UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Biología Celular

Origen y entrada de precursores microgliales durante el desarrollo embrionario de la retina de codorniz

Programa de Doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas

(Universidad de Granada)

TESIS DOCTORAL

María Martín Estebané

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: María Martín Estebane
ISBN: 978-84-9163-550-5
URI: http://hdl.handle.net/10481/48350

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular

Origen y entrada de precursores microgliales durante el desarrollo embrionario de la retina de codorniz

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

Memoria presentada por **MARÍA MARTÍN ESTEBANÉ**, 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.

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 30 de julio de 2017.

Granada a 1 de septiembre de 2017

Fdo. María Martín Estebané

AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

1.- Datos personales del autor de la Tesis	
Apellidos: MARTÍN ESTEBANÉ	Nombre: MARÍA

2.- Datos académicos
Programa de Doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas
Título de la Tesis: Origen y entrada de precursores microgliales durante el desarrollo embrionario de la retina de codorniz

3.- Autorización del Director/es	
D/Dª: JOSÉ LUIS MARÍN TEVA	
Departamento/Instituto/Institución: DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR	
D/Dª: JULIO NAVASCUÉS MARTÍNEZ	
Departamento/Instituto/Institución: DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR	

Como Directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza el trabajo ha sido realizado por el/la doctorando/a bajo nuestra dirección y se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones. Así mismo, el trabajo reúne todos los requisitos de contenido, teóricos y metodológicos para ser admitido a trámite, a su lectura y defensa pública, con el fin de obtener el referido Título de Doctor, y por lo tanto AUTORIZAMOS la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero,

Granada a 1 de septiembre de 2017

Directores de la Tesis

Fdo. José Luis Marín Teva

Fdo. Julio Navascués Martínez

SR. COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y DE SISTEMAS

El doctorando / The *doctoral candidate* **[MARÍA MARTÍN ESTEBANÉ]** y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: **[JULIO NAVASCUÉS MARTÍNEZ Y JOSÉ LUIS MARÍN TEVA]**

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.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / Place and date:

Granada, a 1 de Septiembre de 2017

Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s;*

JULIO NAVASCUÉS MARTÍNEZ

JOSÉ LUIS MARÍN TEVA

Firma / Signed

Doctorando / *Doctoral candidate*:

Firma / Signed

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 BFU2010-19981. La investigación desarrollada ha sido parcialmente financiada por los siguientes proyectos:

REFERENCIA DEL PROYECTO: BFU2010-19981
ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Ciencia e Innovación
INVESTIGADOR PRINCIPAL: Julio Navascués Martínez

AGRADECIMIENTOS

Hace ahora seis años que comencé esta aventura cargada de ilusión y energía, deseosa de poder dedicarme a lo que me apasionaba y para lo que tanto había estudiado. Hoy, miro hacia atrás y me parece mentira lo rápido que han pasado los años… Ha sido un camino duro e intenso, con muchos momentos difíciles de los que te ponen a prueba, pero también lleno de momentos buenos y experiencias inolvidables. En todos esos momentos he tenido la suerte de estar acompañada por personas maravillosas, sin las cuales no estaría hoy escribiendo estas palabras y a las que les debo mi más sincero agradecimiento.

A mis directores de Tesis:

José Luis Marín, por guiarme en este camino. Por enseñarme a pensar por mí misma, a ser autónoma y resolutiva, a no depender de nadie para conseguir lo que he necesitado. Por tus palabras de ánimo cuando las cosas no salían como esperábamos y había que empezar de cero.

Julio Navascués, por darme la oportunidad de iniciar mi carrera científica en el apasionante campo de la Neurociencia, por tu compromiso hacia mí, tu constancia y perseverancia en el trabajo. Por tu entrega total en la elaboración y corrección de este manuscrito. Y, sobre todo, por escucharme y transmitirme fuerza y esperanza en mis momentos más bajos, ¡parecía imposible pero lo hemos conseguido! Gracias de verdad, eres un ejemplo para mí.

A mis compañeros del Departamento de Biología Celular:

Gracias a todos y cada uno de vosotros por los buenos momentos vividos, el interés y los ánimos durante todos estos años y especialmente en la última etapa. Gracias Mari Carmen por tu comprensión y tus palabras cuando me veías decaída. Por todos los buenos ratos de risas y cachondeo junto con Juanjo, ¡gracias a los dos! Quiero hacer mención especial a David, por enseñarme gran parte de lo que he aprendido a nivel experimental, por guiarme en mis primeros

pasos en el laboratorio, por tus buenas ideas y tu apoyo siempre.Y, por último, gracias en mayúsculas a Chary. Llegaste al Departamento al principio de este camino y te has convertido en alguien importante para mí. Gracias por el cariño que me demuestras, por estar ahí siempre para animarme y por todo lo que me has enseñado en este tiempo. Gracias por transmitirme tu pasión por la Ciencia, por creer en mí y recordarme por qué me embarqué en esta aventura, haces que quiera seguir superándome profesionalmente. Gracias, de corazón, por darme alas.

Quiero agradecer también su aportación a este trabajo a los técnicos del Centro de Instrumentación Científica. A David Porcel, responsable del Servicio de Microscopía, por todas las horas compartidas tomando las preciosas imágenes que se presentan en este manuscrito. A Jaime Lazuén, responsable del Servicio de Citometría de flujo, por tu valiosa ayuda en estos últimos meses de locura, por tu disponibilidad cuando íbamos a contrarreloj y tus buenos consejos. Por tu eficacia y compromiso con el trabajo y por los ratos de risas y charlas sobre nuestra querida Costa Tropical, gracias.

Una de las experiencias más increíbles que he vivido en estos años ha sido poder realizar mi estancia de investigación en una de las ciudades más maravillosas del mundo, París, a la que estoy deseando volver para recorrer mis rincones favoritos. Ha sido la experiencia más enriquecedora de mi vida en todos los aspectos, un soplo de aire fresco a nivel profesional y uno de mis mayores retos a nivel personal. Quiero agradecer a Pascal Legendre, Jean Marie Mangin y al resto de compañeros de Jussieu por acogerme en su grupo de investigación y tratarme como si fuera una más desde el primer momento. Y gracias especialmente a mis compis de laboratorio, que me acompañaron cada día y a las que hoy considero amigas. Gracias Sophie y Monara, por todos nuestros momentos de risas, las comidas del Picard, las meriendas con la “Caja de Pandora”… porque sois de lo más importante que me traje de París.

Ahora me toca dar las gracias a las personas que han estado conmigo día a día en nuestro pequeño universo, el laboratorio IV. A Rosa, por tu dedicación y disponibilidad en la primera etapa de este camino. A Ana, por enseñarme tantísimas cosas del trabajo de laboratorio y por estar ahí cuando lo he necesitado, incluso en la distancia. Por todos los buenos momentos que pasamos juntas, gracias. Y, por último, a mi querida Sandra. Has sido mi apoyo cada día en estos dos últimos años. Me has entendido como nadie, siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado, con esa fuerza y energía que a veces ya me faltaba… Hemos hecho un buen equipo y te aseguro que ya echo de menos el "labo" y compartir poyata contigo. Tu perseverancia y entrega te llevarán lejos y espero estar ahí para compartir tus éxitos.

Mil gracias a mis amigos motrileños, a mis niñas biólogas y a mis primas-casi hermanas Ángela y Noe, por todo vuestro apoyo y por hacerme sentir tan valiosa. Gracias Ant, el destino nos unió a los 4 años y a partir de ahí hemos compartido parvulario, colegio, instituto, carrera y doctorado, ¡que se dice pronto! Por nuestros desayunos en el "Mundi", en los que solucionábamos el mundo de la Ciencia. Gracias Lorena, mi compañera fiel desde que tomábamos apuntes en la facultad hasta el fin de nuestros doctorados. Porque hemos vivido esta aventura juntas y nos hemos apoyado la una en la otra para salir adelante, te deseo lo mejor en tu nuevo proyecto. Gracias a todos, soy muy afortunada por teneros.

Me reservo estas últimas líneas para las personas más importantes de mi vida, a las que debo lo que soy y sin las que no hubiera sido capaz de conseguir nada de lo que hoy tengo. Espero que estas pocas palabras os transmitan todo lo que realmente siento.

A mi hermano, gracias por tu cariño eterno y cuidarme siempre como si aún fuese pequeña. Por tu sonrisa y tus mimos. Por tu confianza en mí y por apoyarme siempre, junto a nuestros padres, en los peores momentos.

A mis padres, no sé cómo agradeceros todo lo que habéis hecho por mí desde el día que me trajisteis al mundo… todo lo que tengo y lo que soy os lo debo. Por educarme y darme lo mejor que tenéis, por estar ahí siempre que me he caído para levantarme y darme alas. Por creer en mí más que yo misma y recordarme que puedo llegar a donde yo quiera. Por ser mi apoyo infinito, sin condiciones, sin restricciones, sin límites… Nunca os voy a poder devolver todo el amor que me dais, pero esta es mi manera de deciros gracias, esta Tesis es para vosotros. A los tres, os quiero muchísimo.

Y a ti, Jesús, que has recorrido este camino cogiéndome la mano, sin soltarme un solo segundo. Tú has celebrado conmigo mis mayores éxitos y has llorado conmigo cuando he tocado fondo. Pero no te has rendido, me has sacado una sonrisa y me has dado el amor y la energía que necesitaba para continuar. Gracias por creer en mí y demostrármelo día a día. Has sido mi luz, sin ti hoy no estaría aquí, este momento de felicidad es también tuyo. Solo deseo que tengamos una larga vida juntos y devolverte lo que has hecho por mí todos estos años. Ahora comienza una nueva aventura para nosotros y no hay nada en el mundo que me haga más ilusión. Te quiero infinito.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN..... 1

ESTRUCTURA DE LA RETINA DE VERTEBRADOS..... 4

Células gliales de la retina de los vertebrados..... 7

Células de Müller..... 7

Oligodendrocitos..... 9

Astrocitos..... 10

Células microgliales..... 10

ESTADOS MORFOFUNCIONALES DE LA MICROGLÍA..... 11

ORIGEN MIELOIDE DE LA MICROGLÍA..... 15

Los monocitos no son progenitores microgliales..... 16

La microglía de mamíferos se origina a partir de progenitores hematopoyéticos mieloides dependientes de PU.1, IRF8 y CSF-1R..... 21

Origen hematopoyético mieloide de la microglía en aves..... 28

LA HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA DE MAMÍFEROS Y AVES TRANSCURRE EN TRES ONDAS SUCESIVAS: PRIMITIVA, DEFINITIVA TRANSITORIA Y DEFINITIVA..... 30

Hematopoyesis primitiva y definitiva..... 30

Hematopoyesis definitiva transitoria..... 33

Cronología de las tres ondas hematopoyéticas..... 34

ORIGEN DE LA MICROGLÍA EN MAMÍFEROS Y OTROS GRUPOS DE VERTEBRADOS..... 38

Macrófagos primitivos que no pasan por la etapa monocítica..... 38

Macrófagos fetales derivados de monocitos..... 44

Diferencias en la dependencia de factores de transcripción entre macrófagos primitivos, progenitores eritro-mieloides y CMHs..... 46

Origen vitelino de la microglía en mamíferos..... 47

Origen intraembrionario de la microglía de vertebrados no mamíferos adultos..... 56

DESARROLLO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES..... 59

Entrada de precursores microgliales en el SNC..... 60

Propagación de la microglía en el SNC: migración y proliferación..... 61
Diferenciación de la microglía..... 66
FUNCIONES DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES..... 68
Funciones en el SNC adulto..... 69
Vigilancia y mantenimiento del estado funcional del SNC..... 69
Fagocitosis de patógenos y células muertas..... 69
Inducción de la muerte de neuronas viables (fagoptosis)..... 71
Regulación de la plasticidad sináptica..... 72
Funciones en el SNC en desarrollo..... 73
Fagocitosis de células muertas..... 73
Inducción de la apoptosis neuronal..... 73
Participación en la sinaptogénesis..... 74
Participación en la angiogénesis..... 75
MUERTE NEURONAL PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO..... 75
SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA EN EL SNC..... 76
Microglía y señalización purinérgica..... 79
LOS CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA MICROGLÍA..... 80

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... 83

MATERIALES Y MÉTODOS..... 91
Animales..... 93
Aislamiento de retinas y cultivo *in vitro* de ERECs..... 93
Tratamiento de ERECs de E6,5 con inhibidores farmacológicos y otras moléculas..... 95
Anticuerpos..... 96
Inmunocitoquímica..... 97
Inmunocitoquímica en montajes totales..... 98
Inmunocitoquímica en criosecciones..... 99

Detección de la proliferación microglial mediante marcaje con bromodeoxiuridina..... 100

Reconocimiento inmunocitoquímico de células microgliales en quimeras de EP-SVC..... 101

Análisis cuantitativo del número de células microgliales y de sus caracteres morfológicos en ERECs de E6,5+24hiv..... 103

Cuantificación de células caspasa-3-positivas mediante citometría de flujo..... 104

Determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo..... 106

Detección y cuantificación de fragmentos apoptóticos mediante TUNEL. 108

Microscopía..... 110

Análisis estadístico..... 110

RESULTADOS..... 111

Las quimeras de EP-SVC revelan que el SNC es invadido por macrófagos primitivos procedentes del saco vitelino en estadios tempranos del desarrollo embrionario..... 113

Los macrófagos primitivos colonizan el ojo a través del borde marginal de la retina y la fisura óptica en estadios tempranos del desarrollo embrionario..... 116

Los macrófagos procedentes del saco vitelino que se concentran en la CNO y BP son precursores microgliales que colonizan la retina a partir de E7..... 120

La microglía ameboide que coloniza la retina embrionaria de codorniz y sus precursores de la CNO/BP muestran un fuerte inmunomarcaje de iNOS..... 129

Los precursores microgliales de la CNO/BP comienzan a invadir la retina de codorniz en E7, coincidiendo con un incremento en la muerte de células ganglionares..... 132

Los cultivos organotípicos de ERECs de E6,5+24 hiv son un excelente modelo experimental para el estudio de moléculas reguladoras de la primera entrada de células microgliales en la retina..... 138

La inhibición de caspasas en los ERECs de E6,5+24hiv reduce tanto el número de células caspasa-3-positivas de la retina como la entrada de células microgliales en la misma..... 141

La inhibición de la señalización purinérgica en los ERECs de E6,5+24hiv bloquea la entrada de células microgliales en la retina..... 143

La adición exógena de ATP o UDP induce un aumento del número de células microgliales que entran en la retina..... 159

DISCUSIÓN..... 177

La microglía ameboide que coloniza la retina embrionaria de codorniz proviene de macrófagos que se originan en el saco vitelino..... 179

El comienzo de la entrada de células microgliales en la retina coincide con un aumento de la muerte celular programada..... 185

La señalización purinérgica participa en la entrada de la microglía en la retina en desarrollo 187

REFERENCIAS..... 195

CONCLUSIONES..... 229

ABREVIATURAS

ADP: adenosín-5'-difosfato

AF: alexa-fluor

AGM: aorta-gónadas-mesonefros

AMP: adenosín-5'-monofosfato

ATP: adenosín-5'-trifosfato

ATPγS: adenosín-5'-gamma-tiotrifosfato

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro

BP: base del pecten

BrdU: 5'-bromo-2'-deoxiuridina

BSA: albúmina de suero bovino

CCG: capa de células ganglionares

CD73: ecto-5'-nucleotidasa

CNE: capa nuclear externa

CFN: capa de fibras nerviosas

CMHs: células madre hematopoyéticas

CNI: capa nuclear interna

CNO: cabeza del nervio óptico

CPE: capa plexiforme externa

CPI: capa plexiforme interna

Cre-ER: recombinasa Cre fusionada a un receptor de estrógeno

CSF-1: factor estimulante de colonias 1

CSF-1R: receptor del factor estimulante de colonias 1

CX_3CL1: fractalquina

CX3CR1: receptor de fractalquina

E: día de gestación (en mamíferos) o de incubación (en aves)

EGFP: proteína fluorescente verde mejorada

E-NTPDasa: ecto-nucleósido-trifosfato-difosfohidrolasa

E-NPPs: ectonucleótido-pirofosfatasas

EP: epitelio pigmentario

EP-SVC: embrión de pollo-saco vitelino de codoniz

ER: receptor de estrógenos

ERECs: explantes de retina embrionaria de codorniz

FDA: diacetato de fluoresceína

FPA: focos para-aórticos

GA: grupos aórticos

GFP: proteína fluorescente verde

GFPA: proteína ácida fibrilar glial

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HD: hematopoyesis definitiva

HDT: hematopoyesis definitiva transitoria

HH: estadios de Hamburger y Hamilton

HP: hematopoyesis primitiva

IL: interleuquina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IRF8: factor regulador de interferón 8

IP: yoduro de propidio

MLE: membrana limitante externa

MLI: membrana limitante interna

NDPasa: enzima nucleósido-difosfatasa

NGS: suero normal de cabra

NT-3: neurotrofina 3

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%

PEMs: progenitores eritromieloides

PLP: paraformaldehído-lisina-peryodato

PLs: progenitores linfoides

PMs: progenitores mieloides

ROS: especies reactivas de oxígeno

SNC: sistema nervioso central

SV: saco vitelino

TdT: enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal

TUNEL: Técnica “terminal deoxynucleotidiltransferasedUTPnick-endlabeling”

UDP: uridíndifosfato

UTP: uridíntrifosfato

VEGF: factor de crecimiento de endotelios vasculares

YFP: proteína fluorescente amarilla

5´-NT: ecto-5´-nucleotidasa

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 son imprescindibles para la correcta función neuronal y la homeostasis del tejido nervioso. Las funciones de los astrocitos y oligodendrocitos son bien conocidas, ya que han sido ampliamente investigadas desde antiguo, mientras que la microglía es un tipo glial cuyas funciones han comenzado a desvelarse más recientemente. Desde su descubrimiento por Pío del Río-Hortega (Río-Hortega, 1919), las células microgliales habían sido consideradas como las encargadas de la defensa del SNC, siendo frecuentemente denominadas macrófagos del SNC. Durante mucho tiempo se había considerado que estas células estaban estrechamente emparentadas con los macrófagos de otros tejidos y órganos, con los que parecían compartir un origen común. Sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que la microglía es una población diferente de la de los macrófagos, que es específica del SNC y se origina en etapas tempranas del desarrollo a partir de progenitores provenientes del saco vitelino, que colonizan el SNC primitivo y persisten en el SNC adulto (Ginhoux et al.,2013; Gomez-Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2015; Kierdorf et al., 2013; Schulz et al., 2012), donde se autoperpetúan mediante proliferación local (Ajami et al., 2007; Askew et al., 2017a, 2017b). Durante la última década se han descubierto otras funciones microgliales de gran relevancia para el desarrollo y la homeostasis del SNC, más allá de su función defensiva. Así pues, la microglía desempeña un importante papel en procesos esenciales del desarrollo, tales como: a) muerte y supervivencia de neuronas, b) neurogénesis, c) oligodendrogénesis, d) crecimiento y eliminación de axones, e) mielinización y remielinización, f) migración de neuronas, g) formación, remodelación y maduración de sinapsis durante el establecimiento de circuitos neuronales, y h) vasculogénesis (Arnold y Betsholtz, 2013; Casano y Peri, 2015; Eyo y Dailey, 2013; Harry y Pont-Lezica, 2014; Miron, 2017; Mosser et al., 2017; Nayak et al., 2014; Paolicelli y Ferretti, 2017; Pierre et al., 2017; Reemst et al., 2016; Salter y Beggs, 2014; Shigemoto-Mogami et al., 2014; Tay et al., 2016b; Wu et al., 2015).

Además, la microglía participa en el funcionamiento normal de las neuronas en el SNC maduro, interviniendo en procesos de plasticidad sináptica para la modificación de circuitos neurales y en la neurogénesis adulta, necesaria para la memoria y el aprendizaje (Sierra et al., 2014; Sierra y Tremblay, 2014). Debido a su participación en esta amplia variedad de procesos, la microglía ha cobrado un gran protagonismo en los últimos años, siendo cada vez más numerosos los estudios sobre la misma. En esta tesis doctoral hemos continuado estudios anteriores de nuestro laboratorio sobre el desarrollo de la microglía de la retina de aves, centrando nuestra atención en el origen de las células microglilaes que colonizan la retina durante el desarrollo embrionario de la codorniz y en las moléculas y receptores implicados en el mecanismo mediante el que estas células acceden a la retina.

En la presente Introducción, primero se explica brevemente la estructura y componentes de la retina de los vertebrados, con la intención de facilitar la comprensión del modelo de estudio al lector no familiarizado con el mismo. Seguidamente, se hace una revisión bibliográfica sobre diversos aspectos de la biología de la microglía, incluyendo su origen y funciones, así como el mecanismo de colonización de la retina. Finalmente, en los últimos apartados de la Introducción, se resumen los conocimientos sobre la muerte celular durante el desarrollo del SNC, la señalización purinérgica y la utilización de cultivos organotípicos de retina como modelo experimental para el estudio de la microglía.

ESTRUCTURA DE LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS

La retina forma parte del SNC y, al igual que éste, se diferencia a partir del neuroepitelio del tubo neural. En concreto, la retina se origina a partir de evaginaciones bilaterales del prosencéfalo llamadas vesículas ópticas, que se invaginan para dar lugar a las copas ópticas. Cada copa óptica está conectada con el cerebro a través del tallo óptico, que es colonizado por fibras procedentes de la retina para constituir finalmente el nervio óptico.

La retina constituye la capa más interna de las tres túnicas concéntricas que forman el globo ocular (esclera, coroides y retina) y está compuesta de dos capas, entre las que se dispone un espacio virtual denominado espacio subretiniano. La más interna de estas dos capas es la retina neural, o retina propiamente dicha, que está constituida por varios estratos de células, entre los que se encuentran los fotorreceptores, que captan la señal luminosa que genera los impulsos nerviosos, y diversos tipos neuronales, que colaboran en la transmisión de los impulsos nerviosos hacia el cerebro. El epitelio pigmentario es la capa más externa de la retina y se compone de una sola lámina de células cúbicas, las células pigmentarias, que se encuentran fuertemente adheridas a la coroides.

La retina neural está formada por un conjunto de neuronas y células gliales, con una organización en estratos muy bien definidos, que la convierte en un modelo muy útil para el estudio del desarrollo y diferenciación de las células que la forman. Las neuronas de la retina se pueden clasificar en tres tipos funcionales: a) fotorreceptores (conos y bastones), sensibles a los estímulos lumínicos; b) células ganglionares, que conducen el estímulo nervioso desde la retina al cerebro a través de las fibras nerviosas, que constituyen el nervio óptico; y c) neuronas de asociación o integración, que se disponen entre los fotorreceptores y las células ganglionares, integrando los impulsos recibidos de los fotorreceptores y transmitiéndolos a las células ganglionares. Hay tres tipos de neuronas de asociación en la retina: células bipolares, células horizontales y células amacrinas. Las células gliales de la retina de los vertebrados son los astrocitos, las células de Müller, los oligodendrocitos y la microglía, aunque oligodendrocitos y astrocitos pueden estar ausentes en algunos grupos de vertebrados.

Todos estos tipos celulares se organizan formando diez capas fácilmente identificables con el microscopio óptico. Desde la parte externa del ojo (parte escleral) a la interna (parte vítrea), las capas de la retina son las siguientes (Fig. 1):

1. *Epitelio pigmentario (EP):* no pertenece a la retina neural y es la capa más externa de la retina, localizada externamente a los fotorreceptores.
2. *Capa de conos y bastones*: en ella se localizan los segmentos externos e internos de los fotorreceptores.
3. *Membrana limitante externa (MLE):* constituye el límite apical de las células de Müller.
4. *Capa nuclear externa (CNE):* contiene los somas de conos y bastones.
5. *Capa plexiforme externa (CPE):* en ella 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):* contiene los somas de las células horizontales, amacrinas y bipolares y de las células de Müller.
7. *Capa plexiforme interna (CPI):* en ella se disponen 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):* contiene los somas de las células ganglionares.
9. *Capa de fibras nerviosas (CFN):* está formada por las prolongaciones axónicas de las células ganglionares que salen de la retina y se dirigen al encéfalo a través del nervio óptico.
10. *Membrana limitante interna (MLI):* formada por la lámina basal que se localiza bajo la porción terminal de las células de Müller.

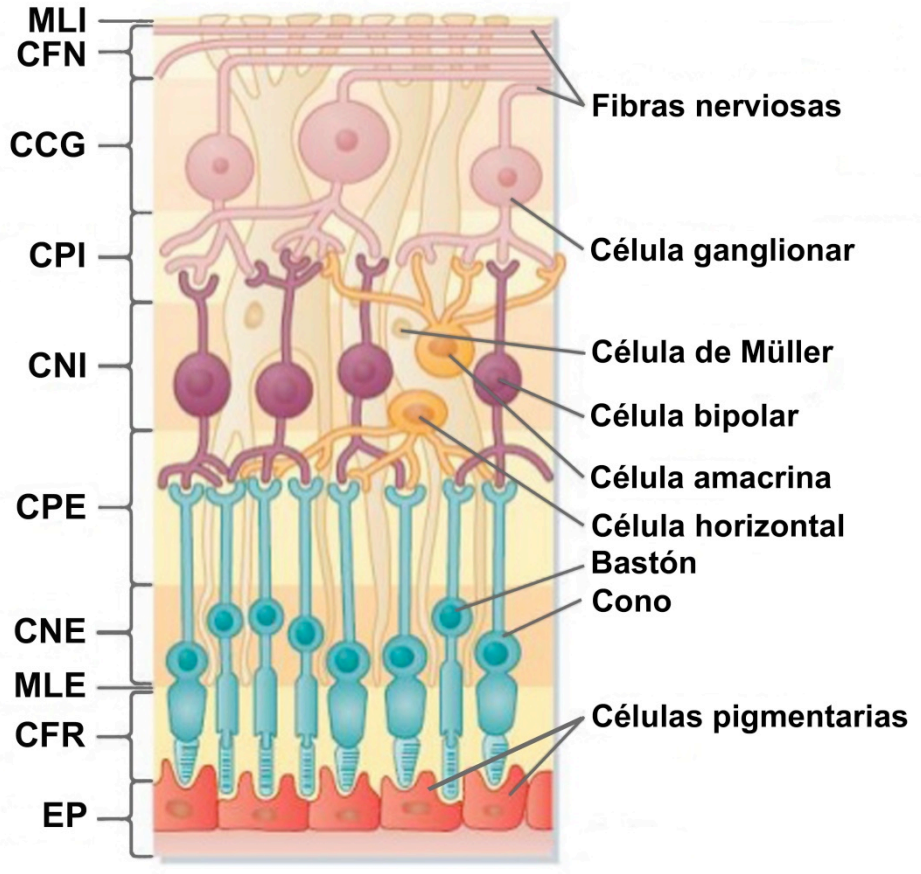

Fig. 1. Representación gráfica de las diferentes capas de la retina, en las que se muestran los distintos tipos celulares. MLI: membrana limitante interna; CFN: capa de fibras nerviosas; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; MLE: membrana limitante externa; CFR: capa de fotorreceptores; EP: epitelio pigmentario.

Células gliales de la retina de los vertebrados

La retina neural, como otras partes del SNC, contiene diferentes tipos de células gliales, tales como oligodendrocitos, astrocitos y células microgliales, así como un tipo de glía específico de la retina, constituido por las células de Müller.

Células de Müller

Atendiendo a sus características estructurales, moleculares y funcionales, las células de Müller han sido contempladas como astrocitos modificados (Holländer et al., 1991; Magalhaes y Coimbra, 1973), aunque también se pueden

considerar como elementos de la glía radial (Bernardos et al., 2007; Reichenbach et al., 1993), teniendo en cuenta la organización radial que adoptan, ocupando todo el espesor de la retina y manteniendo contacto con los diferentes tipos neuronales de la misma. El soma de las células de Müller, donde se alberga el núcleo, se localiza en la CNI, mientras que sus prolongaciones radiales se extienden desde la MLE hasta el límite vítreo de la retina, donde terminan en forma de expansiones laminares denominadas pies terminales, que descansan sobre la lámina basal que constituye la MLI.

Las células de Müller dan soporte estructural y funcional a la retina, envolviendo los somas y las prolongaciones de las neuronas para formar unidades funcionales a modo de columnas (Bringmann et al., 2006; Reichenbach y Bringmann, 2010; Reichenbach y Robinson, 1995). Además, las células de Müller llevan a cabo una amplia gama de funciones específicas. Así, proporcionan sustancias tróficas a las neuronas, intervienen en la eliminación de los desechos metabólicos, regulan la homeostasis del volumen extracelular, los iones y el agua (Bringmann et al., 2006; Newman y Reichenbach, 1996), contribuyen a la supervivencia de los fotorreceptores y neuronas, proporcionan estabilidad estructural a la retina (Bringmann et al., 2009; Reichenbach y Bringmann, 2010), guian la luz hasta los fotorreceptores (Franze et al., 2007) y amortiguan las deformaciones mecánicas que pueda sufrir la retina (Lu et al., 2006). Las células de Müller son capaces de activarse frente a estímulos patógenos, volviéndose células reactivas neuroprotectoras (Bringmann et al., 2009; Reichenbach y Bringmann, 2010), aunque también pueden contribuir a la degeneración neuronal (Bringmann y Wiedemann, 2012). Frente a una lesión, las células de Müller pueden desdiferenciarse, transformándose en células progenitoras multipotentes, que posteriormente pueden diferenciarse en fotorreceptores y otros tipos celulares de la retina (Bernardos et al., 2007).

La disposición radial de las células de Müller permite que sean utilizadas como guía o sustrato para la migración de otros tipos celulares hasta sus localizaciones definitivas durante el desarrollo de la retina, contribuyendo a

conseguir la organización citoarquitectónica de la retina madura (Newman y Reichenbach, 1996). Concretamente, la disposición de los pies terminales de las células de Müller y de sus prolongaciones determina la dirección de la migración tangencial, circunferencial o radial de las células microgliales en la retina en desarrollo (Cuadros y Navascués, 2001; Marín-Teva et al., 1999b; Navascués et al., 1996; Sánchez-López et al., 2004).

Oligodendrocitos

Durante las últimas etapas del desarrollo embrionario y en el periodo postnatal, los precursores de los oligodendrocitos migran a lo largo del nervio óptico, desde el quiasma hasta la retina, antes de diferenciarse en oligodendrocitos maduros que forman la vaina de mielina de los axones de las células ganglionares (Small et al., 1987). El proceso de mielinización de estos axones varía entre especies. Así, en algunos mamíferos, como la rata, el ratón y el hombre, la mielinización de los axones termina en la unión entre el nervio óptico y la retina (Ffrench-Constant et al., 1988; Perry y Lund,1990), no observándose vainas de mielina en la CFN. Por tanto, los oligodendrocitos y sus precursores no están presentes en la retina neural de esas especies (Gao et al., 2006; Stone y Dreher, 1987). En el conejo, los oligodendrocitos se encuentran solo en determinadas zonas de la retina, conocidas como rayos medulares, donde mielinizan los axones de las células ganglionares (Holländer et al., 1995; Jeon y Masland, 1993; Schnitzer, 1985, 1988). Por el contrario, la retina adulta de las aves presenta 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), los cuales se localizan en la CCG y la CFN, de manera que los axones de las células ganglionares están provistos de vaina de mielina (Seo et al., 2001). Durante el desarrollo embrionario y postnatal de las aves, los precursores de los oligodendrocitos alcanzan la retina después de migrar a través del nervio óptico (Nakazawa et al., 1993; Ono et al., 1998).

Astrocitos

La presencia de astrocitos en la retina parece estar asociada a la vascularización de la misma. Así, en las retinas vascularizadas de los mamíferos, los astrocitos están presentes en las capas vitreales a lo largo de toda la extensión de la retina (Schnitzer, 1987, 1988; Stone y Dreher, 1987). Sin embargo, la retina avascular de las aves carece de astrocitos (Meyer, 1977; Reichenbach et al., 1993). No obstante, en la retina de pollo se ha descrito una población de células gliales similares a los astrocitos que están presentes en la CCG y la CFN (Prada et al., 1998). También se ha identificado un nuevo tipo glial de la retina de pollo llamado "células gliales no astrocíticas de la retina interna", cuya regulación está relacionada con la microglía (Fischer et al., 2010; Zelinka et al., 2012).

Los astrocitos de la retina adulta de mamíferos, igual que los del resto del SNC, son esenciales para una gran variedad de funciones relacionadas con el soporte trófico y metabólico de las neuronas, la supervivencia y diferenciación neuronal, la sinaptogénesis y la homeostasis del tejido nervioso. Sus pies terminales, junto con prolongaciones de la microglía, forman la glia limitante perivascular, que separa el sistema vascular del parénquima nervioso (Choi y Kim, 2008; Provis, 2001). Además, los astrocitos liberan el factor de crecimiento de endotelios vasculares, conocido como VEGF, que controla la migración, proliferación y supervivencia de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Fruttiger, 2002; Kubota y Suda, 2009; Provis, 2001; Stone et al., 1995; West et al., 2005).

Células microgliales

La presencia de la microglía en la retina de mamíferos se conoce desde hace noventa años (López-Enríquez, 1926), poco después de los primeros estudios de del Río-Hortega. Tras casi cinco décadas sin nuevos estudios, los trabajos de Vrabec (1970) y Gallego (1976) reavivaron el interés por el conocimiento de la microglía de la retina. Desde entonces, numerosos estudios han descrito el patrón

de distribución de la microglía en la retina de varias especies de mamíferos (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) y otros 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). Dicho patrón es muy similar en las retinas de todos los vertebrados, en las que las células microgliales se distribuyen básicamente en las capas plexiformes, aunque también pueden estar presentes en la CCG y CFN.

La microglía es el objeto de estudio de esta tesis. Por tanto, en los siguientes apartados de esta Introducción vamos a exponer de forma más detallada los conocimientos actuales sobre la microglía.

ESTADOS MORFOFUNCIONALES DE LA MICROGLÍA

Las células microgliales, identificadas y caracterizadas por primera vez por Pío del Río Hortega (Río-Hortega, 1919), constituyen entre el 10 y 20% de las células gliales del SNC de vertebrados. Del Río Hortega estudió estas células utilizando 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 guías para su entrada y dispersión por 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 todo el SNC adulto y cada célula ocupa un territorio exclusivo que no se solapa con los territorios de células microgliales adyacentes. Ante 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 microgliales presentes en el SNC durante el desarrollo, y presenta una gran

capacidad para migrar, proliferar y fagocitar. Por lo tanto, se conocen tres estados morfofuncionales de la microglía, denominados microglía ameboide, microglía ramificada y microglía activada.

La **microglía ameboide** o inmadura (Fig. 2) es la microglía indiferenciada que migra en el SNC en desarrollo. Las células microgliales ameboides presentan una morfología irregular, redondeada, con numerosos pseudópodos y lamelipodios mediante los cuales se desplazan por el parénquima nervioso para colonizar todas sus regiones (Carrasco et al., 2011; Marín-Teva et al., 1998; Swinnen et al., 2013). Son capaces de adaptar su morfología a las condiciones del microambiente en el que están migrando (Amadio et al., 2013) y poseen una gran capacidad proliferativa, incrementando considerablemente su número dentro del SNC conforme avanza el desarrollo (Marín-Teva et al., 1999a; Rigato et al., 2011).

Cuando el SNC madura, las células microgliales se diferencian, emitiendo numerosas y delgadas prolongaciones que se ramifican, dando lugar a la **microglía ramificada** (Fig. 2). Este estado morfofuncional constituye el estado natural de la microglía en el SNC adulto en situación fisiológica (Cuadros y Navascués, 1998; Eyo y Dailey, 2013; Hanisch y Kettenmann, 2007; Kongsui et al., 2014). Hasta hace una década, la microglía ramificada era conocida también como "microglía quiescente" (resting microglia), ya que se pensaba que sus prolongaciones permanecían inmóviles a la espera de ser estimuladas por una señal procedente del microambiente que las rodea (Kreutzberg, 1996). Sin embargo, dos estudios independientes (Nimmerjahn et al., 2005; Davalos et al., 2005) demostraron que las células microgliales ramificadas poseen una gran motilidad, emitiendo y retrayendo continuamente sus prolongaciones con el fin de inspeccionar el parénquima nervioso que las rodea. Otros estudios posteriores (Davalos et al., 2008; Salter y Beggs, 2014; Wake et al., 2009) han confirmado la naturaleza dinámica de las prolongaciones microgliales. A la luz de estos resultados, la percepción sobre la microglía ramificada ha cambiado radicalmente en los últimos años, siendo considerada ahora como un sensor del SNC, tanto en

condiciones fisiológicas como patológicas (Barres, 2008). El nuevo concepto de microglía ramificada como células con prolongaciones dinámicas que inspeccionan el microambiente que las rodea ha promovido que la vieja denominación de "microglía quiescente" (resting microglia) sea reemplazada por la de "microglía vigilante" ("surveying microglia" o "surveillant microglia") (Raivich, 2005; Hanisch y Kettenmann, 2007; Eyo y Dailey, 2013; Gomez-Nicola y Perry, 2015; Ransohoff y Cardona, 2010).

Cuando la microglía vigilante detecta alteraciones en el parénquima nervioso, responde rápidamente retrayendo sus prolongaciones y transformándose en **microglía activada** (Fig. 2), caracterizada por una morfología redondeada y una gran capacidad migratoria que les permite desplazarse activamente dentro del tejido nervioso hacia la zona alterada mediante la emisión de pseudópodos (Boche et al., 2013; Hanisch y Ketenmann, 2007; Kreutzberg, 1996). La microglía activada comparte varias características con los macrófagos de otros tejidos, como la morfología, su capacidad fagocítica y la expresión de numerosas moléculas específicas. Es por ello que, con frecuencia, se ha utilizado el término de macrófagos residentes del SNC para referirse a la microglía activada.

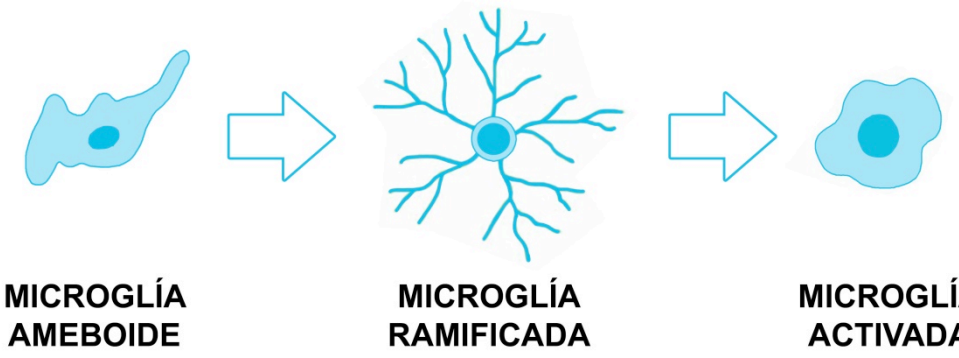

Fig. 2. Estados morfofuncionales de la microglía. La microglía ameboide está presente durante el desarrollo del SNC. Cuando el SNC madura, la microglía se diferencia en microglía ramificada. Ante un daño en el SNC, las células microgliales se activan.

Además de su capacidad migratoria, la microglía activada posee una gran actividad proliferativa (Garden y Möller, 2006; Gómez-Nicola et al., 2013;

Gomez-Nicola y Perry, 2015; 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 entre la microglía activada y la microglía ameboide ha dado lugar a cierta confusión en la literatura, donde a veces se ha utilizado el término de 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, 2015; Rojas et al., 2014; Smith et al., 2012). En este estudio, el nombre de microglía ameboide se refiere exclusivamente a la microglía indiferenciada que está presente en el SNC en desarrollo.

Cuando la microglía se activa, se producen cambios en la expresión de algunos genes que dan lugar a la aparición de nuevas moléculas que no estaban presentes en la microglía ramificada y que le permiten llevar a cabo nuevas funciones imprescindibles para responder a las alteraciones en el SNC, como son la actividad fagocítica, la presentación de antígenos a los linfocitos T y la secreción de sustancias difusibles, como citoquinas, quimioquinas, factores neurotróficos y factores inflamatorios (Garden y Möller, 2006).

La microglía activada puede presentar otras morfologías, además de la redondeada, como la hiper-ramificada o la de bastón (Boche et al., 2013; Ladeby et al., 2005; Ziebell et al., 2015). La microglía activada hiper-ramificada se caracteriza por mostrar ramificaciones más gruesas que las de la microglía ramificada, adoptando una apariencia similar a un arbusto (bushy-like). Se considera que este tipo de microglía se corresponde con un estado inicial de activación, siendo un estado transitorio entre el fenotipo ramificado de la microglía no activada y el fenotipo redondeado de las fases finales de activación (Ladeby et al., 2005). La microglía activada con forma de bastón se caracteriza por presentar un aspecto muy alargado, con prolongaciones laterales cortas y delgadas. Este fenotipo aparece frecuentemente en patologías crónicas y difusas (Boche et al., 2013; Ziebell et al., 2015). En los últimos años, se han descrito dos nuevos estados morfofuncionales de la microglía denominados **microglía**

distrófica (Boche et al., 2013; Luo et al., 2010; Streit, 2006; Streit et al., 2004), que se considera un estado disfuncional de la microglía relacionado con el envejecimiento, y **microglía oscura** (dark microglia) (Bisht et al., 2016), relacionada predominantemente con estados patológicos. La microglía distrófica está constituida por células ramificadas con prolongaciones relativamente gruesas y, a veces, fragmentadas que se observan frecuentemente en individuos de edad avanzada. La microglía distrófica de animales envejecidos muestra una elevada expresión de citoquinas pro-inflamatorias y factores inductores de estrés oxidativo, 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). De este modo, la microglía distrófica en el cerebro envejecido mantiene un cierto grado de activación que genera un incremento de los factores nocivos para las neuronas y una disminución de los factores neurotróficos, contribuyendo a una neuroinflamación crónica y al deterioro neuronal relacionado con la edad. Por otro parte, la microglía oscura se caracteriza por presentar una apariencia ultraestructural distintiva, con el citoplasma y el núcleo muy condensados, que le proporcionan un aspecto oscuro a microscopía electrónica, además de otras alteraciones estructurales como un retículo endoplasmático dilatado, signo de estrés oxidativo (Schonthal, 2012). La microglía oscura parece ser extremadamente activa, fagocitando espinas dendríticas, terminaciones axónicas e incluso sinapsis completas. Este nuevo fenotipo no se encuentra en condiciones fisiológicas, pero es muy abundante en el hipocampo, amígdala, corteza cerebral e hipotálamo bajo condiciones de estrés crónico, envejecimiento, deficiencia de señalización por fractalquina y en la enfermedad de Alzheimer.

ORIGEN MIELOIDE DE LA MICROGLÍA

El origen de la microglía ha sido un tema muy controvertido desde su descubrimiento por del Río-Hortega (Río-Hortega, 1919), quien indicaba que “hay numerosas evidencias a favor del origen mesodérmico y leucocítico de la microglia” (ver la traducción al inglés en Sierra et al., 2016). De esta forma,

establecía el origen mesodérmico de la microglía e iniciaba la controversia que se ha mantenido hasta hace pocos años. En efecto, aunque el origen mesodérmico de la microglía ha sido generalmente aceptado, durante mucho tiempo han coexistido dos hipótesis diferentes, una que apoyaba la procedencia microglial a partir de macrófagos meníngeos que entran en el cerebro durante el desarrollo embrionario y la otra que indicaba que la microglía se origina a partir de monocitos sanguíneos que atraviesan la pared endotelial de los vasos sanguíneos antes de la aparición de la barrera hemato-encefálica. Las dos hipótesis eran aceptadas por del Río-Hortega, quien textualmente indicaba que "de acuerdo con todos los indicios, la microglía se forma mediante la migración de corpúsculos embrionarios desde la pía hacia los centros nerviosos", pero simultáneamente admitía que "además de este origen….. la microglía puede ocasionalmente proceder de otros elementos relacionados, principalmente mononucleares sanguíneos" (Río-Hortega, 1932). Ambas hipótesis han sido aceptadas hasta hace poco. Así, Chan et al. (2007) indicaba que "hay evidencias que apoyan la existencia de al menos dos poblaciones distintas de microglía durante el desarrollo embrionario y fetal, una que deriva de progenitores de origen mieloide/mesenquimático (no necesariamente procedentes de progenitores sanguíneos o monocitos) y una segunda población que representa una forma inmadura y transitoria de macrófagos fetales (derivados de precursores sanguíneos, posiblemente monocitos)".

Los monocitos no son progenitores microgliales

La hipótesis de que la microglía procede de monocitos circulantes era planteada inicialmente por Sántha y Juba (1933) y Dunning y Furth (1935), llegando a ser una idea predominante desde que Van Furth y Cohn (1968) establecieron el concepto de sistema fagocítico mononuclear, que proponía que los monocitos derivados de médula ósea son los precursores de todos los macrófagos residentes de los diferentes órganos (revisado en Yona y Gordon, 2015). Así, en la revisión de Ling y Wong (1993) se podía leer que "las células microgliales ramificadas derivan de monocitos, aunque a través de una etapa

intermedia de microglía ameboide en el periodo perinatal". Esta hipótesis se ha mantenido viva hasta hace pocos años, como queda recogido en la revisión de Kettenmann et al. (2011) que decía que "actualmente hay un consenso general sobre que las células microgliales derivan de progenitores que han migrado desde la periferia y son de origen mesodérmico-mesenquimático. En roedores, estas células migran desde la sangre como células monocíticas, originadas en la médula ósea".

Teniendo en cuenta la idea predominante que consideraba los monocitos circulantes como precursores de los macrófagos tisulares residentes, la hipótesis del origen monocítico de la microglía parecía estar apoyada por la existencia de numerosas similitudes fenotípicas y funcionales entre microglía y macrófagos tisulares residentes. En efecto, las células microgliales inmaduras comparten muchas características morfológicas y estructurales con los macrófagos periféricos (Mori y Leblond, 1969; Murabe y Sano, 1982; Tseng et al., 1983). Además, ambos tipos celulares muestran actividad de diversas enzimas, tales como esterasa no específica, tiamino-pirofosfatasa, nucleósido-difosfatasa y fosfatasa ácida (Almolda et al., 2013; Dalmau et al., 1997; Ling et al., 1982; Oehmichen et al., 1980), y son marcados mediante histoquímica para diferentes lectinas (Colton et al., 1992; Guillemin y Brew, 2004; Villacampa et al., 2013; Wu et al., 1997). El inmunofenotipo de la microglía también muestra numerosas semejanzas con los macrófagos periféricos, ya que ambos tipos de células se marcan con diversos anticuerpos, tales como anti-F4/80, anti-CD45, anti-CD11b y anti-CD68, entre otros (Chugani et al., 1991; Cuadros et al., 2006; Kettenmann et al., 2011; Perry et al., 1985; Tambuyzer et al., 2009). Así mismo, microglía y macrófagos periféricos comparten la expresión de una variedad de receptores de membrana y la secreción de numerosas moléculas que los facultan para funciones como fagocitosis, presentación de antígeno y regulación de la respuesta inflamatoria (Garden y Möller, 2006; Kettenmann et al., 2011; Tambuyzer et al., 2009). La hipótesis del origen monocítico de la microglía también era apoyada por los estudios de Ling y colaboradores, en los que inyectaban partículas de carbón

coloidal en el torrente circulatorio de ratas postnatales (Ling et al., 1980). Estas partículas eran fagocitadas por monocitos circulantes, permitiendo el rastreo de los mismos durante el desarrollo del SNC. Transcurrido un tiempo desde la inyección del carbón, éste marcaba la microglía ameboide y, con posterioridad, algunas células microgliales ramificadas también aparecían marcadas con carbón, sugiriendo la infiltración de monocitos circulantes en el parénquima nervioso, en cuyo seno se transformarían en células microgliales. Sin embargo, Ling y colaboradores indicaban que, en este tipo de experimentos, solamente unas pocas células microgliales se marcaban con carbón, impidiendo obtener una evidencia indudable sobre el origen monocítico de toda la población microglial.

A pesar de estas aparentes evidencias a favor del origen monocítico de la microglía, hay hechos de gran relevancia en contra de esta hipótesis, tales como la presencia de microglía ameboide en el cerebro en desarrollo antes de que comience la vascularización del mismo (Ashwell, 1991; Cuadros et al., 1993; Diaz-Araya et al., 1995) y antes de que los monocitos estén presentes en los tejidos hematopoyéticos (Naito et al., 1996; Sorokin et al., 1992). Los experimentos de parabiosis en embriones de aves (Kurz y Christ, 1998; Kurz et al., 2001) también demostraban que la microglía no procede de monocitos circulantes. Estos experimentos consistían en la creación de anastomosis entre los vasos sanguíneos de las membranas corio-alantoideas de un embrión de codorniz y otro de pollo, que se denominan parabiosis y permiten que las células sanguíneas de codorniz circulen por los vasos sanguíneos del embrión de pollo. Los resultados de estos experimentos no permitían detectar microglía de codorniz (que se reconoce por su marcaje con el anticuerpo QH1) dentro del SNC del embrión de pollo parabiótico, demostrando la incapacidad de las células sanguíneas circulantes para infiltrar el parénquima nervioso y dar lugar a microglía. Resultados similares se obtuvieron en experimentos con ratones parabióticos, cuyos sistemas circulatorios eran interconectados quirúrgicamente (Ajami et al., 2007). Tras la utilización de dos modelos de activación microglial aguda y crónica, los autores no encontraban evidencias de entrada en el cerebro de

progenitores microgliales procedentes de la circulación sanguínea, descartando así la procedencia monocítica de la microglía.

Quimeras de médula ósea también se han utilizado para estudiar la posible contribución de monocitos circulantes a la población de microglía. Para conseguir estas quimeras de médula ósea, se irradiaba de forma letal a ratones con el objetivo de eliminar sus células de médula ósea, las cuales eran seguidamente reemplazadas con células marcadas genéticamente procedentes de ratones transgénicos con expresión ubícua de un gen reportero marcado con fluorescencia. Mildner et al. (2007) utilizaron quimeras de médula ósea, en las cuales las células de médula ósea eran reemplazadas por células medulares marcadas con proteína fluorescente verde (GFP) procedentes de ratones transgénicos β -actina-GFP, demostrando que una población de monocitos circulantes, caracterizados fenotípicamente como Ly-6C^{high} CCR2^{+}, podía infiltrar el cerebro lesionado de ratones, pero esto solo sucedía en patologías del SNC en las que había rotura de la barrera hemato-encefálica o después del acondicionamiento del cerebro mediante irradiación. Sin embargo, en experimentos en los que el cráneo era protegido de la irradiación se observaba una completa ausencia de reclutamiento de progenitores microgliales desde la circulación sanguínea, tanto en ratones sanos como en ratones a los que se practicaba axotomía facial o desmielinización del cuerpo calloso. Por lo tanto, estos experimentos coincidían con la idea de que los monocitos circulantes no son precursores microgliales en el cerebro normal, aunque sí pueden infiltrar el parénquima nervioso después de una lesión que provoque la rotura de la barrera hemato-encefálica o después de la irradiación que se ha utilizado en otros estudios para generar quimeras de médula ósea (Bechman et al., 2005; Hickey et al., 1992; Priller et al., 2001; Wirenfeldt et al., 2007). En otro interesante estudio se utilizaban parejas de ratones parabióticos, en las que uno de ellos pertenecía a una línea con expresión ubícua de GFP y el otro (que era GFP-negativo) sufría mieloablación mediante irradiación letal para conseguir reemplazar sus monocitos circulantes por monocitos GFP-positivos sin afectar la microglía residente del SNC (Ajami et al., 2011). Este estudio ponía de manifiesto

que, durante la inflamación, los monocitos circulantes GFP-positivos conseguían entrar en el SNC y dar lugar a macrófagos fenotípicamente indistinguibles de la microglía residente, pero éstos desaparecían cuando remitía la inflamación. Así, los macrófagos reclutados durante el estado inflamatorio finalmente no contribuían a la población de microglía residente.

Otra estrategia de investigación que se ha mostrado útil para marcar diferencialmente la microglía residente y los macrófagos reclutados derivados de monocitos ha sido la utilización de técnicas de mapeo de destino inducible por tamoxifeno, en las cuales un gen marcado con fluorescencia es temporalmente expresado en un tipo celular concreto. Mediante el uso de este sistema de mapeo de destino, O´Koren et al. (2016) generaban una línea de ratones Cre-inducibles por tamoxifeno (mediante la tecnología cuyos principios se exponen en un apartado posterior de esta Introducción), cuya microglía y monocitos expresaban constitutivamente proteína fluorescente amarilla (YFP) (bajo el control del gen endógeno *Cx3cr1*) y también podían expresar proteína fluorescente roja (RFP) de forma transitoria, tras la administración de tamoxifeno. Seis días después del tratamiento con tamoxifeno, la microglía de la retina mostraba un marcaje con YFP y RFP (YFP+/RFP+) mientras que los monocitos circulantes eran YFP-positivos y RFP-negativos (YFP+/RFP–). De esta forma, la población de microglía residente de la retina era fácilmente distinguible de los monocitos circulantes. Tras practicar un daño en la retina inducido por luz, se observaba un reclutamiento de monocitos YFP+/RFP– en la retina. Sin embargo, el perfil inmunofenotípico de estos monocitos reclutados ($CD45^{hi}$ $CD11c^{hi}$ $F4/80^{+}$ I-A/I-E^{+}) era drásticamente diferente del mostrado por las células microgliales ($CD45^{lo}$ $CD11c^{lo}$ $F4/80^{lo}$ I-A/I-E^{-}), demostrando así que los monocitos no llegaban a transformarse en microglía.

En resumen, diferentes experimentos usando parabiosis de embriones de ave o de ratones adultos, quimeras de médula ósea de ratones letalmente irradiados y técnicas de mapeo de destino inducible por tamoxifeno han proporcionado sólidas evidencias que parecen negar la hipótesis del origen

monocítico de la microglía durante el desarrollo normal del SNC. Además, el marco conceptual sobre el origen de los macrófagos tisulares residentes ha cambiado considerablemente en los últimos años (ver revisiones de Ginhoux y Guilliams, 2016; Ginhoux y Jung, 2014; Hoeffel y Ginhoux, 2015; Jenkins y Hume, 2014). Así, actualmente se ha descartado la antigua idea, propuesta por el modelo del sistema fagocítico mononuclear, de que los monocitos derivados de médula ósea son precursores de los macrófagos residentes de los tejidos. Por el contrario, recientes evidencias indican que: a) los monocitos circulantes no contribuyen sustancialmente a las poblaciones de macrófagos tisulares en situación de normalidad (aunque sí pueden hacerlo en condiciones patológicas); b) estas poblaciones de macrófagos derivan de progenitores embrionarios que siembran los tejidos inmaduros durante el desarrollo; y c) los macrófagos tisulares derivados de progenitores embrionarios se perpetúan en los tejidos adultos mediante autorenovación (Yona et al., 2013). Por lo tanto, el origen no monocítico de la microglía es concordante con esta nueva visión de la ontogenia del sistema fagocítico mononuclear.

La microglía de mamíferos se origina a partir de progenitores hematopoyéticos mieloides dependientes de PU.1, IRF8 y CSF-1R

A pesar de la convicción de la procedencia no monocítica de la microglía, su origen a partir de progenitores hematopoyéticos mieloides está fuertemente apoyado por diferentes estudios en ratones knockout para diferentes genes. Estos estudios han mostrado la ausencia o pronunciada reducción de microglía cuando algunos factores que regulan la generación y desarrollo de células mieloides no están presentes. Por ejemplo, PU.1 es un factor de transcripción codificado por el gen Sfpi-1, con efectos promieloides durante la hematopoyesis (McIvor et al., 2003), habiéndose comprobado que ratones knockout deficientes para PU.1 carecen de las poblaciones tanto de células mieloides (Back et al., 2004; McKercher et al., 1996) como de microglía (Beers et al., 2006; Kierdorf et al.,

2013). Este hecho es una clara indicación de la naturaleza mieloide de la microglía y su fuerte relación ontogenética con los macrófagos.

El factor regulador de interferón 8 (IRF8) es otro factor de transcripción que desempeña un papel crítico en la regulación del desarrollo de células mieloides y es constitutivamente producido en la microglía residente del SNC, siendo un determinante transcripcional crucial del fenotipo microglial (Minten et al., 2012). Ratones nulos para *Irf8* mostraban una significativa reducción del número de células microgliales (Kierdorf et al., 2013), lo que parece apoyar el origen mieloide de la microglía. Sin embargo, otro estudio mostraba resultados opuestos, ya que la cantidad de microglía en la corteza cerebral y el cerebelo de ratones deficientes en *Irf8* era mayor que en las mismas regiones de ratones de tipo silvestre (Minten et al., 2012). No obstante, los ratones *Irf8*-deficientes usados en este estudio eran dobles transgénicos obtenidos mediante cruzamiento de ratones *Irf8*-deficientes con ratones MacGreen, que expresan GFP mejorada (eGFP) bajo el control del promotor del receptor del factor estimulante de colonias-1 (CSF-1R). Es posible que la transgénesis MacGreen pudiera afectar a la deficiencia-*Irf8* para revertir sus efectos sobre el número de células microgliales. De todas formas, este número se ve significativamente afectado, por defecto o por exceso, en los ratones *Irf8*-deficientes, demostrando la participación de este factor de transcripción relacionado con células mieloides en el desarrollo microglial. Shiau et al. (2015) han generado mutantes nulos para *Irf8* de peces cebra, demostrando que los macrófagos tisulares residentes están completamente ausentes durante la embriogénesis, aunque se recuperan parcialmente desde estadios larvarios intermedios (7 días post-fertilización) en adelante. Sin embargo, la microglía continuaba estando ausente en etapas juveniles (31 días post-fertilización) de los peces mutantes. Estos resultados sugerían que tanto los macrófagos tisulares residentes como la microglía son de linaje mieloide, pero existen claras diferencias entre los mecanismos que regulan el desarrollo de ambos tipos de células. Así, la microglía y la población inicial de macrófagos tisulares residentes se originarían de progenitores IRF8-dependientes durante

estadios iniciales del desarrollo, mientras que la población definitiva de macrófagos tisulares emergería en etapas posteriores del desarrollo a partir de progenitores IRF8-independientes.

El factor de transcripción PU.1 juega un papel en los mecanismos de expresión del receptor CSF-1R, codificado por el proto-oncogén *c-fms*. La expresión de este receptor está restringida a los tipos celulares del sistema fagocítico mononuclear, incluyendo la microglía (Akiyama et al., 1994; Raivich et al., 1998), y se ha demostrado que está implicada en la proliferación, supervivencia y diferenciación de monocitos y macrófagos (Sherr et al., 1988; Stanley y Chitu, 2014) y también de microglía (revisado en Chitu et al., 2016; Ulland et al., 2015). La generación de las líneas transgénicas de ratón MacGreen y MacBlue, que expresan proteínas fluorescentes bajo el control del promotor de CSF-1R, ha permitido demostrar el linaje mieloide de la microglía, ya que el gen reportero *csf1r* se expresa de forma específica en los macrófagos de saco vitelino durante etapas tempranas del desarrollo, mientras que en etapas más avanzadas del desarrollo y en la edad adulta también se expresa en la microglía y otros tipos celulares del sistema fagocítico mononuclear (Ovchinnikov et al., 2008). Curiosamente, en ratones MacBlue adultos, la expresión del gen reportero *csf1r* se mantiene en la microglía y células de Langerhans de la piel, pero desaparece en la mayoría de los macrófagos tisulares (Sauter et al., 2014).

Observaciones en ratones knockout *csf1r*$^{-/-}$ han mostrado que la pérdida de CSF-1R da lugar a una severa desaparición de la microglía en el SNC embrionario, postnatal y adulto (Erblich et al., 2011; Ginhoux et al., 2010). Además, en ratones deficientes para DAP12, que es una proteína adaptadora para CSF-1R, también se ha descrito una reducción del número de células microgliales (Otero et al., 2009). Estos resultados demuestran que los progenitores de la microglía son estrechamente dependientes de CSF-1R, lo cual ha sido corroborado por los resultados de Squarzoni et al. (2014) y Hoeffel et al. (2015). En estos estudios se inducía la inhibición transitoria de la vía de señalización de CSF-1R en el cerebro de embriones de ratón, mediante la inyección de un anticuerpo

bloqueante anti-CSF-1R en hembras gestantes de 6,5 días de gestación (E6,5). Tras la inhibición de la vía de CSF-1R, la microglía de los embriones de ratón era completamente eliminada entre los días E10,5 y E14,5. Sin embargo, la microglía repoblaba el SNC después del nacimiento (Squarzoni et al., 2014), poniendo de manifiesto que algunos progenitores microgliales podían ser generados en etapas más avanzadas del desarrollo, una vez finalizada la inhibición transitoria de CSF-1R. Estos resultados coinciden con los estudios de Elmore et al. (2014, 2015) y Dagher et al. (2015), en los que prácticamente toda la microglía del SNC adulto era eliminada mediante la administración de inhibidores selectivos de CSF-1R, pero había una completa repoblación del SNC con nueva microglía 7 días después de la eliminación del inhibidor. Esta microglía de nueva aparición funcionaba de forma similar a la microglía residente original (Elmore at el., 2015) y procedía de la proliferación de progenitores nestina-positivos que estaban presentes en el SNC adulto (Elmore et al., 2014). Dichos progenitores no parecen contribuir a la homeostasis normal de la microglía adulta, ya que un reciente estudio ha demostrado que la renovación microglial en el cerebro de ratones adultos se lleva a cabo mediante proliferación de microglía ramificada pero no a partir de precursores nestina-positivos (Askew et al., 2017b). De todas formas, el origen y funciones de estos progenitores son aspectos no resueltos en cuya investigación se debería profundizar. Por ejemplo, sería interesante conocer si cambios patológicos en los ligandos de CSF-1R alteran la capacidad de los progenitores nestina-positivos para conseguir la repoblación microglial (Hughes y Bergles, 2014).

Las causas últimas de que el desarrollo de la microglía sea dependiente de CSF-1R no se conocen con exactitud y podrían estar relacionadas con los mecanismos de proliferación, diferenciación y supervivencia microglial, tal como se ha demostrado en macrófagos (Pixley y Stanley, 2004; Yu et al., 2012). El hecho de que la supervivencia de la microglía sea dependiente de la señalización de CSF-1R ha sido claramente demostrado en el SNC adulto, donde las células microgliales sufren procesos de muerte celular tras la inhibición farmacológica de dicho receptor con un inhibidor selectivo (Elmore et al., 2014). El estudio de

MacDonald et al. (2010) parecía obtener resultados contrarios al anterior, ya que el tratamiento prolongado de ratones con un anticuerpo anti-CSF-1R monoclonal no mostraba ningún efecto sobre la población de microglía del cerebro, a pesar de que dicho tratamiento conseguía eliminar la inmensa mayoría de macrófagos tisulares. Sin embargo, estos resultados en el cerebro contrastaban con los obtenidos en retina, en la que la microglía era eliminada tras el tratamiento con anti-CSF-1R, sugiriendo que la ausencia de efecto del anticuerpo en el cerebro podría ser debido a la acción de la barrera hemato-encefálica y no reflejar una independencia de la microglía respecto a CSF-1R (MacDonald et al., 2010). Existe la posibilidad de que, durante el desarrollo, la estimulación de CSF-1R proporcione una señal de supervivencia para los progenitores microgliales iniciales, los cuales podrían responder posteriormente a un programa de desarrollo intrínseco para dar lugar a microglía madura (Ginhoux y Prinz, 2015). Otra hipótesis es que la eliminación de la microglía en ausencia de CSF-1R pudiera ser debida a un fallo en el mecanismo de reclutamiento de sus progenitores hacia el SNC. Pruebas a favor de esta hipótesis se han descrito en los mutantes *panther* del pez cebra, que no tienen CSF-1R. En estos mutantes, los macrófagos iniciales de saco vitelino (que son progenitores microgliales) se desarrollan normalmente, pero no consiguen emigrar desde el saco vitelino para invadir la retina y el cerebro durante su desarrollo inicial (Herbomel et al., 2001). Estos autores proponían que todos los tejidos que llegan a ser colonizados por macrófagos atraen a estas células mediante secreción de factor estimulante de colonias-1 (CSF-1), que actúa como un factor quimioatrayente. Por lo tanto, la ausencia de CSF-1R en los macrófagos iniciales de los mutantes *panther* les impediría reconocer el CSF-1 segregado por el cerebro, impidiendo el reclutamiento quimiotáctico de estos progenitores microgliales en los estadios más tempranos del desarrollo. Sin embargo, el reclutamiento de macrófagos iniciales parece ser independiente de CSF-1R en etapas del desarrollo más avanzadas de los peces mutantes *panther*, ya que estos progenitores microgliales consiguen colonizar diferentes regiones cerebrales con un retraso de varios días (Herbomel et al., 2001). Esto no sucede en

ratones knockout *csf1r*$^{-/-}$, en los cuales la microglía está mayoritariamente ausente (alrededor del 90%) a la tres semanas de edad (Erblich et al., 2011; Ginhoux et al., 2010), que es la mayor edad de supervivencia de estos ratones mutantes (Dai et al., 2002). Estas diferencias entre el pez cebra y el ratón sugieren que los mecanismos de reclutamiento de progenitores microgliales hacia el SNC pueden no tener la misma dependencia de CSF-1R en distintos grupos de vertebrados.

