

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2017/18

DOCTORANDO: **CALVO LLAMAS, ESTRELLA**
D.N.I./PASAPORTE: ****662X

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D421-CIENCIAS DE LA VISIÓN**
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **BIOLOGÍA DE SISTEMAS**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 18/05/18, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **PEDRO DE LA VILLA POLO // FRANCISCO JOSÉ GERMAIN MARTÍNEZ**.

Sobre el siguiente tema: *MODELO ANIMAL DE DEGENERACIÓN RETINIANA INDUCIDA POR EXCITOTOXICIDAD. EVALUACION DE AGENTES NEUROPROTECTORES Y TERAPEUTICOS*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 18 de MAYO de 2018

EL PRESIDENTE



Fdo.: Román Blasco Velasco

EL SECRETARIO



Fdo.: MARCELO ANTONIO TRIGUEROS

EL VOCAL



Fdo.: Pedro de la Villa Polo

Con fecha 11 de junio de 2018 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,



Fdo.: Estrella Calvo Llamas

La Secretaria de la Comisión Delegada



¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 11 de junio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por CALVO LLAMAS, ESTRELLA, el día 18 de mayo de 2018, titulada *MODELO ANIMAL DE DEGENERACIÓN RETINIANA INDUCIDA POR EXCITOTOXICIDAD. EVALUACION DE AGENTES NEUROPROTECTORES Y TERAPEUTICOS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 12 de junio de 2018

EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA



F. Javier de la Mata

Javier de la Mata de la Mata

Copia por e-mail a:

Doctorando: CALVO LLAMAS, ESTRELLA

Secretario del Tribunal: MARCELINO AVILÉS TRIGUERO

Director/a de Tesis: PEDRO DE LA VILLA POLO // FRANCISCO JOSÉ GERMAIN MARTÍNEZ



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20 _____



Fdo. El Funcionario

FACULTAD DE MEDICINA.

DEPARTAMENTO BIOLOGÍA DE SISTEMAS.



**Universidad
de Alcalá**

**MODELO ANIMAL DE DEGENERACIÓN RETINIANA
INDUCIDA POR EXCITOTOXICIDAD. EVALUACIÓN DE
AGENTES NEUROPROTECTORES Y TERAPÉUTICOS.**

TESIS DOCTORAL.

ESTRELLA CALVO LLAMAS

Madrid, 2018

Dr. D. **Pedro de la Villa Polo**, Coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión.

INFORMA que la Tesis Doctoral titulada “**MODELO ANIMAL DE DEGENERACIÓN RETINIANA INDUCIDA POR EXCITOTOXICIDAD. EVALUACIÓN DE AGENTES NEUROPROTECTORES Y TERAPÉUTICOS**” presentada por D^a **ESTRELLA CALVO LLAMAS**, bajo la dirección de los Dres. D. Pedro de la Villa Polo y D. Francisco J. Germain Martínez reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal. Esta comisión ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del Doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el programa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares, a 8 de marzo de 2018

Pedro de la Villa Polo



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
F.D. EN CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS



Universidad
de Alcalá

FACULTAD DE
MEDICINA Y CIENCIAS DE LA
SALUD.
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE
SISTEMAS.

Campus universitario
Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
28801 Alcalá de Henares (Madrid)
Teléfono: 918854522
Fax: 918854525

D. **Pedro de la Villa Polo**, Catedrático de Universidad y D. **Francisco J. Germain Martínez**, Profesor Asociado de Universidad, coordinador y miembro respectivamente del Grupo de Investigación “Neurofisiología Visual” de la Universidad de Alcalá.

CERTIFICAN que la Tesis Doctoral presentada por D^a **Estrella Calvo Llamas**, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Alcalá, titulada “*Modelo Animal de Degeneración Retiniana inducida por Excitotoxicidad. Evaluación de Agentes Neuroprotectores y Terapéuticos*” ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos de originalidad, rigurosidad científica y legalidad para proceder a su defensa pública.

En Alcalá de Henares, a 2 de marzo de 2018

*“Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria
completa”*

Mahatma Gandhi.

PROYECTOS FINANCIADOS

- Papel de la muerte celular programada y la aptitud celular en el desarrollo y la diferenciación, y su desequilibrio en la neurodegeneración: Dirección General de Investigación. MCIIN REF. SAF2010-21879-C02-02.
- Modelos animales para el estudio de las enfermedades de la visión. Comunidad Autónoma de Madrid. Ref. P2010/BMD-2439.
- Patología ocular prevalente y crónica. Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)-RETICs. Ref. RD12/0034/0006.
- Nuevas Terapias para la patología ocular prevalente y crónica. Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) Instituto de Salud Carlos III. Ref: PI-13/02098

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Comunicaciones a congresos

- **Congreso:** The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). “Damage of Inner Retinal induced by Neurotoxic Effect of Glutamate Receptor Agonist”. P. De la Villa; E. Calvo; L. Ramírez; F. Germain; V. Gómez-Vicente; N. Cuenca. Seattle. Mayo 2013.
- **Congreso:** SIRCOVA. “Damage of Inner Retinal induced by Neurotoxic Effect of Glutamate Receptor Agonist”. P. De la Villa; E. Calvo; L. Ramírez; F. Germain; V. Gómez-Vicente; N. Cuenca. Valencia. Junio 2013.
- **Congreso:** XXXVIII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences. “Neuroprotective effects in retinal neurodegeneration induced by Excitotoxicity”. R. Barhoum, E. Calvo, L. Ramírez, F. De Arriba, P. De la Villa. Facultad de medicina, Universidad CEU San Pablo.2016.
- **Congreso:** SIRCOVA. “Visual impairment induced by excitotoxic glutamate agonists on specific subtypes of inner retinal cells”. Violeta Gómez-Vicente, E Calvo, A Díaz-Tahoces, I Ortuño-Lizarán, L Ramírez, E Fernández, N Cuenca, F Germain, P de la Villa. Valencia. Junio 2016.
- **Congreso:** XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). “Neuroprotective effects in retinal neurodegeneration induced by Excitotoxicity”. R. Barhoum, E. Calvo, Ramírez, F. De Arriba, P. De la Villa. Zaragoza, 2016.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que han hecho posible este trabajo y en especial a mi mentor Pedro De la Villa, gracias por confiar en mí y brindarme esta oportunidad. Gracias por tu paciencia y dedicación.

Gracias a Francisco Germain, mi Cotutor, gracias por llegar en el mejor momento, antes de tirar la toalla .Admiro tu dedicación y paciencia conmigo, gracias por tener siempre palabras de ánimo.

Gracias a tí, si a tí, Lauri, gracias por estar siempre ahí, tanto dentro como fuera del laboratorio, me llevo una gran amiga.

Gracias a todos los que han pasado por el laboratorio y en especial a Rima, por tus ganas de seguir trabajando, y a Javi y Miguel por estar en mis inicios, os recuerdo con mucho cariño.

Gracias a mi familia y amigas por aguantarme todo este tiempo, no ha sido fácil.

Gracias a Alberto por apoyarme siempre de manera incondicional.

Gracias a todos mis compañeros de trabajo, en especial a Tere que siempre ha tenido palabras de aliento.

