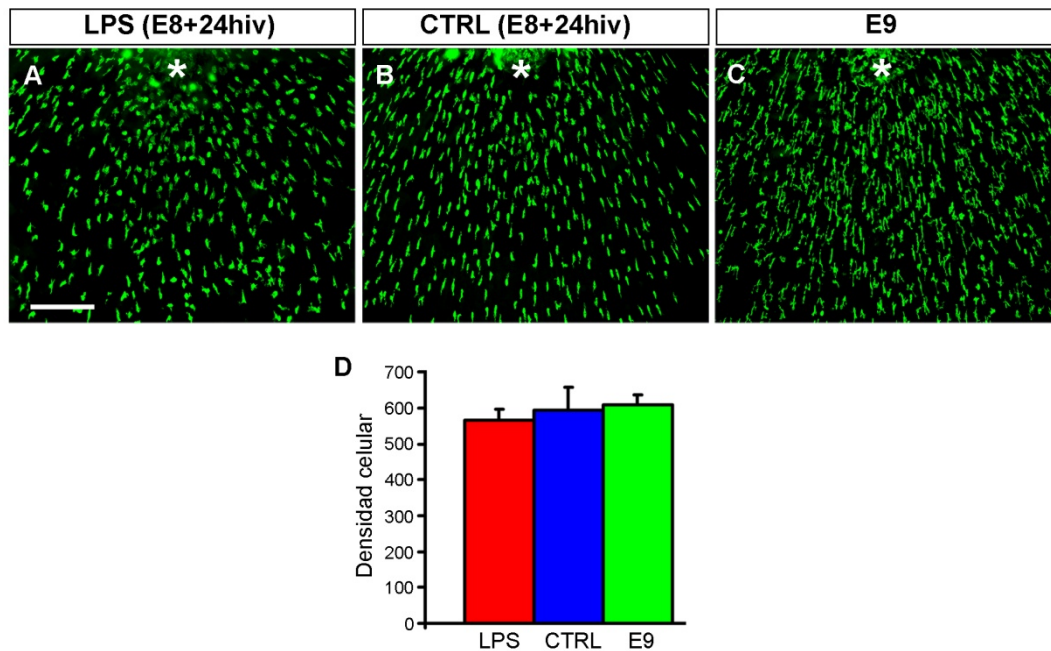
**Fig. 25. Los cambios morfológicos indicativos de activación microglial se observan desde los primeros instantes tras el tratamiento con LPS de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 8 días de incubación (E8).** Imágenes de microscopía confocal (proyecciones máximas) de la microglía ameboide QH1-positiva de ERECs de E8 cultivados durante 1, 3, 6, 12 y 24 horas *in vitro* (hiv) en presencia (imágenes de la izquierda, LPS) o ausencia (imágenes de la derecha, CONTROL) de LPS. Los explantes han sido inmunomarcados *in vitro* (antes de fijar) con el anticuerpo QH1 conjugado con Alexa Fluor 488. En la primera hora de cultivo *in vitro* (1 hiv), ya se aprecia que las células microgliales de un explante tratado con LPS tienden a redondearse, siendo menos alargadas y más anchas que las de su control no tratado. La morfología redondeada de la microglía tratada con LPS es más patente a las 3 hiv y tiende a incrementarse en tiempos de cultivo más avanzados. A las 24 hiv, el grado de redondeamiento de la microglía es máximo en un explante tratado con LPS, mostrando diferencias morfológicas muy evidentes con la microglía de su control no tratado. Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 26. El tratamiento con LPS incrementa significativamente el compartimento lisosómico de la microglía ameboide de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs). A, A'-C, C':** Imágenes confocales (proyecciones máximas) de células microgliales ameboides doblemente inmunomarcadas con QH1 (verde) y Lep100 (marcador específico de membranas lisosomales, rojo) en montajes totales de un EREC de 8 días de incubación cultivado durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en medio que contiene LPS (LPS, **A, A'**), de su control cultivado en medio libre de LPS (CTRL, **B, B'**) y de un explante no cultivado de retina de un embrión de 9 días de incubación (E9, **C, C'**). Las áreas encuadradas en **A, B** y **C** se observan a mayor aumento en **A', B'** y **C'**, respectivamente. El compartimento lisosómico es manifiestamente más extenso en el explante de retina de E8+24hiv tratado con LPS, que en el explante control o en el explante no cultivado de retina de E9. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  para **A-C**; 23  $\mu\text{m}$  para **A'-C'**. **D:** Áreas relativas del compartimento lisosómico (Lep100-positivo) de las células microgliales (QH1-positivas) en EREC's de E8+24hiv tratados con LPS (barra roja), en sus controles no tratados (barra azul) y en explantes no cultivados de retina de E9 (barra verde). Los datos son expresados como medias ( $\pm$  error estándar) de las áreas relativas obtenidas en las células microgliales contenidas en tres campos microscópicos de 240x240  $\mu\text{m}$  de 15 explantes de cada tipo. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ , ANOVA de un factor seguida de un test de Tukey para comparaciones múltiples). Nótese que el área relativa del compartimento lisosómico es significativamente más elevada en la microglía de los explantes de retina de E8+24hiv tratados con LPS que en sus controles o en los explantes no cultivados de retina de E9.





**Fig. 27. La densidad de células microgliales no varía tras el tratamiento con LPS de los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs).** A-C: Imágenes de microscopía confocal de montajes totales inmunomarcados con QH1 de un EREC de 8 días de incubación cultivado durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en medio que contiene LPS (LPS, **A**), de su control cultivado en medio libre de LPS (CTRL, **B**) y de un explante no cultivado de retina de un embrión de 9 días de incubación (E9, **C**). Las células microgliales QH1-positivas se distribuyen de manera similar en los tres explantes, ocupando prácticamente toda la extensión de cada explante, con una concentración algo mayor en las inmediaciones de la cabeza del nervio óptico y base del pecten (asteriscos). Barra de escala: 200  $\mu$ m. **D**: Densidades de células microgliales en EREC de E8+24hiv tratados con LPS (barra roja), en sus controles no tratados (barra azul) y en explantes no cultivados de retina de E9 (barra verde). Los datos se expresan como medias ( $\pm$  error estándar) del número de células microgliales por  $\text{mm}^2$  obtenido en tres campos microscópicos de  $500 \times 500 \mu\text{m}$  de 10 explantes de cada tipo. No se observan diferencias significativas entre los tres tipos de explantes (ANOVA de un factor seguida de un test de Tukey para comparaciones múltiples).

### **El tratamiento con LPS no altera la estructura básica de la retina en ERECs de E8+24hiv, aunque induce una disminución del espesor de la CCG**

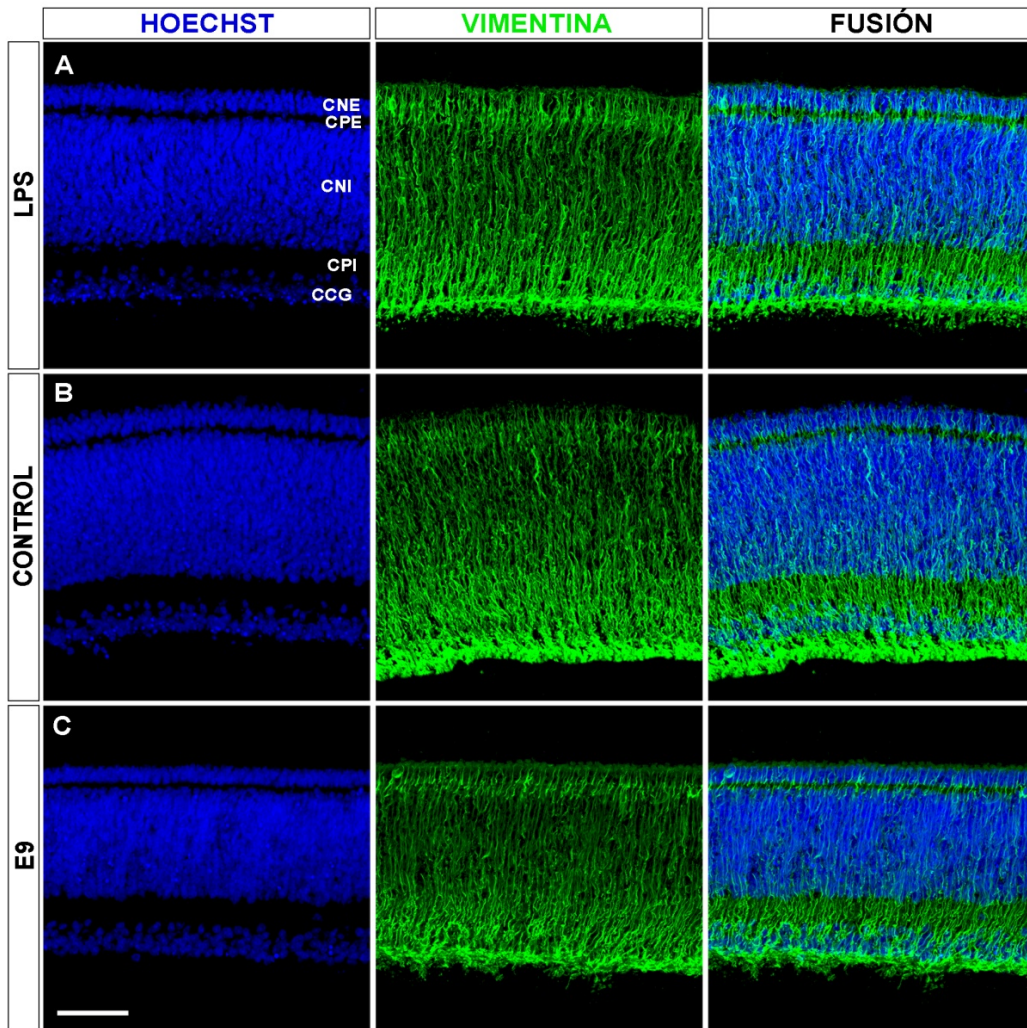
Para comprobar si el LPS tenía algún efecto sobre otros tipos celulares diferentes de la microglía o sobre la estructura general de la retina, secciones transversales de ERECs de E8+24hiv-LPS y de sus respectivos controles no tratados eran inmunomarcadas con diferentes anticuerpos. Así mismo, estos inmunomarcajes también se efectuaron en secciones de explantes no cultivados de retina de E9, con el objetivo de comparar los caracteres estructurales de los ERECs cultivados con los de la retina *in situ* de edad equivalente. De este modo, se analizó la distribución de las células de Müller, puestas de manifiesto mediante inmunomarcaje de la vimentina, que es muy abundante en dichas células. También se analizó la distribución de la tenascina, molécula de matriz extracelular presente en las capas plexiformes de la retina, y de las subpoblaciones de neuronas retinianas que expresan el factor de transcripción Islet-1.

Nuestros resultados evidenciaban que los ERECs de E8+24hiv tratados con LPS mostraban una estructura general de la retina, puesta de manifiesto mediante tinción con Hoechst, que no difería de la observada en sus controles no tratados o en retinas no cultivadas de E9. No obstante, es interesante destacar que los explantes tratados con LPS mostraban una ligera disminución del espesor de la CCG (compárense las imágenes de Hoechst en la Fig. 28).

Tampoco había grandes diferencias en la distribución de células de Müller (Fig. 28), si exceptuamos un marcaje anti-vimentina de la parte vítrea de las mismas, que era ligeramente más intenso en ERECs de E8 cultivados, tanto tratados con LPS (Fig. 28A) como no tratados (Fig. 28B), que en explantes no cultivados de retina de E9 (Fig. 28C). Esta mayor intensidad del marcaje anti-vimentina de las células de Müller en los explantes cultivados podría deberse a que estas células experimentan una cierta reacción durante el aislamiento y puesta en cultivo de los explantes.

La distribución de la tenascina en las capas plexiformes de los explantes cultivados (tratados con LPS o no) era idéntica a la observada en la retina de E9

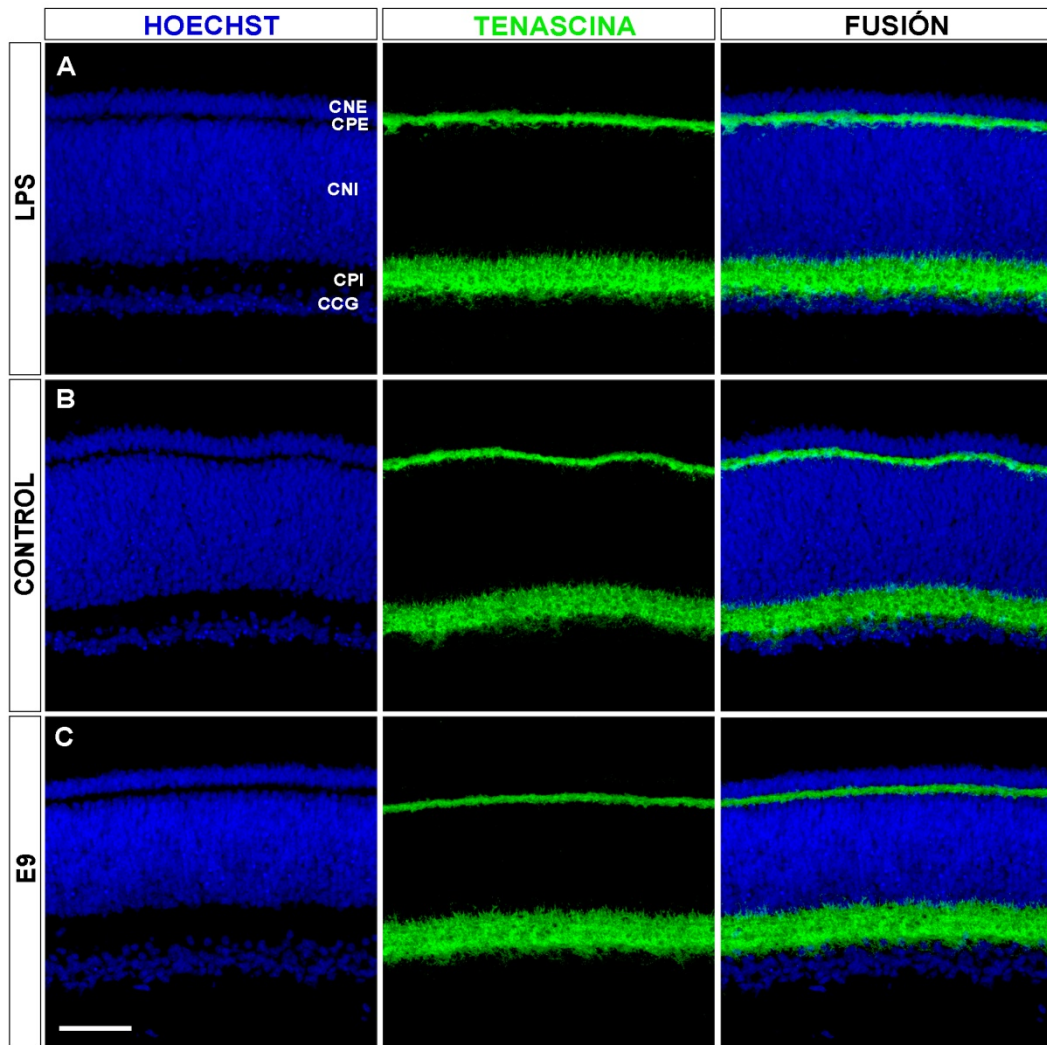
no cultivada (Fig. 29). En cuanto a la distribución general de las células Islet-1-positivas, tampoco había diferencias entre los ERECs de E8+24hiv tratados con LPS (Fig. 30A), sus controles no tratados (Fig. 30B) y los explantes no cultivados de E9 (Fig. 30C). Así, la mayoría de células ganglionares y diferentes subpoblaciones de neuronas de la CNI y de fotorreceptores de la CNE eran Islet-1-positivas en los tres tipos de explantes. Sin embargo, la inmunotinción de las células ganglionares con anti-Islet-1 hacía más evidente la observación descrita con anterioridad relativa a la disminución del espesor de la CCG en los explantes de E8+24hiv-LPS con respecto a sus controles no tratados (compárese A con B en Fig. 30). Esta aparente disminución del espesor de la CCG parecía ser debida a la presencia de un menor número de células ganglionares Islet-1-positivas, tal como se pudo comprobar en un posterior análisis cuantitativo (ver más adelante).



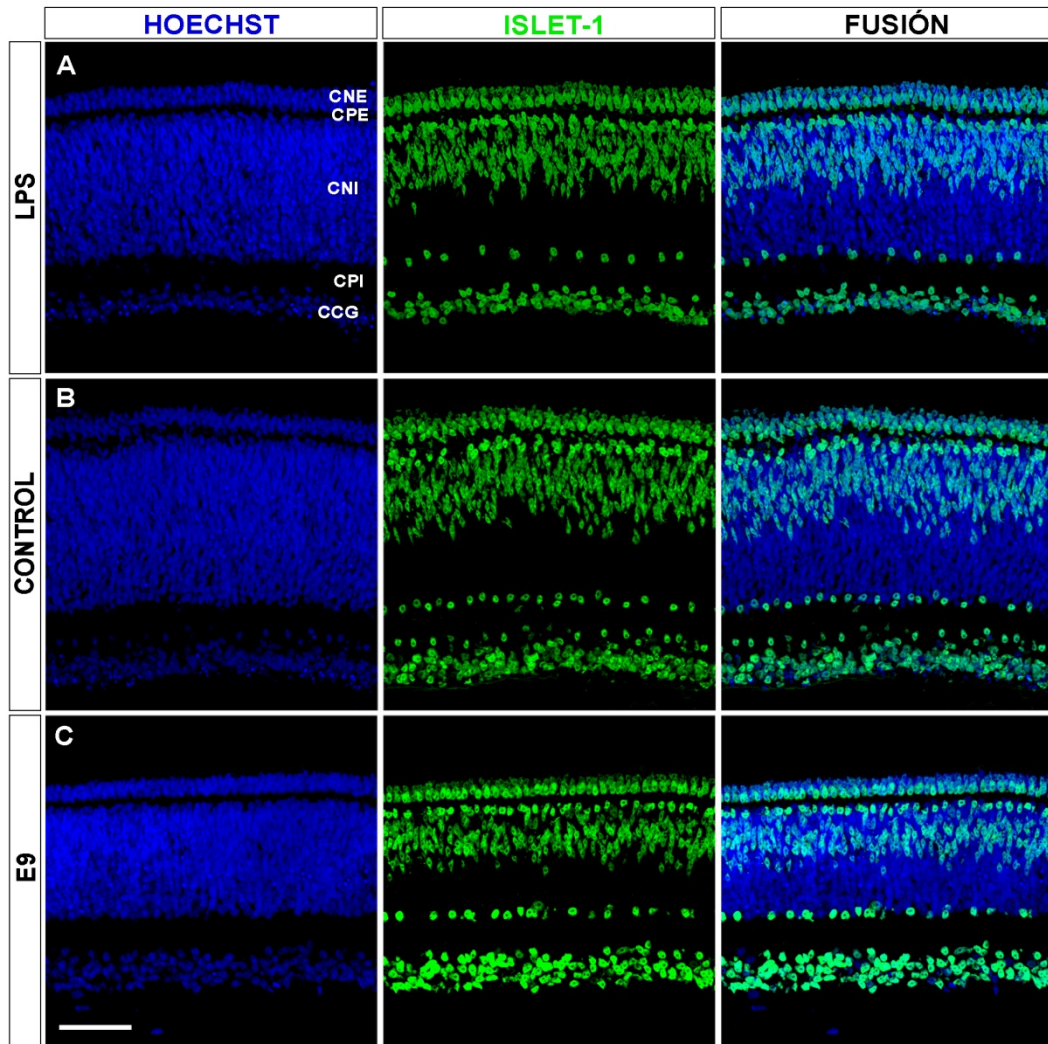
**Fig. 28.** El tratamiento con LPS de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) no altera el patrón de expresión de la vimentina. Se muestran imágenes de microscopía confocal de secciones histológicas transversales de un EREC de 8 días de incubación cultivado durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en presencia de LPS (LPS, **A**), de su control cultivado en medio libre de LPS (CONTROL, **B**) y de un explante no cultivado de retina de un embrión de 9 días de incubación (E9, **C**). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal H5 (verde), que revela el citoesqueleto de vimentina de las células de Müller, y se han teñido con Hoechst 33342 (azul), que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda) y verde (centro) y tras la fusión de ambos canales (derecha). El explante de E8+24hiv tratado con LPS (**A**) y su control (**B**) muestran un andamiaje de células de Müller organizado de manera similar al de la situación fisiológica (**C**), si bien se detecta un ligero aumento del marcaje anti-vimentina en la parte vítrea (inferior) de los explantes cultivados (**A**, **B**) respecto al no cultivado (**C**). CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

**Fig. 29. El tratamiento con LPS de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) no altera el patrón de expresión de la tenascina.** Se muestran imágenes confocales de secciones histológicas transversales de un EREC de 8 días de incubación cultivado durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en presencia de LPS (LPS, **A**), de su control cultivado en medio libre de LPS (CONTROL, **B**) y de un explante no cultivado de retina de un embrión de 9 días de incubación (E9, **C**). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal M1B4 (verde), que reconoce la tenascina, y se han teñido con Hoechst 33342 (azul), que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda) y verde (centro) y tras la fusión de ambos canales (derecha). El patrón de distribución de la tenascina, fuertemente expresada en ambas capas plexiformes, es similar en el explante de E8+24hiv tratado con LPS (**A**) y en su control no tratado (**B**), mostrando también una gran semejanza con el patrón en situación fisiológica, observado en el explante no cultivado de retina de edad equivalente (**C**). CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 30. El tratamiento con LPS de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) no altera el patrón de distribución de las células Islet-1-positivas pero sí afecta al espesor de la capa de células ganglionares.** Se muestran imágenes confocales de secciones histológicas transversales de un EREC de 8 días de incubación cultivado durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en presencia de LPS (LPS, **A**), de su control cultivado en medio libre de LPS (CONTROL, **B**) y de un explante no cultivado de retina de un embrión de 9 días de incubación (E9, **C**). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal 39.4D5 (verde), que reconoce los núcleos de las células que expresan el factor de transcripción Islet-1, y se han teñido con Hoechst 33342 (azul), que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda) y verde (centro) y tras la fusión de ambos canales (derecha). El patrón de distribución de las células Islet-1-positivas en el explante de E8+24hiv tratado con LPS (**A**) es similar al observado en su control no tratado (**B**) y en el explante no cultivado de retina de E9 (**C**). En los tres casos, las subpoblaciones de células Islet-1-positivas se distribuyen en la capa de células ganglionares (CCG), en el límite de la capa nuclear interna (CNI) con la capa plexiforme interna (CPI), en la mitad escleral (superior) de la CNI y en la capa nuclear externa (CNE). Sin embargo, el espesor de la CCG es manifiestamente más reducido en el explante tratado con LPS que en su control no tratado. CPE: capa plexiforme externa. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



### **El tratamiento con LPS disminuye la viabilidad celular e incrementa la apoptosis en ERECs de E8 cultivados *in vitro***

Durante el desarrollo normal del SNC existen periodos en los que tiene lugar una intensa muerte celular programada por apoptosis de diferentes tipos de neuronas. En la retina embrionaria de codorniz, el periodo de muerte celular en la CCG se extiende desde E7 hasta E14, con un pico de máxima intensidad en E10, mientras que en la CNI transcurre entre E7 y P3, con un pico en E12 (Marín-Teva et al., 1999c). En un trabajo previo de nuestro laboratorio, utilizando inmunotinción con anti-caspasa 3 activada, se demostró que el patrón cronotopográfico de muerte celular en la CCG y CNI de ERECs de E9 cultivados durante 24 hiv era similar al observado en la retina *in situ* (Carrasco et al., 2011). Sin embargo, la densidad de neuronas apoptóticas en la CCG (pero no en la CNI) era algo mayor en las retinas cultivadas que en las retinas *in situ* de edad equivalente, lo cual demostraba que, en esa etapa del desarrollo, las células ganglionares eran más susceptibles de sufrir muerte celular durante el cultivo que otros tipos neuronales de la retina. En el presente estudio, se ha analizado el efecto del tratamiento con LPS sobre la viabilidad celular y la muerte celular en ERECs de E8+24hiv.

El efecto del LPS sobre la viabilidad celular era analizado mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes de retina incubadas con IP, que identifica células muertas o dañadas, y FDA, que identifica células viables. En estas experiencias de viabilidad celular se utilizaron ERECs de E8+24hiv tratados con LPS y sus correspondientes controles no tratados. También se utilizaron explantes sin cultivar de retina de E9 con la finalidad de comparar la viabilidad celular obtenida en los explantes cultivados con la de la retina *in situ* de edad equivalente. El porcentaje de células viables en los ERECs de E8+24hiv tratados con LPS era de alrededor del 78%, significativamente menor que en los controles no tratados, en los que alcanzaba un valor aproximado del 87% (Fig. 31). Además, aunque la viabilidad celular en los controles era algo menor que en los explantes no cultivados de retina de E9, la diferencia entre ambos no era

significativa (Fig. 31). Estos resultados demostraban que el tratamiento con LPS induce una disminución de la viabilidad celular en los ERECs de E8+24hiv.

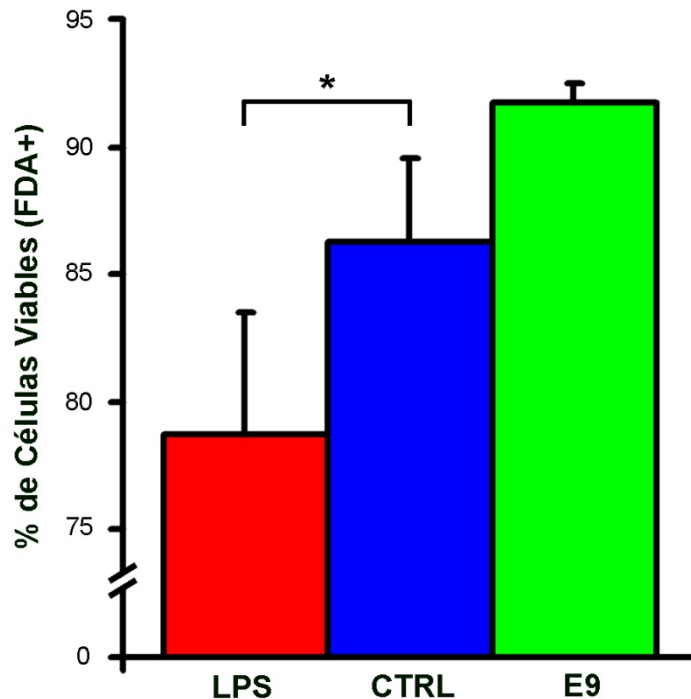
Para comprobar el efecto del LPS sobre la muerte de células de los ERECs, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos. En los primeros, se determinaba el porcentaje de células marcadas con anexina V mediante análisis con citometría de flujo. En el otro tipo de experimentos, se hacía un análisis morfométrico de los cuerpos apoptóticos en montajes totales de ERECs sometidos a la técnica TUNEL.

El análisis de células anexina V-positivas mediante citometría de flujo permitía identificar las células que habían sufrido el proceso de externalización de la fosfatidilserina, que tiene lugar durante las primeras fases de la apoptosis. En este tipo de análisis, los ERECs se marcaban con anexina V-EGFP, que identifica células en etapas iniciales de la apoptosis, y con QH1-AF594, que identifica células microgliales. Así, las células microgliales que hubiesen fagocitado neuronas apoptóticas (anexina V-positivas) mostrarían un doble marcaje con anexina V-EGFP y QH1-AF594. Esta población de células microgliales doblemente marcadas no se tenía en cuenta para el cálculo de los porcentajes de células apoptóticas, de manera que dichas células eran exclusivamente neuronas, ya que las células de Müller, que son el otro tipo celular presente en la retina de codorniz de E8, no parecen sufrir apoptosis. El porcentaje de neuronas apoptóticas se determinaba en ERECs de E8 cultivados durante 1, 3, 6, 12 y 24 hiv en presencia o ausencia de LPS. En todos los tiempos de cultivo analizados, dicho porcentaje era mayor en los explantes tratados con LPS que en los controles no tratados (Fig. 32). No obstante, estas diferencias sólo eran significativas a las 3, 6 y 12 hiv, observándose que la mayor diferencia entre los explantes tratados con LPS y sus controles ocurría a las 12 hiv. Además, el porcentaje de neuronas anexina V-positivas durante la primera hora de cultivo era mayor que el observado a las 3 hiv, tanto en explantes tratados con LPS como en los controles. Este hecho sugería que el aislamiento de las retinas y el inicio de su cultivo provocaban un aumento de la apoptosis en los explantes. Por otra parte, en los

ERECs tratados con LPS, el porcentaje de neuronas apoptóticas aumentaba a partir de 3 hiv, alcanzaba un máximo a las 12 hiv y posteriormente disminuía hasta las 24 hiv. En los explantes control, sin embargo, el porcentaje de neuronas apoptóticas se mantenía prácticamente constante entre 3 y 24 hiv. Estos resultados demostraban que el tratamiento con LPS incrementaba la apoptosis neuronal en los ERECs cultivados entre 3 y 24 hiv.