Existen dos ligandos selectivos del receptor CSF-1R, que son los factores de crecimiento CSF-1 (anteriormente conocido como M-CSF) e interleuquina-34 (IL-34), los cuales compiten por la unión con el receptor y son expresados en diferentes regiones del cerebro en desarrollo, sin que haya solapamiento entre ellas (Chitu et al., 2016; Nandi et al., 2012; Stanley y Chitu, 2014). La ausencia de cualquiera de los dos factores da lugar a significativas alteraciones en el número de células microgliales, demostrando la implicación de ambos ligandos de CSF-1R en la ontogenia microglial. No obstante, estas anomalías son mucho menos severas que las ocasionadas por la ausencia de CSF-1R. En efecto, los ratones mutantes *Csf1*$^{op/op}$, a los que le falta CSF-1 como consecuencia de la mutación natural osteopetrótica en el gen *Csf1*, tienen una marcada reducción de la población de microglía, que oscila entre un 30% y un 60% en diferentes regiones cerebrales (Ginhoux et al., 2010; Kondo et al., 2007; Kondo y Duncan, 2009; Sasaki et al., 2000; Wegiel et al., 1998), coincidiendo con una disminución paralela de otras poblaciones de fagocitos mononucleares (Cecchini et al., 1994). Consecuentemente con esta dependencia de CSF-1 de la microglía, ratones transgénicos que sobreexpresan CSF-1 bajo el control del promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFPA) muestran un incremento del número de células microgliales (De et al., 2014; Nikodemova et al., 2015). La reducción de la población microglial en ratones *Csf1*$^{op/op}$ podría deberse a una disminución de su actividad proliferativa, ya que se ha demostrado que CSF-1 induce proliferación microglial (Guan et al., 2016). El hecho de que la disminución de la microglía en ratones que carecen de CSF-1 sea menos acusada que en ratones nulos para CSF-

1R parece derivar de la existencia de otro ligando selectivo de CSF-1R, como es la IL-34, que puede compensar la pérdida de CSF-1.

Durante el desarrollo del cerebro de ratón, se observa una expresión de IL-34 notablemente más extensa que la de CSF-1 (Greter et al., 2012; Nandi et al., 2012). Concretamente, la expresión de IL-34 se detecta a partir de E11,5 (Wei et al., 2010), antes del comienzo de la expresión de CSF-1, y es predominante en algunas regiones cerebrales, tales como la corteza cerebral y el hipocampo (Greter et al., 2012). Además, la expresión de IL-34 en una forma dependiente del promotor de *Csf1* es capaz de rescatar las deficiencias osteopetróticas de ratones *Csf1*$^{op/op}$ (Wei et al., 2010). Estos hallazgos son compatibles con un importante papel de IL-34 en el desarrollo microglial, una idea que ha sido corroborada por los resultados de dos estudios (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012), que demuestran que ratones deficientes en IL-34 tienen considerablemente reducida la población microglial de diferentes áreas del cerebro adulto, tales como la corteza cerebral y el hipocampo, que se correlacionan con las zonas de elevada expresión de IL-34 observadas en ratones no deficientes. Por el contrario, las áreas cerebrales que no muestran expresión de IL-34 en ratones no deficientes, tales como el cerebelo, tienen un número normal de células microgliales en los ratones deficientes en IL-34. Así, estos estudios demuestran la contribución de IL-34 a la homeostasis de la microglía en áreas concretas del cerebro adulto. Sin embargo, algunos resultados de Greter et al. (2012) sugerían que IL-34 no controla el desarrollo embrionario de la microglía, puesto que no observaban alteraciones del número de precursores microgliales durante todo el desarrollo embrionario del cerebro de ratones deficientes en IL-34. Contrariamente, Wang et al. (2012) concluían que IL-34 es crucial para el desarrollo de la microglía, ya que ratones deficientes en IL-34 recién nacidos tenían mucha menos microglía que los neonatos de tipo silvestre. Por otra parte, Jenkins y Hume (2014) sugerían que IL-34 podría prevenir el reclutamiento de monocitos hacia el cerebro, contribuyendo a mantener un origen de la microglía exclusivamente a partir de progenitores no monocíticos derivados de saco vitelino. En vista de estas contradicciones, se

deberían realizar otros estudios adicionales para determinar con exactitud el papel de IL-34 en el desarrollo embrionario y postnatal de la microglía.

Origen hematopoyético mieloide de la microglía en aves

El origen de la microglía en aves es mucho menos conocido que en mamíferos, aunque la procedencia de la microglía de aves a partir de progenitores hematopoyéticos es avalada por su inmunomarcaje con QH1 en el SNC de la codorniz (Cuadros et al., 1992b). QH1 es un anticuerpo monoclonal que reconoce todas las células de línea hemangioblástica de codorniz, excepto eritrocitos maduros, y es específico de especie, ya que no muestra ningún marcaje en tejidos de pollo (Pardanaud et al., 1987). Por lo tanto, la microglía de codorniz expresa el antígeno reconocido por el anticuerpo QH1, lo mismo que sucede con otras células de linaje hematopoyético, lo que apoya el origen hematopoyético de la microglía. Por otra parte, la microglía del pez cebra muestra una elevada expresión de muchos genes de reguladores transcripcionales mieloides encontrados en mamíferos, tales como IRF8 y PU.1 (Oosterhof et al., 2017), sugiriendo que la expresión de estos genes en la microglía está evolutivamente conservada en todos los vertebrados. En consecuencia, la microglía de aves también procedería de progenitores hematopoyéticos dependientes de IRF8 y PU.1, lo mismo que se ha descrito en mamíferos.

A pesar de que el pollo es un modelo animal ampliamente usado en biología del desarrollo, no existen datos sobre la posible dependencia de CSF-1R, CSF-1 e IL-34 de la microglía de aves, como consecuencia de que todavía no se han desarrollado mutantes nulos para dicho receptor o sus ligandos en especies de aves. Sin embargo, actualmente se están consiguiendo importantes avances que podrán facilitar en un próximo futuro el estudio de los factores que controlan la mielopoyesis de aves. Por ejemplo, en el pollo y en el pinzón cebra se han identificado ortólogos de los genes *csf1r*, *csf1* e *IL-34* de mamíferos, demostrando que la función de CSF-1R y sus dos ligandos se conserva a través de la evolución de aves a mamíferos (Garceau et al., 2010). Además, el reciente desarrollo de un

anticuerpo monoclonal que reconoce el CSF-1R de pollo ha confirmado en esta especie que la expresión de este receptor está restringida a células de linaje macrofágico, incluyendo microglía y macrófagos meníngeos (Garcia-Morales et al., 2014). Sorprendentemente, este anticuerpo no detecta inmunoreactividad en macrófagos de codorniz, a pesar de su estrecho parentesco con el pollo, posiblemente debido a que el receptor CSF-1R de aves está sometido a una intensa selección positiva a través de la evolución (Garcia-Morales et al., 2014). Este estudio también indicaba que, desafortunadamente, el anticuerpo frente a CSF-1R de pollo no realiza una acción bloqueante sobre el receptor, en contraste con el anticuerpo anti-CSF-1R de ratón, que ha sido empleado para eliminar la microglía de embriones de ratón (Hoeffel et al., 2015; Squarzoni et al., 2014), como se ha descrito anteriormente. El inhibidor de CSF-1R conocido como GW2580 tampoco es capaz de inhibir el CSF-1R de pollo (Garcia-Morales et al., 2014), mientras que el inhibidor PLX3397, que se ha usado para eliminar la microglía del cerebro de ratón (Elmore et al., 2014), no ha sido ensayado en el pollo. Por lo tanto, la estrategia experimental basada en la eliminación de la microglía tras el tratamiento con anticuerpos anti-CSF-1R o con inhibidores selectivos de CSF-1R no es posible realizarla actualmente en especies de aves, por lo que serían necesarios nuevos avances para conseguir este propósito. Por el contrario, en embriones de pollo sí se ha conseguido el incremento experimental del número de macrófagos mediante inyección de un conjugado CSF1-Fc de pollo (Garceau et al., 2015), aunque este estudio no ha prestado atención a los efectos de dicho conjugado sobre la población de microglía.

Recientemente, se han generado líneas transgénicas de pollo que expresan proteínas fluorescentes rastreadoras bajo el control del promotor CSF-1R y el elemento regulador intrónico FIRE (Balic et al., 2014). Concretamente, se han establecido dos líneas transgénicas, colectivamente llamadas pollos MacReporter. La llamada línea MacRed expresa la proteína fluorescente rastreadora mAPPLE, mientras que la línea MacGreen expresa eGFP. Estas líneas de pollo MacReporter son equivalentes a los ratones Mac Green y MacBlue (Ovchinnikov et al., 2008;

Sasmono et al., 2003) y muestran especificidad de la expresión del transgen CSF-1R en macrófagos y otras células del sistema fagocítico mononuclear, incluida la microglía, las cuales son fácilmente distinguibles por su marcaje fluorescente. Así, estos pollos MacReporter han sido utilizados para visualizar la conducta dinámica de los macrófagos en los esbozos de las extremidades y en la vasculatura vitelina de embriones de pollo (Balic et al., 2014). Desafortunadamente, todavía no se han llevado a cabo estudios sobre la microglía en estas líneas de pollo MacReporter. Con toda probabilidad, estos pollos transgénicos serán una poderosa herramienta para futuros estudios sobre el origen de la microglía en aves. Por ejemplo, se podrían hacer experiencias de trasplante en las que los embriones de pollo MacReporter se usen como donadores de tejido (que contiene células de linaje macrofágico fluorescentes) que puede ser trasplantado en embriones de pollo normales para trazar el destino de las células fluorescentes a través del desarrollo del SNC hasta la edad adulta.

LA HEMATOPOYESIS EMBRIONARIA DE MAMÍFEROS Y AVES TRANSCURRE EN TRES ONDAS SUCESIVAS: PRIMITIVA, DEFINITIVA TRANSITORIA Y DEFINITIVA

Una vez establecida la naturaleza mieloide de la microglía, es conveniente dar una visión de conjunto de los actuales conocimientos sobre la ontogenia de la hematopoyesis de vertebrados, que ha sido revisada en numerosos artículos (Cumano y Godin, 2007; Fellah et al., 2014; Golub y Cumano, 2013; Hoeffel y Ginhoux, 2015; Medvinsky et al., 2011; Orkin y Zon, 2008; entre otros muchos). El proceso general de hematopoyesis es básicamente similar en aves y mamíferos, aunque existen diferencias entre ambos grupos, como se detalla más adelante.

Hematopoyesis primitiva y definitiva

Tradicionalmente se ha aceptado la existencia de dos ondas de hematopoyesis durante el desarrollo embrionario de los vertebrados. La primera

onda de producción de células sanguíneas, que se conoce como *hematopoyesis primitiva*, tiene lugar en los islotes sanguíneos del saco vitelino extraembrionario durante etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Durante la hematopoyesis primitiva, los progenitores hematopoyéticos de los islotes sanguíneos vitelinos producen tres linajes celulares: a) eritroblastos primitivos, que continúan dividiéndose en la circulación sanguínea, b) megacariocitos primitivos, y c) una primera generación de macrófagos conocida como macrófagos primitivos, que siguen una vía de diferenciación que no pasa por la etapa de monocito (ver más adelante). La segunda onda de hematopoyesis se denomina *hematopoyesis definitiva* y tiene lugar en órganos intraembrionarios, con posterioridad a la hematopoyesis primitiva. Esta onda se caracteriza por la aparición de *células madre hematopoyéticas* (CMHs), que son células multipotentes que se autorenuevan y tienen capacidad para diferenciarse en cualquier tipo de célula sanguínea, incluidos los eritrocitos definitivos y las diferentes líneas de células mieloides y linfoides. Las CMHs tienen capacidad para mediar la reconstitución a largo plazo del sistema hematopoyético en animales letalmente irradiados. En aves, estas células se originan primariamente de la pared de la aorta, en la cual se forman *grupos aórticos* (aortic clusters) de CMHs que hacen protrusión en el endotelio ventral inmediatamente después de la fusión de los dos esbozos aórticos originarios para formar la aorta dorsal (revisado en Fellah et al., 2014). En mamíferos, las CMHs se generan en un área embrionaria análoga, conocida como región aorta-gónadas-mesonefros (AGM), que se origina a partir de la esplacnopleura para-aórtica y consta de la aorta dorsal y las crestas urogenitales (Medvinsky et al., 2011). Alternativamente a este modelo intraembrionario de aparición de CMHs, en ratones se ha propuesto otro modelo extraembrionario, basado en experimentos de rastreo a largo plazo de células de saco vitelino utilizando el modelo de marcaje genético de Runx1 inducible (Samokhvalov, 2014; Samokhvalov et al., 2007). Según este modelo, las CMHs se generan exclusivamente en el saco vitelino y los grupos aórticos son meros lugares intermedios que son colonizados por CMHs de origen vitelino

donde éstas sufren un proceso de expansión. No obstante, esta idea no está suficientemente demostrada como consecuencia de la imprecisa duración del marcaje celular y la presencia de células Runx1-positivas fuera del saco vitelino (Medvinsky et al., 2011). Además, la formación *de novo* de CMHs a partir de una población especializada de células endoteliales ha sido directamente observada mediante estudios de imagen *in vivo* en ratones transgénicos que expresan GFP bajo el control de secuencias reguladoras del gen Ly-6A, el cual codifica una proteína específica de CMHs (Boisset et al., 2010). Por añadidura, la procedencia del saco vitelino de las células de los grupos aórticos no ha sido apoyada por los numerosos experimentos de trasplante llevados a cabo en embriones de aves (Fellah et al., 2014; Golub y Cumano, 2013).

Independientemente de su lugar originario de generación, las CMHs de los grupos aórticos migran en etapas posteriores del desarrollo embrionario y colonizan secuencialmente los *órganos hematopoyéticos transitorios* antes de sembrar los órganos hematopoyéticos finales. En estos órganos hematopoyéticos transitorios, las CMHs no son generadas *de novo* sino que sufren una expansión proliferativa y un proceso de diferenciación en un nicho apropiado. Se han descrito importantes diferencias del patrón de órganos hematopoyéticos transitorios entre embriones de aves y mamíferos. Así, en el embrión de ratón, el *hígado fetal* es un órgano hematopoyético transitorio colonizado por CMHs en etapas del desarrollo posteriores a la aparición de las mismas en los grupos aórticos y constituye el principal sitio de hematopoyesis definitiva entre E12 y E16. Por el contrario, en el embrión de pollo, el hígado fetal contribuye a la hematopoyesis definitiva de forma muy limitada (Guedes et al., 2014; Zon, 1995) y esta función es llevada a cabo por los llamados *focos para-aórticos* (Cumano y Godin, 2007). Estos focos, que no están presentes en mamíferos, aparecen después de que se hayan formado los grupos aórticos y constan de grandes grupos de CMHs procedentes de una subpoblación de células de los grupos aórticos que se introducen en el mesenterio ventral a la aorta (Dieterlen-Lièvre y Martin, 1981; Fellah et al., 2014; Jaffredo et al., 2000). Después de que las CMHs hayan

colonizado los órganos transitorios de la hematopoyesis definitiva, estas células son capaces de sembrar los *órganos hematopoyéticos finales*, que incluyen el timo, el bazo y la médula ósea, con la bolsa de Fabricio como un órgano hematopoyético final adicional en el embrión de aves. En ninguno de estos órganos hay generación de novo de CMHs, sino que se trata de nichos que favorecen la expansión de CMHs extrínsecas que llegan a colonizarlos a través de la circulación sanguínea.

Hematopoyesis definitiva transitoria

Además de su actividad inicial en la hematopoyesis primitiva durante las etapas tempranas del desarrollo, el saco vitelino también participa en la hematopoyesis definitiva que transcurre en etapas posteriores del desarrollo embrionario. De hecho, la visión actual sobre la hematopoyesis embrionaria de mamíferos indica que consta de tres ondas secuenciales (Hoeffel y Ginhoux, 2015; Yoder, 2014): la onda 1 es la hematopoyesis primitiva que tiene lugar en el saco vitelino, la onda 2 también ocurre en el saco vitelino y ha sido denominada *hematopoyesis definitiva transitoria* (Hoeffel y Ginhoux, 2015) y la onda 3 es la hematopoyesis definitiva que sucede en órganos intraembrionarios (Fig. 3). La onda 2 es concomitante con el establecimiento de la circulación sanguínea y produce progenitores eritro-mieloides y linfoides, que se originan a partir del endotelio hemogénico de los vasos vitelinos (Chen et al., 2011; McGrath et al., 2015; Palis et al., 1999, 2001). En el embrión de ratón, estos progenitores migran a través de la circulación sanguínea y siembran el hígado fetal, donde sufren un proceso de expansión (Hoeffel y Ginhoux, 2015), similar al que ocurre durante la onda 3. La onda 2 es considerada "definitiva" porque los progenitores eritro-mieloides y linfoides se diferencian en células sanguíneas con caracteres morfológicos y funcionales de tipo adulto, aunque dichos progenitores no exhiben el potencial de reconstitución a largo plazo típico de las CMHs, las cuales no son producidas en esta onda (Yoder, 2014). Sin embargo, en contraste con la onda 3, la onda 2 se va debilitando a lo largo del desarrollo embrionario y desaparece

antes del nacimiento, motivo por el que es llamada hematopoyesis definitiva "transitoria".

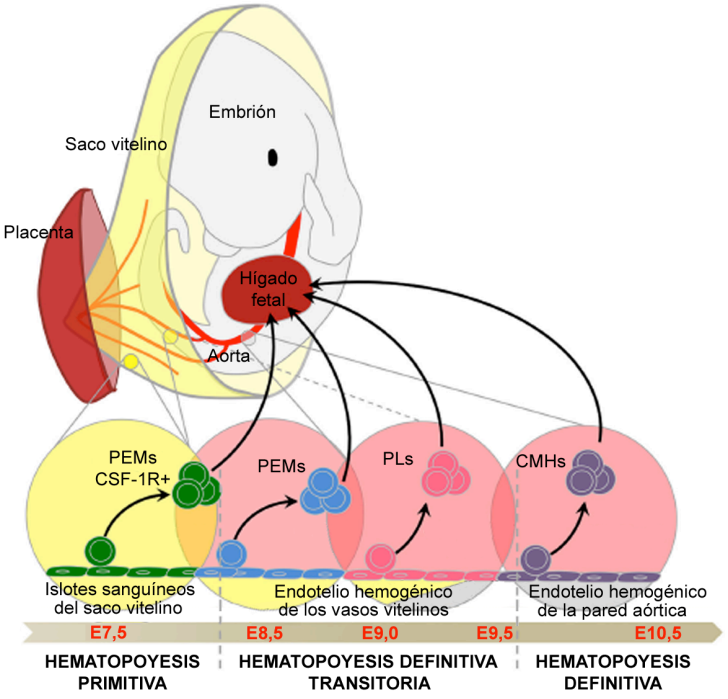

Fig. 3. Esquema representativo de las tres ondas de hematopoyesis que tienen lugar en el embrión de mamíferos. La hematopoyesis primitiva se lleva a cabo en los islotes sanguíneos del saco vitelino y produce progenitores eritro-mieloides (PEMs) primitivos (en verde). La hematopoyesis definitiva transitoria ocurre en el endotelio hemogénico de los vasos del saco vitelino y produce progenitores eritro-mieloides (PEMs, en azul) y linfoides (PLs, en rosa) que colonizan el hígado fetal. La hematopoyesis definitiva tiene lugar en el endotelio hemogénico de la pared de la aorta y región AGM y produce células madre hematopoyéticas (CMHs, en violeta) que colonizan el hígado fetal. Modificado de Hoeffel y Ginhoux (2015).

Cronología de las tres ondas hematopoyéticas

En el embrión de ratón, la onda 1 transcurre desde E7 a E9 (Palis et al., 1999; Yoder, 2014), la onda 2 se inicia en E8.25 (Frame et al., 2013; McGrath y Palis, 2005; Palis y Yoder, 2001; Yoder, 2014), y la onda 3 comienza en E10.5 (Boisset et al., 2010; Frame et al., 2013; Yoder, 2014). En el pez cebra también se ha descrito la existencia de tres ondas de hematopoyesis (Jing y Zon, 2011; Xu et

al., 2012, 2016). La onda de hematopoyesis primitiva se inicia a las 11 horas post-fertilización, en la que los islotes sanguíneos rostrales producen células mieloides que incluyen macrófagos primitivos. La onda de hematopoyesis definitiva comienza a las 26-28 horas post-fertilización a partir de la pared ventral de la aorta dorsal y produce CMHs con capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares de la sangre madura durante la vida fetal y adulta. Además, una onda intermedia de hematopoyesis, equivalente a la hematopoyesis definitiva transitoria de mamíferos, tiene lugar a partir de las 30 horas post-fertilización y produce progenitores eritro-mieloides procedentes de los islotes sanguíneos posteriores.

Ha sido ampliamente demostrado que las ondas de hematopoyesis primitiva y definitiva están presentes en el desarrollo embrionario de aves (revisado en Fellah et al., 2014). En efecto, la formación de islotes sanguíneos se detecta por primera vez en el área opaca de embriones de ave de estadio 5 de Hamburger y Hamilton (1951, HH5), alrededor del primer día de incubación (E1) (Pardanaud et al., 1987) (Fig. 4). Los eritrocitos y macrófagos primitivos se generan en los islotes sanguíneos del saco vitelino (Cuadros et al., 1992a; Lassila et al., 1982), siendo los componentes celulares casi exclusivos de la sangre hasta la edad de E5, a partir de la cual hay una progresiva sustitución de las células hematopoyéticas primitivas de la sangre por células hematopoyéticas intraembrionarias (Lassila et al., 1982; Martin et al., 1978). La aparición por primera vez de los grupos aórticos, que marca el comienzo de la hematopoyesis intraembrionaria definitiva, tiene lugar en HH18 (30-36 pares de somitas), poco antes de E3 (Dieterlen-Lièvre y Martin, 1981; Fellah et al., 2014; Jaffredo et al., 1998, 2000) (Fig. 4). Los grupos aórticos son muy prominentes en E3-E4 y desaparecen en E5, coincidiendo con la formación de los focos para-aórticos, los cuales alcanzan su máximo desarrollo en E8 y desaparecen en E9 (Dieterlen-Lièvre y Martin, 1981; Fellah et al., 2014).

El análisis de los focos eritropoyéticos y granulopoyéticos del saco vitelino del embrión de pollo (Guedes et al., 2014; Nagai y Sheng, 2008; Niimi et al., 2008; Sheng, 2010) parece apoyar la existencia de una onda de hematopoyesis

definitiva transitoria durante el desarrollo embrionario de las aves. Según estos estudios, la hematopoyesis definitiva transitoria se detecta por primera vez en el saco vitelino del pollo en E4-E4,5, siendo predominante entre E5 y E12. Esta onda hematopoyética va disminuyendo en E15 (después de que se intensifique la actividad hematopoyética de la médula ósea), aunque continúa detectándose hasta la eclosión (Fig. 4). Estos datos también se ven apoyados por estudios que muestran que los eritrocitos procedentes de saco vitelino son abundantes (más del 50%) en la sangre periférica de embriones de ave de E13 (Martin et al., 1978) y una pequeña proporción de los mismos (alrededor del 10%) continúa estando presente en E17-E18 (Lassila et al., 1982), desapareciendo por completo después de la eclosión.

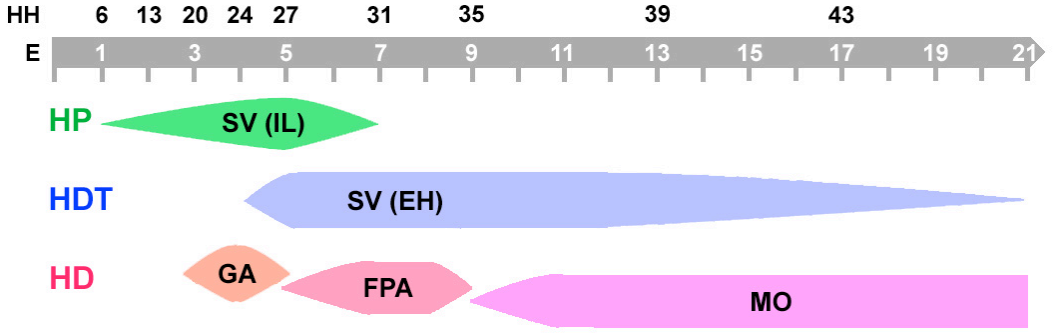

Fig. 4. Cronología de las tres ondas hematopoyéticas en el embrión de pollo, en relación con la edad embrionaria o días de incubación (E) y los estadios de Hamburger y Hamilton (HH). La hematopoyesis primitiva (HP, en verde), que tiene lugar en los islotes sanguíneos (IS) del saco vitelino (SV), comienza alrededor del primer día de incubación y disminuye drásticamente a partir de E5, desapareciendo poco después. La hematopoyesis definitiva transitoria (HDT, en azul), que se origina en el endotelio hemogénico (EH) de los vasos sanguíneos del saco vitelino, se inicia en E4-E4,5, es prominente entre E5 y E12 y disminuye progresivamente en días posteriores hasta desaparecer con la eclosión. La hematopoyesis definitiva (HD, en rojo) comienza en HH18 (poco antes de E3) con la aparición de los grupos aórticos (GA), los cuales desaparecen en E5 coincidiendo con la formación de los focos para-aórticos (FPA), que alcanzan su máximo desarrollo en E8 y desaparecen en E9. La HD es predominente en etapas posteriores del desarrollo embrionario, cuando la médula ósea (MO) y otros órganos hematopoyéticos son colonizados por células madre hematopoyéticas procedentes de los FPA.

Aunque se ha descrito que progenitores eritro-mieloides son generados *de novo* en el saco vitelino, probablemente por desdiferenciación o transdiferenciación de células endoteliales de los vasos sanguíneos vitelinos (Sheng, 2010), también se ha propuesto un origen intra-embrionario de los progenitores eritro-mieloides del saco vitelino, sugiriendo que algunas CMHs originadas en los grupos aórticos intra-embrionarios podrían sembrar el saco vitelino donde sufrirían un proceso de expansión (Guedes et al., 2014). En la práctica, esta hipótesis implicaría que la onda hematopoyética 2 no está presente en el embrión de aves, ya que el saco vitelino sería simplemente un nicho de expansión utilizado por las CMHs generadas intra-embrionariamente durante la hematopoyesis definitiva (onda 3). No obstante, esta hipótesis no parece verosímil si tenemos en cuenta que la onda de hematopoyesis definitiva transitoria está presente tanto en peces (Bertrand et al., 2007) como en mamíferos. Por lo tanto, parece razonable suponer que esta onda hematopoyética se habría conservado a través de la filogenia de los vertebrados, incluidas las aves. Además, observaciones de nuestro laboratorio llevadas a cabo en quimeras de embrión de pollo-saco vitelino de codorniz (EP-SVC) de E8 (obtenidas mediante trasplante del cuerpo de un embrión de pollo en el saco vitelino de un embrión de codorniz) ponían de manifiesto la presencia de numerosas células QH1-positivas (procedentes del saco vitelino) en los vasos sanguíneos intra-embrionarios, muchas de las cuales estaban estrechamente adheridas a la superficie luminal del endotelio y algunas estaban atravesando la pared endotelial (Fig. 5). La presencia de células sanguíneas circulantes de origen vitelino en E8, una edad del desarrollo en la que ya ha finalizado la hematopoyesis primitiva del embrión de pollo (Sheng, 2010), apoya la hipótesis de que el saco vitelino continúa mostrando capacidad hematopoyética en etapas avanzadas del desarrollo embrionario. De cualquier modo, serían necesarios nuevos estudios para confirmar la existencia real de la onda de hematopoyesis definitiva transitoria en las aves.

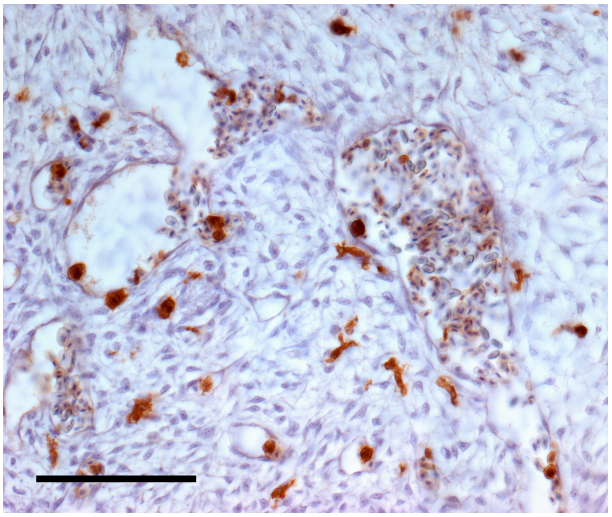

Fig. 5. Sección transversal de vasos sanguíneos de la zona faríngea de una quimera de embrión de pollo-saco vitelino de codorniz de 8 días de incubación, inmunoteñida con el anticuerpo QH1 (que es específico de codorniz) y contrastada con hematoxilina. Algunas células sanguíneas presentes en la luz vascular son QH1-positivas, demostrando su procedencia del saco vitelino. Barra de escala: 100 µm.

ORIGEN DE LA MICROGLÍA EN MAMÍFEROS Y OTROS GRUPOS DE VERTEBRADOS

Actualmente se conoce la existencia de dos poblaciones de progenitores de macrófagos generados sucesivamente en el saco vitelino del embrión de ratón, la primera que es producida durante la hematopoyesis primitiva y la segunda que aparece durante la hematopoyesis definitiva transitoria (revisado en Ginhoux y Guilliams, 2016; Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016; Hoeffel y Ginhoux, 2015). Así, durante la hematopoyesis primitiva, los islotes sanguíneos del saco vitelino generan macrófagos primitivos, además de eritrocitos primitivos. Posteriormente, durante la hematopoyesis definitiva transitoria, el endotelio hemogénico de los vasos sanguíneos vitelinos produce progenitores eritro-mieloides con capacidad para diferenciarse en monocitos fetales que maduran y se diferencian en macrófagos fetales.

Macrófagos primitivos que no pasan por la etapa monocítica

La producción de macrófagos en el saco vitelino de etapas tempranas del desarrollo embrionario del ratón (a partir de E7-E8) era conocida desde hace mucho tiempo (Cline y Moore, 1972; Moore y Metcalf, 1970). Estudios

posteriores del laboratorio de Takahashi (Takahashi et al., 1989; Takahashi y Naito, 1993) demostraron que estos macrófagos, denominados macrófagos primitivos por dichos autores, aparecen por primera vez en los islotes sanguíneos del saco vitelino de embriones de ratón y rata de E9 y, a partir de E10, se diferencian en macrófagos maduros, que los autores llamaron macrófagos fetales. Después de la unión de los vasos vitelinos con el sistema cardiovascular intra-embrionario, los macrófagos generados en el saco vitelino colonizan diferentes tejidos embrionarios, como se pudo demostrar en embriones de ratón (Sorokin et al., 1992; Takahashi y Naito, 1993) y de aves (Cuadros et al., 1992a). Estos macrófagos derivados de saco vitelino han recibido distintos nombres en diferentes estudios. La denominación más frecuente ha sido la de macrófagos primitivos (Andjelkovic et al., 1998; Bertrand et al., 2005; Gomez-Perdiguero et al., 2013; Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016; Ginhoux et al., 2010; Ransohoff y Perry, 2009), tal como fueron bautizados inicialmente por Takahashi et al. (1989). Esta denominación se dio por analogía con los llamados eritrocitos primitivos, también producidos en el saco vitelino durante la hematopoyesis primitiva, los cuales permanecen nucleados durante todo su ciclo vital, en contraste con los eritrocitos anucleados de los mamíferos adultos. También se han utilizado los nombres de macrófagos fetales (Streit, 2001; Shepard y Zon, 2000) y macrófagos primitivos/fetales (Naito et al., 1996; Sorokin et al., 1992; Takahashi et al., 1996), basándose en los dos estadios de maduración descritos inicialmente por Takahashi et al. (1989). Otros nombres usados para referirse a estas células han sido macrófagos de saco vitelino (Hoeffel y Ginhoux, 2015; Kierdorf et al., 2013; Naito et al., 1989; Tong y Vidyadaran, 2016), células fagocíticas derivadas de saco vitelino (Cuadros et al., 1992a), células similares a macrófagos (Martín-Partido et al., 1991) y macrófagos iniciales (Cuadros et al., 1993; Herbomel et al., 1999, 2001). Aquí se utilizará el término “macrófagos primitivos” para referirse a los macrófagos derivados de saco vitelino producidos durante la hematopoyesis primitiva, independientemente de su estado de maduración.

Los macrófagos primitivos son generados en los islotes sanguíneos del saco vitelino, que son grupos de células hematopoyéticas envueltos por células endoteliales, en los que las células hematopoyéticas y endoteliales no comparten un origen común (Ueno y Weissman, 2006). De forma similar a los macrófagos tisulares adultos, los macrófagos primitivos tienen una morfología redondeada y ameboide y son células fagocíticas dotadas de una gran motilidad (Cuadros et al., 1992a; Herbomel et al., 2001). Los macrófagos primitivos siguen una vía de diferenciación que no pasa por la etapa de monocitos, no tienen actividad peroxidasa endógena y muestran una elevada capacidad proliferativa, en contraste con los macrófagos reclutados de los tejidos adultos (Naito et al., 1996; Shepard y Zon, 2000; Takahashi et al., 1989, 1996; Takahashi y Naito, 1993).

La generación de macrófagos primitivos en el saco vitelino durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario es un proceso conservado a través de la evolución de los vertebrados. En efecto, este tipo de macrófagos han sido identificados en embriones tempranos de aves (Cuadros et al., 1992a, 1993; Martín-Partido et al., 1991) y pez cebra (Herbomel et al., 1999, 2001), con características similares a las descritas en mamíferos. Esta conservación evolutiva sugiere que los macrófagos primitivos participan en mecanismos de desarrollo trascendentales, como la remodelación tisular y la defensa del embrión, durante las etapas iniciales de la embriogénesis, cuando la hematopoyesis definitiva todavía no se ha establecido (Shepard y Zon, 2000). Así, numerosos focos de muerte celular en diferentes localizaciones resultan decisivos en la remodelación tisular del embrión temprano (Francisco-Morcillo et al., 2014; Hernández-Martínez y Covarrubias, 2011; Milligan y Schwartz, 1997; Monier y Suzanne, 2015) y los macrófagos primitivos participan activamente en dichos focos de muerte, fagocitando los restos de células muertas (Cuadros et al., 1993; Francisco-Morcillo et al., 2014; van Ham et al., 2012). La eliminación de células muertas por parte de los macrófagos primitivos contribuye eficientemente a la remodelación tisular, ya que previene una posible respuesta inflamatoria que afectaría negativamente a la misma (Fadeel, 2003; Henson y Hume, 2006;

Hochreiter-Hufford y Ravichandran, 2013; Shklover et al., 2015). La participación de los macrófagos primitivos en la remodelación tisular no solo está relacionada con su participación en la eliminación de restos celulares sino también con su capacidad de promover activamente diferentes procesos esenciales para la embriogénesis, tales como la remodelación vascular de órganos en desarrollo (DeFalco et al., 2014; Fantin et al., 2010; Lang y Bishop, 1993), la ejecución de muerte celular programada mediante la expresión de diversos factores que inducen muerte (Diez-Roux y Lang, 1997; Frade y Barde, 1998; Lobov et al., 2005; Marín-Teva et al., 2014; Shklover et al., 2015), y la movilización de CMHs desde los grupos aórticos y focos para-aórticos tras la remodelación de la matriz extracelular mediante secreción de metaloproteasas de matriz, que hace posible la intravasación de CMHs y la colonización de órganos hematopoyéticos definitivos (Travnickova et al., 2015). Por otra parte, se ha demostrado que los macrófagos primitivos del embrión de pez cebra adquieren una conducta activada tras la inyección intravenosa de grandes cantidades de bacterias, que son englobadas y destruidas por dichos macrófagos (Herbomel et al., 1999). Por lo tanto, además de su contribución a la remodelación tisular, los macrófagos primitivos juegan un papel esencial en la defensa del embrión, similar al ejercido por los macrófagos adultos en etapas más avanzadas del desarrollo y en la edad adulta.

Los macrófagos primitivos se generan en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, pero hay discrepancias sobre el momento exacto de su primera aparición en el saco vitelino de embriones de ratón. En efecto, los estudios iniciales del grupo de Takahashi establecían que los macrófagos primitivos no eran detectados en los islotes sanguíneos del saco vitelino hasta E8,5, comenzando a observarse en los vasos sanguíneos hacia E9-E10 (Takahashi et al., 1989). Estudios posteriores describían que la determinación de células mesodérmicas hacia destinos hematopoyéticos comienza en la etapa de línea primitiva (E7) con la aparición simultánea de macrófagos primitivos y progenitores eritroides (Alliot et al., 1999; Palis et al., 1999; Yoder, 2014). Sin embargo, Bertrand et al. (2005) situaba en E8 el comienzo de la génesis de los

macrófagos primitivos. Las revisiones más recientes coinciden en aceptar que los progenitores de macrófagos primitivos surgen en el saco vitelino hacia E7,5, antes de que se establezca la circulación sanguínea del embrión, y dichos progenitores se diferencian en macrófagos primitivos alrededor de E8,5 (Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016; Hoeffel y Ginhoux, 2015) (Fig. 6), momento que coincide con el comienzo de la circulación sanguínea funcional del embrión de ratón (McGrath et al., 2003; Palis et al., 1999; Phoon, 2001). Este acontecimiento del desarrollo permite comparar la cronología de la embriogénesis del ratón con la del pollo. Así, el inicio de la circulación sanguínea en el embrión de pollo tiene lugar en HH12 (Hogers et al., 1995; Sissman, 1970), por lo que esta edad del desarrollo sería equivalente a E8,5 en el embrión de ratón (Phoon, 2001; Sissman, 1970). De acuerdo con esta equivalencia, la diferenciación de los macrófagos primitivos en el saco vitelino del embrión de pollo ocurriría en HH12 (poco antes de E2) y sus progenitores estarían presentes en etapas previas a HH12. Esta cronología es compatible con los resultados obtenidos en quimeras de EP-SVC, los cuales mostraban que los macrófagos primitivos derivados de saco vitelino se observaban por primera vez en tejidos intraembrionarios en HH13 (Cuadros et al., 1992a). En el embrión de ratón, la formación de progenitores hematopoyéticos primitivos disminuye bruscamente hasta hacerse indetectable en E9 (20 pares de somitas, Palis et al., 1999), una edad que sería equivalente a HH14 (poco después de E2) en el embrión de pollo.

Una vez generados en el saco vitelino, los macrófagos primitivos colonizan los tejidos intraembrionarios a través de la circulación sanguínea (Ginhoux et al., 2010; Shepard y Zon, 2000). El mesénquima cefálico es el primer tejido intraembrionario en ser colonizado por macrófagos primitivos (Herbomel et al., 2001), los cuales han sido observados en el momento de atravesar la pared endotelial de los vasos sanguíneos de dicho mesénquima (Martín-Partido et al., 1991). Seguidamente, desde el mesénquima, los macrófagos primitivos son capaces de invadir diferentes órganos, comenzando por el rudimento cerebral (Fig. 6), en el cual se observan por primera vez en edades muy tempranas de la

embriogénesis. Así, en el cerebro de embrión de ratón, ya están presentes entre E8,5 (Alliot et al., 1999) y E9,25-9,5 (Ginhoux et al., 2010), mientras que en el embrión de pollo se observan en HH15 (poco después de E2) (Cuadros et al., 1993), y en el embrión de pez cebra a las 35 horas post-fertilización (Herbomel et al., 2001). La primera entrada de macrófagos primitivos en el cerebro es independiente de los vasos sanguíneos cerebrales y se lleva a cabo después de atravesar la lámina basal que rodea al SNC (Cuadros et al., 1993; Herbomel et al., 2001; Martín-Partido et al., 1991). Tras su entrada en el cerebro, los macrófagos primitivos invaden otros órganos embrionarios, tales como la piel o el hígado (Cuadros et al., 1992a; Herbomel et al., 2001; Sorokin et al., 1992) (Fig. 6).

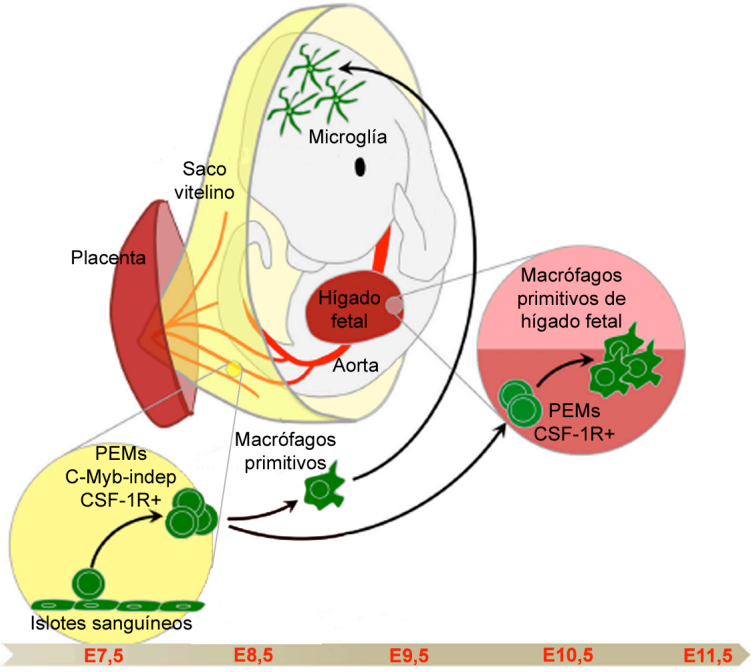

Fig. 6. Ontogenia de los macrófagos primitivos, según Hoeffel y Ginhoux (2015). Los progenitores eritro-mieloides (PEMs) más tempranos emergen en el saco vitelino alrededor de E7,5 (antes del establecimiento de la circulación sanguínea). Estos progenitores expresan CSF-1R y son independientes del factor de transcripción C-Myb. Tras el establecimiento de la circulación sanguínea alrededor de E8,5, los PEMs se diferencian en macrófagos primitivos así como eritrocitos y granulocitos primitivos. Los macrófagos primitivos colonizan todos los tejidos fetales, comenzando por la cabeza, donde darán lugar a la futura microglía, que es capaz de autorenovarse continuamente hasta la edad adulta. La población de macrófagos primitivos que coloniza el hígado fetal se expande antes del establecimiento de la hematopoyesis definitiva transitoria, en la que el hígado fetal será colonizado por macrófagos fetales derivados de monocitos.

Macrófagos fetales derivados de monocitos

Tras la aparición de los progenitores primitivos en E7,5, los progenitores eritro-mieloides de la hematopoyesis definitiva transitoria se originan en el saco vitelino del ratón en E8,25 (Frame et al., 2016; McGrath et al., 2015; Palis et al., 1999). Mientras que los progenitores de macrófagos primitivos se originan a partir de los islotes sanguíneos del saco vitelino (Fig. 6), los progenitores eritro-mieloides lo hacen a partir del endotelio hemogénico de los vasos sanguíneos vitelinos (Fig. 7), independientemente de la identidad arterial o venosa de éstos (Frame et al., 2016). Dichos progenitores eritro-mieloides de saco vitelino migran a tejidos intraembrionarios a través de la circulación sanguínea y colonizan el hígado fetal entre E9,5 y E14,5 (Gomez-Perdiguero et al., 2015; McGrath et al., 2015). En el hígado fetal, los progenitores eritro-mieloides dan lugar a monocitos fetales a partir de E12,5 (Hoeffel y Ginhoux, 2015), los cuales colonizan la piel, los pulmones y otros órganos intraembrionarios (Gomez-Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2012; Tan y Krasnow, 2016) (Fig. 7), donde se diferencian en diversas poblaciones de macrófagos, tales como las células de Langerhans y los macrófagos alveolares. Así, los macrófagos derivados de progenitores eritro-mieloides definitivos coinciden con los macrófagos primitivos en que ambos proceden de progenitores generados en el saco vitelino, pero los primeros se forman a partir de progenitores derivados del endotelio hemogénico que se diferencian en monocitos, mientras que los macrófagos primitivos derivan de progenitores generados en islotes sanguíneos que no pasan por la etapa de monocitos. Por lo tanto, usaremos el término "macrófagos fetales derivados de monocitos" para referirnos a los primeros.

Los monocitos fetales, precursores de macrófagos fetales, son predominantes en la circulación sanguínea del embrión de ratón a partir de E13,5 e infiltran todos los tejidos a partir de esa edad, con la excepción del cerebro, dando lugar a macrófagos residentes de diferentes órganos, tales como piel, pulmones, intestino y corazón (Hoeffel y Ginhoux, 2015). La ausencia de infiltración de monocitos fetales en el cerebro podría se consecuencia del

establecimiento de la barrera hemato-encefálica en edades embrionarias posteriores a E13,5 (Hoeffel y Ginhoux, 2015). Los macrófagos fetales derivados de monocitos que colonizan los diferentes órganos van siendo proporcionalmente más abundantes que los macrófagos primitivos que los habían colonizado en etapas anteriores del desarrollo, de forma que, en algunos de estos órganos, la mayoría de los macrófagos residentes del adulto derivan de macrófagos fetales, con una pequeña proporción de macrófagos residentes derivados de macrófagos primitivos (Hoeffel et al., 2012) (Fig. 7).

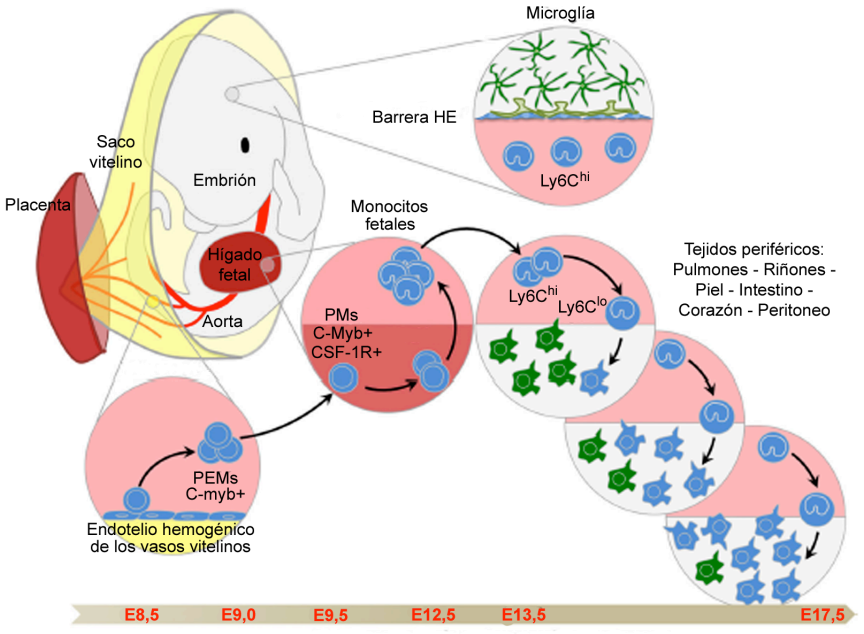

Fig. 7. Monopoyesis fetal y ontogenia de macrófagos en el embrión de ratón, según Hoeffel y Ginhoux (2015). En E8,5, el endotelio hemogénico del saco vitelino genera progenitores eritro-mieloides (PEMs) que expresan el factor de transcripción c-Myb, los cuales siembran el hígado fetal en E9,5, donde se expanden y dan lugar a progenitores mieloides (PMs) CSF-1R-positivos que generan monocitos fetales en E12,5. A través de la circulación sanguínea, los monocitos del hígado fetal colonizan todos los tejidos, con la excepción del cerebro (que ha sido aislado durante estas etapas del desarrollo mediante el establecimiento de la barrera hemato-encefálica). En los diferentes tejidos, los monocitos fetales se diferencian en macrófagos, que progresivamente van superando en número a los macrófagos primitivos que habían colonizado los tejidos en etapas anteriores del desarrollo. En algunos órganos, tales como el hígado o los pulmones, estos macrófagos derivados de monocitos son capaces de auto-renovarse, de manera que en la edad adulta no son reemplazados por monocitos derivados de médula ósea.

La procedencia mayoritaria de los macrófagos residentes de la edad adulta a partir de macrófagos fetales derivados de monocitos se ha puesto de manifiesto en algunos órganos, tales como epidermis, hígado, pulmones y riñones (Guilliams et al., 2013; Hoeffel y Ginhoux, 2015; Hoeffel et al., 2012). En estado de normalidad funcional, estos órganos no parecen ser colonizados por monocitos adultos generados en la médula ósea durante la hematopoyesis definitiva (Gomez-Perdiguero et al., 2015; Hashimoto et al., 2013; Schulz et al., 2012; Yona et al., 2013). Sin embargo, otros tejidos y órganos adultos, tales como dermis, corazón e intestino, son infiltrados por monocitos adultos derivados de médula ósea que dan lugar a macrófagos residentes que progresivamente reemplazan a los macrófagos derivados de monocitos fetales (Bain et al., 2014; Molawi et al., 2014; Tamoutounour et al., 2013). Por lo tanto, en la edad adulta, la población de macrófagos residentes de estos órganos parece proceder exclusivamente de monocitos generados en la médula ósea. No obstante, la procedencia de los macrófagos residentes de los órganos periféricos es un tema controvertido, sometido a constante revisión. Por ejemplo, un reciente estudio ha demostrado que cada una de las diferentes subpoblaciones de macrófagos pulmonares tiene distinta procedencia (Tan y Krasnow, 2016). Así, los macrófagos intersticiales primitivos proceden de macrófagos primitivos, los macrófagos intersticiales definitivos tienen su origen en la médula ósea y los macrófagos alveolares proceden de macrófagos fetales derivados de monocitos.

Diferencias en la dependencia de factores de transcripción entre macrófagos primitivos, progenitores eritro-mieloides y CMHs

Los macrófagos primitivos generados en la hematopoyesis primitiva, los progenitores eritro-mieloides de la hematopoyesis definitiva transitoria y las CMHs de la hematopoyesis definitiva muestran diferencias en su dependencia de distintos factores de transcripción, tales como c-Myb, Runx1 y PU.1. Por ejemplo, el factor c-Myb no se expresa en los macrófagos primitivos pero sí en los progenitores eritro-mieloides que producen monocitos fetales en el hígado y

parece estar relacionado con la capacidad de dichos progenitores para diferenciarse en monocitos (Hoeffel et al., 2015). Sin embargo, este factor no parece ser imprescindible para el desarrollo de macrófagos derivados de los progenitores eritro-mieloides, ya que la diferenciación de dichos macrófagos no se ve afectada en ratones deficientes para c-Myb (Gomez-Perdiguero et al., 2015; Schulz et al., 2012). Por el contrario, este factor c-Myb sí es requerido para el desarrollo de las CMHs y los monocitos y macrófagos derivados de las mismas (Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016; Schulz et al., 2012).

El factor de transcripción Runx1 parece ser necesario para la transición de endotelio hemogénico a células hematopoyéticas (Chen et al., 2009; Yokomizo et al., 2001). En estadios tan tempranos como HH4 y HH5 del embrión de pollo, este factor se expresa exclusivamente en grupos celulares precursores de islotes sanguíneos del área opaca (Bollerot et al., 2005), demostrando que la expresión de Runx1 está restringida a precursores de células hematopoyéticas. Los macrófagos primitivos que invaden el cerebro son Runx1-positivos (Ginhoux te al, 2010), pero a pesar de la expresión de este factor, se ha descrito que los macrófagos primitivos son independientes de Runx1 (Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016; Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013; Yokomizo et al., 2001), mientras que los progenitores eritro-mieloides que producen macrófagos fetales y las CMHs son Runx1-dependientes (Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016).

En cuanto a PU.1, tanto los macrófagos primitivos, como los progenitores eritro-mieloides de la hematopoyesis definitiva transitoria y las CMHs son dependientes de este factor (Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016), lo que explica que los ratones knockout deficientes para PU.1 carezcan de células mieloides (Back et al., 2004; McKercher et al., 1996), incluyendo la microglía (Beers et al., 2006; Kierdorf et al., 2013).

Origen vitelino de la microglía en mamíferos

En la actualidad, está bien establecido que la microglía es capaz de proliferar en el cerebro adulto en condiciones homeostáticas, lo que sugiere que la

población microglial se mantiene mediante autorrenovación. La proliferación microglial era demostrada en el cerebro de ratones mediante técnicas de autorradiografía tras la administración de timidina tritiada (Lawson et al., 1992). Sin embargo, los autores de este estudio concluían que progenitores de células microgliales también podían ser reclutados desde la circulación sanguínea. Posteriormente, Alliot et al. (1999) describían que una elevada proporción de células microgliales del cerebro adulto expresan el marcador de proliferación PCNA, apoyando así su capacidad proliferativa. La autorrenovación de la microglía era confirmada en ratones quiméricos obtenidos mediante experiencias de parabiosis entre ratones salvajes y ratones transgénicos que expresan GFP en todas sus células hematopoyéticas no eritroides (Ajami et al., 2007). Cinco meses después de haber llevado a cabo el intercambio de la circulación sanguínea, no se evidenciaba la presencia de células microgliales GFP-positivas en los ratones salvajes parabióticos, demostrando que no había reclutamiento de progenitores microgliales desde la circulación sanguínea. Además, tampoco se detectaban células microgliales GFP-positivas mediante el uso de dos modelos de activación microglial aguda o crónica en las quimeras parabióticas, a pesar del gran incremento en el número de células microgliales, sugiriendo que la nueva microglía se formaba mediante proliferación de la microglía preexistente. Recientemente, Askew et al. (2017b) han demostrado en ratones y humanos que el número de células microgliales permanece estable desde etapas postnatales tardías hasta la vejez, siendo mantenido por un estrecho acoplamiento espacial y temporal entre proliferación y apoptosis. La renovación microglial conseguida mediante este mecanismo es considerablemente rápida, permitiendo que la población total de microglía se renueve varias veces a lo largo de la vida.

El tamaño de la población microglial adulta del cerebro de ratón es establecido durante las primeras semanas de desarrollo postnatal, observándose que las células microgliales alcanzan un número máximo durante las dos primeras semanas postnatales, mientras que este número se reduce a la mitad durante el periodo comprendido entre la tercera y la sexta semana postnatal, manteniéndose

estable después de este periodo a lo largo de toda la vida adulta (Nikodemova et al., 2015). Según estos autores, la disminución del número de microglía entre las semanas postnatales 3 y 6 era debido al efecto combinado de una apoptosis microglial incrementada y una menor actividad proliferativa. Los factores moleculares que regulan dicha disminución no han podido ser identificados, ya que Nikodemova et al. (2015) no encontraron una correlación entre la disminución del número de células microgliales durante la tercera semana de desarrollo postnatal y los niveles de expresión de factores implicados en la supervivencia y proliferación microglial, tales como CSF-1, IL-34, CD200 y CX3CL1. Además, ratones transgénicos con sobreexpresión de CSF-1 mostraban mayor cantidad de microglía que los ratones salvajes en cualquier edad postnatal, pero en ellos también tenía lugar la disminución de la población microglial a partir de la tercera semana postnatal, por lo que esta disminución sería causada por factores diferentes de CSF-1 (Nikodemova et al., 2015).

Teniendo en cuenta que actualmente está bien demostrado que la población microglial del adulto se autorrenueva mediante proliferación, es lógico pensar que esta población se establece en el SNC antes de la edad adulta y durante la misma no hay sustitución de la población inicial por parte de monocitos derivados de médula ósea (ver apartado anterior de esta Introducción). Esta hipótesis ha sido confirmada en los últimos años gracias al progreso de las técnicas genéticas de mapeo de destino inducible por tamoxifeno, que permiten trazar linajes celulares específicos a través del desarrollo embrionario y postnatal del ratón. Estas técnicas se basan en la introducción de mutaciones definidas en genes diana del genoma de ratón que se expresan en un tipo celular concreto durante un determinado momento del desarrollo (revisado en Feil et al., 2014; Jensen y Dymecki, 2014; Joyner y Zervas, 2006). Con este propósito, se dispone en la actualidad de dos tipos de líneas de ratón: líneas que expresan Cre específicamente en un tipo celular y líneas reporteras de Cre.

Las *líneas de ratón que expresan Cre específicamente en un tipo celular* han sido generadas mediante la inserción del gen exógeno de la recombinasa Cre

quimérica inducible por tamoxifeno (gen Mer-Cre-Mer) en un locus del genoma de ratón bajo el control del promotor de un gen cuya expresión es específica de un tipo celular concreto (revisado en Bouabe y Okkenhaug, 2013). La recombinasa Cre es una enzima que cataliza la recombinación específica entre dos sitios de reconocimiento de ADN llamados sitios loxP, que han sido introducidos para flanquear un exón del gen de interés (Hamilton y Abremski, 1984). Actualmente se usa una recombinasa Cre quimérica (Cre-ER) (Metzger et al., 1995) en la que la recombinasa Cre se ha fusionado a un receptor de estrógeno mutado (ER) que tiene la capacidad de ligar el tamoxifeno, que es un agonista de estrógenos. Si no hay inducción por tamoxifeno, la recombinasa Cre-ER quimérica forma un complejo con la proteína de shock térmico hsp90 y queda secuestrada en el citoplasma en forma inactiva (Fig. 8). Cuando se administra tamoxifeno al sistema, éste rompe el complejo hsp90-Cre-ER y se une a la recombinasa Cre-ER, la cual se activa y migra al núcleo, donde es capaz de catalizar la eliminación del segmento de ADN flanqueado por sitios loxP.

Por otra parte, se dispone de diferentes *líneas de ratón reporteras de Cre*, que permiten el marcaje de la acción de la recombinasa Cre-ER activa sobre la secuencia de ADN flanqueada por sitios loxP. La más popular de estas líneas es la llamada línea R26R (revisado en Feil et al., 2014) en la que el gen reportero se localiza bajo el control del promotor del gen ROSA26 (que se expresa ubicuamente) pero está precedido por una secuencia "stop" transcripcional flanqueada por sitios loxP ("cassette stop") que previene la expresión de dicho gen reportero (Fig. 8). Se han utilizado diferentes genes reporteros, tales como β-galactosidasa (*lacZ*), proteína fluorescente amarilla mejorada (*eYFP*), *eGFP*, etc. El "cassette stop" es excindido cuando la recombinasa Cre-ER se activa mediante administración de tamoxifeno, permitiendo la expresión del gen reportero que proporciona el marcaje de la célula. La eliminación mediada por Cre del "cassette stop" es permanente, de manera que la expresión del gen reportero se mantiene en las células hijas, por lo que la progenie de la célula original puede ser rastreada a través del desarrollo hasta la edad adulta.

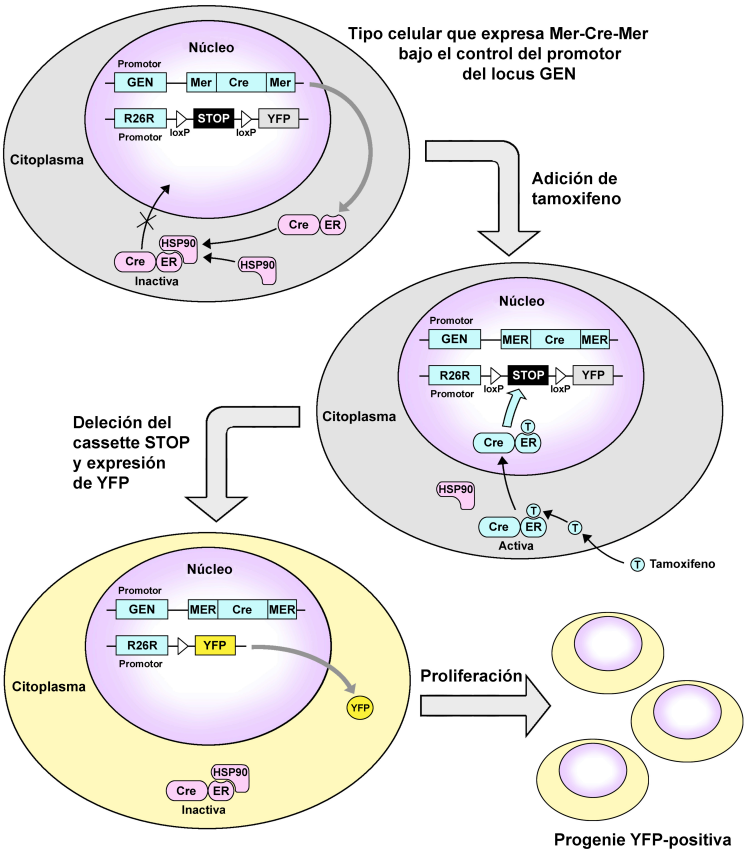

Fig. 8. Esquema que representa los principios básicos de la técnica de mapeo de destino inducible por tamoxifeno, que permite trazar linajes celulares específicos a través del desarrollo embrionario y postnatal del ratón. **A:** Los ratones generados con técnicas genéticas para este tipo de estudios contienen tanto el gen de la recombinasa Cre (Mer-Cre-Mer), que se expresa bajo el control de un promotor específico de tipo celular (GEN), como un gen reportero (YFP) localizado bajo el control del promotor del gen ROSA26 (R26R), que no se expresa porque está precedido de una secuencia "stop" flanqueada por sitios loxP (loxP-STOP-loxP). La recombinasa Cre quimérica (Cre-ER), expresada por el gen Mer-Cre-Mer, forma un complejo con la proteína de shock térmico hsp90 y queda secuestrada en el citoplasma en forma inactiva. **B:** El tamoxifeno administrado exógenamente rompe el complejo hsp90-Cre-ER y se une a la recombinasa Cre-ER, la cual se activa y migra al núcleo, donde cataliza la eliminación de la secuencia STOP del gen reportero flanqueada por sitios loxP. **C:** La eliminación de la secuencia STOP permite la expresión del gen reportero bajo el control de R26R, liberando al citoplasma la proteína marcadora YFP que dota de fluorescencia amarilla a la célula. **D:** La eliminación mediada por Cre de la secuencia STOP es permanente, por lo que la expresión de YFP se mantiene en las células hijas, de manera que la progenie de la célula original permanece marcada a través del desarrollo y puede ser rastreada hasta la edad adulta.

Los ratones utilizados para los estudios de mapeo de destino inducible por tamoxifeno expresan tanto el gen Mer-Cre-Mer bajo el control de un promotor específico de tipo celular como el gen reportero inducible por tamoxifeno (Fig. 8). Estos ratones se obtienen mediante el cruce de ratones que expresan Cre en un tipo celular concreto con ratones reporteros de Cre. En los embriones obtenidos de este modo, la recombinación puede ser inducida mediante inyección de tamoxifeno en las hembras gestantes durante una pequeña ventana temporal, de forma que la expresión irreversible del gen reportero tiene lugar en las células embrionarias que expresan el gen de la recombinasa Cre bajo el control de un promotor específico de tipo celular así como en su progenie. Por lo tanto, las células marcadas pueder ser rastreadas en momentos posteriores del desarrollo embrionario o postnatal, determinando así su destino final. En los estudios de rastreo de un linaje celular, los porcentajes de células marcadas (derivadas de progenitores en los que tuvo lugar la recombinación) se determinan mediante análisis de citometría de flujo de suspensiones celulares obtenidas de diferentes órganos en distintos momentos del desarrollo. La comparación de los porcentajes de recombinación en diferentes poblaciones celulares (identificadas por su especificidad molecular) en distintos momentos del desarrollo permite obtener pistas fiables sobre las relaciones de linaje entre dichas poblaciones, aunque no proporcionan conclusiones indudables.

Dos modelos de mapeo de destino inducible por tamoxifeno en ratón (*Runx1*$^{Cre/eYFP}$ y *Csf1r*$^{Cre/eYFP}$) han sido particularmente útiles para demostrar el origen de la microglía a partir de progenitores del saco vitelino (Ginhoux et al., 2010; Gomez-Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2015; Mass et al., 2016; Schulz et al., 2012). Runx1 es un factor de transcripción relacionado con la generación de progenitores hematopoyéticos cuya expresión está restringida al saco vitelino extra-embrionario hasta E8,0 (Ginhoux et al., 2010; Samokhvalov et al., 2007). En el estudio de Samokhvalov et al. (2007) se generaban ratones que expresan la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno bajo el control del promotor del locus *Runx1* locus (*Runx1*$^{Cre/WT}$), los cuales se cruzaban con la línea

homocigótica de ratón reportero de Cre *Rosa26*$^{eYFP/eYFP}$ para obtener ratones *Runx1*$^{Cre/eYFP}$, útiles para el rastreo genético de células hematopoyéticas derivadas de saco vitelino. En el otro modelo de ratón (*Csf1r*$^{Cre/eYFP}$), el gen de la recombinasa Cre se expresa bajo el control del locus *Csf1r*, un gen esencial para el desarrollo de macrófagos primitivos que se expresa en el saco vitelino en E9,0 (Ginhoux et al., 2010).