RESUMEN

Los modelos animales de degeneración de las células ganglionares de la retina (CGR) han sido ampliamente estudiados a lo largo de la última década. En los últimos años, el uso de agonistas del glutamato tales como el ácido kaínico (KA) o el N -metil- D -aspártico (NMDA) se han utilizado como agentes lesivos de manera selectiva en las células ganglionares de la retina. Sin embargo, la información sobre el efecto de estos agentes neurotóxicos en otros tipos de células, así como el daño funcional generado en la retina, no se ha definido claramente. Por otro lado, la utilización de fármacos neuroprotectores, entre los que se encuentran los agonistas α -adrenérgicos como la brimonidina, durante el proceso degenerativo celular, o previo a él, abre un camino de posibles tratamientos para revertir o minimizar el daño celular.

Nuestro trabajo estudia el efecto neurotóxico de KA y NMDA sobre las células de la retina interna y sus consecuencias sobre la función retiniana, con el objetivo de desarrollar un modelo experimental de degeneración celular por agentes lesivos que sea fiable y reproducible para el estudio de tratamientos neuroprotectores.

En el presente trabajo, el proceso neurotóxico en la retina fue inducido en ratones C57BL6 mediante inyección intraocular de 1 μ l de suero salino tamponado (PBS) con concentraciones crecientes de KA y NMDA. En todos los experimentos, el ojo derecho fue inoculado con agonistas glutamatérgicos y el ojo izquierdo fue utilizado como ojo control, siendo inoculado con 1 μ l de PBS. Las CGR fueron identificadas por **técnicas inmunocitoquímicas** con anticuerpos contra Brn3a, en retinas montadas en plano, a las dos semanas de las inyecciones de KA y/o NMDA; la densidad de CGR fue estimada en diferentes áreas de la retina mediante recuento manual. El estudio de la funcionalidad de la retina se abordó mediante **registros electrorretinográficos**, realizados simultáneamente en ambos ojos. Se ha utilizado el electrorretinograma (ERG) de flash realizado una semana después de la inyección intraocular de los agentes neurotóxicos. El efecto sobre la estructura de la retina generado por los agentes neurotóxicos se observó sobre secciones transversales, con marcaje selectivo de células bipolares y células ganglionares. En una serie de experimentos se procedió al marcaje anterógrado de la vía visual, mediante inyección intraocular de 1 μ l de colerotoxina (CTX) en cada ojo.

Mediante el recuento celular se demostró que la inyección de KA y/o NMDA induce la muerte selectiva de CGR cuando se inyecta en el ojo, produciendo una clara disminución de la densidad de CGR en comparación con los ojos controles. El efecto de KA y NMDA eran dependientes de la dosis, ya que concentraciones elevadas de KA y/o NMDA inducen la muerte selectiva de las CGR en mayor magnitud. Cuando KA y NMDA se inyectaron conjuntamente en el ojo se observó una potenciación de la muerte de CGR. La evaluación funcional de la retina permitió observar una atenuación clara de las amplitudes de onda b del ERG, tanto en condiciones escotópicas como fotópicas en los ojos inyectados con KA y/o NMDA. No se observó disminución significativa de la amplitud de la onda a en estos ojos, indicando la preservación de las células fotorreceptoras. El estudio inmunocitoquímico no demostró efectos nocivos en la capa de células fotorreceptoras y células bipolares, sin embargo, se observó una disminución en las capas de células de la retina interna, lo que indica que KA y NMDA son capaces de inducir la muerte no sólo de CGR, sino también de células situadas en la capa nuclear interna (células bipolares de cono y células amacrinas) y la capa de células ganglionares (CGR y células amacrinas desplazadas). El estudio de la vía visual permitió evidenciar el efecto deletéreo de los agentes neurotóxicos en las proyecciones axonales de las CGR, a lo largo de toda la vía visual, demostrando que la muerte celular conlleva la extinción de las conexiones celulares hasta los centros visuales.

El uso de agonistas α -adrenérgicos en el modelo degenerativo utilizado demostró la disminución de la magnitud de la muerte celular, así como una mejoría del estado funcional de la retina, contrarrestando parcialmente los efectos nocivos producido por los agentes tóxicos.

El presente trabajo muestra que KA y NMDA, dos agonistas de los receptores de glutamato, son capaces de inducir un daño grave de las células retinianas internas cuando se inyectan juntos en el globo ocular. El uso de sustancias neuroprotectoras, como la brimonidina, antes o durante el proceso degenerativo, demuestra su capacidad para disminuir el daño celular. El presente estudio ha permitido definir un modelo de degeneración de CGR útil para estudios posteriores de agentes neuroprotectores.

SUMMARY

SUMMARY

Animal models of retinal ganglion cell (RGC) degeneration have been extensively studied. In recent years, the use of glutamate agonists such as kainic acid (KA) or N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) have been selectively used as detrimental agents in retinal ganglion cells. However, information on the effect of these neurotoxic agents on other cell types, as well as the functional damage generated in the retina, has not been clearly addressed. The use of neuroprotective drugs, including α -adrenergic agonists such as brimonidine, during or before the RGC degenerative process, opens a new field for the study of putative treatments to reverse or minimize cellular damage.

Our work attempts to address the neurotoxic effect of KA and NMDA on internal retinal cells and their effect on retinal function, with the objective of developing an experimental model of cellular degeneration by harmful agents that may be reliable and reproducible for the study of neuroprotector treatments.

The neurotoxic process in the retina was induced in C57BL6 mice by intraocular injection of 1 μ L of PBS with increasing concentrations of KA and NMDA. Glutamate agonists were inoculated into the right eye, being the left eye used as a control, and inoculated just with 1 μ L of PBS. The RGCs were labelled with antibodies against Brn3a in flat mounted retinas, after two weeks of KA and/or NMDA injections; and RGC density was estimated in different areas of the retina by manual cell counting. The study of retinal functionality was addressed by standard binocular flash-electroretinogram (ERG). All recordings were performed one week after intraocular injection of neurotoxic agents. The structural effect of neurotoxic drugs was observed by studying retinal transverse retinal sections immunoreactive for bipolar cells and ganglion cells. Anterograde labelling of the visual pathway was performed by intraocular injection of 1 μ L of cholera toxin (CTX) in both eyes.

Cell counts showed that injection of KA and/or NMDA induces the selective death of RGCs when injected into the eye, producing a clear decrease in RGC density, compared to control eyes. The effect of KA and NMDA were dose-dependent, since high concentrations of KA and/or NMDA induce selective death of RGCs in greater magnitude. When KA and NMDA were injected together into the eye an amplification of RGC death was observed. A clear attenuation of the ERG b-wave amplitudes was

observed under retinal functional evaluation, both in scotopic and photopic conditions, in the eyes injected with NMDA / KA. No significant decrease in the amplitude of a-wave was observed in the injected eyes, thus indicating the damage of internal retinal cells, but the preservation of photoreceptor cells. The immunohistochemical study showed no deleterious effects on the photoreceptor cell and bipolar cells, however, a decrease in inner nuclear layers was observed, indicating that KA and NMDA is able to induce not only the loss of RGC, but also of cells located in the inner nuclear layers (cone bipolar cells and amacrine cells) and the ganglion cell layer (RGC and displaced amacrine cells). The study of the visual pathway evidenced the deleterious effect of the harmful agents in the axonal projections of the RGCs, thus demonstrating that ganglion cell death leads to the extinction of retinal projections to the visual centres.

The use of α -adrenergic agonists in the degenerative model demonstrated a decrease in the magnitude of cell death, as well as an improvement in the functional status of the retina, counteracting the harmful effects produced by toxic agents.