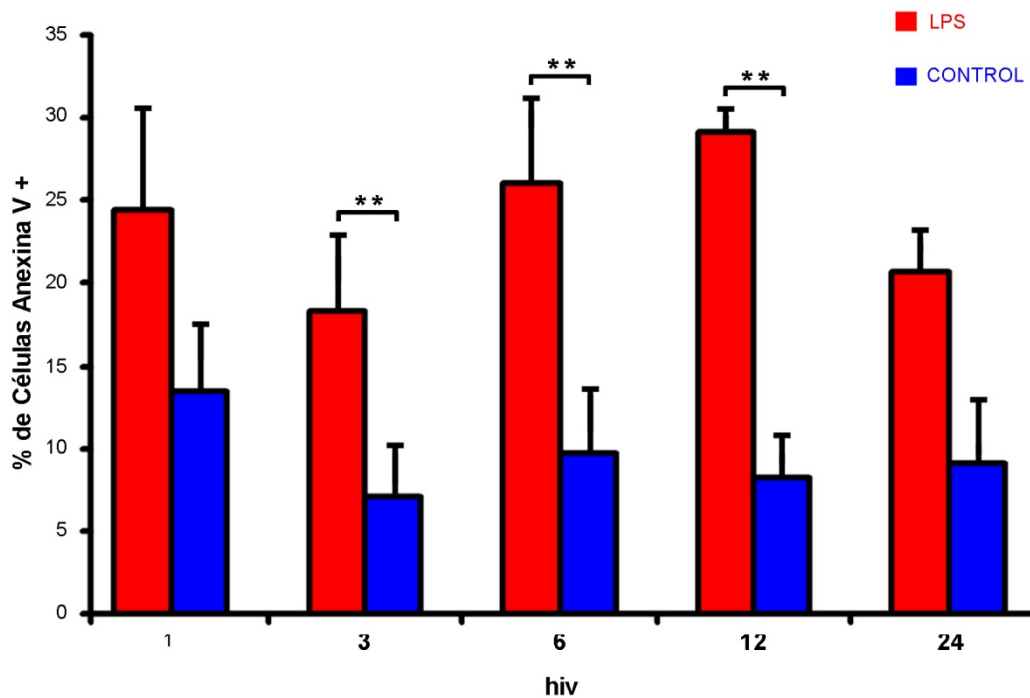
En otro tipo de experimentos, se analizaron cuantitativamente los cuerpos TUNEL-positivos en montajes totales de ERECs de E8+24hiv tratados con LPS y de sus controles. La elección del tiempo de cultivo de 24 hiv para este tipo de experimentos estaba basada en los resultados de los experimentos previos de marcaje con anexina V, que detecta células en etapas iniciales de apoptosis. En ellos, la diferencia entre el porcentaje de células anexina V-positivas en ERECs tratados con LPS y el determinado en sus controles no tratados era máxima en ERECs de E8+12hiv (Fig. 32). Teniendo en cuenta que la técnica TUNEL detecta la fragmentación del ADN, típica de etapas avanzadas del proceso de apoptosis, se consideró que la diferencia entre la cantidad de cuerpos TUNEL-positivos (etapas avanzadas de la apoptosis) de ERECs de E8+24hiv tratados con LPS y la de sus controles no tratados podría ser equivalente a la detectada entre los porcentajes de células anexina V-positivas (etapas iniciales de la apoptosis) en ERECs de E8+12hiv. Los experimentos de marcaje con TUNEL (Fig. 33) mostraban que, tanto en montajes totales como en secciones transversales de ERECs de E8+24hiv, los cuerpos TUNEL-positivos eran aparentemente más abundantes en la CCG de explantes tratados con LPS que en la de sus controles no tratados (compárese A con C y B con D en Fig. 33). El análisis cuantitativo llevado a cabo en el espesor de la CCG de montajes totales confirmaba esta apariencia morfológica. Así, el área relativa de los cuerpos TUNEL-positivos (porcentaje de píxeles TUNEL-positivos por unidad de área) prácticamente se duplicaba en la CCG de ERECs tratados con LPS (algo menos del 13%) con respecto a la de sus controles no tratados (algo más del 6,5%). Teniendo en cuenta que el área ocupada por los cuerpos TUNEL-positivos procedentes de la fragmentación de

células apoptóticas debe ser proporcional al número de las mismas, nuestros resultados permiten concluir que el tratamiento con LPS de ERECs de E8+24hiv induce un significativo incremento del número de células ganglionares que sufren apoptosis.



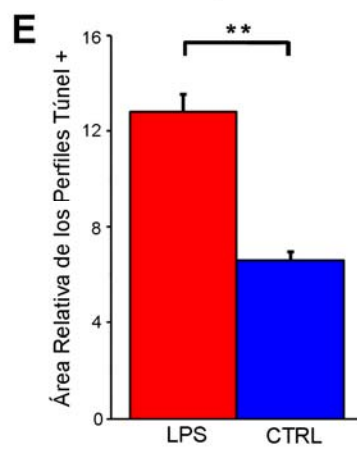
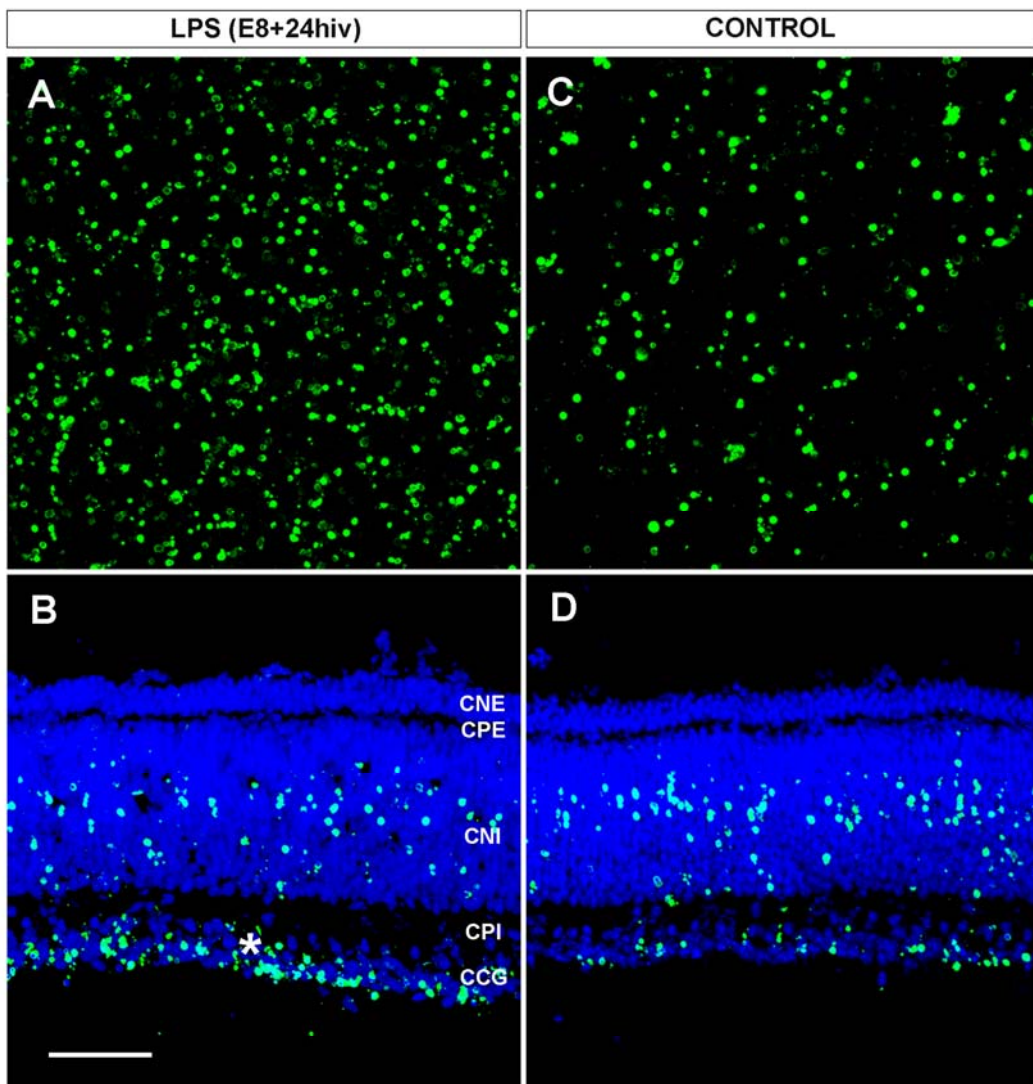
**Fig. 31. El tratamiento con LPS disminuye la viabilidad celular en los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs).** El diagrama de barras muestra los porcentajes de células viables en EREC de 8 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en presencia de LPS (barra roja), en sus controles no tratados (CTRL, barra azul) y en explantes no cultivados de retinas de embriones de 9 días de incubación (E9, barra verde). Dichos porcentajes se han obtenido mediante análisis con citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes tratadas con diacetato de fluoresceína (FDA), como indicador de viabilidad celular, y yoduro de propidio, como indicador de células muertas. El porcentaje de células viables corresponde al porcentaje de células FDA-positivas (FDA+) respecto de la población total de células de los explantes. Los datos se presentan como medias ( $\pm$  error standard) de los porcentajes de células FDA-positivas obtenidas tras el análisis de 9 explantes de cada tipo (LPS, CTRL y E9) en tres experiencias diferentes. El porcentaje de células viables disminuye significativamente en los EREC de E8+24hiv tratados con LPS en relación con los explantes control, mientras que las diferencias entre éstos y los explantes no cultivados de retinas de E9 no son significativas (\*  $P < 0,05$ , ANOVA de un factor seguida de un test de Tukey para comparaciones múltiples).





**Fig. 32.** El tratamiento con LPS incrementa el porcentaje de neuronas anexina V-positivas en los explantes de retina de embriones de codorniz (ERECs) de 8 días de incubación (E8) a diferentes tiempos de cultivo. El diagrama de barras muestra los porcentajes de neuronas anexina V-positivas en ERECs de E8 cultivados durante 1, 3, 6, 12 y 24 horas *in vitro* (hiv) en presencia de LPS (barras rojas) y en sus respectivos controles (barras azules). Dichos porcentajes se han obtenido mediante análisis con citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes marcados con anexina V conjugada con EGFP y QH1 conjugado con Alexa Fluor 594. Las barras representan medias ( $\pm$  error estándar) de los porcentajes de neuronas anexina V-positivas obtenidas tras el análisis de 6 ERECs tratados con LPS, y de sus respectivos controles, en cada tiempo de cultivo. En todos los tiempos de cultivo analizados, el porcentaje de neuronas anexina V-positivas es mayor en los explantes tratados con LPS que en los controles no tratados, aunque las diferencias sólo son significativas a las 3, 6 y 12 horas de cultivo (\*\*  $P < 0,01$ , test t de Student). La máxima diferencia se observa a las 12 horas de cultivo, donde el porcentaje de neuronas anexina V-positivas pasa desde alrededor del 8% en los explantes control hasta el 28% en los explantes tratados con LPS.

**Fig. 33. Los cuerpos apoptóticos TUNEL-positivos se incrementan en la capa de células ganglionares (CCG) de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) tras el tratamiento con LPS. A-D:** Imágenes de microscopía confocal de montajes totales (**A, C**) y secciones histológicas (**B, D**) marcados con TUNEL (verde), obtenidos a partir de ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en presencia (**A, B**, LPS) o ausencia (**C, D**, CONTROL) de LPS. Las imágenes confocales de montajes totales son proyecciones máximas de series de secciones ópticas obtenidas a través del espesor de la CCG. Además del marcaje con TUNEL, las secciones histológicas han sido teñidas con Hoechst 33342 (azul) para poner de manifiesto las capas nucleares de la retina. En montajes totales, los cuerpos TUNEL-positivos de la CCG son aparentemente más abundantes en el explante tratado con LPS (**A**) que en su control (**C**). En las secciones histológicas, se observan cuerpos TUNEL-positivos tanto en la CCG como en la capa nuclear interna (CNI), los cuales también son más numerosos en la CCG (asterisco) del explante tratado con LPS (**B**) que en la CCG de su control (**D**). CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CPI: capa plexiforme interna. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . **E:** Áreas relativas de perfiles TUNEL-positivos en la CCG de montajes totales de ERECs de E8+24hiv tratados con LPS (barra roja) y sus controles (CTRL, barra azul). Las barras representan medias ( $\pm$  error estándar) de los porcentajes de píxeles TUNEL-positivos respecto del total de píxeles (área relativa) medidos en tres áreas de 240x240  $\mu\text{m}$  de la CCG de 17 montajes totales de explantes tratados con LPS y de sus correspondientes controles. El área relativa de perfiles TUNEL-positivos se incrementa significativamente en los explantes tratados con LPS, siendo casi el doble que la de los explantes control (\*\*  $P < 0,01$ , test t de Student).



### **El tratamiento con LPS provoca una disminución de la población de células ganglionares en ERECs de E8+24hiv**

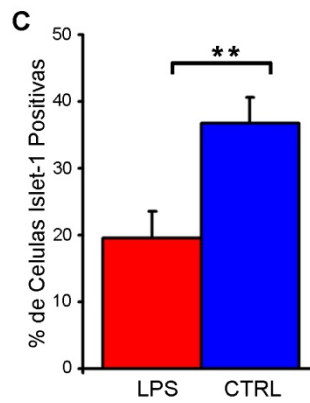
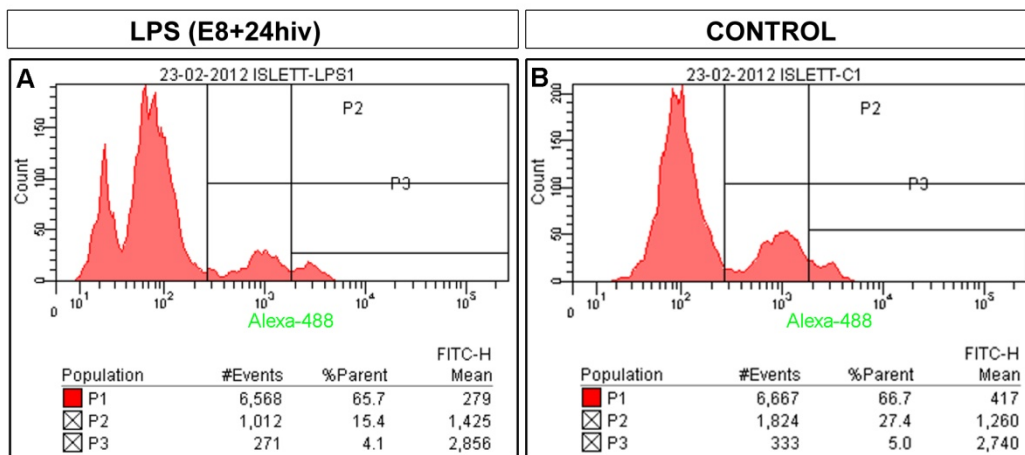
Los resultados del apartado anterior demostraban que el tratamiento con LPS de ERECs de E8+24hiv incrementaba la muerte de células ganglionares en los mismos. Por otra parte, el factor de transcripción Islet-1 es expresado por diferentes subpoblaciones de neuronas de la retina de aves, incluidas las células ganglionares (Fig. 30; Carrasco et al., 2011; Fischer et al., 2002; Halfter et al., 2005). Teniendo en cuenta lo anterior, se realizaron estudios para cuantificar las neuronas Islet-1-positivas en ERECs de E8+24hiv tratados con LPS y en sus controles no tratados.

Primeramente se realizó un análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares procedentes de explantes tratados con LPS y de sus controles no tratados, previamente inmunomarcados con un anticuerpo anti-Islet-1. Este análisis demostraba que el 36,8 % de las células de los ERECs control eran Islet-1 positivas, mientras que este porcentaje descendía hasta el 19,5 % en los ERECs tratados con LPS (Fig. 34). Esta significativa disminución del porcentaje de células Islet-1-positivas inducida por el tratamiento con LPS es compatible con un descenso en el número de células ganglionares (que son Islet-1-positivas en su inmensa mayoría), aunque no se puede descartar que otros tipos neuronales de la CNI y CNE también contribuyan a la disminución de dicho porcentaje.

Para comprobar si la población de células ganglionares realmente se reducía tras el tratamiento con LPS, se hizo un estudio cuantitativo en la CCG de secciones histológicas de ERECs de E8+24hiv y de sus correspondientes controles, inmunomarcadas con anti-Islet-1 (Fig. 35). Como se ha descrito con anterioridad, el espesor de la CCG era menor en los explantes tratados con LPS que en sus controles no tratados (compárese A y B en Fig. 35), probablemente como consecuencia de la desaparición de una proporción de células ganglionares tras el tratamiento con LPS. El estudio cuantitativo evidenciaba que el número de células Islet-1-positivas por unidad de longitud de la CCG en secciones histológicas de explantes tratados con LPS era aproximadamente el 70% del

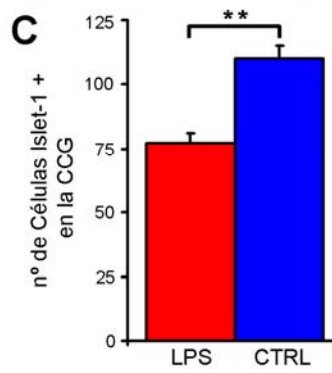
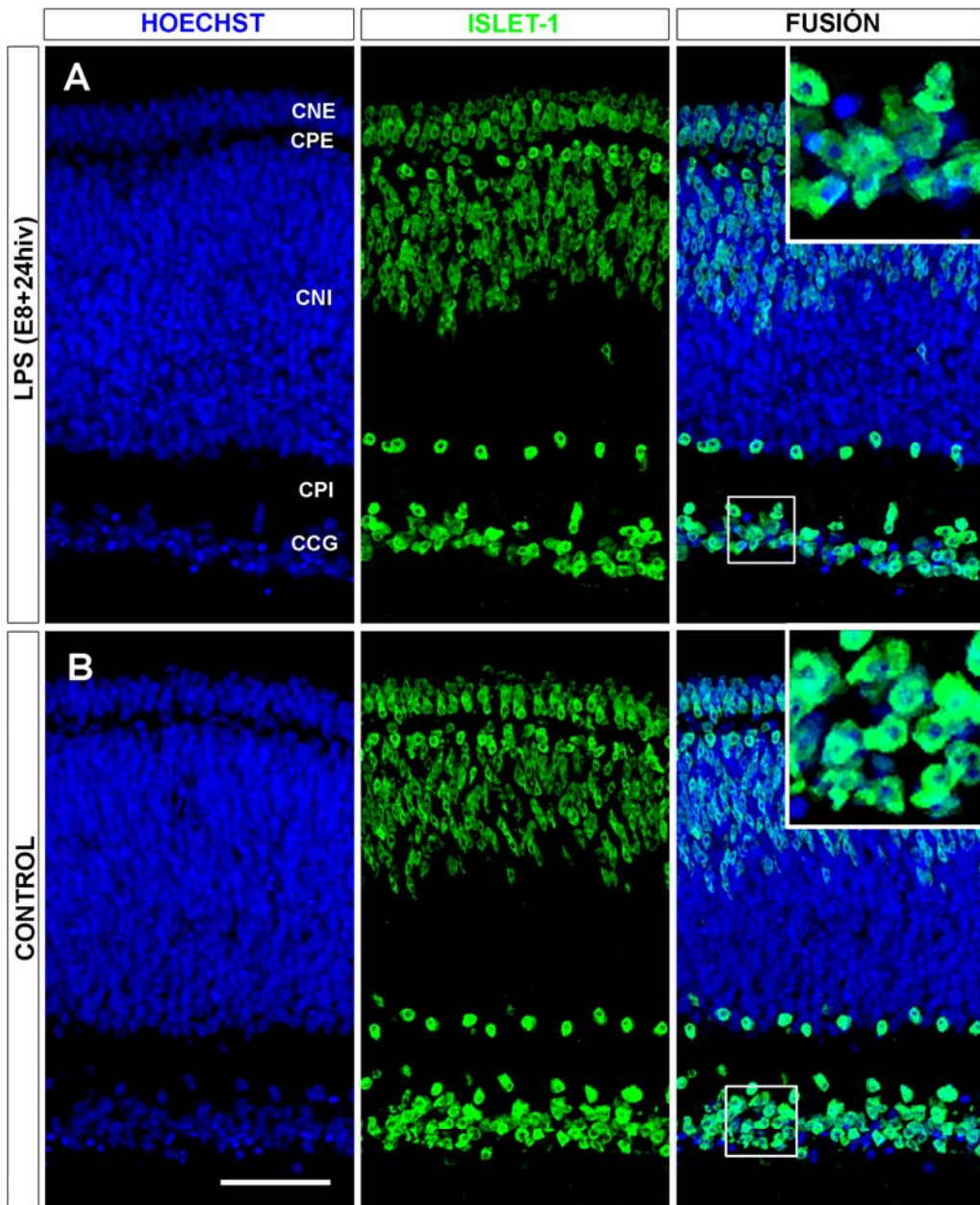
calculado en sus controles no tratados (Fig. 35C). Estos resultados permitían concluir que el tratamiento con LPS de ERECs de E8+24hiv provoca una reducción de alrededor del 30% en el número de células ganglionares, en concordancia con el incremento de la tasa de apoptosis de dichas células descrito en el apartado anterior.

**Fig. 34. El porcentaje de células Islet-1-positivas disminuye significativamente en los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) tras el tratamiento con LPS. A, B:** Histogramas del análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en presencia (**A**, LPS) o ausencia (**B**, CONTROL) de LPS, que han sido inmunomarcados con el anticuerpo 39.4D5 (anti-Islet-1), el cual se ha revelado con anti-IgG de ratón conjugado con Alexa-488. En ambos histogramas, se aprecia la existencia de dos poblaciones de células Islet-1-positivas (P2 y P3), cuyo porcentaje respecto de la población celular completa es menor en el explante tratado con LPS (**A**) que en el control (**B**). **C:** Porcentajes medios ( $\pm$  error standard) de células Islet-1-positivas obtenidos en el análisis mediante citometría de flujo de 8 ERECs de E8+24hiv tratados con LPS (barra roja) y sus correspondientes controles (barra azul). El porcentaje de células Islet-1-positivas de los explantes tratados con LPS es significativamente menor (casi la mitad) que el de los controles (\*\*  $P < 0,01$ , test t de Student).



**Fig. 35. El tratamiento con LPS de los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) provoca una disminución del número de células ganglionares Islet-1-positivas. A, B:** Imágenes confocales de secciones histológicas de un EREC de 8 días de incubación cultivado durante 24 horas *in vitro* (E8+24hiv) en presencia de LPS (**A**, LPS) y de su control cultivado en medio libre de LPS (**B**, CONTROL). Las secciones están inmunomarcadas con el anticuerpo monoclonal 39.4D5 (verde), que reconoce el factor Islet-1, y teñidas con Hoechst 33342 (azul), que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda) y verde (centro) y tras la fusión de ambos canales (derecha). El área encuadrada en las imágenes de la derecha se muestra a mayor aumento en la parte superior de las mismas. Se advierte una aparente reducción del número de células ganglionares Islet-1-positivas en el explante tratado con LPS (**A**) en relación con su control no tratado (**B**). CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares. Barra de escala: 45  $\mu\text{m}$ . **C:** Número de células Islet-1-positivas en la CCG de secciones de ERECs de E8+24hiv tratados con LPS (barra roja) y de sus controles no tratados (barra azul). El análisis cuantitativo se ha efectuado en tres secciones histológicas (obtenidas en las partes dorsal, central y ventral) de 8 ERECs tratados con LPS y sus correspondientes controles, en las que se ha determinado el número de células Islet-1-positivas presentes en micrografías de la CCG de 250  $\mu\text{m}$  de anchura. El número de células ganglionares Islet-1-positivas es significativamente menor en los explantes tratados con LPS que en los controles (\*\*  $P < 0,01$ , test t de Student).





### **Los contactos fagocíticos de células microgliales con células ganglionares caspasa 3-positivas se incrementan tras el tratamiento con LPS de ERECs de E8+12hiv**

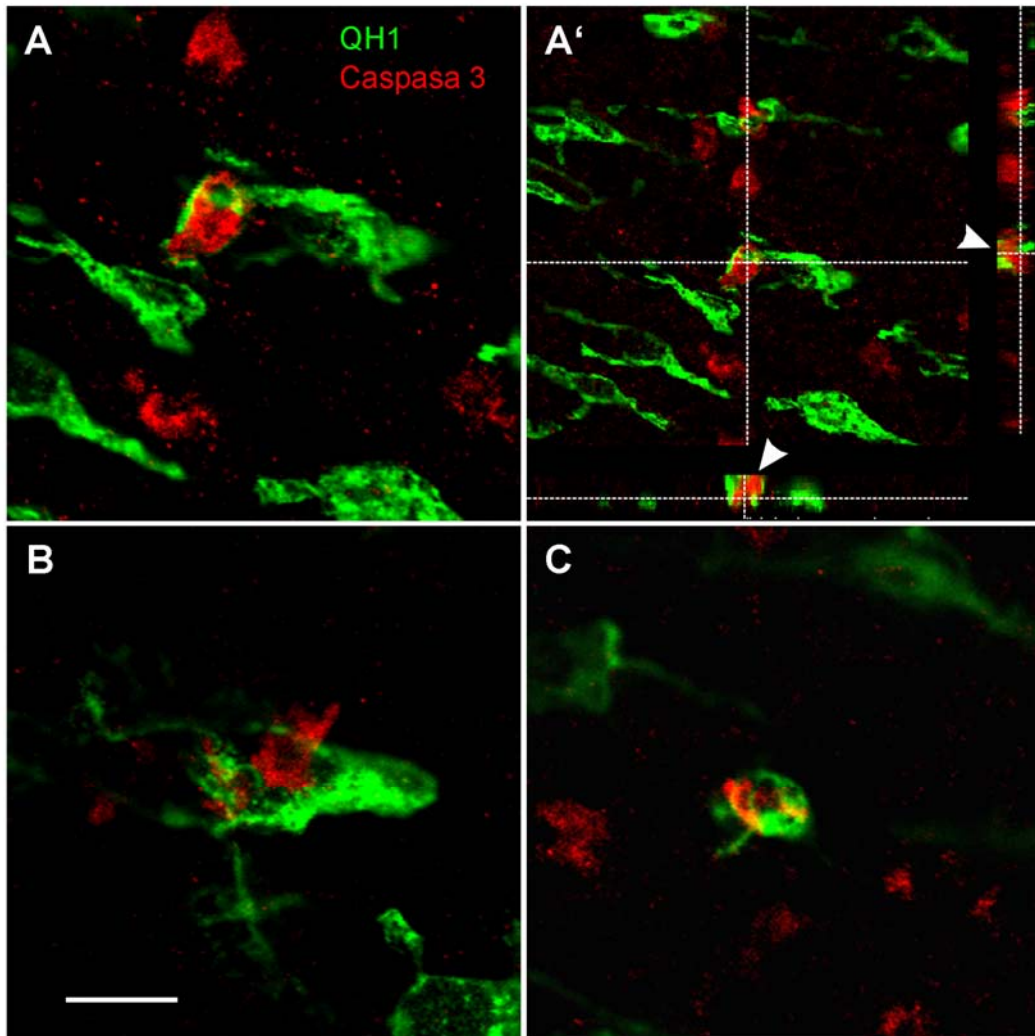
Varios estudios realizados en los últimos 15 años han demostrado que las células microgliales no sólo tienen una función de limpieza de los restos de células que mueren durante el desarrollo normal del SNC, sino que desempeñan un papel activo en los procesos de muerte celular. Así, se ha demostrado que las células microgliales pueden inducir la muerte de algunos tipos de neuronas durante el desarrollo mediante un nuevo mecanismo denominado “muerte celular promovida por fagocitosis” o “fagoptosis”, que se caracteriza por la existencia de contactos fagocíticos entre células microgliales y neuronas que expresan la forma activada de la caspasa 3 y por la producción microglial de ROS, tales como anión  $O_2^-$ , óxido nítrico y peroxinitrito (Bessis et al., 2007; Brown y Neher, 2012, 2014; Cunningham et al., 2013; Mallat et al., 2005; Marín-Teva et al., 2004, 2014; Wakselman et al., 2008). Con el fin de investigar si este mecanismo de muerte celular promovida por fagocitosis estaba implicado en la muerte de células ganglionares observada en los ERECs de E8 tras la activación microglial con LPS, se estudió si existían contactos fagocíticos entre células microgliales y células ganglionares caspasa 3-positivas. Primeramente se analizó si este tipo de contactos ya estaba presente en la retina *in situ* de embriones de E8, etapa del desarrollo en la que está teniendo lugar la muerte celular programada de células ganglionares. Con posterioridad, se examinó si dichos contactos también existían en los ERECs de E8+12hiv y cómo se veían afectados por el tratamiento con LPS, el cual induce un incremento de la muerte de células ganglionares, tal como se ha descrito previamente.