El análisis de la contribución de progenitores del saco vitelino a las poblaciones de microglía y monocitos sanguíneos en ratones *Runx1*$^{Cre/eYFP}$ adultos activados con tamoxifeno en diferentes edades embrionarias desde E6,5 hasta E10,5 mostraba que la microglía cerebral deriva de progenitores eritro-mieloides Runx1-positivos que se originan en el saco vitelino alrededor de E7,5 pero no de otros progenitores generados con posterioridad en el saco vitelino o durante la hematopoyesis definitiva intra-embrionaria (Ginhoux et al., 2010). En un reciente y complejo estudio (Hoeffel et al., 2015), se trazaba la progenie de los macrófagos primitivos mediante el uso del modelo de ratón *Csf1r*$^{Cre/eYFP}$ en el que se expresaba el gen de la recombinasa Cre tras la administración de tamoxifeno en E8,5, justo antes de la aparición de macrófagos primitivos CSF-1R-positivos en el saco vitelino (en E9,0), una estrategia experimental que había sido previamente utilizada por Schulz et al. (2012). El estudio de Hoeffel et al. (2015) también utilizaba el modelo de ratón *Runx1*$^{Cre/eYFP}$ para rastrear la progenie de los progenitores eritro-mieloides de saco vitelino tempranos y tardíos tras la administración de tamoxifeno en E7,5 y E8,5, respectivamente. Este estudio confirmaba que los macrófagos primitivos, generados en el saco vitelino durante la hematopoyesis primitiva, son los principales precursores de la microglía, mientras que la mayoría de las poblaciones de macrófagos residentes de tejidos (en el hígado, piel, riñón y pulmones) derivan de monocitos fetales, que son generados en el saco vitelino durante la hematopoyesis definitiva transitoria. Hoeffel et al. (2015) suponían que el endotelio hemogénico de los vasos del saco vitelino da lugar inicialmente a progenitores eritro-mieloides tempranos (marcados mediante la administración de tamoxifeno en E7,5), los cuales generan

macrófagos primitivos capaces de alcanzar diferentes órganos, incluido el cerebro, donde se transforman en células microgliales (Fig. 6). Con posterioridad, el endotelio vascular del saco vitelino deja de producir progenitores eritro-mieloides tempranos y genera progenitores eritro-mieloides multipotentes tardíos (marcados mediante la administración de tamoxifeno en E8,5), los cuales alcanzan el hígado fetal a través de la circulación sanguínea donde proliferan y se diferencian en múltiples linajes celulares, incluidos los monocitos fetales. Estos monocitos colonizan finalmente diferentes órganos, con la excepción del cerebro, en los que van progresivamente reemplazando a los macrófagos primitivos, dando lugar a los macrófagos residentes de la mayoría de los tejidos (Fig. 7). En resumen, los estudios del laboratorio de Ginhoux defienden que la microglía del SNC es la única población celular del organismo que procede de macrófagos primitivos generados en el saco vitelino durante la hematopoyesis primitiva, mientras que las diferentes poblaciones de macrófagos residentes de otros órganos proceden de macrófagos fetales derivados de monocitos.

Los estudios del laboratorio de Gomez-Perdiguero, que también han utilizado técnicas de mapeo de destino inducible por tamoxifeno, apoyan el origen de la microglía a partir del saco vitelino (Gomez-Perdiguero et al., 2015; Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016; Mass et al., 2016). Sin embargo, en contraposición a la idea defendida por el laboratorio de Ginhoux, los estudios de Gomez-Perdiguero defienden la hipótesis de que tanto la microglía del SNC como los macrófagos residentes de otros órganos tienen un origen común y todos proceden de macrófagos fetales derivados de monocitos generados en el saco vitelino durante la hematopoyesis definitiva transitoria, que han colonizado el hígado fetal antes de alcanzar los diferentes órganos definitivos (ver revisión de Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016). Según esta hipótesis, progenitores eritro-mieloides se generan en el saco vitelino desde E7,5 a E10,5 (Gomez-Perdiguero et al., 2015) y siembran el hígado fetal a partir de E9 (Gomez-Perdiguero et al., 2015; Kieusseian et al., 2012). El nicho del hígado fetal proporciona un microambiente con señales que actúan sobre los progenitores eritro-mieloides para

que éstos puedan avanzar en su potencial de diferenciación (Gomez-Perdiguero et al., 2015). Después de que dichos progenitores se diferencien en monocitos fetales dentro del hígado fetal, éstos colonizan diferentes órganos, incluido el cerebro, de forma dependiente del receptor de la fractalquina CX3CR1 (Fig. 9). Dentro de los diferentes órganos, los monocitos fetales sufren trayectorias de diferenciación específicas de cada órgano, dando lugar a la diversificación fenotípica de los distintos tipos de macrófagos residentes (Mass et al., 2016). Se han analizado los determinantes moleculares que intervienen en la diferenciación específica de cada uno de los tipos de macrófagos residentes en órganos, siendo los factores de transcripción Sall1 y Sall3 los que se expresan al comienzo de la diferenciación de la microglía cerebral (Koso et al., 2016; Lavin et al., 2014; Mass et al., 2016) (Fig. 9). Los programas transcripcionales responsables de la diversificación de los diferentes macrófagos comienzan a establecerse inmediatamente después de que éstos colonicen cada órgano (Mass et al., 2016), probablemente como consecuencia de la recepción de señales específicas del microambiente del órgano.

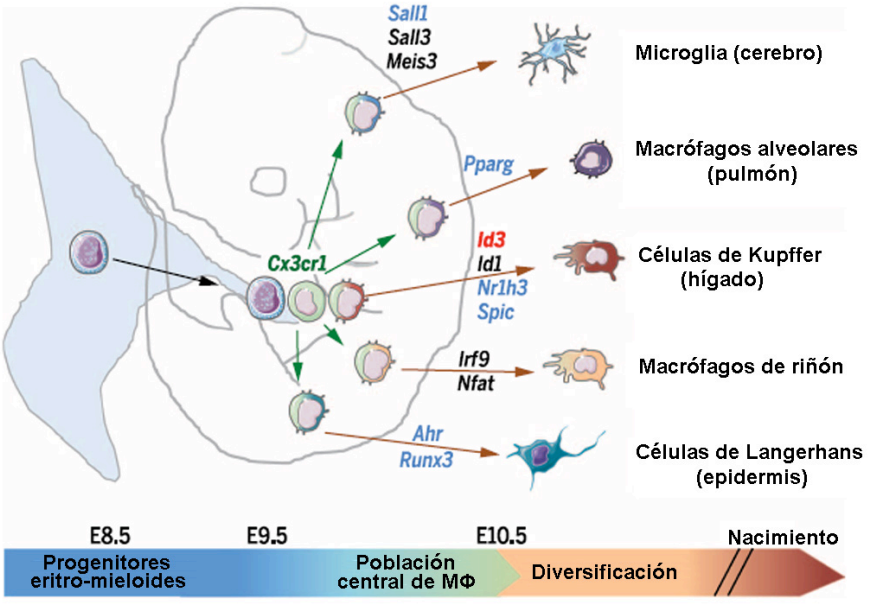

Fig. 9. Diversificación de los diferentes tipos de macrófagos residentes de tejidos, según Mass et al. (2016). Los progenitores eritro-mieloides generados en el saco vitelino colonizan el hígado fetal, donde dan lugar a precursores de macrófagos (monocitos fetales), los cuales adquieren un programa transcripcional central y colonizan diferentes órganos de forma dependiente de CX_3CR1

(flechas verdes). La diversificación de los macrófagos residentes se inicia con la expresión de reguladores transcripcionales específicos de cada tejido (flechas marrones). Sall1 y Sall3 son factores de transcripción importantes para la diferenciación y mantenimiento de la microglía.

Sall1 actúa como un represor transcripcional (De Celis y Barrio, 2009) y es uno de los principales factores de transcripción que desempeñan un papel crucial en el establecimiento de la identidad microglial durante estadios del desarrollo tempranos. Un reciente trabajo ha demostrado la ausencia de microglía normal en ratones deficientes en NRROS, los cuales mueren antes de los 6 meses de edad (Wong et al., 2017). Estos resultados apoyan la participación de Sall1 en la especificación de la microglía, ya que NRROS es una proteína transmembrana del retículo endoplasmático requerida para la expresión normal de Sall1. En otro estudio, la inactivación del locus Sall1 murino *in vivo* induce la conversión de la microglía ramificada en fagocitos inflamatorios, dando lugar a alteraciones de la neurogénesis y de la homeostasis del tejido nervioso (Buttgereit et al., 2016). Por otra parte, en ratones deficientes en Sall1, el proceso de colonización del SNC por parte de progenitores microgliales no se ve afectado, pero la morfología de la microglía cambia desde una forma ramificada a una apariencia ameboide (Koso et al., 2016). Los resultados de estos tres estudios han confirmado la participación de Sall1 en el establecimiento de la identidad microglial durante el desarrollo embrionario.

Origen intraembrionario de la microglía de vertebrados no mamíferos adultos

Aunque la hipótesis predominante en la actualidad es que la microglía de mamíferos procede de progenitores generados en el saco vitelino, ya sean macrófagos primitivos o macrófagos fetales derivados de monocitos, se ha argumentado que el sistema de rastreo celular Cre-ER-loxP controlado por un promotor génico que se ha utilizado en los estudios de mapeo de destino de la microglía de mamíferos no proporciona suficiente resolución espacial para determinar el origen de la microglía de forma indudable (Xu et al., 2015). Así,

poblaciones celulares con marcadores no caracterizados derivadas de la región AGM o de la médula ósea podrían no haber sido detectadas con estas técnicas de mapeo de destino con poca resolución espacio-temporal (Tay et al., 2016a). De ahí que sea necesario tener en cuenta estas limitaciones técnicas de los citados procedimientos de mapeo de destino cuando se interpretan los resultados obtenidos con ellos (Ginhoux y Guilliams, 2016; Kierdorf et al., 2015), sobre todo teniendo en cuenta los resultados de dos estudios en el pez cebra (Xu et al., 2015) y en el pollo (Garceau et al., 2015), que apoyan un origen intraembrionaro de la microglía del SNC adulto de peces y aves.

En el estudio realizado en el pez cebra, Xu et al. (2015) usaban una novedosa técnica de mapeo de destino de alta resolución temporo-espacial inducida por laser, para lo que generaban la línea reportera de pez cebra en la que las células mieloides, incluyendo la microglía, expresaban DsRedx en condiciones normales, pero esta expresión cambiaba a GFP tras la eliminación del locus DsRedx mediada por la recombinasa Cre-ER. Esta línea reportera se cruzaba con una línea de pez cebra inducible por choque térmico, dando lugar a una línea doble transgénica que se utilizaba para realizar el mapeo de destino de la microglía. Para llevar a cabo el marcaje celular restringido a una zona y un momento del desarrollo, los autores aplicaban un choque térmico mediante irradiación con laser infrarrojo que inducía la expresión de Cre-ER en una región anatómica específica y en un momento del desarrollo concreto seguido de la activación de Cre-ER mediada por administración de tamoxifeno. Con esta técnica, los autores demostraban que la microglía cerebral de la etapa larvaria deriva de progenitores generados en los islotes sanguíneos rostrales del saco vitelino, de forma similar a lo descrito en mamíferos. Por el contrario, en peces juveniles y adultos, la microglía de procedencia vitelina disminuía rápidamente, llegando a ser indetectable a la edad de 1 año, mientras que microglía de procedencia intraembrionaria, generada en la pared de la aorta dorsal (equivalente a la región AGM de mamíferos), comenzaba a colonizar el cerebro desde los 15

días post-fertilización en adelante y llegaba a ser la población microglial dominante a la edad de 3 meses.

Resultados similares eran obtenidos en el estudio realizado en el pollo (Garceau et al., 2015), en el que se rastreaba el destino de células sanguíneas derivadas de saco vitelino o de médula ósea marcadas con fluorescencia que se habían inyectado en embriones de pollo de estadios HH16-17 (antes de la aparición de los grupos aórticos de CMHs, que tiene lugar a partir de HH18). Las células sanguíneas inyectadas procedían de pollos transgénicos con expresión ubícua de eGFP y, por lo tanto, estaban marcadas con fluorescencia y podían ser detectadas a diferentes edades del desarrollo embrionario o post-eclosión. En experimentos en los que células sanguíneas eGFP-positivas derivadas de saco vitelino eran inyectadas en embriones de HH16-17, se podían detectar algunas células microgliales eGFP-positivas en el cerebro de pollos recién nacidos, pero éstas desaparecían en el cerebro de pollos adultos. Por el contrario, cuando en los embriones de HH16-17 se inyectaban células eGFP-positivas procedentes de médula ósea de pollos transgénicos recién nacidos, se observaban células microgliales eGFP-positivas en el cerebro de pollos adultos. Estos resultados sugerían que la microglía de procedencia vitelina está presente en el SNC de aves durante el desarrollo embrionario, pero ésta desaparece después de la eclosión y es reemplazada por microglía de procedencia intraembrionaría derivada de médula ósea. La procedencia vitelina de la microglía durante el desarrollo embrionario de las aves había sido sugerida previamente por los estudios de nuestro laboratorio que utilizaban quimeras de EP-SVC, en los que se demostraba la colonización del SNC por macrófagos primitivos procedentes del saco vitelino que podían ser precursores de células microgliales (Cuadros et al., 1993; Martín-Partido et al., 1991). Sin embargo, las quimeras de EP-SVC no daban pistas sobre la posible sustitución de la microglía de origen vitelino del SNC embrionario por otra de origen intraembrionario en el SNC adulto, ya que dichas quimeras no sobrevivían más allá de E9.

En resumen, la idea predominante en la actualidad defiende la procedencia vitelina de la microglía presente en el SNC embrionario, tanto en mamíferos como en peces y aves, mientras que la procedencia vitelina o intraembrionaria de la microglía del SNC adulto es una cuestión que permanece abierta y requiere nuevos estudios en diferentes grupos de vertebrados.

DESARROLLO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

El desarrollo de la microglía en el SNC puede dividirse en tres etapas: 1) entrada de precursores microgliales en el SNC en desarrollo; 2) propagación de los mismos por el SNC; y 3) diferenciación de los precursores microgliales tras alcanzar su localización final (Navascués et al., 1996) (Fig. 10). Estos procesos del desarrollo microglial han sido analizados en diversas 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).

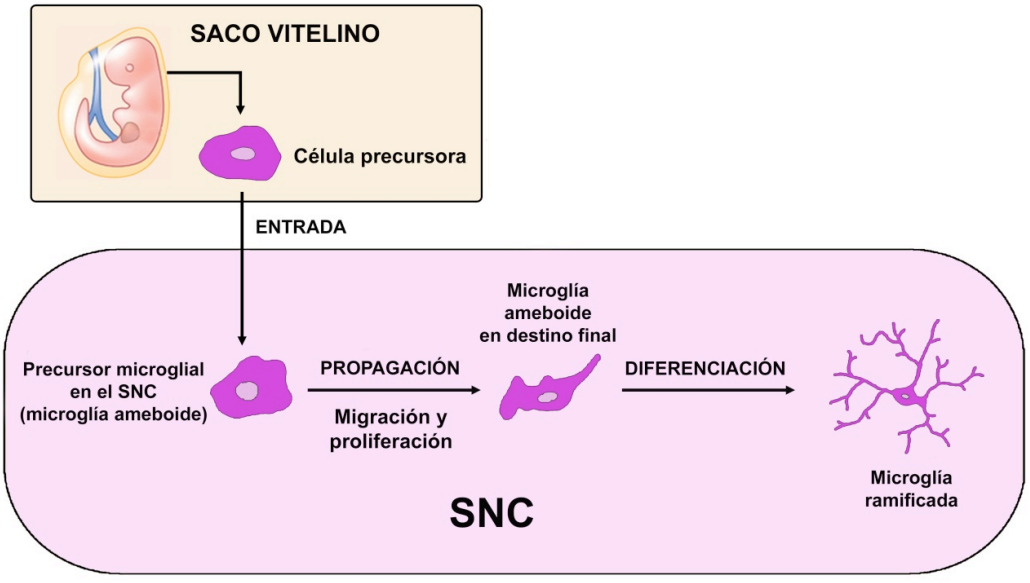

Fig. 10. Representación esquemática de las diferentes etapas del desarrollo de las células microgliales en el SNC. Tras entrar en el SNC procedentes del saco vitelino, las células microgliales ameboides se propagan por todas las regiones del SNC mediante mecanismos de migración y proliferación. Finalmente, cuando alcanzan su localización final, las células microgliales se diferencian, dando lugar a la microglía ramificada del SNC adulto (modificado de Cuadros y Navascués, 1998).

Entrada de precursores microgliales en el SNC

Los progenitores microgliales pueden entrar en el SNC a través de diferentes vías, tales como la superficie meníngea, los ventrículos cerebrales y los vasos sanguíneos. La entrada desde la superficie meníngea implica que progenitores microgliales presentes en el esbozo de piamadre en etapas tempranas del desarrollo deberían atravesar la superficie pial y, una vez dentro del SNC, darían lugar a la microglía ameboide. Esta vía de entrada fue inicialmente propuesta por del Río-Hortega (1932) y ha sido apoyada por observaciones microscópicas posteriores llevadas a cabo en el SNC de mamíferos y aves (Ashwell, 1991; Boya et al., 1979, 1991; Cuadros et al., 1993, 1994, 1997; Hirasawa et al., 2005; Kurz y Christ, 1998). La entrada de precursores microgliales a través de la superficie pial del cerebro es compatible con la procedencia vitelina de los progenitores microgliales a partir de progenitores del saco vitelino, ya que, en etapas tempranas del desarrollo embrionario, los macrófagos primitivos colonizan el mesénquima que rodea el esbozo del SNC y, desde allí, penetran en el parénquima nervioso atravesando la superficie pial, tal como se ha demostrado en aves (Cuadros et al., 1993; Martín-Partido et al., 1991). Aunque estos estudios demostraban la procedencia vitelina de los macrófagos primitivos y que éstos adquirían caracteres parecidos a la microglía ameboide cuando entraban en el cerebro, no demostraban la diferenciación de dichos macrófagos en microglía ramificada. La entrada de progenitores microgliales a través de la superficie pial también ha sido observada de forma directa, mediante video-microscopía de interferencia diferencial, en embriones de pez cebra (Herbomel et al., 2001).

El ventrículo del SNC en desarrollo ha sido descrito como una segunda vía de entrada de precursores microgliales en el parénquima nervioso. Numerosos fagocitos están presentes en la cavidad ventricular desde etapas muy tempranas del desarrollo, procedentes del mesénquima que rodea el esbozo cerebral (Martín-Partido y Navascués, 1990). Estos fagocitos son capaces de atravesar la superficie apical de la pared cerebral (Cuadros et al., 1997; Kaur et al., 2001; Li et al., 1997)

y podrían diferenciarse en microglía ramificada en etapas más avanzadas del desarrollo.

La extravasación de células circulantes desde la luz de los vasos sanguíneos cerebrales puede constituir una tercera vía de entrada de progenitores microgliales en el SNC. En apoyo de la existencia de esta vía de entrada, se ha 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). Además, la ausencia de circulación sanguínea funcional en el SNC de embriones de ratón nulos para Ncx-1 impide la colonización del parénquima nervioso por macrófagos primitivos (Ginhoux et al., 2010).

Propagación de la microglía en el SNC: migración y proliferación

Una vez que los precursores microgliales entran en el SNC, se propagan dentro del mismo mediante dos mecanismos: migración y proliferación. Estudios previos de nuestro grupo de investigación llevados a cabo en regiones del SNC de embriones de codorniz con estructura 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** tiene lugar en dos etapas sucesivas, denominadas migración tangencial y migración radial (Cuadros y Navascués, 2001; Navascués et al., 1996, 2000). La migración tangencial se lleva a cabo en dirección paralela a la superficie pial y permite que las células microgliales se diseminen en un determinado nivel de profundidad por toda la extensión de la zona colonizada. Con posterioridad, la migración radial, que ocurre en dirección perpendicular a la superficie pial, permite que las células microgliales migren desde la capa inicialmente colonizada hacia otros niveles de profundidad de la región colonizada.

Las células microgliales utilizan diferentes componentes del sustrato del SNC en desarrollo (fascículos axónicos, vasos sanguíneos y glía radial) como

guías mecánicas para poder migrar (Cuadros y Navascués, 2001). Frecuentemente, las células microgliales migran a través de regiones de sustancia blanca que contienen numerosos axones orientados en la misma dirección de la migración, tal y como ocurre en el techo óptico (Cuadros et al., 1994), en el cerebelo (Cuadros et al., 1997; Navascués et al., 1996), en el cerebro anterior (Verney et al., 2010) y en la retina (Cuadros y Navascués, 2001; Marín-Teva et al., 1998). Numerosos estudios han demostrado que la microglía ameboide también migra asociada a la pared de los 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).

En nuestro laboratorio se ha utilizado la retina de codorniz como un modelo idóneo para el estudio de la migración de la microglía ameboide ya que se encuentra anatómicamente delimitada del resto del SNC, permitiendo su fácil aislamiento, posee una distribución en capas que facilita la identificación de los distintos niveles de migración y permite el uso del anticuerpo QH1 (específico de codorniz) que facilita el reconocimiento específico de las células microgliales en estadios embrionarios y adultos. Además, la retina de aves es completamente avascular, ya que el ojo de este grupo de animales contiene un órgano profusamente plegado y vascularizado, denominado pecten, el cual se proyecta hacia el interior del vítreo desde la unión de la cabeza del nervio óptico y la retina. En él se concentran numerosos vasos sanguíneos, responsables de la nutrición de las células de la retina mediante difusión de nutrientes a través del vítreo (Bellhorn y Bellhorn, 1975; Meyer, 1977). La condición avascular de la retina de aves se ha utilizado ventajosamente en estudios sobre el origen de la microglía, ya que descarta un posible origen de la misma desde los vasos sanguíneos. Por todo ello, la retina de codorniz es una región del SNC con características idóneas para el estudio del comportamiento y desarrollo de la microglía.

La microglía ameboide entra en la retina de codorniz desde la zona central, ocupada por la cabeza del nervio óptico y la base del pecten (CNO/BP), entre E7 y E16. Seguidamente, migra tangencialmente en dirección centro-periférica (Navascués et al., 1995) sobre los fascículos axónicos que conforman 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 las capas plexiformes (CPI y CPE), en las que se diferencia en microglía ramificada (Marín-Teva et al., 1999c; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004) (Fig. 11).

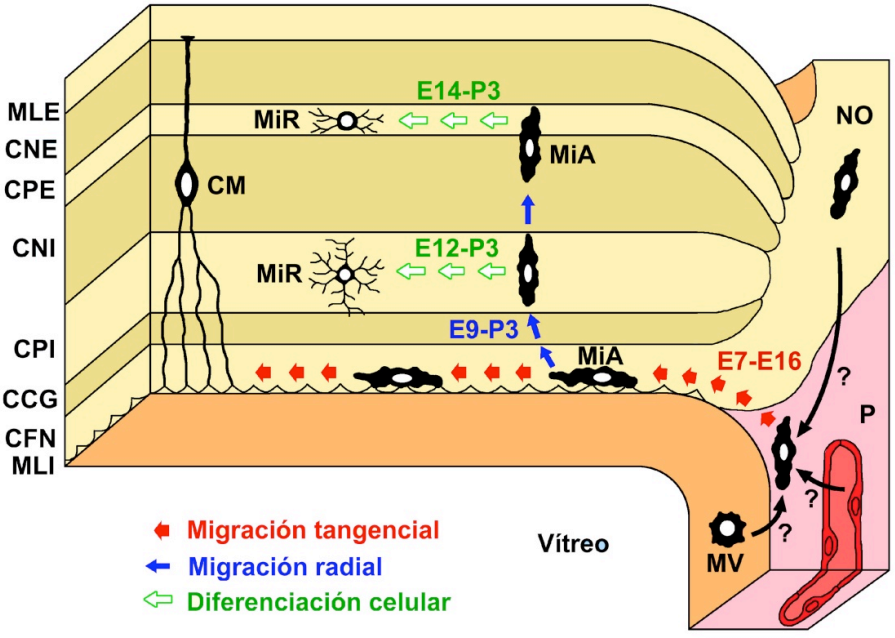

Fig. 11. Representación esquemática de la cronología (E: día de incubación; P: día post-eclosión) de la entrada y migración de la microglía en la retina embrionaria de codorniz. La entrada de precursores microgliales se produce desde el pecten (P) y cabeza del nervio óptico (NO), a partir de E7. Una vez dentro de la retina, la microglía ameboide (MiA) sufre migración tangencial (flechas rojas) en la capa de fibras nerviosas (CFN) entre E7 y E16. Seguidamente, la microglía ameboide migra radialmente (flechas azules) entre E9 y P3, para colonizar la capa plexiforme interna (CPI) y la capa plexiforme externa (CPE), en las que se diferencia (flechas verdes) entre E12 y P3, dando lugar a microglía ramificada (MiR). CM: célula de Müller; MLI: membrana limitante interna; CCG: capa de células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; CNE: capa nuclear externa; MLE: membrana limitante externa. Modificado de Navascués et al. (1995).

Las células microgliales ameboides que migran tangencialmente por la superficie vítrea de la retina embrionaria de codorniz muestran una morfología característica alargada, orientada en la dirección de la migración, con extensos lamelipodios que emergen desde el soma o desde prolongaciones cortas y gruesas (Marín-Teva et al., 1998). El mecanismo de migración tangencial sobre los pies terminales de las células de Müller tiene lugar en varias fases: 1) extensión polarizada de lamelipodios en el borde delantero de la célula; 2) anclaje de la célula al sustrato; 3) translocación del soma hacia la parte delantera de la célula; y 4) retracción de la parte trasera de la célula. Aunque la migración es, en conjunto, centro-periférica, una célula microglial concreta realiza movimientos ectocásticos hacia delante y hacia atrás y muestra interacciones repulsivas con células microgliales vecinas (Carrasco, 2012; Marín-Teva et al., 1998), similares a las descritas en las células de Cajal-Retzius de la corteza cerebral (Villar-Cerviño et al., 2013).

Durante la migración tangencial, la microglía ameboide se desplaza por los surcos ocupados por fascículos de axones, delimitados lateralmente por las prolongaciones radiales de 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 tan estructurado actúa como una guía mecánica de la microglía ameboide para su dispersión por toda la extensión de la retina. Esta hipótesis se ve corroborada por el hecho de que la microglía ameboide en la zona marginal de la retina migra circunferencialmente en vez de hacerlo centro-periféricamente, hecho que coincide con un cambio en la orientación de los surcos, que también se disponen circunferencialmente en esta región (Marín-Teva et al., 1999b). Por otro lado, las células de Müller están distribuidas radialmente en forma de empalizada, lo que facilita la migración radial de la microglía ameboide desde la parte vítrea de la retina hacia las capas plexiformes (Navascués et al., 1996; Sánchez-López et al., 2004). En otras regiones del SNC, como el cerebro o la médula espinal, la microglía ameboide también migra adherida a la glía radial (Rezaie y Male, 1999), equivalente a la glía de Müller de la retina,

sugiriendo que los mecanismos de migración microglial descubiertos en el modelo de retina son similares a los que tienen lugar en otras partes del SNC.

Además de la migración, la microglía también utiliza la **proliferación** como mecanismo para propagarse por todo el SNC. En efecto, la microglía ameboide muestra una gran actividad proliferativa, hecho que ha sido demostrado por la detección de células microgliales ameboides en mitosis (Marín-Teva et al., 1999a; Schnitzer, 1989; Svahn et al., 2013; Wu et al., 1996), la observación *in vivo* mediante videomicroscopía de células microgliales que se están dividiendo (Ginhoux et al., 2010), 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 Ki-67 (Monier et al., 2006; Zusso et al., 2012) y 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 ameboide va disminuyendo progresivamente conforme avanza el desarrollo (Marín-Teva et al., 1999a; Zusso et al., 2012). Sin embargo, al contrario de lo que se pensaba hasta hace pocos años, un estudio reciente ha demostrado que la microglía diferenciada del SNC adulto de ratón y humano presenta una alta tasa de proliferación, permitiendo varios ciclos de renovación de toda la población a lo largo de la vida del organismo (Askew et al., 2017b).

En relación con los mecanismos moleculares que regulan la proliferación microglial durante la colonización del SNC en desarrollo, se han propuesto varios factores solubles como moléculas que estimulan dicha proliferación. Entre ellos, destacan algunas citoquinas como CSF-1, GM-CSF ("granulocyte-macrophage colony stimulating factor") e interleuquina 3 (IL-3, también llamada "multipotential-CSF"). El papel de CSF-1 en la proliferación microglial parece estar apoyado por el hecho de que ratones nulos para CSF-1 muestran una reducción significativa del número de células microgliales con respecto a la cepa silvestre (Kondo et al., 2007; Kondo y Duncan, 2009; Wegiel et al., 1998), lo que podría deberse a una disminución de la tasa de proliferación microglial durante el

desarrollo de los mismos. De acuerdo con estos resultados, ratones transgénicos que sobreexpresan CSF-1 muestran un número de células microgliales mayor que el de los controles, aparentemente promovido por una estimulación de la proliferación (De et al., 2014). Otros estudios *in vitro* han demostrado que el CSF-1 induce proliferación microglial, mientras que ésta se ve muy reducida al tratar con un antisuero anti-CSF-1 (Alliot et al., 1991; Sawada et al., 1990). El efecto mitogénico sobre la microglía ameboide de otras citoquinas, como GM-CSF e IL-3, o neurotrofinas, como BDNF ("brain derived neurotrophic factor") y neurotrofina 3 (NT-3), también ha sido demostrado *in vitro* (Elkabes et al., 1996; Giulian e Ingeman, 1988; Gomes et al., 2013; Zhang et al., 2003).

La mayor o menor tasa de proliferación de la microglía ameboide durante el desarrollo del SNC probablemente depende del equilibrio entre diversos factores estimulantes (como los arriba descritos) e inhibidores, como el factor de transcripción Runx1 (Navascués et al., 2000; Zusso et al., 2012).

Diferenciación de la microglía

La microglía ramificada deriva de la diferenciación de la microglía ameboide (Barron, 1995; Cuadros y Navascués, 1998; Hirasawa et al., 2005; Ling y Wong, 1993; Perry y Gordon, 1991; Rezaie y Male, 1999), y entre ambos estados existen formas intermedias (Ling y Wong, 1993; Navascués et al., 1995; Perry et al., 1985; Rezaie y Male, 1999; Wu et al., 1994). Este hecho ha sido confirmado mediante la observación con videomicroscopía a lapsos de tiempo de la transición entre microglía ameboide y microglía ramificada en el cerebro en desarrollo del pez cebra (Svahn et al., 2013). Aunque el proceso de diferenciación se completa cuando la microglía ameboide alcanza su localización final, el inicio de la ramificación de la microglía comienza en los momentos finales de su migración (Sánchez-López et al., 2004). Una vez diferenciada, cada célula microglial extiende sus prolongaciones en un territorio definido sin solaparse con los 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 basada en la inhibición por contacto que muestran las células microgliales (Carrasco et al., 2011; Jinno et al., 2007).

Durante el proceso de diferenciación, la microglía sufre cambios en la expresión génica que provocan las modificaciones de su inmunofenotipo, desapareciendo o disminuyendo la expresión de ciertas moléculas, y apareciendo o aumentando la expresión de otras. Por ejemplo, la expresión de algunos marcadores antigénicos presentes en la microglía ameboide, como CD11b, CD45 o CD68, disminuye en la 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), al igual que las glicoproteínas puestas de manifiesto por la isolectina B4 de Griffonia simplicifolia (Wu et al., 1994) y algunas enzimas como la 5'-nucleotidasa (Dalmau et al., 1998b). Por el contrario, otras moléculas, como el queratán-sulfato, ausentes en la microglía ameboide se expresan en la microglía ramificada (Bertolotto et al., 1995). Además, la diferenciación de la microglía ameboide a microglía ramificada supone una profunda reorganización del citoesqueleto microtubular (Fanarraga et al., 2009; Ilschner y Brandt, 1996).

El análisis y comparación de los transcriptomas de la microglía ameboide y la microglía ramificada del cuerpo calloso de ratas postnatales y adultas, demostró las diferencias en la expresión génica entre ambos fenotipos (Parakalan et al., 2012). La microglía ameboide expresa genes relacionados con la proliferación (Myc), muerte (Apaf-1), migración (Dcx) y diferenciación (MCl1 e Id2) celular, ausentes en la microglía ramificada. Por otra parte, la microglía ramificada expresa genes relacionados con la transmisión sináptica (Grin2c) y la ramificación (Lsp1), ausentes en la microglía ameboide. Estos cambios en la expresión génica parecen estar controlados por factores de transcripción, como Runx1 (Zusso et al., 2012) y Sall1 (Koso et al., 2016), los cuales a su vez parecen estar regulados por microARNs, como miR-124 (Ponomarev et al., 2013). La expresión de muchos reguladores transcripcionales y genes de diferentes receptores específicos de microglía está conservada en los diferentes grupos de

vertebrados, ya que la expresión de los mismos en la microglía del pez cebra es similar a la observada en mamíferos (Oosterhof et al., 2017).

La diferenciación de la microglía no es un proceso idéntico en todo el SNC, sino que se ve influenciada por las condiciones microambientales de cada región. Eso explica las diferencias en morfología y densidad encontradas en la microglía madura (Jinno et al., 2007; Lawson et al., 1990; Vela et al., 1995). Los factores microambientales que intervienen en la señalización de la diferenciación no están claros, pero algunos factores destacados son moléculas del suero, astrocitos y contacto con neuronas. Las moléculas del suero parecen inhibir la ramificación microglial, por lo que las zonas más expuestas a esos componentes presenten células con menor ramificación (Chamak y Mallat, 1991; Fujita et al., 1996; Perry y Gordon, 1991). Los astrocitos favorecen la ramificación de la microglía en co-cultivos (Giulian et al., 1995; Kalla et al., 2003; Rosenstiel et al., 2001) tanto por contacto directo (Tanaka y Maeda, 1996) como por la liberación de factores solubles (Schilling et al., 2001; Walker et al., 2014). El contacto con neuronas a través de moléculas expresadas en su superficie, como CX_3CL1 y CD200, y sus respectivos receptores en la membrana microglial también se ha descrito como un factor que influye en la diferenciación de la microglía (Bachstetter et al., 2011; Biber et al., 2007; Kierdorf y Prinz, 2013; Sheridan y Murphy, 2013).

FUNCIONES DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

Las células microgliales han sido tradicionalmente consideradas como las células defensivas del SNC, pertenecientes al sistema inmune y encargadas de responder ante microorganismos patógenos y señales de daño en el SNC. Sin embargo, además de esta función, ahora sabemos que la microglía desempeña una gran variedad de papeles de gran importancia para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis del SNC (Ginhoux et al., 2013; Nayak et al., 2014). A continuación, se exponen brevemente las diferentes funciones que las células microgliales llevan a cabo en el SNC adulto y en desarrollo.

Funciones en el SNC adulto

Vigilancia y mantenimiento del estado funcional del SNC

Las células microgliales ramificadas están continuamente vigilando el parénquima nervioso en el que se localizan gracias a la alta motilidad de sus prolongaciones (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Mediante la extensión y retracción de sus finos procesos, la microglía es capaz de vigilar el buen funcionamiento del SNC para mantener la homeostasis cerebral (Fetler y Amigorena, 2005; Kettenmann et al., 2013; Nayak et al., 2014; Wake et al., 2011). Esta capacidad de inspeccionar el microambiente es de vital importancia para detectar rápidamente cualquier cambio en el medio extracelular causado por muerte de células, toxicidad o daños en el cerebro, permitiendo que la microglía responda inmediatamente de una forma adecuada. Las células microgliales cuentan en su superficie con un amplio repertorio de receptores (Kettenmann et al., 2011) que les permiten detectar una gran variedad de señales quimiotácticas (Andreasson et al, 2016), tales como moléculas de superficie y ARN/ADN de origen viral, bacteriano o fúngico, citoquinas, quimioquinas, factores neurotróficos, nucleótidos extracelulares como el adenosín-5'-trifosfato (ATP), neurotransmisores, etc. (Madry y Attwell, 2015). Es por ello que la microglía es considerada en la actualidad como el mayor sensor microambiental del SNC, que interviene tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Barres, 2008; Hanisch y Kettenmann, 2007; Kettenmann et al., 2013).

Fagocitosis de patógenos y células muertas

El concepto de fagocitosis se refiere al proceso celular de “engullir” (Sierra et al., 2013), el cual engloba el reconocimiento, la ingestión y la degradación de organismos o partículas por parte de células especializadas, los fagocitos. Las células microgliales son consideradas como fagocitos del SNC, capaces de activarse en respuesta a un daño o patógeno, cambiando su fenotipo para facilitar la eliminación de los agentes desencadenantes de la activación

mediante el proceso de fagocitosis. Junto con la inflamación, la fagocitosis constituye la primera línea de defensa contra patógenos del sistema inmune innato y ayuda también a iniciar la respuesta inmune adaptativa a través de la presentación de antígenos a los linfocitos T (Litman et al., 2005).

La fagocitosis comprende tres fases, conocidas en la literatura como "find-me", "eat-me" y "digest-me". La primera fase ("find-me") consiste en la localización por parte de la microglía de las células diana (microorganismos o células dañadas), las cuales liberan señales "find-me" que son capaces de atraer a las células microgliales (Lauber et al., 2004; Ravichandran, 2010, 2011). Una vez alcanzada la célula diana, tiene lugar la segunda fase de la fagocitosis en la que la microglía reconoce moléculas en la superficie de dicha célula (señales "eat-me"), que inducen el proceso de endocitosis de la misma (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. La tercera y última fase, conocida como "digest-me", es el momento en el que la membrana microglial se invagina y fusiona los bordes de la invaginación, englobando la célula diana y formando el fagosoma, que evoluciona a fagolisosoma para ejecutar la degradación del material englobado (Fig. 12) (Savill et al., 2002).

Aunque lo más común es que la fagocitosis de células diana se lleve a cabo tras la activación de la microglía, recientes estudios han demostrado que éste no parece ser un requisito imprescindible para la fagocitosis. Las células ramificadas del hipocampo adulto son capaces de fagocitar grandes cantidades de neuroblastos apoptóticos en el hipocampo mediante el englobamiento de los mismos en los extremos de las finas prolongaciones de la microglía, sin que ésta llegue a activarse (Sierra et al., 2010). Este descubrimiento también demuestra que la microglía interviene en los procesos de neurogénesis adulta que tienen lugar en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo y en la zona subventricular (Fourgeaud et al., 2016; Sierra et al., 2010).

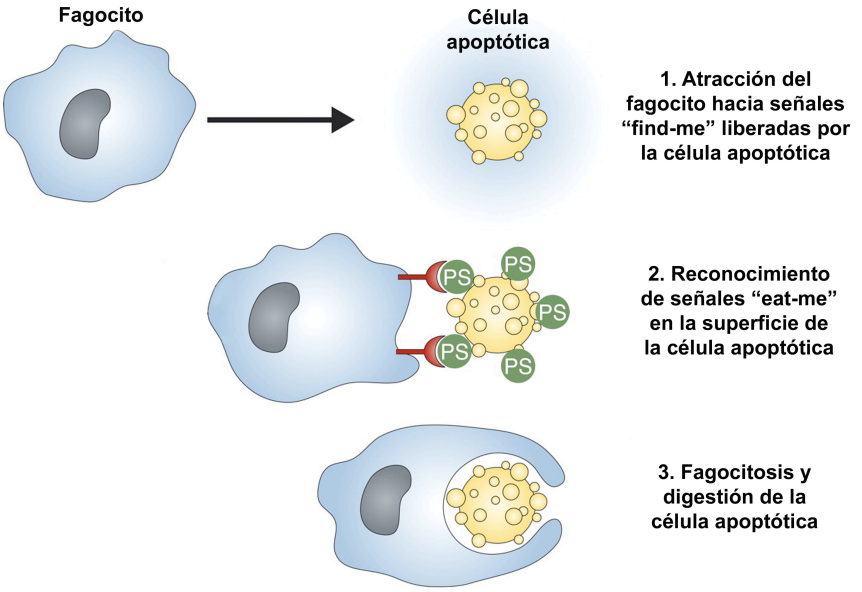

Fig. 12. Etapas de la fagocitosis de células apoptóticas llevada a cabo por fagocitos, como la microglía. La célula apoptótica libera señales "find-me" que atraen a los fagocitos (**1**), los cuales reconocen señales "eat-me" en la superficie de la célula apoptótica (**2**) que inducen su englobamiento y digestión (**3**). Modificada de Ravichandran (2010).

Inducción de la muerte de neuronas viables (fagoptosis)

El término fagoptosis se refiere a la muerte de neuronas viables como consecuencia de la fagocitosis por parte de la microglía (Brown y Neher, 2012, 2014). Este proceso parece ser reversible, como se ha demostrado en estudios *in vitro* en los que se rescata de la muerte a la mayoría de las neuronas tras el bloqueo de la vía fagocítica (Neher et al., 2011). Bajo condiciones de inflamación, la microglía activada libera especies reactivas del oxígeno (ROS) que provocan la exposición de señales "eat-me", como la fosfatidilserina, en la cara externa de la membrana de neuronas estresadas, aunque todavía viables (Jitkaew et al., 2009; Kim et al., 2010; Neher et al., 2011; Neniskyte et al., 2011; Tyurina et al., 2007). La fagoptosis por parte de macrófagos parece contribuir a la renovación de muchos tipos celulares del organismo. Sin embargo, la fagoptosis de neuronas viables provocada por un estado inflamatorio en el SNC puede dar lugar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Brown y Neher, 2012), como la

esclerosis lateral amiotrófica, en la que la microglía parece inducir la muerte de motoneuronas (Frakes et al., 2014).

Regulación de la plasticidad sináptica

La microglía ramificada actúa como un sensor sináptico mediante el establecimiento de contactos transitorios con las sinapsis de su entorno, examinando el estado funcional de la neurotransmisión (Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2009). Estos contactos entre la microglía y las sinapsis neuronales son esenciales para la homeostasis y la remodelación de los circuitos neuronales (ver revisiones de Frost y Schafer, 2016; Morris et al., 2013; Salter y Beggs, 2014; Schafer et al., 2013; Tremblay et al., 2011; Wake et al., 2011, 2013; Wu et al., 2015). A su vez, la transmisión sináptica parece regular la motilidad de las prolongaciones microgliales, incrementándola o disminuyéndola (Fontainhas et al., 2011; Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2009). Cuando la actividad sináptica es muy baja, la microglía puede llegar a fagocitar los componentes neuronales de la misma, contribuyendo a la llamada plasticidad sináptica disparada por actividad (Morris et al., 2013; Salter y Beggs, 2014; Tremblay et al., 2010, 2011, 2014; Wake et al., 2013), así como también puede promover la formación de nuevas sinapsis a través de la liberación de factores neurotróficos como BDNF (Parkhurst et al., 2013). Estos descubrimientos han llevado a proponer la adición del componente microglial al concepto clásico de sinapsis, formado por componentes presináptico, postsináptico y astrocítico (Schafer et al., 2013; Ziebell et al., 2015).

En situaciones de daño neuronal, la microglía activada lleva a cabo el denominado desnudamiento o "stripping" sináptico de neuronas dañadas (ver revisiones de Salter y Beggs, 2014; Wake et al., 2013). Este mecanismo consiste en la eliminación de los contactos sinápticos de la superficie del soma de neuronas dañadas para evitar la hiperactivación de las mismas y contribuir a su supervivencia (Chen et al., 2014; Trapp et al., 2007; Wake et al., 2013).

Funciones en el SNC en desarrollo

La microglía ameboide o inmadura desempeña una gran variedad de funciones esenciales para el correcto desarrollo del SNC, que se resumen seguidamente.

Fagocitosis de células muertas

Uno de los papeles principales de la microglía durante el desarrollo del SNC es la fagocitosis y eliminación de las células que mueren por apoptosis durante los procesos de muerte celular programada. Cuando las neuronas mueren, liberan al medio sustancias citotóxicas que pueden dañar las neuronas cercanas, por lo que la rápida actuación de la microglía en la limpieza y eliminación de las células apoptóticas es esencial para el correcto desarrollo del SNC. La señalización molecular implicada en la fagocitosis microglial de las células apoptóticas es, en la actualidad, objeto de estudio, pero se ha propuesto que las señales "find-me" e "eat-me" son similares a las que participan en la fagocitosis llevada a cabo por los macrófagos de otros órganos y por la microglía activada en condiciones patológicas (revisado en Marín-Teva et al., 2014).

Inducción de la apoptosis neuronal

Al igual que en el SNC adulto, la microglía no solo fagocita células muertas, sino que es capaz de inducir la muerte por apoptosis de neuronas vivas. Durante el desarrollo del SNC, se generan más neuronas de las que conforman el SNC del adulto, de forma que muchas de ellas desaparecen mediante el proceso de muerte celular programada que tiene lugar durante el desarrollo (Kuan et al., 2000; Oppenheim, 1991; Yuan y Yankner, 2000). Numerosos estudios han demostrado que la llegada de la microglía ameboide al SNC coincide cronológicamente con la presencia de neuronas apoptóticas (Ashwell, 1989; Dalmau et al., 1998a; 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 induzca la muerte neuronal, hay algunos estudios que apoyan este papel. En el cerebelo de ratón en desarrollo, un número significativo de células de Purkinje sufren muerte por apoptosis durante la primera semana postnatal. En explantes de cerebelo en desarrollo cultivados *in vitro*, la eliminación de la microglía mediante el uso de liposomas cargados con clodronato incrementa drásticamente la supervivencia de las células de Purkinje, lo que sugiere que la microglía está implicada en la muerte de las mismas (Marín-Teva et al., 2004). Otros estudios también han demostrado la participación de la microglía en la muerte neuronal en distintas regiones del SNC (Frade y Barde, 1998; Rigato et al., 2011; Swinnen et al., 2013; Wakselman et al., 2008).

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 del SNC. En las etapas tempranas del desarrollo se forman más sinapsis de las funcionalmente necesarias, por lo que tiene lugar un proceso de limpieza del exceso de sinapsis llevado a cabo por la microglía, que permite el establecimiento de circuitos neuronales funcionales (Hua y Smith, 2004; Kettenmann et al., 2013; Miyamoto et al., 2013; Mosser et al., 2017; Paolicelli y Ferretti, 2017; Salter y Beggs, 2014; Schafer et al., 2013; Stephan et al., 2012; Tremblay et al., 2011, 2014; Wake et al., 2013; Wu et al., 2015). La interacción de algunas moléculas, como la quimioquina CX_3CL1 y los componentes del complemento C3 y C1q, con sus receptores específicos expresados en la superficie microglial, juegan un papel importante en el control de la poda sináptica por la microglía en el hipocampo (Paolicelli et al., 2011) y en la proyección retino-geniculada (Bialas y Stevens, 2013; Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007) de ratón. La disfunción de la microglía en la poda sináptica podría estar relacionada con el desarrollo de determinadas enfermedades neurales como el autismo (Nardone et al., 2014; Zhan et al., 2014) y el retraso mental causado por la fenilcetonuria (Horling et al., 2014).

Además de su papel en la poda sináptica, la microglía también interviene en la maduración de la transmisión sináptica excitadora (Salter y Beggs, 2014), tal y como demuestran dos estudios en ratones nulos para el receptor microglial CX_3CR1, en los que la ausencia de éste provoca alteraciones en la transmisión sináptica (Zhan et al., 2014) y retraso en la maduración funcional de los receptores de glutamato post-sinápticos (Hoshiko et al., 2012).

Participación en la angiogénesis

La microglía también juega un papel en la formación y remodelación de los vasos sanguíneos durante el desarrollo del SNC (revisiones de Arnold y Betsholtz, 2013; da Fonseca et al., 2014; Harry y Pont-Lezica, 2014). La coincidencia topográfica de la microglía con los vasos sanguíneos se ha venido observando desde hace años, pero inicialmente se pensaba que se debía a que la microglía entraba en el 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 una parte de la invasión microglial del SNC es independiente de la red vascular y que la microglía podría intervenir en los procesos de angiogénesis (Checchin et al., 2006). Un estudio en retina de ratones postnatales carentes de microglía por la deficiencia en CSF-1, demostraron que la ausencia de microglía provoca una disminución de la ramificación de los vasos sanguíneos (Rymo et al., 2011). Por el contrario, la activación de la microglía con lipopolisacárido también induce un desarrollo anormal de la vasculatura de la retina (Tremblay et al., 2013).

MUERTE NEURONAL PROGRAMADA DURANTE EL DESARROLLO

La muerte celular programada es un proceso natural clave en el desarrollo del SNC, durante el cual mueren hasta el 50% de las neuronas inicialmente generadas, que contribuye al correcto establecimiento de las conexiones

neuronales (Kuan et al., 2000; Oppenheim, 1991; Yuan y Yankner, 2000). Esta muerte neuronal está regulada por mecanismos de competencia celular por factores neurotróficos limitantes, como BDNF, que son liberados por las células inervadas por estas neuronas (Barde, 1989; Oppenheim, 1989; Raff et al., 1993; Snider, 1994). La muerte celular programada de neuronas en el SNC da lugar a la formación de cuerpos apoptóticos que son rápidamente fagocitados y digeridos por las células microgliales. El mecanismo molecular por el cual la microglía es atraída hacia las neuronas en proceso de muerte ha sido objeto de numerosas investigaciones que han sugerido un papel importante de ciertas moléculas solubles liberadas por las neuronas apoptóticas, que actúan como señales "find-me" para la atracción de la microglía (ver revisiones de Marín-Teva et al., 2011, 2014). Entre dichas moléculas se han descrito el fosfolípido lipofosfatidilcolina, la quimioquina CX_3CL1 (o fractalquina) y los nucleótidos ATP/ adenosín-5'-difosfato (ADP) y uridín 5'-trifosfato (UTP)/uridín 5'-difosfato (UDP) (Casano y Peri, 2015; Hochreiter-Hufford y Ravichandran, 2013; Medina y Ravichandran, 2016; Sierra et al., 2013). De este modo, la muerte celular programada que tiene lugar en etapas tempranas del desarrollo en determinadas zonas del SNC desprovistas de microglía puede actuar como un estímulo que promueve la colonización de esas regiones por células microgliales. Dos recientes estudios en el SNC en desarrollo del pez cebra han demostrado que la muerte neuronal programada desencadena la colonización del cerebro por la microglía, mediante la señalización por nucleótidos (Casano et al., 2016) o por el fosfolípido lisofosfatidilcolina (Xu et al., 2016).

SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA EN EL SNC

La señalización purinérgica es uno de los mecanismos más importantes de comunicación entre neuronas y glía. Permite integrar la actividad funcional de estas células y juega un papel esencial tanto en el mantenimiento de la homeostasis del SNC sano como en el progreso de enfermedades neurodegenerativas o desmielinizantes (Abbracchio et al., 2009; Burnstock,

2007). En esta señalización participan diferentes tipos de nucleótidos y nucleósidos de purina tales como el ATP, ADP o la adenosina y sus receptores (Fig. 13).

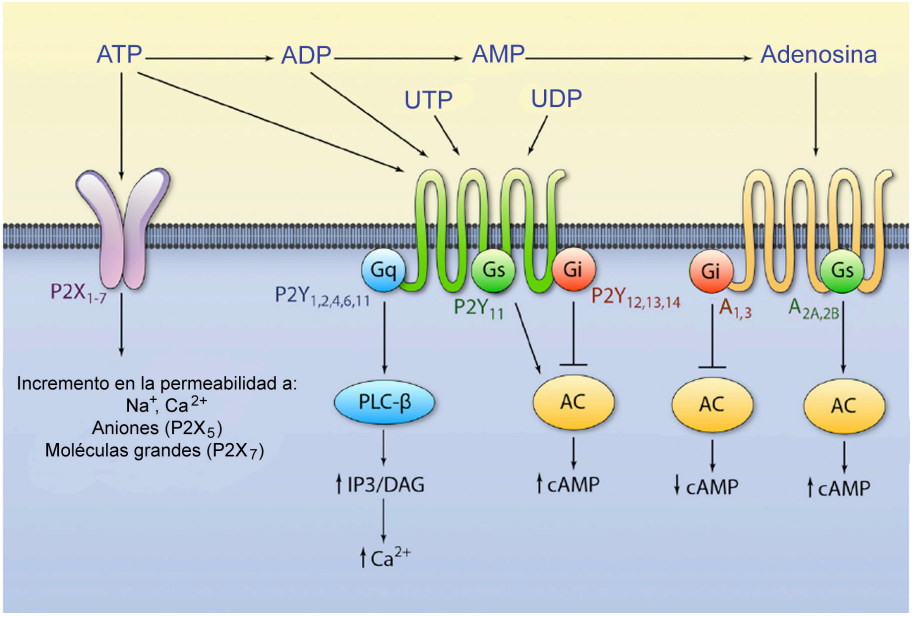

Fig. 13. Vías de señalización de los receptores purinérgicos P1 y P2. Los receptores P2X son canales que tienen como único ligando endógeno al ATP y tras su activación incrementan la permeabilidad a cationes como Na^+ o Ca^{2+}, aunque también ha sido descrito que algunos pueden permitir el paso de aniones o moléculas grandes. Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G. Los receptores P2Y tienen como ligandos endógenos al ATP y al ADP y además responden a nucleótidos y nucleósidos de pirimidina como UTP y UDP. $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, y $P2Y_6$ están acoplados a Gq la cual activa la fosfolipasa C (PLC), desencadenando la movilización de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} mediada por inositol trifosfato (IP3), mientras que $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, y $P2Y_{14}$ están acoplados a Gi, que inhibe la adenilato ciclasa (AC) y por tanto la síntesis de AMP cíclico (cAMP). $P2Y_{11}$ es el único que está acoplado a a Gs y su estimulación provoca un incremento de cAMP. Los receptores P1 son receptores acoplados a proteínas G que se unen a adenosina y que actúan sobre la AC, inhibiéndola (A_1 y A_3, acoplados a Gi) o estimulándola (A_{2A} y A_{2B}, acoplados a Gs), consiguiendo la disminución o el aumento de los niveles de cAMP. Modificado de Yang y Liang (2012).

Los receptors purinérgicos se dividen en dos tipos: receptores P1 (receptores metabotrópicos, que están acoplados a proteína G, son activados por adenosina e incluyen los subtipos A_1, A_{2A}, A_{2B} y A_3) y receptores P2 (activados por otros nucleótidos o nucleósidos) (Abbracchio et al., 2009; Burnstock, 2007) (Fig. 13). Los receptores P2 se subdividen a su vez en siete subtipos de receptores

ionotrópicos o P2X ($P2X_{1-7}$), que están constituidos por canales iónicos regulados por ligando, y doce metabotrópicos acoplados a proteína G o P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_5$, $P2Y_6$, $P2Y_8$, $P2Y_9$, $P2Y_{10-14}$). Los receptores P2X únicamente son activados por ATP, mientras que los P2Y pueden ser activados por ATP, ADP y otros nucleótidos y nucleósidos de pirimidina, como UTP o UDP. Esta diversidad de subtipos de receptores purinérgicos podría reflejar la naturaleza primitiva de este sistema de señalización, presente tanto en invertebrados como en vertebrados (Burnstock, 2007). Muchas células expresan diferentes subtipos de receptores P1 y P2 al mismo tiempo. Además, las vías de señalización de estos receptores pueden compartir los mismos segundos mensajeros. Todo esto hace que la activación de los receptores purinérgicos de una célula pueda provocar diferentes respuestas, en función de la combinación de receptores estimulados mediante un sistema de señalización intracelular estrechamente regulado que aun no es bien conocido.

El ATP es la principal molécula que estimula el sistema de señalización purinérgica. Es la molécula energética por excelencia de los organismos vivos y normalmente se localiza en el interior de las células, aislada del ambiente extracelular por la membrana plasmática. En el SNC, el ATP es considerado como un neuro- y gliotransmisor, que es liberado en pequeñas cantidades por neuronas y células gliales en condiciones fisiológicas. El ATP puede ser liberado por las células mediante una variedad de mecanismos, tales como exocitosis, transportadores y canales de membrana. Además, cuando las células sufren un daño, se produce la rotura de su membrana y el ATP es liberado en grandes cantidades en el medio extracelular. La presencia de elevadas concentraciones de ATP en el medio extracelular actúa como una señal de daño o peligro. En cualquier caso, una vez liberado el ATP al medio extracelular, varias enzimas de la familia de las ectonucleotidasas lo desfosforilan secuencialmente para formar ADP, adenosín-5'-monofosfato (AMP) y adenosina, moléculas que también pueden estimular algunos receptores del sistema de señalización purinérgica (Fig. 13). Estas enzimas regulan la vida media de estos nucleótidos y nucleósidos y, por

lo tanto, modulan las funciones de los receptores P1 y P2 (Abbracchio et al., 2009).

La familia de las ectonucleotidasas está compuesta por enzimas que metabolizan nucleótidos en el espacio extracelular. Incluye las ecto-nucleósido-trifosfato-difosfohidrolasas (E-NTPDasas), las ectonucleótido-pirofosfatasas y/o fosfodiesterasas (E-NPPs) y la ecto-5'-nucleotidasa (5'-NT, también conocida como CD73), todas ellas expresadas en el SNC. Los diferentes subtipos de ectonucleotidasas difieren en la especificidad del sustrato sobre el que actúan y en el producto que forman. Las E-NTPDasas y E-NPPs hidrolizan el ATP y ADP para formar AMP, el cual es usado por la 5'-NT para transformarlo en adenosina (Burnstock, 2007).

Microglía y señalización purinérgica

Cualquier mínimo cambio en el paréquima nervioso provoca una rápida transformación en el fenotipo de las células microgliales. Los receptores purinérgicos juegan un papel fundamental en esta sensibilidad especial de las células microgliales, las cuales expresan una variedad de receptores purinégicos, incluyendo varios P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{12}$ y $P2Y_{14}$), algunos P2X ($P2X_4$ y $P2X_7$) y todas las subclases de receptores de adenosina (Abbracchio et al., 2009; Boucsein et al., 2003; Kettenmann et al., 2011; Koizumi et al., 2013).

Los receptores purinérgicos controlan diferentes funciones microgliales como activación, proliferación, motilidad de los procesos celulares, migración, fagocitosis o liberación de citoquinas pro- y anti-inflamatorias (Abbracchio et al., 2009; Davalos et al., 2005; Kettenmann et al., 2011; Koizumi et al., 2013). La estimulación de los receptores purinérgicos puede producir una gran variedad de efectos en función de los receptores estimulados. Así por ejemplo, cuando el ATP/ADP liberado por células dañadas es detectado por la microglía mediante receptores $P2Y_{12}$, ésta adquiere un fenotipo móvil que extiende sus procesos celulares y migra hacia los sitios dañados (Haynes et al., 2006). La sobreexpresión de los receptores de adenosina A_{2A} estimula la retración de los procesos celulares

de las células microgliales, que adquieren un fenotipo ameboide (Orr et al., 2009). Sin embargo, la unión de los receptores $P2Y_6$ con UDP liberado por las células dañadas estimula la fagocitosis de las mismas por la microglía (Koizumi et al., 2007). Por otra parte, la respuesta de los diferentes receptores purinérgicos puede ser modulada por otros receptores P1 o P2 que se pueden expresar simultáneamente. Así, cada fenotipo microglial vendría determinado por la presencia de una combinación específica de receptores purinérgicos y por el grado de expresión de cada uno de ellos (Koizumi et al., 2013). Además, las células microgliales pueden liberar ATP mediante exocitosis y presentan en su superficie la E-NTPDasa1 (CD39) y la 5'-NT (CD73), de manera que dichas células son capaces de modular la estimulación de su propio sistema purinérgico (Färber et al., 2008; Imura et al., 2013; Matyash et al., 2017).

LOS CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA MICROGLÍA

La utilización de técnicas de cultivo *in vitro* ha facilitado el estudio del comportamiento y las funciones de la microglía en el SNC en condiciones fisiológicas y patológicas, habiéndose utilizado dos tipos de técnicas: cultivos de células disociadas (o cultivos celulares) y cultivos de partes intactas de SNC, también llamados cultivos organotípicos. En los primeros, el tejido es disgregado y las neuronas o células gliales individualizadas se aislan y se hacen crecer sobre una superficie a la que se adhieren. Sin embargo, las células microgliales son células extremadamente sensibles que responden de forma inmediata e intensa a los cambios del microambiente, por lo que en los cultivos celulares la microglía se redondea rápidamente y adquiere características de microglía activada, dificultando o impidiendo el estudio de numerosos procesos fisiológicos de este tipo celular (Hurley et al., 1999; Lee et al., 2002; Slepko y Levi, 1996). En cambio, en los cultivos organotípicos se aislan rebanadas de tejido de 200-400 μm de espesor, en las que la citoarquitectura del tejido originario es preservada relativamente bien, de manera que se mantiene un alto grado de organización

celular, semejante al existente *in vivo* (Gähwiler et al., 1997; Lossi et al., 2009). La introducción de un método sencillo para cultivar rebanadas de hipocampo sobre una membrana semiporosa en una interfase líquido-aire (Stoppini et al., 1991) convirtió el uso de los cultivos organotípicos de distintas regiones del SNC adulto y en desarrollo en una técnica habitual para el estudio de diversos aspectos de la biología de las células microgliales, tales como su activación en situaciones patológicas (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 diferenciación (Hailer et al., 1996, 1997) o su comportamiento migratorio (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).

Los cultivos organotípicos de retina embrionaria constituyen un modelo muy útil para estudiar las células microgliales inmaduras y facilita el tratamiento experimental con diversas moléculas. La retina tiene un espesor que permite cultivarla sin necesidad de seccionar el tejido o de hacer rebanadas del mismo, como resulta necesario en los cultivos de otras regiones del SNC. Así, las superficies superior e inferior de los explantes cultivados siguen siendo las superficies escleral y vitreal de la retina, igual que sucede en la retina *in situ.* En nuestro laboratorio se ha puesto a punto 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 tras el cultivo. Además, las células microgliales mantienen su comportamiento migratorio en la superficie vítrea de la retina, mostrando una morfología ameboide alargada y polarizada en la dirección de la migración, tal como sucede en la retina *in situ*. Esto ha hecho posible que nuestro modelo de cultivo *in vitro* de ERECs sea una herramienta excelente para el estudio de la entrada de la microglía ameboide en la retina y de las moléculas implicadas en este proceso.

Hipótesis y Objetivos

En los últimos años, la utilización de técnicas de mapeo de destino genético en ratones ha revelado que la microglía se origina a partir de macrófagos derivados del saco vitelino que colonizan el cerebro en desarrollo en estadios muy tempranos de la embriogénesis y permanecen en el cerebro adulto (Ginhoux et al., 2010; Gomez-Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2015; Schulz et al., 2012), donde se autoperpetúan mediante proliferación local (Ajami et al., 2007; Askew et al., 2017a, 2017b). En el pez cebra, al igual que en el ratón, la microglía embrionaria tiene un origen extraembrionario; sin embargo, la microglía del cerebro adulto parece proceder de una fuente intraembrionaria, la pared ventral de la aorta dorsal (Xu et al., 2015). Los experimentos llevados a cabo por Garceau et al. (2015) en los que células sanguíneas derivadas del saco vitelino marcadas genéticamente eran inyectadas en el torrente sanguíneo de embriones de pollo, demuestran también el origen dual de la microglía. Los resultados de estos experimentos demuestran el origen de la microglía a partir del saco vitelino en los embriones de aves, pero apoyan que ésta es reemplazada por microglía procedente de una fuente intraembrionaria durante el desarrollo post-eclosión. Independientemente del reemplazo o no de la microglía durante la edad adulta, no parece haber duda de que los progenitores microgliales derivados del saco vitelino entran en el SNC en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario de los vertebrados y se propagan por todo el SNC dando lugar a la microglía. Una vez dentro del SNC, los progenitores microgliales constituyen la microglía ameboide (Ling y Wong, 1993), que se mueve mediante migración tangencial y radial hasta alcanzar sus localizaciones finales dentro del parénquima nervioso, donde se diferencia en microglía ramificada (revisado en Cuadros y Navascués, 1998).

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado el programa de colonización de la retina embrionaria de codorniz por las células microgliales (Marín-Teva et al., 1998, 1999c; Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004). Así, los precursores microgliales entran en la retina desde la región de la CNO/BP a partir de E7 y colonizan toda la extensión de la retina, en su parte más vítrea, mediante migración tangencial en dirección centro-periférica.

Seguidamente, la microglía ameboide se adentra en el espesor de la retina mediante migración radial en dirección vítreo-escleral, alcanzando las capas plexiformes donde se diferencia en microglía ramificada. Por otra parte, los macrófagos primitivos colonizan el SNC en etapas tempranas del desarrollo del embrión de pollo (Cuadros et al., 1993), pero no se conoce si estos macrófagos de procedencia vitelina son realmente progenitores de las células microgliales que entran en la retina de las aves en etapas más avanzadas del desarrollo embrionario. El primer objetivo de esta Tesis ha sido comprobar la hipótesis de que la microglía ameboide que coloniza la retina embrionaria de codorniz a partir de E7, procede de macrófagos primitivos procedentes del saco vitelino. Además, estudios anteriores demostraban que los precursores microgliales entran en la retina embrionaria de codorniz desde la CNO/BP (Navascués et al., 1995), pero no conseguían determinar las vías concretas a través de las que dichos precursores alcanzan la retina. Nuestro primer objetivo también ha incluido la investigación de estas vías de acceso a la retina.