In conclusion, the present work shows that NMDA and KA are able to induce the damage of internal retinal cells when injected together into the eyeball. The use of neuroprotective substances, such as brimonidine is able to decrease cellular damage. The present study has allowed us to define a model of RGC degeneration. This model is proposed for later studies of neuroprotective agents.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	III
ÍNDICE.....	V
ABREVIATURAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABLAS	XIX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ESTRUCTURA GENERAL OCULAR	3
1.2. ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA RETINA.....	6
1.3. LAS CÉLULAS DE LA RETINA.....	9
1.3.1. Epitelio pigmentario de la retina.....	9
1.3.2. Tipos celulares neuronales	9
1.3.2.1. Células fotorreceptoras	9
1.3.2.2. Células bipolares	14
1.3.2.3. Células horizontales.....	15
1.3.2.4. Células amacrinas	16
1.3.2.5. Células interplexiformes.....	16
1.3.2.6. Células ganglionares.....	16
1.3.3. Tipos celulares no neuronales. Células gliales	19
1.3.3.1. Células de Müller	19
1.3.3.2. Astroцитos.....	19
1.3.3.3. Células microgliales	20
1.3.3.4. Oligodendrocitos	20
1.4. ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LA RETINA.....	21
1.4.1. Fototransducción.....	21
1.4.2. Células ON y OFF	25
	V

1.4.3. Vías transversales en el procesamiento de la señal visual	28
1.5. TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN LA RETINA	29
1.5.1. Neurotransmisores excitatorios: Glutamato.....	29
1.5.1.1. Receptores ionotrópicos de glutamato.....	30
1.5.1.2. Receptores metabotrópicos de glutamato	31
1.5.2. Neurotransmisores inhibitorios.....	32
1.6. ELECTORRETINOGRAFÍA.....	33
1.6.1. Principios generales. Componentes del ERG	33
1.6.1.1. La onda “a”.....	34
1.6.1.2. La onda “b”	34
1.6.1.3. La onda “c”.....	35
1.6.1.4. Otras ondas electrofisiológicas.....	35
1.6.2. Estandarización de las respuestas del ERG	36
1.6.3. Tipos de electrorretinografía.....	38
1.7. PROYECCIONES CENTRALES DE LA RETINA	41
1.7.1. Vía visual y núcleos de relevo	41
1.8. EXCITOTOXICIDAD	44
1.8.1. Agentes excitotóxicos	45
1.8.2. Mecanismos de muerte celular	47
1.9. NEURODEGENERACIÓN.....	48
1.9.1. Modelos de degeneración retiniana	48
1.10. NEUROPROTECCIÓN.AGENTES NEUROPROTECTORES.....	51
1.10.1. Factores neurotróficos.....	51
1.10.2. Brimonidina (agonista alfa adrenérgico)	53
1.10.3. Antagonistas de los canales de Calcio	54
1.10.4. Antagonistas de Glutamato.....	54
1.10.5. Agentes anti-inflamatorios.....	55
1.10.6. Ácido Tauroursodesoxicólico (TUDCA).....	55
1.11. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN ROEDORES.....	56
1.11.1. Identificación de la población de CGR en roedores	56
1.11.2. Cuantificación de la población de CGR en roedores	58
2. HIPÓTESIS	59

ÍNDICE

3. OBJETIVOS	63
4. MATERIALES Y MÉTODOS	67
4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	69
4.1.1. Descripción del modelo animal utilizado.....	69
4.1.2. Cuidados y mantenimiento	70
4.1.3. Procedimientos anestésicos.....	71
4.2. INYECCIÓN INTRAOCULAR	72
4.3. REGISTRO ELECTORRETINOGRÁFICO.....	73
4.3.1. Fuentes de iluminación	74
4.3.2. Preparación del animal.....	75
4.3.3. Técnica de registro.....	76
4.3.4. Protocolo de iluminación	78
4.3.5. Respuestas electrorretinográficas	79
4.4. INMUNOCITOQUÍMICA	81
4.4.1. Anticuerpos utilizados	81
4.4.2. Microscopía utilizada.....	84
4.4.3. Protocolos de inmunotinción	84
4.4.3.1. Inmunotinción de retina completa en plano.....	85
4.4.3.2. Inmunotinción de secciones transversales de retina	86
4.4.4. Recuento de células ganglionares de la retina. Cuantificación manual	89
4.5. MARCAJE ANTERÓGRADO DE LA VÍA ÓPTICA	90
4.5.1. Marcadores utilizados.....	90
4.5.2. Perfusión de los animales	91
4.5.3. Secciones encefálicas	92
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	93
5. RESULTADOS	95
5.1. RECuentos de células ganglionares de retina de ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS	97
5.1.1. Recuento de células ganglionares de retina ante la inyección	

intraocular con distintas dosis de KA	97
5.1.2. Recuento de células ganglionares de retina ante la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA	100
5.1.3. Recuento de células ganglionares de retina ante la inyección intraocular simultánea con distintas dosis de NMDA y KA	102
5.1.4. Recuento de células ganglionares de retina ante la inyección intraocular simultánea con una dosis de NMDA y KA seleccionada	104
5.2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA RETINA DE ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS	106
5.2.1. Valores electroretinográficos tras la inyección intraocular de dosis crecientes de KA. Comparación con los ojos control	108
5.2.1.1.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de KA sobre la onda STR. Comparación con ojos control	108
5.2.1.2.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de KA sobre la onda b escotópica. Comparación con ojos control	111
5.2.1.3.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de KA sobre la onda b fotópica. Comparación con ojos control	113
5.2.1.4.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de KA sobre la onda de potenciales oscilatorios. Comparación con ojos control	115
5.2.2. Valores electroretinográficos tras la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA. Comparación con los ojos control	117
5.2.2.1.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA sobre la onda STR. Comparación con ojos control	117
5.2.2.2.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA sobre la onda b escotópica. Comparación con ojos control	119
5.2.2.3.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA sobre la onda b fotópica. Comparación con ojos control	121
5.2.2.4.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA sobre la onda de potenciales oscilatorios. Comparación con ojos control	123
5.2.3. Valores electroretinográficos tras la administración de dosis conjunta de NMDA y KA en animales sometidos a inyección intraocular frente a los valores obtenidos en animales control	125
5.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RETINA DE ANIMALES	

ÍNDICE

SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.....	127
5.4. EFECTO DE LOS AGENTES NEUROPROTECTORES SOBRE LA Y FUNCIÓN DE LA RETINA DE ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.....	133
5.4.1. Análisis funcional de la retina tras ser sometida a la inyección intraocular con una dosis seleccionada de NMDA y KA y ser tratada con agente neuroprotectores.....	133
5.4.1.1. Efecto generado en la onda STR tras la administración de dosis conjunta de MDA y KA seleccionada en animales sometidos a la inyección intraocular y tratados con neuroprotección.....	134
5.4.1.2. Efecto generado en la onda b escotópica tras la administración de dosis conjunta de NMDA y KA seleccionada en animales sometidos a la inyección intraocular y tratados con neuroprotección.....	136
5.4.1.3. Efecto generado en la onda b fotópica tras la administración de dosis conjunta de NMDA y KA seleccionada en animales sometidos a la inyección intraocular y tratados con neuroprotección.....	138
5.4.1.4. Efecto generado en la onda de potenciales oscilatorios tras la administración de dosis conjunta de NMDA y KA seleccionada en animales sometidos a la inyección intraocular y tratados con neuroprotección.....	140
5.5. PROYECCIONES CENTRALES DE LA RETINA Y ANÁLISIS DE LA VÍA VISUAL EN ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.	142
6. DISCUSION.....	147
6.1. SELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL.....	149
6.2. SELECCIÓN DE LA RETINA COMO ZONA DE ESTUDIO.....	149
6.3. IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LA POBLACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN RATÓN ADULTO	150
6.4. CARACTERIZACIÓN DEL BRN3A COMO MARCADOR DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN RATÓN ADULTO	152