Para el estudio *in situ* se utilizaron montajes totales de ERECs de E8,5 no cultivados, doblemente inmunomarcados con anti-caspasa 3 activada y QH1. En secciones ópticas confocales de dichos montajes totales, se observaba la existencia de frecuentes contactos fagocíticos entre células microgliales y células ganglionares caspasa 3-positivas (Fig. 36). Algunas células microgliales

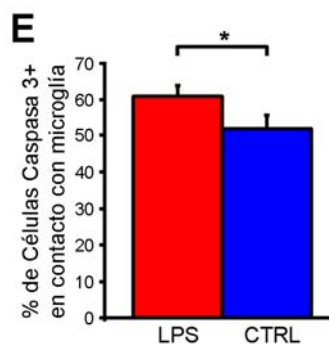
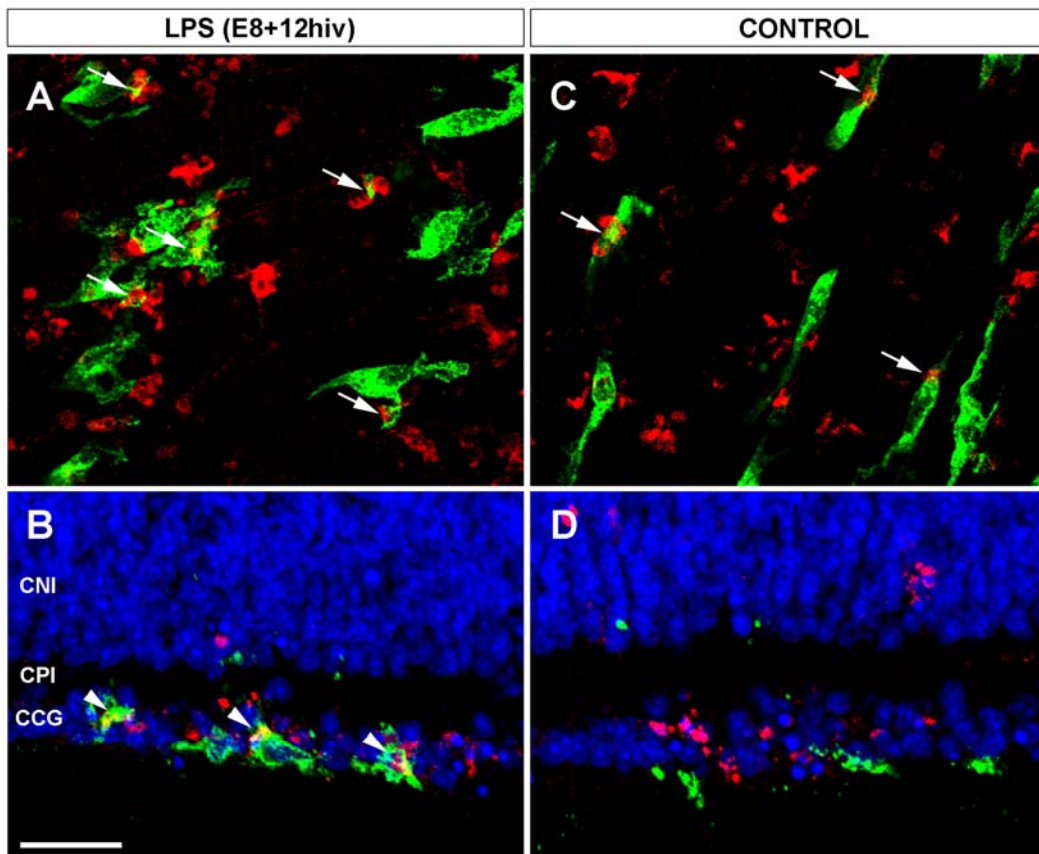
establecían contactos con células ganglionares apoptóticas a través de prolongaciones que abrazaban a dichas células (Fig. 36A), tal como se podía comprobar en vistas ortogonales XZ e YZ de dichos contactos (Fig. 36A'). Otras veces se observaban contactos fagocíticos entre el soma de las células microgliales y las células caspasa 3-positivas (Fig. 36B) y también se podían ver células microgliales cuyo soma envolvía completamente a una célula ganglionar apoptótica (Fig. 36C).

La presencia de contactos fagocíticos entre células microgliales y células ganglionares caspasa 3-positivas también era analizada en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS y en sus controles no tratados. Con este fin, montajes totales y secciones histológicas de los explantes, doblemente inmunomarcados con QH1 y anti-caspasa 3 activada, eran analizados mediante microscopía confocal (Fig. 37). Dichos contactos fagocíticos estaban presentes en la CCG, tanto de explantes tratados con LPS (Fig. 37A, C) como de explantes control (Fig. 37B, D), aunque aparentemente había mayor número de contactos en los primeros que en sus controles. Estas observaciones eran comprobadas cuantitativamente mediante la determinación del porcentaje de células ganglionares caspasa 3-positivas que estaban contactadas por células microgliales (Fig. 37E). Los resultados demostraban que dicho porcentaje era significativamente más elevado en los explantes tratados con LPS que en sus controles. Se podría argumentar que este aumento del porcentaje de células ganglionares caspasa 3-positivas contactadas por células microgliales tras el tratamiento con LPS podría ser causado por la existencia de mayor número de células microgliales en los explantes tratados con LPS. Sin embargo, el tratamiento con LPS de los ERECs de E8+24hiv no producía cambios significativos en la densidad de células microgliales, tal como se ha descrito anteriormente (Fig. 27). De estos resultados se puede concluir que las células microgliales eran más activas en el establecimiento de contactos fagocíticos con las células ganglionares tras su activación inducida por el tratamiento con LPS.

**Fig. 36. Las células microgliales establecen estrechos contactos fagocíticos con células ganglionares caspasa 3-positivas en explantes no cultivados de retina embrionaria de codorniz.** Se muestran tres secciones confocales, obtenidas en la capa de células ganglionares de montajes totales de explantes no cultivados de retina de embriones de codorniz de 8,5 días de incubación, doblemente inmunomarcados con los anticuerpos QH1 (verde) y anti caspasa 3-activada (rojo), en las que se observan estrechos contactos entre células microgliales QH1-positivas y células ganglionares apoptóticas caspasa 3-positivas. **A:** Una célula ganglionar apoptótica es abrazada y parcialmente envuelta por prolongaciones de una célula microglial. **A':** Imagen en el plano XY de la sección óptica mostrada en **A**, acompañada a la derecha y abajo por sendas vistas ortogonales en los planos YZ y XZ de los contactos entre la célula ganglionar apoptótica y las prolongaciones microgliales que la están abrazando (cabecitas de flecha). **B:** Contacto entre el soma de una célula microglial y una célula ganglionar apoptótica. **C:** Imagen de una fase avanzada de la fagocitosis, en la que una célula ganglionar apoptótica aparece englobada dentro del soma de una célula microglial. Barra de escala: 15  $\mu\text{m}$  para **A**, **B** y **C**; 29  $\mu\text{m}$  para **A'**.



**Fig. 37. El tratamiento con LPS de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) incrementa el número de células ganglionares caspasa 3-positivas con las que la microglía establece contactos fagocíticos. A-D:** Imágenes de microscopía confocal de montajes totales (**A, C**) y secciones histológicas (**B, D**) doblemente inmunomarcadas con QH1 (verde) y anti-caspasa 3 activada (rojo), obtenidos a partir de ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 12 horas *in vitro* (E8+12hiv) en presencia (**A, B, LPS**) o ausencia (**C, D, CONTROL**) de LPS. Las imágenes confocales de montajes totales son secciones ópticas obtenidas en la capa de células ganglionares (CCG). Además del doble inmunomarcaje, las secciones histológicas han sido teñidas con Hoechst 33342 (azul) para poner de manifiesto las capas nucleares de la retina. Se puede apreciar que los contactos (flechas en **A** y **C**; cabezas de flecha en **B**) entre células microgliales (QH1-positivas) y células ganglionares apoptóticas (caspasa 3-positivas) son más abundantes en los explantes tratados con LPS que en los explantes control. CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna. Barra de escala: 21  $\mu\text{m}$  para **A** y **C**; 25  $\mu\text{m}$  para **B** y **D**. **E:** Porcentajes de células ganglionares apoptóticas caspasa 3-positivas que muestran estrechos contactos con células microgliales en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS (barra roja) y en sus controles (barra azul). Las barras representan las medias ( $\pm$  error standard) de los porcentajes obtenidos en los recuentos efectuados en tres zonas (dorsal, nasal y temporal) de los montajes totales de 6 explantes tratados con LPS y sus correspondientes controles. Nótese que el porcentaje de células ganglionares apoptóticas que reciben contactos microgliales es significativamente más elevado en los explantes tratados con LPS que en los controles no tratados (\*  $P < 0,05$ , test t de Student).



### **El tratamiento con LPS de ERECs de E8+12hiv incrementa la producción microglial de ROS, pero no de anión $O_2^-$**

Diversos estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que las células microgliales activadas con LPS incrementan la producción de ROS, tales como anión  $O_2^-$ , óxido nítrico o peroxinitrito (formado por la reacción del óxido nítrico con el anión  $O_2^-$ , provocando la degeneración de neuronas y otras células (Arimoto y Bing, 2003; Cui et al., 2012; di Penta et al., 2013; Golde et al., 2002; Li et al., 2005; Liu et al., 2010; Neher et al., 2011; Qin et al., 2004, 2013; Roy et al., 2008). En el presente trabajo, analizábamos si la producción de ROS por la microglía también se incrementaba en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS en relación con sus controles no tratados. Con este fin se utilizaron las sondas carboxi- $H_2$ DCFDA y DHE.

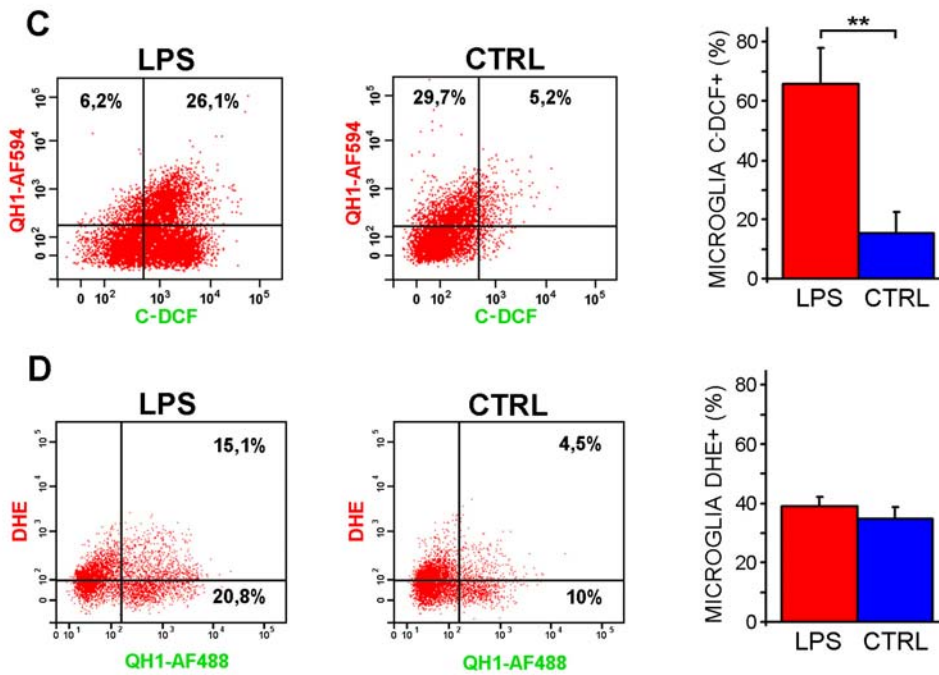
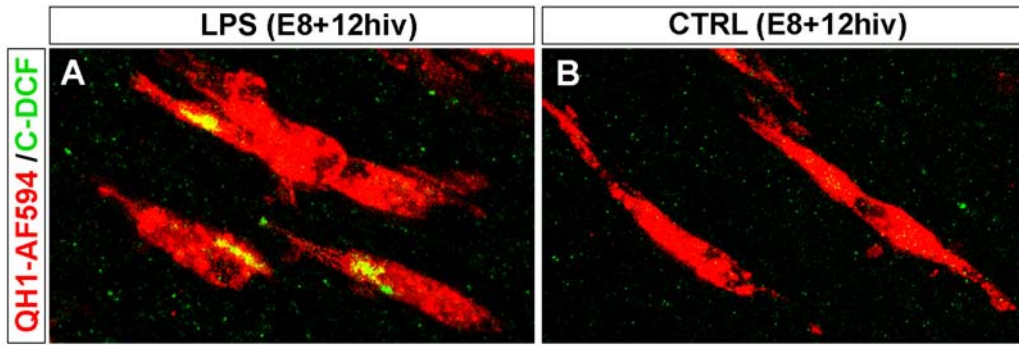
El carboxi- $H_2$ DCFDA detecta la producción intracelular de diversas ROS, entre las que se incluyen óxido nítrico y peroxinitrito, que lo oxidan y convierten en carboxi-DCF, que emite fluorescencia verde. Los ERECs de E8+12hiv tratados con LPS y sus controles no tratados se marcaban durante la última hora de cultivo con carboxi- $H_2$ DCFDA, que identificaba las células que producen ROS, y QH1-AF594, que permitía reconocer las células microgliales. La observación en el microscopio confocal de montajes totales de ERECs con este doble marcaje mostraba que las células microgliales carboxi-DCF-positivas eran aparentemente más abundantes en los explantes tratados con LPS que en los controles (Fig. 38A, B). La cuantificación de estas células mediante análisis microscópico era extraordinariamente difícil, ya que el carboxi-DCF se debilitaba y desaparecía con gran rapidez al iluminar el campo microscópico para su observación. Por lo tanto, la cuantificación de células microgliales carboxi-DCF-positivas se llevó a cabo mediante análisis con citometría de flujo de suspensiones celulares obtenidas a partir de explantes con doble marcaje carboxi-DCF/QH1-AF594 (Fig. 38C). Este análisis demostraba que el porcentaje de células microgliales productoras de ROS (carboxi-DCF-positivas) era mucho más elevado en ERECs tratados con LPS (aproximadamente el 66%) que en sus controles (alrededor del 15%).



El DHE es una sonda habitualmente utilizada para detectar la producción de anión  $O_2^-$ , ya que en presencia de éste se convierte en etidio, que se acumula en el núcleo celular y emite fluorescencia roja. El análisis con citometría de flujo de suspensiones celulares obtenidas a partir de ERECs de E8+12hiv doblemente marcados con DHE y QH1-AF488 demostraba que el porcentaje de células microgliales productoras de  $O_2^-$  (DHE-positivas) hallado en los explantes tratados con LPS no mostraba diferencias significativas con el obtenido en los controles no tratados (Fig. 38D). Por lo tanto, el tratamiento con LPS no incrementaba la producción de  $O_2^-$  en las células microgliales.

En resumen, los experimentos con las sondas carboxi- $H_2DCFDA$  y DHE demostraban que el tratamiento con LPS incrementaba la producción de ROS, pero no de anión  $O_2^-$ , en las células microgliales de ERECs de E8+12hiv.

**Fig. 38. Las células microgliales incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), pero no de anión superóxido ( $O_2^-$ ), tras el tratamiento de los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) con LPS. A, B:** Imágenes confocales (proyecciones máximas) de células microgliales en montajes totales de sendos ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 12 horas *in vitro* (E8+12hiv) en presencia (A, LPS) o ausencia (B, CTRL) de LPS, ambos tratados durante la última hora de cultivo con la sonda carboxi- $H_2DCFDA$ , que se convierte en carboxi-DCF (C-DCF, verde) en presencia de ROS, y el anticuerpo QH1 conjugado con Alexa Fluor 594 (QH1-AF594, rojo), para identificar la microglía. Las células microgliales del explante tratado con LPS se observan marcadas con C-DCF, indicando la producción de ROS por las mismas, mientras que las del control carecen de este marcaje. Barra de escala: 25  $\mu m$ . **C:** Gráficas de puntos del análisis mediante citometría de flujo de las células microgliales productoras de ROS en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS (gráfica de puntos izquierda, LPS) y en sus controles no tratados (gráfica de puntos derecha, CTRL). Nótese que las células microgliales (QH1-AF594-positivas) productoras de ROS (C-DCF-positivas), representadas en el cuadrante superior derecho de cada gráfica, son mucho más numerosas en los explantes tratados con LPS que en los controles, mientras que lo contrario ocurre con las células microgliales que no producen ROS (C-DCF-negativas), representadas en el cuadrante superior izquierdo. En el diagrama de barras de la derecha se representan los porcentajes medios ( $\pm$  error estándar) de células microgliales C-DCF-positivas en relación con la población total de microglía (suma de los números de células de los cuadrantes superiores izquierdo y derecho), obtenidos tras el análisis de 12 ERECs tratados con LPS (barra roja) y sus correspondientes controles (barra azul). El porcentaje de microglía productora de ROS es más de cuatro veces superior en los explantes tratados con LPS que en los controles (\*\*  $P < 0,01$ , test t de Student). **D:** Gráficas de puntos del análisis mediante citometría de flujo de la producción de aniones  $O_2^-$  en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS (gráfica de puntos izquierda, LPS) y en sus controles no tratados (gráfica de puntos derecha, CTRL), tras la adición al medio durante la última hora de cultivo de la sonda dihidroetidido (DHE), para la detección de aniones  $O_2^-$ , y el anticuerpo QH1-AF488, para la identificación de la microglía. A la derecha se representan los porcentajes medios ( $\pm$  error estándar) de células microgliales (QH1-AF488-positivas) productoras de aniones  $O_2^-$  (DHE-positivas) en relación con la población total de microglía (células QH1-AF488-positivas ya sean DHE-positivas o DHE-negativas), obtenidos tras el análisis de 6 ERECs tratados con LPS (barra roja) y sus correspondientes controles (barra azul). El porcentaje de células microgliales DHE-positivas en los explantes tratados con LPS no muestra diferencias significativas con el obtenido en los controles no tratados (test t de Student), indicando que las células microgliales productoras de  $O_2^-$  no se incrementan tras el tratamiento con LPS.



### **Incremento de la expresión de iNOS en la microglía ameboide activada de ERECs de E8+12hiv tratados con LPS**

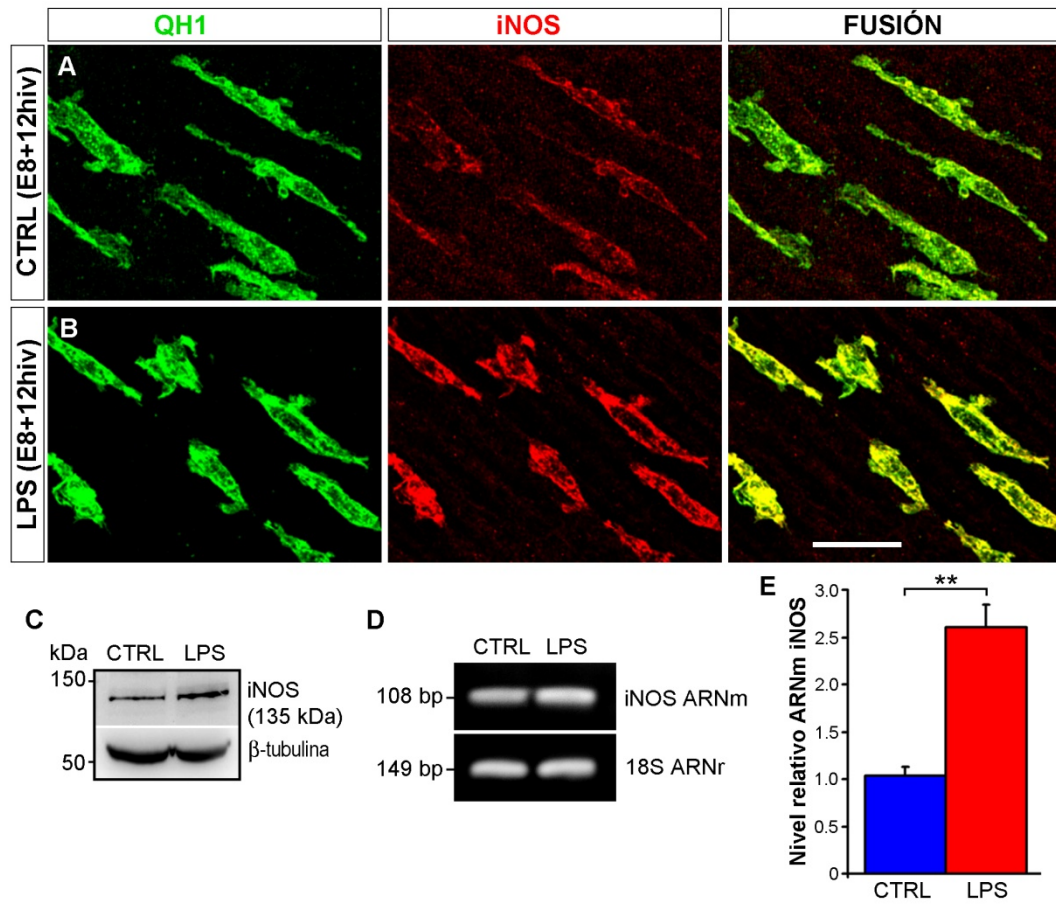
Teniendo en cuenta la elevada expresión de iNOS que tienen las células microgliales en la retina de E8 *in situ* (Fig. 15A, B, 17 y 22) y considerando que la producción de ROS, pero no de anión  $O_2^-$ , se incrementaba en la microglía de ERECs de E8+12hiv tras el tratamiento con LPS (Fig. 38), este tiempo de cultivo era seleccionado para analizar las posibles diferencias de expresión de iNOS por células microgliales entre explantes tratados con LPS y sus controles no tratados (Fig. 39). El doble marcaje inmunocitoquímico de montajes totales de ERECs de E8+12hiv con anti-iNOS y QH1 mostraba que hay una mayor expresión de iNOS en las células microgliales de los explantes tratados con LPS que en la microglía de los explantes control (compárese A con B en Fig. 39). El estudio con western blot de lisados de explantes de retina mostraba que, en efecto, la banda de 135 kD, correspondiente a la proteína iNOS, aparecía con más intensidad en los extractos obtenidos de explantes tratados con LPS que en los de explantes control (Fig. 39C). Además, la determinación de la expresión del ARNm de iNOS mediante RT-PCR demostraba que el nivel de ARNm de iNOS en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS era más de dos veces superior al encontrado en los controles no tratados (Fig. 39D, E), reflejando un aumento de la regulación del gen de iNOS como consecuencia del tratamiento con LPS.

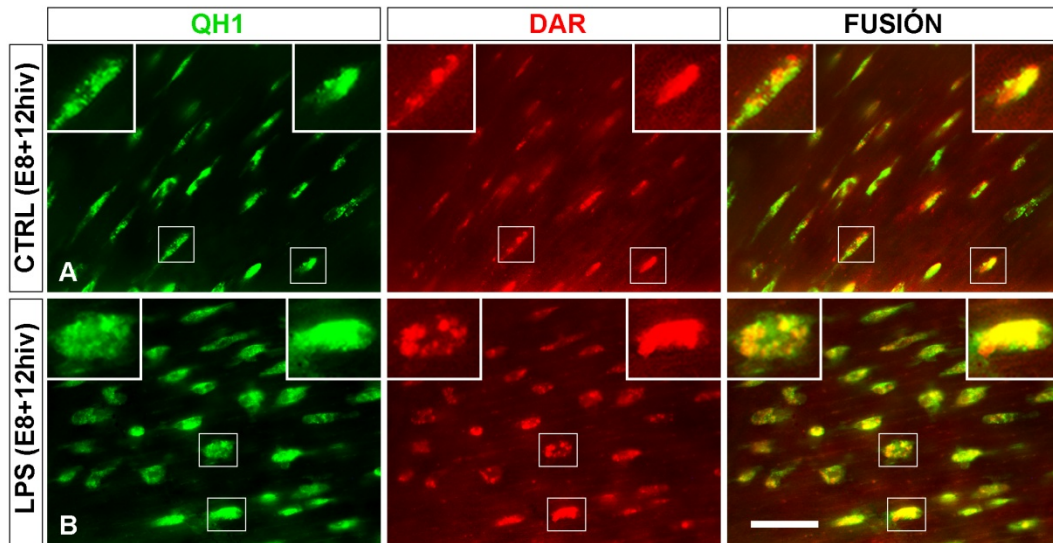
Por otra parte, teniendo en cuenta que el DAR-4M AM es un indicador fluorescente de la producción de óxido nítrico por la iNOS (Kojima et al., 2001; Pandit et al., 2009), se utilizaron montajes totales de ERECs de E8+12hiv doblemente marcados con DAR-4M AM y QH1-AF488 con el fin de demostrar la producción de óxido nítrico por células microgliales en explantes tratados con LPS y en sus controles (Fig. 40). La fluorescencia roja de DAR-4M AM era detectada en las células microgliales (con fluorescencia verde de QH1-AF488), tanto en las de morfología alargada de los explantes control no tratados (Fig. 40A) como en las activadas, de aspecto redondeado, de los explantes tratados con LPS (Fig. 40B). Estas observaciones demostraban que la microglía no sólo contenía la

enzima iNOS sino que ésta era funcional y producía óxido nítrico. No se detectaba fluorescencia de DAR-4M AM en células no marcadas con QH1, tanto de explantes tratados con LPS como de explantes control, demostrando que la producción de óxido nítrico era específica de las células microgliales. La apariencia morfológica del área citoplasmática marcada con DAR-4M AM era variable. Así, algunas células microgliales mostraban una masa DAR-4M AM-positiva que ocupaba todo el soma de la célula (recuadros a la derecha de cada imagen en Fig. 40), mientras que otras células contenían diversos cuerpos DAR-4M AM-positivos de diferentes tamaños (recuadros a la izquierda de cada imagen en Fig. 40). En cualquier caso, la apariencia del marcaje fluorescente con DAR-4M AM en la microglía era diferente al del marcaje con QH1. Aunque no se pudo hacer un estudio cuantitativo del marcaje DAR-4M AM por las dificultades inherentes de la técnica (rápida pérdida de la fluorescencia), numerosas células microgliales activadas de los explantes tratados con LPS parecían mostrar mayor intensidad de fluorescencia DAR-4M AM que la mayoría de células microgliales alargadas de los controles no tratados. Estas observaciones sugerían que la mayor activación microglial inducida por el tratamiento con LPS incrementaba la cantidad de óxido nítrico producido por las células microgliales, en concordancia con el incremento en la expresión de iNOS, previamente descrito en los explantes tratados con LPS (Fig. 39).

En conjunto, los anteriores resultados demostraban que el tratamiento con LPS de ERECs de E8+12hiv induce un aumento del grado de activación de la microglía ameboide que ocasiona un significativo incremento de la expresión de iNOS y la consiguiente elevación en la producción de óxido nítrico.

**Fig. 39. Las células microgliales incrementan la expresión de iNOS tras el tratamiento de los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) con LPS.** **A, B:** Imágenes confocales (proyecciones máximas) de células microgliales en montajes totales, doblemente inmunomarcados con los anticuerpos QH1 (verde) y anti-iNOS (rojo), de sendos ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 12 horas *in vitro* (E8+12hiv) en ausencia (**A**, CTRL) o presencia (**B**, LPS) de LPS. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales verde (izquierda) y rojo (centro) y tras la fusión de ambos canales (derecha). El inmunomarcaje con anti-iNOS es manifiestamente más intenso en el explante tratado con LPS que en el control. Barra de escala, 25  $\mu$ m. **C:** Análisis mediante western blot de los niveles de la proteína iNOS en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS (LPS) y en sus controles no tratados (CTRL). Las bandas mostradas son representativas de las obtenidas en tres experimentos independientes. La banda de 135 kDa, que corresponde a la proteína iNOS, es notablemente más intensa en explantes tratados con LPS que en explantes control. El anticuerpo  $\beta$ -tubulina se ha usado como control de carga. **D:** Gel representativo de tres experimentos independientes de electroforesis en gel de agarosa del ARNm de iNOS, que muestra una banda más intensa en los ERECs de E8+12hiv tratados con LPS (LPS) que en los explantes control (CTRL). El ARNr 18S se ha utilizado como control interno de expresión. **E:** Análisis cuantitativo de la expresión del ARNm de iNOS mediante RT-PCR. El diagrama de barras representa el nivel relativo del ARNm de iNOS en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS con respecto al nivel obtenido en explantes control no tratados (CTRL). Los datos se expresan como medias ( $\pm$  error estándar) obtenidas en tres experimentos diferentes de RT-PCR. El nivel del ARNm de iNOS en los explantes tratados con LPS es significativamente más elevado que el hallado en los controles no tratados (\*\*  $P < 0,01$ , test t de Student), alcanzando un valor de más del doble.





**Fig. 40.** Las células microgliales de explantes de retina de embriones de codorniz (ERECs) de 8 días de incubación cultivados durante 12 horas *in vitro* (E8+12hiv) producen óxido nítrico. Imágenes de células microgliales ameboides obtenidas en montajes totales de sendos ERECs de E8+12hiv cultivados en ausencia (A, CTRL) o presencia (B, LPS) de LPS, ambos tratados durante la última hora de cultivo con la sonda fluorescente DAR-4M AM (DAR, rojo), que es un marcador de la producción subcelular de óxido nítrico, y el anticuerpo QH1 conjugado con Alexa Fluor 488 (QH1, verde), para identificar la microglía. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales verde (izquierda) y rojo (centro) y tras la fusión de ambos canales (derecha). Las células encuadradas en cada micrografía se observan a mayor aumento en los recuadros de la parte superior de la misma. Nótese que todas las células microgliales están específicamente marcadas con DAR, tanto en el explante tratado con LPS como en el explante control. Algunas células microgliales muestran fluorescencia roja del DAR en todo el soma (recuadros en la parte superior derecha de cada micrografía), mientras que otras células muestran un soma que contiene varias masas DAR-positivas de tamaño variable (recuadros en la parte superior izquierda de cada micrografía). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ ; 20  $\mu\text{m}$  para los recuadros.



### **La inhibición de iNOS con L-NMMA rescata de la muerte a un número significativo de células ganglionares en ERECs de E8+12hiv tratados con LPS**

Los resultados descritos anteriormente demostraban que la sobreactivación de las células microgliales con LPS en ERECs de E8 produce un incremento significativo de la expresión de iNOS en la microglía, así como un incremento del porcentaje de células ganglionares apoptóticas contactadas por células microgliales y un aumento de la muerte de células ganglionares. Estos resultados sugerían que el tratamiento con LPS de los explantes podría desencadenar la muerte de células ganglionares mediante un mecanismo promovido por la fagocitosis microglial, con la intervención del óxido nítrico. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron experiencias de inhibición de iNOS con L-NMMA, que se añadía al medio de cultivo, junto con LPS, desde el inicio de cada experimento.