Muchos estudios han puesto de manifiesto la coincidencia espacial y temporal entre la entrada de la microglía y la muerte celular programada durante el desarrollo normal del SNC de vertebrados (Ashwell, 1991; Calderó et al., 2009; Francisco-Morcillo et al., 2014; Marín-Teva et al., 1999c, 2014; Perry et al., 1985; Rigato et al., 2011; Swinnen et al., 2013). La microglía que entra en el SNC está involucrada en la fagocitosis y limpieza de restos de células muertas, tal como se ha demostrado en diferentes regiones cerebrales (revisado en Marín-Teva et al., 2014; Sierra et al., 2013). El SNC en desarrollo debe poseer mecanismos que guíen a la microglía hacia las dianas apoptóticas para conseguir una eliminación efectiva de los desechos celulares. Este mecanismo podría incluir señales "find-me" liberadas por células apoptóticas en las últimas etapas de muerte, que guiarían a distancia la migración de la microglía. Las principales moléculas liberadas por células apoptóticas que actúan como señales “find-me” que atraen macrófagos son la quimioquina CX3CL1 (fractalquina), el lípido lisofosfatidilcolina y los nucleótidos ATP/ADP y UTP/UDP (revisado en

Hochreiter-Hufford y Ravichandran, 2013; Medina y Ravichandran, 2016). Se ha sugerido que estas mismas moléculas también podrían guiar a la microglía hacia neuronas apoptóticas (Casano y Peri, 2015; Marín-Teva et al., 2014; Sierra et al., 2013). En este sentido, la muerte celular programada que tiene lugar en estadios tempranos de desarrollo en regiones del SNC desprovistas de microglía podría ser responsable de la liberación de señales que favorecen la entrada de precursores microgliales al interior del SNC, iniciando así el proceso de colonización microglial. La muerte celular programada también podría favorecer la colonización microglial del SNC mediante inducción de la proliferación microglial, como se ha comprobado en el cerebro anterior de embriones de ratón (Arnó et al., 2014).

Se ha demostrado en nuestro laboratorio que la entrada y migración de precursores microgliales en la retina que sucede durante la embriogénesis *in situ* también tiene lugar cuando los ERECs se cultivan *in vitro* (Carrasco et al., 2011; Sierra et al., 2014). Por tanto, los cultivos organotípicos de explantes de retina son un excelente modelo experimental para investigar posibles factores moleculares involucrados en la entrada de precursores microgliales en la retina. Así, el segundo objetivo de esta Tesis ha sido contrastar la hipótesis de que la muerte celular programada que tiene lugar en la retina de codorniz en estadios tempranos del desarrollo embrionario está estrechamente relacionada con el comienzo de la entrada de células microgliales.

Los nucleótidos ATP/ADP y UTP/UDP son señales "find-me" que pueden estimular tanto la quimiotaxis como la quimiocinesis de las células microgliales, atrayéndolas hacia los sitios de daño neuronal en el cerebro adulto (Bernier et al., 2013; Davalos et al., 2005; Haynes et al., 2006; Honda et al., 2001; Koizumi et al., 2007; Kurpius et al., 2007; Maeda et al., 2016; Miller et al., 2009). La microglía puede detectar el ATP/ADP y el UTP/UDP liberados por células dañadas a través de los receptores purinérgicos P2X y P2Y, extendiendo prolongaciones celulares y migrando hacia los sitios de daño (Kettenmann et al., 2011; Koizumi et al., 2013; Madry y Attwell, 2015; Ohsawa y Kohsaka, 2011).

Sin embargo, hasta hace poco tiempo no estaba claro si este mecanismo de reclutamiento microglial también funcionaba durante el desarrollo normal del SNC. Dos estudios recientes sobre el desarrollo del pez cebra han revelado que la colonización microglial del cerebro está desencadenada por procesos de apoptosis neuronal que tienen lugar durante el desarrollo (Casano et al., 2016; Xu et al., 2016). Ambos estudios difieren en el factor molecular involucrado en el reclutamiento microglial, demostrando que la señalización mediada por nucleótidos (Casano et al., 2016) y por lisofosfatidilcolina (Xu et al., 2016) juegan un importante papel en la atracción de progenitores microgliales hacia el cerebro en desarrollo del pez cebra. Sin embargo, no se dispone de datos sobre los factores moleculares que desencadenan la entrada de progenitores microgliales en el SNC durante el desarrollo embrionario de aves. Por lo tanto, el tercer objetivo de la Tesis ha sido comprobar la hipótesis de que la señalización purinérgica mediada por nucleótidos participa en la entrada de células microgliales en la retina embrionaria de codorniz.

En resumen, el objetivo general perseguido en esta Tesis ha sido comprobar la hipótesis de que las células microgliales que colonizan la retina embrionaria de codorniz a partir de E7 proceden de precursores originados en el saco vitelino y que su entrada en la retina está mediada por la señalización purinérgica relacionada con la muerte celular programada que tiene lugar en esos estadios del desarrollo de la retina. Este objetivo general se ha desglosado en los siguientes tres objetivos concretos:

Primero. Estudio del origen de los precursores microgliales y de las rutas a través de las que colonizan la retina embrionaria de codorniz, mediante el análisis de quimeras de EP-SVC y embriones de codorniz inmunoteñidos con QH1.

Segundo. Análisis de la relación entre la muerte celular programada y la entrada de células microgliales en la retina, mediante estudio de la expresión de caspasa-3 activa en retinas *in situ* y en ERECs cultivados *in vitro* en condiciones control y tras el tratamiento con un inhibidor de caspasas.

Tercero. Estudio de la participación de la señalización purinérgica en la entrada de células microgliales durante el desarrollo de la retina, mediante análisis de los efectos producidos por la inhibición de receptores purinérgicos y la adición exógena de nucleótidos en ERECs cultivados *in vitro*.

Los dos últimos objetivos han dado lugar a una publicación (Martín-Estebané et al., 2017), mientras que el primer objetivo se incluye en otra publicación cuyo manuscrito está actualmente en preparación.

Materiales y Métodos

Animales

En el presente estudio se han empleado retinas *in situ* de embriones de codorniz de edades comprendidas entre E3 y E7 para estudiar los precursores microgliales y la relación entre la primera entrada de éstos en la retina y la muerte celular programada que tiene lugar durante estos estadios del desarrollo de la retina. También se han utilizado cultivos organotípicos de ERECs de edades comprendidas entre E3 y E7 para investigar la procedencia de las células microgliales y para estudiar los mecanismos moleculares que controlan la primera entrada de células microgliales en la retina. Concretamente, para abordar este segundo objetivo se utilizaron ERECs de E6,5. Se eligió esta edad del desarrollo teniendo en cuenta el patrón de colonización de la retina por las células microgliales, las cuales entran desde la región de la CNO/BP entre E7 y E16 (Marín Teva et al., 1999c; Navascués et al., 1995). Por ello, los distintos tratamientos experimentales para demostrar el efecto de diferentes moléculas sobre la entrada de la microglía se llevaron a cabo en ERECs de E6,5 cultivados *in vitro* durante 24 horas (E6,5+24hiv), ya que el tratamiento se iniciaba antes de que las primeras células microgliales hubiesen entrado en la retina y concluía 24 horas después, cuando ya se había iniciado la entrada de dichas células.

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

El aislamiento de las retinas se llevó a cabo mediante la disección de los ojos en solución salina tamponada de Gey (Sigma), suplementada con 5 mg/ml de glucosa (Sigma) y 50 UI-µg/ml de penicilina-estreptomicina (Gibco) y enfriada en hielo. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ERECs obtenidos a partir de retinas aisladas de E3, E4, E5, E6, E6,5 y E7, 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 la retina que incluía la porción dorsal y media de la CNO/BP, lugar por el cual las células microgliales comienzan a entrar en la retina (Fig. 14).

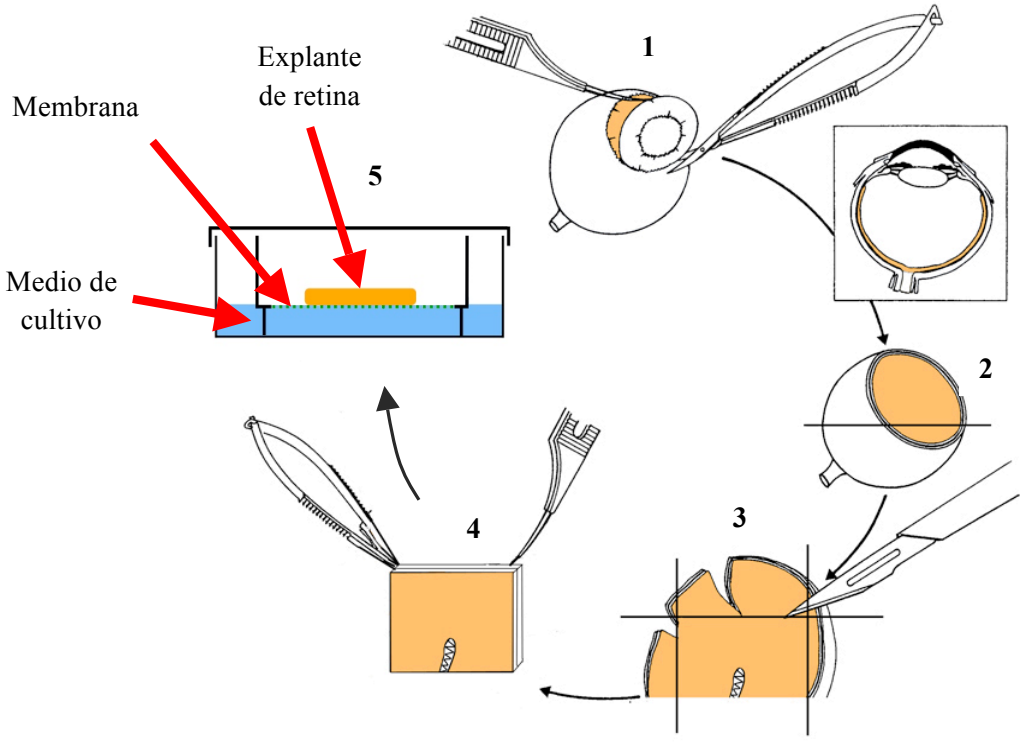

Fig. 14. Método de aislamiento y cultivo *in vitro* de un EREC siguiendo el método de Stoppini et al., (1991) con algunas modificaciones. El ojo, aislado en solución salina de Gey enfriada con hielo, se diseccionaba, eliminando la córnea, el cuerpo ciliar, el cristalino, la esclera y el cuerpo vítreo (1, 2). 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 se cultivaban siguiendo el método descrito por 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 colocado con la parte vítrea hacia abajo sobre la membrana porosa (0,4 µm de tamaño de poro) de un dispositivo Millicell de 30 mm (Millipore). Cada dispositivo Millicell se disponía a su vez en un pocillo de una placa de 6 pocillos, con 1 ml de medio de cultivo.

De este modo, cada explante estaba en contacto íntimo con el medio de cultivo en su parte vítrea y con el aire por su parte escleral. El medio de cultivo estaba compuesto por 50% de medio basal de Eagle con sales de Earle (BME), 25% de solución salina de Hanks (Gibco), 25% de suero de caballo (Gibco), L-glutamina 1 mM, 10 UI-µg/ml de penicilina-estreptomicina (Gibco) y 5 mg/ml de glucosa. Los explantes de retinas de E3, E4, E5, E6 y E7 se incubaban en estufa de cultivo a 37ºC, con atmósfera saturada de humedad y 5% de CO_2 durante los días correspondientes hasta alcanzar la edad de E10 (7, 6, 5, 4 y 3 días *in vitro* [div], respectivamente). Por otra parte, los explantes de retina de E6,5 se incubaban en las mismas condiciones que los anteriores durante 24 horas *in vitro* (hiv).

Tratamiento de ERECs de E6,5 con inhibidores farmacológicos y otras moléculas

Para poner de manifiesto la relación entre la entrada de células microgliales en la retina y la muerte celular, así como la participación de nucleótidos, tales como ATP y UDP, en el proceso de entrada de las células microgliales en la retina, se llevaron a cabo una serie de ensayos experimentales en ERECs de E6,5. En estas experiencias se utilizó un inhibidor farmacológico de proteínas de la familia de las caspasas (implicadas en la muerte celular), una enzima que degrada nucleótidos, un inhibidor de receptores purinérgicos (receptores específicos de ATP y UDP) y los propios nucleótidos ATP y UDP. Las diferentes moléculas ensayadas se añadían al medio de cultivo de ERECs de E6,5 al inicio de cada experimento y se dejaban actuar durante 24 hiv. Para obtener los resultados de cada tratamiento se utilizaron entre 10 y 15 embriones de E6,5. En cada experimento, el EREC procedente del ojo derecho del embrión se utilizaba como experimental o tratado, mientras que el EREC procedente del ojo izquierdo del mismo embrión se empleaba como control. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, los ERECs se fijaban para analizar los efectos inducidos por las sustancias ensayadas sobre la entrada de células microgliales en la retina.

El estudio de la posible relación entre la entrada de las células microgliales en la retina a partir de E7 y la muerte celular programada que tiene lugar en ese momento del desarrollo, se llevó a cabo mediante el tratamiento de los ERECs con el inhibidor de amplio espectro de caspasas Q-VD-OPh (R&D Systems, OPH001) a una concentración de 100 μM.

Para determinar la posible implicación del ATP en la entrada de las células microgliales en la retina, los ERECs fueron tratados con apirasa (Sigma, A6132), una enzima con actividad di- y trifosfatasa que degrada el ATP y ADP, produciendo adenosina. La apirasa se añadía al medio de cultivo a una concentración de 10 U/ml, tras haber sido purificada mediante centrifugación en Amicon (Millipore) para eliminar el piruvato sódico que podía modificar el pH del medio de cultivo.

Con el objetivo de comprobar el posible papel de los receptores purinérgicos en la entrada de las células microgliales en la retina, los ERECs se trataron con suramina (Sigma, S2671), un inhibidor de amplio espectro de los receptores purinérgicos P2Y y P2X, a una concentración de 100 μM.

Por último, se estudió el efecto del incremento de la concentración de los nucleótidos ATP y UDP (mediante adición exógena de los mismos a ERECs) sobre la entrada de células microgliales en la retina. Los nucleótidos añadidos al medio de cultivo al inicio de cada experiencia fueron ATP (Sigma, A6419) a varias concentraciones (10 μM, 100 μM y 1mM), ATPγS (Sigma, A1388), que es un análogo no hidrolizable del ATP, a una concentración de 100 μM, y UDP (Sigma, 94330), a concentraciones de 100 μM y 1mM.

Anticuerpos

Las células microgliales de la retina de codorniz se identificaron mediante marcaje inmunocitoquímico con el anticuerpo monoclonal QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB], University of Iowa), que reconoce todas las células de la línea hemangioblástica de codorniz, excepto los eritrocitos maduros (Pardanaud et al., 1987), incluidas todas las fases del desarrollo de las células

microgliales (Cuadros et al., 1992b). También se identificaron las células microgliales mediante marcaje de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) con el anticuerpo policlonal anti-iNOS (Abcam), que reconoce la iNOS expresada por las células microgliales ameboides de la retina embrionaria de codorniz (Sierra et al., 2014).

Para identificar las células en proceso de apoptosis se utilizó el anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 activa (R&D System). Las células en proceso de proliferación eran identificadas con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Sigma), que reconoce el nucleótido sintético BrdU incorporado al ADN en la fase S de células proliferativas.

El anticuerpo monoclonal H5 (DSHB) se usó para identificar las células de Müller en la retina y otros tipos de glía, como la glía peripapilar o los astrocitos en la cabeza del nervio óptico, ya que reconoce la vimentina, muy abundante en el citoesqueleto de dichas células (Fischer et al., 2010). Por último, 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, tales como las células ganglionares (Fischer et al., 2002).

Inmunocitoquímica

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

Los montajes totales de retinas completas de edades comprendidas entre E3 y E7 se obtenían mediante aislamiento de éstas y posterior fijación en paraformaldehído-lisina-peryodato (PLP, Yamato et al., 1984) durante 1 hora, a 4º C. Los montajes totales de ERECs de edades entre E3 y E7 cultivados *in vitro* se despegaban de la membrana Millicell al final del cultivo, siendo fijados del mismo modo 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 se obtenían a partir de ERECs de E6,5+24hiv sometidos a diferentes tratamientos experimentales y de sus respectivos controles no tratados, así como de retinas completas no cultivadas de edades entre E3 y E7, siguiendo el siguiente procedimiento. Los explantes o las retinas completas se fijaban en PLP durante 1 hora, a 4ºC, se lavaban varias veces en PBS 0,01M con Tritón X-100 0,1% (PBS-0,1%T) y se incubaban a 4º C, durante toda la noche, en sacarosa al 20% en PBS-0,1%T. A continuación, las muestras se sumergían en una solución de gelatina al 7,5% y sacarosa al 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 -40º C hasta la obtención de criosecciones en un criostato Leica CM1850 (Leica). Las criosecciones, de 20 μm de espesor y perpendiculares a la línea del pecten, se obtenían seriadamente y se montaban alternativamente sobre diferentes portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Fisher 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 no cultivadas eran sometidos a dobles inmunomarcajes con QH1 (para identificar las células microgliales) y uno de los anticuerpos anti-iNOS o anti-caspasa 3. En algunos casos se realizaban inmunomarcajes simples con QH1.

Para el doble marcaje anti-iNOS/QH1, los montajes totales se fijaban en PLP durante 1 hora, a 4ºC, y se lavaban 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 4º C, con agitación. Después de un lavado en PBS-0,1%T, se incubaban durante toda la noche, a 4º C, en una mezcla de los anticuerpos primarios anti-iNOS y QH1. Ambos anticuerpos se diluían (1:500 y 1:4, respectivamente) 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 durante 4 horas a temperatura ambiente en los

anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (AF-594) (para revelar el anticuerpo policlonal anti-iNOS) y anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (AF-488) (para revelar el anticuerpo monoclonal QH1) (Thermo Fisher Scientific), ambos diluidos 1:500 en PBS-1%BSA-0,25%T. Finalmente, las muestras se lavaban en PBS-0,1%T y se incubaban durante 5 minutos en Hoechst 33342 (Sigma) diluido en PBS 0,01M (10 μg/ml), con objeto de poner de manifiesto 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 los montajes totales de retina con PLP durante 1 hora, a 4ºC, se llevaba a cabo un protocolo similar al descrito anteriormente, modificando las diluciones de los anticuerpos primarios (1:100 para el anticuerpo anti-caspasa 3 y 1:4 para QH1).

Los ERECs cultivados *in vitro* eran sometidos a un inmunomarcaje simple con el anticuerpo QH1, siguiendo el mismo protocolo descrito para los montajes totales de retinas no cultivadas. Los núcleos celulares también se teñían con Hoechst.

Inmunocitoquímica en criosecciones

En algunas criosecciones de retinas no cultivadas se realizaron dobles inmunomarcajes con QH1 y uno de los anticuerpos anti-iNOS o anti-caspasa 3, seguidos de una tinción con Hoechst. Tras su hidratación con PBS 0,01M, se llevaba a cabo un procedimiento similar al descrito para los mismos inmunomarcajes en montajes totales con pequeñas modificaciones, consistentes en que las criosecciones no se permeabilizaban y el tiempo de incubación en el anticuerpo secundario se reducía a 2,5 horas. Además, la tinción de los núcleos celulares con Hoechst se reducía a 3 minutos.

En otras criosecciones de retinas no cultivadas se llevó a cabo un doble inmunomarcaje con anti-iNOS y el anticuerpo H5 (anti-vimentina), seguido de una tinción con Hoechst. El protocolo seguido era el mismo descrito para el

inmunomarcaje de iNOS en montajes totales con algunas modificaciones. La incubación, en este caso, se hacía con los anticuerpos primarios anti-iNOS y H5 diluidos 1:500 y 1:40, respectivamente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de conejo conjugado con AF-488 para revelar el anticuerpo anti-iNOS y anti-IgG de ratón conjugado con AF-594 para revelar el anticuerpo H5. Los núcleos celulares se pusieron de manifiesto mediante la tinción con Hoechst.

En el caso de los ERECs de E6,5+24hiv, se quiso comprobar si los distintos tratamientos experimentales provocaban cambios en la citoarquitectura de la retina y en la expresión de caspasa-3. Con este objetivo, las criosecciones de ERECs tratados experimentalmente y de sus respectivos controles eran inmunoteñidas con uno de los anticuerpos H5 (anti-vimentina), 39.4D5 (anti-Islet-1), o anti-caspasa 3. En estos inmunomarcajes simples, las criosecciones se incubaban durante una noche en el correspondiente anticuerpo primario (dilución 1:40 para H5 y 1:100 para 39.4D5 y anti-caspasa 3) y durante 2,5 horas en el anticuerpo secundario a una dilución de 1:500. Los anticuerpos secundarios utilizados eran anti-IgG de ratón conjugado con AF-488, para revelar los anticuerpos H5 y 39.4D5, y anti-IgG de conejo conjugado con AF-594, para revelar el anticuerpo anti-caspasa 3. Finalmente, los núcleos celulares se teñían con Hoechst durante 3 minutos.

Detección de la proliferación microglial mediante marcaje con bromodeoxiuridina

Para comprobar si el tratamiento experimental de los ERECs de E6,5+24hiv con ATP o UDP provocaba cambios en la actividad proliferativa de las células microgliales que entraban en la retina, se marcaron las células microgliales con 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). La BrdU es un nucleótido sintético, análogo de la timidina, que se incorpora al ADN durante la replicación y posteriormente puede ser detectado mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-BrdU. De este modo, el marcaje con BrdU permite reconocer células proliferativas que se encuentran en la fase S del ciclo celular.

Para identificar las células microgliales que tenían actividad proliferativa en ERECs de E6,5+24hiv tratados con ATP o UDP y en sus respectivos controles no tratados, se añadía BrdU (Sigma) al medio de cultivo, con una concentración de 10 μM, a las 12 horas de cultivo *in vitro* (E6,5+12hiv). Se escogió ese tiempo de cultivo, correspondiente al estadio E7, para añadir la BrdU porque a partir de ese momento es cuando las células microgliales comienzan a entrar en la retina y, de este modo, se puede marcar la microglía con actividad proliferativa que ya ha entrado en la retina. Tras finalizar el tiempo de cultivo, los ERECs de E6,5+24hiv eran fijados en PLP durante 1 hora y lavados varias veces en PBS. Seguidamente, se procedía a desnaturalizar el ADN con ácido clorhídrico 2N durante 1 hora, a 37ºC, para facilitar el acceso del anticuerpo. A continuación, se neutralizaba el efecto del ácido clorhídrico con un lavado en borato sódico 0,1M (pH 8,5) durante 25 minutos, a temperatura ambiente, seguido de un bloqueo de los sitios inespecíficos con suero normal de cabra (NGS) al 5% en PBS-0,1%T durante 15 minutos. Seguidamente, los ERECs se incubaban durante toda la noche, a 4ºC, con los anticuerpos primarios anti-BrdU y anti-iNOS (para identificar las células microgliales), a una concentración 1:800 y 1:500, respectivamente. Tras unos lavados en PBS-0,1%T, los explantes se incubaban durante 2 horas con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado con AF-594, para revelar el anticuerpo anti-BrdU, y anti-IgG de conejo conjugado con AF-488, para revelar el anticuerpo anti-iNOS. Finalmente, los ERECs se lavaban en PBS y se montaban con Fluoromount G con la parte vítrea hacia arriba.

Reconocimiento inmunocitoquímico de células microgliales en quimeras de EP-SVC

Para comprobar la procedencia de las células microgliales que colonizan la retina, se realizaron estudios en secciones de parafina de cabezas de quimeras de EP-SVC, en las que la microglía se marcaba inmunocitoquímicamente con el anticuerpo específico de codorniz QH1. Las secciones histológicas utilizadas en este estudio corresponden a los archivos de muestras histológicas de nuestro

grupo de investigación, obtenidas en anteriores estudios de nuestro laboratorio (Cuadros et al., 1992a, 1993; Martín-Partido et al., 1991) mediante el método descrito por Cuadros et al. (1992a). Según este método, cada quimera se obtenía tras abrir una ventana en la cáscara de un huevo de codorniz de 27-34 horas de incubación, a través de la cual se reemplazaba el área central del blastodermo del embrión de codorniz de 7-13 somitas por la región equivalente del blastodermo de un embrión de pollo con el mismo grado de desarrollo (7-13 somitas, 29-45 horas de incubación). Una vez colocada la zona prospectiva del cuerpo del embrión de pollo sobre el saco vitelino del embrión de codorniz, se superponían los bordes de ambos blastodermos para facilitar su fusión y se volvía a incubar el huevo de codorniz hasta alcanzar el tiempo de incubación deseado (Fig. 15). Seguidamente, las cabezas de los embriones quiméricos eran fijadas en Bouin, incluidas en parafina y se obtenían secciones de 5 µm de espesor, que se adherían en portaobjetos.

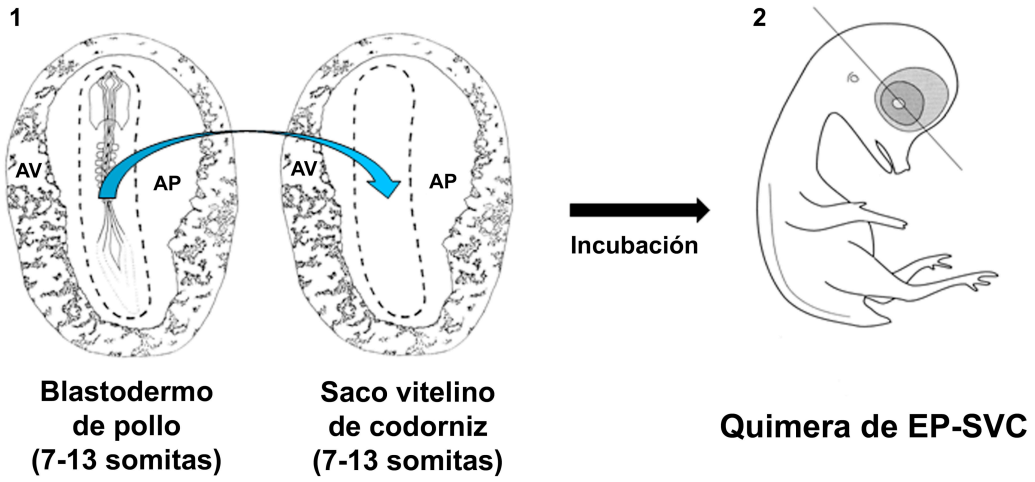

Fig. 15. Representación esquemática del método de preparación de quimeras de embrión de pollo-saco vitelino de codorniz (EP-SVC) seguido por Cuadros et al. (1992a). El blastodermo del embrión de pollo (delimitado por líneas discontinuas) se extraía del huevo y se colocaba sobre el saco vitelino del huevo de codorniz, reemplazando al blastodermo del embrión de codorniz, previamente extraido (1). Una vez colocado, se procedía a incubar el huevo de codorniz, que contenía la quimera, hasta alcanzar la edad embrionaria deseada. Finalmente, las cabezas de las quimeras de EP-SVC se fijaban e incluían en parafina, antes de ser seccionadas (2). AV: área vasculosa; AP: área pelúcida.

Las secciones de parafina de algunas quimeras de EP-SVC de edades comprendidas entre E5 y E8, obtenidas en antiguos estudios, se conservaron durante años, siendo rescatadas en el presente estudio para identificar en ellas las células microgliales, originadas en el saco vitelino de codorniz, que habían colonizado las estructuras oculares del embrión de pollo. Con este objetivo, dichas secciones se trataron inmunocitoquímicamente con QH1. Las secciones se desparafinaban e hidrataban, siendo tratadas posteriormente con peróxido de hidrógeno al 1% en PBS durante 30 minutos, con el fin de eliminar la actividad peroxidasa endógena. A continuación, se lavaban en PBS y se bloqueaban los sitios inespecíficos con NGS al 30% en PBS-1%BSA durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las secciones se incubaban con el anticuerpo primario QH1 diluido 1:4 en PBS-1%BSA, durante toda la noche, a 4ºC. Después de unos lavados en PBS, las secciones se incubaban con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con biotina (Sigma) y, seguidamente, con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Sigma). Ambos se utilizaban a una concentración 1:200 durante 1 hora, a temperatura ambiente. La presencia de la peroxidasa se revelaba mediante la incubación de las secciones con su sustrato (peróxido de hidrógeno al 3%), en presencia del cromógeno diaminobencidina (Sigma). Tras lavar las secciones, se llevaba a cabo una tinción de fondo con hematoxilina para poner de manifiesto las estructuras tisulares. Finalmente, las secciones se deshidrataban y se montaban con Depex.

Análisis cuantitativo del número de células microgliales y de sus caracteres morfológicos en ERECs de E6,5+24hiv

En las experiencias de tratamiento experimental de ERECs de E6,5+24hiv con diferentes sustancias, se contabilizaron las células microgliales QH1-positivas que habían penetrado en la retina de los ERECs tratados y de sus correspondientes controles. En cada EREC, los recuentos celulares se efectuaron en un campo microscópico cuadrado de 2 mm x 2 mm. Los valores medios del número de

células microgliales se determinaron a partir del recuento de al menos 10 ERECs tratados y sus respectivos controles no tratados.

En las experiencias para determinar la actividad proliferativa de la microglía que había entrado en la retina, también se utilizaban campos microscópicos de 2 mm x 2 mm de ERECs de E6,5+24hiv tratados adicionalmente con BrdU, en los que se determinaba el porcentaje de células microgliales BrdU-positivas con respecto al número total de células microgliales. Se obtuvieron los porcentajes medios de células microgliales BrdU-positivas tras efectuar recuentos en al menos 8 ERECs tratados con ATP 1 mM, 8 ERECs tratados con UDP 1 mM y sus correspondientes controles.

Las células microgliales inmunomarcadas con QH1 eran analizadas morfométricamente en ERECs de E6,5+24hiv tratados experimentalmente y en sus correspondientes controles, a fin de determinar los posibles cambios en el fenotipo migratorio de dichas células inducidos por los diferentes tratamientos. Los indicadores morfológicos analizados eran el área del perfil celular y el índice de elongación 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. En cada EREC, el análisis morfométrico de dichos parámetros se realizaba en tres campos microscópicos diferentes, de forma cuadrada y área de 0,25 mm^2 (500x500 μm), seleccionados en las zonas dorsal, nasal y temporal, adyacentes a la CNO/BP. Los valores medios de estos parámetros celulares eran determinados en al menos 10 ERECs de E6,5+24hiv tratados y en sus respectivos controles no tratados. Este análisis se llevaba a cabo sobre micrografías de los campos microscópicos seleccionados, obtenidas con el objetivo de 10x, utilizando el software ImageTool 2.0 (University of Texas Health Science Center).

Cuantificación de células caspasa-3-positivas mediante citometría de flujo

La cuantificación de células que expresaban caspasa-3 activa en los ERECs se llevó a cabo mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de los mismos marcadas con el anticuerpo anti-caspasa-3 activa. Se realizaron tres

experimentos diferentes, utilizando un total de 9 ERECs de E6,5+24hiv por cada tratamiento (apirasa, suramina, ATP y UDP) con sus respectivos controles no tratados.

Tras el cultivo *in vitro*, los ERECs se fijaban en paraformaldehido al 4% en tampón fosfato 0,1M (pH 7,4) durante 15 minutos, se lavaban con PBS y se incubaban con el anticuerpo anti-caspasa-3 activa (dilución 1:100) durante toda la noche, a 4ºC. Seguidamente, se lavaban en PBS-0,1%T y se incubaban en el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con AF-488, a una dilución 1:100, durante 2 horas, a temperatura ambiente. Finalmente, los explantes se disgregaban en 1 ml de PBS en un homogeneizador manual de vidrio tipo Dounce de ranura ancha (Pobel) y la suspensión celular obtenida se analizaba en un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton-Dickinson), utilizando el software FACS Diva (Becton-Dickinson) para la adquisición y el análisis de los datos. Finalmente, se determinaban los valores medios de los porcentajes de células caspasa-3-positivas en los ERECs de E6,5+24hiv sometidos a cada tratamiento y en sus respectivos controles, que eran comparados estadísticamente (ver último apartado de Materiales y Métodos).

Con el fin de probar la posible relación entre la muerte celular programada y la entrada de las células microgliales en la retina, se hizo una cuantificación de las células caspasa-3 positivas y de las células microgliales que entran en la retina en ERECs de E6,5+24hiv tratados con el inhibidor de caspasas Q-VD-OPh y sus respectivos controles, utilizando los mismos ERECs para la cuantificación de ambos tipos de células. Para ello, tras la fijación de los ERECs, cada explante se incubaba con el anticuerpo QH1 conjugado con Alexa Fluor 594 (dilución 1:500), durante 1 hora, a temperatura ambiente, y se extendía sobre un portaobjetos con la parte vítrea hacia arriba para la obtención de micrografías, las cuales eran usadas para la cuantificación de las células microgliales. Seguidamente, el explante se lavaba en PBS y se sometía al protocolo descrito en el párrafo anterior para la cuantificación de las células caspasa-3 positivas mediante citometría de flujo.

Determinación de la viabilidad celular mediante citometría de flujo

Para comprobar que el tratamiento de los ERECs con las diferentes moléculas utilizadas en nuestro estudio no afectaba a la supervivencia de las células de la retina, la viabilidad celular era analizada mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de ERECs marcadas con diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma) y yoduro de propidio (IP, Sigma) (Darzynkiewicz et al., 1994). El FDA es un marcador de células viables, mientras que el IP es un marcador de células muertas.

El FDA es una molécula no fluorescente permeable a la membrana celular que, tras penetrar en las células viables, es hidrolizada por las esterasas intracelulares que la transforman en fluoresceína. La fluoresceína emite fluorescencia verde cuando es excitada por luz de longitud de onda de 495 nm. Esta molécula 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 de las células vivas, pero sí atraviesa la membrana deteriorada de las células no viables. De este modo, el IP solo se une al ADN de células 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 emitían fluorescencia verde en el citómetro de flujo, mientras que los núcleos de las células muertas emitían fluorescencia roja. También se detectaba en el citómetro de flujo un porcentaje de partículas doblemente marcadas con FDA e IP, que correspondían a células que, aun siendo viables (ya que incorporaban FDA), habían sufrido algún daño en su membrana durante el proceso de disgregación celular (por lo que también incorporaban IP).

El estudio de la viabilidad celular se llevaba a cabo en tres experiencias diferentes, utilizando un total de 9 ERECs de E6,5+24hiv por cada tratamiento (apirasa, suramina, ATP y UDP) con sus respectivos controles no tratados. Tras el

cultivo, cada explante se lavaba en PBS para eliminar los restos de medio de cultivo y se disgregaba en 1 ml de PBS con la ayuda de un homogeneizador manual de vidrio tipo Dounce de ranura ancha, obteniendo así una suspensión celular. Seguidamente, se añadía IP (10 µg/ml) y FDA (15 µg/ml) a la suspensión celular, que se incubaba durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. La cuantificación de células viables se realizaba en un citómetro de flujo FACS Canto II, utilizando el software FACS Diva 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 según sus respectivas fluorescencias (Fig. 16), se correspondían con: a) restos celulares obtenidos durante la disgregación del explante (FDA-negativos e IP-negativos, cuadrante inferior izquierdo); b) células vivas con la membrana intacta (FDA-positivas e IP-negativas, cuadrante inferior derecho); células muertas (FDA-negativas e IP-positivas, cuadrante superior izquierdo); y d) células vivas cuya membrana se había dañado durante el proceso de disgregación del explante (FDA-positivas e IP-positivas, cuadrante superior derecho). La viabilidad celular de cada explante era determinada como el porcentaje de células FDA-positivas e IP-negativas (cuadrante inferior derecho) con respecto al 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 E6,5+24hiv de cada tratamiento y en sus respectivos controles, y los resultados eran analizados estadísticamente (ver último apartado de Materiales y Métodos).

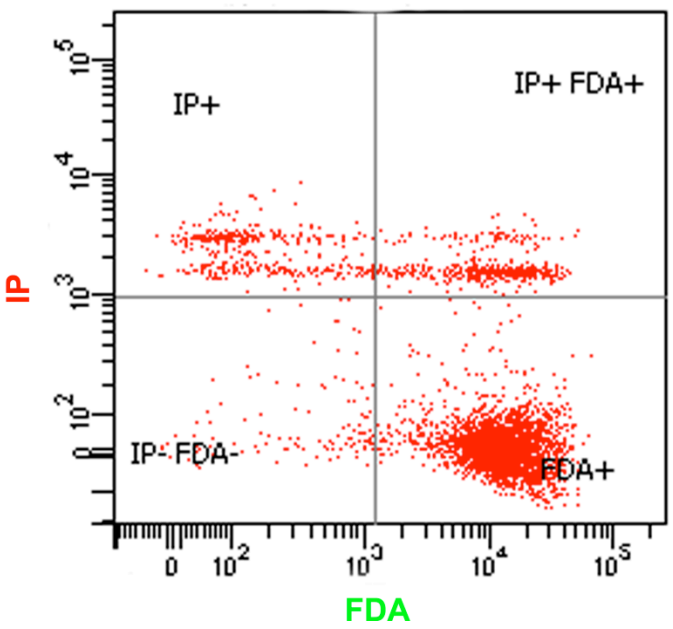

Fig. 16. Gráfica de puntos representativa de las obtenidas en la citometría de flujo para la determinación de la viabilidad celular en suspensiones celulares de explantes de retina marcadas con diacetato de fluoresceína (FDA) y yoduro de propidio (IP). Las células representadas en el cuadrante inferior derecho (FDA+) son viables, mientras que las del cuadrante superior izquierdo (IP+) son no viables. Las células representadas en el cuadrante superior derecho (IP+/FDA+) no son consideradas como células viables en el recuento, por ser positivas para los dos marcadores. Los elementos representados en el cuadrante inferior izquierdo (IP-/FDA-) son considerados restos celulares obtenidos durante la disgregación del explante.

Detección y cuantificación de fragmentos apoptóticos mediante TUNEL

Con el objetivo de comparar la distribución topográfica de fragmentos apoptóticos con respecto a la de células apoptóticas caspasa-3-positivas, se llevó a cabo un doble marcaje con la técnica TUNEL ("Terminal deoxynucleotidil transferase dUTP nick-end labeling", Gavrieli et al., 1992) y el inmunomarcaje con el anticuerpo anti-caspasa-3. La técnica TUNEL marca los núcleos y fragmentos celulares 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 durante la fragmentación del ADN, mediante la incorporación en dichos extremos de

nucleótidos marcados con biotina gracias a la acción de la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT).

El doble marcaje TUNEL/anti-caspasa-3 se realizó en criosecciones de retinas no cultivadas de E6 y E7. Las criosecciones de 20 μm de espesor eran hidratadas en PBS y permeabilizadas con PBS-1%T durante 2 minutos. Después de un lavado en PBS, se incubaban durante 1 hora a 37ºC en la solución de reacción, compuesta por 4 nmol/ml del nucleótido biotina-16-dUTP (Roche Diagnostics) y 10 unidades/ml de TdT (Promega) en tampón TdT (Promega), a pH 6,8. Tras lavar con PBS, las criosecciones se incubaban en estreptavidina conjugada con AF-488 (Molecular Probes), durante 1 hora, a temperatura ambiente. Tras el bloqueo de los sitios inespecíficos con NGS al 10% en PBS-0,1%T durante 45 minutos, se realizaba un inmunomarcaje simple con el anticuerpo anti-caspasa-3 activa (1:100), siguiendo el protocolo descrito con anterioridad (ver apartado "Inmunocitoquímica"). Finalmente, los núcleos celulares se teñían con Hoechst.

Para cuantificar la proporción de células caspasa-3 positivas marcadas simultáneamente con TUNEL en retinas no cultivadas de E6 y E7, se utilizaron criosecciones doblemente marcadas con anti-caspasa-3 y TUNEL procedentes de 3 ojos de cada estadio. En cada ojo, se analizaban 10 criosecciones obtenidas a intervalos de 200 μm a lo largo del eje antero-posterior del ojo. De cada criosección analizada se obtenía una micrografía, utilizando el objetivo 40X de un microscopio Zeiss Axiophot, dotado de cámara digital Zeiss AxioCam. En cada micrografía, cuya anchura era de 300 μm y su altura abarcaba todo el espesor de la retina, se contaba el número total de células caspasa-3 positivas y el número de células doblemente marcadas con anti-caspasa-3 y TUNEL. De esta forma, se determinaba el porcentaje de células caspasa-3 positivas marcadas simultáneamente con TUNEL. A partir de los recuentos efectuados en los 3 ojos de cada estadio, se determinaba el porcentaje medio de células caspasa-3/TUNEL-positivas presentes en retinas no cultivadas de E6 y E7.

Microscopía

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con un microscopio confocal Leica TCS-SP5 (Leica). De cada campo microscópico seleccionado se obtenían series de secciones ópticas confocales en el plano horizontal (XY) a intervalos de 0,5-1µm en el eje vertical Z, a partir de las cuales se obtenía la imagen de proyección. Estas imágenes se almacenaban en formato TIFF y se procesaban digitalmente con Adobe Photoshop CS (Adobe Systems).

Análisis estadístico

Cada parámetro analizado cuantitativamente en el presente estudio se expresaba como el valor medio obtenido en las diferentes muestras analizadas ± error estándar de la media. Las diferencias estadísticas entre los explantes de retina tratados y sus respectivos controles se determinaban 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

Las quimeras de EP-SVC revelan que el SNC es invadido por macrófagos primitivos procedentes del saco vitelino en estadios tempranos del desarrollo embrionario

El estudio inmunocitoquímico de las quimeras de EP-SVC con el anticuerpo monoclonal QH1, específico de codorniz, demostró que en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario, el SNC se encontraba invadido por células QH1-positivas, procedentes del saco vitelino de codorniz (Fig. 17). Teniendo en cuenta su procedencia vitelina y la temprana edad en la que colonizan el SNC embrionario, estas células QH1-positivas han sido consideradas como macrófagos primitivos. En quimeras de E5 dichos macrófagos primitivos se observaban distribuidos por todo el SNC del embrión (Fig. 17A). En determinadas regiones del mismo, como la pared anterior del prosencéfalo, se encontraron acumulaciones de macrófagos primitivos intensamente marcados con QH1 y con morfología redondeada (Fig. 17B). También se observaba una mayor densidad de células QH1-positivas en la zona del nervio óptico (Fig. 17C) y en las paredes laterales del rombencéfalo (Fig. 17D). En quimeras de E8, los macrófagos procedentes del saco vitelino se concentraban en el quiasma óptico y en regiones adyacentes al mismo (Fig. 18A). La morfología de los macrófagos acumulados en zonas laterales del quiasma óptico era redondeada y sin ramificaciones (Fig. 18B, C), mientras que los macrófagos vitelinos localizados en zonas centrales del quiasma y en los nervios ópticos presentaban una morfología alargada y polarizada, propia de un estado migratorio, con largos procesos celulares provistos de lamelipodios y orientados paralelamente a las fibras nerviosas que integran los nervios ópticos (Fig. 18D).

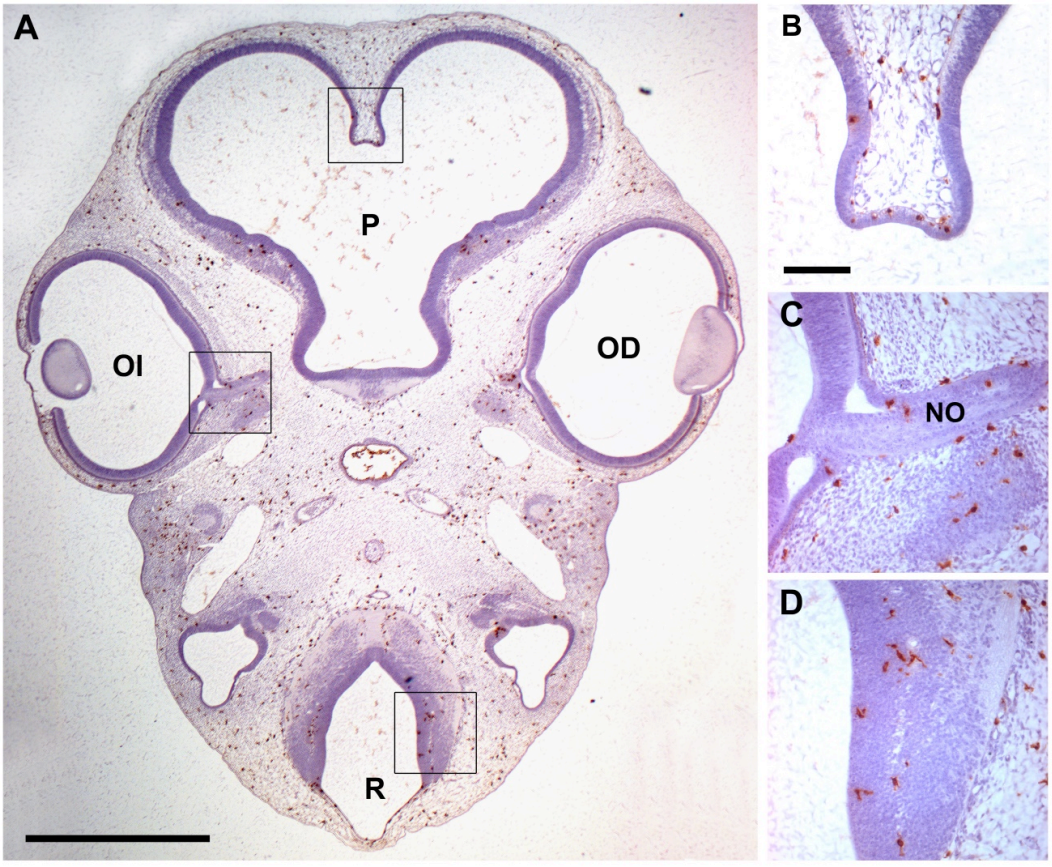

Fig. 17. Macrófagos procedentes del saco vitelino de codorniz invaden el SNC de pollo en estadios tempranos del desarrollo embrionario de quimeras de embrión de pollo-saco vitelino de codorniz. A: Sección coronal de la cabeza de una quimera de embrión de pollo-saco vitelino de codorniz de E5 inmunomarcada con el anticuerpo QH1 (marrón), que reconoce todas las fases del desarrollo de la microglía de codorniz. Las estructuras tisulares se han puesto de manifiesto mediante tinción de fondo con hematoxilina (violeta). Nótese que los macrófagos QH1-positivos, procedentes del saco vitelino de codorniz, se encuentran distribuidos por todas las regiones del SNC del embrión de pollo. Las áreas encuadradas en **A** se muestran a mayor aumento en **B**, **C** y **D**. P: prosencéfalo; OI: ojo izquierdo; OD: ojo derecho; R: rombencéfalo. Barra de escala en **A**: 1 mm. **B**: Aumento de la parte anterior del prosencéfalo, en cuya pared se observan macrófagos QH1-positivos. **C**: Aumento del nervio óptico (NO) del ojo izquierdo, donde también se localizan macrófagos QH1-positivos. **D**: Aumento de la pared del rombencéfalo, con numerosas células QH1-positivas en diferentes niveles de profundidad. Barra de escala en **B**: 100 µm para **B**, **C** y **D**.

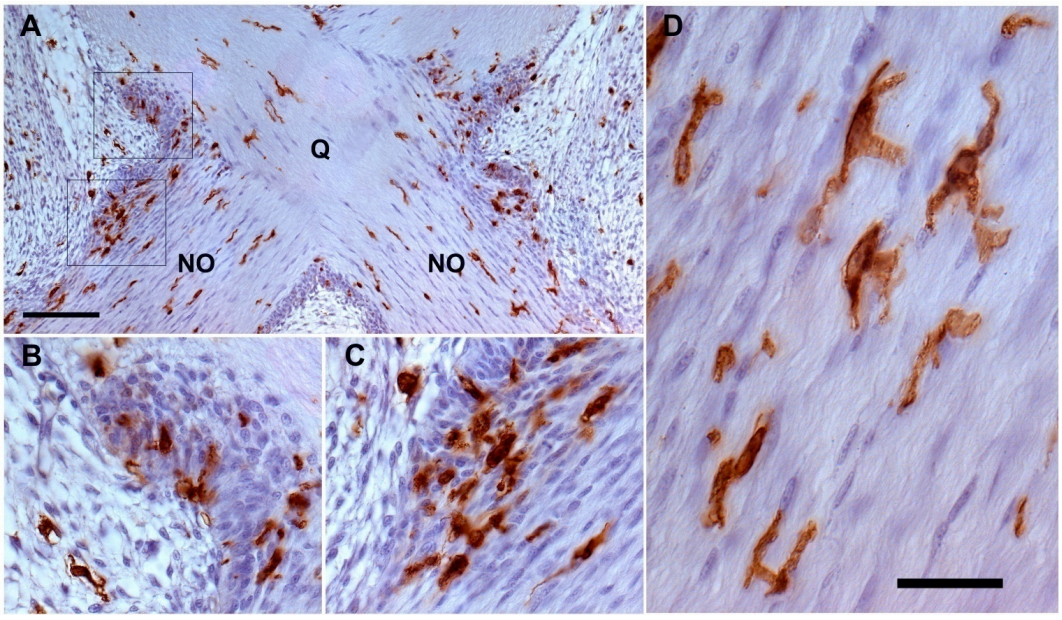

Fig. 18. Los macrófagos originados en el saco vitelino colonizan el quiasma y los nervios ópticos, en los que migran activamente. Sección frontal del área del quiasma óptico (Q) de una quimera de embrión de pollo-saco vitelino de codorniz de E8, inmunomarcada con el anticuerpo QH1 (marrón), específico de codorniz (marrón), y teñida con hematoxilina (violeta). **A:** Los macrófagos QH1-positivos (que proceden del saco vitelino) se distribuyen por toda la zona del quiasma óptico, nervios ópticos (NO) y tejidos adyacentes. Las áreas encuadradas en **A** se muestran a mayor aumento en **B** y **C**. **B, C**: Aumentos de la zona periférica del quiasma óptico, donde se observa una acumulación de macrófagos QH1-positivos de morfología redondeada. **D**: Aumento de una región central del nervio óptico, en la que se observan macrófagos QH1-positivos de apariencia migratoria, con morfología alargada y provistos de lamelipodios, orientados paralelamente a los fascículos de fibras ópticas. Barra de escala en **A**: 100 µm para **A** y 31 µm para **B** y **C**. Barra de escala en **D**: 25 µm.

Los macrófagos primitivos colonizan el ojo a través del borde marginal de la retina y la fisura óptica en estadios tempranos del desarrollo embrionario

En quimeras EP-SVC, numerosos macrófagos QH1-positivos procedentes del saco vitelino de codorniz (macrófagos primitivos) se localizaban en el mesénquima periocular desde estadios muy tempranos del desarrollo (desde E2 en adelante). Nuestras observaciones en quimeras EP-SVC y en embriones de codorniz inmunoteñidos con QH1 demostraban que, en estadios posteriores del desarrollo, los macrófagos vitelinos del mesénquima periocular invadían los tejidos oculares siguiendo dos principales vías: el borde marginal de la retina, adyacente al cristalino, y la fisura óptica, prospectiva del nervio óptico y el pecten.

En relación con la entrada de macrófagos por el borde marginal de la retina, en E4 se observaban algunos macrófagos de morfología aplanada estrechamente adheridos a la superficie basal de dicho borde marginal, adyacente al cristalino y al mesénquima periocular (Fig. 19A). Estas observaciones sugerían que estos macrófagos estaban migrando por el margen periférico de la retina para acceder desde el mesénquima periocular a la cavidad vítrea del ojo. Los macrófagos primitivos que aparentemente migraban en el borde marginal de la retina también se observaban en montajes totales del ojo de embrión de codorniz de E4, en los que se podía apreciar la cercanía de los mismos al extremo de la fisura óptica, colonizada por vasos sanguíneos y por otros macrófagos primitivos (Fig. 19B). En E5 y E6 seguían observándose macrófagos primitivos QH1-positivos aparentemente entrando por el borde marginal de la retina, los cuales mostraban una morfología polarizada con largas prolongaciones celulares (Fig. 19C, D). En E7, estas células se encontraban localizadas en los surcos del cuerpo ciliar en formación (Fig. 19E).

En lo referente a la entrada de macrófagos primitivos por la fisura óptica, vasos sanguíneos del mesénquima periocular se introducían en el espacio de la fisura, localizado entre los bordes ventrales de la retina (Fig. 20A, B), durante las etapas tempranas del desarrollo del embrión de codorniz (E3-E5). Macrófagos

primitivos QH1-positivos que acompañaban a los vasos sanguíneos también accedían a la fisura óptica, donde quedaban alojados (Fig. 20A, B). En E6, numerosas fibras ópticas ya habían escapado de la retina a través de sus bordes ventrales (que limitan la fisura óptica), de forma que esta región se había transformado en la CNO (Fig. 20C). En la porción más vítrea de la misma se disponía el tejido vascularizado procedente de la fisura óptica, en el que se concentraban numerosos macrófagos (Fig. 20C). Dicho tejido infiltrado por macrófagos constituía la BP, a partir del cual se desarrollaba el pecten desde E7 en adelante (Fig. 20D). En E7, se observaban algunos macrófagos alargados en la parte vítrea de la zona de transición entre la BP y la retina, que aparentemente estaban entrando en la retina desde la BP (Fig. 20D). Esta última observación coincidía con descripciones previas de nuestro grupo de investigación, que habían mostrado que células microgliales ameboides entran en la retina embrionaria de codorniz desde la zona de la CNO/BP entre E7 y la eclosión, que tiene lugar en E16, migrando posteriormente en dirección centro-periférica sobre la parte vítrea de la retina embrionaria (Navascués et al., 1995; Marín-Teva et al., 1998).

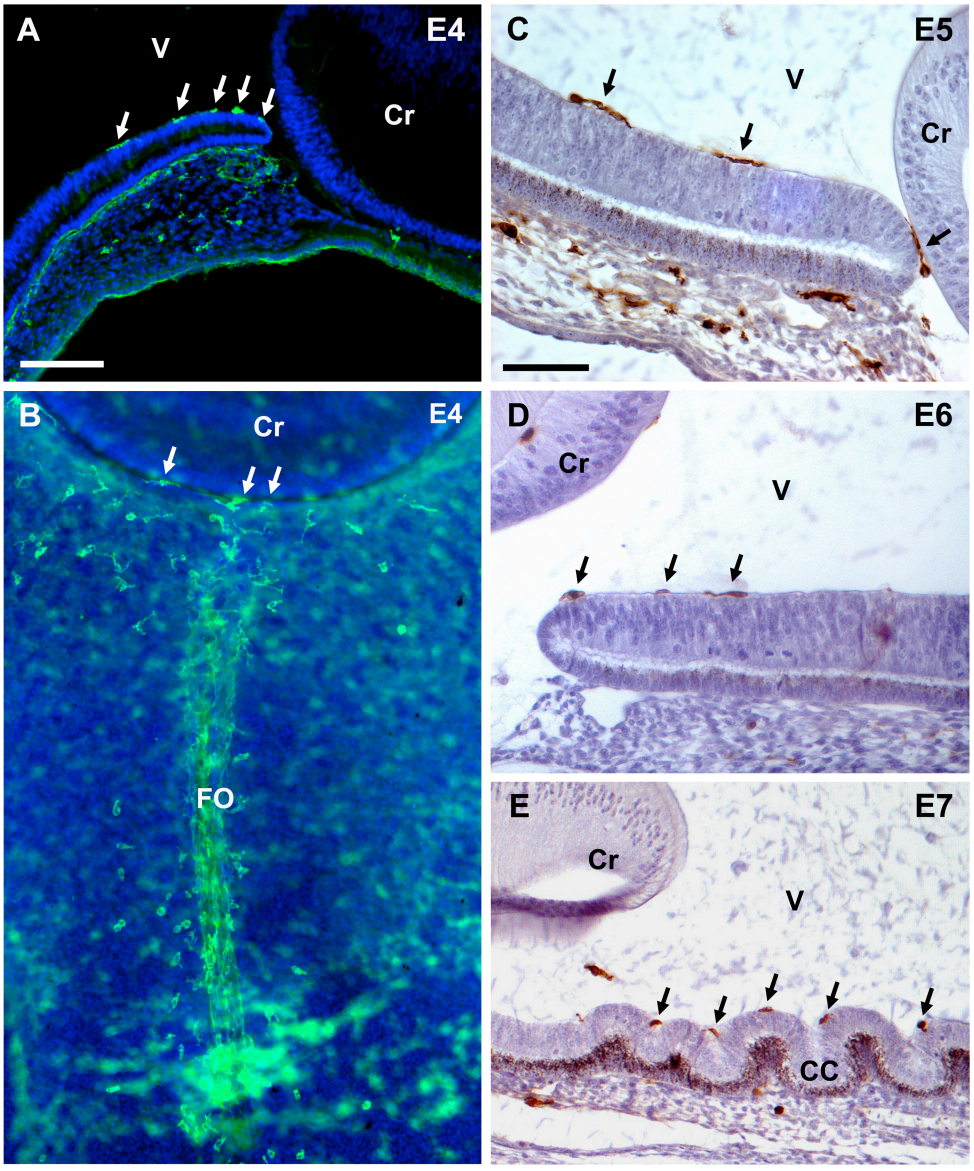

Fig. 19. Macrófagos primitivos QH1-positivos colonizan el ojo del embrión de codorniz a través del borde marginal de la retina, adyacente al cristalino. A: Microscopía confocal del borde marginal de la retina en una sección transversal de un ojo de embrión de codorniz de E4 inmunomarcada con el anticuerpo QH1 (verde). Los núcleos celulares se han puesto de manifiesto mediante tinción nuclear con Hoechst 33342 (azul). Macrófagos QH1-positivos (flechas) se observan migrando por el borde marginal de la retina, adyacente al cristalino (Cr), estrechamente adheridos a la superficie basal de la misma. V: vítreo. **B:** Porción ventral de un montaje total de un ojo de embrión de codorniz de E4, inmunomarcado con QH1 (verde) y teñido con Hoechst 33342 (azul), en el que se observa el cristalino (Cr) y la fisura óptica (FO), prospectiva del futuro pecten. En la parte superior de la imagen se observan macrófagos QH1-positivos (flechas) que están migrando sobre el borde marginal de la retina adyacente al cristalino (Cr). Barra de escala en **A**: 100 µm para **A**; 180 µm para **B**. **C-E:** Secciones histológicas transversales de ojos de quimeras

EP-SVC de E5 (**C**), E6 (**D**) y E7 (**E**) inmunomarcadas con QH1 (marrón) y teñidas con hematoxilina (violeta). Macrófagos QH1-positivos (flechas), provenientes del saco vitelino, se observan estrechamente adheridos sobre el borde marginal de la retina y muestran una morfología alargada, característica de células en migración. Nótese que en E7 (**E**) se está formando el cuerpo ciliar (CC) en la región marginal del ojo, mostrando pliegues sobre los que se adhieren macrófagos primitivos. Barra de escala en **C**: 50 µm para **C**; 45 µm para **D**; 65 µm para **E**.

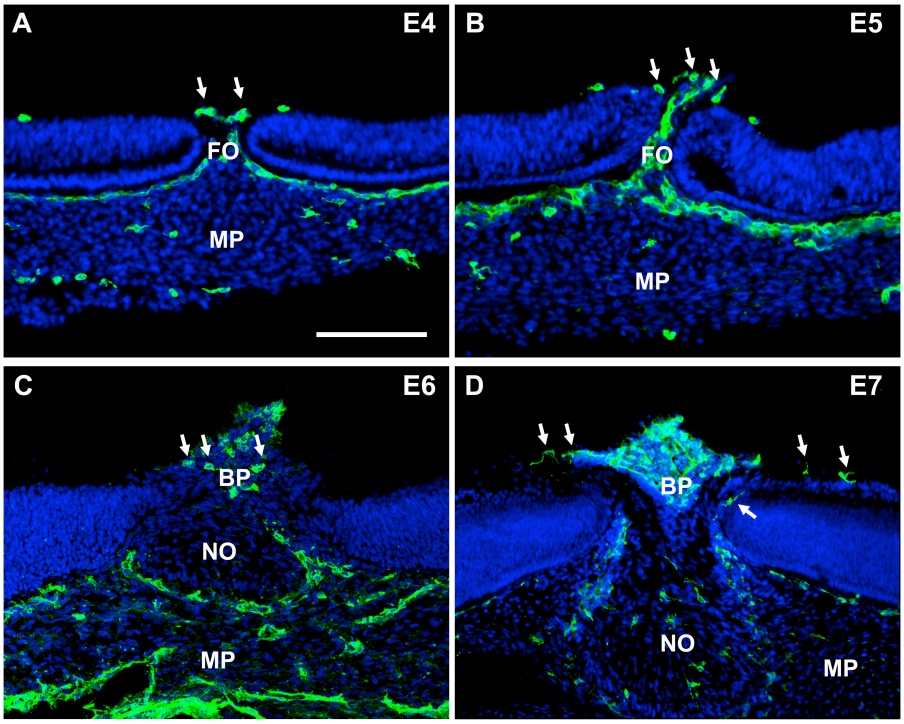

Fig. 20. Macrófagos primitivos QH1-positivos invaden la fisura óptica del ojo del embrión de codorniz en estadios tempranos del desarrollo, concentrándose en la base del pecten en etapas más avanzadas del desarrollo. Microscopía confocal de secciones transversales de ojos de codorniz de E4 (**A**), E5 (**B**), E6 (**C**) y E7 (**D**), inmunomarcadas con el anticuerpo QH1 (verde) y teñidas con Hoechst 33342 (azul). **A, B:** En etapas tempranas del desarrollo, macrófagos primitivos QH1-positivos (flechas) procedentes del mesénquima periocular (MP) invaden la fisura óptica (FO) junto con vasos sanguíneos, que también son QH1-positivos. **C:** En E6, con la salida de numerosas fibras ópticas desde la retina, la zona de la fisura óptica se ha transformado en la cabeza del nervio óptico (NO), en cuya porción más vítrea se localiza un tejido muy vascularizado, llamado base del pecten (BP), a partir del cual se desarrollará el futuro pecten. En este tejido se acumulan gran cantidad de macrófagos QH1-positivos (flechas). **D:** En E7, hay un mayor desarrollo de la cabeza del nervio óptico (NO) y de la base del pecten (BP), que contiene numerosos vasos sanguíneos y macrófagos QH1-positivos. Algunos macrófagos (flechas), aparentemente procedentes de la base del pecten, están comenzando a entrar en el interior de la retina. Barra de escala en **A**: 100 µm para **A** y **B**; 95 µm para **C**; 145 µm para **D**.

Los macrófagos procedentes del saco vitelino que se concentran en la CNO y BP son precursores microgliales que colonizan la retina a partir de E7

En quimeras EP-SVC de E8, edad embrionaria correspondiente a E7 en la codorniz, la BP mostraba numerosos macrófagos redondeados que eran QH1-positivos (Fig. 21A, B), demostrando así su procedencia del saco vitelino, mientras que el endotelio de los vasos sanguíneos era QH1-negativo, revelando su procedencia intraembrionaria. En la CNO también se observaban macrófagos QH1-positivos con apariencia migratoria (Fig. 21A), localizados entre los fascículos de axones ópticos. Los macrófagos de la BP mostraban una morfología redondeada (Fig. 21B) y algunos de ellos parecían estar atravesando la pared endotelial de vasos sanguíneos (Fig. 21B, flechas), sugiriendo que podrían proceder de células sanguíneas circulantes que sufrían extravasación desde la luz vascular. En las quimeras de E8, algunos macrófagos de apariencia migratoria se localizaban en la parte vítrea de la zona de transición entre la BP y la retina (Fig. 21C, flechas), de forma similar a lo observado en embriones de codorniz de E7, sugiriendo que los macrófagos de la BP eran capaces de migrar hacia la retina. Macrófagos QH1-positivos (de procedencia vitelina) también se localizaban en el mesénquima periocular adyacente a la CNO. Es interesante destacar que algunos macrófagos del mesénquima, localizados junto al límite entre la retina y el nervio óptico, parecían estar atravesando la superficie limitante de la CNO (Fig. 21C, cabezas de flecha). Estas observaciones sugerían una vía de entrada de macrófagos primitivos desde el mesénquima hacia la retina.

Por otra parte, macrófagos QH1-positivos localizados entre los fascículos de axones ópticos de la CNO parecían estar entrando en la retina, adheridos a los fascículos de axones ópticos que salían de la retina hacia la CNO (Fig. 22). Dichos macrófagos mostraban una apariencia migratoria, caracterizada por su morfología alargada y la presencia de prolongaciones provistas de lamelipodios (Fig. 22B, flechas), que coincide con las características morfológicas de las células microgliales ameboides de la retina descritas en estudios previos (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995).

En resumen, nuestras observaciones en quimeras EP-SVC demuestran que las células microgliales ameboides que comienzan a entrar en la retina a partir de E7 son de procedencia vitelina y derivan de macrófagos vitelinos con una triple localización: BP, CNO y mesénquima periocular. Además, los macrófagos localizados en la BP en la etapa en la que comienzan a entrar en la retina pueden tener una doble procedencia: 1) a partir de macrófagos primitivos que han colonizado la BP en etapas anteriores del desarrollo, procedentes del mesénquima periocular, y 2) a partir de células circulantes que atraviesan el endotelio de los vasos sanguíneos de la propia BP.