6.5. SELECCIÓN DE LAS AREAS DE RECuento CELULAR.....	152
6.6. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN RATÓN ADULTO	153
6.7. SELECCIÓN DE LA INYECCIÓN INTRAOCULAR COMO TÉCNICA GENERADORA DEL DAÑO CELULAR	154
6.8. DOSIFICACIÓN DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.....	155
6.9. ANALISIS FUNCIONAL DE LA RETINA EN ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR CON AGENTES EXCITOTOXICOS.....	157
6.10. TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA PROTECCIÓN DEL DAÑO CELULAR	158
6.11. ESTUDIO DE LA VÍA VISUAL TRAS LA INYECCIÓN INTRAOCULAR CON AGENTES LESIVOS.....	161
7. CONCLUSIONES.....	163
8. BIBLIOGRAFIA	167

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5metilisoazolil-4-propionato.

ARVO: Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain derived neurotrophic factor*).

BRn3a: Factor de transcripción BRn3a.

CGR: Células ganglionares de la retina.

CSF: Capa de los segmentos externos de los fotorreceptores.

CTX: Colerotoxina.

CCGR: Capa de células ganglionares de la retina.

CFN: Capa de fibras del nervio óptico

CNE: Capa nuclear externa.

CNI: Capa nuclear interna.

CNO: Cabeza del nervio óptico.

CNTF: Factor neurotrófico ciliar (*Ciliar neurotrophic factor*)

Cono L: Cono con sensibilidad de longitud de onda larga.

Cono M: Cono con sensibilidad de longitud de onda media.

Cono S: Cono con sensibilidad de longitud de onda corta.

CPE: Capa plexiforme externa.

CPI: Capa plexiforme interna.

CS: Colículo superior.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DE: Desviación estándar.

DLGN: Núcleo geniculado latero dorsal (*Dorso-lateral geniculate nucleus*).

DMSO: Dimetil sulfoxido.

EP: Epitelio pigmentario de la retina.

ERG: Electrorretinograma.

ERP: Electrorretinograma de potencial temprano de receptores.

FG: FluoroGold™ (2-hidroxiestilbeno-4,4'dicarboxamidinebis(metanosulfonato)).

FR: Fotorreceptores.

GABA: Ácido gamma-aminobutírico (ácido γ -aminobutírico).

GC: Guanilato Ciclasa.

GCAP: Proteína Activadora de la Guanilato Ciclasa.

GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales (*Glial derived neurotrophic factor*)

Glu: Glutamato.

Gly: Glicina.

GMPc: Guanosina cíclica monofosfato.

HEPA: Filtros de aire (*High Efficiency Particulate Air Filters*).

HTO: Hipertensión ocular.

IP3: Inositol trifosfato.

ipRGC: Células ganglionar intrínsecamente fotosensible (*Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells*).

ISCEV: Sociedad Internacional para la Electrofisiología clínica de la Visión (*International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*)

KA: Ácido kaínico.

LED: Diodos de emisión de luz (*Light emission diode*).

mfERG: Electrorretinograma multifocal .

mGluR: Receptores metabotrópicos para glutamato.

MLE: Membrana limitante externa.

MLI: Membrana limitante interna.

NGL: Núcleo geniculado lateral del tálamo.

NMDA: N -metil- D – aspártico.

NO: Nervio óptico.

ABREVIATURAS

- NOG:** Neuropatías ópticas glaucomatosas.
- NSQ:** Núcleo supraquiasmático.
- nSTR:** Respuesta umbral escotópica negativa.
- NTFs:** Factores neurotróficos (Neurotrophic factors).
- OCT:** Compuesto óptimo de temperatura de corte.
- OD:** Ojo derecho.
- OHS:** Hidroxistilbamidina metanosulfonato.
- OI:** Ojo izquierdo.
- p:** Probabilidad.
- PBS:** Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline).
- PFA:** Paraformaldehído.
- PhNR:** Respuesta fotópica negativa.
- PKC:** Proteína kinasa C.
- PO:** Potenciales oscilatorios.
- pSTR:** Respuesta umbral escotópica positiva.
- SF:** Capa de los segmentos de los fotorreceptores.
- SE:** Segmentos externos de los fotorreceptores.
- SI:** Segmentos internos de los fotorreceptores.
- SNC:** Sistema nervioso central.
- STR:** Respuesta umbral escotópica.
- TUDCA:** Ácido taurosodesoxicólico.
- VEP:** Potenciales visuales evocados.
- Wt:** *wild-type*.

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sección sagital del ojo humano	5
Figura 2.	Principales partes de las neuronas	6
Figura 3.	Organización laminar de la retina y los principales tipos de Neuronas	8
Figura 4.	Curvas de absorción espectral en conos y bastones en humanos	10
Figura 5.	Estructura de los fotorreceptores	12
Figura 6.	Microscopía electrónica de conos y bastones.	14
Figura 7.	Esquema del proceso de la fototransducción en los segmentos externos de los fotorreceptores.....	23
Figura 8.	Conexiones retinianas entre células.....	27
Figura 9.	Receptores de Glutamato.....	32
Figura 10.	Respuestas electrorretinográficas estándar en un ratón con visión normal.....	38
Figura 11.	La vía visual.....	41
Figura 12.	Esquema sagital del cerebro de ratón	44
Figura 13.	Ciclo del glutamato.....	46
Figura 14.	Imagen del ratón C57BL/6J.....	69
Figura 15.	Localización de la zona de inyección intraocular.....	72
Figura 16.	Proceso de inyección intraocular	73
Figura 17.	Fuentes de iluminación en los registros electrorretinográficos.	75
Figura 18.	Equipo de electrorretinografía.....	77
Figura 19.	Esquema representativo de la técnica de inmunohistoquímica para la detección de las proteínas Brn3a en el núcleo de las CGR.	86
Figura 20.	Esquema del proceso de marcaje inmunohistoquímico.....	89
Figura 21.	Molde de cerebro con coordenadas estereotáxicas.....	92