En primer lugar se estudió si el L-NMMA producía algún cambio en la morfología de las células microgliales activadas con LPS en ERECs de E8+12hiv. Los resultados de esta experiencia mostraban que el aspecto morfológico de las células microgliales de explantes tratados con LPS no sufría cambios apreciables tras el tratamiento adicional con L-NMMA, manteniendo la morfología típica de las células microgliales activadas, es decir una apariencia más redondeada, con escasas y cortas prolongaciones celulares (Fig. 41). Estas observaciones parecían indicar que el L-NMMA no revertía la activación microglial inducida por el tratamiento de los explantes con LPS. Sin embargo, otros experimentos demostraban que el tratamiento de ERECs de E8+12hiv con L-NMMA inhibía significativamente la producción de ROS por la microglía (Fig. 42). En estos experimentos, se analizaban mediante citometría de flujo suspensiones celulares obtenidas a partir de explantes marcados con carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA y QH1-AF594, examinando ERECs tratados simultáneamente con LPS y L-NMMA, así como sus controles tratados exclusivamente con LPS. Nuestros resultados demostraban que el porcentaje de células microgliales (QH1-positivas) productoras de ROS (carboxi-DCF-positivas) disminuía significativamente (más de un 60%) en los

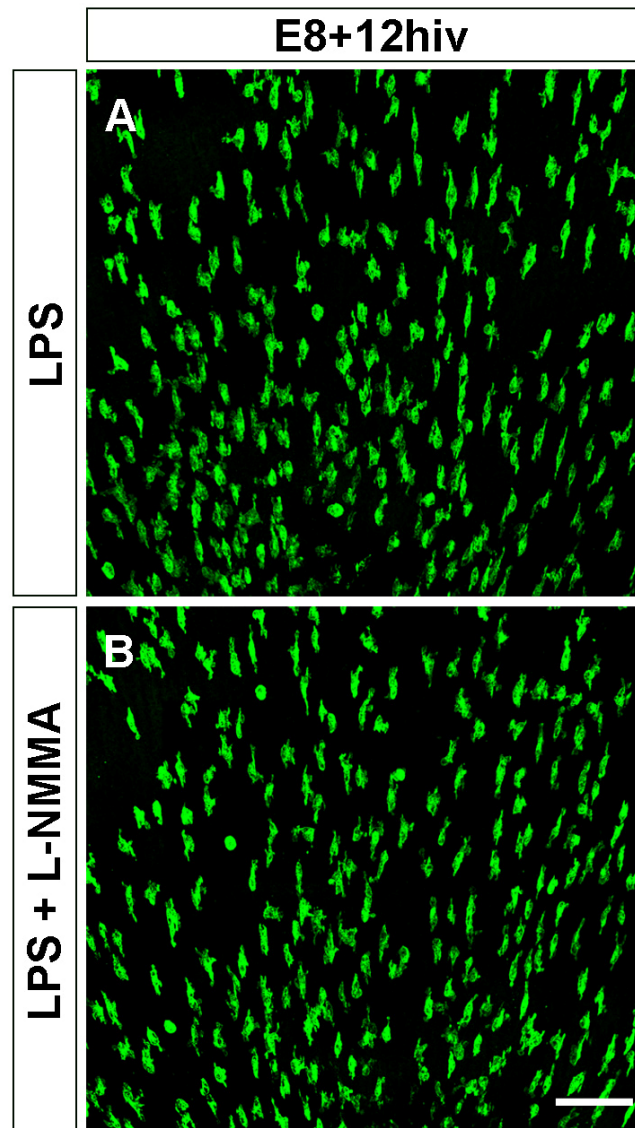
ERECs tratados con LPS y L-NMMA en relación a sus controles tratados únicamente con LPS (Fig. 42). Por lo tanto, se podía concluir que, a pesar de no revertir los cambios morfológicos de las células microgliales sobreactivadas por efecto del LPS, el L-NMMA sí inducía una fuerte disminución de la producción de ROS en dichas células, como parece lógico si se tiene en cuenta el efecto inhibitor de NOS del L-NMMA.

Seguidamente se estudió el efecto del tratamiento con L-NMMA sobre el porcentaje de neuronas retinianas que están en fases tempranas de apoptosis (que sufren externalización de la fosfatidilserina). Para ello, se usaron ERECs de E8+12 hiv cultivados sólo con LPS (controles) o con LPS y L-NMMA, que se marcaban con anexina V-EGFP y QH1-AF594, según la metodología descrita con anterioridad. El análisis de estos explantes con citometría de flujo mostraba que el porcentaje de neuronas apoptóticas anexina V-positivas descendía significativamente desde un 32% en los explantes tratados solo con LPS hasta un 13% en los explantes tratados simultáneamente con LPS y L-NMMA (Fig. 43A). Esta diferencia en los porcentajes de neuronas anexina V-positivas era similar a la existente entre explantes tratados con LPS y explantes control no tratados (Fig. 43B). Con el objetivo de estudiar si el inhibidor L-NMMA tenía algún efecto sobre la apoptosis temprana de las neuronas en ausencia de estimulación microglial con LPS, también se hicieron experiencias de citometría de flujo en las que se comparaba el porcentaje de neuronas anexina V-positivas en explantes tratados exclusivamente con L-NMMA con el obtenido en sus controles sin ningún tipo de tratamiento. Estas experiencias revelaban que no había diferencias significativas entre ambos (Fig. 43C), demostrando que el inhibidor de NOS sólo tenía efecto sobre la apoptosis neuronal temprana cuando las células microgliales se habían activado con LPS. En conjunto, los resultados obtenidos en las experiencias de marcaje de ERECs con anexina V indicaban que el tratamiento con L-NMMA conseguía revertir los efectos del LPS sobre la muerte de neuronas retinianas, rescatando de la apoptosis a un porcentaje de neuronas similar al de neuronas inducidas a morir por efecto del LPS.

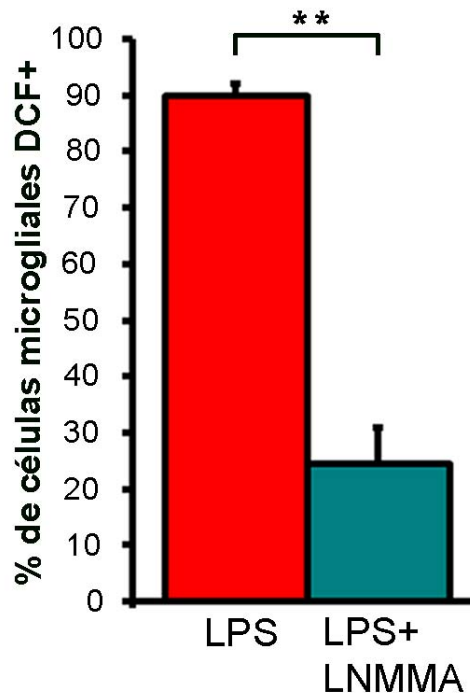
Teniendo en cuenta que el tratamiento con L-NMMA parecía estar rescatando de la muerte a numerosas neuronas retinianas en los ERECS de E8+12hiv tratados con LPS, era lógico suponer que la población neuronal de la retina debería de estar incrementada 12 hiv más tarde, es decir en ERECs de E8+24hiv. Con esta premisa, se realizaron experimentos para analizar el efecto del L-NMMA sobre la población de neuronas Islet-1-positivas (entre las que se encuentran las células ganglionares), que descendía tras el tratamiento con LPS, como habíamos demostrado con anterioridad (Fig. 34). En estos experimentos se utilizaron explantes de E8+24hiv tratados con LPS y L-NMMA y explantes control tratados exclusivamente con LPS, los cuales se marcaban con anti-Islet-1 y se analizaban mediante citometría de flujo siguiendo la metodología descrita anteriormente. El porcentaje de neuronas Islet-1-positivas aumentaba alrededor de un 10% en explantes tratados con LPS y L-NMMA en relación a los tratados exclusivamente con LPS (Fig. 44). Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento con L-NMMA de ERECs de E8+24 hiv lograba recuperar una parte significativa de la población de neuronas Islet-1-positivas que habían desaparecido a consecuencia del tratamiento con LPS (compárense Figs. 34 y 44).

Puesto que una subpoblación de neuronas Islet-1-positivas corresponde a células ganglionares, se analizó si este tipo de neuronas retinianas estaban incluidas entre las neuronas Islet-1-positivas rescatadas de la muerte inducida por LPS tras el tratamiento con L-NMMA. Con este fin, se cuantificaron los fragmentos apoptóticos TUNEL-positivos (etapas avanzadas de la apoptosis) en la CCG de montajes totales de ERECs de E8+24hiv tratados sólo con LPS (controles) o con LPS y L-NMMA. El análisis del área relativa ocupada por dichos fragmentos apoptóticos (proporcional al número de células apoptóticas) revelaba que la muerte de células ganglionares en los explantes tratados con LPS y L-NMMA (área relativa de 6%) era significativamente menor que en los controles tratados sólo con LPS (área relativa de 13%, Fig. 45A), alcanzando valores similares a los observados en explantes sin tratamiento alguno (área relativa de 7%, Fig. 45B).

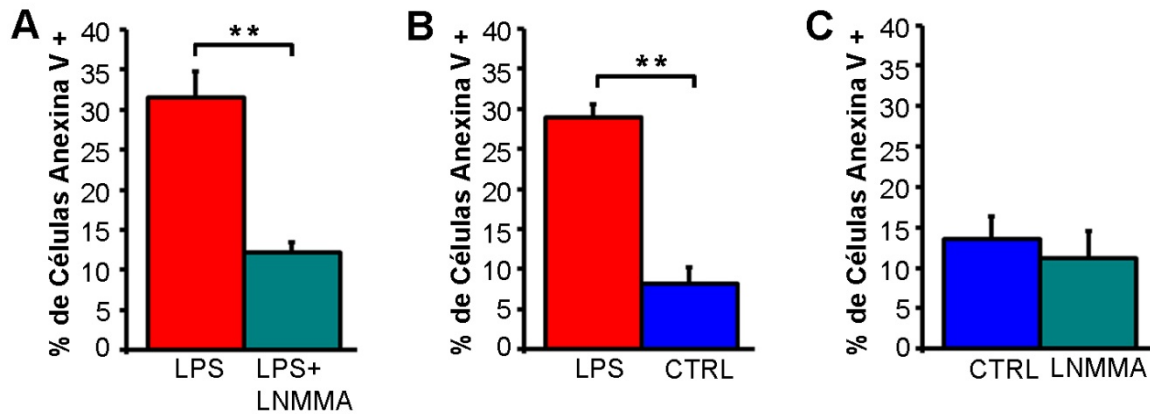
En conjunto, los resultados de las experiencias de inhibición de iNOS con L-NMMA apoyan que el óxido nítrico producido por la iNOS microglial podría ser la principal molécula implicada en el aumento de la muerte de células ganglionares inducido por LPS en ERECs de E8+24hiv. Así, el LPS promovería la sobreactivación de las células microgliales ameboides (que ya tenían un nivel basal de activación), incrementando la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico en las mismas, el cual actuaría sobre las células ganglionares, induciendo la muerte de un número significativo de ellas. Esta idea es compatible con la existencia de un mecanismo de muerte celular promovida por fagocitosis microglial, descrito en otros sistemas experimentales (Brown y Neher, 2012, 2014; Cunningham et al., 2013).



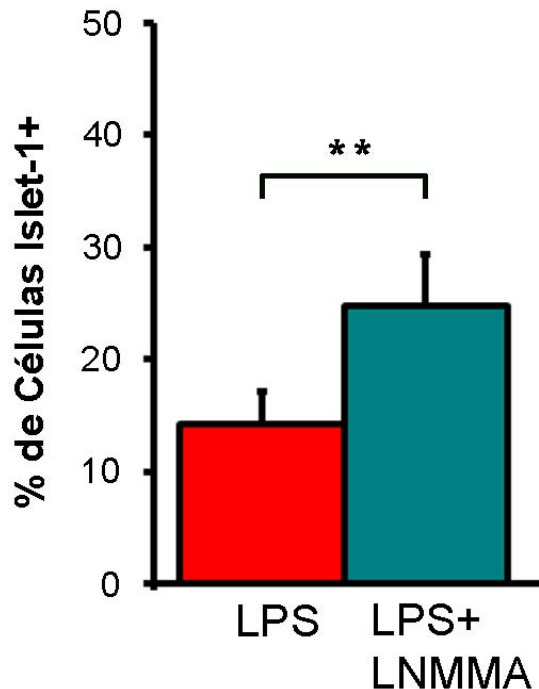
**Fig. 41.** El inhibidor de óxido nítrico sintasas L-NMMA no revierte el fenotipo activado de las células microgliales inducido por LPS en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs). Imágenes confocales (proyecciones máximas) de células microgliales inmunomarcadas con QH1 en montajes totales de ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 12 horas *in vitro* (E8+12hiv) en presencia de LPS (A, LPS) y de LPS más L-NMMA (B, LPS+L-NMMA). La morfología de las células microgliales del explante tratado con LPS+L-NMMA es similar a la mostrada en el explante tratado exclusivamente con LPS. En ambos casos, la microglía ameboide exhibe una morfología ligeramente redondeada, característica de un fenotipo activado, que difiere de la morfología alargada que estas células muestran en ERECs cultivados en ausencia de LPS (ver Figs. 24B, 25 y 26B). Barra de escala: 100  $\mu$ m.



**Fig. 42. El L-NMMA induce una fuerte disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células microgliales de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) tratados con LPS.** El diagrama de barras muestra los resultados del análisis mediante citometría de flujo de células microgliales productoras de ROS en ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 12 horas *in vitro* (E8+12hiv) en presencia de LPS y L-NMMA (LPS+LNMMMA) y en sus controles tratados exclusivamente con LPS. Ambos tipos de explantes han sido tratados durante la última hora de cultivo con la sonda carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA, que se convierte en carboxi-DCF en presencia de ROS, y el anticuerpo QH1 conjugado con Alexa Fluor 594 (QH1-AF594), para identificar la microglía. Las barras representan los porcentajes medios ( $\pm$  error estándar) de células microgliales (QH1-AF594-positivas) productoras de ROS (carboxi-DCF-positivas) obtenidos tras el análisis de 6 ERECs de E8+12hiv tratados con LPS y L-NMMA (barra verde) y sus correspondientes controles tratados exclusivamente con LPS (barra roja). Nótese que el porcentaje de células microgliales carboxi-DCF-positivas en los explantes tratados con LPS es del 90% y este porcentaje se reduce significativamente (\*\*  $P < 0,01$ , test t de Student) hasta alrededor del 25% en los explantes tratados con LPS y L-NMMA.

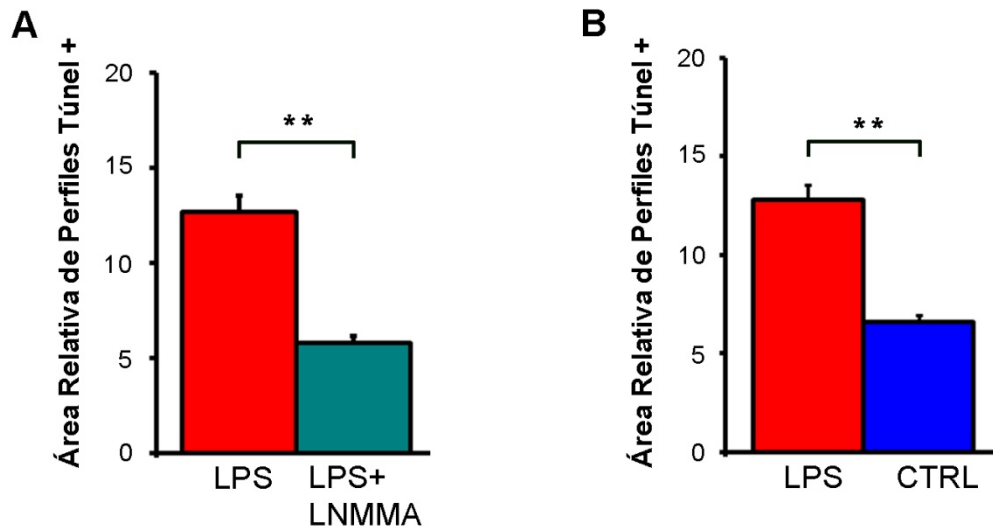


**Fig. 43. El porcentaje de neuronas anexina V-positivas presentes en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) tratados con LPS sufre una fuerte disminución tras la inhibición de las óxido nítrico sintasas con L-NMMA.** Los diagramas de barras muestran los porcentajes de neuronas anexina V-positivas determinados mediante análisis de citometría de flujo en tres tipos de experiencias (A-C) en las que ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 12 horas *in vitro* (E8+12hiv) han sido sometidos a diferentes tratamientos. Las barras representan los porcentajes medios ( $\pm$  error estándar) de neuronas anexina V-positivas, los cuales se han comparado mediante el test t de Student para determinar la existencia de diferencias significativas (\*\*  $P < 0,01$ ). **A:** Porcentajes medios de neuronas anexina V-positivas obtenidos en 6 ERECs de E8+12hiv tratados con LPS y L-NMMA (barra verde, LPS+LNMMA) y en sus controles tratados exclusivamente con LPS (barra roja, LPS). Las neuronas anexina V-positivas disminuyen significativamente desde un 32% tras el tratamiento con LPS hasta un 13% tras el tratamiento con LPS y L-NMMA. **B:** Porcentajes medios de neuronas anexina V-positivas obtenidos en 6 ERECs de E8+12hiv tratados con LPS (barra roja, LPS) y en sus controles no tratados (barra azul, CTRL). Las neuronas anexina V-positivas alcanzan el 8% en los controles no tratados y este porcentaje se eleva significativamente hasta el 29% tras el tratamiento con LPS. **C:** Porcentajes medios de neuronas anexina V-positivas obtenidos en 6 ERECs de E8+12hiv tratados exclusivamente con L-NMMA (barra verde, LNMMA) y en sus controles no tratados (barra azul, CTRL). El tratamiento con L-NMMA no altera significativamente el porcentaje de neuronas anexina V-positivas en relación con los controles no tratados.



**Fig. 44.** El porcentaje de células Islet-1-positivas presentes en explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) tratados con LPS se incrementa por efecto del tratamiento con L-NMMA. Porcentajes medios ( $\pm$  error estándar) de células Islet-1-positivas determinados mediante análisis de citometría de flujo en 11 ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en presencia de LPS y L-NMMA (barra verde, LPS+LNMMA) y en sus controles tratados exclusivamente con LPS (barra roja, LPS). Los explantes han sido inmunomarcados con el anticuerpo 39.4D5 (anti-Islet-1), el cual se ha revelado con anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488, antes de obtener las correspondientes suspensiones celulares para el análisis con citometría de flujo. El porcentaje de neuronas anexina V-positivas es significativamente más elevado (aproximadamente un 10%, \*\*  $P < 0,01$ , test t de Student) en los explantes tratados con LPS y L-NMMA que en los tratados exclusivamente con LPS.





**Fig. 45.** Los cuerpos TUNEL-positivos presentes en la capa de células ganglionares (CCG) de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) tratados con LPS disminuyen por efecto del tratamiento con L-NMMA. Los diagramas de barras comparan las áreas relativas de perfiles TUNEL-positivos halladas en la CCG de ERECs de 8 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en presencia de LPS (barras rojas en **A** y **B**, LPS) con las obtenidas en explantes tratados con LPS y L-NMMA (**A**, barra verde, LPS+LNMMA) y en explantes no sometidos a ningún tratamiento (**B**, barra azul, CTRL). Las barras representan medias ( $\pm$  error estándar) de los porcentajes de píxeles TUNEL-positivos respecto del total de píxeles (área relativa) medidos en tres áreas de  $240 \times 240 \mu\text{m}$  de la CCG de montajes totales de 8 ERECs tratados con LPS y L-NMMA, con sus correspondientes controles tratados exclusivamente con LPS (**A**), y de otros 17 ERECs tratados con LPS, con sus respectivos controles no tratados (**B**). El área relativa de perfiles TUNEL-positivos está en torno a 13 en explantes tratados exclusivamente con LPS (**A**, **B**) y se reduce significativamente a la mitad (\*\*  $P < 0,01$ , test t de Student) en explantes tratados con LPS y L-NMMA (**A**), alcanzando un valor de alrededor de 6, similar al obtenido en los controles no tratados (**B**).



## **Discusión**

---



Los resultados de nuestra investigación se pueden resumir en tres puntos básicos. 1) En primer lugar, se demuestra que la microglía ameboide expresa iNOS y produce óxido nítrico durante el desarrollo embrionario normal de la retina de codorniz. Dada la asociación entre la expresión de iNOS y la activación microglial (Brown y Neher, 2010; Garden y Möller, 2006; Saha y Pahan, 2006), estos resultados sugieren que la microglía ameboide tiene un cierto grado de activación (activación basal) durante el desarrollo normal. La expresión de iNOS disminuye cuando la microglía ameboide se diferencia en microglía ramificada, lo que indica que la activación basal se va reduciendo durante el proceso de diferenciación microglial. 2) También demostramos que el tratamiento *in vitro* con LPS de cultivos organotípicos de ERECs de E8 induce importantes cambios en la microglía ameboide, la cual se redondea, incrementa la extensión de su compartimento lisosómico y aumenta la expresión de iNOS, con el consecuente aumento de la producción de óxido nítrico. De estos resultados se puede concluir que la microglía ameboide de ERECs aumenta su nivel de activación en respuesta a la acción del LPS. 3) Otro aspecto destacable de nuestro estudio en ERECs de E8 cultivados *in vitro* es la demostración de que la sobreactivación de la microglía ameboide con LPS provoca un incremento de la muerte de células ganglionares y una disminución de su número, así como un aumento de los contactos fagocíticos de la microglía con células ganglionares. Estos resultados indican que la microglía sobreactivada induce la muerte de células ganglionares mediante un mecanismo compatible con el de la muerte inducida por fagocitosis microglial. El inhibidor de NOS L-NMMA rescata de la muerte inducida por LPS a una proporción significativa de células ganglionares, sugiriendo la participación de ROS, fundamentalmente óxido nítrico, en dicho mecanismo de muerte.

### **Expresión de iNOS y producción de óxido nítrico por la microglía ameboide de la retina de codorniz**

El presente estudio demuestra inequívocamente que la microglía ameboide de la retina normal de embriones de codorniz de E8 y E9, que se encuentra

migrando tangencialmente en la CFN, expresa iNOS y produce óxido nítrico. Esta conclusión está apoyada en el hecho de que la microglía ameboide se marca específicamente mediante inmunocitoquímica con anticuerpos policlonales frente a iNOS de ratón, los cuales muestran reactividad para la iNOS de pollo, según las especificaciones del fabricante. Se podría argumentar que los anticuerpos anti-iNOS pueden reaccionar de forma cruzada con un antígeno distinto de la iNOS, como consecuencia de la heterogeneidad de los anticuerpos policlonales. Sin embargo, la expresión de iNOS en la microglía ameboide de la retina en desarrollo de codorniz se ha visto confirmada por los resultados de otras tres investigaciones. En primer lugar, el análisis del ARNm de iNOS mediante RT-PCR revela la expresión de iNOS en retinas normales en desarrollo. Esta iNOS presumiblemente corresponde a células microgliales, ya que la NOS expresada por neuronas es generalmente la nNOS (Förstermann y Sessa, 2012). En segundo lugar, los experimentos *in vitro* utilizando cultivos organotípicos de ERECs de E8+24hiv revelan que la microglía ameboide aumenta la expresión de iNOS en respuesta al tratamiento con LPS, ya que en ellos se demuestra un aumento del marcaje con el anticuerpo anti-iNOS, un mayor contenido de proteína iNOS detectada por Western blot y un aumento de los niveles de mRNA de iNOS observados mediante RT-PCR. En tercer lugar, el uso de la sonda fluorescente DAR-4M AM también ha demostrado que la microglía produce óxido nítrico, que es la molécula catalizada por la acción de iNOS. Dicha sonda es un indicador fiable de la producción de óxido nítrico (Kojima et al., 2001; Pandit et al., 2009) y ha sido ampliamente utilizada en numerosos estudios (Ikeda et al., 2006; Imura et al., 2005; Siamwala et al., 2010, 2012). Por lo tanto, el marcaje específico con DAR- 4M AM de las células microgliales puede ser considerado una prueba concluyente de la expresión de iNOS en la microglía ameboide normal. En nuestro estudio, el DAR- 4M AM se ha utilizado en explantes de retina E8+12hiv para evitar los problemas técnicos inherentes a su uso *in vivo*. Dado el comportamiento fisiológico de las células microgliales en ERECs de E8 cultivados hasta 24 hiv (Carrasco et al., 2011), la producción de óxido nítrico por

la microglía en estos explantes parece ser representativa de la que tiene lugar *in vivo*. Además, el aumento de la expresión de iNOS en respuesta al tratamiento con LPS proporciona evidencias indirectas de dicha expresión en la microglía ameboide de la retina normal. Este aumento de la expresión de iNOS es coherente con el efecto del LPS documentado en otros sistemas (Bal-Price y Brown, 2001; Béchade et al., 2014; Di Penta et al., 2013; Wen et al., 2011) y ha sido demostrado en nuestro estudio de forma inequívoca mediante inmunocitoquímica con anti-iNOS, Western blot, RT-PCR cuantitativa y detección de óxido nítrico con DAR-4M AM, validando así el procedimiento técnico utilizado para demostrar la expresión de iNOS en las células microgliales de retinas *in vivo*.

Los resultados de la expresión de iNOS en la microglía ameboide durante el desarrollo normal de la retina choca con la visión extensamente aceptada de que iNOS sólo se expresa en la microglía durante situaciones patológicas, en respuesta a factores pro-inflamatorios de diversa naturaleza (Brown y Neher, 2010; Förstermann y Sessa, 2012; Govers y Oess, 2004; Pacher et al., 2007). Sin embargo, la expresión de iNOS también se ha descrito en la retina humana adulta normal (Park et al., 1994). En la retina de aves, el estudio de Ientile et al. (1996) mostraba elevados niveles de actividad de NOS en retinas de embriones de pollo de E8-E9, que disminuían con el avance del desarrollo. Actualmente se sabe que una gran variedad de neuronas de la retina de pollo expresan nNOS durante el desarrollo y en la edad adulta (Fischer y Stell, 1999; Goureau et al., 1997; Ríos et al., 2000; Tekmen-Clark y Gleason, 2013; Wilson et al., 2011), mientras que la eNOS está presente en ciertas poblaciones neuronales y células de Müller (Goureau et al., 1997; Haverkamp et al., 1999). En cuanto a la expresión de iNOS, no se había descrito hasta el presente en ningún tipo celular de la retina normal de aves, pero nuestros resultados demuestran que tiene lugar en la microglía de la retina normal de codorniz, principalmente durante el desarrollo. Diversos estudios han sugerido que la iNOS también se expresa en el SNC normal de mamíferos. Así, Bertini et al. (1996) utilizaban la técnica histoquímica con NADPH-diaforasa para demostrar actividad de NOS en la microglía ameboide durante el desarrollo

postnatal del cuerpo calloso y las cápsulas interna y externa de la rata. Estos autores sugerían que dicha actividad de NOS se podría atribuir a la iNOS, ya que la microglía no mostraba inmunomarcaje con nNOS. Sin embargo, un reciente estudio indicaba que la iNOS apenas se detecta en células microgliales del cuerpo calloso de ratones postnatales transgénicos que expresan la proteína fluorescente tdTomato y la recombinasa CRE bajo el control de las regiones reguladoras del gen de iNOS (Béchade et al., 2014). Por otra parte, la expresión de iNOS se ha observado recientemente en la microglía ameboide de la corteza cerebral normal de ratas prenatales (Cunningham et al., 2013) y en el cerebro de ratones postnatales de 3 días (Crain et al., 2013). La expresión constitutiva de iNOS también se ha descrito en otros tipos celulares del cerebro normal de ratón, tales como neuronas olfatorias durante etapas tempranas del desarrollo embrionario (Arnhold et al., 1997) y otras neuronas dispersas en diversas regiones cerebrales (Béchade et al., 2014). En resumen, diferentes estudios en el SNC de mamíferos y los resultados de la presente investigación en la retina de codorniz demuestran que la iNOS se puede expresar de forma constitutiva en diferentes tipos celulares del SNC, incluyendo la microglía, tanto durante el desarrollo como en la edad adulta.

El óxido nítrico sintetizado por la acción de la iNOS en la microglía ameboide podría jugar diferentes papeles fisiológicos en el desarrollo de la retina normal. Por ejemplo, se ha propuesto que el óxido nítrico producido por algunos tipos celulares no microgliales durante el desarrollo de la retina de pollo (Goureau et al., 1997; Ríos et al., 2000) participa en funciones que contribuyen al desarrollo del SNC, tales como regulación de la sinaptogénesis y refinamiento de circuitos neuronales (Contestabile, 2000; Imura et al., 2005; Nikonenko et al., 2008; Ogilvie et al., 1995). Otros estudios han demostrado que el óxido nítrico puede actuar como un agente antiproliferativo que controla el balance entre proliferación y diferenciación neuronal durante el desarrollo del SNC (Contestabile, 2000; Kuzin et al., 1996; Peunova y Enikolopov, 1995). Además, la nitración de proteínas, a la que contribuye el óxido nítrico, juega un papel importante en la diferenciación neuronal (Cappelletti et al., 2004; Okamoto y Lipton, 2014). Por



otra parte, un reciente estudio *in vitro* llevado a cabo en rebanadas de cerebelo de ratas ha demostrado que los oligodendrocitos son dianas del óxido nítrico fisiológico, el cual favorece el crecimiento y maduración oligodendroglial, ayudando a coordinar la mielinización axónica durante el desarrollo y contribuyendo a cambios adaptativos de la mielinización durante la edad adulta (Garthwaite et al., 2015). La retina de aves contiene oligodendrocitos que participan en la mielinización de axones de células ganglionares (Gotoh et al., 2011; Kim et al., 2012; Ono et al., 1998; Rompani y Cepko, 2010). Además, durante el desarrollo embrionario de la retina de codorniz, existe una estrecha relación topográfica entre las células microgliales y los oligodendrocitos cuando ambos se encuentran migrando en la CFN (observaciones no publicadas). Estas observaciones son compatibles con la idea de que el óxido nítrico liberado por la microglía en la retina embrionaria de codorniz podría favorecer la diferenciación de los oligodendrocitos y la mielinización axónica. Por todo lo anteriormente expuesto, no resulta descabellado pensar que el óxido nítrico liberado por la microglía durante el desarrollo de la retina de codorniz pudiera contribuir mediante mecanismos paracrinos a una variedad de funciones decisivas para el desarrollo retiniano, tales como sinaptogénesis y diferenciación neuronal y oligodendroglial. No obstante, esta hipótesis es una idea especulativa que necesitaría ser confirmada experimentalmente, ya que el presente estudio tan solo demuestra la expresión constitutiva de iNOS y la producción de óxido nítrico en la microglía de la retina de codorniz.