Parecía existir una estrecha relación entre el final del proceso de vascularización de la BP y el comienzo de la entrada de macrófagos desde dicha BP hacia la retina, como demostraban las observaciones realizadas en extensiones de retina de codorniz inmunomarcadas con QH1, en las que se conservaba intacta la zona de la CNO y BP (Fig. 23). En extensiones de E5, la mayor parte de la longitud de la BP mostraba vasos sanguíneos y macrófagos, pero el extremo dorsal de la misma se encontraba desprovisto de ambos (Fig. 23B). En E6, los vasos sanguíneos habían avanzado hacia la parte dorsal de la BP, pero todavía permanecía una pequeña zona de su extremo dorsal en la que los vasos estaban ausentes (Fig. 23C). El avance dorsal de la vascularización de la BP siempre iba acompañado de la presencia de macrófagos QH1-positivos adyacentes a los vasos. Tanto en E5 como en E6, la retina estaba absolutamente desprovista de células QH1-positivas. En E7, comenzaban a observarse macrófagos QH1-positivos de aspecto migratorio en el interior de la retina contigua a la CNO/BP, coincidiendo con la finalización del proceso de avance dorsal de la vascularización de la BP (Fig. 23D). Dichos macrófagos mostraban una morfología polarizada, con largas prolongaciones provistas de amplios lamelipodios y orientadas en dirección centro-periférica, propia de la microglía ameboide.

Los precursores microgliales que entraban en la retina atravesaban la zona limitante entre la retina y la CNO/BP, que estaba ocupada por células alargadas, caracterizadas por una intensa expresión de vimentina en su citoesqueleto (Fig.

24). Estas células vimentina-positivas correspondían a la llamada glía peripapilar (Quesada et al., 2004). Los precursores microgliales que atravesaban el límite entre la CNO/BP y la retina, establecían contactos con la glía peripapilar y se orientaban paralelamente al citoesqueleto de vimentina de la misma (Fig. 24).

Para comprobar que los macrófagos concentrados en la CNO y BP desde etapas tempranas del desarrollo eran efectivamente precursores de la microglía que colonizaba la retina a partir de E7, se realizaron experiencias con cultivos organotípicos de retinas de embriones de codorniz de distintas edades embrionarias (desde E3 a E7), que eran mantenidas *in vitro* un número de días progresivamente mayor cuanto menor era la edad embrionaria de partida, hasta completar la edad de E10 al final de cada cultivo (Fig. 25). Así, las extensiones de retinas de menor edad (E3) eran cultivadas *in vitro* durante 7 días, mientras que las de mayor edad (E7) solamente se cultivaban durante 3 días, de forma que la edad final de las retinas cultivadas siempre era E10. En todas las extensiones de retina se conservaba la zona de la CNO y BP, en la que se concentraban los macrófagos de procedencia vitelina descritos con anterioridad. En todos los casos, al final del cultivo, las extensiones de retina aparecían invadidas por numerosas células QH1-positivas con apariencia de microglía ameboide (es decir, con prolongaciones celulares provistas de lamelipodios). Así, en retinas de E3 cultivadas durante 7 div, las células microgliales ameboides colonizaban la totalidad del explante (Fig. 25A, A'), demostrando que los macrófagos presentes en la zona de la CNO/BP en el momento del inicio del cultivo (E3) eran capaces de colonizar la retina cuando ésta alcanzaba un grado de madurez suficiente, dando lugar a las células microgliales ameboides de la misma. Idéntica situación se observaba en los explantes de retina de E4, E5, E6 y E7 cultivados durante 6, 5, 4 y 3 días, respectivamente (Fig. 25B, B'-E, E'). Estos resultados permitían concluir que los macrófagos de procedencia vitelina presentes en la región prospectiva de BP y CNO desde E3 en adelante eran los precursores de la microglía ameboide que coloniza la retina a partir de E7.

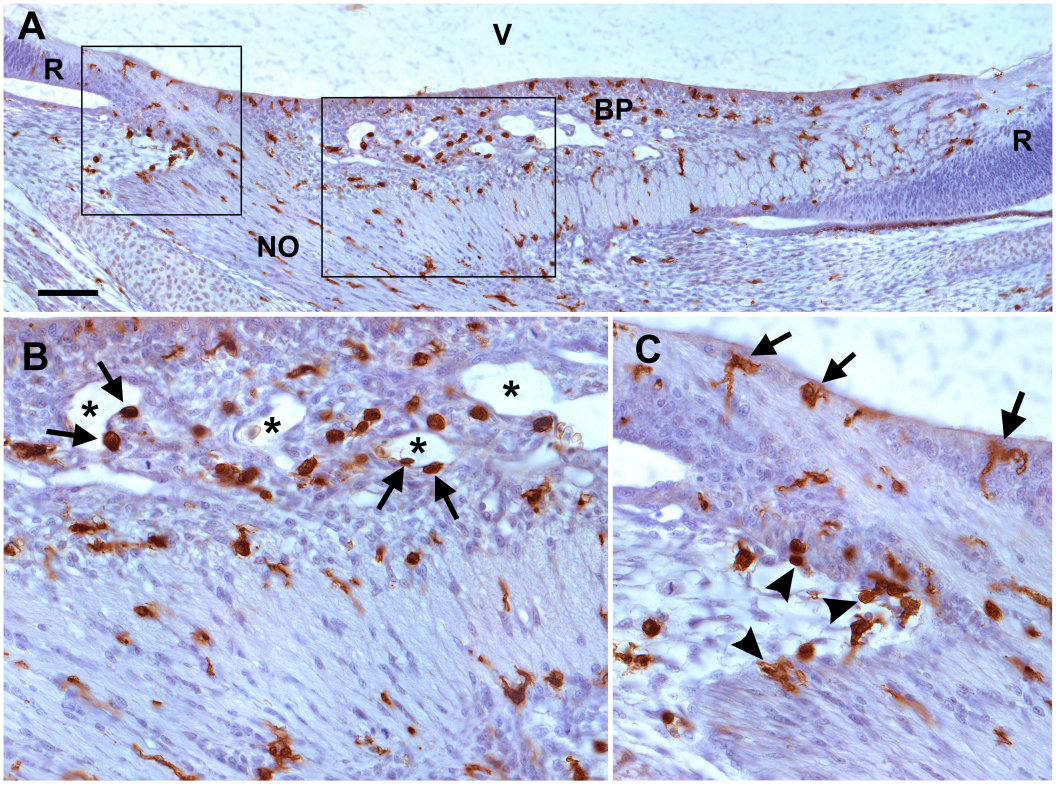

Fig. 21. Numerosos macrófagos de procedencia vitelina se concentran en la base del pecten y cabeza del nervio óptico de quimeras EP-SVC de E8. A: Base del pecten (BP) y cabeza del nervio óptico (NO) de una sección frontal de la cabeza de una quimera EP-SVC de E8 inmunomarcada con el anticuerpo QH1 (marrón), específico de codorniz, y teñida con hematoxilina (violeta). La base del pecten muestra numerosos macrófagos QH1-positivos (de procedencia vitelina) y vasos sanguíneos cuyo endotelio es QH1-negativo (de procedencia intraembrionaria). La cabeza del nervio óptico también muestra macrófagos QH1-positivos distribuidos entre los fascículos de axones ópticos. Las áreas encuadradas en **A** se muestran a mayor aumento en **B** y **C**. V: vítreo; R: retina. **B**: La mitad superior de la imagen muestra la base del pecten con numerosos vasos sanguíneos (asteriscos) y macrófagos QH1-positivos de morfología redondeada, algunos de los cuales (flechas) parecen estar atravesando el endotelio vascular. En la mitad inferior de la imagen se observa la cabeza del nervio óptico, que contiene macrófagos QH1-positivos de morfología alargada e irregular, propia de células migratorias. **C**: Aumento de la zona intermedia entre la retina (a la izquierda), base del pecten y cabeza del nervio óptico, que muestra macrófagos QH1-positivos de apariencia migratoria estrechamente adheridos a la superficie vítrea (flechas). Numerosos macrófagos se concentran en el mesénquima periocular adyacente a la zona de transición entre retina y cabeza del nervio óptico, algunos de los cuales parecen estar atravesando la superficie limitante de dicha zona (cabezas de flecha). Barra de escala en **A**: 100 µm para **A**; 38 µm para **B**; 36 µm para **C**.

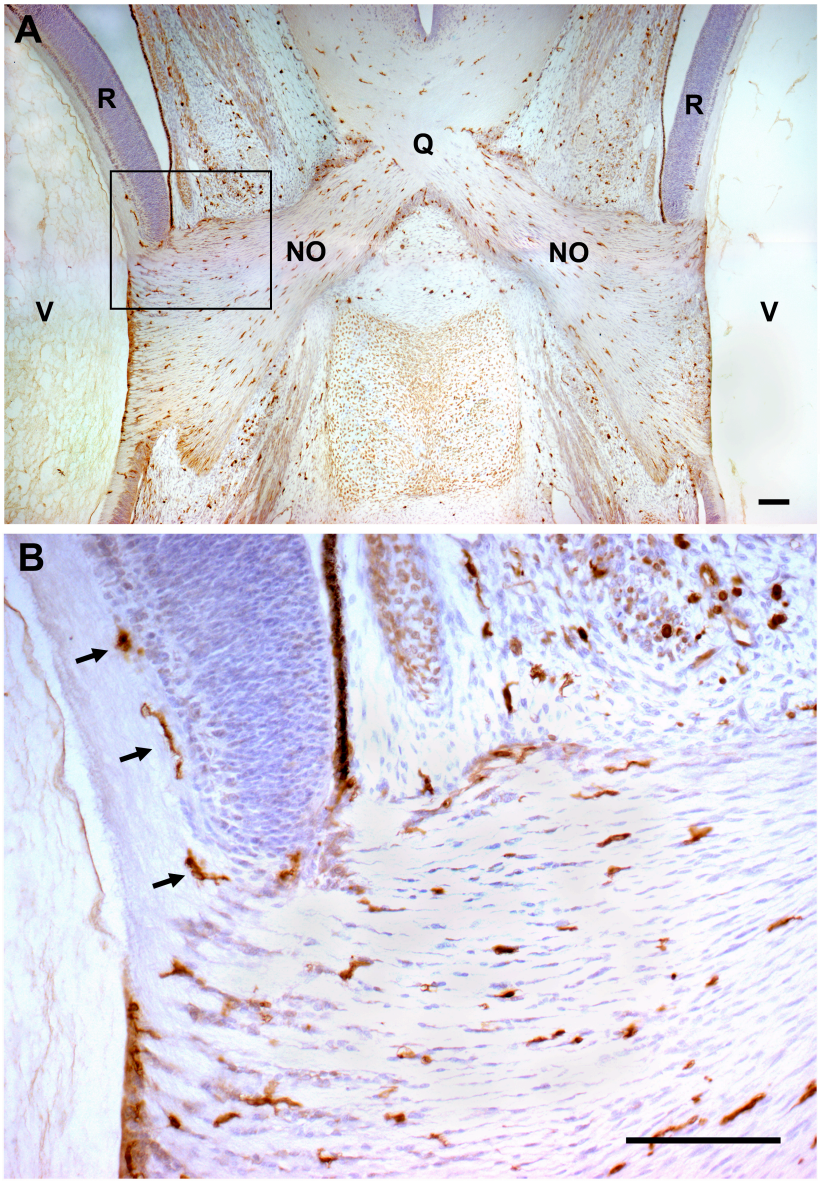

Fig. 22. Los macrófagos QH1-positivos (procedentes del saco vitelino) de la cabeza del nervio óptico de quimeras EP-SVC de E8 parecen estar migrando hacia la retina. A: Quiasma óptico (Q), nervios ópticos (NO) y retinas (R) de una sección frontal de la cabeza de una quimera EP-SVC de E8 inmunomarcada con el anticuerpo QH1 (marrón) y teñida con hematoxilina (violeta). Numerosas células QH1-positivas se distribuyen en el quiasma, nervios ópticos y mesénquima periocular. El área encuadrada se muestra a mayor aumento en **B**. V: vítreo. **B**: aumento del extremo proximal del nervio óptico que se continúa con la cabeza del mismo y con la retina. Se observan numerosos macrófagos QH1-positivos (de procedencia vitelina) localizados entre los fascículos de axones ópticos. Algunos macrófagos de apariencia migratoria (flechas) parecen estar entrando en la retina desde la cabeza del nervio óptico. Barras de escala: 100 µm.

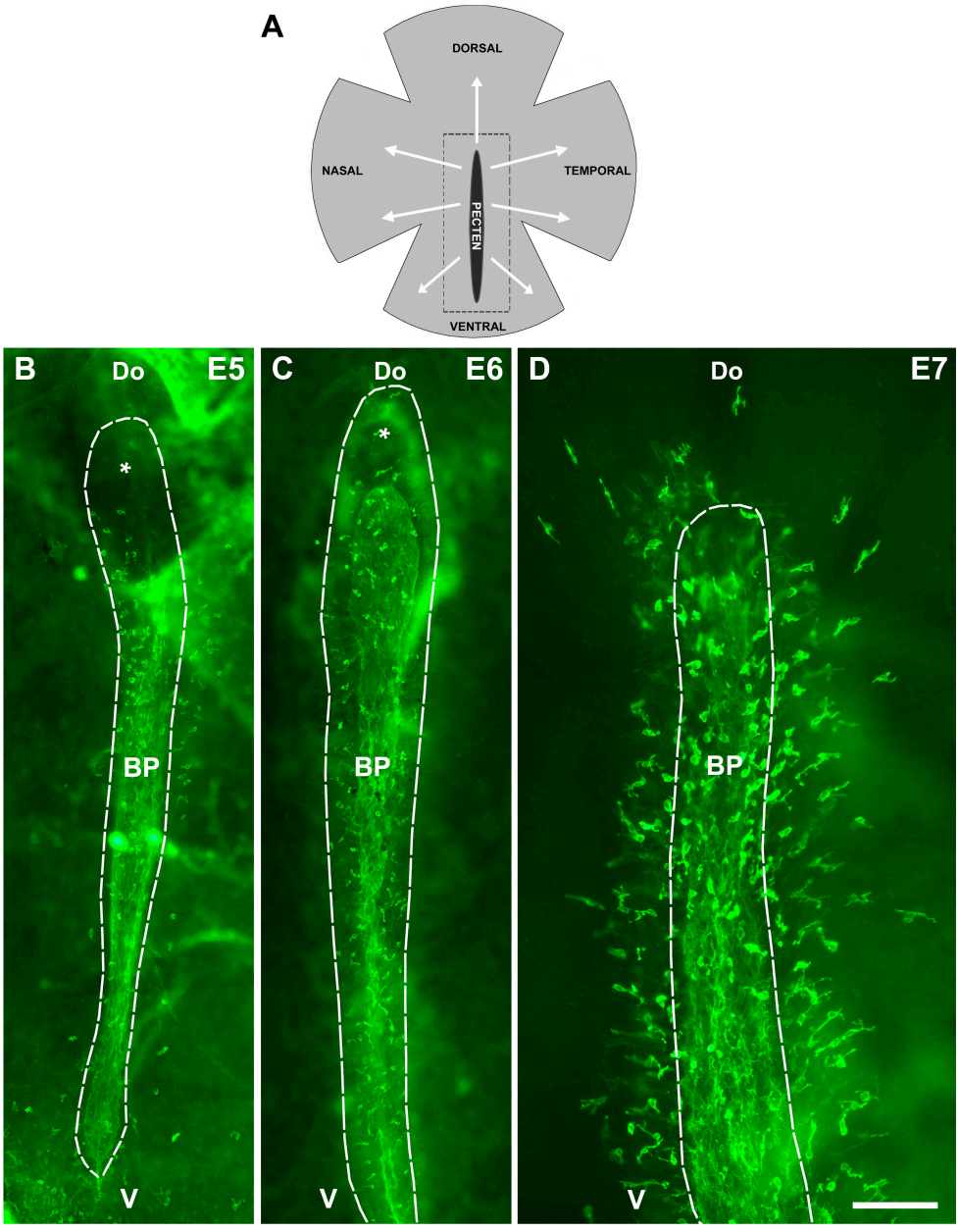

Fig. 23. El proceso de vascularización e invasión por macrófagos de la base del pecten progresa en dirección dorsal antes de la entrada de precursores microgliales en la retina embrionaria de codorniz a partir de E7. A: Dibujo esquemático de una extensión total de retina embrionaria de codorniz en cuya parte central se localiza la base del pecten (en negro), desde donde los precursores microgliales migran centro-periféricamente (flechas) a partir de E7. El área delimitada por la línea discontinua representa la zona mostrada en **B**, **C** y **D**. **B-D:** Base del pecten (BP, delimitada por líneas discontinuas) de extensiones totales de retinas embrionarias de codorniz de E5 (**B**), E6 (**C**) y E7 (**D**), que han sido inmunomarcadas con el anticuerpo QH1 (verde) para identificar los vasos sanguíneos y macrófagos. Do: dorsal; V: ventral. En E5 (**B**), gran parte de la longitud de la base del pecten muestra vasos sanguíneos rodeados de macrófagos, pero su extremo dorsal (asterisco) está desprovisto de ambos. En E6 (**C**), los vasos sanguíneos rodeados de

macrófagos de la base del pecten han avanzado en dirección dorsal, pero todavía permanece una pequeña zona del extremo dorsal (asterisco) en la que están ausentes. En esta edad embrionaria no se observan células QH1-positivas en el interior de la retina. En E7 (**D**), toda la longitud de la base del pecten, incluyendo su extremo dorsal, está ocupada por vasos sanguíneos rodeados de macrófagos QH1-positivos. En esta edad, los macrófagos de la base del pecten comienzan a invadir la retina, mostrando una morfología alargada, propia de la microglía ameboide con actividad migratoria. Barra de escala en **D**: 155 µm para **B**; 175 µm para **C**; 100 µm para **D**.

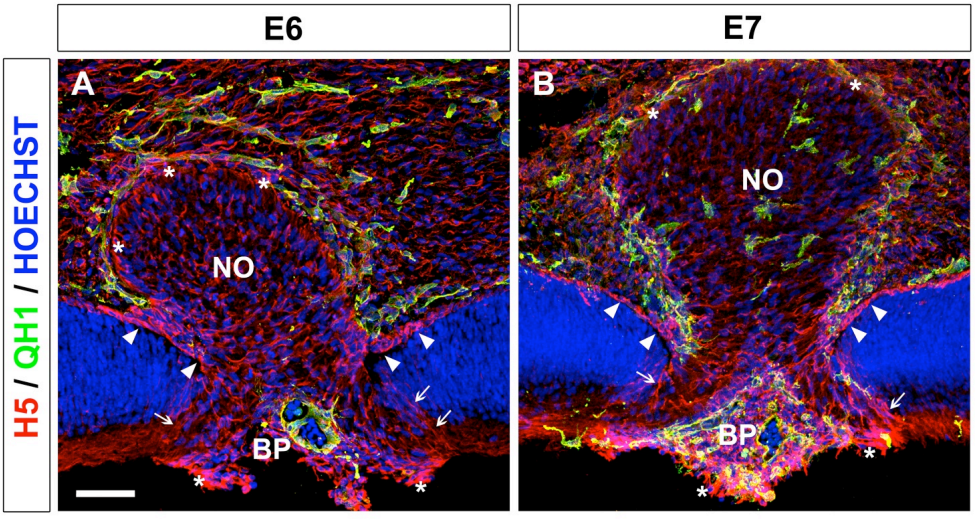

Fig. 24. La zona de entrada de los precursores microgliales en la retina está delimitada por la glía peripapilar vimentina-positiva. Microscopía confocal de secciones transversales de la cabeza de nervio óptico (NO) y base del pecten (BP) de embriones de codorniz de E6 (**A**) y E7 (**B**) doblemente inmunomarcadas con los anticuerpos QH1 (verde), para identificar los precursores microgliales, y H5 (rojo), para identificar el citoesqueleto de vimentina de las células gliales. Los núcleos celulares se han puesto de manifiesto mediante tinción nuclear con Hoechst 33342 (azul). Las prolongaciones de las células gliales que limitan superficie vítrea de la base del pecten y rodean la cabeza del nervio óptico (asteriscos), así como las células del epitelio pigmentario (cabezas de flecha), son vimentina-positivas. La glía peripapilar (flechas), que se localiza en la zona de entrada de la retina, también es intensamente vimentina-positiva y, en E7 (**B**), algunos precursores microgliales muestran una estrecha relación topográfica con la misma. Barra de escala: 50 µm.

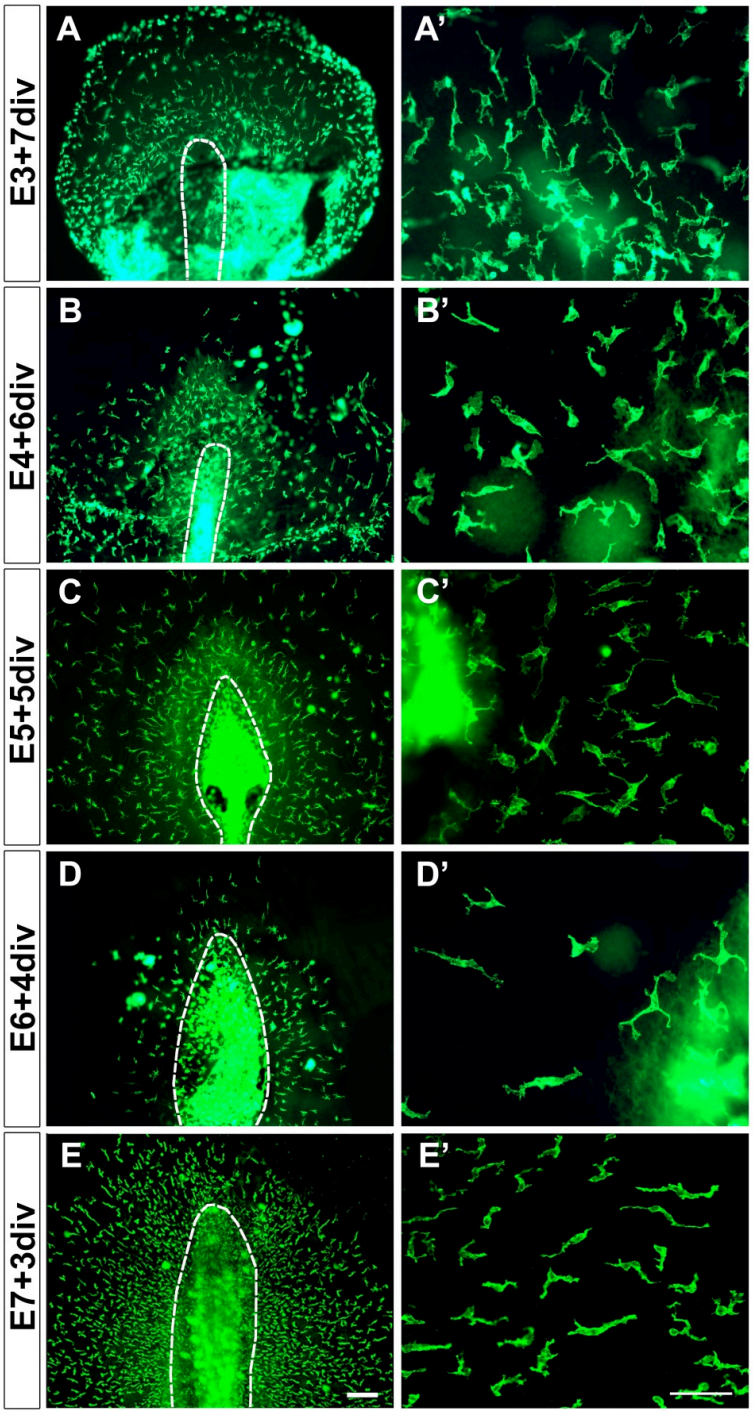

Fig. 25. La base del pecten y cabeza del nervio óptico contiene precursores microgliales desde E3 en adelante con capacidad de colonizar la retina a partir de E7. Extensiones de retinas embrionarias de codorniz de E3 (**A, A'**), E4 (**B, B'**), E5 (**C, C'**), E6 (**D, D'**) y E7 (**E, E'**) cultivadas durante 7, 6, 5, 4 y 3 días *in vitro* (div), respectivamente (hasta alcanzar la edad de E10), e inmunomarcadas con QH1 (verde). La zona de la cabeza del nervio óptico y base del pecten, donde los macrófagos se concentran desde etapas tempranas del desarrollo, se ha

delimitado con una línea discontinua. En todos los cultivos (**A-E**), la retina está invadida por células QH1-positivas, independientemente de la menor o mayor edad de los explantes al comienzo del cultivo, demostrando que los progenitores de estas células están presentes en los explantes de todas las edades ensayadas, incluyendo E3. Las células QH1-positivas que invaden la retina, mostradas a mayor aumento en **A'-E',** tienen la apariencia de microglía ameboide, con prolongaciones provistas de lamelipodios, y parecen proceder de la zona de la cabeza del nervio óptico y base del pecten. Barra de escala en **E**: 100 μm para **A-E**. Barra de escala en **E'**: 50 μm para **A'-E'**.

La microglía ameboide que coloniza la retina embrionaria de codorniz y sus precursores de la CNO/BP muestran un fuerte inmunomarcaje de iNOS

La microglía ameboide QH1-positiva que entraba en la retina desde la CNO/BP a partir de E7, se marcaba intensamente con el anticuerpo policlonal anti-iNOS, el cual no marcaba ni las neuronas ni las células de Müller de la retina (Fig. 26), evidenciando la especificidad del inmunomarcaje de las células microgliales. Estos resultados demostraban la expresión de la enzima iNOS, implicada en la producción de óxido nítrico, en las células microgliales ameboides durante su entrada en la retina y están de acuerdo con los obtenidos en estudios anteriores de nuestro grupo, que mostraban que la microglía de la retina embrionaria de codorniz también es iNOS-positiva en etapas posteriores del desarrollo embrionario (Sierra et al., 2014). Además, los macrófagos concentrados en la CNO/BP en etapas anteriores del desarrollo (entre E3 y E6), que son precursores microgliales, también mostraban un fuerte marcaje anti-iNOS (Fig. 27). Por otra parte, el endotelio de los vasos sanguíneos de la fisura óptica y de la BP, que deriva de aquella, mostraban un débil marcaje anti-iNOS (Fig. 27), en contraste con el intenso marcaje de los macrófagos del vítreo adheridos a la superficie del pecten (Fig. 27C, D).

El inmunomarcaje con anti-iNOS de la microglía ameboide tenía cierta semejanza con el obtenido con el anticuerpo QH1, aunque había claras diferencias entre ambos marcajes (compárense B y C en la Fig. 26). Así, el marcaje con QH1 mostraba todo el perfil de cada célula microglial, incluyendo las prolongaciones y los lamelipodios, 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 y parte de las prolongaciones no se marcaban. Los componentes iNOS-positivos del citoplasma microglial eran siempre QH1-positivos (Fig. 26).

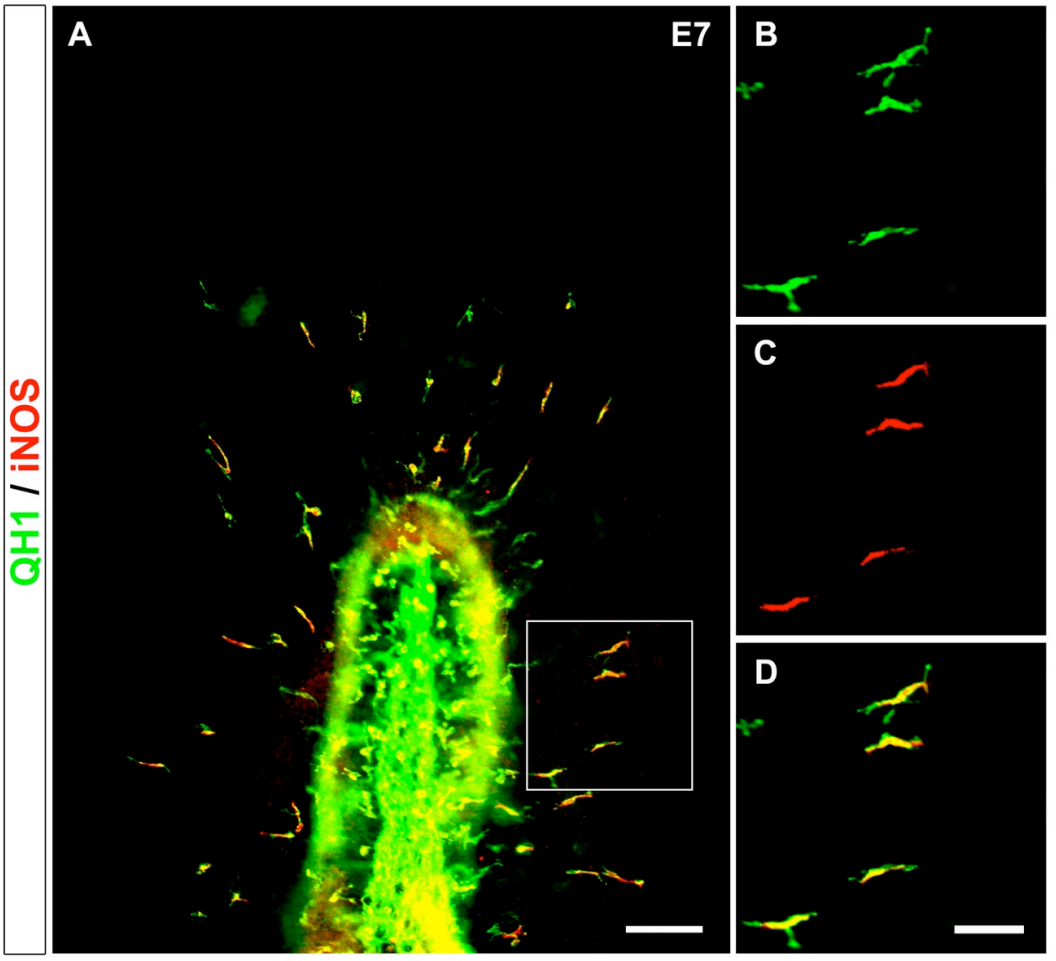

Fig. 26. Las células microgliales ameboides que colonizan la retina embrionaria de codorniz en E7 expresan la enzima iNOS. A: Zona dorsal de la CNO/BP de una extensión total de retina de codorniz de E7 doblemente inmunomarcada con QH1 (verde) y anti-iNOS (rojo). Todas las células microgliales ameboides QH1-positivas que están colonizando la retina muestran un fuerte marcaje anti-iNOS. El área encuadrada en **A** se muestra a mayor aumento en **B-D.** Barra de escala: 100 µm. **B-D:** Campo microscópico de la retina adyacente a la CNO/BP que muestra varias células microgliales ameboides en los canales verde (**B**), rojo (**C**) y tras la fusión de ambos (**D**). Las células microgliales están doblemente inmunomarcadas con QH1 (**B**) y anti-iNOS (**C**), pudiéndose apreciar ligeras diferencias entre ambos marcajes. El anticuerpo QH1 marca intensamente la totalidad de los perfiles microgliales, mientras que el marcaje anti-iNOS es más reducido y no se observa en toda la extensión de las prolongaciones celulares ni en los lamelipodios. Barra de escala: 50 µm.

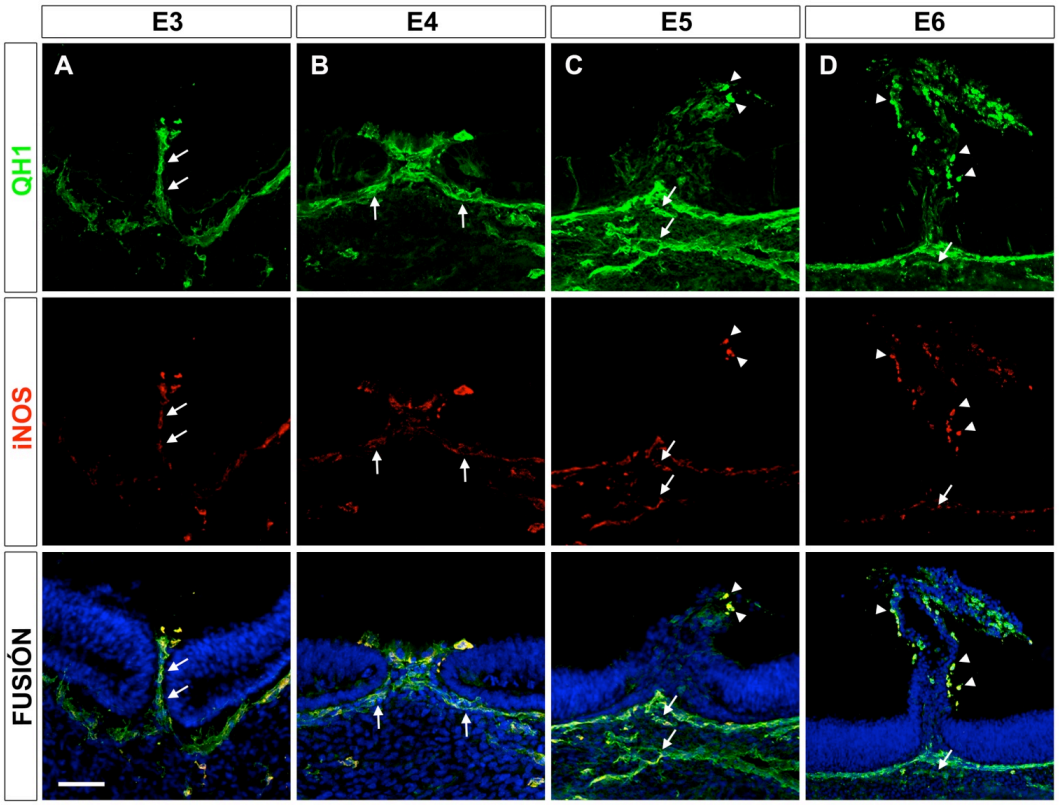

Fig. 27. Los precursores microgliales concentrados en la cabeza de nervio óptico y base del pecten en estadios previos a su entrada en la retina embrionaria de codorniz se marcan intensamente con anti-iNOS. Microscopía confocal de secciones histológicas transversales de ojos de codorniz de E3 (**A**), E4 (**B**), E5 (**C**) y E6 (**D**), doblemente inmunomarcadas con QH1 (verde) y anti-iNOS (rojo). Los núcleos celulares se han teñido con Hoechst 33342 (azul). Cada hilera de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales verde (arriba), rojo (centro) y tras la fusión de canales, incluido el azul (abajo). En todos los estadios, los precursores microgliales QH1-positivos, localizados en la base del pecten (o en su precursor, la fisura óptica) y en el mesénquima periocular, muestran marcaje anti-iNOS. Los macrófagos vitreales QH1-positivos (cabezas de flecha) adheridos a la superficie del pecten (**C, D**) son fuertemente iNOS-positivos, mientras que el endotelio de los vasos sanguíneos (flechas) muestra un intenso marcaje QH1-positivo pero está débilmente inmunomarcado con anti-iNOS. Barra de escala en **A**: 50 µm para **A**; 37 µm para **B**; 61 µm para **C**; 94 µm para **D**.

Los precursores microgliales de la CNO/BP comienzan a invadir la retina de codorniz en E7, coincidiendo con un incremento en la muerte de células ganglionares

Para dilucidar la causa que provoca que los precursores microgliales colonicen la retina de codorniz desde E7 en adelante y no en estadios previos, se estudiaron los procesos de muerte celular programada que tienen lugar en la retina en esos momentos del desarrollo embrionario. Nuestros resultados demostraban que la expresión de la proteína caspasa-3 activa era muy baja en la retina embrionaria de codorniz de E6 (Fig. 28A, C), cuando los precursores microgliales aún no habían comenzado a entrar en la retina (Fig. 28E). Sin embargo, la expresión de caspasa-3 activa aumentaba de forma evidente en E7 (Fig. 28B, D), momento en el que los primeros precursores microgliales estaban entrando en la retina desde la región de la CNO/BP (Fig. 28F). Las células caspasa-3 activa-positivas se localizaban mayoritariamente en la mitad interna de la capa neuroblástica de la retina, donde posteriormente se diferenciaban la CFN, la CCG y la CPI. La coincidencia cronotopográfica entre el aumento en la expresión de caspasa-3 activa y el comienzo de la entrada de las células microgliales ameboides en la retina de E7 se observaba claramente en la región central de ésta, localizada inmediatamente dorsal a la zona de la CNO/BP (Fig. 29). En E6, se observaban muy pocas células caspasa-3 positivas en esta región y los precursores microgliales estaban todavía localizados dentro de la CNO/BP (Fig. 29B). Sin embargo, en E7 había un obvio incremento del número de células caspasa-3-positivas en la zona dorsal a la CNO/BP, coincidiendo con la entrada de las primeras células microgliales ameboides (Fig. 29C). Estas células caspasa-3-positivas se localizaban en la parte vitreal de la retina y frecuentemente mostraban largas prolongaciones dirigidas hacia la CNO (Fig. 29C, D), lo que sugería que eran células ganglionares cuyos axones salían de la retina a través de la CNO. Con frecuencia, las células microgliales que estaban migrando por la retina establecían estrechos contactos con los axones y somas de células ganglionares caspasa-3-positivas (Fig. 29C, D). Además, independientemente de que las células caspasa-

3-positivas eran mucho más abundantes en E7 que en E6 (Fig. 30A, A'), aproximadamente el 70% de las mismas también estaban marcadas con TUNEL, tanto en E7 como en E6 (Fig. 30), lo que permitía concluir que dichas células caspasa-3-positivas se encontraban en proceso de muerte por apoptosis.

En resumen, los anteriores resultados demuestran que las células microgliales ameboides, procedentes de la CNO/BP, comenzaban a invadir la retina en E7, coincidiendo con un incremento de la muerte apoptótica de células ganglionares.

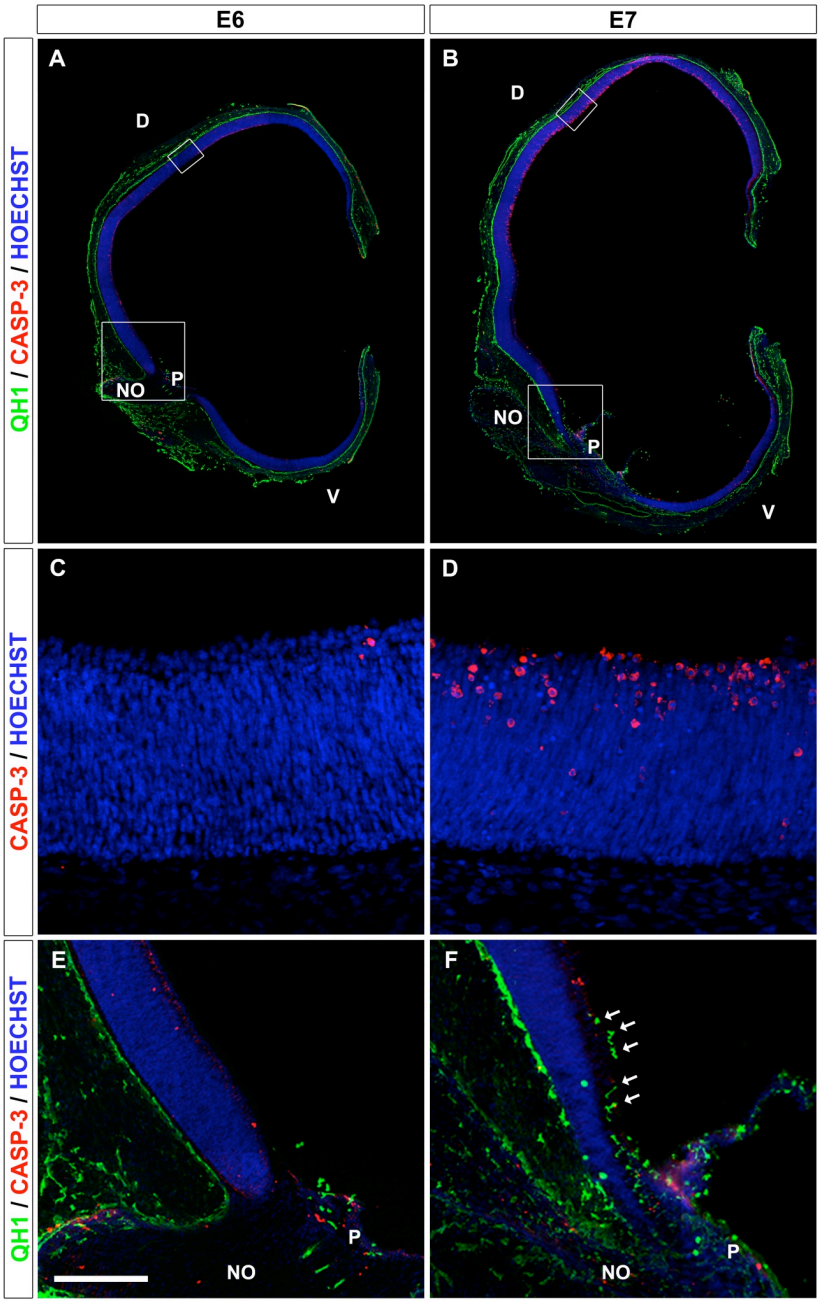

Fig. 28. El comienzo de la entrada de microglía en la retina embrionaria de codorniz coincide con un incremento del número de células caspasa-3-positivas en la misma. A, B: Microscopía confocal de secciones histológicas de ojos de embriones de codorniz de 6 (E6, **A**) y 7 días de incubación (E7, **B**) doblemente inmunomarcadas con el anticuerpo monoclonal QH1 (verde) y el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa (rojo). Las capas nucleares de la retina se han puesto de manifiesto mediante tinción nuclear con Hoechst 33342 (azul). Las áreas encuadradas en **A** y **B** se muestran a mayor aumento en **C** y **E** y en **D** y **F**, respectivamente. D: dorsal; V: ventral; P: pecten; NO: nervio óptico. **C, D**: Aumentos de sendas zonas de la retina dorsal de E6 y E7, que muestran la expresión de caspasa-3 activa. Nótese que en E6 la presencia de células caspasa-3-positivas es

apenas perceptible (**C**), mientras que en E7 es mucho más evidente e intensa (**D**). **E**, **F**: Aumento de sendas zonas de la cabeza del nervio óptico (NO) y base del pecten (P) de E6 y E7, por donde las células microgliales penetran en la retina. En E6 (**E**) no se observa microglía dentro de la retina, mientras que en E7 (**F**) hay células microgliales (flechas) que se adentran desde la región del nervio óptico-base del pecten hacia la parte dorsal de la retina. Barra de escala en **F**: 725 µm para **A y B**; 50 µm para **C y D**; 160 µm para **E y F.**

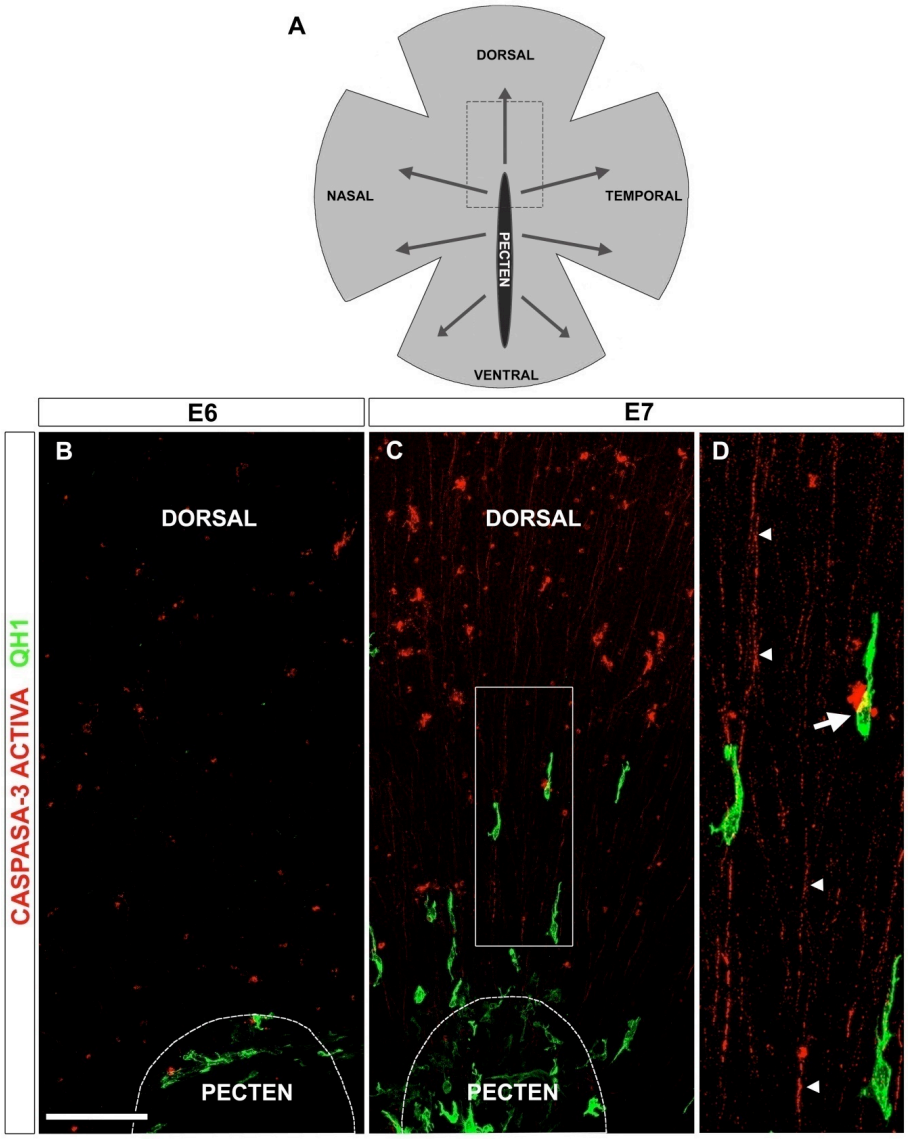

Fig. 29. Las células microgliales que entran en la retina desde la región dorsal de la base del pecten se orientan hacia una zona con gran cantidad de células caspasa-3-positivas. A: Dibujo esquemático de una extensión de retina embrionaria de codorniz en cuya parte central se representa la base del pecten, desde donde se produce migración centro-periférica de la microglía (representada por flechas) a partir del día 7 de incubación (E7). El área delimitada por la línea discontinua representa la zona mostrada en **B** y **C**. **B, C:** Imágenes confocales de la parte dorsal de

montajes totales de retina embrionaria de codorniz de E6 (**B**) y E7 (**C**), doblemente inmunomarcadas con el anticuerpo monoclonal QH1, que muestra la entrada de células microgliales QH1-positivas (verde), y el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa (rojo). En E6, todavía no hay células microgliales dentro de la retina y apenas se observan células caspasa-3-positivas (**B**). En E7, por el contrario, algunas células microgliales entran en la retina desde la base del pecten, observándose orientadas hacia una zona con abundantes células caspasa-3-positivas (**C**). El área encuadrada en **C** se muestra a mayor aumento en **D**. **D**: Aumento de la zona dorsal de la retina de E7, adyacente a la base del pecten, que muestra varias células microgliales orientadas ventro-dorsalmente, una de ellas en estrecho contacto con una célula caspasa-3-positiva (flecha). Se aprecian también numerosas fibras nerviosas caspasa-3-positivas (cabezas de flecha), que parecen ser axones de neuronas caspasa-3-positivas. Barra de escala en **B**: 100 µm para **B** y **C**; 37 µm para **D**.

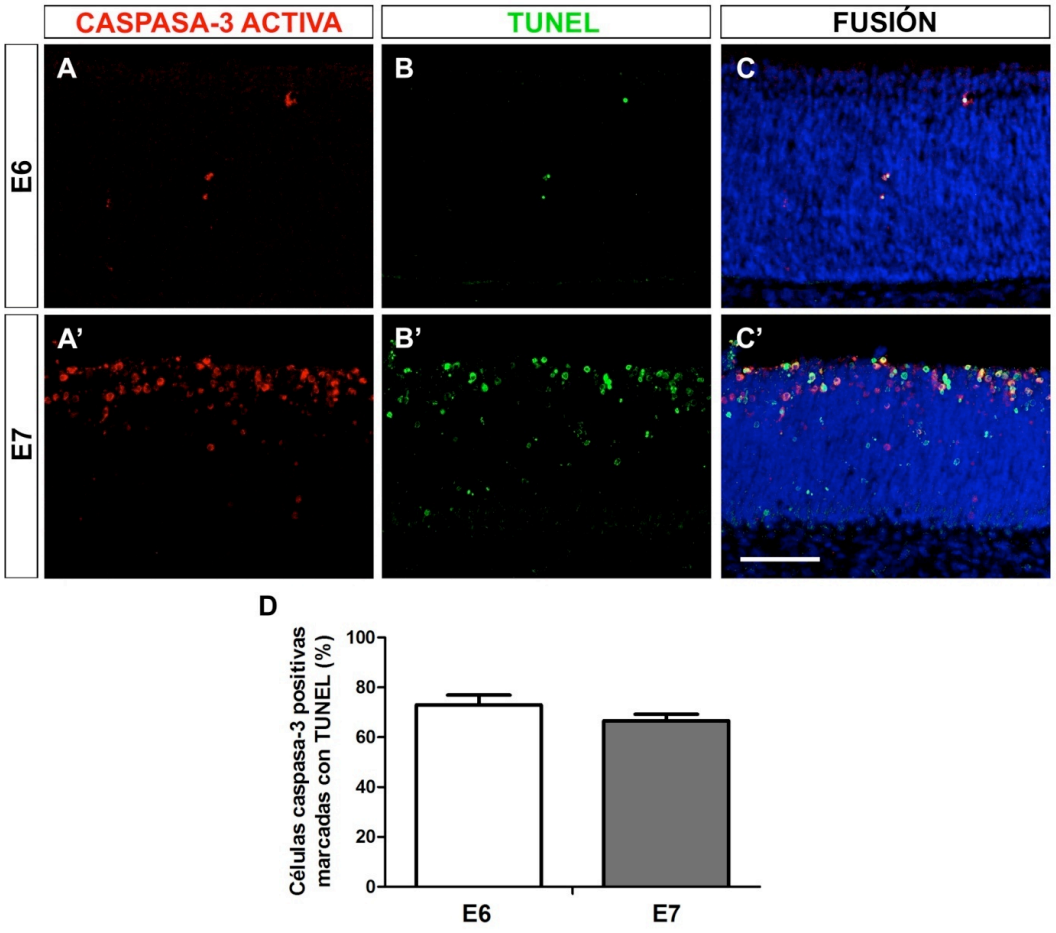

Fig. 30. Las células caspasa-3-positivas localizadas en la región dorsal de la retina se encuentran en proceso de muerte por apoptosis. Microscopía confocal de secciones de retina de embriones de codorniz de 6 días de incubación (E6, **A-C**) y de E7 (**A'-C'**) doblemente marcadas con TUNEL (verde) y con el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa (rojo). Las capas nucleares de la retina se han puesto de manifiesto mediante tinción nuclear con Hoechst 33342

(azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales rojo (izquierda) y verde (centro), y tras la fusión de ambos incluyendo también el canal azul (derecha). La colocalización de ambos marcajes en la mayoría de las células demuestra que las células caspasa-3 positivas se encuentran en proceso de muerte apoptótica. Barra de escala: 50 μm. **D**: Porcentaje de células doblemente marcadas con anti-caspasa-3 y TUNEL en retinas de E6 (barra blanca) y E7 (barra gris). Los datos se expresan como medias (± error estándar) del porcentaje de células caspasa-3/TUNEL-positivas con respecto al total de células caspasa-3-positivas contenidas en campos microscópicos de 300x200 μm de 10 secciones histológicas de 3 embriones de cada estadio. Aunque la presencia de células caspasa-3-positivas es mucho mayor en E7 que en E6, los porcentajes de células caspasa-3/TUNEL-positivas son muy similares en ambos estadios de desarrollo.

Los cultivos organotípicos de ERECs de E6,5+24 hiv son un excelente modelo experimental para el estudio de moléculas reguladoras de la primera entrada de células microgliales en la retina

Nuestro grupo ha demostrado en estudios previos que los cultivos organotípicos de ERECs son un excelente sistema *in vitro* para reproducir el comportamiento fisiológico de las células microgliales ameboides, que migran y se ramifican de acuerdo a unos patrones cronotopográficos muy similares a los de la retina *in situ* (Carrasco et al., 2011). En el presente estudio, hemos utilizado ERECs similares que contenían la parte más dorsal de la CNO/BP, los cuales eran obtenidos a partir de embriones de codorniz de E6,5 y cultivados durante 24 hiv (Fig. 31A-C), con el objetivo de probar los efectos de diferentes moléculas en la entrada de células microgliales en la retina. El estadio de desarrollo elegido para este estudio *in vitro* abarcaba un período de tiempo desde 12 horas antes hasta 12 horas después de la primera entrada de células microgliales en la retina (que tenía lugar en E7). En cada embrión de codoniz, el explante de retina obtenido a partir del ojo derecho era empleado para llevar a cabo el tratamiento experimental, mientras que el explante procedente del ojo izquierdo se utilizaba como control no tratado. Esta forma de proceder estaba basada en el hecho de que, en cada embrión de codorniz, tanto la morfología elongada de las células microgliales que migraban tangencialmente como su tasa de entrada desde la CNO/BP eran similares en los explantes de retina no tratados procedentes de ambos ojos (Fig. 31B, D). De hecho, el número de células microgliales que entraban en la retina no mostraba diferencias significativas entre los ERECs obtenidos a partir de ojos derechos y los procedentes de ojos izquierdos (Fig. 31D). Por lo tanto, estos resultados demuestran que los ERECs de E6,5+24hiv constituyen un modelo experimental *in vitro* fiable para el estudio de los factores que regulan la entrada temprana de las células microgliales en la retina, pudiendo utilizar el explante procedente del ojo derecho de cada embrión como experimental o tratado y el explante procedente del ojo izquierdo como control.

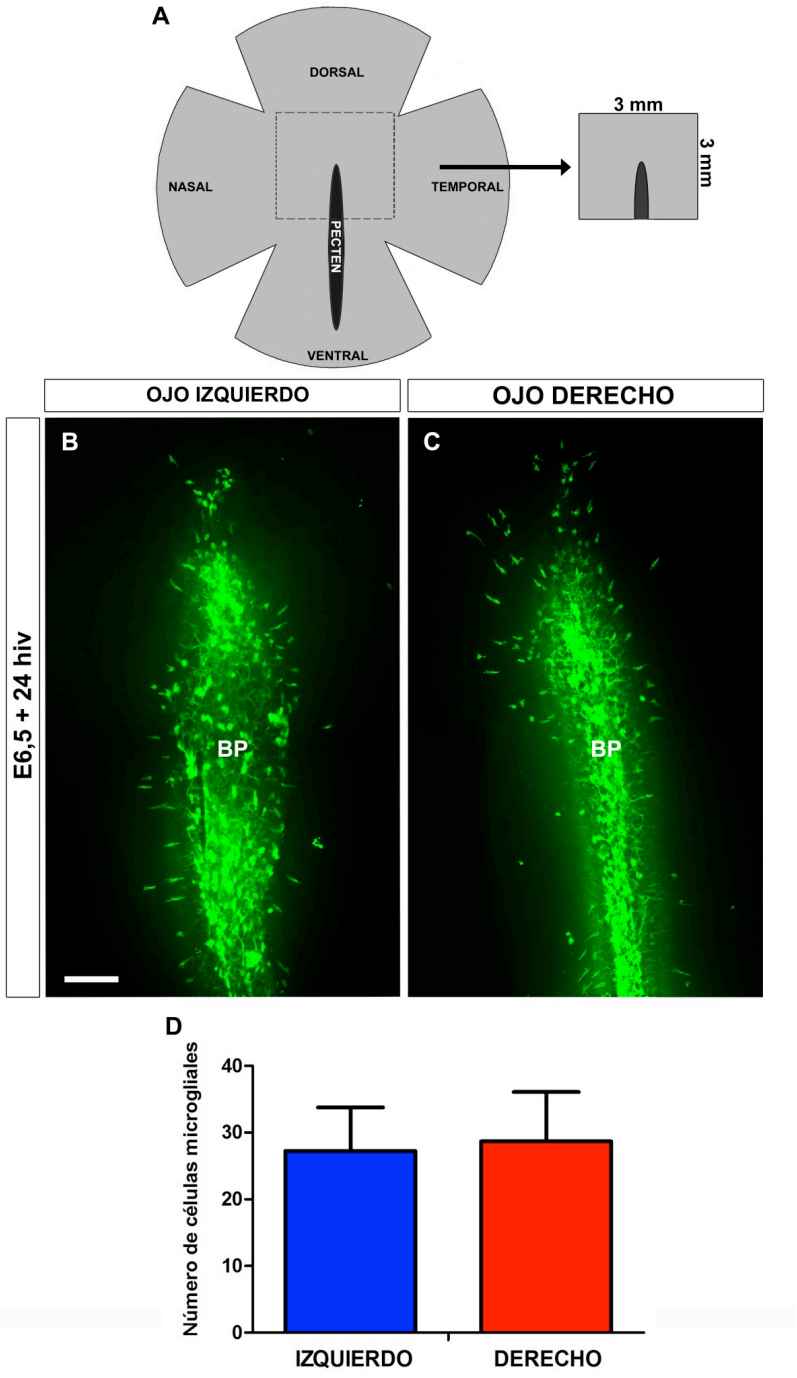

Fig. 31. El ritmo de entrada de células microgliales ameboides en la retina es similar en ambos ojos de cada embrión de codorniz. A: Representación esquemática de la localización de los explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) utilizados en nuestro estudio. El área delimitada por la línea discontinua representa la zona de la extensión de retina que se aislaba para su posterior cultivo *in vitro*. Dicha zona incluía la parte más dorsal de la base del pecten (representada en negro). **B, C:** Montajes totales de ERECs de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (E6,5+24hiv) procedentes de los ojos izquierdo (**A**) y derecho (**B**) de un

mismo embrión. Los explantes han sido inmunomarcados con QH1 para mostrar la entrada de células microgliales QH1-positivas (verde) en ambas retinas. Nótese que la cantidad de células microgliales que han entrado en la retina parece similar en ambos explantes. BP: base del pecten. Barra de escala: 100 μm. **C:** Número total de células microgliales localizadas dentro de la retina en ERECs de E6,5+24hiv procedentes de ojos izquierdos (barra azul) y derechos (barra roja). Los datos se expresan como medias (± error estándar) del número de células microgliales obtenidas a partir del análisis de 12 explantes de cada tipo de ojo, pudiéndose apreciar que no existen diferencias significativas entre los ERECs procedentes de ojos izquierdos y los obtenidos a partir de ojos derechos ($P<0,05$, test t de Student).

La inhibición de caspasas en los ERECs de E6,5+24hiv reduce tanto el número de células caspasa-3-positivas de la retina como la entrada de células microgliales en la misma

Con el objetivo de comprobar la relación entre la expresión de caspasa-3 activa y la entrada de células microgliales en la retina embrionaria de codorniz, los ERECs de E6,5 se trataron durante 24 hiv con el inhibidor de caspasas de amplio espectro Q-VD-OPh (Fig. 32), que es más efectivo que otros inhibidores de caspasas de amplio espectro, como Boc-D-fmk o Z-VAD-fmk (Caserta et al., 2003; Chauvier et al., 2007). Su uso en nuestro sistema experimental no eliminaba por completo la presencia de células caspasa-3-positivas en la retina, aunque sí provocaba una evidente reducción de las mismas (compárese C y D en Fig. 32). Concretamente, el porcentaje de células caspasa-3-positivas, determinado mediante citometría de flujo, se reducía significativamente alrededor de un 45% en los ERECs tratados con Q-VD-OPh (Fig. 32A). Paralelamente, la entrada de células microgliales en los mismos ERECs tratados con Q-VD-OPh también se veía reducida de forma significativa en aproximadamente un 35% con respecto a los ERECs controles (Fig. 32B). Por lo tanto, aunque el inhibidor Q-VD-OPh no inhibía totalmente la expresión de caspasa-3 activa en los ERECs de E6,5+24hiv, su efecto era suficiente para reducir significativamente tanto el número de células caspasa-3-positivas de la retina como el número de células microgliales que entraban en ella desde la CNO/BP, demostrando así que la entrada de la microglía en la retina guardaba una estrecha relación con la muerte celular en la misma.

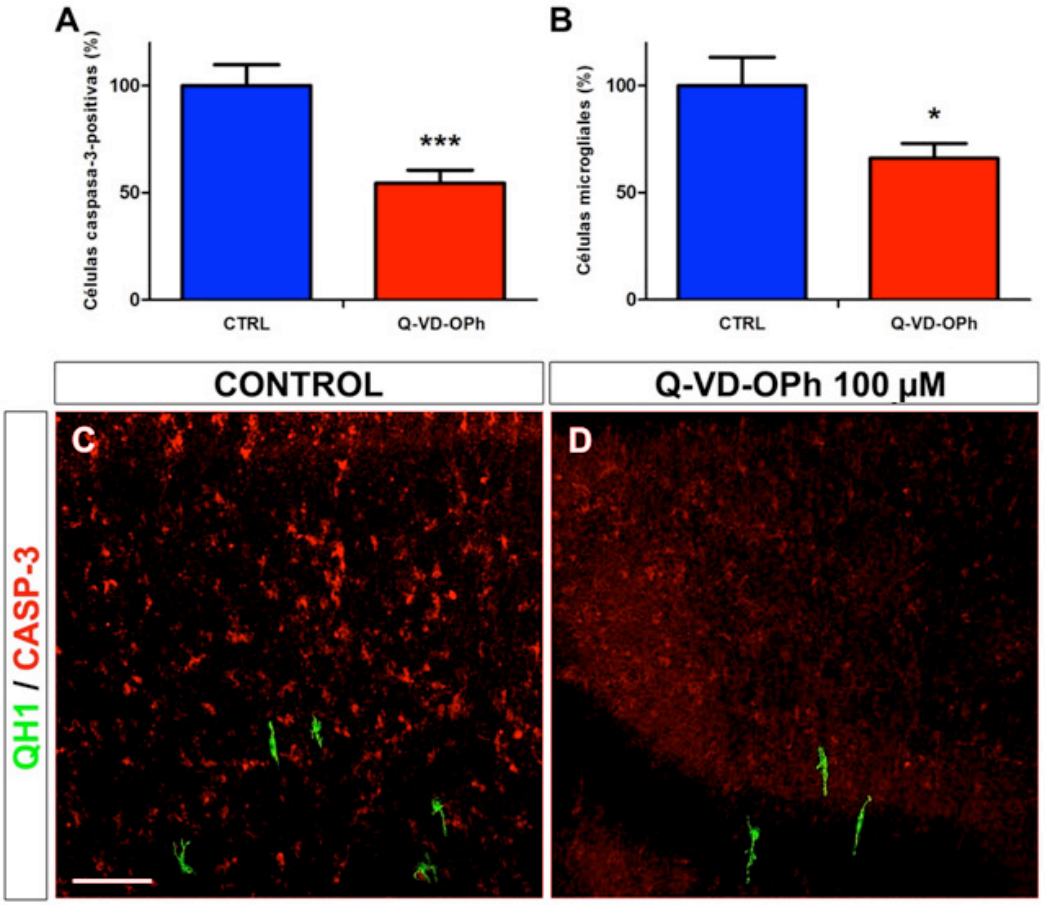

Fig. 32. El tratamiento *in vitro* con el inhibidor de caspasas de amplio espectro Q-VD-OPh reduce el número de células caspasa-3 positivas y, paralelamente, disminuye la entrada de células microgliales en la retina embrionaria de codorniz. A, B: Efecto del inhibidor Q-VD-OPh sobre la cantidad de células caspasa-3 activa-positivas (**A**) y de células microgliales (**B**) en explantes de retina de embriones de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (ERECs de E6,5+24hiv). Las barras rojas representan los porcentajes de células caspasa-3-positivas (medidos mediante citometría de flujo) y de células microgliales hallados en los explantes tratados con Q-VD-OPh 100 µM con respecto a sus correspondientes controles (CTRL, barras azules). Los datos se expresan como valores medios de dichos porcentajes (± error estándar) obtenidos a partir de las medidas efectuadas en 12 explantes en **A** y 10 explantes en **B**. Los porcentajes de células caspasa-3 positivas y de células microgliales que han entrado en la retina son significativamente menores en los explantes tratados con Q-VD-OPh que en los explantes control (*P<0,05, ***P<0,001, test t-Student), demostrando una estrecha relación entre la muerte celular y la entrada de la microglía en la retina. **C, D:** Imágenes de microscopía confocal de la región dorsal de ERECs de E6,5+24hiv incubados en ausencia (**C**, CONTROL) o presencia (**D**, Q-VD-OPh) de Q-VD-OPh (100 µM), doblemente inmunomarcados con anti-caspasa-3 activa (rojo) y QH1 (verde). La presencia de células caspasa-3 positivas se ve claramente reducida en los explantes tratados con Q-VD-OPh. Barra de escala en **C**: 50 µm para **C** y **D.**

La inhibición de la señalización purinérgica en los ERECs de E6,5+24hiv bloquea la entrada de células microgliales en la retina

Los nucleótidos extracelulares, como ATP/ADP y UTP/UDP, son conocidos por actuar como señales "find-me" y "eat-me" liberadas por células apoptóticas que atraen a la microglía y otros fagocitos (Elliott et al., 2009; Haynes et al., 2006; Honda et al., 2001; Koizumi et al., 2007; Kurpius et al., 2007; Medina y Ravichandran, 2016). Considerando que el comienzo de la entrada de las células microgliales en la retina de E7 coincidía con un incremento en la muerte de células ganglionares (Figs. 28-30), era razonable suponer que la señal purinérgica mediada por nucleótidos liberados por las células en proceso de muerte podría estar jugando un papel decisivo en dicha entrada. Para comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos en los que se trataban ERECs de E6,5 con apirasa, una enzima hidrolítica de nucleótidos, o con suramina, un antagonista de los receptores purinérgicos.