Figura 22. Imagen de una retina montada en plano e inmuno marcada con anti-cuerpo contra Brn3a.	98
Figura 23. Porcentaje de células ganglionares de la retina (CGR) en animales sometidos a inyección intraocular con distintas dosis de KA.....	100
Figura 24. Porcentaje de células ganglionares de la retina (CGR) en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA	102
Figura 25. Porcentaje de células ganglionares de la retina (CGR) en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis conjunta de KA y NMDA.	103
Figura 26. Porcentaje de células ganglionares de la retina (CGR) en una muestra de siete animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA	105
Figura 27. Registros electroretinográficos (ERG) en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM NMDA:KA bajo condiciones de luz escotópicas	107
Figura 28. Registros electroretinográficos (ERG) en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM NMDA:KA bajo condiciones de luz fotópica.	108
Figura 29. Registro electroretinográfico de la onda STR en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA.	110
Figura 30. Registro electroretinográfico de la respuesta de bastones en condiciones de luz escotópicas, en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA.	112
Figura 31. Registro electroretinográfico de la respuesta de conos, en condiciones de luz fotópicas, en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA.	114
Figura 32. Registro electroretinográfico de la onda de potenciales oscilatorios en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA.....	116
Figura 33. Registro electroretinográfico de la onda STR en animales sometidos a inyección intraocular con distintas dosis de NMDA.	118
Figura 34. Registro electroretinográfico de la respuesta de bastones en condiciones de luz escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA.....	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 35. Registro electroretinográfico de la respuesta de conos en condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA.....	122
Figura 36. Registro electroretinográfico de la onda de potenciales oscilatorios en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA.	124
Figura 37. Amplitud de ondas electroretinográficas (ERG) en un animal sometido a la inyección intraocular con 15:5 mM de NMDA: KA.....	125
Figura 38. Amplitud de las ondas electroretinográficas en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA.	127
Figura 39. Secciones transversales de retina en un animal sometido a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA y KA.....	128
Figura 40. Secciones transversales de retina de animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones combinadas de NMDA: KA.	130
Figura 41. Efecto lesivo de NMDA y KA sobre células bipolares de la retina de ratón.	132
Figura 42. Efecto de agentes neuroprotectores sobre la amplitud de la onda STR del electroretinograma en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA.....	135
Figura 43. Efecto de agentes neuroprotectores sobre la amplitud de la onda b del electroretinograma bajo condiciones de luz escotópicas de luz en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA.	137
Figura 44. Efecto de agentes neuroprotectores sobre la amplitud de la onda b del electroretinograma bajo condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA.	139
Figura 45. Efecto de agentes neuroprotectores sobre la amplitud de la onda de Potenciales Oscilatorios del electroretinograma en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA.	141
Figura 46: Corte histológico del cerebro de un animal sano tras el marcaje bilateralmente diferenciado de la vía óptica con colerotoxinas.....	143

Figura 47: Corte histológico del cerebro de un animal sometido a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA:KA en el ojo derecho (OD) ante el marcaje de ambas vías ópticas con colerotoxinas..... 144

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Protocolo ERG.....	78
Tabla II.	Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en protocolos de inmunotinción	83
Tabla III.	Características del DAPI.....	83
Tabla IV.	Densidad promedio de CGR (cel. /mm ²) en animales sometidos a la inyección intraocular con KA	99
Tabla V.	Densidad promedio de CGR (cel. /mm ²) en animales sometidos a la inyección intraocular con NMDA	101
Tabla VI.	Densidad promedio de CGR (cel. /mm ²) en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA.....	104
Tabla VII.	Valores de la amplitud de la onda STR (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA.	109
Tabla VIII.	Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA.....	111
Tabla IX.	Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA.....	113
Tabla X.	Valores de la amplitud de la onda de Potenciales Oscilatorios (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA.....	115

Tabla XI. Valores de la amplitud de la onda STR (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA.....	117
Tabla XII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA.....	119
Tabla XIII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA.....	121
Tabla XIV. Valores de la amplitud de la onda de Potenciales Oscilatorios (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA.....	123
Tabla XV. Valores de la amplitud de las ondas (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones de 30:10 mM de NMDA: KA (n=11).	126
Tabla XVI. Valores de la amplitud de la onda STR (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA: KA y tratados con BMD (n=3), el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5).....	134
Tabla XVII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA: KA y tratados con BMD (n=3), el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5).	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla XVIII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA: KA y tratados con BMD (n=3), el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5).....	138
Tabla XIX. Valores de la amplitud de la onda de Potenciales Oscilatorios (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA: KA y tratados con BMD (n=3), el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5).....	140

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA GENERAL OCULAR.

El ojo o globo ocular, es el órgano de la visión, responsable de la captación de la energía luminosa, su estructura esférica es ligeramente ovalada alcanzando un diámetro anteroposterior de 25-26 mm y un diámetro transversal de aproximadamente 23 mm en humanos, siendo de 3,37 mm y 3,32 mm los correspondientes valores en ratones (Remtulla y Hallet, 1985; Jeon y cols., 1998). El globo ocular está formado por tres capas o envolturas concéntricas de diferente naturaleza;

Capa Fibrosa; capa más externa formada por tejido conectivo denso avascular, compuesta por dos regiones; la esclerótica, (del griego skleros= duro) cubre la parte posterior y lateral, es opaca y de color blanco y su función principal es de protección; y la córnea que es la parte anterior con forma de lente convexa y transparente a través de la cual penetra la luz al interior del ojo. La esclerótica se une a la córnea por el limbo esclerocorneal.

Capa Vascolar o úvea; capa intermedia pigmentada y vascularizada. Está compuesta por tres partes: la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides, es de color oscuro y se yuxtapone a la esclera, su función es la de proporcionar oxígeno y sustancias nutritivas a la retina. El cuerpo ciliar, productor de humor acuoso, consta de músculo liso del cual se extienden los ligamentos suspensorios y cuya función consiste en el mantenimiento de la posición del cristalino, y en consecuencia, la acomodación de esta lente y el enfoque correcto. El iris es la región pigmentada del ojo que separa la cámara anterior de la cámara posterior, los pigmentos impiden la entrada de la luz en el ojo, excepto por la abertura circular central que deja, denominada pupila, cuyo tamaño es controlado por dos músculos de fibra lisa (el esfínter y el dilatador de la pupila (dilatación= midriasis; contracción= miosis).

Capa sensorial o retina; es la capa más interna, se extiende desde los músculos ciliares hacia la parte posterior del ojo. Es la encargada de recoger la información luminosa y enviarla al cerebro para su procesamiento. La retina contiene las células fotorreceptoras (conos y bastones) así como otras estructuras nerviosas. Dentro de la

retina se diferencian dos zonas, la fovea que es una zona especializada de la visión y el punto ciego que es la región de la retina por donde los axones de las células ganglionares salen del globo ocular formando el nervio óptico.

La estructura de capas retinianas en roedores es muy similar a la de los otros mamíferos, pero como diferenciación los roedores no poseen fovea, región especializada de la retina para la visión en detalle, como los humanos y primates. Pero si se diferencia una denominada estría visual, que corresponde con una región de alta densidad de CGR (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2009).

En el globo ocular también podemos diferenciar dos zonas; una zona anterior que se subdivide en una cámara anterior delimitada entre la córnea y el iris y una cámara posterior delimitada entre el iris y el cristalino; y una zona posterior desde el cristalino hacia la retina donde se encuentra la cámara vítrea que contiene el humor vítreo. La cámara anterior y posterior se encuentran bañadas en humor acuoso compuesto por un 99,6% de H₂O (de composición similar al líquido cefalorraquídeo), sirve como medio de nutrición y se renueva varias veces al día. Este líquido es imprescindible para mantener la presión intraocular. La cámara vítrea está constituida por un líquido gelatinoso (ácido hialurónico) incoloro y transparente responsable del mantenimiento de la presión intraocular frente a presiones externas y donde van a parar los pigmentos visuales que son desprendidos de la retina. El cristalino tiene forma de lente biconvexa, situado detrás del iris y fijado a los músculos ciliares. Su cara anterior es más plana que la posterior y se curva al contraerse el músculo ciliar y aflojarse el ligamento suspensor, fenómeno que recibe el nombre de acomodación del cristalino. En el roedor, el cristalino es prácticamente redondo y ocupa una gran parte de la cámara posterior del globo ocular.