El óxido nítrico producido por la iNOS microglial también podría estar relacionado con la muerte neuronal natural que tiene lugar durante el desarrollo de la retina de embriones de codorniz desde E7 en adelante (Marín-Teva et al., 1999c), ya que ésta coincide cronológicamente con el fuerte inmunomarcaje de iNOS en las células microgliales ameboides. En apoyo de esta idea, estudios *in vitro* han demostrado que la microglía puede inducir la muerte neuronal por un mecanismo en el que participa el óxido nítrico (Gibbons y Dragunov, 2006; Li et al., 2013; Lijia et al., 2012). Además, el óxido nítrico también está implicado en la

muerte de bastones en cultivos *in vitro* de células retinianas (Goureau et al., 1999). Por otra parte, la muerte neuronal natural que tiene lugar durante el desarrollo del cerebelo y el hipocampo del ratón está mediada por la producción microglial de aniones  $O_2^-$  (Marín-Teva et al., 2004; Wakselman et al., 2008). Así, los posibles efectos apoptóticos del óxido nítrico microglial podrían estar mediados por el peroxinitrito, producido por la oxidación del óxido nítrico con aniones  $O_2^-$  (Bal-Price et al., 2002; Mander y Brown, 2005). Por lo tanto, el peroxinitrito producido por la liberación simultánea de óxido nítrico y aniones  $O_2^-$  en las células microgliales ameboides podría participar en el mecanismo de muerte neuronal natural durante el desarrollo de la retina de codorniz. En este sentido, el presente estudio demuestra que el incremento en la expresión de iNOS promovido por la sobreactivación microglial inducida por LPS, con la consiguiente producción de óxido nítrico, desempeña un importante papel en la muerte de células ganglionares en ERECs cultivados *in vitro*, tal como se discute más adelante. El óxido nítrico microglial también podría participar en la fagocitosis de restos de neuronas muertas durante el desarrollo de la retina. En apoyo de esta hipótesis, Kakita et al. (2013) han demostrado que el inhibidor de iNOS L-NMMA reduce la fagocitosis microglial inducida por citoquinas, mientras que el donante de óxido nítrico nitroprusiato sódico la favorece, indicando que la producción de óxido nítrico es clave en la regulación de la fagocitosis microglial.

Tampoco se puede descartar que el óxido nítrico contribuya al cese de la muerte neuronal en ciertas etapas del desarrollo de la retina, ya que estudios *in vitro* han demostrado su participación en la inhibición de la apoptosis neuronal (Estévez et al., 1998; Guimarães et al., 2001; Mejía-García y Paes-de-Carvalho, 2007; Socodato et al., 2013). Además, se ha propuesto que el óxido nítrico tiene efectos opuestos sobre la muerte neuronal dependiendo de su concentración (Brown, 2010; Saha y Pahan, 2006). Así, en etapas del desarrollo de la retina con mayor expresión de iNOS habría mayor concentración de óxido nítrico microglial que podría favorecer la muerte neuronal, mientras que cuando la expresión de

iNOS disminuye, la concentración de óxido nítrico sería menor y favorecería la supervivencia neuronal. En nuestro estudio se demuestra que el inmunomarcaje de la microglía con anti-iNOS es muy intenso durante estadios tempranos del desarrollo embrionario (E8 y E9) de la retina de codorniz y continúa estando presente en etapas más avanzadas del desarrollo embrionario (E14). Estas etapas del desarrollo coinciden con aquellas en las que tiene lugar la muerte natural programada de células ganglionares y neuronas de la CNI (Marín-Teva et al., 1999c). Durante el desarrollo post-eclosión (P4), la microglía sigue expresando iNOS pero el inmunomarcaje es mucho más débil, coincidiendo con el final del periodo de muerte neuronal en la retina. Por lo tanto, en la retina de codorniz se observa una coincidencia cronológica de la muerte neuronal programada con el fuerte inmunomarcaje de iNOS microglial y del cese de la muerte neuronal con el debilitamiento de dicho marcate. Esta coincidencia es compatible con la hipótesis de que la muerte neuronal pudiera estar mediada por una elevada concentración de óxido nítrico, mientras que una menor concentración favorecería el cese de la muerte, potenciando la supervivencia de las neuronas retinianas.

Junto a los posibles efectos paracrinos, el óxido nítrico microglial también podría tener efectos autocrinos sobre las propias células microgliales y jugar un papel en su migración y proliferación. La migración tangencial de la microglía, que tiene lugar en la retina embrionaria de codorniz desde E7 en adelante (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995), coincide cronológicamente con el fuerte inmunomarcaje de iNOS en las células microgliales demostrado en el presente estudio, lo que sugiere un papel del óxido nítrico en la migración tangencial de las células microgliales. Además, nuestros resultados revelan que este inmunomarcaje se debilita cuando la microglía cesa su migración tangencial y comienza a migrar radialmente hacia las capas plexiformes, coincidiendo con el inicio de su proceso de ramificación (Sánchez-López et al., 2004). La hipotética relación entre óxido nítrico y migración microglial se ve apoyada por el conocimiento de que esta molécula desempeña un papel en la migración de otros tipos celulares, como células endoteliales (Kawasaki et al., 2003; Murohara et al., 1999; Siamwala et

al., 2010) y neuronas del cerebelo (Arias-Salvatierra et al., 2011). Por otro lado, las células microgliales se dividen activamente mientras están migrando dentro de la retina (Marín-Teva et al., 1999a), coincidiendo con el fuerte inmunomarcaje de iNOS. Por lo tanto, la regulación de la proliferación microglial podría estar relacionada con la producción de óxido nítrico, sobre todo teniendo en cuenta que éste parece estar implicado en la proliferación microglial en el cerebro lesionado de ratas prenatales (Hao et al., 2001). Sin embargo, la coincidencia cronológica entre producción de óxido nítrico y migración/proliferación de microglía no prueba una relación causal entre ambos procesos y otros estudios serían necesarios para aclarar esta cuestión.

Aunque el inmunomarcaje de iNOS se debilita cuando las células microgliales se ramifican en las capas plexiformes de la retina, indicando que la expresión de iNOS disminuye en la microglía diferenciada, nuestros resultados de RT-PCR corroboran que dicha expresión continúa estando presente en la retina adulta (Fig. 22), sobre todo en las células microgliales alargadas de la CFN (Fig. 21). El papel del óxido nítrico producido por la iNOS microglial en la retina de la codorniz adulta es desconocido y requiere nuevas investigaciones, aunque podría sumarse al óxido nítrico producido por la nNOS expresada en una variedad de neuronas de la retina (Tekmen-Clark y Gleason, 2013; Wilson et al., 2011), contribuyendo a la fisiología normal de la retina mediante su participación en mecanismos moduladores de la transmisión sináptica en diferentes tipos neuronales de la retina (ver revisiones de Goldstein et al., 1996 y Socodato et al., 2013).

### **Activación de la microglía ameboide en respuesta al tratamiento con LPS**

La expresión de iNOS es considerada como uno de los principales marcadores de activación microglial (Bal-Price y Brown, 2001; Cherry et al., 2014; Chhor et al., 2013). Por lo tanto, la expresión de iNOS en la microglía ameboide, demostrada en la presente tesis y en otros estudios (Crain et al., 2013; Cunningham et al., 2013; Sierra-Martín et al., 2014), es indicativa de que las

células microgliales inmaduras muestran un cierto grado de activación durante el desarrollo normal. En sentido estricto, la activación microglial es un concepto reservado para la reacción defensiva de la microglía ramificada frente a diferentes estímulos patológicos en el SNC adulto. Se caracteriza por la adquisición de una morfología redondeada similar a la mostrada por los macrófagos, un aumento de su actividad proliferativa y de su capacidad fagocítica, la expresión de algunos receptores de superficie y la producción de diferentes factores potencialmente neurotóxicos o neurotróficos, tales como factores de crecimiento, citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , etc.), óxido nítrico y otras ROS (Hanisch y Kettenmann, 2007; Lynch, 2009; Sierra et al., 2013; Smith et al., 2012). Estos factores actúan en el microambiente que rodea a la microglía activada para restaurar la homeostasis del parénquima nervioso (Streit y Xue, 2009). La activación de la microglía madura en el cerebro adulto ha sido considerada por algunos autores como una recapitulación inversa de los acontecimientos que ocurren durante el desarrollo del cerebro (Zusso et al., 2012). En los últimos años, el término activación ha ampliado su sentido y se ha aplicado a la microglía ameboide inmadura presente en el SNC durante el desarrollo normal (Crain et al., 2013; Hristova et al., 2010; Rigato et al., 2011; Shigemoto-Mogami et al., 2014), siendo denominada activación constitutiva (Goings et al., 2006) o activación basal (Sierra-Martín et al., 2014). Sin embargo, la activación de la microglía ameboide es un proceso desencadenado por señales no patológicas presentes en el microambiente del SNC normal en desarrollo, las cuales estimulan la producción de factores similares a los liberados por la microglía activada del SNC adulto lesionado, tales como citoquinas, óxido nítrico y otras ROS, pero en unas concentraciones apropiadas para regular funciones específicas durante el desarrollo normal del SNC. Estos factores contribuyen a una variedad de procesos del desarrollo, tales como neurogénesis y oligodendrogénesis (Cunningham et al., 2013; Shigemoto-Mogami et al., 2014), sinaptogénesis (Arnoux et al., 2013; Schafer et al., 2012), supervivencia neuronal (Ueno et al., 2013) y muerte neuronal (Marín-Teva et al., 2004; Sedel et al., 2004; Wakselman et al., 2008). Adicionalmente, la microglía

ameboide en estado de activación basal es capaz de incrementar su nivel de activación, en respuesta a diferentes estímulos que producen un daño en el SNC inmaduro (Acarin et al., 1996; Czeh et al., 2011; Ferrazzano et al., 2013; Fiske y Brunjes, 2000; Fukui et al., 2006; Graeber et al., 1998; Hao et al., 2001; Hutton et al., 2008; Li et al., 2011; Manivannan et al., 2014; Sánchez-López et al., 2005; Sivakumar et al., 2011). Este aumento del grado de activación de las células microgliales ameboides, que hemos denominado sobreactivación (Sierra-Martín et al., 2014), incrementa su actividad fagocítica y proliferativa (Hao et al., 2001) y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Czeh et al., 2011; Deng et al., 2008; Ferrazzano et al., 2013; Fukui et al., 2006; Hristova et al., 2010; Li et al., 2011; Sivakumar et al., 2011), quimioquinas, como CSF-1 (Deng et al., 2009; Hao et al., 2001; Sivakumar et al., 2011), prostaglandinas (Li et al., 2010) y factores citotóxicos, como óxido nítrico (Chao et al., 1992; Hao et al., 2001). En la presente tesis, se utilizó el LPS para comprobar si la microglía ameboide podía ser sobreactivada y sobreexpresar iNOS en nuestro sistema experimental de cultivos de explantes de retina de E8. El tratamiento con LPS, tanto *in vivo* como *in vitro*, es uno de los procedimientos más utilizados para inducir la activación microglial (Block y Hong, 2007; Broderick et al., 2000; Calderó et al., 2009; Carter y Dick, 2003; Chang et al., 2001; Lehnardt et al., 2003; Lijia et al., 2012; Ling et al., 2006; Lund et al., 2006; Madore et al., 2013; Neher et al., 2011; Tremblay et al., 2013; Wang et al., 2011; Woo et al., 2008) y el consiguiente incremento en la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico (Béchade et al., 2014; di Penta et al., 2013; Ji et al., 2013; Kumar et al., 2014; Mander y Brown, 2005; Miyake et al., 2014; Possel et al., 2000; Sheng et al., 2011; Wen et al., 2011; Zhao et al., 2006). Además, el LPS también se ha utilizado en algunos estudios para inducir la sobreactivación de la microglía inmadura (Cunningham et al., 2013; Hristova et al., 2010; Hutton et al., 2008; Li et al., 2010). Los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento con LPS de los explantes cultivados de retina de E8 induce un aumento de la expresión de iNOS en la microglía ameboide, como se demuestra mediante

inmunomarcaje con el anticuerpo anti-iNOS, Western-blot y RT-PCR, lo cual indica que estas células se sobreactivan en respuesta al LPS.

La sobreactivación de la microglía ameboide en explantes de retina de E8 tratados con LPS fue corroborado por el análisis morfológico de las células microgliales, siguiendo criterios usados previamente en otros estudios (Cunningham et al., 2013; Ueno et al., 2013). Así, después del tratamiento con LPS, el índice de redondez celular de la microglía ameboide es significativamente mayor, mientras que el de elongación celular es significativamente menor, lo cual es compatible con un aumento de su nivel de activación. Además, el cambio morfológico de las células microgliales por efecto del LPS se produce de forma muy rápida, ya que desde la primera hora de cultivo se observan diferencias morfológicas respecto a los explantes control. Por otra parte, el índice de elongación de las células microgliales en explantes de E8 cultivados durante 24 hiv es muy similar al estimado en explantes de E9 sin cultivar, aunque sí se observan diferencias significativas en el área celular e índice de redondez de las células microgliales entre ambos tipos de explantes. Concretamente, el área celular es mayor y el índice de redondez menor en las células de los explantes de E9 no cultivados. Estas diferencias se deben a que las células microgliales de los explantes de E8 cultivados *in vitro* muestran lamelipodios menos numerosos y de menor extensión que las de los explantes de E9 sin cultivar, probablemente como consecuencia de una cierta reacción al método de cultivo. Un estudio anterior de nuestro laboratorio ya había demostrado una disminución similar en el número y extensión de lamelipodios en las células microgliales de explantes de retina de E9 cultivados *in vitro*, aunque a pesar de ello dichas células mantenían sus restantes caracteres fenotípicos, así como su comportamiento migratorio y su programa de diferenciación celular (Carrasco et al., 2011). Por lo tanto, la metodología de cultivo empleada en el presente estudio induce un ligero aumento del nivel de activación basal de las células microgliales, aunque éstas no pierden su típica morfología polarizada y elongada y su comportamiento migratorio, permitiendo el

estudio de los efectos de la sobreactivación de la microglía ameboide en condiciones muy parecidas a las del estado fisiológico *in situ*.

El mayor nivel de activación de la microglía ameboide en los explantes tratados con LPS, demostrado mediante análisis de los cambios en la morfología celular, se ha visto confirmado por el estudio cuantitativo de los lisosomas presentes en estas células. Estos orgánulos celulares están implicados en la degradación de una gran diversidad de moléculas de origen endógeno y exógeno a través de procesos de autofagia y fagocitosis. Diferentes estudios han demostrado que el compartimento lisosómico de las células microgliales se incrementa significativamente cuando éstas se activan (Engelsberg et al., 2004; Origasa et al., 2001; Pearse et al., 2004; Tanaka et al., 2013). Además, en un estudio anterior de nuestro laboratorio demostrábamos que la microglía ameboide de la retina embrionaria de codorniz de E7 y E9 es capaz de activarse en respuesta a la herida producida por un pinchazo, exhibiendo un aumento en la expresión del antígeno QH1 y un compartimento lisosómico incrementado (Sánchez-López et al., 2005). En el presente estudio, hemos demostrado que el área relativa ocupada por el compartimento lisosómico en las células microgliales ameboides de los explantes de retina de E8 cultivados en presencia de LPS se incrementa un 15% respecto al área relativa hallada en los controles no tratados, confirmando que el tratamiento con LPS aumenta el grado de activación de la microglía ameboide. Es interesante indicar que el área relativa del compartimento lisosómico de las células microgliales es muy similar en los explantes control de E8+24hiv y en los explantes de E9 no cultivados, lo cual valida el sistema experimental de cultivos organotípicos de retina embrionaria empleado en el presente estudio para el análisis de la activación de la microglía ameboide.

Otro de los signos característicos de la activación de las células microgliales en respuesta al LPS o a diferentes daños producidos en el SNC es que dichas células aumentan su proliferación (Calderó et al., 2009; Chang et al., 2001; Jiang-Shieh et al., 2005; Langmann, 2007; Mander et al., 2006; Shankaran et al., 2007; Zeiss y Johnson, 2004). Sin embargo, nuestros resultados muestran



que no hay diferencias significativas en la densidad media de células microgliales entre los explantes cultivados en presencia de LPS y los explantes control, y tampoco hay diferencias con los explantes de E9 no cultivados. Esta ausencia de incremento en la proliferación celular observada en los explantes tratados con LPS durante 24 hiv puede tener varias posibles explicaciones. En primer lugar, el tiempo de cultivo empleado es corto, sólo 24 hiv, y podría ser insuficiente para detectar un incremento significativo en la proliferación de las células microgliales. Además, la microglía ameboide presente en la retina de E8 prolifera muy activamente durante su migración para colonizar la retina (Marín-Teva et al., 1999a), de manera que esta proliferación basal podría enmascarar un hipotético incremento en la proliferación producido tras la activación de la microglía inducida por LPS. Esta explicación estaría de acuerdo con lo observado en la retina lesionada de embriones de codorniz de E7 y E9, en la que se observa una clara activación de la microglía ameboide en la zona de la lesión sin un aparente aumento de la proliferación celular (Sánchez-López et al., 2005). Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta es que los explantes cultivados tienen unas dimensiones limitadas ( $3 \text{ mm}^2$ ) y se obtienen a partir de la zona central de la retina de E8, que es la región con mayor densidad de células microgliales en esa etapa del desarrollo retiniano (Navascués et al., 1995). Por lo tanto, la microglía de estos explantes podría estar sufriendo lo que se conoce como “inhibición del crecimiento celular dependiente de la densidad” (Blat et al., 1994; McClatchey y Yap, 2012; Stoker y Rubin, 1967), que parece estar implicada en el control de la proliferación de las células microgliales (Geisert et al., 2002; Koguchi et al., 2003; Yamada et al., 2006). De esta manera, aunque la activación de las células microgliales por el LPS podría favorecer el aumento de su capacidad proliferativa, la inhibición del crecimiento celular dependiente de la densidad podría contrarrestar este aumento, explicando la ausencia de diferencias de densidad microglial entre los explantes tratados con LPS y controles no tratados.

En resumen, se puede concluir que la microglía ameboide presente en los explantes de retina de E8 cultivados *in vitro* sin ningún tipo de tratamiento (que

muestra un grado de activación basal) aumenta su nivel de activación (sobreactivación) en respuesta al tratamiento con LPS, incrementando su compartimento lisosómico y aumentando la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico.

### **La sobreactivación de la microglía ameboide con LPS induce un incremento en la muerte de células ganglionares: papel de la fagoptosis y las ROS**

El presente estudio demuestra que, en ERECs de E8 cultivados *in vitro*, la sobreactivación de la microglía ameboide con LPS no altera la estructura básica de la retina pero provoca un incremento de la muerte de células ganglionares, así como un aumento de los contactos fagocíticos de la microglía con células ganglionares que expresan caspasa-3 activada. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios realizados en los últimos 15 años, que han demostrado que las células microgliales ameboides no sólo tienen una función de limpieza de los restos de células que mueren, sino que desempeñan un papel importante en las interacciones celulares que regulan la muerte celular programada durante el desarrollo normal del SNC. Así, se ha demostrado que las células microgliales pueden inducir la muerte de algunos tipos de neuronas durante el desarrollo mediante un mecanismo denominado “muerte celular promovida por fagocitosis”, que se caracteriza por la existencia de contactos fagocíticos entre células microgliales y neuronas que expresan la forma activada de la caspasa-3 y por la producción microglial de ROS, tales como anión  $O_2^-$ , óxido nítrico y peroxinitrito (Bessis et al., 2007; Cunningham et al., 2013; Mallat et al., 2005; Marín-Teva et al., 2004, 2014; Wakselman et al., 2008). Un mecanismo similar de muerte celular promovida por fagocitosis ha sido descrito por otros autores en co-cultivos de neuronas y células microgliales inmaduras activadas mediante tratamiento con péptido  $\beta$ -amiloide 1-42, LPS o ácido lipoteicoico (Fricker et al., 2012; Neher et al., 2011; Neniskyte et al., 2011). Estos trabajos han mostrado que la microglía inmadura activada puede inducir la muerte por apoptosis de neuronas aparentemente sanas tras establecer contactos fagocíticos con las mismas (Brown

y Neher, 2012, 2014). La apoptosis inducida por fagocitosis microglial, también conocida como “fagoptosis”, se produce como consecuencia de la exposición de señales “eat-me”, como la fosfatidilserina, en la cara externa de la membrana plasmática de neuronas estresadas, aunque todavía viables (Jitkaew et al., 2009; Kim et al., 2010; Neher et al., 2011; Tyurina et al., 2007). Dicha exposición de fosfatidilserina es reversible y está mediada por ROS liberadas por la microglía ameboide activada, como el peroxinitrito. Las ROS estimulan las escramblasas, enzimas que mezclan los fosfolípidos de las dos monocapas de la membrana plasmática, e inhiben las translocasas de fosfatidilserina, enzimas que transportan de forma continua la fosfatidilserina desde la monocapa externa a la interna en la membrana de las células sanas, con gasto de ATP (Brown y Neher, 2012, 2014; Neher et al., 2011; Neniskyte et al., 2011). Otro estudio *in vitro*, usando una línea celular de microglía y otra neuronal, ha demostrado que la microglía activada con LPS e IFN- $\gamma$  induce la muerte neuronal mediante la producción de óxido nítrico, siendo necesario para ello que las células microgliales estén en contacto directo con las neuronas que van a degenerar (Gibbons y Dragunow, 2006).

En nuestro modelo experimental de cultivos organotípicos de retina de E8, la existencia de un mecanismo de fagoptosis microglial, similar al descrito en los estudios anteriormente citados, explicaría de forma convincente el aumento en la muerte de células ganglionares observado después de sobreactivar la microglía con LPS durante 24 hiv. Nuestros resultados demuestran que la sobreactivación de la microglía ameboide con LPS provoca un incremento de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática de las células retinianas y, simultáneamente, una disminución significativa de la viabilidad celular. Es interesante señalar que en explantes de E8 desprovistos de microglía (explantes obtenidos de la zona más periférica de retinas de E8, que todavía no ha sido colonizada por células microgliales), el porcentaje de neuronas con fosfatidilserina externalizada tras el tratamiento con LPS es significativamente menor que el observado en los explantes que contienen microglía (datos no mostrados). Esto demuestra que el incremento en la externalización de

fosfatidilserina observado tras el tratamiento con LPS sólo se produce en presencia de microglía. Por otra parte, el análisis del número de contactos fagocíticos entre células microgliales y células ganglionares caspasa-3-positivas ha revelado que éstos se incrementan significativamente tras el tratamiento con LPS, sugiriendo que la sobreactivación microglial favorece una mayor tasa de fagocitosis de células ganglionares que podría contribuir activamente a la muerte de las mismas.

Como se ha discutido con anterioridad, la sobreactivación de las células microgliales ameboides con LPS produce un incremento de la extensión de su compartimento lisosómico y un aumento de la expresión de iNOS y de la producción de óxido nítrico en dichas células. Así, el tratamiento de ERECs de E8 con LPS produce un incremento significativo del número de células microgliales que se marcan con carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA, sonda fluorescente que detecta la producción intracelular de diversas ROS, entre las que se incluyen óxido nítrico y peroxinitrito. Por otra parte, es importante destacar que nuestros resultados también demuestran que aproximadamente un 35-40% de las células microgliales presentes en los ERECs cultivados producen anión superóxido (Fig. 38). Este dato es importante porque el óxido nítrico producido por la iNOS puede reaccionar con el anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> para producir peroxinitrito, altamente reactivo y tóxico (Ischiropoulos et al., 1992; Kumar et al., 2014). El peroxinitrito tiene una vida media de 1 segundo y puede difundir aproximadamente 100 µm, a pH 7,4 y 37°C (Marla et al., 1997). Además, a diferencia del anión O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el peroxinitrito atraviesa las membranas celulares y puede alterar y/o dañar diferentes moléculas o estructuras intracelulares de las neuronas (Marla et al., 1997; Pacher et al., 2007; Radi, 2013). Por lo tanto, teniendo en cuenta que las células microgliales ameboides sobreactivadas con LPS en los ERECs de E8 generan tanto óxido nítrico como anión O<sub>2</sub><sup>-</sup>, podemos suponer que probablemente se esté formando peroxinitrito, el cual podría desencadenar el aumento en la exposición de fosfatidilserina sobre la superficie de las células ganglionares y el consiguiente aumento del proceso de fagoptosis microglial descrito anteriormente (Brown y

Neher, 2012, 2014; Neher et al., 2011; Neniskyte et al., 2011). A favor de esta hipótesis, los ERECs tratados con LPS y DPI (inhibidor de la NADPHox y, consiguientemente, de la producción de  $O_2^-$ ) ven reducido significativamente el porcentaje de neuronas que externalizan fosfatidilserina sobre su superficie (datos no mostrados). Teniendo en cuenta que el tratamiento de ERECs de E8+12hiv con LPS incrementa la proporción de microglía productora de ROS, sin que la proporción de microglía productora de  $O_2^-$  se vea afectada (Fig. 38), podemos deducir que hay una tasa constante de producción de  $O_2^-$  en la microglía de los ERECs, independientemente de que éstos hayan sido tratados o no con LPS, y sería la producción de óxido nítrico la que se incrementa por efecto de la mayor expresión de iNOS inducida por LPS. Así, el incremento en la producción de óxido nítrico tras el tratamiento con LPS sería responsable del incremento en la formación de peroxinitrito, el cual, a su vez, provocaría el aumento en la tasa de fagoptosis de células ganglionares.

Nuestros resultados con el inhibidor de iNOS L-NMMA también apoyan la idea de que la liberación de ROS por la microglía sobreactivada con LPS es la acción desencadenante del incremento en la muerte de células ganglionares. Así, la adición de L-NMMA al medio de cultivo de los explantes tratados con LPS induce una fuerte disminución en la producción de ROS por las células microgliales y en el porcentaje de neuronas que exponen fosfatidilserina sobre su superficie a las 12 hiv. Además, el tratamiento con L-NMMA rescata de la muerte por apoptosis a un número significativo de células ganglionares a las 24 hiv. Una reducción similar en la muerte celular tras la inhibición de la iNOS microglial con L-NMMA ha sido observada en otros sistemas experimentales *in vitro*. Así, por ejemplo, el tratamiento con L-NMMA disminuye la muerte neuronal inducida por LPS e IFN- $\gamma$  en cultivos mixtos de neuronas y microglía de cerebro inmaduro de ratón (Chao et al., 1992). Los autores de este estudio demostraban que las células microgliales activadas eran la principal fuente de óxido nítrico y, por lo tanto, responsables del aumento de muerte neuronal. Resultados parecidos se han obtenido en co-cultivos de oligodendrocitos y microglía o de neuronas y microglía

de corteza cerebral de ratas recién nacidas tratados con LPS, con LPS e  $\text{INF}\gamma$  o con péptido  $\beta$ -amiloide 1-42 e  $\text{INF}\gamma$  (Li et al., 2005; Xie et al., 2002), en los que la adición de L-NMMA al medio de cultivo previene la muerte celular producida tras la activación de la microglía. Además, la muerte celular también se reduce tras la disminución de la producción de anión  $\text{O}_2^-$  por la microglía mediante tratamiento de los co-cultivos con inhibidores de la NADPHox.

En resumen, nuestros resultados apoyan que el aumento en la muerte de células ganglionares tras el tratamiento con LPS es debido al incremento de la fagoptosis de las mismas llevado a cabo por células microgliales ameboides sobreactivadas, con la intervención del óxido nítrico y su derivado el peroxinitrito. Conviene resaltar que nuestro estudio también demuestra la existencia de abundantes contactos fagocíticos entre células microgliales ameboides y células ganglionares caspasa-3-positivas en la retina *in situ* de embriones de codorniz de E8,5. En esta edad del desarrollo, las células microgliales están migrando en la CFN y penetran frecuentemente en la CCG, donde numerosas células ganglionares están sufriendo un proceso de muerte celular programada (Marín-Teva et al., 1999c; Navascués et al., 1995). Por lo tanto, es probable que la muerte natural de células ganglionares que tiene lugar durante el desarrollo normal de la retina embrionaria de codorniz también pueda estar promovida por la fagocitosis microglial, de forma similar a lo descrito en otras regiones del SNC de mamíferos (Bessis et al., 2007; Cunningham et al., 2013; Mallat et al., 2005; Marín-Teva et al., 2004, 2014; Wakselman et al., 2008). Esta hipótesis se ve apoyada por la coincidencia cronológica entre la muerte programada de células ganglionares (Marín-Teva et al., 1999c) y el fuerte inmunomarcaje de iNOS en la microglía ameboide, con la consiguiente producción de óxido nítrico, demostrado en el presente estudio. No obstante, serían necesarios experimentos adicionales en retinas *in situ* para confirmar inequívocamente la participación de la microglía ameboide en la muerte programada de células ganglionares durante el desarrollo normal.