La apirasa elimina la señalización por ATP/ADP y UTP/UDP debido a que hidroliza los nucleótidos tri- y di-fosfato extracelulares (Kurpius et al., 2007; Neher et al., 2014). El tratamiento de los explantes de retina con apirasa, a una concentración de 10 U/ml durante 24 hiv, inhibía eficazmente la entrada de células microgliales en la retina (Fig. 33), demostrando que los nucleótidos tri- y di-fosfato, pero no la adenosina, estaban involucrados en los mecanismos de entrada de células microgliales en la retina, procedentes de la región de la CNO/BP. Además, las escasas células microgliales que entraban en la retina en los explantes tratados con apirasa mostraban un fenotipo significativamente menos elongado que los controles no tratados (Fig. 34), sugiriendo que estas células tenían limitada su capacidad migratoria como consecuencia de la hidrólisis de los nucleótidos extracelulares.

Cabe destacar que el tratamiento con apirasa de los ERECs no afectaba a otros aspectos morfofuncionales de la retina diferentes de la microglía, tales como la expresión de caspasa-3 (Fig. 35), la viabilidad celular (Fig. 36), el patrón de expresión de vimentina (Fig. 37) o el patrón de distribución de células islet-1-

positivas (Fig. 38), indicando que la apirasa actuaba específicamente sobre las células microgliales de la retina, sin afectar a otros componentes de la misma. En efecto, tanto los ERECs de E6,5+24hiv tratados con apirasa como sus respectivos controles mostraban patrones de expresión de caspasa-3 similares en la CCG y capa neuroblástica (CNB), las dos capas celulares presentes en la retina en este estadio del desarrollo (comparar A y B en Fig. 35). La presencia de células caspasa-3-positivas era particularmente alta en la incipiente CCG y en la mitad interna de la CNB de los ERECs tratados con apirasa (Fig. 35B) y de sus controles (Fig. 35A), de forma parecida a lo también observado en la retina *in situ* (Fig. 28D). Además, los porcentajes de células caspasa-3-positivas medidos mediante citometría de flujo también eran similares en los ERECs tratados con apirasa y en sus controles (Fig. 35C). Por otra parte, el porcentaje de células viables de los ERECs, determinado mediante citometría de flujo, tampoco se alteraba significativamente tras el tratamiento con apirasa (Fig. 36). El patrón de expresión de filamentos intermedios de vimentina en los explantes tratados con apirasa también era idéntico al observado en los explantes control (comparar A y B en Fig. 37). En ambos casos, la vimentina era expresada en las células de Müller, de manera más intensa en la parte vítrea de la retina, ocupada por la CCG, y más tenue en el resto de la misma, correspondiente a la CNB. Otro aspecto estructural de la retina analizado en los ERECs tratados con apirasa y en sus controles era el patrón de distribución del factor de transcripción islet-1, pudiéndose comprobar que no se alteraba tras el tratamiento con la enzima (comparar A y B en Fig. 38). Tanto en los ERECs tratados con apirasa como en sus controles, se observaban subpoblaciones de células islet-1-positivas distribuidas en la CCG, en el límite vitreal de la CNB y en la mitad escleral de esta última. Los resultados anteriores sugerían que los efectos del tratamiento con apirasa sobre la entrada y morfología de las células microgliales no se debían a un efecto indirecto sobre otros tipos celulares de la retina.

Es bien conocido que la microglía utiliza los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X y metabotrópicos P2Y como vía de señalización frente a

nucleótidos extracelulares como el ATP/ADP y UTP/UDP (Kettenmann et al., 2011; Koizumi et al., 2013; Madry y Attwell, 2015; Ohsawa y Kohsaka, 2011). Con el objetivo de comprobar si los receptores purinérgicos P2X/P2Y están involucrados en la entrada temprana y migración de las células microgliales en la retina, los ERECs de E6,5 eran tratados durante 24 hiv con suramina, que es un antagonista no específico de receptores P2X/P2Y (Burnstock, 2007; Gendron et al., 2003; Shieh et al., 2014). Nuestros resultados revelaban que el tratamiento con suramina a una concentración de 100 μM prevenía significativamente la entrada de células microgliales en la retina (Fig. 39). Igual que sucedía en las experiencias de tratamiento con apirasa, las pocas células microgliales que penetraban dentro de la retina de los explantes tratados con suramina tenían un fenotipo significativamente menos elongado que las localizadas en los controles no tratados (Fig. 40), sugiriendo que dichas células habían detenido su migración tras el bloqueo de los receptores purinérgicos.

De forma similar a lo descrito en las experiencias de tratamiento con apirasa, el tratamiento con suramina de ERECs de E6,5+24hiv no modificaba el patrón de expresión de caspasa-3 (Fig. 41), ni la viabilidad celular (Fig. 42), ni el patrón de expresión de vimentina (Fig. 43), ni el patrón de distribución de células islet-1-positivas (Fig. 44). Así, los explantes tratados con suramina y sus respectivos controles mostraban el mismo patrón de expresión de caspasa-3 en la CCG y en la CNB (comparar A y B en Fig. 41), con mayor presencia de células caspasa-3-positivas en la incipiente CCG y en la mitad interna de la CNB. Además, el porcentaje de células caspasa-3-positivas medido por citometría de flujo no mostraba diferencias significativas entre los explantes tratados con suramina y sus controles (Fig. 41C). De igual modo, el tratamiento con suramina de los ERECs no producía alteraciones en el porcentaje de células viables determinado mediante citometría de flujo (Fig. 42), ni en los patrones de distribución de la vimentina (comparar A y B en Fig. 43) y del factor de transcripción islet-1 (comparar A y B en Fig. 44). En conjunto, estos resultados sugerían que los efectos del tratamiento con suramina sobre las células

microgliales no se debían a un efecto indirecto sobre otros tipos celulares de la retina.

En conclusión, los resultados de los experimentos con apirasa y suramina demostraban el papel esencial de la señalización purinérgica vía P2X/P2Y en la primera entrada y migración de células microgliales ameboides en la retina embrionaria de codorniz de E7.

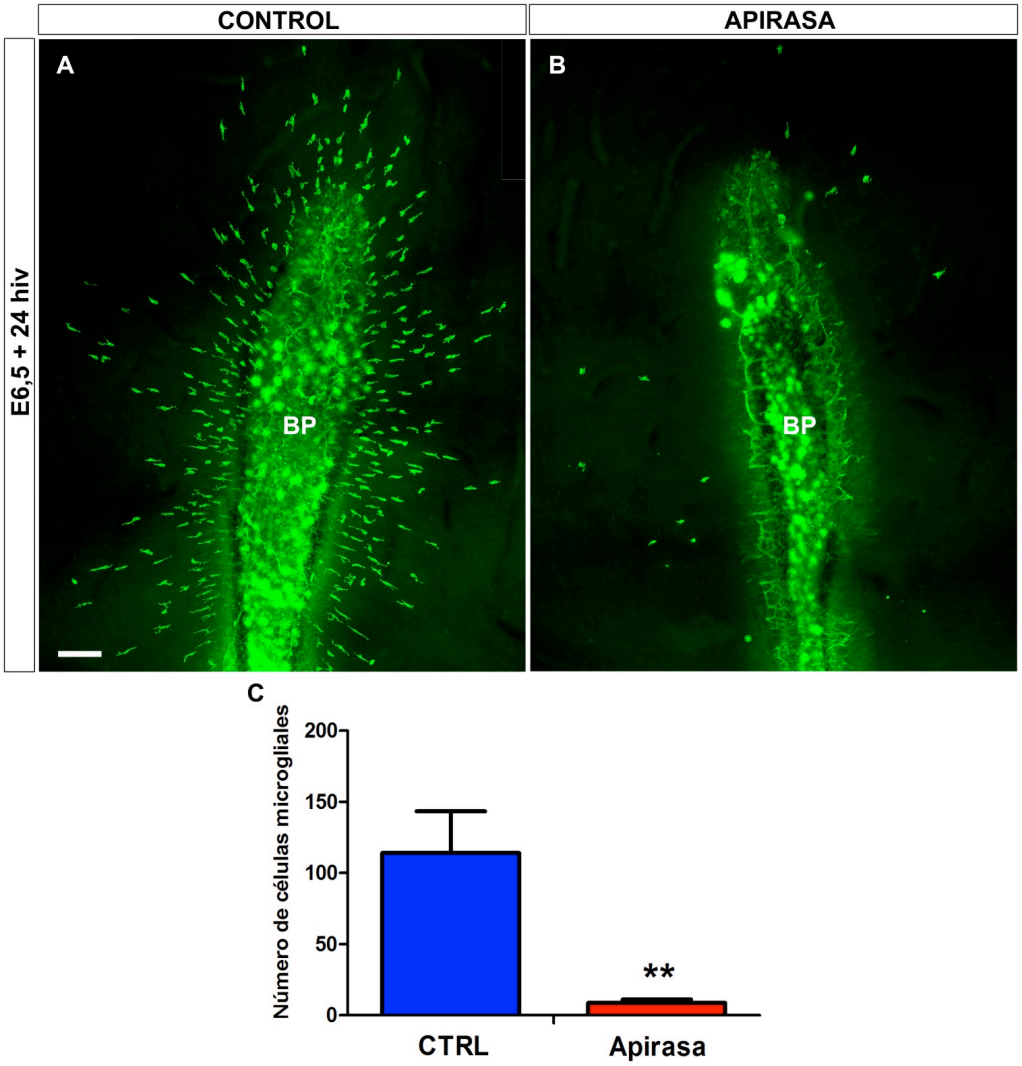

Fig. 33. El tratamiento *in vitro* con apirasa inhibe la entrada de células microgliales en la retina embrionaria de codorniz. A, B: Montajes totales de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (E6,5+24hiv) inmunomarcados con QH1, que muestran la entrada de células microgliales QH1-positivas (verde) en la retina en ausencia (**A,** CONTROL) o presencia (**B**, APIRASA) de apirasa (10U/ml). La presencia de células microgliales dentro del explante tratado con apirasa se ve drásticamente reducida con respecto a la observada en el explante control. BP: base del pecten. Barra de escala: 100 µm. **C:** Número total de células microgliales localizadas dentro de la retina en ERECs de E6,5+24hiv tratados con apirasa (barra roja) y en sus controles no tratados (barra azul). Los datos se expresan como valores medios (± error estándar) del número de células microgliales obtenidos a partir de los recuentos efectuados en 10 explantes de cada tipo. El número de células microgliales es significativamente menor en los explantes tratados con apirasa que en los explantes control (**P<0,01, test t de Student).

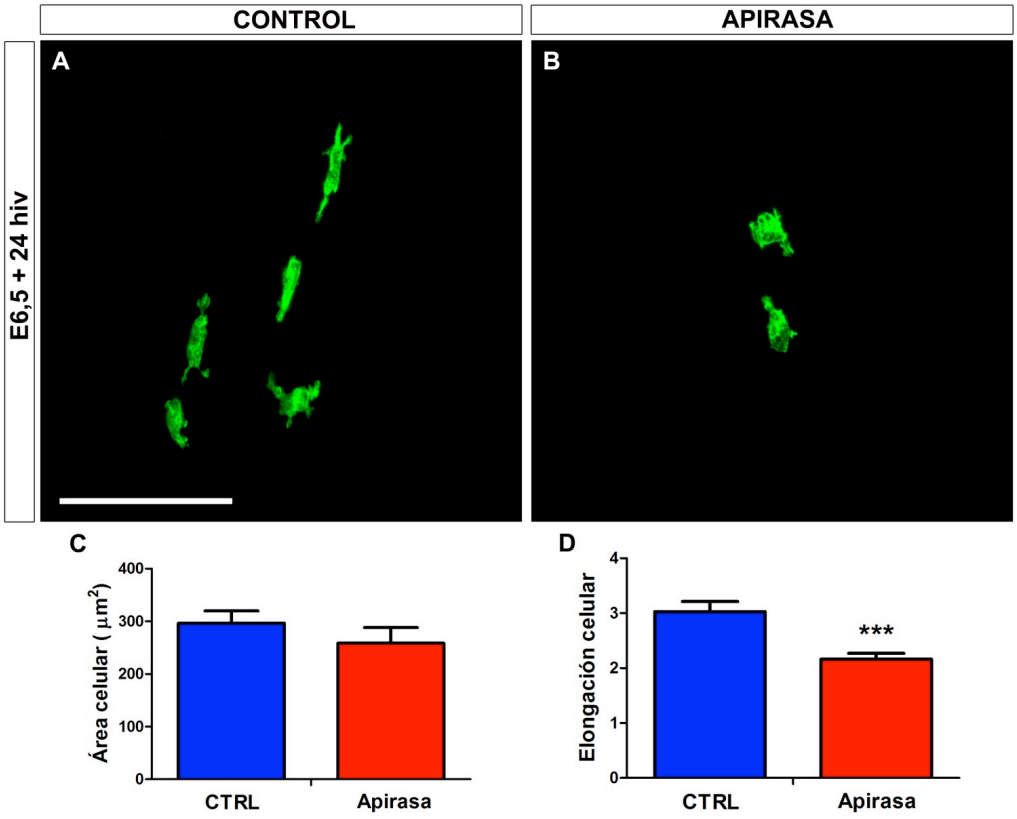

Fig. 34. El tratamiento *in vitro* con apirasa induce cambios morfológicos en las células microgliales de la retina embrionaria de codorniz. A, B: Células microgliales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A**, CONTROL) o presencia (**B**, APIRASA) de apirasa (10 U/ml). Las células microgliales han sido inmunomarcadas con QH1 (verde) y muestran una morfología más redondeada en el explante tratado con apirasa que en su control, donde son más alargadas y polarizadas. Barra de escala: 50 µm. **C, D:** Área celular (**C**) e índice de elongación (**D**) de las células microgliales de explantes tratados con apirasa (barras rojas) y explantes control (barras azules). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los valores medidos en las células microgliales contenidas en tres campos microscópicos de 500x500 µm de 10 explantes de cada tipo. El índice de elongación de las células microgliales de los explantes tratados con apirasa es significativamente menor que en sus controles (***P<0,001, test t-Student).

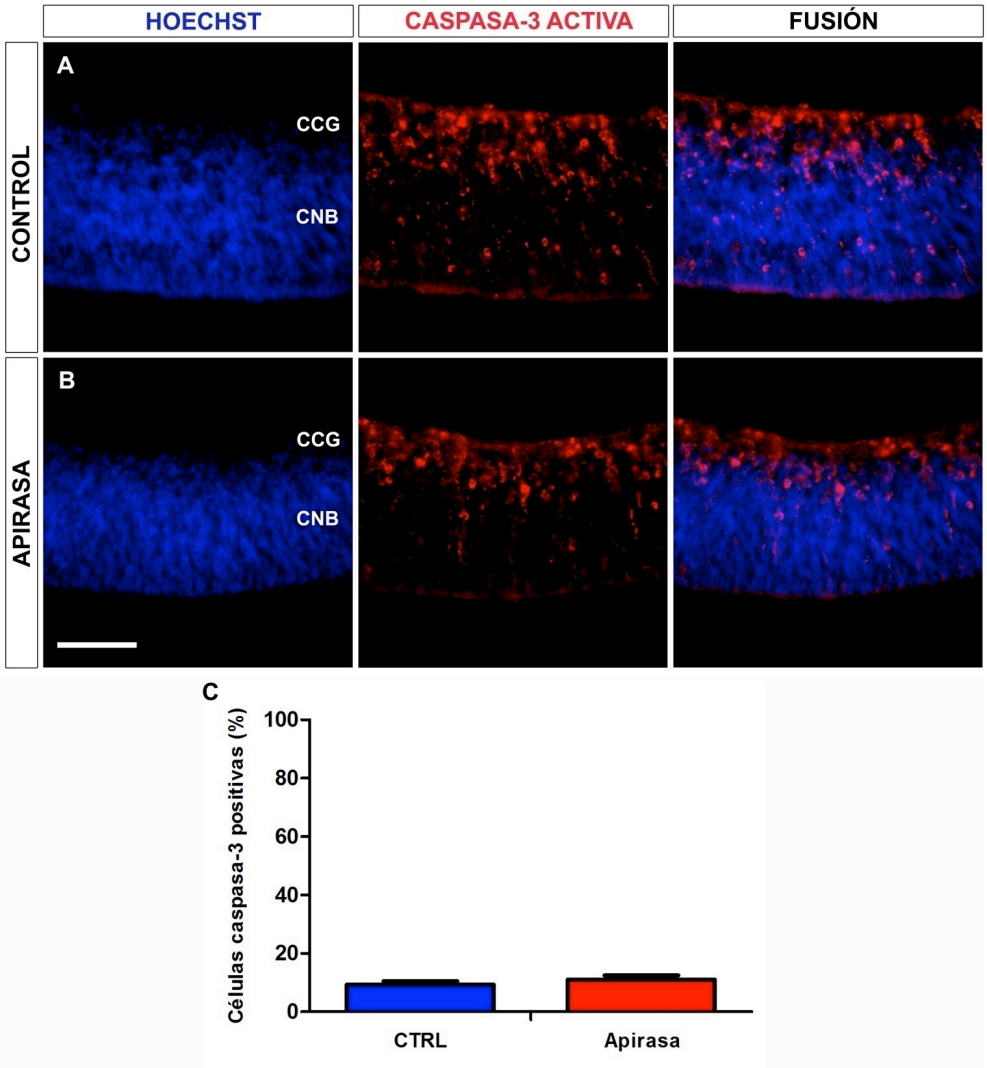

Fig. 35. El tratamiento *in vitro* con apirasa no altera la expresión de la proteína caspasa-3 activa en los explantes de retina embrionaria de codorniz. A, B: Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y añadiendo apirasa al medio de cultivo (**B**, APIRASA). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 activa (rojo) y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), rojo (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de expresión de caspasa-3 activa en el explante tratado con apirasa (**B**) no difiere del observado en su control no tratado (**A**). En ambos casos, el immunomarcaje se localiza en la capa de células ganglionares (CCG) y, en menor medida, en todo el espesor de la capa neuroblástica (CNB). Barra de escala: 50 µm. **C:** Porcentaje de células caspasa-3-positivas (determinado mediante citometría de flujo) en explantes tratados con apirasa (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los porcentajes de células caspasa-3 positivas obtenidos en 9 explantes de cada tipo. Los porcentajes no difieren significativamente entre los explantes tratados con apirasa y sus controles no tratados ($P<0,05$, test t de Student).

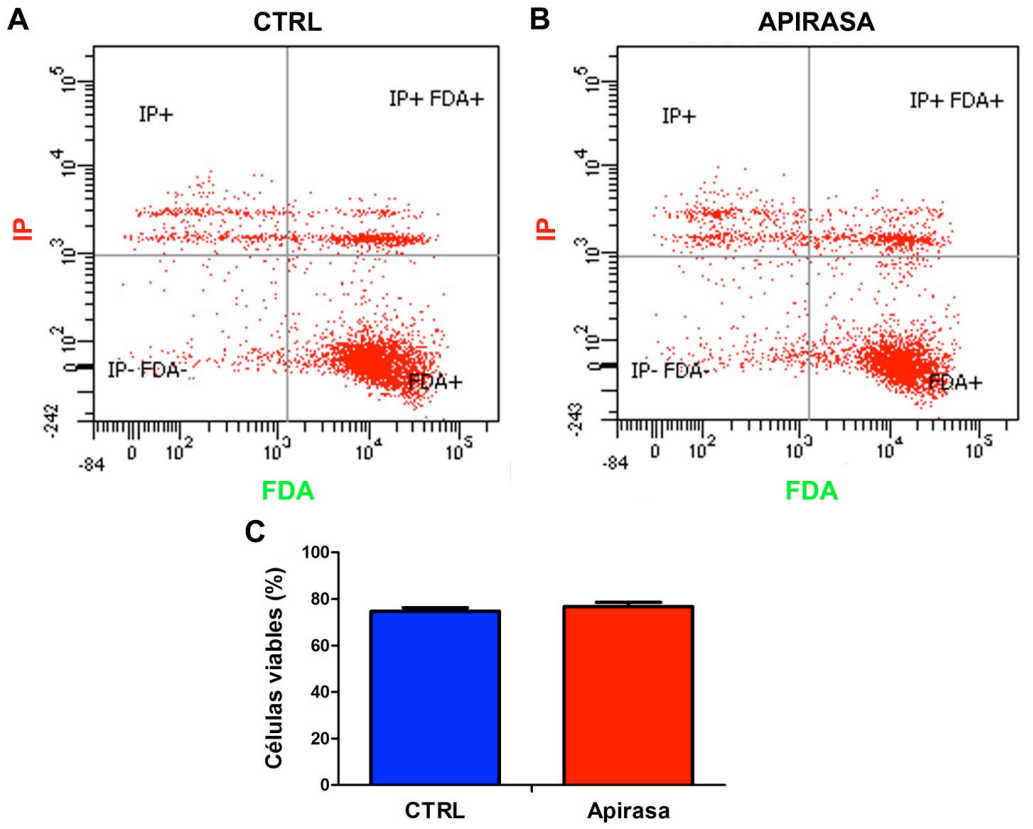

Fig. 36. El tratamiento *in vitro* con apirasa no produce cambios en la viabilidad celular de los explantes de retina embrionaria de codorniz. A, B: Gráficas de puntos representativas del análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A,** CTRL) o presencia (**B**, APIRASA) de apirasa. Las suspensiones celulares han sido tratadas con diacetato de fluoresceína (FDA), como indicador de viabilidad celular, y yoduro de propidio (IP), como indicador de células muertas. Nótese que tanto la nube de puntos de células viables (FDA-positivas), representada en el cuadrante inferior derecho de cada gráfica, como la de células muertas (IP-positivas), representada en el cuadrante superior izquierdo, son similares en los ERECs tratados con apirasa y en sus controles no tratados. **C:** Porcentaje de células viables en explantes tratados con apirasa (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). 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 representan como medias (± error standard) de los porcentajes de células FDA-positivas obtenidos tras el análisis de 9 explantes de cada tipo. La viabilidad celular de los explantes tratados con apirasa no muestra diferencias significativas con la de los explantes control ($P<0,05$, test t de Student).

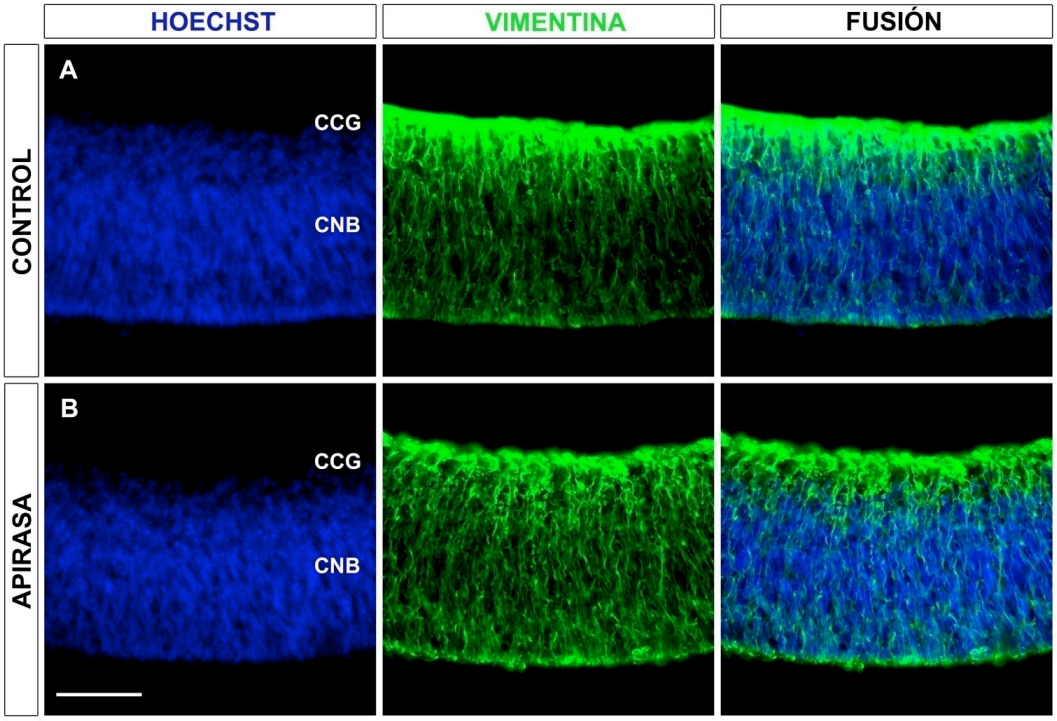

Fig. 37. El tratamiento *in vitro* con apirasa no altera el patrón de expresión de la vimentina en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con apirasa (**B**, APIRASA). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal H5, que revela el citoesqueleto de vimentina de las células de Müller (verde), y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), verde (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). La estructura de las células de Müller vimentina-positivas no muestra diferencias aparentes entre el explante tratado con apirasa (**B**) y su control (**A**). En ambos casos, el marcaje más intenso se concentra en la capa de células ganglionares (CCG), haciéndose más tenue en la capa neuroblástica (CNB). Barra de escala: 50 µm.

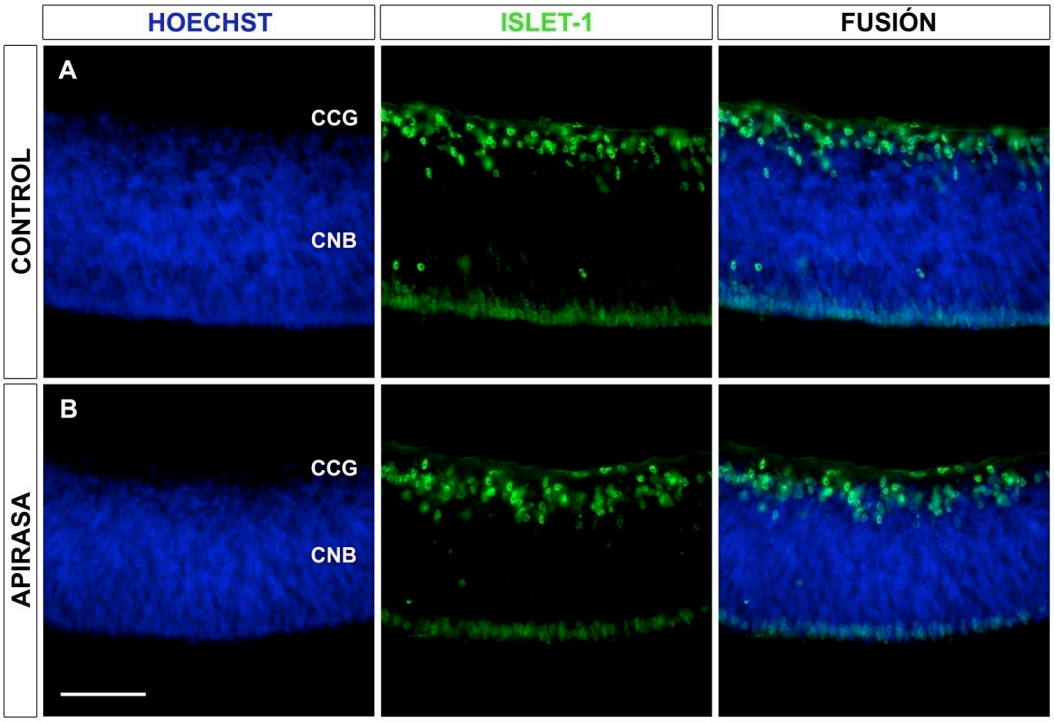

Fig. 38. El tratamiento *in vitro* con apirasa no altera el patrón de distribución de las células Islet-1-positivas en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con apirasa (**B**, APIRASA). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal 39.4D5, que reconoce los núcleos de las células que expresan el factor de transcripción Islet-1 (verde), y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), verde (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de distribución de células Islet-1-positivas en el explante tratado con apirasa (**B**) es similar al observado en su control no tratado (**A**). En ambos casos, las subpoblaciones de células Islet-1-positivas se distribuyen en la capa de células ganglionares (CCG), en el límite vitreal de la capa neuroblástica (CNB) y en la mitad escleral de ésta. Barra de escala: 50 µm.

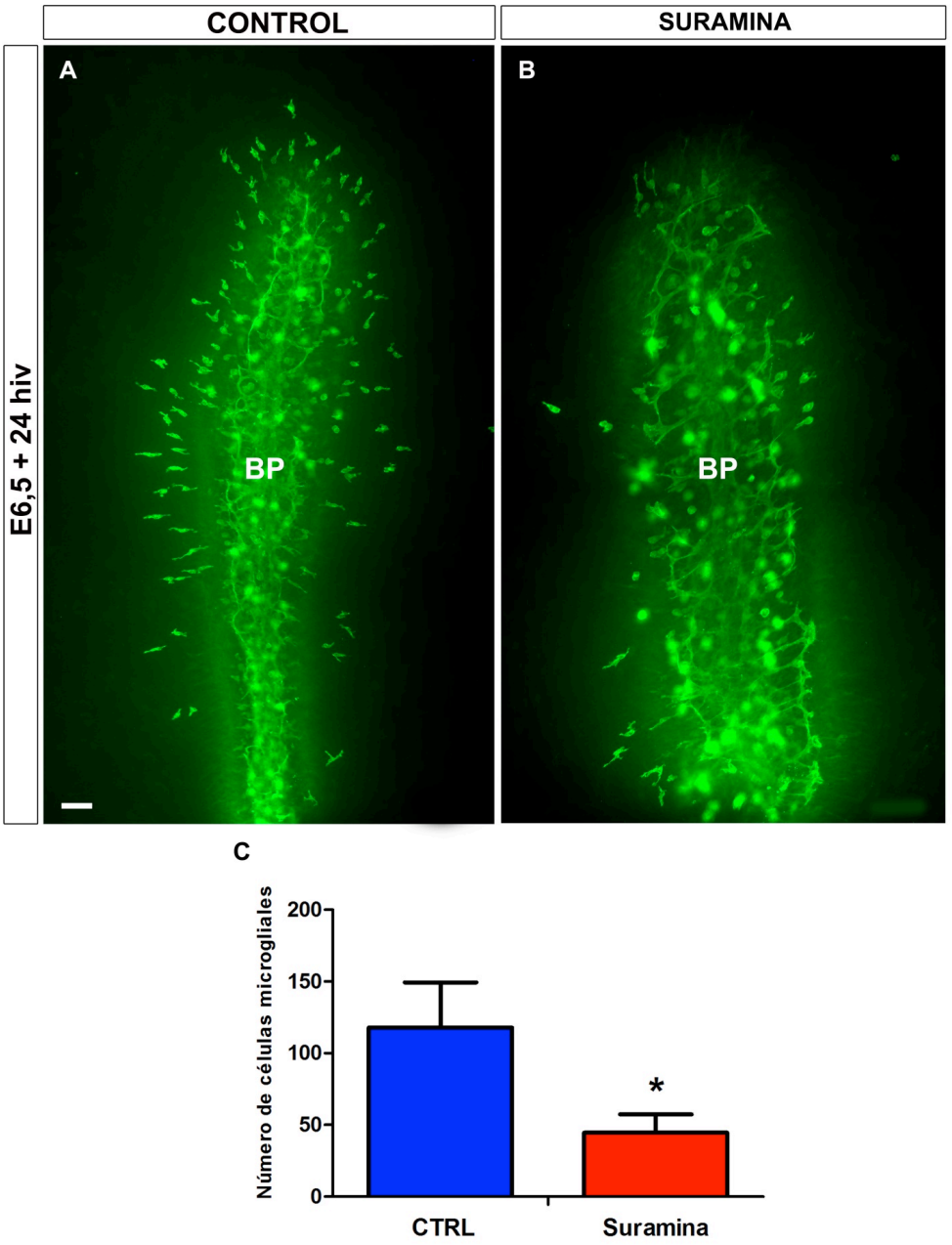

Fig. 39. El tratamiento *in vitro* con suramina inhibe la entrada de células microgliales en la retina embrionaria de codorniz. A, B: Montajes totales de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (E6,5+24hiv) en ausencia (**A,** CONTROL) o presencia (**B**, SURAMINA) de suramina 100 µM. Los explantes han sido inmunomarcados con QH1 para mostrar la entrada de células microgliales QH1-positivas (verde) en la retina. En el explante tratado con suramina, las células microgliales apenas han entrado en la retina, en contraste con lo observado en el explante control, en el que se aprecia mayor cantidad de células microgliales dentro de la retina. BP: base del pecten. Barra de escala: 100 µm. **C:** Número total de células microgliales localizadas dentro de la retina en ERECs de E6,5+24hiv tratados con suramina 100 µM (barra roja) y en sus controles no tratados (barra azul).

Los datos se expresan como valores medios (± error estándar) del número de células microgliales obtenidos a partir de los recuentps efectuados en 15 explantes de cada tipo. El número de células microgliales en los explantes tratados con suramina es significativamente menor que en los explantes control (*P<0,05, test t de Student).

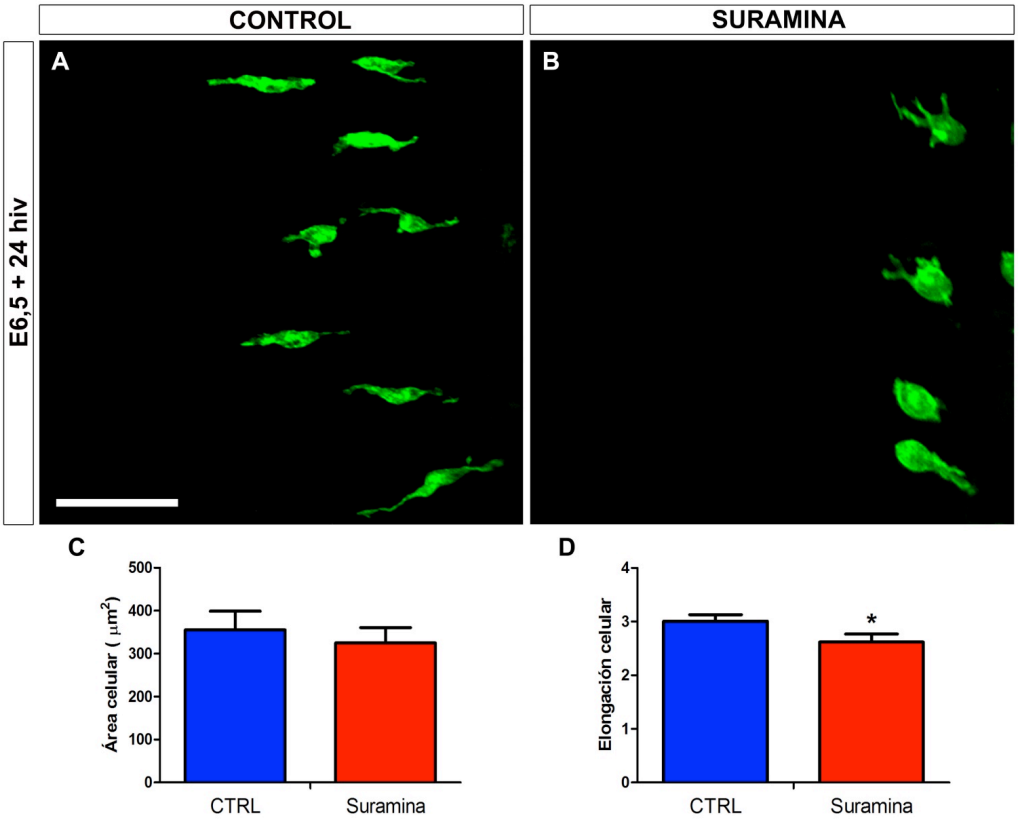

Fig. 40. El tratamiento *in vitro* con suramina induce cambios morfológicos en las células microgliales de la retina embrionaria de codorniz. A, B: Células microgliales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A**, CONTROL) o presencia (**B**, SURAMINA) de suramina 100 µM. Las células microgliales han sido inmunomarcadas con QH1 (verde) y muestran una morfología más redondeada en el explante tratado con suramina que en su control, en el que la forma es más alargada y polarizada. Barra de escala: 100 µm. **C, D:** Área celular (**C**) e índice de elongación (**D**) de las células microgliales de explantes tratados con suramina 100 µM (barras rojas) y explantes control (barras azules). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los valores medidos en las células microgliales contenidas en tres campos microscópicos de 500x500 µm de 15 explantes de cada tipo. El índice de elongación de las células microgliales de los explantes tratados con suramina es significativamente menor que en sus controles (*P<0,05, test t-Student).

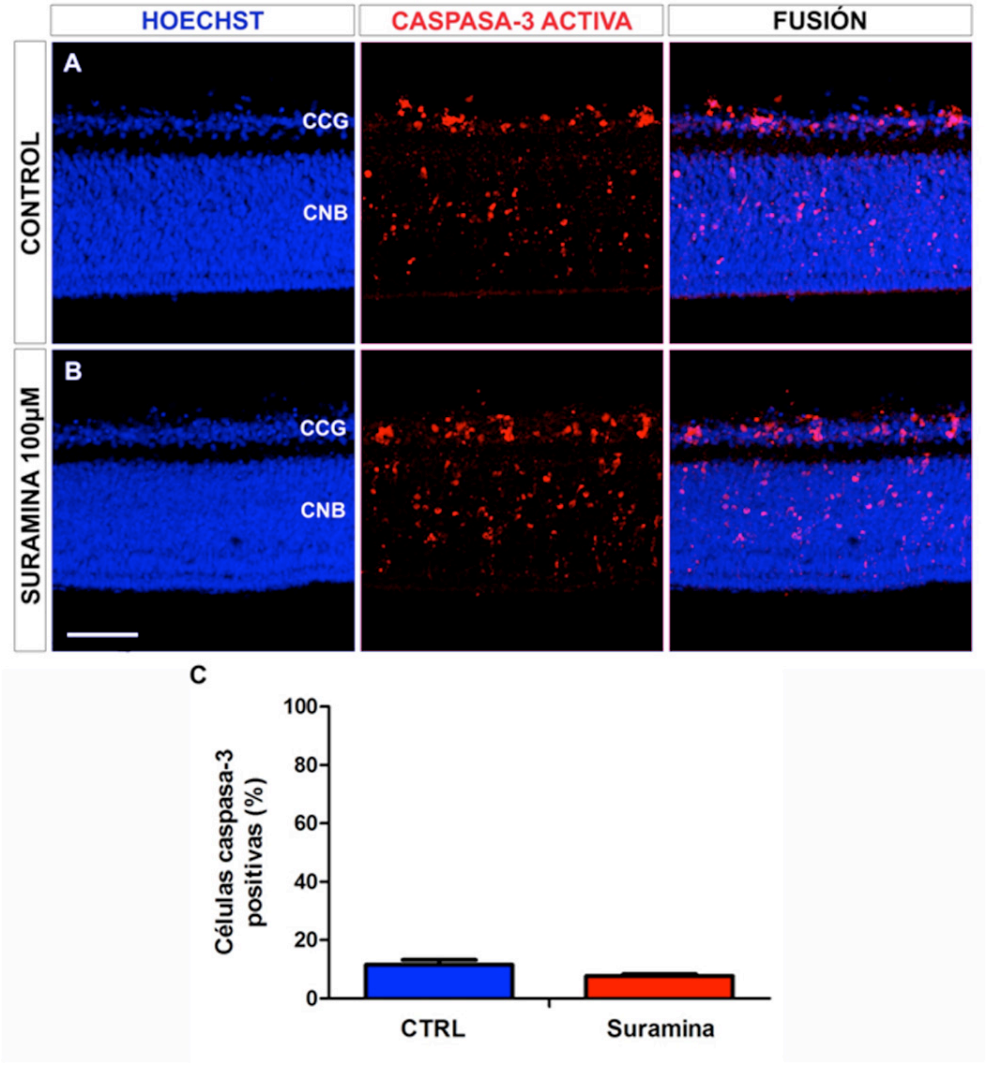

Fig. 41. El tratamiento *in vitro* con suramina no altera la expresión de la proteína caspasa-3 activa en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con suramina (**B**, SURAMINA 100 µM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo policlonal anti-caspasa-3 activa (rojo) y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), rojo (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de expresión de caspasa-3 activa en el explante tratado con suramina (**B**) no difiere del observado en su control no tratado (**A**). En ambos casos, el inmunomarcaje se localiza mayoritariamente en la capa de células ganglionares (CCG) y en todo el espesor de la capa neuroblástica (CNB). Barra de escala: 50 µm. **C:** Porcentaje de células caspasa-3 positivas (determinado mediante citometría de flujo) en explantes tratados con suramina (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los porcentajes de células caspasa-3-positivas obtenidos en 9 explantes de cada tipo. No hay diferencias significativas en la expresión de caspasa-3 entre los explantes tratados con suramina y sus controles ($P<0,05$, test t de Student).

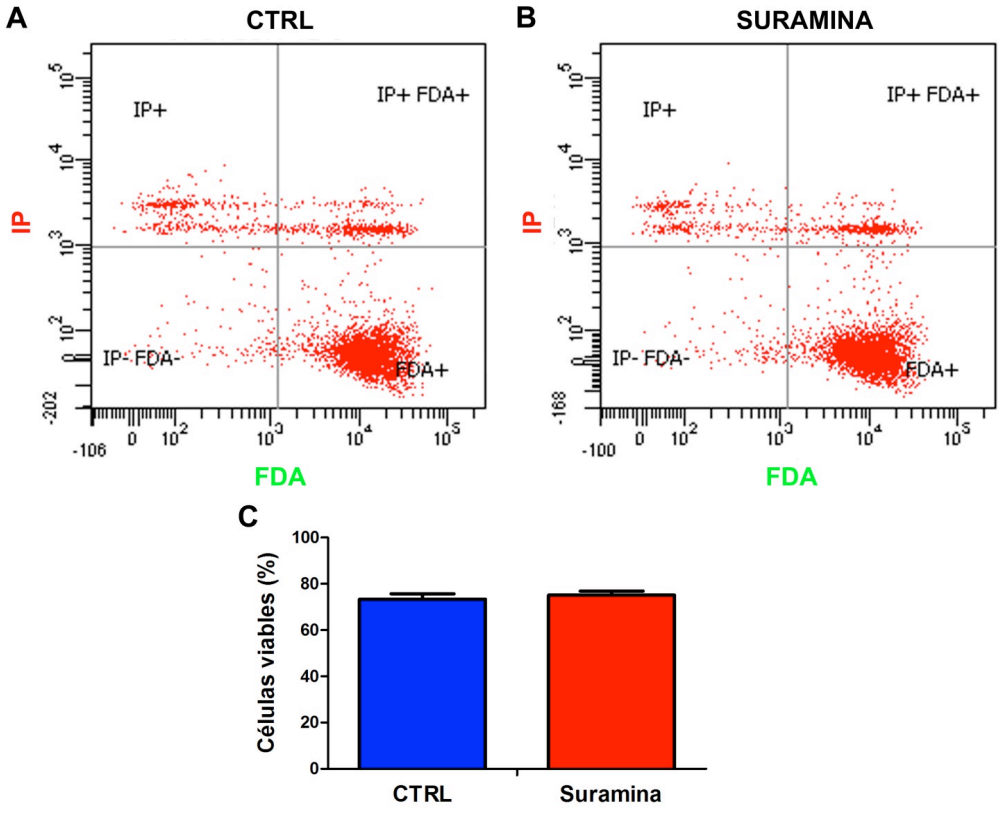

Fig. 42. El tratamiento *in vitro* con suramina no produce cambios en la viabilidad celular de los explantes de retina embrionaria de codorniz. A, B: Gráficas de puntos representativas del análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A,** CTRL) o presencia (**B**, SURAMINA) de suramina, que han sido tratadas con diacetato de fluoresceína (FDA), como indicador de viabilidad celular, y yoduro de propidio (IP), como indicador de células muertas. Nótese que tanto la nube de puntos de células viables (FDA-positivas), representada en el cuadrante inferior derecho de cada gráfica, como la de células muertas (IP-positivas), representada en el cuadrante superior izquierdo, son similares en los ERECs tratados con suramina y los controles no tratados. **C:** Porcentaje de células viables en explantes tratados con suramina (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). 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 representan como medias (± error standard) de los porcentajes de células FDA-positivas obtenidos tras el análisis de 9 explantes de cada tipo. No existen diferencias significativas en la viabilidad celular entre los explantes tratados con suramina y los explantes control ($P<0,05$, test t de Student).

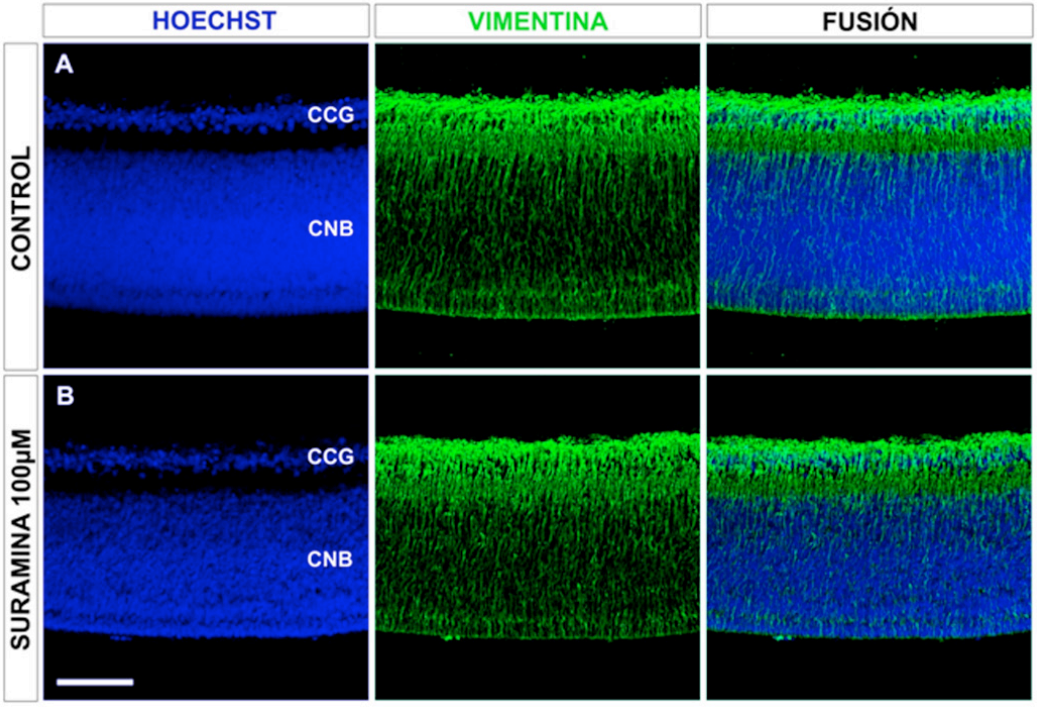

Fig. 43. El tratamiento *in vitro* con suramina no altera el patrón de expresión de la vimentina en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con suramina (**B**, SURAMINA 100 µM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal H5, que revela el citoesqueleto de vimentina de las células de Müller (verde), y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), verde (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). No se observan diferencias en la estructura de las células de Müller vimentina-positivas entre el explante tratado con suramina (**B**) y su control (**A**). En ambos casos, el marcaje más intenso se concentra en la capa de células ganglionares (CCG) y es más tenue en la capa neuroblástica (CNB). Barra de escala: 50 µm.

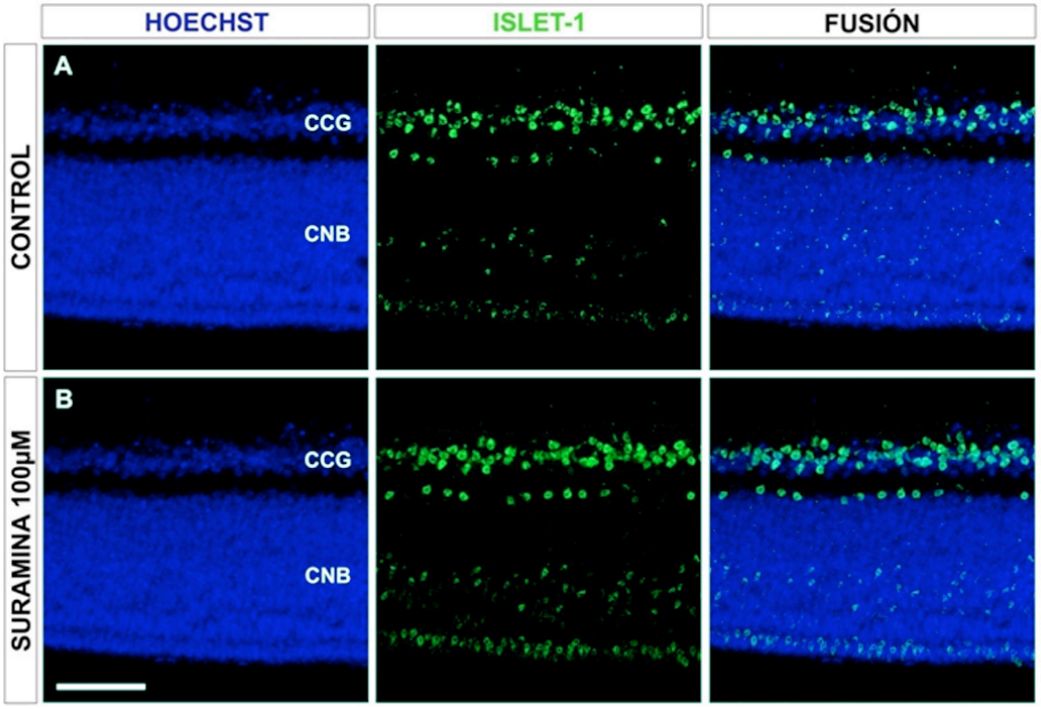

Fig. 44. El tratamiento con suramina no altera el patrón de distribución de las células Islet-1-positivas en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con suramina (**B**, SURAMINA 100 µM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal 39.4D5, que reconoce los núcleos de las células que expresan el factor de transcripción Islet-1 (verde), y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), verde (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de distribución de las células Islet-1-positivas en el explante tratado con suramina (**B**) es similar al observado en su control no tratado (**A**). En ambos casos, las subpoblaciones de células Islet-1-positivas se distribuyen en la capa de células ganglionares (CCG), en el límite de la capa neuroblástica (CNB) con la capa plexiforme interna y en la mitad escleral de la CNB. Barra de escala: 50 µm.

La adición exógena de ATP o UDP induce un aumento del número de células microgliales que entran en la retina

Una vez establecida la contribución de la señalización purinérgica en el comienzo del proceso de colonización de la retina de codorniz por las células microgliales, investigamos el papel de diferentes nucleótidos extracelulares en esta señalización. Elegimos para este estudio el ATP y el UDP, los cuales han sido previamente identificados como señales liberadas por neuronas dañadas que atraen a las células microgliales (Haynes et al., 2006; Honda et al., 2001; Koizumi et al., 2007; Kurpius et al., 2007; Neher et al., 2014). En estos experimentos, los explantes de retina de E6,5 eran tratados durante 24 hiv con cada uno de los nucleótidos.

La adición exógena de ATP a una concentración de 1 mM sobre ERECs de E6,5+24hiv causaba un incremento significativo en el número de células microgliales que entraban en la retina (Fig. 45). Sin embargo, este nucleótido no tenía efecto aparente a menores concentraciones (10 y 100 μM). El hecho de que el ATP solo ejerciera un efecto inductor de la migración de la microglía a la concentración más elevada sugería que dicho nucleótido podría estar siendo hidrolizado a AMP o adenosina por la acción de ectonucleotidasas, tales como E-NTPDasa, nucleósido-difosfatasa (NDPasa) y 5'-NT, cuya expresión en células microgliales ha sido ampliamente demostrada en diferentes estudios, que apoyan un importante papel de las mismas en la atracción de la microglía inducida por ATP (Dalmau et al., 1998b; Färber et al., 2008; Kettenmann et al., 2011; Madry y Attwell, 2015). Para comprobar si las ectonucleotidasas podrían estar actuando en nuestro sistema *in vitro,* se trataron los ERECs de E6,5+24hiv con ATPγS, un análogo no hidrolizable del ATP, durante 24 hiv. Nuestros resultados demostraban que el ATPγS a una concentración de 100 μM inducía un incremento en la entrada de las células microgliales en la retina (Fig. 45), que era similar al observado en los experimentos con explantes tratados con ATP hidrolizable a una concentración de 1 mM, sugiriendo que, en efecto, una cierta cantidad de este ATP podía estar siendo hidrolizado a AMP o adenosina.

El aumento del número de células microgliales que se localizaban dentro de la retina tras el tratamiento con ATP podría ser debido a una acción del nucleótido sobre la migración microglial, que facilitaría su movimiento desde la CNO/BP hacia la retina, o bien a un efecto del ATP sobre la proliferación de la microglía que ya había accedido al interior de la retina. Con el fin de evaluar esta segunda posibilidad, los ERECs de E6,5+24hiv tratados con ATP 1 mM y sus respectivos controles fueron incubados con BrdU durante las 12 últimas horas de cultivo. La elección de este tiempo de tratamiento de los explantes con BrdU se hizo teniendo en cuenta que las células microgliales comienzan a entrar en la retina *in situ* a partir de E7, edad embrionaria que tenían los ERECs de E6,5 tras las primeras 12 hiv. Así, la BrdU añadida al medio de cultivo durante las siguientes 12 hiv podría actuar sobre células microgliales que ya estaban dentro de la retina. El tratamiento de los ERECs con BrdU revelaba que el porcentaje de células microgliales BrdU-positivas no mostraba diferencias significativas entre los explantes tratados con ATP y sus controles no tratados (Fig. 46), demostrando que el ATP exógeno no afectaba a la actividad proliferativa de las células microgliales. Por otra parte, tanto el ATP 1 mM como el ATPγS 100 μM inducían un aumento significativo de la elongación de las células microgliales que migraban dentro de la retina (Figs. 47 y 48), apoyando la primera posibilidad señalada con anterioridad, es decir que el ATP exógeno extracelular ejercía un efecto estimulante de la migración de la microglía que favorecía la entrada de la misma en el interior de la retina.

Los efectos del ATP exógeno sobre las células microgliales no eran debidos a un efecto indirecto sobre otros tipos celulares de la retina, ya que el tratamiento de los ERECs con el nucleótido no modificaba los diferentes aspectos morfofuncionales de la retina también analizados en las experiencias de tratamiento con apirasa o con suramina, descritos en el apartado anterior. Así, el patrón de expresión de caspasa-3 activa y la cuantificación de células caspasa-3-positivas mediante citometría de flujo eran similares en los explantes tratados con ATP 1 mM y en sus controles (Fig. 49). Tampoco se observaban cambios en el

porcentaje de células viables de la retina (Fig. 50) ni en los patrones de distribución de vimentina (Fig. 51) o del factor de transcripción islet-1 (Fig. 52).

De forma similar a lo descrito en los explantes tratados con ATP, el tratamiento de los ERECs de E6,5 con UDP exógeno durante 24 hiv producía un incremento del número de células microgliales que entraban en la retina (Fig. 53), el cual era poco acusado tras el tratamiento con UDP a una concentración de 100 μM, pero alcanzaba significación estadística cuando la concentración de UDP era de 1 mM (Fig. 53D). Igual que lo anteriormente descrito en las experiencias de tratamiento de ERECs con ATP, el tratamiento con UDP 1 mM no afectaba de manera significativa a la proliferación de las células microgliales localizadas dentro de la retina (Fig. 54), pero sí producía un aumento significativo en la elongación de las mismas (Fig. 55). La similitud de los efectos provocados por los tratamientos con ATP y UDP sobre la entrada y elongación de células microgliales sugerían que ambos nucleótidos podrían actuar sobre los mismos receptores, probablemente receptores P2Y metabotrópicos, ya que éstos son los receptores purinérgicos a los que se unen tanto el ATP como el UDP.

Por último, igual que ocurría con el ATP, la adición de UDP exógeno en los ERECs de E6,5+24hiv no modificaba el patrón de expresión de la caspasa-3 activa ni el porcentaje de células caspasa-3-positivas medidas por citometría de flujo (Fig. 56). Tampoco alteraba la viabilidad celular de la retina (Fig. 57) ni los patrones de distribución de la vimentina (Fig. 58) o del factor de transcripción islet-1 (Fig. 59), apoyando así que el efecto del UDP sobre la microglía no era indirecto a través de una acción sobre otros componentes de la retina.

En conjunto, todos los resultados anteriormente descritos demostraban que tanto el ATP como el UDP extracelulares potenciaban el movimiento de las células microgliales sin afectar a su tasa de proliferación, favoreciendo así su paso desde la CNO/BP hacia la retina embrionaria de codorniz y su migración dentro de la misma.

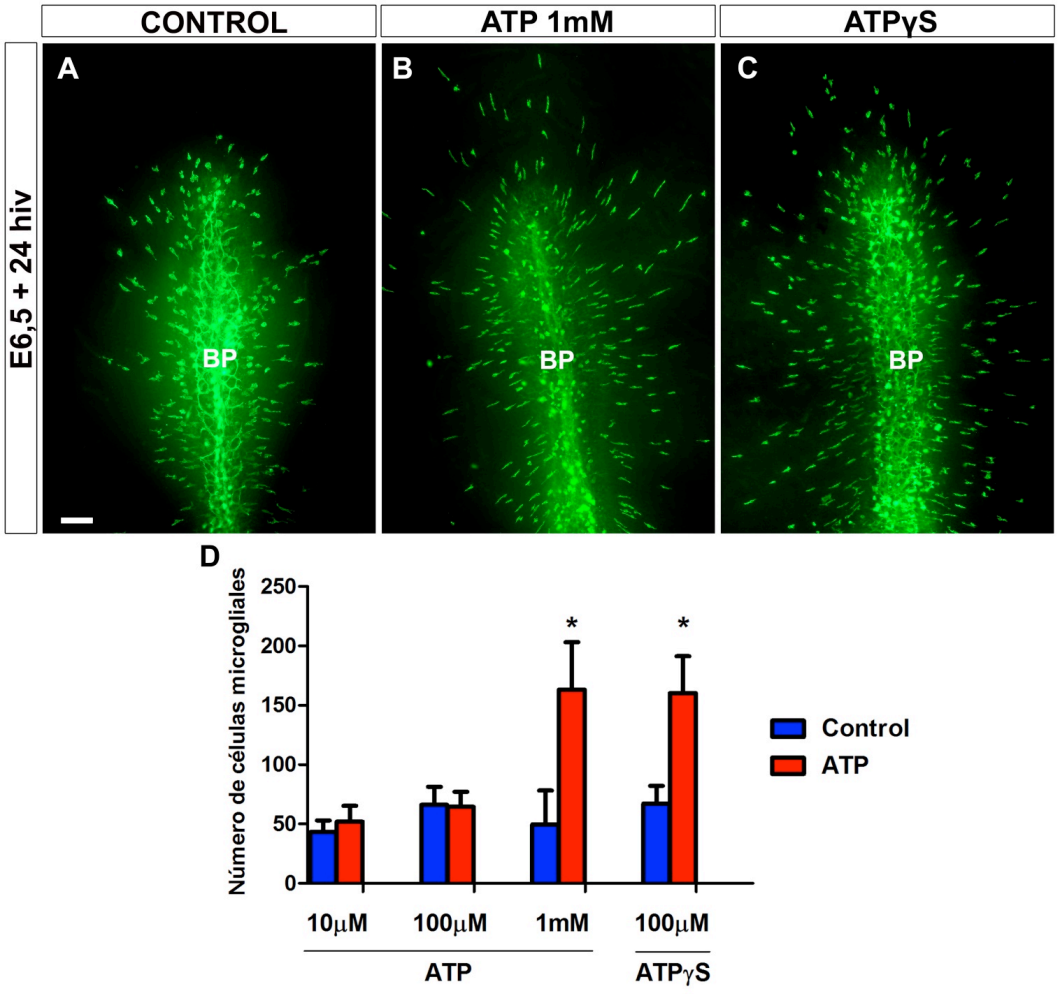

Fig. 45. El tratamiento *in vitro* con ATP o ATP no hidrolizable (ATPγS) estimula la entrada de células microgliales en la retina embrionaria de codorniz. A-C: Montajes totales de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (E6,5+24hiv) sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tratados con ATP 1 mM (**B**) o ATPγS 100 μM (**C**). Los explantes han sido inmunomarcados con QH1 para observar la entrada de células microgliales QH1-positivas (verde) en la retina. Los explantes tratados con ATP (**B**) o con ATPγS (**C**) parecen mostrar mayor cantidad de células microgliales dentro de la retina que el explante control (**A**). BP: base del pecten. Barra de escala: 100 μm. **D:** Número total de células microgliales localizadas dentro de la retina en ERECs de E6,5+24hiv tratados con diferentes concentraciones de ATP (10 μM, 100 μM y 1 mM) y con ATPγS 100 μM (barras rojas) y en sus respectivos controles no tratados (barras azules). Los datos se expresan como valores medios (± error estándar) del número de células microgliales obtenidos a partir de los recuentos efectuados en al menos 10 explantes de cada tipo. Dicho número no es significativamente diferente en los explantes tratados con las concentraciones más bajas de ATP (10 μM y 100 μM) con respecto a sus controles. Sin embargo, el tratamiento con ATP 1 mM o ATPγS 100 μM sí aumenta de forma significativa el número de células microgliales (*P<0,05, test t de Student).

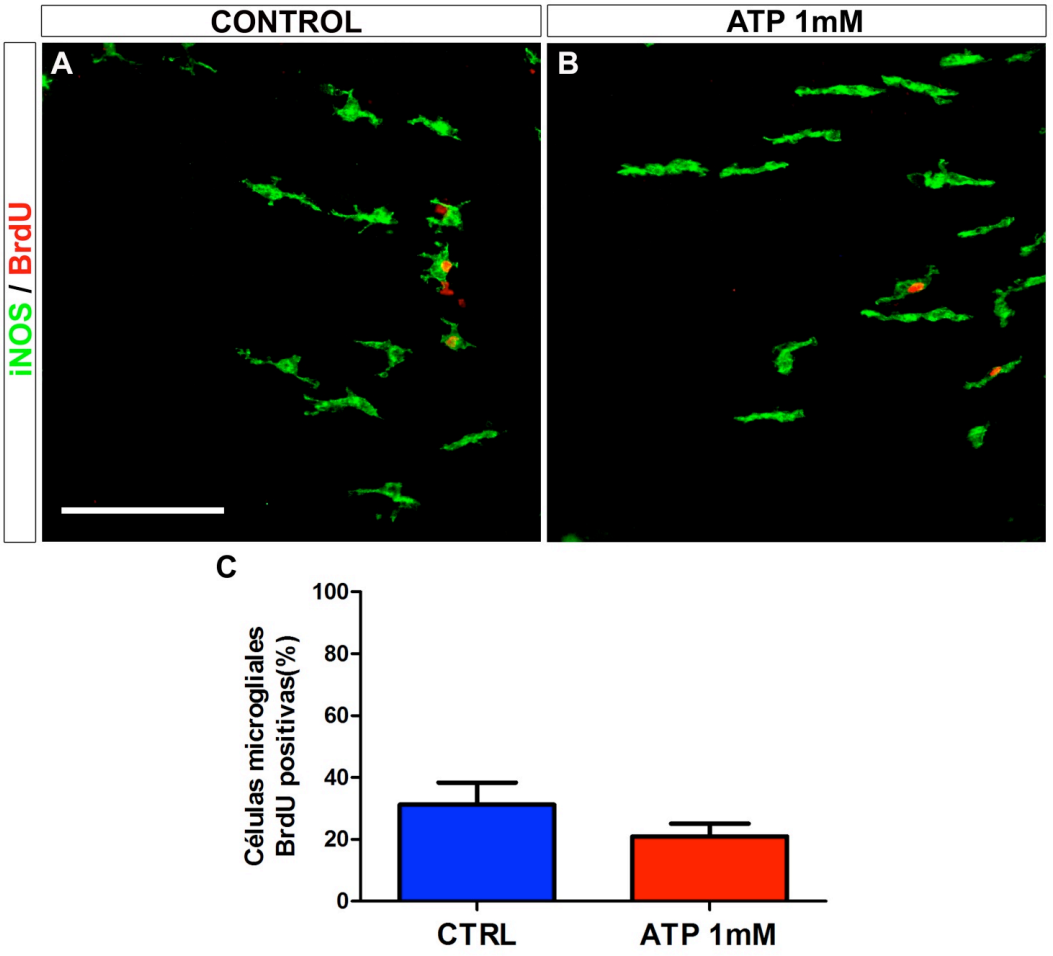

Fig. 46. El tratamiento *in vitro* con ATP 1 mM no altera la actividad proliferativa de las células microgliales de la retina embrionaria de codorniz. A, B: Células microgliales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 cultivados durante 24 hiv en ausencia (**A**) o presencia de ATP 1 mM (**B**), ambos incubados durante las últimas 12 hiv con BrdU, un nucleótido sintético que se incorpora al ADN nuclear durante la fase S del ciclo celular. Las células microgliales han sido inmunomarcadas con anti-iNOS (verde) y anti-BrdU (rojo). La presencia de células microgliales marcadas con BrdU en los explantes tratados con ATP 1 mM (**B**) es aparentemente similar a la observada en los explantes control (**A**). Barra de escala: 100 µm. **C:** Porcentaje de células microgliales BrdU-positivas en explantes tratados con ATP 1 mM (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los porcentajes de células microgliales que son BrdU-positivas, obtenidas a partir de los recuentos efectuados en 8 explantes de cada tipo. No hay diferencias significativas entre los explantes tratados con ATP 1 mM y los explantes control ($P<0,05$, test t de Student), demostrando que el tratamiento con ATP no altera la actividad proliferativa de la microglía.