INTRODUCCIÓN

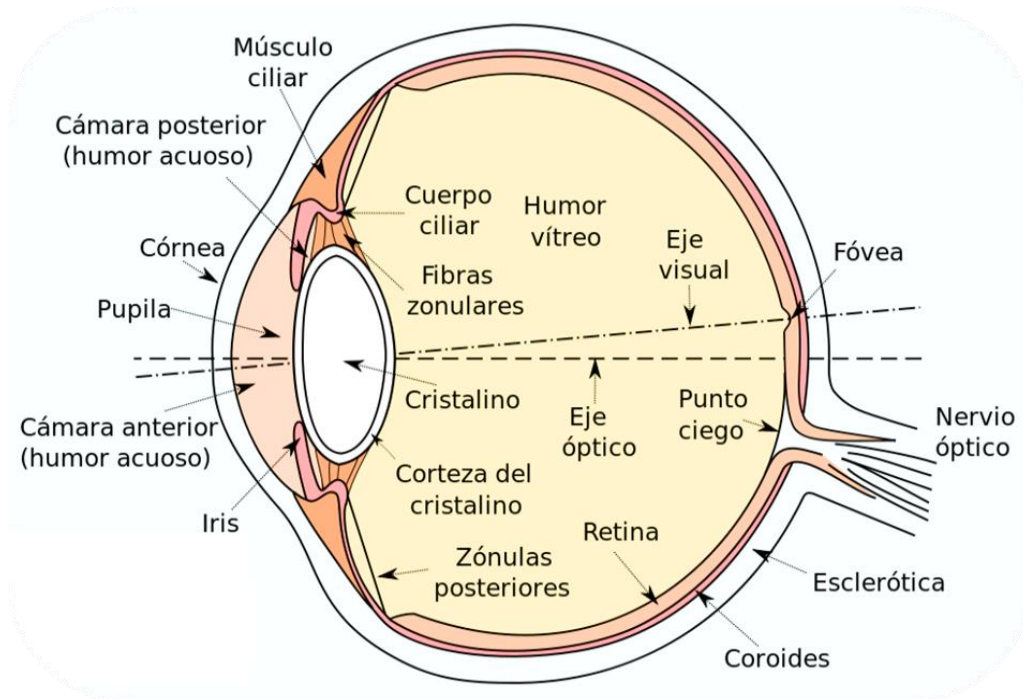


Figura 1. Sección sagital del ojo humano. Representación de las tres capas; Capa fibrosa (Córnea y Esclerótica); Capa vascular o úvea (Coroides, Cuerpo ciliar e Iris) y Capa sensorial o retina (Modificado de Eyesection.gif, Illustration of Human Eye).

El movimiento del globo ocular se produce por la acción de los músculos extra oculares, que son; cuatro músculos rectos (Recto superior, Recto inferior, Recto nasal, Recto temporal) y dos oblicuos (Oblicuo superior, Oblicuo inferior). En su parte posterior se observa el nervio óptico (NO), formado por los axones de las CGR, y junto a él la arteria central de la retina, que penetra en el ojo en la vaina de mielina que recubre al NO. Esta arteria procede de la arteria oftálmica y se divide en varias ramas a la entrada del globo ocular que se denominan arterias ciliares anteriores y posteriores (largas y cortas).

El sistema visual de los mamíferos es muy similar en cuanto a morfología y funcionalidad, por ello se utilizan modelos animales para estudiar de manera precisa los mecanismos patológicos. Por su fácil manejo, los roedores son el modelo animal más estudiado en la investigación del sistema visual (Huberman y Niell, 2011).

1.2. ORGANIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA RETINA.

En la retina se inicia el proceso de percepción visual debido a que las neuronas (células nerviosas), principal componente del sistema nervioso, reciben la información lumínica que llega a través de los medios oculares transparentes y la transforman en información eléctrica que es procesada y recibida por el cerebro. En las células nerviosas diferenciamos distintas zonas; el soma o cuerpo celular (contiene el núcleo de la célula, mitocondrias y organelas); las dendritas que son fibras que parten del cuerpo celular y el axón que es la fibra nerviosa principal. La función de la célula nerviosa es captar la información de las demás células a través de las dendritas y cuerpo celular y sumar, integrar y transmitir esa señal mediante el axón hacia otras células. La información es conducida a otras neuronas mediante sinapsis.

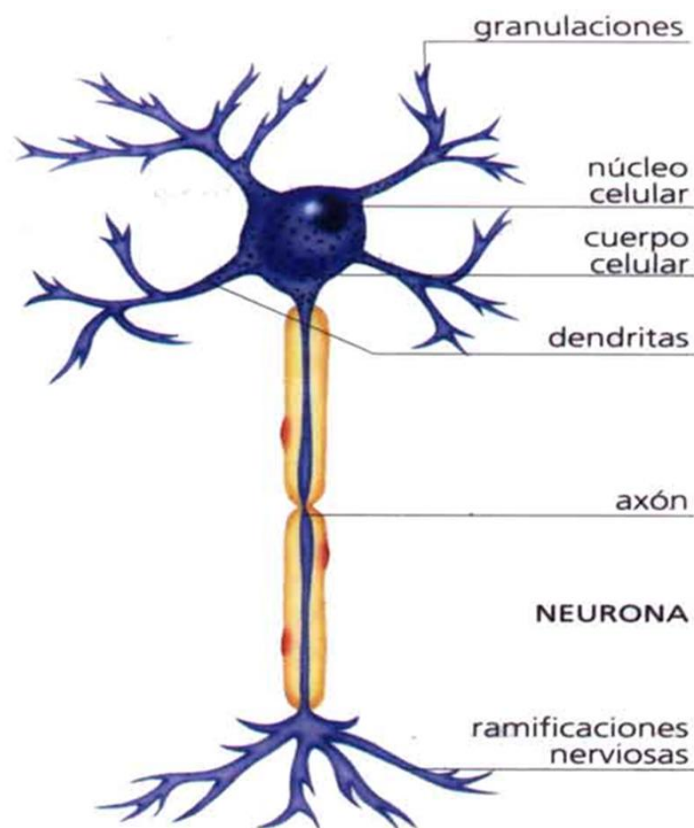


Figura 2. Principales partes de las neuronas. (Modificado de Tesis doctoral Caridad Galindo Romero, 2014).

INTRODUCCIÓN

La retina y sus células se estructuran mediante una serie de capas definidas y enormemente organizadas. Anatómicamente, podemos diferenciar tres capas nucleares donde se sitúan los cuerpos neuronales y dos capas formadas por un entramado de conexiones sinápticas efectuadas por los axones y dendritas de estas neuronas. También podemos describir la retina diferenciando dos zonas; El epitelio pigmentario de la retina (EP) y el neuro-epitelio. El epitelio pigmentario está formado por una monocapa de células epiteliales que le limita externamente con la coroides, contiene numerosos gránulos de pigmento y aunque no se considera parte de la retina neural cumple funciones imprescindibles en la fototransducción así como en la integridad de los fotorreceptores. El neuro-epitelio está constituido por nueve capas que son las siguientes:

1. Capa de los segmentos de los fotorreceptores (SF), capa formada por los segmentos externos (SE) e internos (SI) de las células fotorreceptoras de la retina.
2. Membrana Limitante externa (MLE), formada por una hilera de zónulas adherentes donde las células fotorreceptoras están unidas a las células de Müller que rodean y dan apoyo a los elementos nerviosos.
3. Capa Nuclear externa (CNE), aquí se localizan los somas o cuerpos celulares de los fotorreceptores. La capa de las fibras de Henle sólo se ve en la región de la mácula y está formada por axones de fotorreceptores que se elongan para permitir una gran concentración de segmentos externos en la fovea. Esta capa se sitúa entre los fotorreceptores y la sináptica o plexiforme externa.
4. Capa plexiforme externa (CPE), formada por los axones de los fotorreceptores y las dendritas de células bipolares y horizontales.
5. Capa nuclear interna (CNI), compuesta por los cuerpos celulares de células bipolares horizontales interplexiformes, amacrinas y ganglionares desplazadas, así como los cuerpos de las células de Müller.
6. Capa plexiforme interna (CPI), formada por los axones de las células bipolares y dendritas de células ganglionares, amacrinas e interplexiformes.
7. Capa de células ganglionares (CCGR), aquí se ubican los somas de las células ganglionares y de las células amacrinas desplazadas. Está constituida, en roedores, en igual proporción por las células ganglionares de la retina y las células amacrinas desplazadas (Draguer y Olsen, 1981; Perry, 1981; Jeon y cols., 1998).