## **Referencias**

---





- Acarin L, González B, Castellano B, Castro AJ (1996) Microglial response to N-methyl-D-aspartate-mediated excitotoxicity in the immature rat brain. *J Comp Neurol* 367: 361-374.
- Afanas'ev IB (2007) Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions. *Mol Biotechnol* 37: 2-4.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10: 1538-1543.
- Akira S, Sato S (2003) Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* 35: 555-562.
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615.
- Alliot F, Godin I, Pessac B (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117: 145-152.
- Alliot F, Lecain E, Grima B, Pessac B (1991) Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1541-1545.
- Almolda B, González B, Castellano B (2013) Microglia detection by enzymatic histochemistry. *Methods Mol Biol* 1041: 243-259.
- Amadio S, De Ninno A, Montilli C, Businaro L, Gerardino A, Volonte C (2013) Plasticity of primary microglia on micropatterned geometries and spontaneous long-distance migration in microfluidic channels. *BMC Neurosci* 14: 121.
- Amitai Y (2010) Physiologic role for "inducible" nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. *Glia* 58: 1775-1781.
- Andjelkovic AV, Nikolic B, Pachter JS, Zecevic N (1998) Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res* 814: 13-25.
- Andreka P, Zang J, Dougherty C, Slepak TI, Webster KA, Bishopric NH (2001) Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 88:305-312.
- Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR (2007) Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2: 297-312.
- Arias-Salvatierra D, Silbergeld EK, Acosta-Saavedra LC, Calderon-Aranda ES (2011) Role of nitric oxide produced by iNOS through NF-kappaB pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by lipopolysaccharide. *Cell Signal* 23: 425-435.
- Arimoto T, Bing G (2003) Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 12: 35-45.
- Arnhold S, Andressen C, Bloch W, Mai JK, Addicks K (1997) NO synthase-II is transiently expressed in embryonic mouse olfactory receptor neurons. *Neurosci Lett* 229: 165-168.
- Arnold T, Betsholtz C (2013) Correction: The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell* 5: 12.

- Arnoux I, Hoshiko M, Mandavy L, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2013) Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory "Barrel" cortex. *Glia* 61: 1582-1594.
- Arroyo DS, Soria JA, Gaviglio EA, Rodriguez-Galan MC, Iribarren P (2011) Toll-like receptors are key players in neurodegeneration. *Int Immunopharmacol* 11: 1415-1421.
- Ashwell K (1989) Development of microglia in the albino rabbit retina. *J Comp Neurol* 287: 286-301.
- Ashwell K (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55: 219-230.
- Ashwell K (1991) The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 58: 1-12.
- 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.
- Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T (2003) Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci* 23: 7922-7930.
- Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, Schlunk A, Mitchell SH, Brewster KW, Hudson CE, Cole MJ, Harrison JK, Bickford PC, Gemma C (2011) Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 32: 2030-2044.
- Bacon KB, Harrison JK (2000) Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol* 104: 92-97.
- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G (2001) Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol* 22: 147-184.
- Bal-Price A, Brown GC (2001) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* 21: 6480-6491.
- Bal-Price A, Matthias A, Brown GC (2002) Stimulation of the NADPH oxidase in activated rat microglia removes nitric oxide but induces peroxynitrite production. *J Neurochem* 80: 73-80.
- Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH (2002) CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol* 23: 285-290.
- Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60: 430-440.
- Barron KD (1995) The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 134 Suppl: 57-68.
- Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW (1999) Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19: 1708-1716.
- Béchade C, Colasse S, Diana MA, Rouault M, Bessis A (2014) NOS2 expression is restricted to neurons in the healthy brain but is triggered in microglia upon inflammation. *Glia* 62: 956-963.
- Béchade C, Pascual O, Triller A, Bessis A (2011) Nitric oxide regulates astrocyte maturation in the hippocampus: involvement of NOS2. *Mol Cell Neurosci* 46: 762-769.
- Becher B, Prat A, Antel JP (2000) Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29: 293-304.

- Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH (2006) Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16021-16026.
- Belmonte KE, McKinnon LA, Nathanson NM (2000) Developmental expression of muscarinic acetylcholine receptors in chick retina: selective induction of M2 muscarinic receptor expression in ovo by a factor secreted by Müller glial cells. *J Neurosci* 20: 8417-8425.
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27: 7028-7040.
- Bertini G, Savio T, Zaccheo D, Schmidt HH, Bentivoglio M (1996) NADPH-diaphorase activity in brain macrophages during postnatal development in the rat. *Neuroscience* 70: 287-293.
- Bertolotto A, Manzardo E, Iudicello M, Guglielmone R, Riccio A (1995) Keratan sulphate is a marker of differentiation of ramified microglia. *Dev Brain Res* 86: 233-241.
- Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I (2005) Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* 106: 3004-3011.
- Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55: 233-238.
- Beynon SB, Walker FR (2012) Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience* 225: 162-171.
- Bialas AR, Stevens B (2013) TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat Neurosci* 16: 1773-1782.
- Bianchi R, Kastrianaki E, Giambanco I, Donato R (2011) S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. *J Biol Chem* 286: 7214-7226.
- Biber K, Block ML (2014) Neuroprotection versus neurotoxicity. En: *Microglia in health and disease* (Tremblay ME, Sierra A, eds). Springer, New York, pp 145-172.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW (2007) Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci* 30: 596-602.
- Blat C, Villaudy J, Harel L (1994) Density-dependent inhibition of mouse embryo fibroblast growth: involvement of IGFBP-3. *Exp Cell Res* 215: 114-118.
- Blinzinger K, Kreutzberg G (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85: 145-157.
- Block ML, Hong JS (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans* 35: 1127-1132.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8: 57-69.
- Boche D, Perry VH, Nicoll JA (2013) Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39: 3-18.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-916.
- Bogdan C, Rollingshoff M, Diefenbach A (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17-26.

- Borsello T, Mottier V, Castagne V, Clarke PG (2002) Ultrastructure of retinal ganglion cell death after axotomy in chick embryos. *J Comp Neurol* 453: 361-371.
- Boucsein C, Zacharias R, Farber K, Pavlovic S, Hanisch UK, Kettenmann H (2003) Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci* 17: 2267-2276.
- Boya J, Calvo J, Prado A (1979) The origin of microglial cells. *J Anat* 129: 177-186.
- Boya J, Calvo JL, Carbonell AL, Borregon A (1991) A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* 175: 229-236.
- Boya J, Carbonell AL, Calvo J, Borregón A (1987) Ultrastructural study on the origin of rat microglial cells. *Acta Anat* 130: 329-335.
- 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, Biedermann B, Francke M, Iandiev I, Grosche J, Wiedemann P, Albrecht J, Reichenbach A (2009) Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54: 143-160.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25: 397-424.
- Bringmann A, Wiedemann P (2012) Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 227: 1-19.
- Brockhaus J, Möller T, Kettenmann H (1996) Phagocytosing amoeboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia* 16: 81-90.
- Broderick C, Duncan L, Taylor N, Dick AD (2000) IFN- $\gamma$  and LPS-mediated IL-10-dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2613-2622.
- Brown GC (2007) Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans* 35: 1119-1121.
- Brown GC (2010) Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23: 153-165.
- Brown GC, Bal-Price A (2003) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 27: 325-355.
- Brown GC, Borutaite V (2002) Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 33: 1440-1450.
- Brown GC, Neher JJ (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 41: 242-247.
- Brown GC, Neher JJ (2012) Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends Biochem Sci* 37: 325-332.
- Brown GC, Neher JJ (2014) Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci* 15:209-216.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2: 788-794.
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD, Ransohoff RM, Gygi SP, Antel JP, Weiner HL (2014) Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 17: 131-143.

- Calderó J, Brunet N, Ciutat D, Hereu M, Esquerda JE (2009) Development of microglia in the chick embryo spinal cord: implications in the regulation of motoneuronal survival and death. *J Neurosci Res* 87: 2447-2466.
- Cao L, He C (2013) Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination. *Neurosci Bull* 29: 189-198.
- Cappelletti G, Tedeschi G, Maggioni MG, Negri A, Nonnis S, Maci R (2004) The nitration of  $\tau$  protein in neurone-like PC12 cells. *FEBS Lett* 562: 35-39.
- Carbonell WS, Murase S, Horwitz AF, Mandell JW (2005) Migration of perilesional microglia after focal brain injury and modulation by CC chemokine receptor 5: an in situ time-lapse confocal imaging study. *J Neurosci* 25: 7040-7047.
- Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, 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. *Nat Neurosci* 9: 917-924.
- Carrasco MC (2012) Comportamiento de las células microgliales en cultivos organotípicos de retina en desarrollo. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Carrasco MC, Navascués J, Cuadros MA, Calvente R, Martín-Oliva D, Santos AM, Sierra A, Ferrer-Martín RM, Marín-Teva JL (2011) Migration and ramification of microglia in quail embryo retina organotypic cultures. *Dev Neurobiol* 71: 296-315.
- Carter DA, Dick AD (2003) Lipopolysaccharide/interferon- $\gamma$  and not transforming growth factor  $\beta$  inhibits retinal microglial migration from retinal explant. *Br J Ophthalmol* 87: 481-487.
- Carter DA, Dick AD (2004) CD200 maintains microglial potential to migrate in adult human retinal explant model. *Curr Eye Res* 28: 427-436.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH (2005) Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 48: 16-42.
- Castaño A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70: 1584-1592.
- Castellano B, González B, Jensen MB, Pedersen EB, Finsen BR, Zimmer J (1991) A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. *J Histochem Cytochem* 39: 561-568.
- Chamak B, Mallat M (1991) Fibronectin and laminin regulate the in vitro differentiation of microglial cells. *Neuroscience* 45: 513-527.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53: 344-354.
- Chang RC, Chen W, Hudson P, Wilson B, Han DS, Hong JS (2001) Neurons reduce glial responses to lipopolysaccharide (LPS) and prevent injury of microglial cells from over-activation by LPS. *J Neurochem* 76: 1042-1049.
- Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149: 2736-2741.
- Chauvet N, Palin K, Verrier D, Poole S, Dantzer R, Lestage J (2001) Rat microglial cells secrete predominantly the precursor of interleukin-1 $\beta$  in response to lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci* 14: 609-617.

- 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 J, Rogers SC, Kavdia M (2013) Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Ann Biomed Eng* 41: 327-337.
- Chen SH, Oyarzabal EA, Sung YF, Chu CH, Wang Q, Chen SL, Lu RB, Hong JS (2015) Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia* 63: 118-131.
- Chen Z, Jalabi W, Hu W, Park HJ, Gale JT, Kidd GJ, Bernatowicz R, Gossman ZC, Chen JT, Dutta R, Trapp BD (2014) Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun* 5: 4486.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014) Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 11: 98.
- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré MV, Celador IL, Josserand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Sävman K, Mallard C, Gressens P, Fleiss B (2013) Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun* 32: 70-85.
- Chinnaiyan AM (1999) The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1: 5-15.
- Cho S, Park EM, Zhou P, Frys K, Ross ME, Iadecola C (2005) Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 493-501.
- Cho SS, Lucas JJ, Roh EJ, Yoo YB, Lee KH, Park KH, Hwang DH, Baik SH (1997) Distribution of transferrin binding protein immunoreactivity in the chicken central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 382: 260-271.
- Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT (2002) Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol* 35: 116-126.
- Choi JS, Cha JH, Park HJ, Chung JW, Chun MH, Lee MY (2004) Transient expression of osteopontin mRNA and protein in amoeboid microglia in developing rat brain. *Exp Brain Res* 154: 275-280.
- Choi YK, Kim KW (2008) Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep* 41: 345-352.
- Christensen LB, Woods TA, Carmody AB, Caughey B, Peterson KE (2014) Age-related differences in neuroinflammatory responses associated with a distinct profile of regulatory markers on neonatal microglia. *J Neuroinflammation* 11: 70.
- Christensen RN, Ha BK, Sun F, Bresnahan JC, Beattie MS (2006) Kainate induces rapid redistribution of the actin cytoskeleton in amoeboid microglia. *J Neurosci Res* 84: 170-181.
- Chugani DC, Kедersha NL, Rome LH (1991) Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. *J Neurosci* 11: 256-268.
- Colton CA (2009) Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4: 399-418.
- Colton CA, Abel C, Patchett J, Keri J, Yao J (1992) Lectin staining of cultured CNS microglia. *J Histochem Cytochem* 40: 505-512.
- Contestabile A (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Rev* 32: 476-509.

- Cossmann PH, Egli PS, Christ B, Kurz H (1997) Mesoderm-derived cells proliferate in the embryonic central nervous system: confocal microscopy and three-dimensional visualization. *Histochem Cell Biol* 107: 205-213.
- Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ (2013) Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *J Neurosci Res* 91: 1143-1151.
- Cross AK, Woodrooffe MN (1999) Chemokines induce migration and changes in actin polymerization in adult rat brain microglia and a human fetal microglial cell line in vitro. *J Neurosci Res* 55: 17-23.
- Cross AK, Woodrooffe MN (2001) Immunoregulation of microglial functional properties. *Microsc Res Tech* 54: 10-17.
- Cuadros MA, Coltey P, Carmen Nieto M, Martin C (1992a) Demonstration of a phagocytic cell system belonging to the hemopoietic lineage and originating from the yolk sac in the early avian embryo. *Development* 115: 157-168.
- Cuadros MA, Martin C, Coltey P, Almendros A, Navascués J (1993) First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol* 330: 113-129.
- Cuadros MA, Moujahid A, Martin-Partido G, Navascués J (1992b) Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neurosci Lett* 148: 11-14.
- Cuadros MA, Moujahid A, Quesada A, Navascués J (1994) Development of microglia in the quail optic tectum. *J Comp Neurol* 348: 207-224.
- Cuadros MA, Navascués J (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56: 173-189.
- Cuadros MA, Navascués J (2001) Early origin and colonization of the developing central nervous system by microglial precursors. *Prog Brain Res* 132: 51-59.
- Cuadros MA, Rodríguez-Ruiz J, Calvente R, Almendros A, Marín-Teva JL, Navascués J (1997) Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol* 389: 390-401.
- Cuadros MA, Santos AM, Martín-Oliva D, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J (2006) Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. *J Histochem Cytochem* 54: 727-738.
- Cui YQ, Jia YJ, Zhang T, Zhang QB, Wang XM (2012) Fucoidan protects against lipopolysaccharide-induced rat neuronal damage and inhibits the production of proinflammatory mediators in primary microglia. *CNS Neurosci Ther* 18: 827-833.
- Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC (2013) Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 33: 4216-4233.
- Czapiga M, Colton CA (1999) Function of microglia in organotypic slice cultures. *J Neurosci Res* 56: 644-651.
- Czeh M, Gressens P, Kaindl AM (2011) The yin and yang of microglia. *Dev Neurosci* 33: 199-209.
- D'Acquisto F, de Cristofaro F, Maiuri MC, Tajana G, Carnuccio R (2001) Protective role of nuclear factor kappa B against nitric oxide-induced apoptosis in J774 macrophages. *Cell Death Differ* 8: 144-151.
- da Fonseca ACC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, Lima FRS (2014) The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci* 8: 362.

- Dai JN, Zong Y, Zhong LM, Li YM, Zhang W, Bian LG, Ai QL, Liu YD, Sun J, Lu D (2011) Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways. *PLoS One* 6: e21891.
- Dailey ME, Waite M (1999) Confocal imaging of microglial cell dynamics in hippocampal slice cultures. *Methods* 18: 222-230.
- Dale DC, Boxer L, Liles WC (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112: 935-945.
- Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J, González B, Castellano B (1997) Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J Comp Neurol* 377: 70-84.
- Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B (1998) Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 8: 458-474.
- 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.
- Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J (1994) Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol* 41: 15-38.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8: 752-758.
- Davalos D, Lee JK, Smith WB, Brinkman B, Ellisman MH, Zheng B, Akassoglou K (2008) Stable in vivo imaging of densely populated glia, axons and blood vessels in the mouse spinal cord using twophoton microscopy. *J Neurosci Methods* 169: 1-7.
- David S, Kroner A (2011) Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12: 388-399.
- Dawn B, Bolli R (2002) Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 962: 18-41.
- De I, Nikodemova M, Steffen MD, Sokn E, Maklakova VI, Watters JJ, Collier LS (2014) CSF1 overexpression has pleiotropic effects on microglia in vivo. *Glia* 62: 1955-1967.
- Del Río-Hortega P (1919) El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos III. Naturaleza probable de la microglía. *Bol Soc Esp Biol* 9: 69-120.
- Del Río-Hortega P (1932) Microglia. En: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, vol. 2 (Penfield W, ed). PB Hoeber, New York, pp 481-534.
- Deng YY, Lu J, Ling EA, Kaur C (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) produced via NF- $\kappa$ B signaling pathway mediates migration of amoeboid microglia in the periventricular white matter in hypoxic neonatal rats. *Glia* 57: 604-621.
- Deng YY, Lu J, Sivakumar V, Ling EA, Kaur C (2008) Amoeboid microglia in the periventricular white matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxic neonatal rats. *Brain Pathol* 18: 387-400.
- Derecki NC, Cronk JC, Kipnis J (2013) The role of microglia in brain maintenance: implications for Rett syndrome. *Trends Immunol* 34: 144-150.
- Díaz B, Pimentel B, de Pablo F, de La Rosa EJ (1999) Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur J Neurosci* 11: 1624-1632.
- Dihné M, Block F, Korr H, Töpper R (2001) Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. *Brain Res* 902: 178-189.



- di Penta A, Moreno B, Reix S, Fernandez-Diez B, Villanueva M, Errea O, Escala N, Vandenbroeck K, Comella JX, Villoslada P (2013) Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS One* 8: e54722.
- Donovan M, Carmody RJ, Cotter TG (2001) Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J Biol Chem* 276: 23000-23008.
- Dringen R (2005) Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal* 7: 1223-1233.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16: 2508-2521.
- Ellison JA, de Vellis J (1995) Amoeboid microglia expressing GD3 ganglioside are concentrated in regions of oligodendrogenesis during development of the rat corpus callosum. *Glia* 14: 123-132.
- Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN (2014) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82: 380-397.
- Engelsberg K, Ehinger B, Wasselius J, Johansson K (2004) Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 42: 229-239.
- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One* 6: e26317.
- Estévez AG, Spear N, Thompson JA, Cornwell TL, Radi R, Barbeito L, Beckman JS (1998) Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 18: 3708-3714.
- Eugenin EA, Dyer G, Calderon TM, Berman JW (2005) HIV-1 tat protein induces a migratory phenotype in human fetal microglia by a CCL2 (MCP-1)-dependent mechanism: possible role in NeuroAIDS. *Glia* 49: 501-510.
- Eugenin EA, Eckardt D, Theis M, Willecke K, Bennett MV, Saez JC (2001) Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4190-4195.
- Eyo UB, Dailey ME (2013) Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J Neuroimmune Pharmacol* 8: 494-509.
- Fadok VA, Bratton DL, Henson PM (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108: 957-962.
- Fanarraga ML, Villegas JC, Carranza G, Castano R, Zabala JC (2009) Tubulin cofactor B regulates microtubule densities during microglia transition to the reactive states. *Exp Cell Res* 315: 535-541.
- Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C (2010) Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116: 829-840.
- Fedoroff S, Zhai R, Novak JP (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50: 477-486.

- Fehsel K, Jalowy A, Qi S, Burkart V, Hartmann B, Kolb H (1993) Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes* 42: 496-500.
- Ferrazzano P, Chanana V, Uluc K, Fidan E, Akture E, Kintner DB, Cengiz P, Sun D (2013) Age-dependent microglial activation in immature brains after hypoxia-ischemia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12: 338-349.
- Ferrer-Martín RM, Martín-Oliva D, Sierra A, Carrasco MC, Martín-Estebané M, Calvente R, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA (2014) Microglial cells in organotypic cultures of developing and adult mouse retina and their relationship with cell death. *Exp Eye Res* 121: 42-57.
- Fetler L, Amigorena S (2005) Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 309: 392-393.
- Ffrench-Constant C, Miller RH, Burne JF, Raff MC (1988) Evidence that migratory oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells are kept out of the rat retina by a barrier at the eye-end of the optic nerve. *J Neurocytol* 17: 13-25.
- Fischer AJ, Dierks BD, Reh TA (2002) Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development* 129: 2283-2291.
- Fischer AJ, Scott MA, Zelinka C, Sherwood P (2010) A novel type of glial cell in the retina is stimulated by insulin-like growth factor 1 and may exacerbate damage to neurons and Müller glia. *Glia* 58: 633-649.
- Fischer AJ, Stell WK (1999) Nitric oxide synthase-containing cells in the retina, pigmented epithelium, choroid, and sclera of the chick eye. *J Comp Neurol* 405: 1-14.
- Fiske BK, Brunjes PC (2000) Microglial activation in the developing rat olfactory bulb. *Neuroscience* 96: 807-815.
- Flavin MP, Zhao G, Ho LT (2000) Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro. *Glia* 29: 347-354.
- Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT (2011) Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6: e15973.
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33: 829-837, 837a-837d.
- Frade JM, Barde YA (1998) Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20: 35-41.
- Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP, Popovich PG, Guttridge DC, Kaspar BK (2014) Microglia induce motor neuron death via the classical NF- $\kappa$ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 81: 1009-1023.
- Frank MG, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF (2010) Aging sensitizes rapidly isolated hippocampal microglia to LPS ex vivo. *J Neuroimmunol* 226: 181-184.
- Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J (2007) Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8287-8292.
- Fricker M, Oliva-Martin MJ, Brown GC (2012) Primary phagocytosis of viable neurons by microglia activated with LPS or A $\beta$  is dependent on calreticulin/LRP phagocytic signalling. *J Neuroinflammation* 9: 196.
- Fruttiger M (2002) Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 522-527.

- Fujita H, Tanaka J, Toku K, Tateishi N, Suzuki Y, Matsuda S, Sakanaka M, Maeda N (1996) Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. *Glia* 18: 269-281.
- Fujita Y, Imagawa T, Uehara M (2001) Fine structure of the retino-optic nerve junction in the chicken. *Tissue Cell* 33: 129-134.
- Fukui O, Kinugasa Y, Fukuda A, Fukuda H, Tskitishvili E, Hayashi S, Song M, Kanagawa T, Hosono T, Shimoya K, Murata Y (2006) Post-ischemic hypothermia reduced IL-18 expression and suppressed microglial activation in the immature brain. *Brain Res* 1121: 35-45.
- Gabriel C, Camins A, Sureda FX, Aquirre L, Escubedo E, Pallas M, Camarasa J (1997) Determination of nitric oxide generation in mammalian neurons using dichlorofluorescein diacetate and flow cytometry. *J Pharmacol Toxicol Methods* 38: 93-98.
- Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20: 471-477.
- Gallego A (1976) La microglía de la retina. *An R Acad Nac Med* 93:393-407.
- Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B (2002) Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 81: 1285-1297.
- Gao HM, Zhou H, Zhang F, Wilson BC, Kam W, Hong JS (2011) HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *J Neurosci* 31: 1081-1092.
- Gao L, Macklin W, Gerson J, Miller RH (2006) Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. *Dev Biol* 290: 277-286.
- Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenburg PA, Michalak M, Henson PM (2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123: 321-334.
- Garden GA, Möller T (2006) Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 1: 127-137.
- Garthwaite G, Hampden-Smith K, Wilson GW, Goodwin DA, Garthwaite J (2015) Nitric oxide targets oligodendrocytes and promotes their morphological differentiation. *Glia* 63: 383-399.
- Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276: 37993-38001.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501.
- Geisert EE, Jr., Williams RW, Geisert GR, Fan L, Asbury AM, Maecker HT, Deng J, Levy S (2002) Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. *J Comp Neurol* 453: 22-32.
- Ghosh APD (2010) Brain APCs including microglia are only differential and positional polymorphs. *Ann Neurosci* 17: 191-199.
- Gibbons HM, Dragunow M (2006) Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Res* 1084: 1-15.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis

- reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330: 841-845.
- Ginhoux F, Jung S (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14: 392-404.
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7: 45.
- Giordana MT, Attanasio A, Cavalla P, Migheli A, Vigliani MC, Schiffer D (1994) Reactive cell proliferation and microglia following injury to the rat brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 163-174.
- Gitik M, Liraz-Zaltsman S, Oldenburg PA, Reichert F, Rotshenker S (2011) Myelin down-regulates myelin phagocytosis by microglia and macrophages through interactions between CD47 on myelin and SIRPalpha (signal regulatory protein-alpha) on phagocytes. *J Neuroinflammation* 8: 24.
- Gitik M, Kleinhaus R, Hadas S, Reichert F, Rotshenker S (2014) Phagocytic receptors activate and immune inhibitory receptor SIRPalpha inhibits phagocytosis through paxillin and cofilin. *Front Cell Neurosci* 8: 104.
- Giulian D, Ingeman JE (1988) Colony-stimulating factors as promoters of amoeboid microglia. *J Neurosci* 8: 4707-4717.
- Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li X, Kirkpatrick JB (1995) Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J Neurosci* 15: 7712-7726.
- Goings GE, Kozlowski DA, Szele FG (2006) Differential activation of microglia in neurogenic versus non-neurogenic regions of the forebrain. *Glia* 54: 329-342.
- Golde S, Chandran S, Brown GC, Compston A (2002) Different pathways for iNOS-mediated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expression. *J Neurochem* 82: 269-282.
- Goldstein IM, Ostwald P, Roth S (1996) Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res* 36: 2979-2994.
- Gomes C, Ferreira R, George J, Sanches R, Rodrigues DI, Gonçalves N, Cunha RA (2013) Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *J Neuroinflammation* 10: 16.
- Gomes-Leal W (2012) Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav* 2: 345-356.
- Gómez-Nicola D, Franssen NL, Suzzi S, Perry VH (2013) Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* 33: 2481-2493.
- Gomez-Nicola D, Perry VH (2014) Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist*, publicado online, doi: 10.1177/1073858414530512.
- Gomez Perdiguerro E, Schulz C, Geissmann F (2013) Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. *Glia* 61: 112-120.
- Goodbrand IA, Gaze RM (1991) Microglia in tadpoles of *Xenopus laevis*: normal distribution and the response to optic nerve injury. *Anat Embryol (Berl)* 184: 71-82.
- Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
- Gotoh H, Ueda T, Uno A, Ohuchi H, Ikenaka K, Ono K (2011) Expression of myelin genes in the developing chick retina. *Gene Expr Patterns* 11: 471-475.

- Goureau O, Régnier-Ricard F, Jonet L, Jeanny JC, Courtois Y, Chany-Fournier F (1997) Developmental expression of nitric oxide synthase isoform I and III in chick retina. *J Neurosci Res* 50: 104-113.
- Goureau O, Regnier-Ricard F, Desire L, Courtois Y (1999) Role of nitric oxide in photoreceptor survival in embryonic chick retinal cell culture. *J Neurosci Res* 55: 423-431.
- Govers R, Oess S (2004) To NO or not to NO: 'where?' is the question. *Histol Histopathol* 19: 585-605.
- Graeber MB, López-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S (1998) The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813: 241-253.
- Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1989) Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res* 22: 103-106.
- Greter M, Merad M (2013) Regulation of microglia development and homeostasis. *Glia* 61: 121-127.
- Griffiths MR, Gasque P, Neal JW (2010) The regulation of the CNS innate immune response is vital for the restoration of tissue homeostasis (repair) after acute brain injury: a brief review. *Int J Inflam* 2010: 151097.
- Grossmann R, Stence N, Carr J, Fuller L, Waite M, Dailey ME (2002) Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia* 37: 229-240.
- Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75: 388-397.
- Guimarães C, Assrey J, Linden R (2001) Paracrine neuroprotective effect of nitric oxide in the developing retina. *J Neurochem* 76: 1233-1241.
- Hailer NP, Heppner FL, Haas D, Nitsch R (1997) Fluorescent dye prelabelled microglial cells migrate into organotypic hippocampal slice cultures and ramify. *Eur J Neurosci* 9: 863-866.
- Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R (1996) Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18: 319-331.
- Halfter W, Willem M, Mayer U (2005) Basement membrane-dependent survival of retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 1000-1009.
- Hamburger V, Hamilton HL (1992) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn* 195: 231-272.
- Hanamsagar R, Cardona SM, Kielian T, Cardona AE (2014) Roles in immune responses. En: *Microglia in health and disease* (Tremblay ME, Sierra A, eds). Springer, New York, pp 115-144.
- Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417: 182-187.
- Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140-155.
- Hanisch UK (2013) Proteins in microglial activation - inputs and outputs by subsets. *Curr Protein Pept Sci* 14: 3-15.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10: 1387-1394.
- Hao AJ, Dheen ST, Ling EA (2001) Response of amoeboid microglia/brain macrophages in fetal rat brain exposed to a teratogen. *J Neurosci Res* 64: 79-93.

- Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K (2002) Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 22: 9228-9236.
- Hardingham N, Dachtler J, Fox K (2013) The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front Cell Neurosci* 7: 190.
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10896-10901.
- Harry GJ, Kraft AD (2012) Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. *Neurotoxicology* 33: 191-206.
- Harry GJ (2013) Microglia during development and aging. *Pharmacol Ther* 139: 313-326.
- Harry GJ, Pont-Lezica L (2014) Developmental vascularization, neurogenesis, myelination, and astrogliogenesis. En: *Microglia in health and disease* (Tremblay ME, Sierra A, eds). Springer, New York, pp 193-221.
- Haverkamp S, Kolb H, Cuenca N (1999) Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is localized to Muller cells in all vertebrate retinas. *Vision Res* 39: 2299-2303.
- He YF, Chen HJ, Qian LH, He LF, Buzby JS (2013) Diphenyleneiodonium protects preoligodendrocytes against endotoxin-activated microglial NADPH oxidase-generated peroxynitrite in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia. *Brain Res* 1492: 108-121.
- Hegg CC, Hu S, Peterson PK, Thayer SA (2000)  $\beta$ -chemokines and human immunodeficiency virus type-1 proteins evoke intracellular calcium increases in human microglia. *Neuroscience* 98: 191-199.
- Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH (2009) Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 4:389-398.
- Hepfner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R (1998) Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 10: 3284-3290.
- 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 (1999) Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development* 126: 3735-3745.
- 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.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 23: 2134-2145.
- Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, Uchino S, Kohsaka S (2005) Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 81: 357-362.
- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD (2000) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290: 1768-1771.