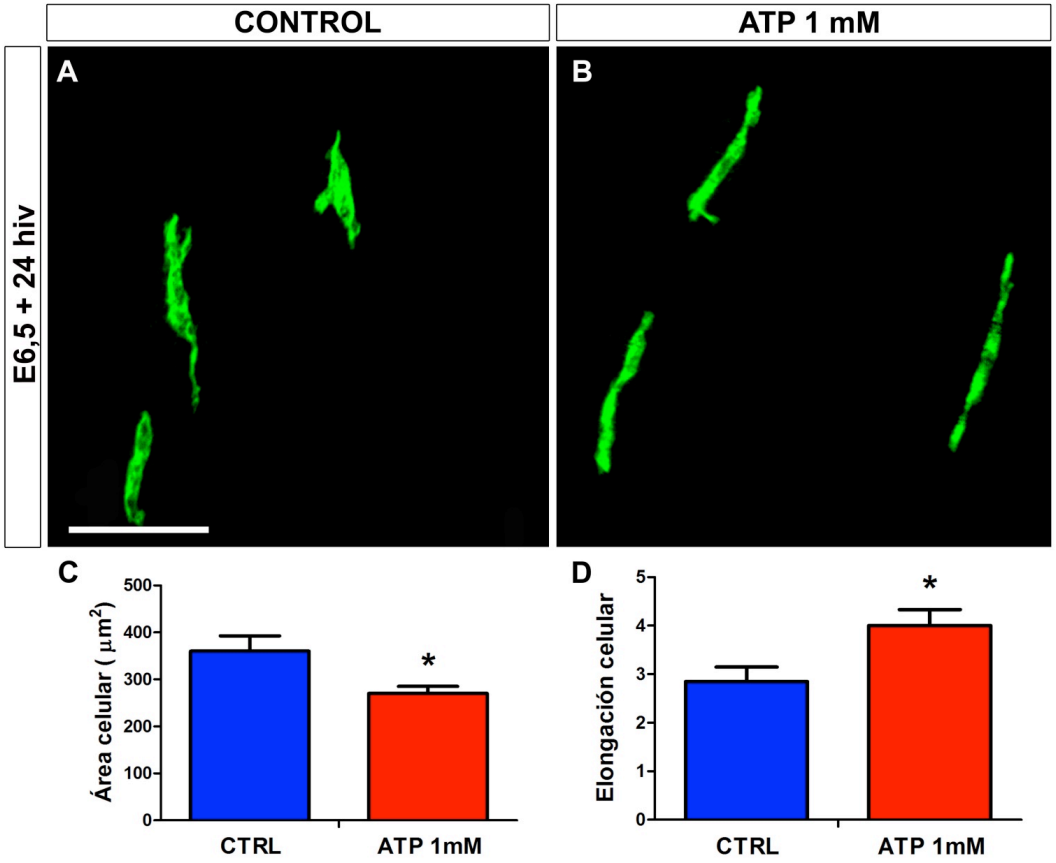

Fig. 47. El tratamiento *in vitro* con ATP 1 mM induce cambios morfológicos en las células microgliales de la retina embrionaria de codorniz. **A, B:** Células microgliales QH1-positivas de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A**, CONTROL) o presencia de ATP 1 mM (**B**). Las células microgliales han sido inmunomarcadas con QH1 (verde) y muestran una morfología más alargada y polarizada (propia de un estado migratorio muy activo) en los explantes tratados con ATP (**B**) que en los explantes control (**A**). Barra de escala: 50 μm. **C, D:** Área celular (**C**) e índice de elongación (**D**) de las células microgliales de explantes tratados con ATP (barras rojas) y sus explantes control (barras azules). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los valores medidos en las células microgliales contenidas en tres campos microscópicos de 500x500 μm de 10 explantes de cada tipo. El área celular es significativamente menor en los explantes tratados con ATP 1 mM que en los explantes control. Por el contrario, el índice de elongación es significativamente más elevado en los explantes tratados con ATP que en sus controles (*P< 0,05, test t-Student).

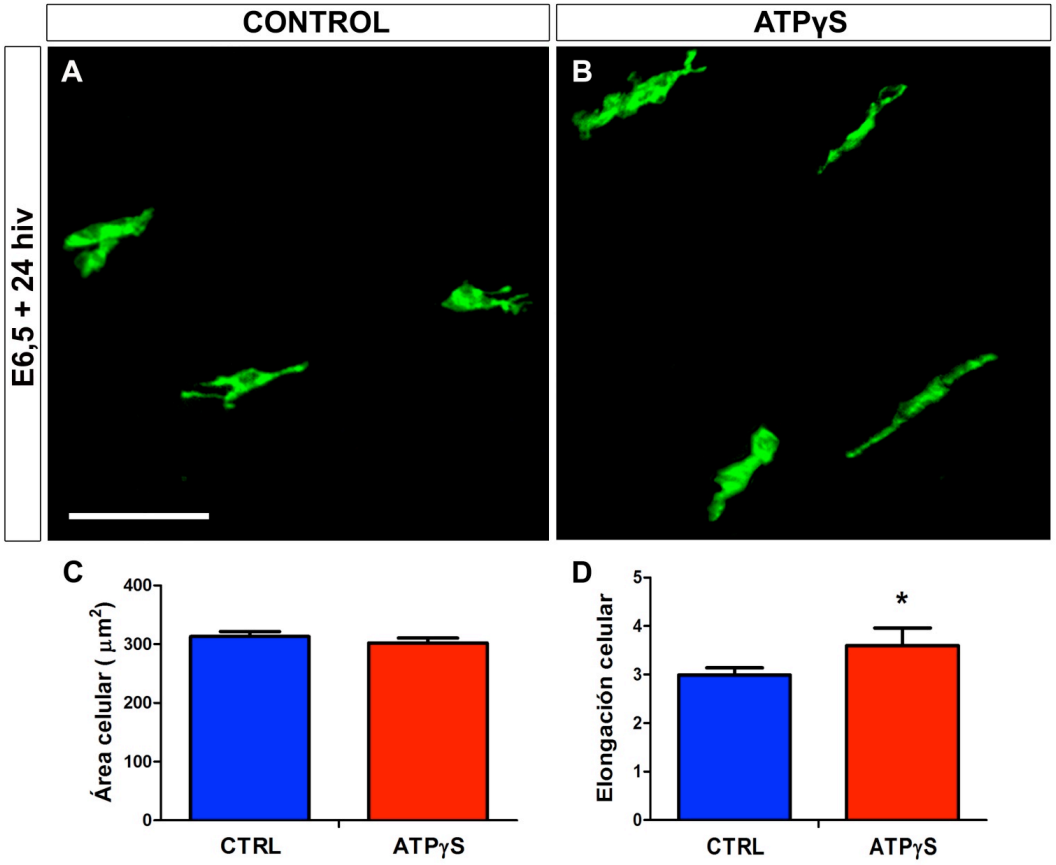

Fig. 48. El tratamiento *in vitro* con ATPγS 100 µM induce cambios morfológicos en las células microgliales de la retina embrionaria de codorniz. **A, B:** Células microgliales QH1-positivas de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A**) o presencia de ATPγS 100 µ M (**B**). Las células microgliales han sido inmunomarcadas con QH1 (verde) y muestran una morfología más alargada y polarizada en los explantes tratados con ATPγS (**B**) que en los explantes control (**A**). Barra de escala: 50 µm. **C, D:** Área celular (**C**) e índice de elongación (**D**) de las células microgliales de explantes tratados con ATPγS (barras rojas) y de sus controles no tratados (barras azules). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los valores medidos en las células microgliales contenidas en tres campos microscópicos de 500x500 µm de 10 explantes de cada tipo**.** El índice de elongación de las células microgliales de los explantes tratados con ATPγS es significativamente mayor que en sus controles (*P< 0,05, test t-Student).

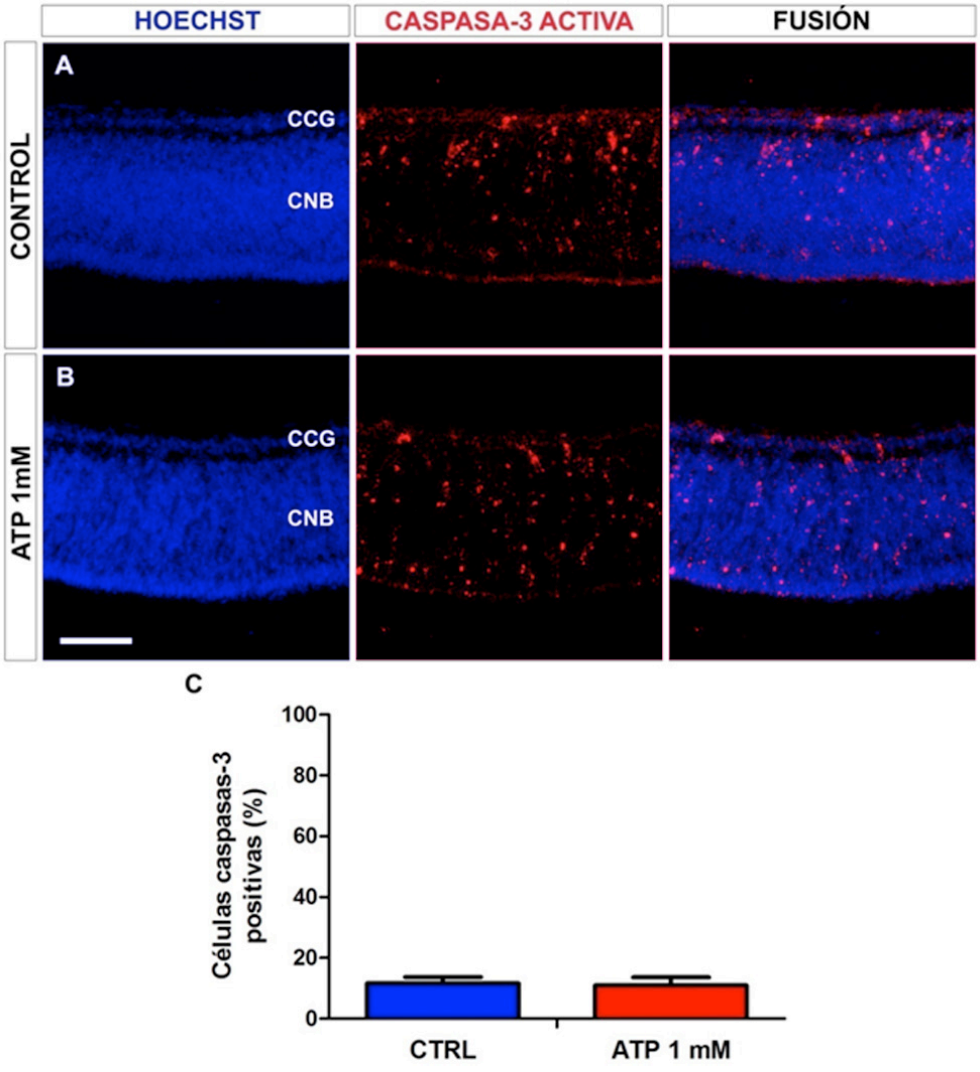

Fig. 49. El tratamiento *in vitro* con ATP no altera la expresión de la enzima caspasa-3 activa en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con ATP (**B**, ATP 1 mM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 activa (rojo) y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), rojo (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de expresión de caspasa-3 activa en el explante tratado con ATP (**B**) no difiere del observado en su control no tratado (**A**). En ambos casos, el immunomarcaje se localiza en la capa de células ganglionares (CCG) y en todo el espesor de la capa neuroblástica (CNB). Barra de escala: 50 µm. **C:** Porcentaje de células caspasa-3-positivas (determinado mediante citometría de flujo) en explantes tratados con ATP 1 mM (barra roja) y en sus controles no tratados (barra azul). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los porcentajes de células caspasa-3-positivas obtenidos en 9 explantes de cada tipo. No existen diferencias significativas entre los explantes tratados con ATP 1 mM y los explantes control ($P<0,05$, test t de Student).

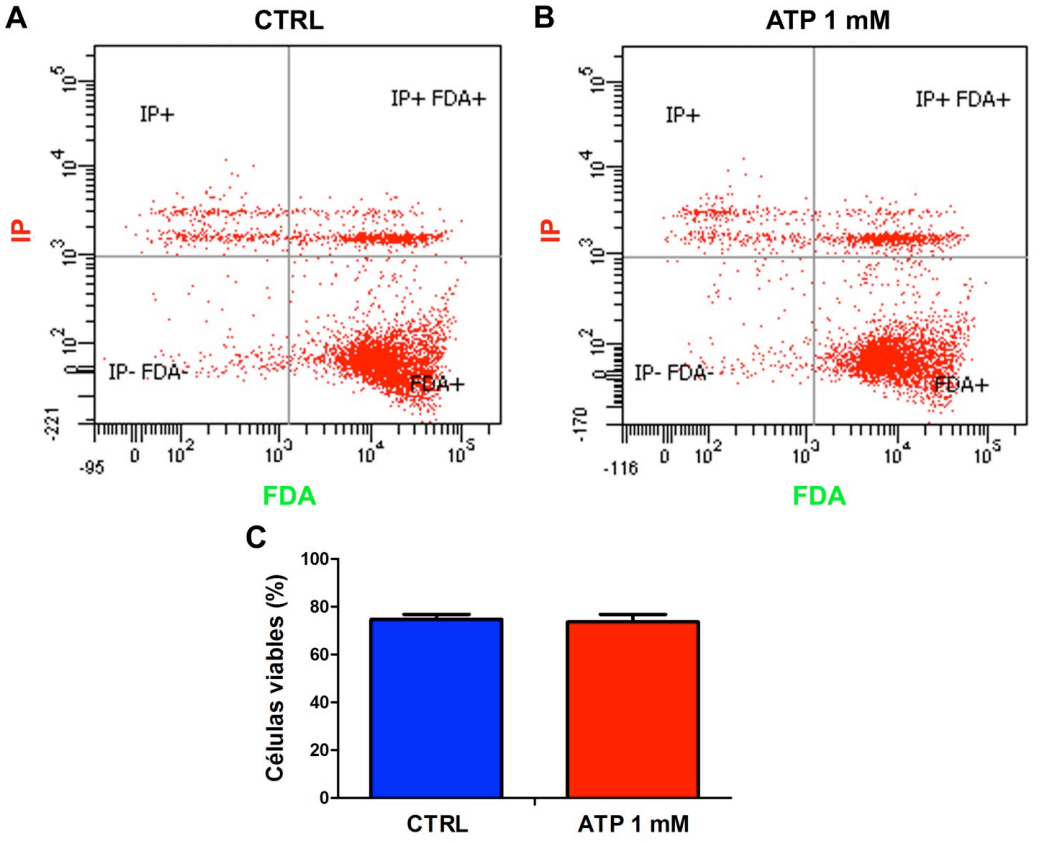

Fig. 50. El tratamiento *in vitro* con ATP no produce cambios en la viabilidad celular de los explantes de retina embrionaria de codorniz. A, B: Gráficas de puntos representativas del análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A,** CTRL) o presencia (**B**, ATP 1 mM) de ATP, que han sido tratadas con diacetato de fluoresceína (FDA), como indicador de viabilidad celular, y yoduro de propidio (IP), como indicador de células muertas. La nube de puntos de células viables (FDA-positivas), representada en el cuadrante inferior derecho de cada gráfica, y la de células muertas (IP-positivas), representada en el cuadrante superior izquierdo, son similares en los ERECs tratados con ATP y en los controles no tratados. **C:** Porcentaje de células viables en explantes tratados con ATP 1 mM (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). 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 representan como medias (±error standard) de los porcentajes de células FDA-positivas obtenidos tras el análisis de 9 explantes de cada tipo. No existen diferencias significativas de viabilidad celular entre los explantes tratados con ATP 1 mM y los explantes control ($P<0,05$, test t de Student).

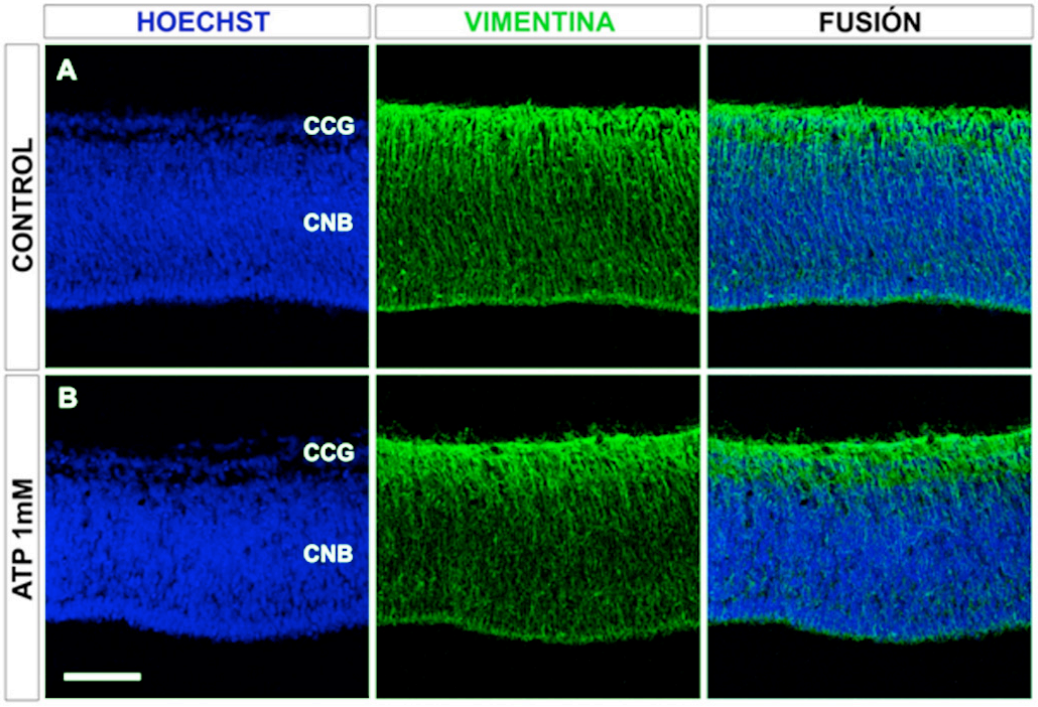

Fig. 51. El tratamiento *in vitro* con ATP no altera el patrón de expresión de la vimentina en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con ATP 1 mM (**B**, ATP 1 mM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal H5, que revela el citoesqueleto de vimentina de las células de Müller (verde), y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), verde (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de distribución de la vimentina en las células de Müller no muestra diferencias entre el explante tratado con ATP (**B**) y su control (**A**). En ambos casos, el marcaje más intenso se concentra en la capa de células ganglionares (CCG), haciéndose más tenue en la capa neuroblástica (CNB). Barra de escala: 50 µm.

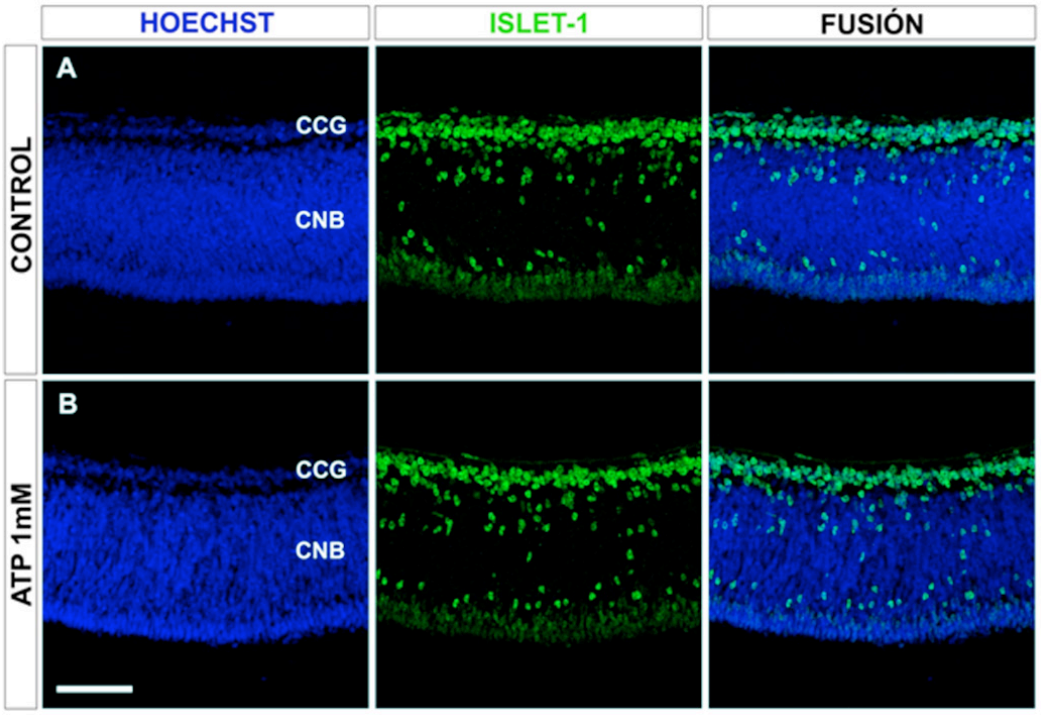

Fig. 52. El tratamiento *in vitro* con ATP no altera el patrón de distribución de las células Islet-1-positivas en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con ATP (**B**, ATP 1 mM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal 39.4D5, que reconoce los núcleos de las células que expresan el factor de transcripción Islet-1 (verde), y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), verde (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de distribución de las células Islet-1-positivas en el explante tratado con ATP (**B**) es similar al observado en su control no tratado (**A**). En ambos casos, las subpoblaciones de células Islet-1-positivas se distribuyen en la capa de células ganglionares (CCG), en el límite superior de la capa neuroblástica (CNB) y en la mitad escleral de la CNB. Barra de escala: 50 µm.

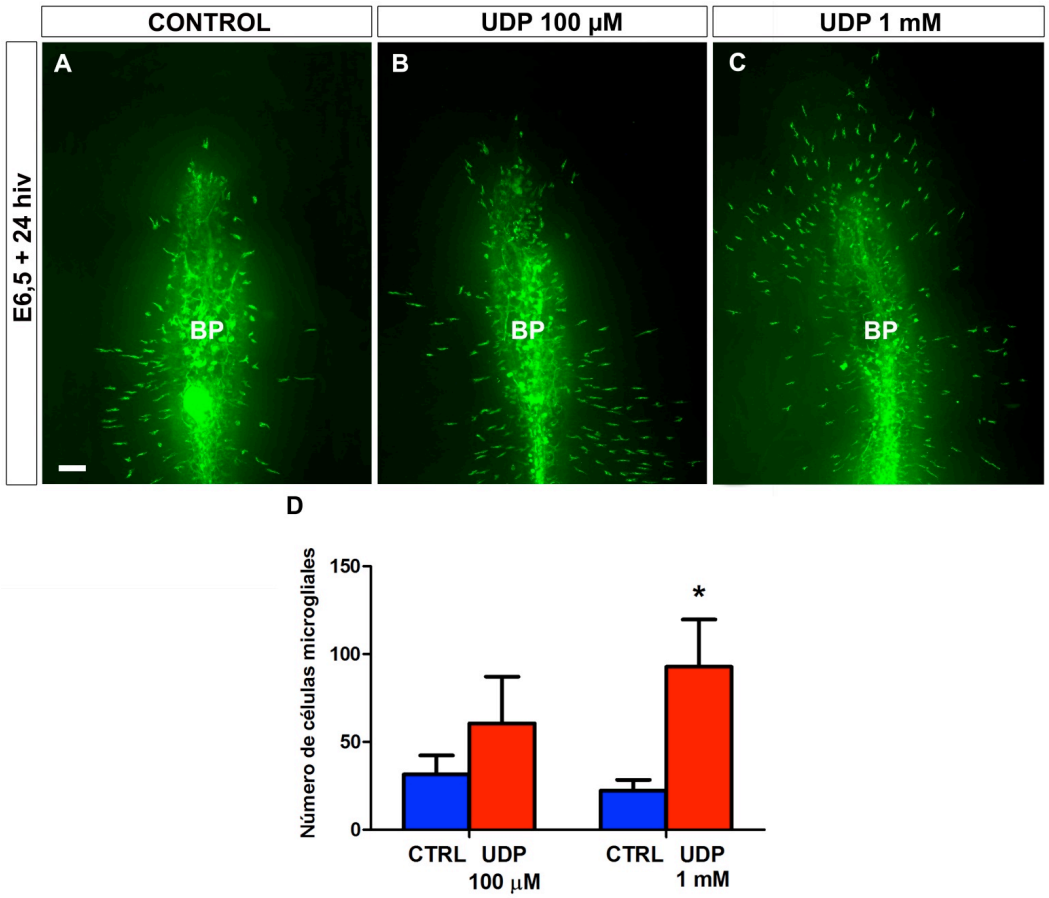

Fig. 53. El tratamiento *in vitro* con UDP estimula la entrada de células microgliales en la retina embrionaria de codorniz. A-C: Montajes totales de explantes de retina embrionaria de codorniz (ERECs) de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* (E6,5+24hiv) inmunomarcados con QH1. Se muestran células microgliales QH1-positivas (verde) dentro de la retina en un explante control sin tratamiento (**A**) y en dos explantes tratados con dos concentraciones diferentes de UDP (100 µM en **B** y 1 mM en **C**). La presencia de células microgliales es aparentemente mayor en los explantes tratados con ambas concentraciones de UDP (**B** y **C**) que en el explante control (**A**). BP: base del pecten. Barra de escala: 100 µm. **D:** Número total de células microgliales localizadas dentro de la retina en ERECs de E6,5+24hiv tratados con UDP 100 µM y 1 mM (barras rojas) y en sus respectivos controles no tratados (barras azules). Los datos se expresan como medias (± error estándar) del número de células microgliales obtenidas a partir de los recuentos efectuados en 10 explantes de cada tipo. No hay diferencias significativas entre los explantes tratados con UDP 100 µM y sus controles. Sin embargo, el tratamiento con UDP 1 mM aumenta de forma significativa el número de células microgliales que colonizan la retina (*P<0,05, test t de Student).

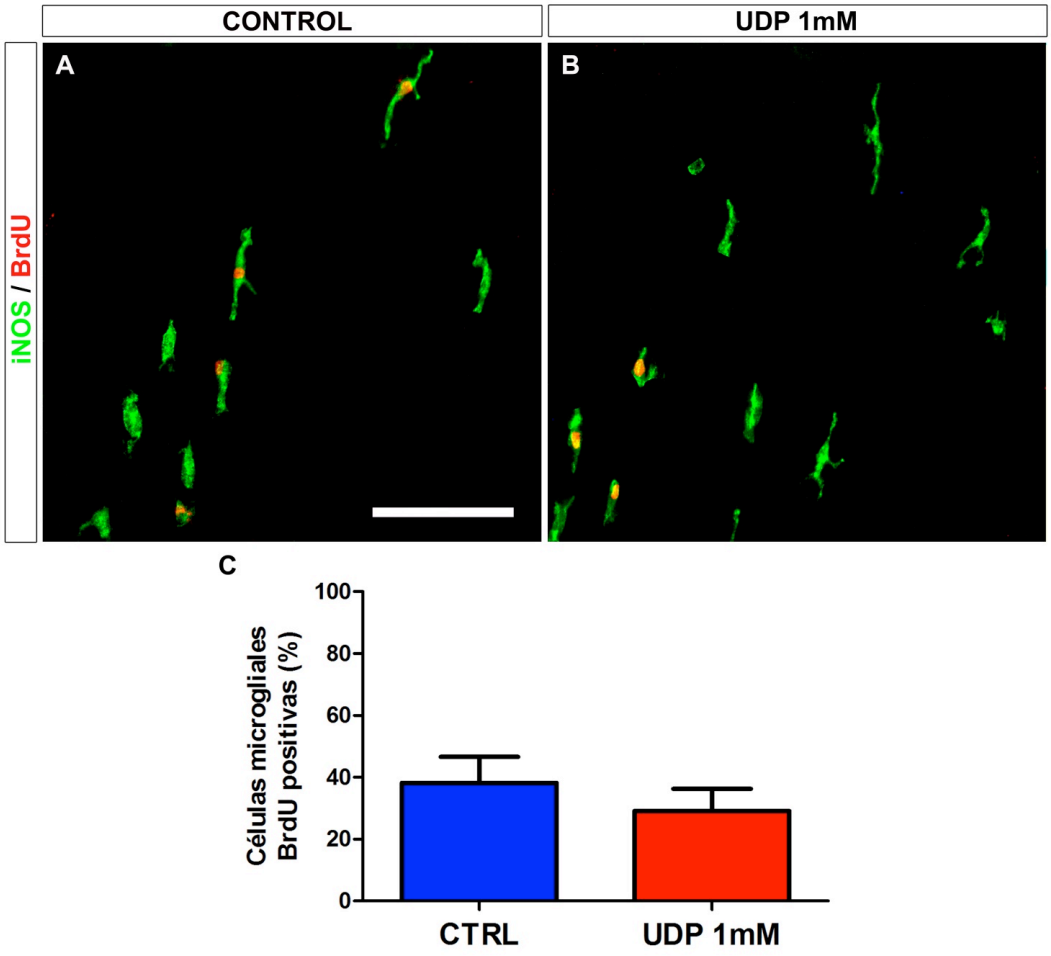

Fig. 54. El tratamiento *in vitro* con UDP 1 mM no altera la actividad proliferativa de las células microgliales de la retina embrionaria de codorniz. A, B: Células microgliales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 cultivados durante 24 hiv en ausencia (**A**) o presencia de UDP 1 mM (**B**), ambos cultivados durante las últimas 12 horas de cultivo con BrdU, un nucleótido sintético que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular. Las células microgliales han sido inmunomarcadas con anti-iNOS (verde) y anti-BrdU (rojo). La presencia de células microgliales marcadas con BrdU es aparentemente similar en los explantes tratados con UDP 1 mM (**B**) y en los explantes control (**A**). Barra de escala: 100 µm. **C:** Porcentaje de células microgliales BrdU-positivas en explantes tratados con UDP 1 mM (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los porcentajes de células microgliales que son BrdU-positivas, obtenidas a partir de los recuentos efectuados en 8 explantes de cada tipo. Dichos porcentajes no muestran diferencias significativas entre los explantes tratados con UDP 1 mM y sus controles ($P<0,05$, test t de Student), demostrando que el tratamiento con UDP no altera la actividad proliferativa de la microglía.

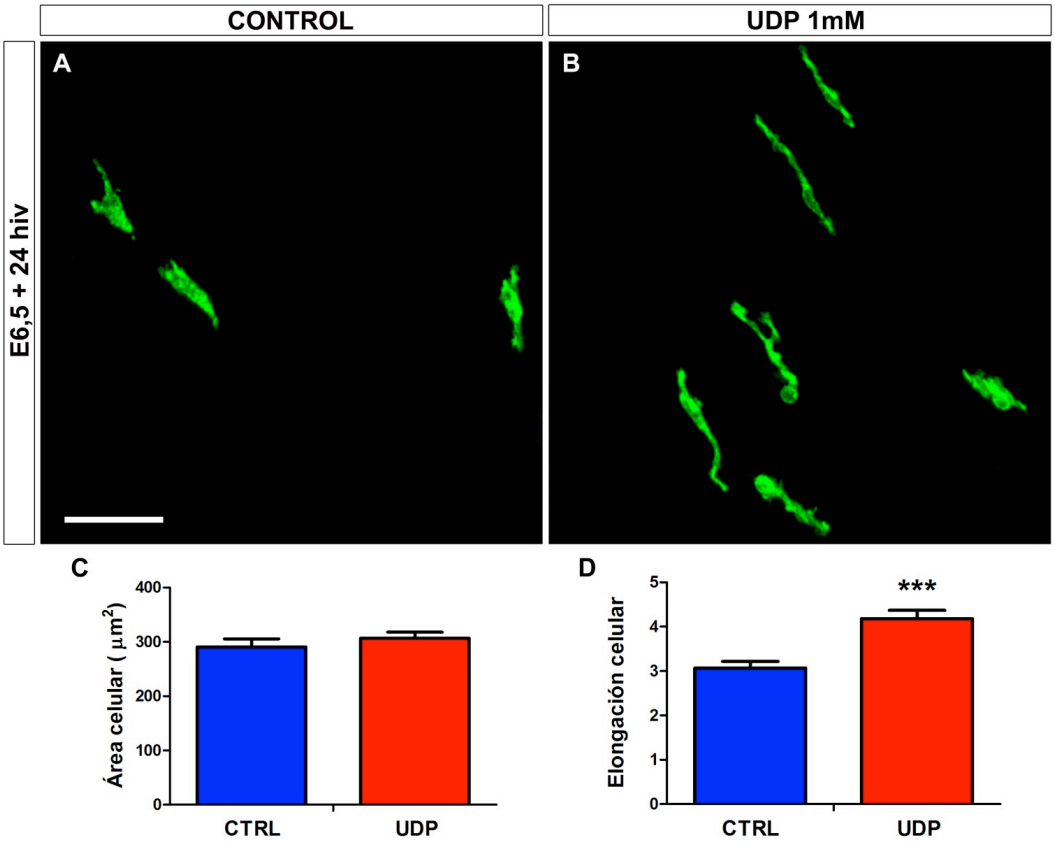

Fig. 55. El tratamiento *in vitro* con UDP induce cambios morfológicos en las células microgliales de la retina embrionaria de codorniz. **A, B:** Células microgliales QH1-positivas de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A**, CONTROL) o presencia (**B**, UDP) de UDP 1 mM. Las células microgliales han sido inmunomarcadas con QH1 (verde) y muestran una morfología más alargada y polarizada, propia de un estado migratorio muy activo, en el explante tratado con UDP (**B**) que en el explante control (**A**). Barra de escala: 50 µm. **C, D:** Área celular (**C**) e índice de elongación (**D**) de las células microgliales de explantes tratados con UDP 1 mM (barras rojas) y explantes control (barras azules). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los valores medidos en las células microgliales contenidas en tres campos microscópicos de 500x500 µm de 10 explantes de cada tipo. El índice de elongación de las células microgliales de los explantes tratados con UDP es significativamente mayor que el de sus controles (***P< 0,001, test t-Student).

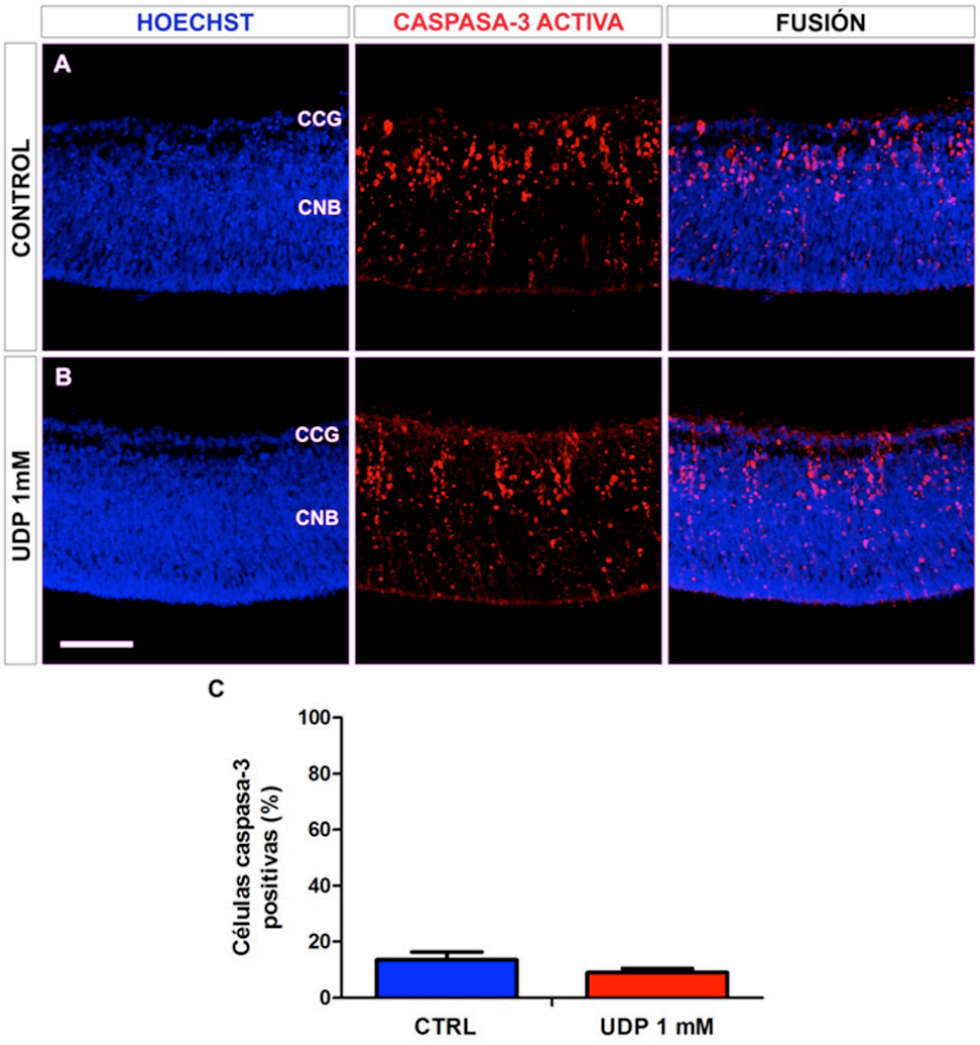

Fig. 56. El tratamiento *in vitro* con UDP no altera la expresión de la enzima caspasa-3 activa en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con UDP (**B**, UDP 1 mM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo policlonal anti-caspasa 3 activa (rojo) y se han teñido con Hoechst 33342, que pone de manifiesto las capas nucleares de la retina (azul). Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), rojo (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de expresión de caspasa-3 activa en el explante tratado con UDP (**B**) no difiere del observado en su control no tratado (**A**). En ambos casos, el inmunomarcaje se localiza en la capa de células ganglionares (CCG) y en todo el espesor de la capa neuroblástica (CNB). Barra de escala: 50 µm. **C:** Porcentaje de células caspasa-3 positivas (determinado mediante citometría de flujo) en explantes tratados con UDP 1 mM (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). Los datos se expresan como medias (± error estándar) de los porcentajes de células caspasa-3 positivas obtenidos en 9 explantes de cada tipo. No hay diferencias significativas de dichos porcentajes entre los explantes tratados con UDP 1 mM y los explantes control ($P<0,05$, test t de Student).

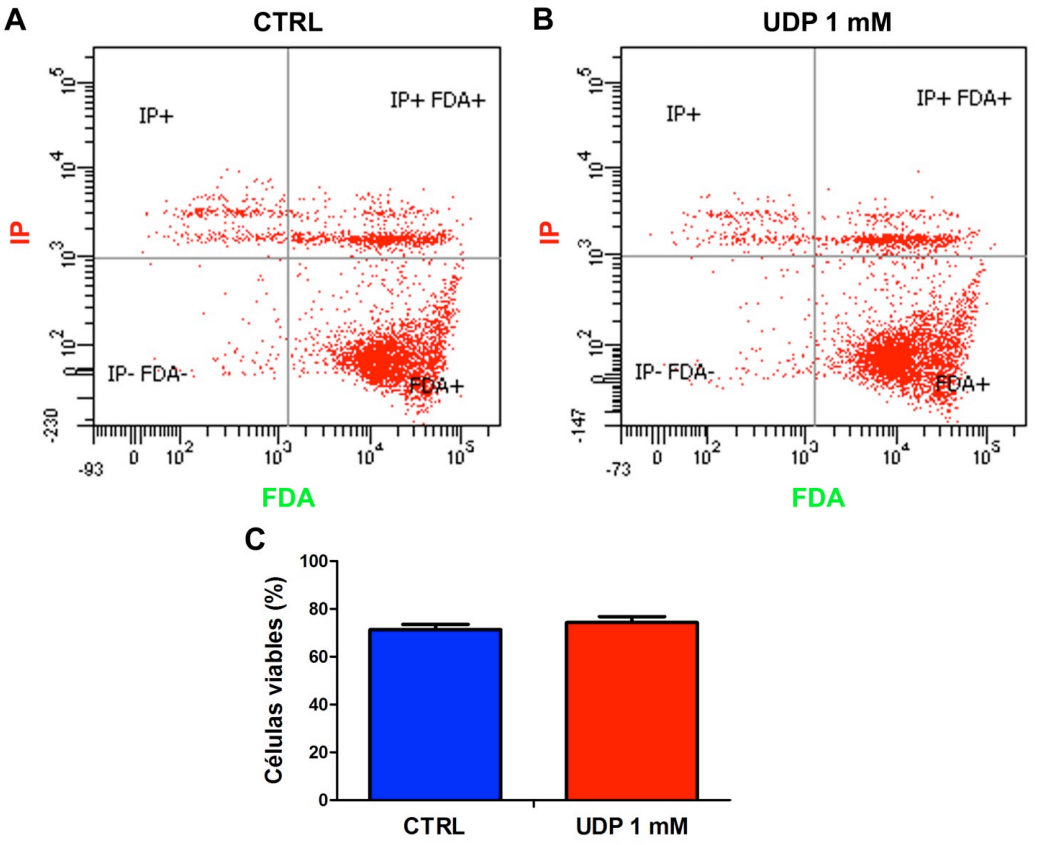

Fig. 57. El tratamiento *in vitro* con UDP no produce cambios en la viabilidad celular de los explantes de retina embrionaria de codorniz. A, B: Gráficas de puntos representativas del análisis mediante citometría de flujo de suspensiones celulares de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* en ausencia (**A,** CTRL) o presencia (**B**, UDP 1 mM) de UDP, que han sido tratadas con diacetato de fluoresceína (FDA), como indicador de viabilidad celular, y yoduro de propidio (IP), como indicador de células muertas. Nótese que tanto la cantidad de células viables (FDA-positivas), representadas en el cuadrante inferior derecho de cada gráfica, como de células muertas (IP-positivas), representadas en el cuadrante superior izquierdo, son similares en los ERECs tratados con UDP y en sus controles no tratados. **C:** Porcentajes de células viables en explantes tratados con UDP 1 mM (barra roja) y explantes control no tratados (barra azul). 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 representan como medias (± error standard) de los porcentajes de células FDA-positivas obtenidas tras el análisis de 9 explantes de cada tipo. No existen diferencias significativas de viabilidad celular entre los explantes tratados con UDP 1 mM y sus controles no tratados ($P<0,05$, test t de Student).

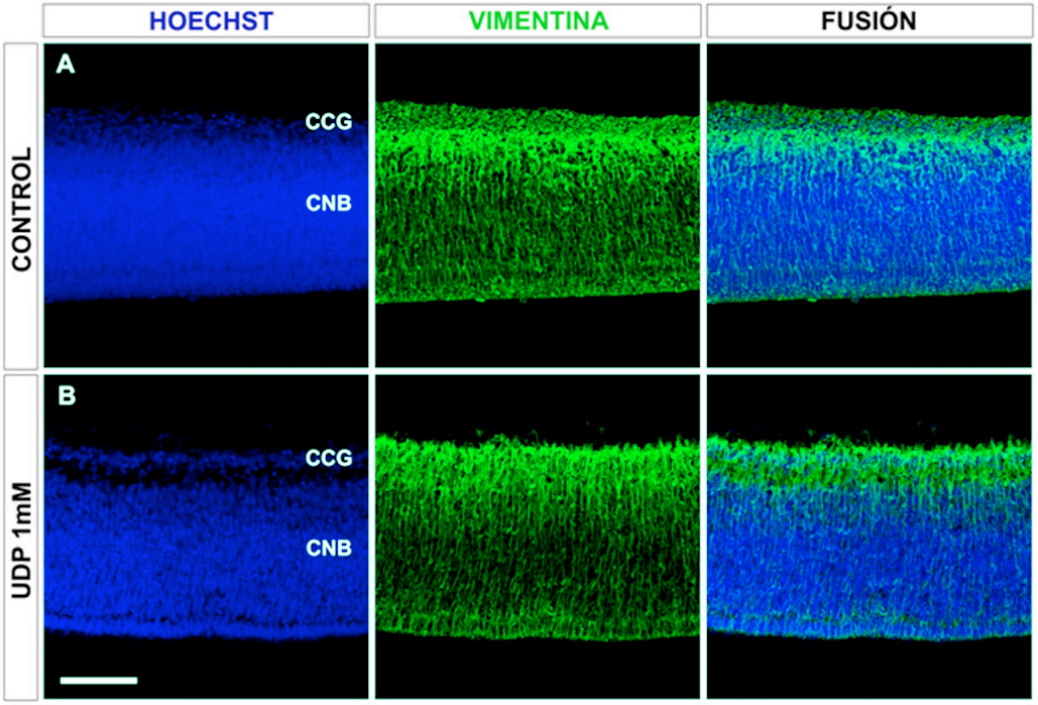

Fig. 58. El tratamiento *in vitro* con UDP no altera el patrón de expresión de la vimentina en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con UDP (**B**, UDP 1 mM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal H5, que revela el citoesqueleto de vimentina de las células de Müller (verde). Las capas nucleares de la retina (azul) se han puesto de manifiesto mediante tinción nuclear con Hoechst 33342. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), verde (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de distribución de la vimentina en las células de Müller no muestra diferencias entre el explante tratado con UDP (**B**) y su control (**A**). En ambos casos, el marcaje más intenso se concentra en la capa de células ganglionales (CCG), siendo más tenue en la capa neuroblástica (CNB). Barra de escala: 50 µm.

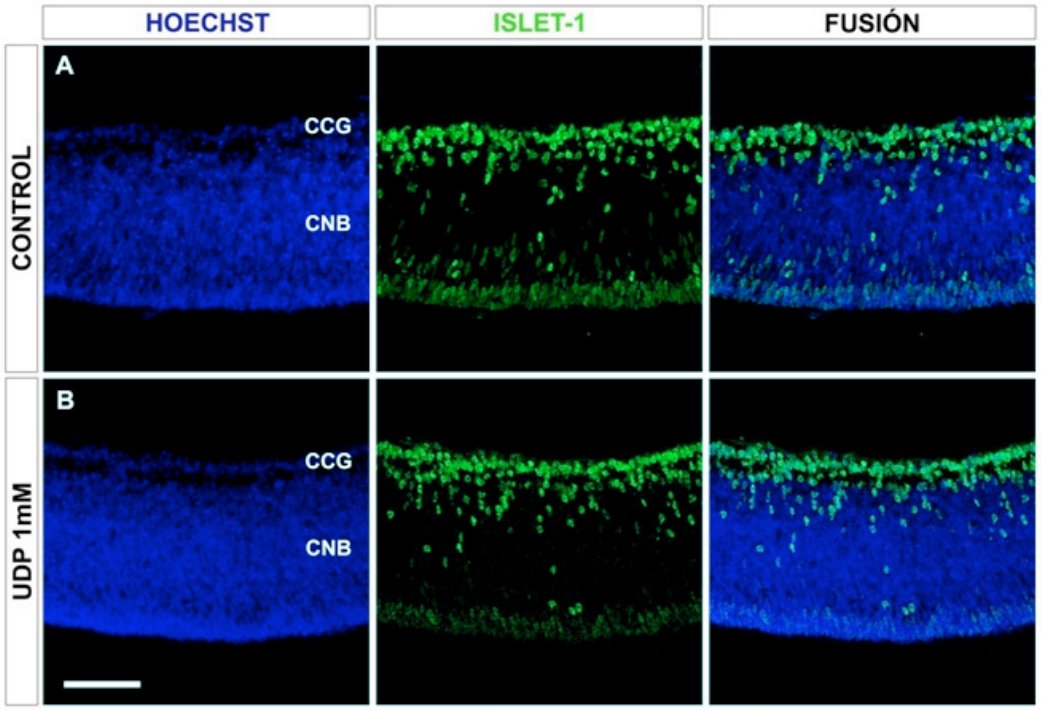

Fig. 59. El tratamiento *in vitro* con UDP no altera el patrón de distribución de las células Islet-1-positivas en los explantes de retina embrionaria de codorniz. Secciones transversales de explantes de retina embrionaria de codorniz de 6,5 días de incubación cultivados durante 24 horas *in vitro* sin ningún tratamiento (**A**, CONTROL) y tras el tratamiento con UDP (**B**, UDP 1 mM). Las secciones se han inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal 39.4D5, que reconoce los núcleos de las células que expresan el factor de transcripción Islet-1 (verde). Las capas nucleares de la retina (azul) se han puesto de manifiesto mediante tinción nuclear con Hoechst 33342. Cada fila de imágenes muestra el mismo campo microscópico en los canales azul (izquierda), verde (centro) y tras la fusión de ambos (derecha). El patrón de distribución de las células Islet-1-positivas en el explante tratado con UDP (**B**) es similar al observado en su control no tratado (**A**). En ambos casos, las subpoblaciones de células Islet-1-positivas se distribuyen en la capa de células ganglionares (CCG), en el límite superior de la capa neuroblástica (CNB) y en la mitad escleral de la CNB. Barra de escala: 50 µm

Discusión

Los resultados de la presente investigación se pueden resumir en tres puntos básicos. 1) En primer lugar, se demuestra que las células microgliales que colonizan la retina embrionaria de codorniz desde la región de la CNO/BP a partir de E7 proceden de macrófagos originados en el saco vitelino, que han invadido el SNC en estadios tempranos del desarrollo embrionario. Estos precursores microgliales alcanzan la retina a través de varias rutas y muestran un cierto grado de activación basal, dado que expresan iNOS. 2) También demostramos que el comienzo de la entrada de células microgliales en la retina coincide con una oleada de muerte programada de células ganglionares y que la inhibición de caspasas en cultivos *in vitro* de ERECs de E6,5 reduce la entrada de microglía ameboide en la retina, sugiriendo que la muerte celular programada es un estímulo que favorece la colonización de la retina por células microgliales. 3) Por último, nuestro estudio en ERECs de E6,5 cultivados *in vitro* demuestra que la señalización purinérgica participa en la entrada y migración de la microglía en la retina embrionaria de codorniz, ya que la degradación de los di- y tri-nucleótidos con apirasa, así como el bloqueo de los receptores purinérgicos con suramina previenen dicha entrada, mientras que la adición exógena de ATP o UDP la incrementan.

La microglía ameboide que coloniza la retina embrionaria de codorniz proviene de macrófagos que se originan en el saco vitelino

Nuestras observaciones en quimeras de EP-SVC demuestran que macrófagos de codorniz están presentes en el SNC desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Puesto que en dichas quimeras el saco vitelino es el único componente de codorniz, resulta evidente que los macrófagos que colonizan el SNC son de procedencia vitelina. Además, la temprana edad embrionaria en la que estas células son generadas en el saco vitelino, cuando la hematopoyesis definitiva transitoria todavía no ha comenzado (Guedes et al., 2014; Nagai y Sheng, 2008; Niimi et al., 2008; Sheng, 2010), permite concluir que se trata de macrófagos primitivos generados durante la hematopoyesis primitiva. Las

presentes observaciones confirman las ya descritas tanto en aves (Cuadros et al., 1993; Martín-Partido et al., 1991) como en peces (Herbomel et al., 2001) y mamíferos (Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2010; Sorokin et al., 1992), que demostraban la colonización del SNC por macrófagos primitivos en etapas tempranas de la embriogénesis. No obstante, no se puede descartar que los macrófagos de procedencia vitelina presentes en el SNC de etapas más avanzadas del desarrollo (a partir de E4) puedan ser macrófagos fetales derivados de monocitos, generados en la hematopoyesis definitiva transitoria, que también tiene lugar en el saco vitelino y comienza en E4-E4,5 (ver Fig. 4 en la Introducción de esta Tesis).

Los macrófagos primitivos invaden el mesénquima de la cabeza antes de entrar en el SNC (Cuadros et al., 1992a, 1993; Ginhoux et al., 2010). Los resultados del presente estudio demuestran que muchos de estos macrófagos alcanzan regiones perioculares, desde donde algunos son capaces de penetrar hacia el interior del ojo, migrando adheridos a la superficie del borde marginal de la retina, y otros entran en la fisura óptica. La entrada de macrófagos primitivos en el ojo por el borde marginal de la retina está probablemente relacionada con la atracción de los mismos hacia una zona de muerte celular localizada en la zona de cierre de la vesícula del cristalino, adyacente al borde marginal de la retina (Cuadros et al., 1991). Los macrófagos que se introducen a través de esta vía entran en la cavidad vítrea, donde podrían dar origen a tres tipos de macrófagos oculares que han sido descritos en las aves: los hialocitos del vítreo (Seaman y Storm, 1965), los hialocitos del pecten (Korkmaz y Kum, 2016; Llombart et al., 2009; Navascués et al., 1995) y los macrófagos del cuerpo ciliar (Marín-Teva et al., 1999b; Uehara et al., 1996).

En lo referente a los macrófagos primitivos que invaden la fisura óptica, probablemente son precursores de la microglía que se concentran en esta región del ojo antes de invadir la retina en etapas posteriores del desarrollo (a partir de E7). En efecto, la fisura óptica es una estrecha abertura localizada entre los bordes naso-ventral y temporo-ventral de la copa óptica, los cuales se fusionan

posteriormente dando lugar finalmente a la BP, en cuya interfase con la retina se observan macrófagos de procedencia vitelina (QH1-positivos en la quimeras de EP-SVC de E8) aparentemente migrando desde la BP hacia la retina (ver Fig. 21). Una vez dentro de la retina, estos macrófagos constituyen la microglía ameboide (Marín-Teva et al., 1998; Navascués et al., 1995), cuya progresiva diferenciación en microglía ramificada ha sido previamente demostrada en etapas comprendidas entre E12 y el tercer día post-eclosión (Navascués et al., 1995; Sánchez-López et al., 2004). Por lo tanto, la microglía ramificada que está presente en la retina de codorniz poco después de la eclosión parece proceder de los macrófagos primitivos que se acumularon en la fisura óptica en etapas tempranas del desarrollo embrionario, lo que concuerda con el origen de la microglía de mamíferos defendido por Ginhoux y sus colaboradores (Ginhoux et al., 2010; Ginhoux y Guilliams, 2016; Ginhoux y Prinz, 2015; Hoeffel et al., 2015; Hoeffel y Ginhoux, 2015). Esta idea está apoyada por nuestros resultados experimentales en cultivos organotípicos de ERECs de edades comprendidas entre E3 y E7 que se incubaban *in vitro* hasta completar la edad de E10 al final de cada cultivo (Fig. 25). En efecto, este tipo de experiencias han demostrado que los precursores microgliales ya se encuentran en la región de la CNO y BP desde E3, etapa en la que los macrófagos primitivos están acumulándose en la fisura óptica. Nuestros resultados demuestran que dichos precursores tienen capacidad de diferenciarse en microglía a partir de E7, cuando la retina ha alcanzado el grado de madurez suficiente para permitir la entrada, migración y diferenciación de los mismos.

No es descartable que solo una parte de los macrófagos de procedencia vitelina que se acumulan en la BP sean macrófagos primitivos (procedentes de islotes sanguíneos del saco vitelino), mientras que otra parte de los mismos sean macrófagos fetales derivados de monocitos (procedentes del endotelio hemogénico de los vasos sanguíneos del saco vitelino). En efecto, nuestros resultados en quimeras de EP-SVC de E8 demuestran que la BP contiene una profusa red vascular, en la cual circulan numerosos leucocitos de procedencia vitelina, algunos de los cuales parecen atravesar el endotelio vascular,

incorporándose al tejido de la BP para dar lugar a macrófagos, que se sumarían a la población de macrófagos primitivos previamente existente en dicho tejido. Las células sanguíneas de procedencia vitelina que circulan en la luz de los vasos durante la etapa del desarrollo en la que se han realizado las observaciones (E8) se habrían generado después de finalizar la hematopoyesis primitiva, que tiene lugar hasta E5 (Lassila et al., 1982; Martin et al., 1978), cuando la hematopoyesis definitiva transitoria es predominante (ver Fig. 4). Por lo tanto, los macrófagos que se incorporan a la BP en esta etapa serían macrófagos fetales derivados de monocitos generados en el saco vitelino durante la hematopoyesis definitiva transitoria, que se añadirían a los macrófagos primitivos previamente existentes en la BP, y ambas poblaciones de macrófagos vitelinos podrían migrar seguidamente desde esta zona hacia la retina para dar la microglía ameboide que termina diferenciándose en microglía ramificada. Según lo que acabamos de argumentar, la microglía de la retina de codorniz de etapas post-eclosión tendría un origen totalmente vitelino, aunque sería parcialmente derivada de macrófagos primitivos y parcialmente procedente de macrófagos fetales derivados de monocitos. Esta segunda procedencia coincide con el origen de la microglía defendido por el grupo de Gomez-Perdiguero (Gomez-Perdiguero et al., 2015; Gomez-Perdiguero y Geissmann, 2016; Mass et al., 2016).

A la luz de los resultados obtenidos por Garceau et al. (2015) en el pollo y Xu et al. (2015) en el pez cebra, cabría la posibilidad de que la microglía de procedencia vitelina de la retina embrionaria de codorniz fuera reemplazada por microglía de origen intraembrionario durante el desarrollo post-eclosión. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido analizada en nuestro estudio, ya que las quimeras de EP-SVC no son capaces de sobrevivir después de E9. Se ha descrito que el patrón de distribución y los caracteres morfológicos de las células microgliales en la retina de codorniz adulta (Navascués et al., 1994) son idénticos a los observados al final del desarrollo post-eclosión (Navascués et al., 1995), pero estos datos no significan que no pueda haber una posterior y progresiva sustitución de dichas células a partir de precursores intraembrionarios. Si éstos

procedieran de órganos hematopoyéticos, como la médula ósea, deberían alcanzar la retina a través de la red vascular, que no está presente en la retina de codorniz aunque sí en el pecten. De esta forma, dichos precursores intraembrionarios podrían alcanzar fácilmente la BP y desde aquí migrar al resto de la retina, de manera similar a como sucede durante el desarrollo embrionario, para conseguir reemplazar a la microglía ramificada. En este sentido, Navascués et al. (1994) identificaron células microgliales de morfología bipolar en la CFN de la retina de codorniz adulta. Dichas células estaban orientadas paralelamente a los axones ópticos y no mostraban ramificación, por lo que podría tratarse de células microgliales en vías de migración. No obstante, la hipotética sustitución de la microglía embrionaria de procedencia vitelina por otra de procedencia intraembrionaria es un tema que necesitaría nuevas investigaciones.

Además de la procedencia de la microglía ameboide de la retina embrionaria de codorniz a partir de macrófagos vitelinos localizados en la BP, nuestro estudio muestra que dicha microglía también puede proceder de macrófagos vitelinos localizados tanto en la CNO (Fig. 22) como en el mesénquima periocular (Fig. 21C). En relación con la entrada en la retina de macrófagos vitelinos procedentes de la CNO, se ha descrito el reclutamiento de macrófagos primitivos hacia focos de muerte celular que aparecen en el nervio óptico del embrión de codorniz desde E3 (Moujahid et al., 1996). En este estudio también se observaba que dichos macrófagos se diseminan seguidamente por todo el nervio óptico y dan lugar a la microglía del mismo. Nuestros resultados actuales en quimeras de EP-SVC de E8 muestran que los macrófagos vitelinos se distribuyen entre los fascículos de axones del nervio óptico y presentan una morfología alargada y polarizada, con largas prolongaciones provistas de lamelipodios (Fig. 18D), que es típica de células en proceso de migración. Por lo tanto, dichos macrófagos parecen estar migrando entre los axones ópticos a lo largo del nervio óptico, siendo capaces de alcanzar la CNO, desde donde podrían ingresar en la CFN de la retina, pasando a formar parte de la microglía ameboide de la misma. Esta vía de colonización microglial de la retina a partir de

macrófagos que migran en el nervio óptico sería semejante a la descrita en el embrión de pollo para los precursores de oligodendrocitos (Ono et al., 1997, 1998). Con respecto a la entrada en la retina de macrófagos vitelinos procedentes del mesénquima periocular, algunos macrófagos localizados en dicho mesénquima parecen atravesar la superficie limitante de la CNO en su zona de inserción con la retina, lo que permitiría su acceso a la CNO e incorporación a la población de macrófagos que migran desde ésta hacia el interior de la retina. Esta vía de entrada de precursores microgliales es similar a la descrita en otras partes del SNC en desarrollo a través de la superficie pial (Cuadros et al., 1993, 1994, 1997; Hirasawa et al., 2005; Kaur et al., 2001; Kurz y Christ, 1998). Los macrófagos vitelinos que entran en la retina tanto desde la CNO (Fig. 22) como desde el mesénquima periocular, deben atravesar la zona de inserción de la CNO en la retina, en la que existe un tipo especial de células gliales que se conocen como glía peripapilar (Kim et al., 2011; Quesada et al., 2004; Schuck et al., 2000; Stanke et al., 2010). Estas células expresan moléculas de adhesión celular, que han sido implicadas en los mecanismos de direccionalidad de los axones ópticos (Gerhardt et al., 2000) y que también podrían contribuir a la migración de los macrófagos vitelinos desde la CNO hacia el interior de la retina.

En el presente estudio se describe por primera vez la expresión de iNOS en una población de macrófagos primitivos. Además, también se ha demostrado que la enzima iNOS se expresa tanto en los macrófagos vitelinos que se concentran en la CNO/BP entre E3 y E7 como en la microglía ameboide que comienza a colonizar la retina en E7. La expresión de iNOS en ambas poblaciones celulares constituye un argumento adicional en apoyo de la idea de que se trataría de la misma población celular en diferentes momentos del desarrollo, es decir, que los macrófagos concentrados en la CNO/BP entre E3 y E6 serían los precursores microgliales que colonizan la retina a partir de E7. La expresión de iNOS en la microglía ameboide de la retina de codorniz de E7, evidenciada en el presente estudio, continúa estando presente en etapas posteriores del desarrollo embrionario, como se demostraba en un estudio anterior de nuestro laboratorio

(Sierra et al., 2014), en el que también se describía que dicha expresión disminuye progresivamente a medida que la microglía ameboide se diferencia en microglía ramificada. La iNOS es una enzima homodimérica que convierte la L-arginina y el oxígeno en L-citrulina y óxido nítrico, una especie reactiva de oxígeno con efectos pleiotrópicos que actua como un regulador importante de diversas funciones fisiológicas y que puede ser citotóxico si se combina con otros radicales libres, como el anión superóxido, para dar peroxinitrito (Bogdan, 2015; Pacher et al., 2007). Está ampliamente aceptado que la expresión de iNOS es inducida en macrófagos y células microgliales que se activan tras el contacto con antígenos bacterianos, como el lipopolisacárido, o por estimulación con diferentes citoquinas (Bogdan, 2015; Brown y Vilalta, 2015), aunque dicha expresión también puede tener lugar en la microglía ameboide durante el desarrollo normal del SNC (Crain et al., 2013; Cunningham et al., 2013; Sierra et al., 2014). De cualquier modo, la expresión de iNOS se considera un marcador de activación, por lo que la existencia de dicha expresión en los macrófagos vitelinos de la CNO/BP entre E3 y E7 indica que estas células tienen un cierto grado de activación (activación basal), que podría contribuir a su migración desde la CNO/BP hacia la retina, ya que el óxido nítrico podría tener efectos autocrinos sobre los propios macrófagos, favoreciendo su movimiento y proliferación (Sierra et al., 2014). Después de su entrada en la retina, la microglía ameboide continúa expresando iNOS, que podría favorecer la migración de ésta en el interior de la retina. No obstante, estudios adicionales serían necesarios para corroborar la posible participación del óxido nítrico producido por iNOS en los mecanismos de entrada y migración de los precursores microgliales de la retina.