8. Capa de fibras del nervio óptico (CFN), formada por los axones de las células ganglionares, los cuales abandonan la retina por el denominado cabeza del nervio óptico (CNO) formando el nervio óptico (NO). En esta capa también podemos encontrar astrocitos.
9. Membrana limitante interna (MLI), es la lámina basal de las células de Müller.

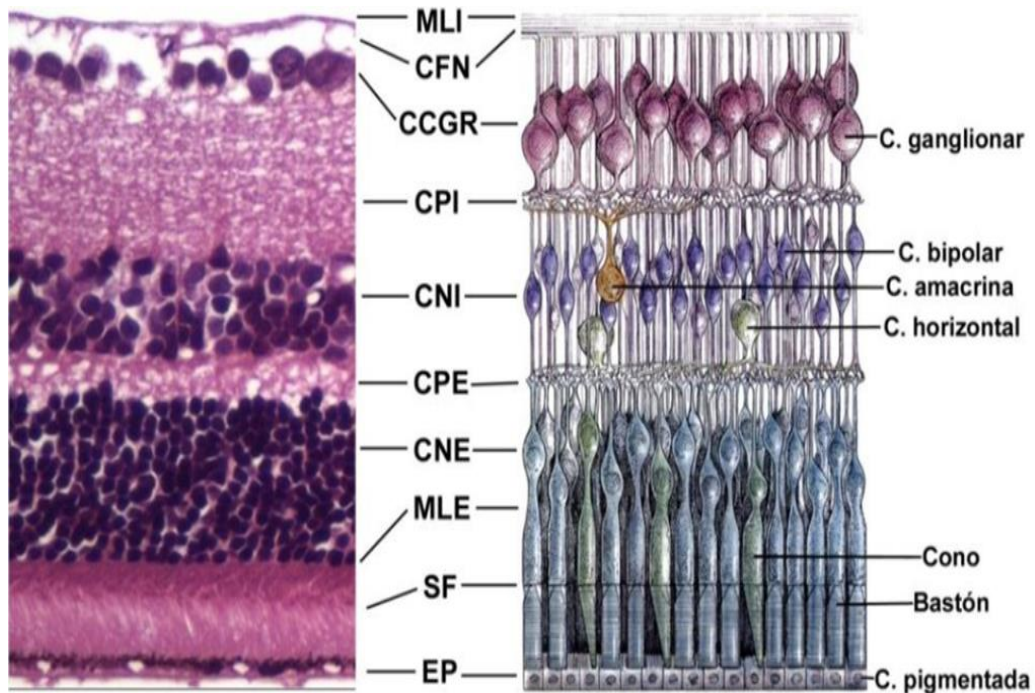


Figura 3: Organización laminar de la retina y los principales tipos de neuronas. Corte sagital de una retina de rata adulta teñida con hematoxilina-eosina (40X) donde se observan las diferentes capas (izquierda) y su correspondencia con el esquema representativo (derecha). MLI: membrana limitante interna; CFN: capa de fibras nerviosas de la retina; CCGR: capa de las células ganglionares de la retina; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; MLE: membrana limitante externa; SF: segmentos externos de los fotorreceptores; EP: epitelio pigmentario. Esquema modificado de “Ojo, cerebro y visión”, D. Hubel, 2000.

1.3. LAS CÉLULAS DE LA RETINA.

1.3.1. Epitelio pigmentario de la retina.

Embriológicamente no deriva de la retina neural y está formado por una lámina de células epiteliales fuertemente pigmentadas (contienen melanina) que cumple funciones imprescindibles de apoyo a las células fotorreceptoras, así como al proceso de la foto-transducción. Cabría mencionar la función de absorción de las radiaciones luminosas o cuantos de luz no capturados por los fotorreceptores evitando que la luz se refleje y vuelva de nuevo a excitar las células fotosensibles provocando distorsión en la imagen visual, así como la función de soporte metabólico entre coriocapilar y neuro-epitelio y contribuir a la renovación constante de los segmentos externos de los fotorreceptores.

1.3.2. Tipos celulares neuronales.

Se distinguen en la retina tres tipos de neuronas; las células fotorreceptoras (conos y bastones), las interneuronas (células horizontales, amacrinas, bipolares e interplexiformes) y las neuronas de proyección (células ganglionares de retina).

1.3.2.1. Células fotorreceptoras.

Constituyen la primera neurona de la vía óptica y se encargan de llevar a cabo el proceso de recepción de la señal luminosa mediante absorción de las radiaciones luminosas, transformándolo en un impulso eléctrico (fototransducción) y transmitiéndolo al circuito de la retina. Tradicionalmente se han descrito dos tipos de células fotorreceptoras en mamíferos, los conos y los bastones.

Los conos presentan una resolución espacial y temporal alta, son sensibles a mayor intensidad de luz por lo que son los responsables de la visión diurna (fotópica) y de la discriminación de los colores (Dowling, 1987).

Se describen distintos tipos de conos de acuerdo a su distinta sensibilidad espectral, cada tipo funcional de cono presenta su pico de máxima sensibilidad espectral a una longitud de onda distinta del espectro de las radiaciones electromagnéticas.

En los primates existen tres tipos de conos (Guyton y Hall, 2006; Kandel y cols., 2001);

Cono L (“L” de “*long wavelength*”, o larga longitud de onda) también denominado cono rojo tiene máxima sensibilidad, máxima absorción en 564nm.

Cono M (“M” de “*medium wavelength*” o media longitud de onda) también denominado cono verde, tiene máxima absorción a 534nm.

Cono S (“S” de “*short wavelength*” o corta longitud de onda) también denominado cono azul tiene máxima absorción a 420nm.