- 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. *J Comp Neurol* 313: 587-603.
- Holländer H, Makarov F, Stefani FH, Stone J (1995) Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribrosa in the normotensive eye in humans and other mammals. *Ophthalmic Res* 27: 296-309.
- Horling K, Schlegel G, Schulz S, Vierk R, Ullrich K, Santer R, Rune GM (2014) Hippocampal synaptic connectivity in phenylketonuria. *Hum Mol Genet*, publicado on-line, doi:10.1093/hmg/ddu515.
- Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012) Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci* 32: 15106-15111.
- Hristova M, Cuthill D, Zbarsky V, Acosta-Saltos A, Wallace A, Blight K, Buckley SM, Peebles D, Heuer H, Waddington SN, Raivich G (2010) Activation and deactivation of periventricular white matter phagocytes during postnatal mouse development. *Glia* 58: 11-28.
- Hua JY, Smith SJ (2004) Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci* 7: 327-332.
- Huerta S, Heinzerling JH, Anguiano-Hernandez YM, Huerta-Yepez S, Lin J, Chen D, Bonavida B, Livingston EH (2007) Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: roles of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF. *J Surg Res* 142: 184-194.
- Hughes PM, Botham MS, Frentzel S, Mir A, Perry VH (2002) Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia* 37: 314-327.
- Huizinga R, van der Star BJ, Kipp M, Jong R, Gerritsen W, Clarner T, Puentes F, Dijkstra CD, van der Valk P, Amor S (2012) Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis. *Glia* 60: 422-431.
- 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.
- Hur J, Lee P, Kim MJ, Kim Y, Cho YW (2010) Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp91phox NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 1526-1530.
- Hurley SD, Walter SA, Semple-Rowland SL, Streit WJ (1999) Cytokine transcripts expressed by microglia in vitro are not expressed by amoeboid microglia of the developing rat central nervous system. *Glia* 25: 304-309.
- 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.
- Hutchins KD, Dickson DW, Rashbaum WK, Lyman WD (1990) Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Dev Brain Res* 55: 95-102.
- Hutton LC, Castillo-Melendez M, Smythe GA, Walker DW (2008) Microglial activation, macrophage infiltration, and evidence of cell death in the fetal brain after uteroplacental administration of lipopolysaccharide in sheep in late gestation. *Am J Obstet Gynecol* 198: 117.e1-117.e11.

- Ientile R, Malecka B, Picciurro V, Naso A, Pedale S, Macaione S (1996) Nitric oxide synthase in chick embryo retina during development. *FEBS Lett* 379: 82-84.
- Ikeda H, Kusudo K, Murase K (2006) Nitric oxide-dependent long-term potentiation revealed by real-time imaging of nitric oxide production and neuronal excitation in the dorsal horn of rat spinal cord slices. *Eur J Neurosci* 23: 1939-1943.
- Ilschner S, Brandt R (1996) The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. *Glia* 18: 129-140.
- Imai Y, Kohsaka S (2002) Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia* 40: 164-174.
- Imura T, Kanatani S, Fukuda S, Miyamoto Y, Hisatsune T (2005) Layer specific production of nitric oxide during cortical circuit formation in postnatal mouse brain. *Cereb Cortex* 15: 332-340.
- Inoue K (2008) Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci* 65: 3074-3080.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 298: 446-451.
- Izumi Y, Clifford DB, Zorumski CF (1992) Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science* 257: 1273-1276.
- Jakubowski W, Bartosz G (2000) 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 24: 757-760.
- Jeon CJ, Masland RH (1993) Selective accumulation of diamidino yellow and chromomycin A3 by retinal glial cells. *J Histochem Cytochem* 41: 1651-1658.
- Ji R, Tian S, Lu HJ, Lu Q, Zheng Y, Wang X, Ding J, Li Q (2013) TAM receptors affect adult brain neurogenesis by negative regulation of microglial cell activation. *J Immunol* 191: 6165-6177.
- Jiang XS, Ni YQ, Liu TJ, Zhang M, Ren H, Jiang R, Huang X, Xu GZ (2012) CCR2 overexpression promotes the efficient recruitment of retinal microglia in vitro. *Mol Vis* 18: 2982-2992.
- Jiang-Shieh YF, Yeh KY, Wei IH, Chang CY, Chien HF, Tsai RY, Chang ML, Lee AW, Pai MH, Wu CH (2005) Responses of microglia in vitro to the gram-positive bacterial component, lipoteichoic acid. *J Neurosci Res* 82: 515-524.
- Jinno S, Fleischer F, Eckel S, Schmidt V, Kosaka T (2007) Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55: 1334-1347.
- Jitkaew S, Witasap E, Zhang S, Kagan VE, Fadeel B (2009) Induction of caspase- and reactive oxygen species-independent phosphatidylserine externalization in primary human neutrophils: role in macrophage recognition and engulfment. *J Leukoc Biol* 85: 427-437.
- Joly S, Francke M, Ulbricht E, Beck S, Seeliger M, Hirrlinger P, Hirrlinger J, Lang KS, Zinkernagel M, Odermatt B, Samaradzija M, Reichenbach A, Grimm C, Reme CE (2009) Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions. *Am J Pathol* 174: 2310-2323.
- Jurgens HA, Johnson RW (2012) Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol* 233: 40-48.
- Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Asai H, Hussein MH, Suzuki M, Kato S, Saitoh S, Asai K (2013) Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis of cultured microglia via nitric oxide production. *Toxicol Appl Pharmacol* 268: 99-105.



- Kalla R, Bohatschek M, Kloss CU, Krol J, Von Maltzan X, Raivich G (2003) Loss of microglial ramification in microglia-astrocyte cocultures: involvement of adenylate cyclase, calcium, phosphatase, and Gi-protein systems. *Glia* 41: 50-63.
- Kaneko YS, Ota A, Nakashima A, Mori K, Nagatsu I, Nagatsu T (2012) Regulation of oxidative stress in long-lived lipopolysaccharide-activated microglia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39: 599-607.
- Kang YC, Kim PK, Choi BM, Chung HT, Ha KS, Kwon YG, Kim YM (2004) Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide. *In Vivo* 18: 367-376.
- Karlstetter M, Ebert S, Langmann T (2010) Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology* 215: 685-691.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA (2001) Origin of microglia. *Microsc Res Tech* 54: 2-9.
- Kawabori M, Yenari MA (2014) The role of the microglia in acute CNS injury. *Metab Brain Dis*, publicado on-line, doi: 10.1007/s11011-014-9531-6.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373-384.
- Kawasaki K, Smith RS, Jr., Hsieh CM, Sun J, Chao J, Liao JK (2003) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 5726-5737.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91: 461-553.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77: 10-18.
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Höltscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 16: 273-280.
- Kierdorf K, Prinz M (2013) Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci* 7: 44.
- Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW (2014) Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol* 258: 5-16.
- Kim JY, Song SH, Kim HN, Kim DW, Sohn HJ, Lee EY, Cho SS, Seo JH (2012)  $\alpha$ B-crystallin is expressed in myelinating oligodendrocytes of the developing and adult avian retina. *Neurochem Res* 37: 2135-2142.
- Kim KW, Vallon-Eberhard A, Zigmond E, Farache J, Shezen E, Shakhar G, Ludwig A, Lira SA, Jung S (2011) In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* 118: e156-e167.
- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81: 302-313.
- Kim YE, Chen J, Langen R, Chan JR (2010) Monitoring apoptosis and neuronal degeneration by real-time detection of phosphatidylserine externalization using a polarity-sensitive indicator of viability and apoptosis. *Nat Protoc* 5: 1396-1405.
- Kobayashi K, Yamanaka H, Noguchi K (2013) Expression of ATP receptors in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. *Anat Sci Int* 88: 10-16.
- Kobayashi N, Karisola P, Pena-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, Butte MJ, Nagumo H, Chernova I, Zhu B, Sharpe AH, Ito S, Dranoff G, Kaplan GG, Casanovas JM, Umetsu DT, Dekruyff RH, Freeman GJ (2007) TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27: 927-940.

- Koeglsperger T, Li S, Brenneis C, Saulnier JL, Mayo L, Carrier Y, Selkoe DJ, Weiner HL (2013) Impaired glutamate recycling and GluN2B-mediated neuronal calcium overload in mice lacking TGF-beta1 in the CNS. *Glia* 61: 985-1002.
- Koguchi K, Nakatsuji Y, Okuno T, Sawada M, Sakoda S (2003) Microglial cell cycle-associated proteins control microglial proliferation in vivo and in vitro and are regulated by GM-CSF and density-dependent inhibition. *J Neurosci Res* 74: 898-905.
- Koizumi S, Ohsawa K, Inoue K, Kohsaka S (2013) Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* 61: 47-54.
- Kojima H, Hirotsani M, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T (2001) Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indicators based on the rhodamine chromophore. *Anal Chem* 73: 1967-1973.
- Kondo Y, Duncan ID (2009) Selective reduction in microglia density and function in the white matter of colony-stimulating factor-1-deficient mice. *J Neurosci Res* 87: 2686-2695.
- Kondo Y, Lemere CA, Seabrook TJ (2007) Osteopetrotic (op/op) mice have reduced microglia, no A-beta deposition, and no changes in dopaminergic neurons. *J Neuroinflammation* 4: 31.
- Kongsui R, Beynon SB, Johnson SJ, Walker F (2014) Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat. *J Neuroinflammation* 11: 182.
- Kono H, Rock KL (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8: 279-289.
- Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ (2006) Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 26: 328-332.
- Kremlev SG, Roberts RL, Palmer C (2004) Differential expression of chemokines and chemokine receptors during microglial activation and inhibition. *J Neuroimmunol* 149: 1-9.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318.
- Kuan CY, Roth KA, Flavell RA, Rakic P (2000) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* 23: 291-297.
- Kubota Y, Suda T (2009) Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development. *Trends Cardiovasc Med* 19: 38-43.
- Kumar A, Chen SH, Kadiiska MB, Hong JS, Zielonka J, Kalyanaraman B, Mason RP (2014) Inducible nitric oxide synthase is key to peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV2 cells. *Free Radic Biol Med* 73: 51-59.
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30: 16-34.
- 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.
- Kurpius D, Wilson N, Fuller L, Hoffman A, Dailey ME (2006) Early activation, motility, and homing of neonatal microglia to injured neurons does not require protein synthesis. *Glia* 54: 58-70.

- Kurz H, Christ B (1998) Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 22: 98-102.
- Kurz H, Korn J, Eggli PS, Huang R, Christ B (2001) Embryonic central nervous system angiogenesis does not involve blood-borne endothelial progenitors. *J Comp Neurol* 436: 263-274.
- Kuzin B, Roberts I, Peunova N, Enikolopov G (1996) Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87: 639-649.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Dalmau I, Gregersen R, Garcia-Ovejero D, Babcock A, Owens T, Finsen B (2005) Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury. *Glia* 50: 121-131.
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Rev* 48: 196-206.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS, Wirenfeldt M, Nielsen M, Dagnaes-Hansen F, Bluethmann H, Faergeman NJ, Meldgaard M, Deierborg T, Finsen B (2009) Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci* 29: 1319-1330.
- Langmann T (2007) Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81: 1345-1351.
- Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S (2004) Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14: 277-287.
- 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.
- Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M (2003) Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 42: 139-148.
- Lee YB, Nagai A, Kim SU (2002) Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res* 69: 94-103.
- Lehnardt S (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58: 253-263.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22: 2478-2486.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8514-8519.
- Lenz KM, Nugent BM, Haliyur R, McCarthy MM (2013) Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *J Neurosci* 33: 2761-2772.
- Li F, Wang L, Li JW, Gong M, He L, Feng R, Dai Z, Li SQ (2011) Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci* 12: 111.

- Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA (2005) Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9936-9941.
- Li P, Kaur C, Lu J, Sivakumar V, Dheen ST, Ling EA (2010) Expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin-E synthase in amoeboid microglial cells in the developing brain and effects of cyclooxygenase-2 neutralization on BV-2 microglial cells. *J Neurosci Res* 88: 1577-1594.
- Li Y, Chen G, Zhao J, Nie X, Wan C, Liu J, Duan Z, Xu G (2013) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces microglial nitric oxide production and subsequent rat primary cortical neuron apoptosis through p38/JNK MAPK pathway. *Toxicology* 312: 132-141.
- Li YB, Kaur C, Ling EA (1997) Labeling of amoeboid microglial cells and intraventricular macrophages in fetal rats following a maternal injection of a fluorescent dye. *Neurosci Res* 28: 119-125.
- Liang J, Takeuchi H, Jin S, Noda M, Li H, Doi Y, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A (2010) Glutamate induces neurotrophic factor production from microglia via protein kinase C pathway. *Brain Res* 1322: 8-23.
- Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH (2012) Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol* 237: 147-152.
- Lichanska AM, Browne CM, Henkel GW, Murphy KM, Ostrowski MC, McKercher SR, Maki RA, Hume DA (1999) Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood* 94: 127-138.
- Lichanska AM, Hume DA (2000) Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp Hematol* 28: 601-611.
- Lijia Z, Zhao S, Wang X, Wu C, Yang J (2012) A self-propelling cycle mediated by reactive oxide species and nitric oxide exists in LPS-activated microglia. *Neurochem Int* 61: 1220-1230.
- Lima FRS, da Fonseca ACC, Faria GP, Dubois LGF, Alves TR, Faria J, Moura-Neto V (2009) The origin of microglia and the development of the brain. En: *Perspectives of Stem Cells* (Ulrich H, ed). Springer, New York, pp 171-189.
- Ling EA, Penney D, Leblond CP (1980) Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'amoeboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol* 193: 631-657.
- Ling EA, Tan CK (1974) Amoeboid microglial cells in the corpus callosum of neonatal rats. *Arch Histol Jpn* 36: 265-280.
- Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7: 9-18.
- Ling Z, Zhu Y, Tong C, Snyder JA, Lipton JW, Carvey PM (2006) Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally. *Exp Neurol* 199: 499-512.
- Lipfert J, Odemis V, Wagner DC, Boltze J, Engele J (2013) CXCR4 and CXCR7 form a functional receptor unit for SDF-1/CXCL12 in primary rodent microglia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39: 667-680.
- Liu HT, Du YG, He JL, Chen WJ, Li WM, Yang Z, Wang YX, Yu C (2010) Tetramethylpyrazine inhibits production of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced N9 microglial cells through blockade of

- MAPK and PI3K/Akt signaling pathways, and suppression of intracellular reactive oxygen species. *J Ethnopharmacol* 129: 335-343.
- Liu J, Hong Z, Ding J, Zhang J, Chen S (2008) Predominant release of lysosomal enzymes by newborn rat microglia after LPS treatment revealed by proteomic studies. *J Proteome Res* 7: 2033-2049.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Loane DJ, Byrnes KR (2010) Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7: 366-377.
- López-Enríquez M (1926) Existencia de células de Hortega 'microglia' en la retina y vías ópticas. *Bol R Soc Esp Hist Nat* 26: 294-301.
- Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A (2009) Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 88: 221-245.
- Lu YB, Franze K, Seifert G, Steinhäuser C, Kirchhoff F, Wolburg H, Guck J, Janmey P, Wei EQ, Kas J, Reichenbach A (2006) Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17759-17764.
- Louboutin JP, Strayer DS (2013) Relationship between the chemokine receptor CCR5 and microglia in neurological disorders: consequences of targeting CCR5 on neuroinflammation, neuronal death and regeneration in a model of epilepsy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12: 815-829.
- Lull ME, Block ML (2010) Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7: 354-365.
- Lund S, Christensen KV, Hedtjörn M, Mortensen AL, Hagberg H, Falsig J, Hasseldam H, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M (2006) The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *J Neuroimmunol* 180: 71-87.
- Luo XG, Chen SD (2012) The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl Neurodegener* 1: 9.
- Luo XG, Ding JQ, Chen SD (2010) Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 5: 12.
- Lynch MA (2009) The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol* 40: 139-156.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.
- Madore C, Joffre C, Delpech JC, De Smedt-Peyrusse V, Aubert A, Coste L, Layé S, Nadjar A (2013) Early morphofunctional plasticity of microglia in response to acute lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 34: 151-158.
- Magalhaes MM, Coimbra A (1973) Electron microscope autoradiographic detection of sites of protein synthesis in the rabbit retina Müller cells. *J Cell Biol* 57: 77-87.
- Mallat M, Marín-Teva JL, Cheret C (2005) Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol* 15: 101-107.
- Mander P, Brown GC (2005) Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 2: 20.
- Mander PK, Jekabsone A, Brown GC (2006) Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from NADPH oxidase. *J Immunol* 176: 1046-1052.
- Manivannan J, Tay SS, Ling EA, Dheen ST (2014) Dihydropyrimidinase-like 3 regulates the inflammatory response of activated microglia. *Neuroscience* 253: 40-54.

- 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. *Anat Embryol* 200: 289-300.
- Marín-Teva JL, Calvente R, Cuadros MA, Almendros A, Navascués J (1999b) Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia* 27: 226-238.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascués J (1999c) Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412: 255-275.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J (2011) Microglia and neuronal cell death. *Neuron Glia Biol* 7: 25-40.
- Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41: 535-547.
- Marín-Teva JL, Navascués J, Sierra A, Mallat M (2014) Developmental neuronal elimination. En: *Microglia in health and disease* (Tremblay ME, Sierra A, eds). Springer, New York, pp 175-192.
- Marla SS, Lee J, Groves JT (1997) Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14243-14248.
- Martín-Partido G, Cuadros MA, Martín C, Coltey P, Navascués J (1991) Macrophage-like cells invading the suboptic necrotic centres of the avian embryo diencephalon originate from haemopoietic precursors. *J Neurocytol* 20: 962-968.
- Martín-Partido G, Navascués J (1990) Macrophage-like cells in the presumptive optic pathways in the floor of the diencephalon of the chick embryo. *J Neurocytol* 19: 820-832.
- Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6: 13.
- Mazaheri F, Breus O, Durdu S, Haas P, Wittbrodt J, Gilmour D, Peri F (2014) Distinct roles for BAI1 and TIM-4 in the engulfment of dying neurons by microglia. *Nat Commun* 5: 4046.
- McClatchey AI, Yap AS (2012) Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr Opin Cell Biol* 24: 685-694.
- McCoy CE, O'Neill LA (2008) The role of toll-like receptors in macrophages. *Front Biosci* 13: 62-70.
- McKay SM, Brooks DJ, Hu P, McLachlan EM (2007) Distinct types of microglial activation in white and grey matter of rat lumbosacral cord after mid-thoracic spinal transection. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 698-710.
- McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* 15: 5647-5658.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397.
- Mejía-García TA, Paes-de-Carvalho R (2007) Nitric oxide regulates cell survival in purified cultures of avian retinal neurons: involvement of multiple transduction pathways. *J Neurochem* 100: 382-394.

- Mejía-García TA, Portugal CC, Encarnação TG, Prado MA, Paes-de-Carvalho R (2013) Nitric oxide regulates AKT phosphorylation and nuclear translocation in cultured retinal cells. *Cell Signal* 25: 2424-2439.
- Mennicken F, Maki R, de Souza EB, Quirion R (1999) Chemokines and chemokine receptors in the CNS: a possible role in neuroinflammation and patterning. *Trends Pharmacol Sci* 20: 73-78.
- Mertsch K, Hanisch UK, Kettenmann H, Schnitzer J (2001) Characterization of microglial cells and their response to stimulation in an organotypic retinal culture system. *J Comp Neurol* 431: 217-227.
- Meyer DB (1977) The avian eye and its adaptations. En: *The visual system in vertebrates* (Crescitelli F, ed). Springer-Verlag, Berlin, pp 549-611.
- Miao J, Ding M, Zhang A, Xiao Z, Qi W, Luo N, Di W, Tao Y, Fang Y (2012) Pleiotrophin promotes microglia proliferation and secretion of neurotrophic factors by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Neurosci Res* 74: 269-276.
- Mildner A, Mack M, Schmidt H, Bruck W, Djukic M, Zabel MD, Hille A, Priller J, Prinz M (2009) CCR2<sup>+</sup>Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain* 132: 2487-2500.
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, Merkler D, Hanisch UK, Mack M, Heikenwalder M, Bruck W, Priller J, Prinz M (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2<sup>+</sup> monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10: 1544-1553.
- Minogue AM, Barrett JP, Lynch MA (2012) LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1beta in a JAK2-dependent manner. *J Neuroinflammation* 9: 126.
- Mitrasinovic OM, Grattan A, Robinson CC, Lapustea NB, Poon C, Ryan H, Phong C, Murphy GMJr (2005) Microglia overexpressing the macrophage colony-stimulating factor receptor are neuroprotective in a microglial-hippocampal organotypic coculture system. *J Neurosci* 25: 4442-4451.
- Miyake K (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* 12: 186-192.
- Miyake T, Shirakawa H, Kusano A, Sakimoto S, Konno M, Nakagawa T, Mori Y, Kaneko S (2014) TRPM2 contributes to LPS/IFNgamma-induced production of nitric oxide via the p38/JNK pathway in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 444: 212-217.
- Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J (2013) Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci* 7: 70.
- Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE (2012) The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J Immunol* 188: 29-36.
- Moncada S, Higgs EA (1991) Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21: 361-374.
- Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C (2006) Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *J Comp Neurol* 499: 565-582.
- Monif M, Burnstock G, Williams DA (2010) Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1753-1756.

- Moos T (1995) Developmental profile of non-heme iron distribution in the rat brain during ontogenesis. *Dev Brain Res* 87: 203-213.
- Moran LB, Graeber MB (2004) The facial nerve axotomy model. *Brain Res Rev* 44: 154-178.
- Morris GP, Clark IA, Zinn R, Vissel B (2013) Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiol Learn Mem* 105: 40-53.
- Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Anisman H, Hayley S, Park DS (2007) Involvement of interferon- $\gamma$  in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 27: 3328-3337.
- Muessel MJ, Harry GJ, Armstrong DL, Storey NM (2013) SDF-1 $\alpha$  and LPA modulate microglia potassium channels through Rho GTPases to regulate cell morphology. *Glia* 61: 1620-1628.
- Munder M (2009) Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol* 158: 638-651.
- Murabe Y, Sano Y (1982) Morphological studies on neuroglia. VI. Postnatal development of microglial cells. *Cell Tissue Res* 225: 469-485.
- Murohara T, Witzendichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM (1999) Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1156-1161.
- Murphy S (2000) Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29: 1-13.
- Nadeau S, Rivest S (2000) Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J Neurosci* 20: 3456-3468.
- Naito M, Umeda S, Yamamoto T, Moriyama H, Umezu H, Hasegawa G, Usuda H, Shultz LD, Takahashi K (1996) Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J Leukoc Biol* 59: 133-138.
- 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. *Neurochem Int* 50: 807-820.
- Nakamura Y (2002) Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull* 25: 945-953.
- Nakanishi Y, Henson PM, Shiratsuchi A (2009) Pattern recognition in phagocytic clearance of altered self. *Adv Exp Med Biol* 653: 129-138.
- Nakazawa T, Tachi S, Aikawa E, Ihnuma M (1993) Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia* 8: 114-121.
- Napoli I, Neumann H (2009) Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158: 1030-1038.
- Nardone S, Sams DS, Reuveni E, Getselter D, Oron O, Karpuj M, Elliott E (2014) DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways. *Transl Psychiatry* 4: e433.
- Navascués J, Calvente R, Marín-Teva JL, Cuadros MA (2000) Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc* 72: 91-102.
- Navascués J, Cuadros MA, Almendros A (1996) Development of microglia: evidence from studies in the avian central nervous system. En: *Topical issues in microglia*



- research (Ling EA, Tan CK, Tan CBC, eds). Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp 43-64.
- Navascués J, Moujahid A, Almendros A, Marín-Teva JL, Cuadros MA (1995) Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol* 354: 209-228.
- Navascués J, Moujahid A, Quesada A, Cuadros MA (1994) Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J Comp Neurol* 350: 171-186.
- Nayak D, Roth TL, McGavern DB (2014) Microglia development and function. *Annu Rev Immunol* 32: 367-402.
- Neher JJ, Neniskyte U, Brown GC (2012) Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration. *Front Pharmacol* 3: 27.
- Neher JJ, Neniskyte U, Zhao JW, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC (2011) Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *J Immunol* 186: 4973-4983.
- Neniskyte U, Neher JJ, Brown GC (2011) Neuronal death induced by nanomolar amyloid beta is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J Biol Chem* 286: 39904-39913.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132: 288-295.
- Newman E, Reichenbach A (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19: 307-312.
- Nikonenko I, Boda B, Steen S, Knott G, Welker E, Muller D (2008) PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *J Cell Biol* 183: 1115-1127.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-1318.
- Nishikawa M, Sato EF, Kuroki T, Utsumi K, Inoue M (1998) Macrophage-derived nitric oxide induces apoptosis of rat hepatoma cells in vivo. *Hepatology* 28: 1474-1480.
- Njie EG, Boelen E, Stassen FR, Steinbusch HVM, Borchelt DR, Streit WJ (2012) Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 33: 195e1-195e12.
- Oehmichen M, Wietholter H, Gencic M (1980) Cytochemical markers for mononuclear phagocytes as demonstrated in reactive microglia and globoid cells. *Acta Histochem* 66: 243-252.
- Ogilvie P, Schilling K, Billingsley ML, Schmidt HH (1995) Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *FASEB J* 9: 799-806.
- Okamoto SI, Lipton SA (2014) S-Nitrosylation in neurogenesis and neuronal development. *Biochim Biophys Acta*, publicado on-line, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.12.013.
- Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV (2009) Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 59: 278-292.
- Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW (2011) Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10: 108-118.
- Oldreive CE, Gaynor S, Doherty GH (2012) Effects of nitric oxide on the survival and neurogenesis of cerebellar Purkinje neurons. *J Mol Neurosci* 46: 336-342.
- Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173: 3916-3924.

- Ono K, Tsumori T, Kishi T, Yokota S, Yasui Y (1998) Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *J Comp Neurol* 398: 309-322.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453-501.
- Origasa M, Tanaka S, Suzuki K, Tone S, Lim B, Koike T (2001) Activation of a novel microglial gene encoding a lysosomal membrane protein in response to neuronal apoptosis. *Mol Brain Res* 88: 1-13.
- Otani Y, Yamaguchi Y, Sato Y, Furuichi T, Ikenaka K, Kitani H, Baba H (2011) PLD4 is involved in phagocytosis of microglia: expression and localization changes of PLD4 are correlated with activation state of microglia. *PLoS One* 6: e27544.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-424.
- Pandit L, Kolodziejaska KE, Zeng S, Eissa NT (2009) The physiologic aggresome mediates cellular inactivation of iNOS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1211-1215.
- Paolicelli RC, Bisht K, Tremblay ME (2014) Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front Cell Neurosci* 8: 129.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333: 1456-1458.
- Parajuli B, Sonobe Y, Kawanokuchi J, Doi Y, Noda M, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A (2012) GM-CSF increases LPS-induced production of proinflammatory mediators via upregulation of TLR4 and CD14 in murine microglia. *J Neuroinflammation* 9: 268.
- Parakalan R, Jiang B, Nimmi B, Janani M, Jayapal M, Lu J, Tay SS, Ling EA, Dheen ST (2012) Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain. *BMC Neurosci* 13: 64.
- Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lievre F, Buck CA (1987) Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100: 339-349.
- Park CS, Pardhasaradhi K, Gianotti C, Villegas E, Krishna G (1994) Human retina expresses both constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 85-91.
- Park KW, Lee DY, Joe EH, Kim SU, Jin BK (2005) Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *J Neurosci Res* 81: 397-402.
- Park SJ, Song HY, Youn HS (2009a) Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of toll-like receptors by isoliquiritigenin in RAW264.7 macrophages. *Mol Cells* 28: 365-368.
- Park SY, Jung MY, Lee SJ, Kang KB, Gratchev A, Riabov V, Kzhyshkowska J, Kim IS (2009b) Stabilin-1 mediates phosphatidylserine-dependent clearance of cell corpses in alternatively activated macrophages. *J Cell Sci* 122: 3365-3373.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155: 1596-1609.
- Pearse DD, Pereira FC, Stolyarova A, Barakat DJ, Bunge MB (2004) Inhibition of tumour necrosis factor-alpha by antisense targeting produces immunophenotypical and morphological changes in injury-activated microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* 20: 3387-3396.

- Penfold PL, Madigan MC, Provis JM (1991) Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci* 7: 383-388.
- Peng B, Xiao J, Wang K, So KF, Tipoe GL, Lin B (2014) Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa. *J Neurosci* 34: 8139-8150.
- Perez RG, Halfter W (1993) Tenascin in the developing chick visual system: distribution and potential role as a modulator of retinal axon growth. *Dev Biol* 156: 278-292.
- 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, Gordon S (1991) Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 125: 203-244.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15: 313-326.
- Perry VH, Lund RD (1990) Evidence that the lamina cribrosa prevents intraretinal myelination of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol* 19: 265-272.
- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6: 193-201.
- Perry VH, O'Connor V (2010) The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN Neuro* 2: e00047.
- Persson AK, Estacion M, Ahn H, Liu S, Stamboulian-Platel S, Waxman SG, Black JA (2014) Contribution of sodium channels to lamellipodial protrusion and Rac1 and ERK1/2 activation in ATP-stimulated microglia. *Glia* 62: 2080-2095.
- Petersen MA, Dailey ME (2004) Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46: 195-206.
- Peunova N, Enikolopov G (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375: 68-73.
- Piccinini AM, Midwood KS (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010.
- Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci* 30: 527-535.
- Polazzi E, Contestabile A (2006) Overactivation of LPS-stimulated microglial cells by co-cultured neurons or neuron-conditioned medium. *J Neuroimmunol* 172: 104-111.
- Polazzi E, Monti B (2010) Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol* 92: 293-315.
- Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN (2007) CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci* 27: 10714-10721.
- Ponomarev ED, Veremeyko T, Weiner HL (2013) MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. *Glia* 61: 91-103.
- Pont-Lezica L, Béchade C, Belarif-Cantaut Y, Pascual O, Bessis A (2011) Physiological roles of microglia during development. *J Neurochem* 119: 901-908.
- Possel H, Noack H, Putzke J, Wolf G, Sies H (2000) Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia* 32: 51-59.