El comienzo de la entrada de las células microgliales en la retina coincide con un aumento de la muerte celular programada

El presente estudio demuestra que el comienzo de la entrada de las células microgliales en la retina embrionaria de codorniz coincide temporal y topográficamente con un marcado incremento de la muerte celular programada en

regiones localizadas dorsalmente a la CNO/BP. Muchos estudios han demostrado que existe una relación espacio-temporal entre la colonización de la microglía y la muerte celular programada en varias regiones del SNC en desarrollo, incluyendo la retina (Ashwell et al., 1991; Calderó et al., 2009; Eyo et al., 2016; Hume et al., 1983; Marín-Teva et al., 1999c; Peri et al., 2008; Perry et al., 1985; Rigato et al., 2011; Santos et al., 2008; Swinnen et al., 2013). La estrecha relación entre las neuronas en proceso de muerte y las células microgliales está bien documentada, ya que se ha demostrado que la microglía fagocita restos neuronales (Ashwell et al., 1991; Eyo et al., 2016; Hume et al., 1983; Marín-Teva et al., 1999c; Peri et al., 2008; Sierra et al., 2013) e incluso promueve la muerte de células con las que contacta (Cunningham et al., 2013; Marín-Teva et al., 2004; Marín-Teva et al., 2014; Wakselman et al., 2008). Muchos de estos estudios proponían que la muerte celular programada podría atraer a las células microgliales hacia el SNC en desarrollo. Sin embargo, esta hipótesis no había sido confirmada hasta hace poco, cuando dos grupos de investigación independientes han demostrado que la apoptosis neuronal atrae a los precursores microgliales para que entren en el SNC del pez cebra (Casano et al., 2016; Xu et al., 2016). Ambos estudios mostraban que el patrón espacio-temporal de colonización del cerebro en desarrollo del pez cebra por células microgliales está estrechamente correlacionado con el patrón espacio-temporal de muerte neuronal. Por el contrario, otro estudio llevado a cabo durante el desarrollo postnatal de ratones knockout para BAX mostraba que la colonización microglial en el hipocampo parece ser independiente de la muerte celular (Eyo et al., 2016). No obstante, estos ratones knockout muestran una reducción, pero no una completa eliminación, de la muerte desarrollo, entre otras regiones del cerebro (White et al., 1998). En el hipocampo de los ratones knockout para BAX se observaba una reducción transitoria de la densidad microglial durante la primera semana postnatal, coincidiendo con una reducción de la muerte celular, y dicha densidad era similar a la de los ratones salvajes durante la segunda semana postnatal (Eyo et al., 2016). Desde nuestro punto de vista, estos resultados apoyan que existe una estrecha relación entre la

colonización microglial temprana y la muerte celular programada, aunque otros factores distintos a la muerte neuronal podrían participar en la regulación del reclutamiento tardío al interior del hipocampo, tal y como proponían estos autores (Eyo et al., 2016). Nuestros resultados demuestran una clara correlación espacial y temporal entre el inicio de la entrada de los precursores microgliales en la retina embrionaria en E7 y un incremento de la muerte celular en la retina central, tal y como muestran los marcajes con anti-caspasa-3 activa y TUNEL (ver Figs. 28-30). Además, observamos que la inhibición de las caspasas en explantes de retina de E6,5+24hiv reduce significativa y simultáneamente tanto la muerte celular en la retina como la entrada de células microgliales en la misma (Fig. 32). Estos resultados sugieren una relación entre el reclutamiento de la microglía y la muerte celular programada y están en consonancia con los resultados de los estudios anteriormente citados en el cerebro en desarrollo del pez cebra (Casano et al., 2016; Xu et al., 2016). Esta hipótesis también se ve apoyada por las frecuentes observaciones de contactos entre los precursores microgliales que están entrando en la retina y los axones y somas de células ganglionares caspasa-3 positivas (Fig. 29).

La señalización purinérgica participa en la entrada de la microglía en la retina en desarrollo

Una vez establecido que la entrada temprana de los precursores microgliales en la retina en desarrollo podría estar inducida por la muerte celular programada, investigamos los posibles mecanismos moleculares involucrados en este proceso, centrándonos en la señalización purinérgica. Se ha descrito que algunos nucleótidos extracelulares, como el ADP/ATP y el UTP/UDP, son liberados por las neuronas que mueren en el SNC dañado, induciendo migración y/o fagocitosis en las células microgliales mediante señalización a través de diferentes receptores purinérgicos del tipo P2X y P2Y, expresados en la superficie de dichas células (Koizumi et al., 2013; Madry et al., 2015; Ohsawa et al., 2011). De este modo, el ATP extracelular liberado por las neuronas dañadas puede

ejercer efectos tanto quimiotácticos como quimiocinéticos sobre las células microgliales mediante su unión a los receptores purinérgicos P2X4, P2Y1 y P2Y12 (De Simone et al., 2010; Haynes et al., 2006; Honda et al., 2001; Kurpius et al., 2007; Miller et al., 2009; Nasu-Tada et al., 2005; Ohsawa et al., 2007). Las células dañadas también liberan UTP que es inmediatamente degradado por las ectonucleotidasas a UDP, el cual actúa sobre los receptores purinérgicos microgliales del tipo P2Y6 para facilitar la fagocitosis (Koizumi et al., 2007; Neher et al., 2014). Sin embargo, el papel de estos nucleótidos y sus receptores en la entrada y migración de las células microgliales durante el desarrollo normal no ha sido apenas investigado. Recientemente, un estudio ha demostrado que la señalización por nucleótidos participa en la entrada de los precursores microgliales en el cerebro en desarrollo del pez cebra (Casano et al., 2016), aunque este estudio no determinaba la naturaleza de los nucleótidos implicados ni los mecanismos celulares responsables de dicha entrada.

El papel de la señalización purinérgica en la entrada de los precursores microgliales en la retina y la naturaleza de los nucleótidos extracelulares implicados en la misma ha sido analizado en el presente estudio mediante el uso de cultivos organotípicos de ERECs de E6,5, en los cuales se mantienen los procesos de entrada y migración de precursores microgliales en la retina de forma similar a los observados durante el desarrollo *in situ*. Como cuestión previa, pudimos comprobar que, en cada explante, entraban en la retina entre 20 y 150 células microgliales y el número de células que entraban era siempre similar en los explantes obtenidos de ambos ojos de cada embrión. El cultivo *in vitro* de los explantes de retina comenzaba 12 horas antes de la primera entrada de los precursores microgliales en la retina (que tiene lugar en E7) y acababa 12 horas después. De este modo, conseguíamos una estrecha ventana temporal de desarrollo que permitía el estudio de los factores que controlan la entrada inicial y la migración en la retina de los precursores microgliales de manera parecida a como lo hacen en la retina *in situ*.

La señalización purinérgica era bloqueada en los explantes de retina de E6,5 mediante el uso de dos estrategias experimentales complementarias. La primera de ellas consistía en el uso de la apirasa, una enzima que hidroliza los tri- y di-nucleótidos extracelulares (Kurpius et al., 2007; Warny et al., 2001), la cual era añadida al medio de cultivo, eliminando así la señalización por ATP/ADP y UTP/UDP. En el segundo abordaje experimental, los explantes de retina de E6,5 eran tratados con suramina, un antagonista no específico de los receptores purinérgicos P2X/P2Y (Gendron et al., 2003; Shieh et al., 2014). Ambos tratamientos inhibían la entrada de las células microgliales en la retina, demostrando que los tri- y di-nucleótidos están involucrados en la migración de las células microgliales desde la región de la CNO/BP hacia el interior de la retina y que la señalización purinérgica vía P2X/P2Y juega un papel esencial en la entrada y migración de las células microgliales en la retina embrionaria de codorniz de E7. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el estudio de Casano y colaboradores (Casano et al., 2016), que demuestran que la entrada de los precursores microgliales en el cerebro del pez cebra se reduce significativamente tras el tratamiento de los embriones con suramina o mediante el bloqueo de los canales de panexina-1, los cuales están involucrados en la liberación de nucleótidos citosólicos al medio extracelular durante la apoptosis (Chekeni et al., 2010; Qu et al., 2011). Un hecho a destacar es que ninguno de los tratamientos utilizados en nuestro modelo provocaba cambios en la distribución y porcentaje de las células caspasa-3 positivas, en la viabilidad celular de los explantes o en diferentes caracteres de la citoarquitectura de la retina. Esto demostraba que el bloqueo de la entrada de las células microgliales en la retina tras el tratamiento con apirasa o suramina no se debía a un efecto indirecto de estas moléculas sobre otros tipos celulares como consecuencia de una toxicidad no específica de las mismas. Además, las pocas células microgliales que entraban en la retina en los explantes tratados con apirasa o suramina presentaban un fenotipo significativamente menos elongado en comparación con los controles no tratados, indicando una limitación en su capacidad migratoria. Estos resultados sugieren

que la señalización purinérgica es necesaria para la entrada de las células microgliales en la retina y para su migración tangencial, aunque no podemos descartar otros factores adicionales que también podrían contribuir a regular los procesos de entrada y migración de los precursores microgliales.

Para comprobar el papel de los nucleótidos tri- y difosfato en la migración de los precursores microgliales de la CNO/BP hacia el interior de la retina, se añadieron los nucleótidos ATP y UDP al medio de cultivo de ERECs de E6,5. Curiosamente, el tratamiento con ATP 1 mM y UDP 1mM provocaba un incremento significativo y muy similar del número de células microgliales que entraban en la retina y de su índice de elongación, sin afectar a su proliferación, lo que sugiere que ambos nucleótidos están involucrados no solo en el movimiento de los precursores microgliales desde la CNO/BP hacia la retina, sino también en su migración tangencial dentro de la retina. Dado que el ATP es capaz de unirse tanto a receptores purinérgicos de tipo P2X como P2Y y el UDP solo puede unirse a los receptores P2Y (Bianco et al., 2005), podemos especular que los receptores purinérgicos de tipo P2Y podrían ser los candidatos más apropiados para la participación en estos procesos, aunque serían necesarios nuevos estudios para corroborar esta hipótesis.

Los efectos estimulantes del ATP y del UDP sobre la entrada de las células microgliales en la retina, mostrados en nuestro sistema experimental, son compatibles con un aumento de la quimiocinesis de estas células. Se pueden distinguir tres formas de migración celular en función de las señales químicas involucradas en su regulación: 1) migración basal aleatoria, que tiene lugar en ausencia de estímulos químicos externos; 2) quimiocinesis, que tiene lugar cuando un factor químico estimula la migración celular sin determinar la dirección de la misma, es decir cuando un estímulo químico incrementa la locomoción celular orientada al azar; y 3) quimiotaxis, que ocurre cuando existe un gradiente de concentración de un determinado factor soluble, que actúa asimétricamente dictando la dirección de la migración celular desde la región de menor concentración hacia la de mayor concentración (Petrie et al., 2009; Wilkinson et

al., 1998). En este sentido, los explantes de retina eran cultivados sobre membranas Millicell con la superficie vitreal hacia abajo, y el ATP y UDP eran disueltos en el medio de cultivo dispuesto bajo la membrana. Por tanto, no había gradiente de concentración de nucleótidos, ya que la concentración de los mismos era similar en toda la superficie vitreal de la retina. Además, está demostrado que la adición exógena de ATP y UDP puede interrumpir los posibles gradientes de estos nucleótidos liberados por las células apoptóticas (Abiega et al., 2016; Davalos et al., 2005). Así, nuestros resultados parecen compatibles con la existencia de un efecto quimiocinético del ATP y UDP sobre las células microgliales que entran en la retina de codorniz a partir de E7. Esta hipótesis está en concordancia con los resultados obtenidos en cultivos primarios de células microgliales de ratón, en los que la respuesta migratoria de la microglía al ATP extracelular podría estar dirigida tanto por quimiotaxis como por quimiocinesis (Honda et al., 2001; Miller et al., 2009).

Conviene destacar que nuestros experimentos no demuestran que el ATP o el UDP sea liberado por las células apoptóticas de la retina embrionaria de codorniz, por lo que no podemos descartar su procedencia de otras fuentes, ya que se han descrito en la literatura diversos componentes del parénquima nervioso capaces de liberar ATP al medio extracelular. Así, el ATP y otros nucleótidos son liberados por neuronas o células macrogliales a través de una variedad de mecanismos, pudiendo actuar como glio- y neurotransmisores en diferentes regiones del SNC, incluida la retina, y están involucrados en la señalización bidireccional entre neuronas y células gliales en procesos de desarrollo y patológicos (Abbracchio et al., 2009; Housley et al., 2009; Newman et al., 2004). En la retina, la estimulación por la luz provoca un aumento del nivel de ATP extracelular liberado por las células ganglionares y/o amacrinas en un proceso dependiente de calcio (Neal et al., 1994; Newman et al., 2005; Santos et al., 1999). Al igual que otros neurotransmisores convencionales, el ATP se almacena y se libera en vesículas secretoras en los terminales presinápticos de las neuronas (Ward et al., 2010). Se piensa que actúa como un cotransmisor en muchos tipos

celulares, desde los que es liberado junto con neurotransmisores y neuropéptidos inhibidores (GABA) y excitatorios (glutamato) (Jo et al., 1999, 2002; Sperlágh et al., 1998; Ward et al., 2010). Sin embargo, el papel del ATP como neurotransmisor en la retina en desarrollo no ha sido investigado y, por tanto, se necesitarían más estudios para demostrar que las neuronas en los explantes de retina de E6,5 liberan ATP.

Por otro lado, las células no neuronales también son una fuente de ATP en la retina. Se ha demostrado que los astrocitos, las células de Müller y el epitelio pigmentario son capaces de liberar ATP en respuesta a diferentes estímulos (Mitchell et al., 2001; Newman et al., 2001; Pearson et al., 2005; Voigt et al., 2015; Wurm et al., 2011). La ausencia de epitelio pigmentario en los explantes de retina de E6,5 descarta a estas células como una posible fuente de ATP. Sin embargo, las células de Müller sí podrían producir el ATP en nuestro sistema experimental. En la retina de aves, la cual está desprovista de astrocitos, las células de Müller constituyen el principal tipo de células gliales. Cada célula de Müller conforma el núcleo de una columna de neuronas retinianas, que representa la unidad funcional más pequeña de la retina (Bringmann et al., 2006). Las células de Müller interaccionan con las neuronas de sus columnas en una especie de relación simbiótica, siendo responsables del soporte tanto funcional como metabólico de las neuronas que tienen asociadas. Así, las células de Müller proveen de sustancias tróficas a las neuronas y eliminan los restos metabólicos generados por ellas. Además, juegan un papel clave en la regulación del volumen del espacio extracelular, en la homeostasis del agua y de los iones y en la regulación de la actividad sináptica mediante la liberación de gliotransmisores y el reciclaje de neurotransmisores (Bringmann et al., 2006). Curiosamente, se ha visto que las células de Müller de la retina de embriones de pollo de E8 (estadio de desarrollo equivalente a E7 en la codorniz) liberan ATP *in vitro* (Loiola et al., 2011). Teniendo en cuenta que las células microgliales en la retina embrionaria de codorniz migran tangencialmente sobre los pies terminales de las células de Müller (Marín-Teva et al., 1998), la producción de ATP por parte de éstas podría

inducir la quimiocinesis de las células microgliales. Además, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que las células de Müller pueden fagocitar células apoptóticas en la retina embrionaria de codorniz (Marín-Teva et al., 1999c). Teniendo en cuenta que las células de Müller se pueden activar por la acción de muchos estímulos, incluyendo la muerte celular, podríamos suponer que la muerte celular que tiene lugar durante el desarrollo de la retina activaría las células de Müller, induciéndolas a producir ATP que estimularía la quimiocinesis de las células microgliales. Sin embargo, ésta es una mera hipótesis que necesita ser confirmada por nuevos estudios.

Además del efecto quimiocinético del ATP y UDP sobre los precursores microgliales, demostrado por nuestros resultados, es evidente que otras moléculas distribuidas en un gradiente quimiotáctico podrían contribuir a la regulación de la entrada y migración de los precursores microgliales en la retina. De hecho, recientemente se ha demostrado que la lipofosfatidilcolina y la quimioquina CXCL12 participan en el reclutamiento de las células microgliales al cerebro en desarrollo del pez cebra y a la zona subventricular de la corteza cerebral en desarrollo de ratón, respectivamente (Arnó et al., 2014; Xu et al., 2016).

En el presente estudio, solo concentraciones relativamente altas tanto de ATP (1 mM) como de UDP (1 mM) tenían un efecto significativo en la entrada de los precursores microgliales en la retina, probablemente debido a la rápida hidrólisis de estos nucleótidos a nucleósidos (incluida la adenosina) por la acción de ectonucleotidasas (Dalmau et al., 1998b; Färber et al., 2008; Robson et al., 2006), algunas de las cuales son expresadas por las células microgliales (Braun et al., 2001). Por tanto, las células microgliales estarían expuestas tanto a nucleótidos como a nucleósidos (Färber et al., 2008) y podrían detectar ambas señales, ya que poseen múltiples receptores purinérgicos de tipo P1 (selectivo para la adenosina) y P2 (sensible a los nucleótidos) (Koizumi et al., 2013; Ohsawa et al., 2011). De hecho, se ha demostrado que la coestimulación de los subtipos P2Y y P1 de receptores purinérgicos es necesaria para la quimiotaxis de microglía purificada de cerebro de ratón postnatal hacia una fuente de ATP (Färber et al., 2008). En

nuestro modelo, los explantes de retina fueron tratados con el análogo de ATP no hidrolizable ATPγS para comprobar si las ectonucleotidasas actuaban en nuestro sistema *in vitro*. El tratamiento con ATPγS 100 μM inducía un incremento similar en la entrada y elongación de las células microgliales al observado tras el tratamiento de los explantes con ATP 1 mM. Estos resultados sugieren que el ATP tiene un efecto directo sobre la entrada de las células microgliales y que una proporción de ATP podría ser hidrolizada a AMP o adenosina.

En resumen, nuestro estudio revela que la señalización purinérgica tiene un importante papel en la entrada y consiguiente migración de los precursores microgliales en la retina, demostrando que el ATP y el UDP extracelular ejercen un efecto quimiocinético sobre las células microgliales que entran en la retina, el cual se realiza a través de receptores purinérgicos, probablemente del subtipo P2Y. La señalización nucleotídica también participa en el reclutamiento de los progenitores microgliales en el cerebro en desarrollo del pez cebra (Casano et al., 2016), lo que sugiere un mecanismo generalizado de reclutamiento microglial en el SNC en desarrollo de los vertebrados.

Referencias

A

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. Trends Neurosci 32:19-29.

Abiega O, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Nadjar A, Layé S, Leyrolle Q, Gómez-Nicola D, Domercq M, Pérez-Samartín A, Sánchez-Zafra V, Paris I, Valero J, Savage JC, Hui CW, Tremblay MÈ, Deudero JJ, Brewster AL, Anderson AE, Zaldumbide L, Galbarriatu L, Marinas A, Vivanco MD, Matute C, Maletic-Savatic M, Encinas JM, Sierra A (2016) Neuronal hyperactivity disturbs ATP microgradients, impairs microglial motility, and reduces phagocytic receptor expression triggering apoptosis/microglial phagocytosis uncoupling. PLoS Biol 14:e1002466.

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. Nat Neurosci 14:1142-1149.

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.

Akiyama H, Nishimura T, Kondo H, Ikeda K, Hayashi Y, McGeer PL (1994) Expression of the receptor for macrophage colony stimulating factor by brain microglia and its upregulation in brains of patients with Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res 639:171-174.

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 USA 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.

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.

Andreasson KI, Bachstetter AD, Colonna M, Ginhoux F, Holmes C, Lamb B, Landreth G, Lee DC, Low D, Lynch MA, Monsonego A, O'Banion MK, Pekny M, Puschmann T, Russek-Blum N, Sandusky LA, Selenica ML, Takata K, Teeling J, Town T, Van Eldik L (2016) Targeting innate immunity for neurodegenerative disorders of the central nervous system. J Neurochem 138:653-93.

Arnó B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, Greter M, Favaro R, Comi G, Becher B, Martino G, Muzio L (2014) Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. Nat Commun 5:5611.

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.

Ashwell K (1989) Development of microglia in the albino rabbit retina. J Comp Neurol 287:286-301.

Ashwell K (1991) The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. Brain Res Dev Brain Res 58:1-12.

Askew K, Gomez-Nicola D (2017a) A story of birth and death: Insights into the formation and dynamics of the microglial population. Brain Behav Immun, publicado on-line, doi: 10.1016/j.bbi.2017.03.009.

Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, Riecken K, Beccari S, Sierra A, Molnár Z, Cragg MS, Garaschuk O, Perry VH, Gomez-Nicola D (2017b) Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. Cell Rep 18:391-405.

B

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.

Back J, Dierich A, Bronn C, Kastner P, Chan S (2004) PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. Blood 103:3615-3623.

Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Gomez-Perdiguero E, Geissmann F, Henri S, Malissen B, Osborne LC, Artis D, Mowat AM (2014) Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. Nat Immunol 15:929-937.

Balic A, Garcia-Morales C, Vervelde L, Gilhooley H, Sherman A, Garceau V, Gutowska MW, Burt DW, Kaiser P, Hume DA, Sang HM (2014) Visualisation of chicken macrophages using transgenic reporter genes: insights into the development of the avian macrophage lineage. Development 141:3255-3265.

Barde YA (1989) Trophic factors and neuronal survival. Neuron 2:1525-1534.

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.

Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J (2005) Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. Faseb J 19:647-649.

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.

Bellhorn RW, Bellhorn MS (1975) The avian pecten. 1. Fluorescein permeability. Ophthalmic Res 7:1-7.

Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. J Neurosci 27:7028-7040.

Bernier LP, Ase AR, Boué-Grabot E, Séguéla P (2013) Inhibition of P2X4 function by P2Y6 UDP receptors in microglia. Glia 61:2038-2049.

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.

Bertrand JY, Kim AD, Violette EP, Stachura DL, Cisson JL, Traver D (2007) Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. Development 134:4147-4156.

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.

Bianco F, Fumagalli M, Pravettoni E, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Abbracchio MP, Verderio C (2005) Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. Brain Res Rev 48:144-156.

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW (2007) Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. Trends Neurosci 30:596-602.

Bisht K, Sharma KP, Lecours C, Sánchez MG, El Hajj H, Milior G, Olmos-Alonso A, Gómez-Nicola D, Luheshi G, Vallières L, Branchi I, Maggi L, Limatola C, Butovsky O, Tremblay MÈ (2016) Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. Glia 64:826-39.

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 (2015) Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. Trends Immunol 36:161-178.

Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C (2010) In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. Nature 464:116-120.

Bouabe H, Okkenhaug K (2013) Gene targeting in mice: a review. Methods Mol Biol 1064:315-336.

Boucsein C, Zacharias R, Färber 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.

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.

Braun N, Zimmermann H (2001) Microglial ectonucleotidases: identification and functional roles. Drug Dev Res 53:208-217.

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.

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.

Brown GC, Vilalta A (2015) How microglia kill neurons. Brain Res 1628:288-297.

Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiol Rev 87:659-797.

Buttgereit A, Lelios I, Yu X, Vrohlings M, Krakoski NR, Gautier EL, Nishinakamura R, Becher B, Greter M (2016) Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. Nat Immunol 17:1397-1406.

C

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.

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.

Casano AM, Albert M, Peri F (2016) Developmental apoptosis mediates entry and positioning of microglia in the zebrafish brain. Cell Rep 16:897-906.

Casano AM, Peri (2015). Microglia: multitasking specialists of the brain. Dev Cell 32:469-477.

Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL (2003) Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. Apoptosis 8:345-52.

Cecchini MG, Dominguez MG, Mocci S, Wetterwald A, Felix R, Fleisch H, Chisholm O, Hofstetter W, Pollard JW, Stanley ER (1994) Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. Development 120:1357-1372.

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.

Chauvier D, Ankri S, Charriaut-Marlanque C, Casimir R, Jacotot E (2007) Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality?. Cell Death Differ 14:387-91.

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.

Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, Armstrong AJ, Penuela S, Laird DW, Salvesen GS, Isakson BE, Bayliss DA, Ravichandran KS (2010) Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. Nature 467:863-867.

Chen MJ, Li Y, De Obaldia ME, Yang Q, Yzaguirre AD, Yamada-Inagawa T, Vink CS, Bhandoola A, Dzierzak E, Speck NA (2011) Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. Cell Stem Cell 9:541-552.

Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA (2009) Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. Nature 457:887-891.

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.

Chitu V, Gokhan S, Nandi S, Mehler MF, Stanley ER (2016) Emerging roles for CSF-1 receptor and its ligands in the nervous system. Trends Neurosci 39:378-393.

Cho SS, Lucas JJ, Roh EJ, Yoo YB, Lee KH, Park KH, Hwang DH, Baik SH (1997) Distribution of transferrin binding protein immunoreactivity in the chicken central and peripheral nervous systems. J Comp Neurol 382:260-271.

Choi YK, Kim KW (2008) Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. BMB Rep 41:345-352.

Christensen RN, Ha BK, Sun F, Bresnahan JC, Beattie MS (2006) Kainate induces rapid redistribution of the actin cytoskeleton in ameboid microglia. J Neurosci Res 84:170-181.

Chugani DC, Kedersha NL, Rome LH (1991) Vault immunofluorescence in the brain: new insights regarding the origin of microglia. J Neurosci 11:256-268.

Cline MJ, Moore MA (1972) Embryonic origin of the mouse macrophage. Blood 39:842-849.

Colton CA, Abel C, Patchett J, Keri J, Yao J (1992) Lectin staining of cultured CNS microglia. J Histochem Cytochem 40:505-512.

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.

Cuadros MA, Coltey P, Nieto MC, 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, Martin C, Ríos A, Martín-Partido G, Navascués J (1991) Macrophages of hemangioblastic lineage invade the lens vesicle-ectoderm interspace during closure and detachment of the avian embryonic lens. Cell Tissue Res 266:117-127.

Cuadros MA, Moujahid A, Martín-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.

Cumano A, Godin I (2007) Ontogeny of the hematopoietic system. Annu Rev Immunol 25:745-785.

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.

D

Dagher NN, Najafi AR, Kayala KM, Elmore MR, White TE, Medeiros R, West BL, Green KN (2015) Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. J Neuroinflammation 12:139.

Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER (2002) Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. Blood 99:111-120.

Dailey ME, Waite M (1999) Confocal imaging of microglial cell dynamics in hippocampal slice cultures. Methods 18:222-230.

Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J, Gonzalez 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 (1998a) Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. Hippocampus 8:458-474.

Dalmau I, Vela JM, González B, Castellano B (1998b) Expression of purine metabolism-related enzymes by microglial cells in the developing rat brain. J Comp Neurol 398:333-346.

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.

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.

De Celis JF, Barrio R (2009) Regulation and function of Spalt proteins during animal development. Int J Dev Biol 53:1385-1398.

De Simone R, Niturad CE, De Nuccio C, Ajmone-Cat MA, Visentin S, Minghetti L (2010) TGF-β and LPS modulate ADP-induced migration of microglial cells through P2Y1 and P2Y12 receptor expression. J Neurochem 115:450-459.

DeFalco T, Bhattacharya I, Williams AV, Sams DM, Capel B (2014) Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 111:E2384-2393.

Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, Billson FA (1995) Development of microglial topography in human retina. J Comp Neurol 363:53-68.

Dieterlen-Lièvre F, Martin C (1981) Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. Dev Biol 88:180-191.

Diez-Roux G, Lang RA (1997) Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo. Development 124:3633-3638.

Dunning HS, Furth J (1935) Studies on the relation between microglia, histiocytes and monocytes. Am J Pathol 11:895-919.

E

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.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature 461:282-286.

Elmore MR, Lee RJ, West BL, Green KN (2015) Characterizing newly repopulated microglia in the adult mouse: impacts on animal behavior, cell morphology, and neuroinflammation. PLoS One 10:e0122912.

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.

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.

Eyo UB, Dailey ME (2013) Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. J Neuroimmune Pharmacol 8:494-509.

Eyo UB, Miner SA, Weiner JA, Dailey ME (2016) Developmental changes in microglial mobilization are independent of apoptosis in the neonatal mouse hippocampus. Brain Behav Immun 55:49-59.

F

Fadeel B (2003) Programmed cell clearance. Cell Mol Life Sci 60:2575-2585.

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, Prykhozhij 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.

Färber K, Markworth S, Pannasch U, Nolte C, Prinz V, Kronenberg G, Gertz K, Endres M, Bechmann I, Enjyoji K, Robson SC, Kettenmann H (2008) The ectonucleotidase cd39/ENTPDase1 modulates purinergic-mediated microglial migration. Glia 56:331-341.

Feil S, Krauss J, Thunemann M, Feil R (2014) Genetic inducible fate mapping in adult mice using tamoxifen-dependent Cre recombinases. Methods Mol Biol 1194:113-139.

Fellah JS, Jaffredo T, Nagy N, Dunon D (2014) Development of the avian immune system. In: Avian Immunology, 2nd ed (Schat KA, Kaspars B, Kaiser P, eds). Elsevier, Amsterdam, pp 45-63.

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.

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.

Fourgeaud L, Través PG, Tufail Y, Leal-Bailey H, Lew ED, Burrola PG, Callaway P, Zagórska A, Rothlin CV, Nimmerjahn A, Lemke G (2016) TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. Nature 532:240-4.

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-κB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. Neuron 81:1009-1023.

Frame JM, Fegan KH, Conway SJ, McGrath KE, Palis J (2016) Definitive hematopoiesis in the yolk sac emerges from Wnt-responsive hemogenic endothelium independently of circulation and arterial identity. Stem Cells 34:431-444.

Frame JM, McGrath KE, Palis J (2013) Erythro-myeloid progenitors: "definitive" hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stem cells. Blood Cells Mol Dis 51:220-225.

Francisco-Morcillo J, Bejarano-Escobar R, Rodríguez-Leon J, Navascués J, Martín-Partido G (2014) Ontogenetic cell death and phagocytosis in the visual system of vertebrates. Dev Dyn 243:1203-1225.

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 USA 104:8287-8292.

Frost JL, Schafer DP (2016) Microglia: architects of the developing nervous system. Trends Cell Biol 26:587-597.

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.

G

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 L, Macklin W, Gerson J, Miller RH (2006) Intrinsic and extrinsic inhibition of oligodendrocyte development by rat retina. Dev Biol 290:277-286.

Garceau V, Balic A, Garcia-Morales C, Sauter KA, McGrew MJ, Smith J, Vervelde L, Sherman A, Fuller TE, Oliphant T, Shelley JA, Tiwari R, Wilson TL, Chintoan-Uta C, Burt DW, Stevens MP, Sang HM, Hume DA (2015) The development and maintenance of the mononuclear phagocyte system of the chick is controlled by signals from the macrophage colony-stimulating factor receptor. BMC Biol 13:12.

Garceau V, Smith J, Paton IR, Davey M, Fares MA, Sester DP, Burt DW, Hume DA (2010) Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. J Leukoc Biol 87:753-764.

Garcia-Morales C, Rothwell L, Moffat L, Garceau V, Balic A, Sang HM, Kaiser P, Hume DA (2014) Production and characterisation of a monoclonal antibody that recognises the chicken CSF1 receptor and confirms that expression is restricted to macrophage-lineage cells. Dev Comp Immunol 42:278-285.

Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg 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.

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.

Gendron FP, Chalimoniuk M, Strosznajder J, Shen S, González FA, Weisman GA, Sun GY (2003) $P2X_7$ nucleotide receptor activation enhances IFNγ-induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells. J Neurochem 87:344-352.

Gerhardt H, Rascher G, Schuck J, Weigold U, Redies C, Wolburg H (2000) R- and B-cadherin expression defines subpopulations of glial cells involved in axonal guidance in the optic nerve head of the chicken. Glia 31:131-143.

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, Guilliams M (2016) Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. Immunity 44:439-449.

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.

Ginhoux F, Prinz M (2015) Origin of microglia: current concepts and past controversies. Cold Spring Harb Perspect Biol 7:a020537.

Giulian D, Ingeman JE (1988) Colony-stimulating factors as promoters of ameboid 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.

Golub R, Cumano A (2013) Embryonic hematopoiesis. Blood Cells Mol Dis.

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.

Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Perry VH (2013) Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. J Neurosci 33:2481-2493.

Gomez-Nicola D, Perry VH (2015) Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. Neuroscientist 21:169-184.

Gomez-Perdiguero E, Geissmann F (2016) The development and maintenance of resident macrophages. Nat Immunol 17:2-8.

Gomez-Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR (2015) Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. Nature 518:547-551.

Gomez-Perdiguero E, Schulz C, Geissmann F (2013) Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. Glia 61:112-120.

Goodbrand IA, Gaze RM (1991) Microglia in tadpoles of Xenopus laevis: normal distribution and the response to optic nerve injury. Anat Embryol (Berl) 184:71-82.

Gotoh H, Ueda T, Uno A, Ohuchi H, Ikenaka K, Ono K (2011) Expression of myelin genes in the developing chick retina. Gene Expr Patterns 11:471-475.

Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1989) Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. J Neurosci Res 22:103-106.

Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, Kundig TM, Frei K, Ginhoux F, Merad M, Becher B (2012) Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of Langerhans cells and the maintenance of microglia. Immunity 37:1050-1060.

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.

Guan Z, Kuhn JA, Wang X, Colquitt B, Solorzano C, Vaman S, Guan AK, Evans-Reinsch Z, Braz J, Devor M, Abboud-Werner SL, Lanier LL, Lomvardas S, Basbaum AI (2016) Injured sensory neuron-derived CSF1 induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain. Nat Neurosci 19:94-101.

Guedes PT, de Oliveira BC, Manso PP, Caputo LF, Cotta-Pereira G, Pelajo-Machado M (2014) Histological analyses demonstrate the temporary contribution of yolk sac,

liver, and bone marrow to hematopoiesis during chicken development. PLoS One 9:e90975.

Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. J Leukoc Biol 75:388-397.

Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN (2013) Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. J Exp Med 210:1977-1992.

H

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.

Hamburger V, Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 88:49-92.

Hamilton DL, Abremski K (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. J Mol Biol 178:481-486.

Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nat Neurosci 10:1387-1394.

Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K (2002) Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. J Neurosci 22:9228-9236.

Harry GJ, Kraft AD (2012) Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. Neurotoxicology 33:191-206.

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.

Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, Becker CD, See P, Price J, Lucas D, Greter M, Mortha A, Boyer SW, Forsberg EC, Tanaka M, van Rooijen N, Garcia-Sastre A, Stanley ER, Ginhoux F, Frenette PS, Merad M (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity 38:792-804.

Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D (2006) $P2Y_{12}$ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. Nat Neurosci 9:1512-9.

Henson PM, Hume DA (2006) Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. Trends Immunol 27:244-250.

Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R (1998) Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. Eur J Neurosci 10:3284-3290.

Herbomel P, Thisse B, Thisse C (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.

Hernandez-Martinez R, Covarrubias L (2011) Interdigital cell death function and regulation: new insights on an old programmed cell death model. Dev Growth Differ 53:245-258.

Hickey WF, Vass K, Lassmann H (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. J Neuropathol Exp Neurol 51:246-256.

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.

Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS (2013) Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. Cold Spring Harb Perspect Biol 5:a008748.

Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, Beaudin AE, Lum J, Low I, Forsberg EC, Poidinger M, Zolezzi F, Larbi A, Ng LG, Chan JK, Greter M, Becher B, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F (2015) C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. Immunity 42:665-678.

Hoeffel G, Ginhoux F (2015) Ontogeny of tissue-resident macrophages. Front Immunol 6:486.

Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F, Choy SH, Grisotto M, Renia L, Conway SJ, Stanley ER, Chan JK, Ng LG, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F (2012) Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. J Exp Med 209:1167-1181.

Hogers B, DeRuiter MC, Baasten AM, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE (1995) Intracardiac blood flow patterns related to the yolk sac circulation of the chick embryo. Circ Res 76:871-877.

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.

Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S (2001) Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through $G_{i/o}$-coupled P2Y receptors. J Neurosci 21:1975-1982.

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.

Housley GD, Bringmann A, Reichenbach A (2009) Purinergic signaling in special senses. Trends Neurosci 32:128-141.

Hua JY, Smith SJ (2004) Neural activity and the dynamics of central nervous system development. Nat Neurosci 7:327-332.

Hughes EG, Bergles DE (2014) Hidden progenitors replace microglia in the adult brain. Neuron 82:253-255.

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.

Hurley SD, Walter SA, Semple-Rowland SL, Streit WJ (1999) Cytokine transcripts expressed by microglia in vitro are not expressed by ameboid microglia of the developing rat central nervous system. Glia 25:304-309.

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.

I

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.

Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, Shibata K, Shinozaki Y, Kasai H, Moriishi K, Moriyama Y, Koizumi S (2013) Microglia release ATP by exocytosis. Glia 61:1320-1330.

J

Jaffredo T, Gautier R, Brajeul V, Dieterlen-Lièvre F (2000) Tracing the progeny of the aortic hemangioblast in the avian embryo. Dev Biol 224:204-214.

Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F (1998) Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. Development 125:4575-4583.

Jagannathan-Bogdan M, Zon LI (2013) Hematopoiesis. Development 140:2463-2467.

Jenkins SJ, Hume DA (2014) Homeostasis in the mononuclear phagocyte system. Trends Immunol 35:358-367.

Jensen P, Dymecki SM (2014) Essentials of recombinase-based genetic fate mapping in mice. Methods Mol Biol 1092:437-454.

Jeon CJ, Masland RH (1993) Selective accumulation of diamidino yellow and chromomycin A3 by retinal glial cells. J Histochem Cytochem 41:1651-1658.

Jing L, Zon LI (2011) Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis. Dis Model Mech 4:433-438.

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, Witasp 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.

Jo YH, Role LW (2002) Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. J Neurosci 22:4794-4804.

Jo YH, Schlichter R (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. Nat Neurosci 2:241-245.

Joyner AL, Zervas M (2006) Genetic inducible fate mapping in mouse: establishing genetic lineages and defining genetic neuroanatomy in the nervous system. Dev Dyn 235:2376-2385.

Jurgens HA, Johnson RW (2012) Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. Exp Neurol 233:40-48.

K

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.

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 (2015) The role of the microglia in acute CNS injury. Metab Brain Dis 30:381-392.

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, Holscher C, Muller 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.

Kierdorf K, Prinz M, Geissmann F, Gomez-Perdiguero E (2015) Development and function of tissue resident macrophages in mice. Semin Immunol 27:369-378.

Kieusseian A, Brunet de la Grange P, Burlen-Defranoux O, Godin I, Cumano A (2012) Immature hematopoietic stem cells undergo maturation in the fetal liver. Development 139:3521-3530.

Kim JY, Sohn HJ, Seo JH (2011) Characterization of the antigenic phenotype of alphaB-crystallin-expressing peripapillary glial cells in the developing chick retina. Anat Cell Biol 44:35-40.

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.

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.

Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K (2007) UDP acting at $P2Y_6$ receptors is a mediator of microglial phagocytosis. Nature 446:1091-1095.

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 Abeta 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.

Korkmaz D, Kum S (2016) Investigation of the antigen recognition and presentation capacity of pecteneal hyalocytes in the chicken (Gallus gallus domesticus). Biotech Histochem 91:212-219.

Koso H, Tsuhako A, Lai CY, Baba Y, Otsu M, Ueno K, Nagasaki M, Suzuki Y, Watanabe S (2016) Conditional rod photoreceptor ablation reveals Sall1 as a microglial marker and regulator of microglial morphology in the retina. Glia 64:2005-2024.

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.

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.

L

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.

Lang RA, Bishop JM (1993) Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. Cell 74:453-462.

Lassila O, Martin C, Toivanen P, Dieterlen-Lièvre F (1982) Erythropoiesis and lymphopoiesis in the chick yolk-sac-embryo chimeras: contribution of yolk sac and intraembryonic stem cells. Blood 59:377-381.

Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S (2004) Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. Mol Cell 14:277-287.

Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, Jung S, Amit I (2014) Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. Cell 159:1312-1326.

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.

Lee YB, Nagai A, Kim SU (2002) Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. J Neurosci Res 69:94-103.

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.

Ling EA, Kaur C, Wong WC (1982) Light and electron microscopic demonstration of non-specific esterase in amoeboid microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats: a cytochemical link to monocytes. J Anat 135:385-394.

Ling EA, Penney D, Leblond CP (1980) Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the 'ameboid cells' present in the corpus callosum of postnatal rats. J Comp Neurol 193:631-657.

Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. Glia 7:9-18.

Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ (2005) Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. Nat Rev Immunol 5:866-79.

Llombart C, Nacher V, Ramos D, Luppo M, Carretero A, Navarro M, Melgarejo V, Armengol C, Rodriguez-Baeza A, Mendes-Jorge L, Ruberte J (2009) Morphological characterization of pecteneal hyalocytes in the developing quail retina. J Anat 215:280-291.

Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, Vallance JE, Ito M, Ondr JK, Kurup S, Glass DA, Patel MS, Shu W, Morrisey EE, McMahon AP, Karsenty G, Lang RA (2005) WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. Nature 437:417-421.

Loiola EC, Ventura AL (2011) Release of ATP from avian Müller glia cells in culture. Neurochem Int 58:414-422.

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.

Luo XG, Ding JQ, Chen SD (2010) Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. Mol Neurodegener 5:12.

M

MacDonald KP, Palmer JS, Cronau S, Seppanen E, Olver S, Raffelt NC, Kuns R, Pettit AR, Clouston A, Wainwright B, Branstetter D, Smith J, Paxton RJ, Cerretti DP, Bonham L, Hill GR, Hume DA (2010) An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. Blood 116:3955-3963.

Madry C, Attwell D (2015) Receptors, ion channels, and signaling mechanisms underlying microglial dynamics. J Biol Chem 290:12443-12450.

Maeda T, Inagaki M, Fujita Y, Kimoto T, Tanabe-Fujimura C, Zou K, Liu J, Liu S, Komano H (2016) ATP increases the migration of microglia across the brain endothelial cell monolayer. Biosci Rep 36.

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.

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.

Martin C, Beaupain D, Dieterlen-Lièvre F (1978) Developmental relationships between vitelline and intra-embryonic haemopoiesis studied in avian 'yolk sac chimaeras'. Cell Differ 7:115-130.

Martín-Estebane M, Navascués J, Sierra-Martín A, Martín-Guerrero SM, Cuadros MA, Carrasco MC, Marín-Teva JL (2017) Onset of microglial entry into developing quail retina coincides with increased expression of active caspase-3 and is mediated by extracellular ATP and UDP. PLoS One 12:e0182450.

Martín-Partido G, Cuadros MA, Martin 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.

Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Gunther P, Crozet L, Jacome-Galarza CE, Handler K, Klughammer J, Kobayashi Y, Gomez-Perdiguero E, Schultze JL, Beyer M, Bock C, Geissmann F (2016) Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. Science 353:aaf4238.

Matyash M, Zabiegalov O, Wendt S, Matyash V, Kettenmann H (2017) The adenosine generating enzymes CD39/CD73 control microglial processes ramification in the mouse brain. PLoS One 12:e0175012.

McGrath KE, Frame JM, Fegan KH, Bowen JR, Conway SJ, Catherman SC, Kingsley PD, Koniski AD, Palis J (2015) Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo. Cell Rep 11:1892-1904.

McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J (2003) Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. Blood 101:1669-1676.

McGrath KE, Palis J (2005) Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. Exp Hematol 33:1021-1028.

McIvor Z, Hein S, Fiegler H, Schroeder T, Stocking C, Just U, Cross M (2003) Transient expression of PU.1 commits multipotent progenitors to a myeloid fate whereas continued expression favors macrophage over granulocyte differentiation. Exp Hematol 31:39-47.

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.

Medina CB, Ravichandran KS (2016) Do not let death do us part: 'find-me' signals in communication between dying cells and the phagocytes. Cell Death Differ 23:979-89.

Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S (2011) Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. Development 138:1017-1031.

Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. Proc Natl Acad Sci USA 92:6991-6995.

Meyer DB (1977) The avian eye and its adaptations. En: The visual system in vertebrates (Crescitelli F, ed). Springer-Verlag, Berlin, pp 549-611.

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+ monocytes only under defined host conditions. Nat Neurosci 10:1544-1553.

Miller AM, Stella N (2009) Microglial cell migration stimulated by ATP and C5a involve distinct molecular mechanisms: quantification of migration by a novel near-infrared method. Glia 57:875-883.

Milligan CE, Schwartz LM (1997) Programmed cell death during animal development. Br Med Bull 53:570-590.

Minten C, Terry R, Deffrasnes C, King NJ, Campbell IL (2012) IFN regulatory factor 8 is a key constitutive determinant of the morphological and molecular properties of microglia in the CNS. PLoS One 7:e49851.

Miron VE (2017) Microglia-driven regulation of oligodendrocyte lineage cells, myelination, and remyelination. J Leukoc Biol 101:1103-1108.

Mitchell CH (2001) Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. J Physiol 534:193-202.

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.

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.

Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, Pinto AR, Klapproth K, Henri S, Malissen B, Rodewald HR, Rosenthal NA, Bajenoff M, Prinz M, Jung S, Sieweke MH (2014) Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. J Exp Med 211:2151-2158.

Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C (2006) Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. J Comp Neurol 499:565-582.

Monier B, Suzanne M (2015) The morphogenetic role of apoptosis. Curr Top Dev Biol 114:335-362.

Moore MA, Metcalf D (1970) Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. Br J Haematol 18:279-296.

Mori S, Leblond CP (1969) Identification of microglia in light and electron microscopy. J Comp Neurol 135:57-80.

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.

Mosser CA, Baptista S, Arnoux I, Audinat E (2017) Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. Prog Neurobiol 149-150:1-20.

Moujahid A, Navascués J, Marín-Teva JL, Cuadros MA (1996) Macrophages during avian optic nerve development: relationship to cell death and differentiation into microglia. Anat Embryol 193:131-144.

Murabe Y, Sano Y (1982) Morphological studies on neuroglia. VI. Postnatal development of microglial cells. Cell Tissue Res 225:469-485.

N

Nagai H, Sheng G (2008) Definitive erythropoiesis in chicken yolk sac. Dev Dyn 237:3332-3341.

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.

Naito M, Yamamura F, Nishikawa S, Takahashi K (1989) Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in cultures. J Leukoc Biol 46:1-10.

Nakazawa T, Tachi S, Aikawa E, Ihnuma M (1993) Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. Glia 8:114-121.

Nandi S, Gokhan S, Dai XM, Wei S, Enikolopov G, Lin H, Mehler MF, Stanley ER (2012) The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. Dev Biol 367:100-113.

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.

Nasu-Tada K, Koizumi S, Inoue K (2005) Involvement of β1 integrin in microglial chemotaxis and proliferation on fibronectin: different regulations by ADP through PKA. Glia 52:98-107.

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.

Neal M, Cunningham J (1994) Modulation by endogenous ATP of the light-evoked release of Ach from retinal cholinergic neurons. Br J Pharmacol 113:1085-1087.

Neher JJ, Neniskyte U, Hornik T, Brown GC (2014) Inhibition of UDP/$P2Y_6$ purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. Glia 62:1463-1475

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.

Newman E, Reichenbach A (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. Trends Neurosci 19:307-312.

Newman EA (2001) Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. J Neurosci 21:2215-2223.

Newman EA (2004) A dialogue between glia and neurons in the retina: modulation of neuronal excitability. Neuron Glia Biol 1:245-252.

Newman EA (2005) Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. J Neurosci 25:5502-5510.

Niimi G, Usuda N, Shinzato M, Kaneko C, Nagamura Y, Pereda J (2008) Histochemical study of the definitive erythropoietic foci in the chicken yolk sac. Ital J Anat Embryol 113:9-16.

Nikodemova M, Kimyon RS, De I, Small AL, Collier LS, Watters JJ (2015) Microglial numbers attain adult levels after undergoing a rapid decrease in cell number in the third postnatal week. J Neuroimmunol 278:280-288.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science 308:1314-1318.

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.

O

Oehmichen M (1980) Enzyme-histochemical differentiation of neuroglia and microglia: a contribution to the cytogenesis of microglia and globoid cells. Review of the literature. Pathol Res Pract 168:344-373.

Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S (2007) Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. Glia 55:604-616.

Ohsawa K, Kohsaka S (2011) Dynamic motility of microglia: purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. Glia 59:1793-1799.

O'Koren EG, Mathew R, Saban DR (2016) Fate mapping reveals that microglia and recruited monocyte-derived macrophages are definitively distinguishable by phenotype in the retina. Sci Rep 6:20636.

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.

Ono K, Yasui Y, Rutishauser U, Miller RH (1997) Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve. Neuron 19:283-292.

Oosterhof N, Holtman IR, Kuil LE, van der Linde HC, Boddeke EW, Eggen BJ, van Ham TJ (2017) Identification of a conserved and acute neurodegeneration-specific microglial transcriptome in the zebrafish. Glia 65:138-149.

Oppenheim RW (1989) The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. Trends Neurosci 12:252-255.

Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. Annu Rev Neurosci 14:453-501.

Orkin SH, Zon LI (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell 132:631-644.

Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF (2009) Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. Nat Neurosci 12:872-878.

Otero K, Turnbull IR, Poliani PL, VermiW, Cerutti E, Aoshi T, Tassi I, Takai T, Stanley SL, Miller M, Shaw AS, Colonna M (2009) Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and β-catenin. Nat Immunol 10:734-743.

Ovchinnikov DA, van Zuylen WJ, DeBats CE, Alexander KA, Kellie S, Hume DA (2008) Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. J Leukoc Biol 83:430-433.

P

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev 87:315-424.

Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G (1999) Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. Development 126:5073-5084.

Palis J, Yoder MC (2001) Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. Exp Hematol 29:927-936.

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.

Paolicelli RC, Ferretti MT (2017) Function and dysfunction of microglia during brain development: consequences for synapses and neural circuits. Front Synaptic Neurosci 9:9.

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.

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.

Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P (2005) ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. Neuron 46:731-744.

Penfold PL, Madigan MC, Provis JM (1991) Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. Vis Neurosci 7:383-388.

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.

Petersen MA, Dailey ME (2004) Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. Glia 46:195-206.

Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM (2009) Random versus directionally persistent cell migration. Nat Rev Mol Cell Biol 10:538-549.

Phoon CK (2001) Circulatory physiology in the developing embryo. Curr Opin Pediatr 13:456-464.

Pierre WC, Smith PL, Londono I, Chemtob S, Mallard C, Lodygensky GA (2017) Neonatal microglia: the cornerstone of brain fate. Brain Behav Immun 59:333-345.

Pixley FJ, Stanley ER (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. Trends Cell Biol 14:628-638.

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.

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.

Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. Nat Med 7:1356-1361.

Provis JM (2001) Development of the primate retinal vasculature. Prog Retin Eye Res 20:799-821.

Q

Qu Y, Misaghi S, Newton K, Gilmour LL, Louie S, Cupp JE, Dubyak GR, Hackos D, Dixit VM (2011) Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. J Immunol 186:6553-6561.

Quesada A, Prada FA, Aguilera Y, Espinar A, Carmona A, Prada C (2004) Peripapillary glial cells in the chick retina: a special glial cell type expressing astrocyte, radial glia, neuron, and oligodendrocyte markers throughout development. Glia 46:346-355.

R

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. Science 262:695-700.

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.

Ransohoff RM, Cardona AE (2010) The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. Nature 468:253-262.

Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol 27:119-145.

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.

Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM (2016) The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. Front Hum Neurosci 10:566.

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, Ulfig N (2005) Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. Cereb Cortex 15:938-949.

Rezaie P, Male D (1999) Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. Microsc Res Tech 45:359-382.

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.

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.

Río-Hortega P (1932) Microglia. In: Penfield W, editor. Cytology and cellular pathology of the nervous system, vol 2. Paul B Hoeber, New York, pp 483-534.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signal 2:409-430.

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.

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.

S

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.

Samokhvalov IM (2014) Deconvoluting the ontogeny of hematopoietic stem cells. Cell Mol Life Sci 71:957-978.

Samokhvalov IM, Samokhvalova NI, Nishikawa S (2007) Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. Nature 446:1056-1061.

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.

Sántha K, Juba A (1933) Weitere untersuchungen über die entwicklung der Hortegaschen mikroglia. Arch Psychiat Nervenkr 98:598-613.

Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martín-Oliva D, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA (2008) Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. J Comp Neurol 506:224-239.

Santos PF, Caramelo OL, Carvalho AP, Duarte CB (1999) Characterization of ATP release from cultures enriched in cholinergic amacrine-like neurons. J. Neurobiol 41:340-348.

Sasaki A, Yokoo H, Naito M, Kaizu C, Shultz LD, Nakazato Y (2000) Effects of macrophage-colony-stimulating factor deficiency on the maturation of microglia and brain macrophages and on their expression of scavenger receptor. Neuropathology 20:134-142.

Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, Wainwright BJ, Ostrowski MC, Himes SR, Hume DA (2003) A macrophage colony-stimulating factor receptor-

green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. Blood 101:1155-1163.

Sauter KA, Pridans C, Sehgal A, Bain CC, Scott C, Moffat L, Rojo R, Stutchfield BM, Davies CL, Donaldson DS, Renault K, McColl BW, Mowat AM, Serrels A, Frame MC, Mabbott NA, Hume DA (2014) The MacBlue binary transgene (csf1r-gal4VP16/UAS-ECFP) provides a novel marker for visualisation of subsets of monocytes, macrophages and dendritic cells and responsiveness to CSF1 administration. PLoS One 9:e105429.

Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. Nat Rev Immunol 2:965-75.

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.

Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C (2001) Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K+ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. Eur J Neurosci 14:463-473.

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.

Schonthal AH (2012) Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. Scientifica (Cairo) 2012:857516.

Schuck J, Gerhardt H, Wolburg H (2000) The peripapillary glia of the optic nerve head in the chicken retina. Anat Rec 259:263-275.

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.

Seaman AR, Storm HK (1965) Electron microscope observations on the hyalocytes of the vitreous body in the domestic fowl (Gallus domesticus). Exp Eye Res 4:13-17.

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.

Sheng G (2010) Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. Int J Dev Biol 54:1033-1043.

Shepard JL, Zon LI (2000) Developmental derivation of embryonic and adult macrophages. Curr Opin Hematol 7:3-8.

Sheridan GK, Murphy KJ (2013) Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. Open Biol 3:130181.

Sherr CJ, Roussel MF, Rettenmier CW (1988) Colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms). J Cell Biochem 38:179-187.

Shiau CE, Kaufman Z, Meireles AM, Talbot WS (2015) Differential requirement for irf8 in formation of embryonic and adult macrophages in zebrafish. PLoS One 10:e0117513.

Shieh CH, Heinrich A, Serchov T, van Calker D, Biber K (2014) P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF-α in cultured mouse microglia. Glia 62:592-607.

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.

Shklover J, Levy-Adam F, Kurant E (2015) Apoptotic cell clearance in development. Curr Top Dev Biol 114:297-334.

Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H (2013) Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. Front Cell Neurosci 7:6.

Sierra A, de Castro F, Del Rio-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H (2016) The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. Glia 64:1801-1840.

Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. Cell Stem Cell 7:483-495.

Sierra 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.

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.

Sissman NJ (1970) Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: comparative chronology. Am J Cardiol 25:141-148.

Slepko 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.

Snider WD (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. Cell 77:627-638.

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.

Sperlágh B, Maglóczky Z, Vizi ES, Freund TF (1998) The triangular septal nucleus as the major source of ATP release in the rat habenula: a combined neurochemical and morphological study. Neuroscience 86:1195-1207.

Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, Garel S (2014) Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. Cell Rep 8:1271-1279.

Stanke J, Moose HE, El-Hodiri HM, Fischer AJ (2010) Comparative study of Pax2 expression in glial cells in the retina and optic nerve of birds and mammals. J Comp Neurol 518:2316-2333.

Stanley ER, Chitu V (2014) CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. Cold Spring Harb Perspect Biol 6.

Stence N, Waite M, Dailey ME (2001) Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. Glia 33:256-266.

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.

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.

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 (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.

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 bymicroglial cells during development of the mouse embryo. Glia 61:150-163.

T

Takahashi K, Naito M (1993) Development, differentiation, and proliferation of macrophages in the rat yolk sac. Tissue Cell 25:351-362.

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.

Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. J Leukoc Biol 85:352-370.

Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, Pollet E, Ardouin L, Luche H, Sanchez C, Dalod M, Malissen B, Henri S (2013)

Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. Immunity 39:925-938.

Tan SY, Krasnow MA (2016) Developmental origin of lung macrophage diversity. Development 143:1318-1327.

Tanaka J, Maeda N (1996) Microglial ramification requires nondiffusible factors derived from astrocytes. Exp Neurol 137:367-375.

Tay TL, Hagemeyer N, Prinz M (2016a) The force awakens: insights into the origin and formation of microglia. Curr Opin Neurobiol 39:30-37.

Tay TL, Savage J, Hui CW, Bisht K, Tremblay ME (2016b) Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. J Physiol 595:1929-1945.

Terubayashi H, Murabe Y, Fujisawa H, Itoi M, Ibata Y (1984) Enzymhistochemical 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.

Tong CK, Vidyadaran S (2016) Role of microglia in embryonic neurogenesis. Exp Biol Med (Maywood) 241:1669-1675.

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.

Travnickova J, Tran Chau V, Julien E, Mateos-Langerak J, Gonzalez C, Lelievre E, Lutfalla G, Tavian M, Kissa K (2015) Primitive macrophages control HSPC mobilization and definitive haematopoiesis. Nat Commun 6:6227.

Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. PLoS Biol 8:e1000527.

Tremblay ME, Paolicelli RC, Stevens B, Wake H, Bessis A (2014) Developing and mature synapsis. En: Microglia in health and disease (Tremblay ME, Sierra A, eds). Springer, New York, pp 223-248.

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 S, Miloudi K, Chaychi S, Favret S, Binet F, Polosa A, Lachapelle P, Chemtob S, Sapieha P (2013) Systemic inflammation perturbs developmental retinal angiogenesis and neuroretinal function. Invest Ophthalmol Vis Sci 54:8125-8139.

Tseng CY, Ling EA, Wong WC (1983) Light and electron microscopic and cytochemical identification of amoeboid microglial cells in the brain of prenatal rats. J Anat 136:837-849.

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.

U

Uehara M, Imagawa T, Kitagawa H (1996) Morphological studies of the hyalocytes in the chicken eye: scanning electron microscopy and inflammatory response after the intravitreous injection of carbon particles. J Anat 188:661-669.

Ueno H, Weissman IL (2006) Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. Dev Cell 11:519-533.

Ulland TK, Wang Y, Colonna M (2015) Regulation of microglial survival and proliferation in health and diseases. Semin Immunol 27:410-415.

V

van Furth R, Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J Exp Med 128:415-435.

van Ham TJ, Kokel D, Peterson RT (2012) Apoptotic cells are cleared by directional migration and elmo1- dependent macrophage engulfment. Curr Biol 22:830-836.

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.

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, Gonzalez B, Castellano B (2013) Tomato lectin histochemistry for microglial visualization. Methods Mol Biol 1041:261-279.

Villar-Cerviño V, Molano-Mazón M, Catchpole T, Valdeolmillos 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.

Voigt J, Grosche A, Vogler S, Pannicke T, Hollborn M, Kohen L, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A (2015) Nonvesicular release of ATP from rat retinal glial (Müller) cells is differentially mediated in response to osmotic stress and glutamate. Neurochem Res 40:651-660.

Vrabec F (1970) Microglia in the monkey and rabbit retina. J Neuropathol Exp Neurol 29:217-224.

W

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, Miyamoto A, Nabekura J (2013) Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. Trends Neurosci 36:209-217.

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.

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.

Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nat Immunol 13:753-760.

Ward MM, Puthussery T, Vessey KA, Fletcher EL (2010) The role of purinergic receptors in retinal function and disease. Adv Exp Med Biol 664:385-391.

Warny M, Aboudola S, Robson SC, Sévigny J, Communi D, Soltoff SP, Kelly CP (2001) P2Y6 nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. J Biol Chem 276:26051-26056.

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 S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, Huang M, Williams LT, Lin H, Stanley ER (2010) Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. J Leukoc Biol 88:495-505.

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.

White FA, Keller-Peck CR, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Snider WD (1998) Widespread elimination of naturally occurring neuronal death in Bax-deficient mice. J Neurosci 18:1428-1439.

Wilkinson PC (1998) Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. J Immunol Methods 216:139-153.

Wirenfeldt M, Dissing-Olesen L, Anne Babcock A, Nielsen M, Meldgaard M, Zimmer J, Azcoitia I, Leslie RG, Dagnaes-Hansen F, Finsen B (2007) Population control of resident and immigrant microglia by mitosis and apoptosis. Am J Pathol 171:617-631.

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.

Won MH, Kang TC, Cho SS (2000) Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. Microsc Res Tech 50:151-160.

Wong K, Noubade R, Manzanillo P, Ota N, Foreman O, Hackney JA, Friedman BA, Pappu R, Scearce-Levie K, Ouyang W (2017) Mice deficient in NRROS show abnormal microglial development and neurological disorders. Nat Immunol 18:633-641.

Wu CH, Wang HJ, Wen CY, Lien KC, Ling EA (1997) Response of amoeboid and ramified microglial cells to lipopolysaccharide injections in postnatal rats--a lectin and ultrastructural study. Neurosci Res 27:133-141.

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, Dissing-Olesen L, MacVicar BA, Stevens B (2015) Microglia: dynamic mediators of synapse development and plasticity. Trends Immunol 36:605-613.

Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Francke M, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Osborne NN, Bringmann A (2011) Purinergic signaling involved in Müller cell function in the mammalian retina. Prog Retin Eye Res 30:324-342.

X

Xu J, Du L, Wen Z (2012) Myelopoiesis during zebrafish early development. J Genet Genomics 39:435-442.

Xu J, Wang T, Wu Y, Jin W, Wen Z (2016) Microglia colonization of developing zebrafish midbrain is promoted by apoptotic neuron and lysophosphatidylcholine. Dev Cell 38:214-222.

Xu J, Zhu L, He S, Wu Y, Jin W, Yu T, Qu JY, Wen Z (2015) Temporal-spatial resolution fate mapping reveals distinct origins for embryonic and adult microglia in zebrafish. Dev Cell 34:632-641.

Y

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.

Yamato S, Hirabayashi Y, Sugihara H (1984) An improved procedure for the histochemical demonstration of cathepsin D by the mercury-labeled pepstatin method. Stain Technol 59:113-120.

Yang R, Liang BT (2012) Cardiac P2X(4) receptors: targets in ischemia and heart failure? Circ Res 111:397-401.

Yoder MC (2014) Inducing definitive hematopoiesis in a dish. Nat Biotechnol 32:539-541.

Yokomizo T, Ogawa M, Osato M, Kanno T, Yoshida H, Fujimoto T, Fraser S, Nishikawa S, Okada H, Satake M, Noda T, Ito Y (2001) Requirement of Runx1/AML1/PEBP2αB for the generation of haematopoietic cells from endothelial cells. Genes Cells 6:13-23.

Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guilliams M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity 38:79-91.

Yona S, Gordon S (2015) From the reticuloendothelial to mononuclear phagocyte system - The unaccounted years. Front Immunol 6:328.

Yu W, Chen J, Xiong Y, Pixley FJ, Yeung YG, Stanley ER (2012) Macrophage proliferation is regulated through CSF-1 receptor tyrosines 544, 559, and 807. J Biol Chem 287:13694-13704.

Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. Nature 407:802-809.

Z

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.

Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini 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.

Ziebell JM, Adelson PD, Lifshitz J (2015) Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury. Metab Brain Dis 30:393-400.

Zon LI (1995) Developmental biology of hematopoiesis. Blood 86:2876-2891.

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. Los macrófagos primitivos procedentes del saco vitelino de codorniz invaden el sistema nervioso central de quimeras de embrión de pollo-saco vitelino de codorniz y alcanzan el ojo a través del borde marginal de la retina y de la fisura óptica en estadios tempranos del desarrollo embrionario.

Segunda. Los macrófagos de procedencia vitelina localizados en la región de la cabeza del nervio óptico y base del pecten son precursores microgliales que colonizan la retina embrionaria de codorniz a partir del séptimo día de incubación. El acceso a la retina de dichos macrófagos tiene lugar desde tres localizaciones diferentes: la base del pecten, la cabeza del nervio óptico y el mesénquima que rodea a esta última.

Tercera. La microglía ameboide que coloniza la retina embrionaria de codorniz y sus precursores de la cabeza del nervio óptico y base del pecten muestran una fuerte expresión de la enzima iNOS, evidenciando un nivel de activación basal que puede facilitar la colonización microglial durante el desarrollo de la retina.

Cuarta. El inicio del proceso de entrada de precursores microgliales en la retina coincide con un incremento de la muerte programada de células ganglionares, puesta de manifiesto mediante marcaje con anti-caspasa-3 activa y TUNEL.

Quinta. La muerte celular programada de la retina guarda una estrecha relación con el proceso de colonización de ésta por microglía, como demuestra el tratamiento experimental de explantes de retina de embriones de codorniz de 6,5 días de incubación con un inhibidor de caspasas de amplio espectro, que reduce significativamente tanto el número de células retinianas caspasa-3-positivas como el de células microgliales que entran en la retina.

Sexta. La señalización purinérgica vía receptores P_2X/P_2Y juega un papel esencial en el proceso de entrada de precursores microgliales en la retina embrionaria de codorniz, tal como demuestra el bloqueo de dicha entrada en explantes de retina cultivados *in vitro* tras la inhibición de la señalización purinérgica con apirasa,

una enzima hidrolítica de nucleótidos, y con suramina, un antagonista de receptores purinérgicos P_2X/P_2Y.

Séptima. La señalización purinérgica también parece intervenir en el mecanismo de migración de la microglía ameboide dentro de la retina embrionaria de codorniz, tal como sugiere la menor elongación de dicha microglía en explantes de retina cultivados *in vitro* tras la degradación de nucleótidos con apirasa y el bloqueo de receptores purinérgicos con suramina.

Octava. Los nucleótidos ATP y UDP están implicados en la señalización que estimula la entrada de precursores microgliales en la retina embrionaria de codorniz, como demuestra el incremento del número de células microgliales que entran en la retina tras la adición exógena de ATP o UDP en explantes de retina cultivados *in vitro*.

Novena. El ATP y el UDP también participan en el mecanismo de migración de la microglía ameboide dentro de la retina embrionaria de codorniz, tal como indica la adición exógena de ATP o UDP en explantes de retina cultivados *in vitro* que provoca un incremento de la elongación de las células microgliales sin que se vea afectada la actividad proliferativa de las mismas.