- Pöttler M, Zierler S, Kerschbaum HH (2006) An artificial three-dimensional matrix promotes ramification in the microglial cell-line, BV-2. *Neurosci Lett* 410: 137-140.
- Prada FA, Quesada A, Dorado ME, Chmielewski C, Prada C (1998) Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia* 22: 221-236.
- Prinz M, Mildner A (2011) Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 59: 177-187.
- Prinz M, Priller J (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 15: 300-312.
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 14: 1227-1235.
- Provis JM (2001) Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 20: 799-821.
- Qin L, Liu Y, Hong JS, Crews FT (2013) NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia* 61: 855-868.
- Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block ML, Wilson B, Liu B, Hong JS (2004) NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem* 279: 1415-1421.
- Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55: 453-462.
- Radi R (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem* 288: 26464-26472.
- Raivich G (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 28: 571-573.
- Raivich G, Haas S, Werner A, Klein MA, Kloss C, Kreutzberg GW (1998) Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J Comp Neurol* 395: 342-358.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 30: 77-105.
- Rajbhandari L, Tegenge MA, Shrestha S, Ganesh Kumar N, Malik A, Mithal A, Hosmane S, Venkatesan A (2014) Toll-like receptor 4 deficiency impairs microglial phagocytosis of degenerating axons. *Glia* 62: 1982-1991.
- Rankine EL, Hughes PM, Botham MS, Perry VH, Felton LM (2006) Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. *Eur J Neurosci* 24: 77-86.
- Ransohoff RM, Cardona AE (2010) The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468: 253-262.
- Ransohoff RM, Engelhardt B (2012) The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 12: 623-635.
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27: 119-145.
- Rathnasamy G, Sivakumar V, Rangarajan P, Foulds WS, Ling EA, Kaur C (2014) NF- $\kappa$ B-mediated nitric oxide production and activation of caspase-3 cause retinal

- ganglion cell death in the hypoxic neonatal retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55: 5878-5889.
- Ravichandran KS (2010) Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med* 207: 1807-1817.
- Ravichandran KS (2011) Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35: 445-455.
- Rawji KS, Yong VW (2013) The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol* 2013: 948976.
- Regen T, van Rossum D, Scheffel J, Kastriiti ME, Revelo NH, Prinz M, Bruck W, Hanisch UK (2011) CD14 and TRIF govern distinct responsiveness and responses in mouse microglial TLR4 challenges by structural variants of LPS. *Brain Behav Immun* 25: 957-970.
- Reichenbach A, Bringmann A (2010) Müller cells in the healthy and diseased retina. Springer, New York.
- Reichenbach A, Robinson SR (1995) Phylogenetic constraints on retinal organisation and development. *Prog Ret Eye Res* 15: 139-171.
- Reichenbach A, Stolzenburg JU, Eberhardt W, Chao TI, Dettmer D, Hertz L (1993) What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *J Chem Neuroanat* 6: 201-213.
- Rezaie P, Dean A, Male D, Ulfing N (2005) Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cereb Cortex* 15: 938-949.
- Rezaie P, Hanisch UK (2014) Historical Context. En: *Microglia in health and disease* (Tremblay ME, Sierra A, eds). Springer, New York, pp 7-46.
- Rezaie P, Male D (1999) Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc Res Tech* 45: 359-382.
- Rezaie P, Trillo-Pazos G, Greenwood J, Everall IP, Male DK (2002) Motility and ramification of human fetal microglia in culture: an investigation using time-lapse video microscopy and image analysis. *Exp Cell Res* 274: 68-82.
- Rigato C, Buckinx R, Le-Corronc H, Rigo JM, Legendre P (2011) Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* 59: 675-695.
- Rigato C, Swinnen N, Buckinx R, Couillin I, Mangin JM, Rigo JM, Legendre P, Le Corronc H (2012) Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *J Neurosci* 32: 11559-11573.
- Riobó NA, Clementi E, Melani M, Boveris A, Cadenas E, Moncada S, Poderoso JJ (2001) Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH: ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* 359: 139-145.
- Ríos H, López-Costa JJ, Fosser NS, Brusco A, Saavedra JP (2000) Development of nitric oxide neurons in the chick embryo retina. *Dev Brain Res* 120: 17-25.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245: 154-160.
- Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15038-15043.
- Rodieck RW (1998) *First steps in seeing*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- 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.
- Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, Hudson CE, Peters MM, Grimmig BA, Weeber EJ, Bickford PC, Gemma C (2011) CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci* 31: 16241-16250.
- Röhl C, Armbrust E, Herbst E, Jess A, Gülden M, Maser E, Rimbach G, Bösch-Saadatmandi C (2010) Mechanisms involved in the modulation of astroglial resistance to oxidative stress induced by activated microglia: antioxidative systems, peroxide elimination, radical generation, lipid peroxidation. *Neurotox Res* 17: 317-331.
- Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM (2014) Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation* 11: 133.
- Rompani SB, Cepko CL (2010) A common progenitor for retinal astrocytes and oligodendrocytes. *J Neurosci* 30: 4970-4980.
- Rosenstiel P, Lucius R, Deuschl G, Sievers J, Wilms H (2001) From theory to therapy: implications from an in vitro model of ramified microglia. *Microsc Res Tech* 54: 18-25.
- Rotshenker S (2009) The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. *J Mol Neurosci* 39: 99-103.
- Roy A, Jana A, Yatish K, Freidt MB, Fung YK, Martinson JA, Pahan K (2008) Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 45: 686-699.
- Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen Sand F, Lang R, Uv A, Betsholtz C (2011) A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PLoS One* 6: e15846.
- Saha RN, Pahan K (2006) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 8: 929-947.
- Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11: 775-787.
- Sajjan S, Holsinger RM, Fok S, Ebrahimkhani S, Rollo JL, Banati RB, Graeber MB (2014) Up-regulation of matrix metalloproteinase 12 in motor neurons undergoing synaptic stripping. *Neuroscience* 274: 331-340.
- Salimi K, Humpel C (2002) Down-regulation of complement receptor 3 and major histocompatibility complex I and II antigen-like immunoreactivity accompanies ramification in isolated rat microglia. *Brain Res* 946: 283-289.
- Salter MW, Beggs S (2014) Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell* 158: 15-24.
- Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP (2000) Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol* 417: 431-447.
- Sánchez-López A, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J (2004) Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia* 46: 261-273.

- Sánchez-Lopez AM, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marín-Teva JL, Navascués J (2005) Activation of immature microglia in response to stab wound in embryonic quail retina. *J Comp Neurol* 492: 20-33.
- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martín-Oliva D, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA (2008) Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506: 224-239.
- Savli H, Gulkac MD, Esen N (2004) The effect of stimulated microglia conditioned media on BDNF gene expression of striatal astrocytes: quantification by real-time PCR. *Int J Neurosci* 114: 1601-1612.
- Sawada M, Sawada H, Nagatsu T (2008) Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis* 5: 254-256.
- Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H, Marunouchi T (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res* 509: 119-124.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74: 691-705.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B (2013) The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia* 61: 24-36.
- Scheffel J, Regen T, Van Rossum D, Seifert S, Ribes S, Nau R, Parsa R, Harris RA, Boddeke HW, Chuang HN, Pukrop T, Wessels JT, Jurgens T, Merkler D, Bruck W, Schnaars M, Simons M, Kettenmann H, Hanisch UK (2012) Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. *Glia* 60: 1930-1943.
- Schilling M, Strecker JK, Ringelstein EB, Schabitz WR, Kiefer R (2009) The role of CC chemokine receptor 2 on microglia activation and blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 1289: 79-84.
- Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C (2001) Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K<sup>+</sup> channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur J Neurosci* 14: 463-473.
- Schlegelmilch T, Henke K, Peri F (2011) Microglia in the developing brain: from immunity to behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 21: 5-10.
- Schmid CD, Melchior B, Masek K, Puntambekar SS, Danielson PE, Lo DD, Sutcliffe JG, Carson MJ (2009) Differential gene expression in LPS/IFN $\gamma$  activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J Neurochem* 109 Suppl 1: 117-125.
- Schnitzer J (1985) Distribution and immunoreactivity of glia in the retina of the rabbit. *J Comp Neurol* 240: 128-142.
- Schnitzer J (1987) Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci Lett* 78: 29-34.
- Schnitzer J (1988) Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia* 1: 74-89.
- Schnitzer J (1989) Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol* 282: 249-263.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F

- (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86-90.
- Sedel F, Béchade C, Vyas S, Triller A (2004) Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. *J Neurosci* 24: 2236-2246.
- Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT (2005) Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat* 30: 144-157.
- Seo JH, Haam YG, Park SW, Kim DW, Jeon GS, Lee C, Hwang DH, Kim YS, Cho SS (2001) Oligodendroglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult bird. *J Neurosci Res* 65: 173-183.
- Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E (2003) NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res* 988: 193-198.
- Shankaran M, Marino ME, Busch R, Keim C, King C, Lee J, Killion S, Awada M, Hellerstein MK (2007) Measurement of brain microglial proliferation rates in vivo in response to neuroinflammatory stimuli: application to drug discovery. *J Neurosci Res* 85: 2374-2384.
- Shen YH, Wang XL, Wilcken DE (1998) Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. *FEBS Lett* 433: 125-131.
- Sheng W, Zong Y, Mohammad A, Ajit D, Cui J, Han D, Hamilton JL, Simonyi A, Sun AY, Gu Z, Hong JS, Weisman GA, Sun GY (2011) Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of ERK1/2, iNOS and sPLA<sub>2</sub>-IIA expression in astrocytes and microglia. *J Neuroinflammation* 8: 121.
- Sheridan GK, Murphy KJ (2013) Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol* 3: 130181.
- Shideman CR, Hu S, Peterson PK, Thayer SA (2006) CCL5 evokes calcium signals in microglia through a kinase-, phosphoinositide-, and nucleotide-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 83: 1471-1484.
- Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34: 2231-2243.
- Siamwala JH, Reddy SH, Majumder S, Kolluru GK, Muley A, Sinha S, Chatterjee S (2010) Simulated microgravity perturbs actin polymerization to promote nitric oxide associated migration in human immortalized Eahy926 cells. *Protoplasma* 242: 3-12.
- Siamwala JH, Veeriah V, Priya MK, Rajendran S, Saran U, et al. (2012) Nitric oxide rescues thalidomide mediated teratogenicity. *Sci Rep* 2: 679.
- Siddiqui TA, Lively S, Vincent C, Schlichter LC (2012) Regulation of podosome formation, microglial migration and invasion by Ca<sup>2+</sup>-signaling molecules expressed in podosomes. *J Neuroinflammation* 9: 250.
- Sierra A, Abiega O, Shahrzad A, Neumann H (2013) Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci* 7: 6.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, et al. (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7: 483-495.
- Sierra A, Tremblay ME (2014) Adult neurogenesis, learning and memory. En: *Microglia in health and disease* (Tremblay ME, Sierra A, eds). Springer, New York, pp 249-271.



- Sierra-Martín A, Navascués J, Cuadros MA, Calvente R, Martín-Oliva D, Ferrer-Martín RM, Martín-Estebane M, Carrasco MC, Marín-Teva JL (2014) Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in microglia of the developing quail retina. *PLoS One* 9: e106048.
- Singhal S, Lawrence JM, Salt TE, Khaw PT, Limb GA (2010) Triamcinolone attenuates macrophage/microglia accumulation associated with NMDA-induced RGC death and facilitates survival of Muller stem cell grafts. *Exp Eye Res* 90: 308-315.
- Sivakumar V, Foulds WS, Luu CD, Ling EA, Kaur C (2011) Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina. *J Pathol* 224: 245-260.
- Slepkó N, Levi G (1996) Progressive activation of adult microglial cells in vitro. *Glia* 16: 241-246.
- Small RK, Riddle P, Noble M (1987) Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* 328: 155-157.
- Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87: 10-20.
- Smith PL, Hagberg H, Naylor AS, Mallard C (2014) Neonatal peripheral immune challenge activates microglia and inhibits neurogenesis in the developing murine hippocampus. *Dev Neurosci* 36: 119-131.
- Socodato R, Brito R, Portugal CC, de Oliveira NA, Calaza KC, Paes-de-Carvalho R (2014) The nitric oxide-cGKII system relays death and survival signals during embryonic retinal development via AKT-induced CREB1 activation. *Cell Death Differ* 21: 915-928.
- Socodato R, Portugal CC, Encarnação TG, Domith I, Cossenza M, Paes-de-Carvalho R (2013) Studying nitric oxide in the developing retina: neuromodulatory functions and signaling mechanisms. *Open Nitric Oxide J* 4: 1-15.
- Sorce S, Krause KH (2009) NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal* 11: 2481-2504.
- Sorokin SP, Hoyt RF, Jr., Blunt DG, McNelly NA (1992) Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anat Rec* 232: 527-550.
- Spittau B, Rilka J, Steinfath E, Zoller T, Krieglstein K (2015) TGFβ1 increases microglia-mediated engulfment of apoptotic cells via upregulation of the milk fat globule-EGF factor 8. *Glia* 63: 142-153.
- Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP (2006) Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-α. *FASEB J* 20: 670-682.
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B (2012) The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci* 35: 369-389.
- Stence N, Waite M, Dailey ME (2001) Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33: 256-266.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B, Sher A, Litke AM, Lambris JD, Smith SJ, John SW, Barres BA (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131: 1164-1178.
- Stoker MG, Rubin H (1967) Density dependent inhibition of cell growth in culture. *Nature* 215: 171-172.

- Stolzing A, Grune T (2004) Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *Faseb J* 18: 743-745.
- Stone J, Dreher Z (1987) Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255: 35-49.
- Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E (1995) Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 15: 4738-4747.
- Stoppini L, Buchs PA, Müller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-182.
- Streit WJ (2001) Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology* 22: 619-624.
- Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133-139.
- Streit WJ (2006) Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* 29: 506-510.
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL (2004) Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45: 208-212.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563-581.
- Streit WJ, Xue QS (2009) Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4: 371-379.
- Sunnemark D, Eltayeb S, Nilsson M, Wallstrom E, Lassmann H, Olsson T, Berg AL, Ericsson-Dahlstrand A (2005) CX3CL1 (fractalkine) and CX3CR1 expression in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: kinetics and cellular origin. *J Neuroinflammation* 2: 17.
- Svahn AJ, Graeber MB, Ellett F, Lieschke GJ, Rinkwitz S, Bennett MR, Becker TS (2013) Development of ramified microglia from early macrophages in the zebrafish optic tectum. *Dev Neurobiol* 73: 60-71.
- Swinnen N, Smolders S, Avila A, Notelaers K, Paesen R, Ameloot M, Brone B, Legendre P, Rigo JM (2013) Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* 61: 150-163.
- Takahashi K, Naito M, Takeya M (1996) Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int* 46: 473-485.
- Takahashi K, Yamamura F, Naito M (1989) Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 45: 87-96.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376.
- Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol* 85: 352-370.
- Tanaka J, Maeda N (1996) Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. *Exp Neurol* 137: 367-375.
- Tanaka J, Toku K, Sakanaka M, Maeda N (1999) Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neurosci Res* 34: 207-215.
- Tanaka Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M (2013) Increased lysosomal biogenesis in activated microglia and exacerbated neuronal damage after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. *Neuroscience* 250: 8-19.

- Tang Z, Gan Y, Liu Q, Yin JX, Shi J, Shi FD (2014) CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke. *J Neuroinflammation* 11: 26.
- Tekmen-Clark M, Gleason E (2013) Nitric oxide production and the expression of two nitric oxide synthases in the avian retina. *Vis Neurosci* 30: 91-103.
- Terubayashi H, Murabe Y, Fujisawa H, Itoi M, Iyata Y (1984) Enzymohistochemical identification of microglial cells in the rat retina: light and electron microscopic studies. *Exp Eye Res* 39: 595-603.
- Thanos S (1991) The relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur J Neurosci* 3: 1189-1207.
- Thomas WE (1999) Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Rev* 31: 42-57.
- Togashi H, Sakuma I, Yoshioka M, Kobayashi T, Yasuda H, Kitabatake A, Saito H, Gross SS, Levi R (1992) A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 343-347.
- Trang T, Beggs S, Salter MW (2012) ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain. *Exp Neurol* 234: 354-361.
- 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.
- Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8: e1000527.
- Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31: 16064-16069.
- Tremblay ME, Paolicelli RC, Stevens B, Wake H, Bessis A (2014) Developing and mature synapses. En: *Microglia in health and disease* (Tremblay ME, Sierra A, eds). Springer, New York, pp 223-248.
- Tremblay S, Miloudi K, Chaychi S, Favret S, Binet F, Polosa A, Lachapelle P, Chemtob S, Sapiéha P (2013) Systemic inflammation perturbs developmental retinal angiogenesis and neuroretinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 8125-8139.
- Tyurina YY, Basova LV, Konduru NV, Tyurin VA, Potapovich AI, Cai P, Bayir H, Stoyanovsky D, Pitt BR, Shvedova AA, Fadeel B, Kagan VE (2007) Nitrosative stress inhibits the aminophospholipid translocase resulting in phosphatidylserine externalization and macrophage engulfment: implications for the resolution of inflammation. *J Biol Chem* 282: 8498-8509.
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 16: 543-551.
- Ueno M, Yamashita T (2014) Bidirectional tuning of microglia in the developing brain: from neurogenesis to neural circuit formation. *Curr Opin Neurobiol* 27: 8-15.
- van Furth R, Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128: 415-435.
- Vela JM, Dalmau I, González B, Castellano B (1995) Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 361: 602-616.
- Vela-Hernández JM, Dalmau I, González B, Castellano B (1997) Abnormal expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the spinal cord of the hypomyelinated jimpy mutant mice. *Brain Res* 747: 130-139.

- Velasco A, Jimeno D, Lillo C, Caminos E, Lara JM, Aijon J (1999) Enzyme histochemical identification of microglial cells in the retina of a fish (*Tinca tinca*). *Neurosci Lett* 263: 101-104.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51.
- Verney C, Monier A, Fallet-Bianco C, Gressens P (2010) Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat* 217: 436-448.
- Villacampa N, Almolda B, González B, Castellano B (2013) Tomato lectin histochemistry for microglial visualization. *Methods Mol Biol* 1041: 261-279.
- Villar-Cerviño V, Molano-Mazón M, Catchpole T, Valdeolillos M, Henkemeyer M, Martínez LM, Borrell V, Marín O (2013) Contact repulsion controls the dispersion and final distribution of Cajal-Retzius cells. *Neuron* 77: 457-471.
- Vincent C, Siddiqui TA, Schlichter LC (2012) Podosomes in migrating microglia: components and matrix degradation. *J Neuroinflammation* 9: 190.
- Voss EV, Skuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, Stangel M (2012) Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiol Dis* 45: 519-528.
- Vrabec F (1970) Microglia in the monkey and rabbit retina. *J Neuropathol Exp Neurol* 29: 217-224.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29: 3974-3980.
- Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J (2011) Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol* 7: 47-53.
- Wake H, Moorhouse AJ, Miyamoto A, Nabekura J (2013) Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci* 36: 209-217.
- Wakselman S, Béchade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A (2008) Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 28: 8138-8143.
- Walker FR, Beynon SB, Jones KA, Zhao Z, Kongsui R, Cairns M, Nilsson M (2014) Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain Behav Immun* 37: 1-14.
- Walker FR, Nilsson M, Jones K (2013) Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets* 14: 1262-1276.
- Walter L, Neumann H (2009) Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. *Semin Immunopathol* 31: 513-525.
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP2nd, Scheffler B, Steindler DA (2006) Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54: 815-825.
- Wang AL, Yu AC, Lau LT, Lee C, Wu le M, Zhu X, Tso MO (2005) Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. *Neurochem Int* 47: 152-158.
- Wang CC, Wu CH, Shieh JY, Wen CY, Ling EA (1996) Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J Anat* 189: 567-574.
- Wang K, Peng B, Lin B (2014) Fractalkine receptor regulates microglial neurotoxicity in an experimental mouse glaucoma model. *Glia* 62: 1943-1954.

- Wang L, Zhu ZA (2014) Nitric oxide show its survival role by NO-PKC pathway through cGMP-dependent or independent on the culture of cerebella granular neurons. *Neurosci Lett* 583: 165-169.
- Wang M, Ma W, Zhao L, Fariss RN, Wong WT (2011) Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *J Neuroinflammation* 8: 173.
- Wang Q, Zhou H, Gao H, Chen SH, Chu CH, Wilson B, Hong JS (2012) Naloxone inhibits immune cell function by suppressing superoxide production through a direct interaction with gp91phox subunit of NADPH oxidase. *J Neuroinflammation* 9: 32.
- Wang X, Li C, Chen Y, Hao Y, Zhou W, Chen C, Yu Z (2008) Hypoxia enhances CXCR4 expression favoring microglia migration via HIF-1 $\alpha$  activation. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 283-288.
- Wang X, Sam-Wah Tay S, Ng YK (2000) Nitric oxide, microglial activities and neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus of glaucomatous rats. *Brain Res* 878: 136-147.
- Wegiel J, Wisniewski HM, Dziewiatkowski J, Tarnawski M, Kozielski R, Trenkner E, Wiktor-Jedrzejczak W (1998) Reduced number and altered morphology of microglial cells in colony stimulating factor-1-deficient osteopetrotic op/op mice. *Brain Res* 804: 135-139.
- Wei C, Wang X, Zheng M, Cheng H (2012) Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 24: 254-261.
- Wei T, Chen C, Hou J, Xin W, Mori A (2000) Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta* 1498: 72-79.
- Wen J, Ribeiro R, Zhang Y (2011) Specific PKC isoforms regulate LPS-stimulated iNOS induction in murine microglial cells. *J Neuroinflammation* 8: 38.
- West H, Richardson WD, Fruttiger M (2005) Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development* 132: 1855-1862.
- Wieghofer P, Knobloch KP, Prinz M (2015) Genetic targeting of microglia. *Glia* 63: 1-22.
- Wilson M, Nacsá N, Hart NS, Weller C, Vaney DI (2011) Regional distribution of nitergic neurons in the inner retina of the chicken. *Vis Neurosci* 28: 205-220.
- Wohl SG, Schmeer CW, Friese T, Witte OW, Isenmann S (2011) In situ dividing and phagocytosing retinal microglia express nestin, vimentin, and NG2 in vivo. *PLoS One* 6: e22408.
- Wohl SG, Schmeer CW, Witte OW, Isenmann S (2010) Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2686-2696.
- Won MH, Kang TC, Cho SS (2000) Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microsc Res Tech* 50: 151-160.
- Woo MS, Park JS, Choi IY, Kim WK, Kim HS (2008) Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *J Neurochem* 106: 770-780.
- Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN (2001) The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology* 102: 173-179.

- Wu CH, Chien HF, Chang CY, Ling EA (1997) Heterogeneity of antigen expression and lectin labeling on microglial cells in the olfactory bulb of adult rats. *Neurosci Res* 28: 67-75.
- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1993) A quantitative study of the differentiation of microglial cells in the developing cerebral cortex in rats. *J Anat* 182: 403-413.
- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1994) Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J Neurocytol* 23: 258-269.
- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1996) Use of lectin as a tool for the study of microglial cells: expression and regulation of lectin receptors in normal development and under experimental conditions. En: *Topical issues in microglia research* (Ling EA, Tan CK, Tan CBC, eds). Singapore Neuroscience Association, Singapore, pp 83-202.
- Wu Y, Tibrewal N, Birge RB (2006) Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol* 16: 189-197.
- Xie Z, Wei M, Morgan TE, Fabrizio P, Han D, Finch CE, Longo VD (2002) Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. *J Neurosci* 22: 3484-3492.
- Yamada J, Sawada M, Nakanishi H (2006) Cell cycle-dependent regulation of kainate-induced inward currents in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 913-919.
- Yamamoto S, Nakajima K, Kohsaka S (2010) Macrophage-colony stimulating factor as an inducer of microglial proliferation in axotomized rat facial nucleus. *J Neurochem* 115: 1057-1067.
- Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA (2010) Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 7: 378-391.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809.
- Zeiss CJ, Johnson EA (2004) Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 971-976.
- Zelinka CP, Scott MA, Volkov L, Fischer AJ (2012) The reactivity, distribution and abundance of Non-astrocytic Inner Retinal Glial (NIRG) cells are regulated by microglia, acute damage, and IGF1. *PLoS One* 7: e44477.
- Zeng HY, Zhu XA, Zhang C, Yang LP, Wu LM, Tso MO (2005) Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2992-2999.
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci* 17: 400-406.
- Zhang J, Geula C, Lu C, Koziel H, Hatcher LM, Roisen FJ (2003) Neurotrophins regulate proliferation and survival of two microglial cell lines in vitro. *Exp Neurol* 183: 469-481.
- Zhang W, Rojas M, Lilly B, Tsai NT, Lemtalsi T, Liou GI, Caldwell RW, Caldwell RB (2009) NAD(P)H oxidase-dependent regulation of CCL2 production during retinal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 3033-3040.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications

- in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 34: 1359-1368.
- Zhao J, Brooks DM, Lurie DI (2006) Lipopolysaccharide-activated SHP-1-deficient microglia release increased nitric oxide, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . *Glia* 53: 304-312.
- Zhou X, Gordon SA, Kim YM, Hoffman RA, Chen Y, Zhang XR, Simmons RL, Ford HR (2000) Nitric oxide induces thymocyte apoptosis via a caspase-1-dependent mechanism. *J Immunol* 165: 1252-1258.
- Ziebell JM, Adelson PD, Lifshitz J (2014) Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury. *Metab Brain Dis*, publicado on-line, doi: 10.1007/s11011-014-9539-y.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9: 268-275.
- Zusso M, Methot L, Lo R, Greenhalgh AD, David S, Stifani S (2012) Regulation of postnatal forebrain amoeboid microglial cell proliferation and development by the transcription factor Runx1. *J Neurosci* 32: 11285-11298.





## **Conclusiones**

---



**Primera.** La enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se expresa en la retina de codorniz desde etapas tempranas del desarrollo embrionario hasta la edad adulta, tal como se demuestra mediante PCR a tiempo real.

**Segunda.** Las células microgliales ameboides de la retina embrionaria de codorniz muestran un fuerte inmunomarcaje de iNOS, que evidencia la producción de óxido nítrico en las mismas. Puesto que la expresión de iNOS se considera un marcador de activación, se puede afirmar que la microglía ameboides tiene un nivel de activación basal durante el desarrollo normal de la retina de codorniz.

**Tercera.** El inmunomarcaje de iNOS disminuye significativamente cuando la microglía ameboides de la retina embrionaria se diferencia en microglía ramificada, aunque sigue estando presente en la microglía de la retina adulta. Por lo tanto, la activación basal se va reduciendo durante el proceso de diferenciación microglial.

**Cuarta.** El tratamiento con LPS de explantes de retina de embriones de codorniz de 8 días de incubación cultivados *in vitro* induce importantes cambios morfológicos en la microglía ameboides, con un mayor redondeamiento, así como un incremento de su compartimento lisosómico. De estos resultados se deduce que la microglía ameboides de la retina embrionaria aumenta su nivel de activación basal en respuesta a la acción del LPS, pasando a un estado de mayor activación que hemos denominado sobreactivación inducida por LPS.

**Quinta.** El LPS no altera la estructura laminar básica de la retina ni la distribución general de neuronas Islet 1-positivas en explantes de retina embrionaria de 8 días de incubación cultivados *in vitro*.

**Sexta.** El tratamiento con LPS disminuye la viabilidad celular en explantes de retina embrionaria de codorniz de 8 días de incubación e induce un significativo

incremento de la apoptosis de células ganglionares, tal como se demuestra en experiencias de citometría de flujo tras el marcaje con anexina V y de cuantificación de fragmentos apoptóticos identificados con la técnica TUNEL. Además, el tratamiento con LPS provoca una significativa disminución del número de células ganglionares Islet-1-positivas. Estos resultados demuestran que el LPS induce la eliminación mediante apoptosis de una parte de la población de células ganglionares.

**Séptima.** El tratamiento con LPS de los explantes de retina provoca un incremento de los contactos fagocíticos entre células microgliales sobreactivadas y células ganglionares en fases tempranas de la apoptosis, sugiriendo que el mecanismo de eliminación apoptótica de las células ganglionares está mediado por la fagocitosis microglial.

**Octava.** La sobreactivación inducida por LPS incrementa la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico, pero no de aniones superóxido, en la microglía ameboide de los explantes de retina, por lo que el óxido nítrico podría estar implicado en el mecanismo de apoptosis de células ganglionares inducido por el tratamiento con LPS.

**Novena.** El L-NMMA, un inhibidor de las óxido nítrico sintasas, no revierte los cambios morfológicos inducidos por LPS en las células microgliales sobreactivadas de explantes de retina embrionaria de codorniz, pero provoca una fuerte disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno en dichas células, consiguiendo revertir los efectos del LPS sobre dicha producción.

**Décima.** La inhibición de iNOS con L-NMMA revierte el efecto del LPS sobre la apoptosis de células ganglionares, disminuyendo la proporción de células anexina V-positivas y de fragmentos TUNEL-positivos hasta el nivel observado en explantes control no sometidos a ningún tratamiento. Además, el L-NMMA

rescata el porcentaje de células Islet-1-positivas perdido por efecto del LPS. Estos resultados indican que el óxido nítrico producido por la iNOS de la microglía sobreactivada juega un papel en el mecanismo de apoptosis de células ganglionares Islet-1-positivas inducida por LPS.