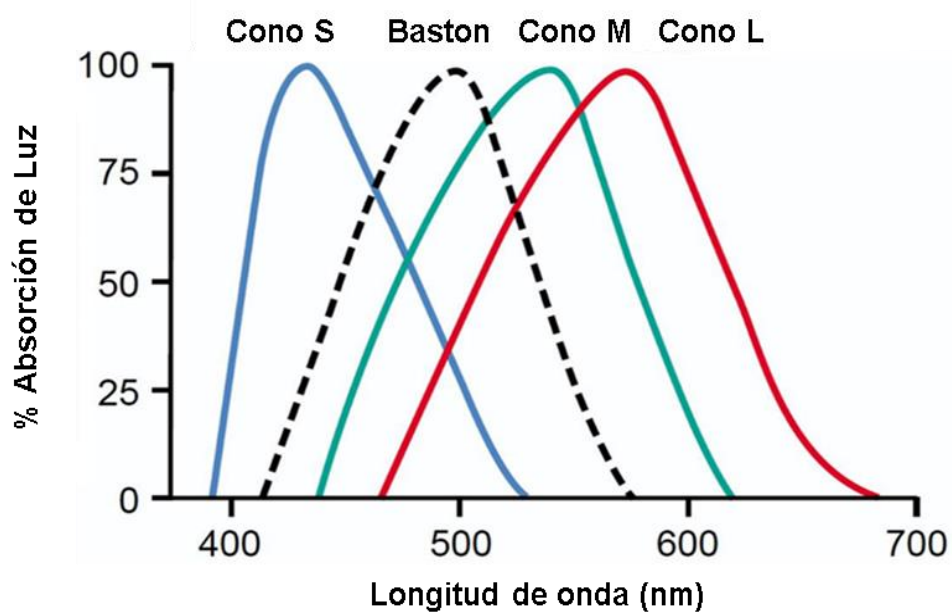


Figura 4. Curvas de absorción espectral en conos y bastones en humanos. En ordenadas, porcentaje de absorción de la luz. En abscisas, longitud de onda expresada en nanómetros. Cono Azul (S), absorción máxima a 420nm; Cono Verde (M), absorción máxima a 534nm; Cono rojo (L), absorción máxima a 564nm. Bastones absorción máxima a 498nm. (Modificado de Bowmaker y Dartnall, 1980).

INTRODUCCIÓN

En los roedores existen solamente dos tipos de conos: los conos S, que expresan la opsina S (Bowmaker y cols., 2006) y los conos L, que expresan la opsina LWS, opsina que es sensible a la luz verde (Jacobs y cols., 2001). También se ha documentado la existencia de conos duales en roedores, conos que expresan ambas opsinas (Ortín-Martínez y cols., 2010, 2014). En rata, los conos L son los más numerosos y se distribuyen por toda la retina, con la mayor densidad en la zona central. Los conos S suponen un 15% de la población total de conos y su mayor densidad se encuentra en la periferia de la retina. Por su parte, los conos duales suponen un 3% de la población total de conos y, al igual que los conos S, su densidad es mayor en la periferia de la retina (Ortín-Martínez y cols., 2010). En el ratón pigmentado, se ha descrito que existe un número similar de conos S, de conos L y de conos duales en la retina (Ortín-Martínez y cols., 2014). Los conos L presentan una distribución similar a la de las retinas de rata, encontrándose una zona de mayor densidad en la zona central de la retina. Sin embargo, la distribución de los conos S difiere con respecto a la distribución de los conos S de la rata; en el ratón, los conos S presentan una mayor densidad en la zona inferotemporal de la retina (Ortín-Martínez y cols., 2014).

Los bastones tienen una resolución espacial y temporal baja y son extremadamente sensibles a la luz por ello son responsables de la visión nocturna (escotópica), utilizados por los animales en situaciones de escasa luminosidad (amanecer y crepúsculo) o para la visión nocturna, cuando los estímulos lumínicos son demasiados débiles para producir excitación de los conos. A diferencia de los conos, sólo hay un tipo de bastón, sensible a longitudes de onda en torno a los 500 nm (Kandel y cols., 2001).

Conos y bastones se distinguen entre sí por; su morfología, tipo de fotorreceptor, distribución en la retina y patrón de conexiones sinápticas. La morfología de los fotorreceptores es alargada y su estructura está polarizada para poder realizar sus dos funciones principales: por un extremo (el externo) reciben y procesan la energía luminosa y por el otro (el interno) la transmiten. En el fotorreceptor se puede describir las siguientes estructuras, desde las capas más externas a las más internas de la retina: segmento externo, pedúnculo de conexión, segmento interno, soma, axón o fibra interna y terminal sináptico.

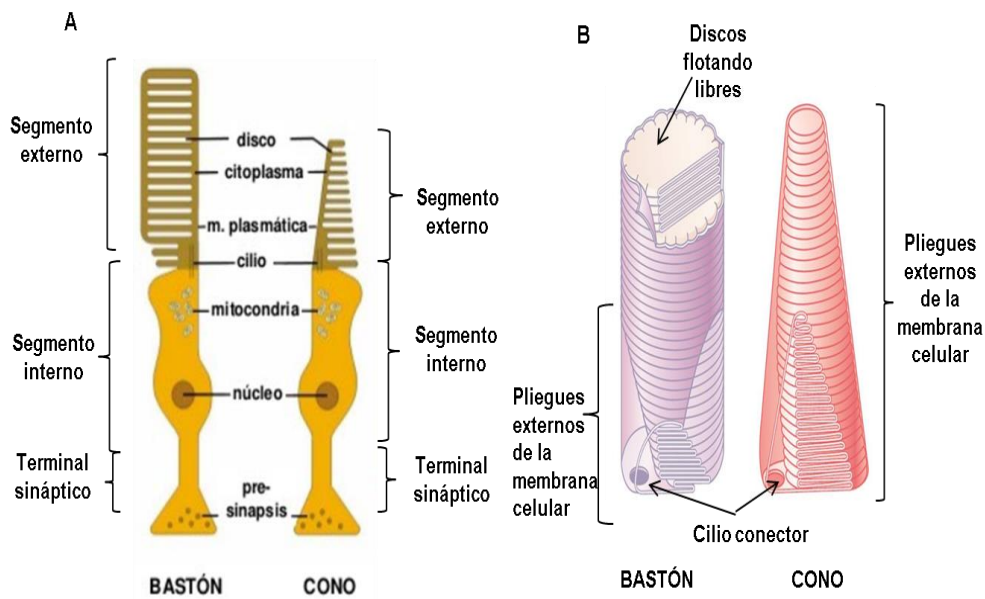


Figura 5. Estructura de los fotorreceptores. A, morfología de los fotorreceptores; B, Detalle del segmento externo de los fotorreceptores. (Modificado de Fisiología Guyton ,2006).

Los pigmentos visuales que se encuentran en los segmentos externos están formados por una parte proteica (rodopsina en los bastones y opsinas en los conos) y un cromóforo derivado de la vitamina A, el 11-cis retinaldehído. La sensibilidad espectral de los fotorreceptores se debe a la opsina y a su espectro de absorción.

Los fotones, o unidades simples de luz visible, son absorbidos por el cromóforo que cambia su conformación a 11-trans retinaldehído. Este cambio de conformación inicia, a su vez, una serie de cambios conformacionales en la parte proteica del pigmento, cambios que dan lugar en última instancia a un cambio del potencial de la membrana plasmática que provoca la hiperpolarización de los fotorreceptores y un cambio (disminución) en la cantidad de liberación del neurotransmisor glutamato en el pie sináptico del fotorreceptor.

La proporción entre conos y bastones varía entre las distintas clases de vertebrados, desde animales en cuya retina prácticamente no existen conos (como las aves nocturnas; Tarrés y cols., 1986) hasta animales donde los conos representan la práctica totalidad de los fotorreceptores (como las ardillas, West y Dowling, 1975). Esta proporción incluso es distinta para especies dentro de la misma clase.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los vertebrados presenta una distribución homogénea de fotorreceptores, con iguales densidades y proporciones en toda la retina. Sin embargo, en algunos animales existe una distribución topográfica de los fotorreceptores con mayor densidad de conos en unas regiones retinianas y mayor densidad de bastones en otras. En la retina de los primates, diferenciamos la fovea que es un área donde sólo hay conos y la papila óptica en la que no hay fotorreceptores porque corresponde a los axones de las células ganglionares que salen del globo ocular formando el nervio óptico y que supone una mancha ciega para el campo visual.

En la retina murina existe una mayor proporción de bastones que de conos, llegando éstos últimos escasamente al 1% del total de los fotorreceptores (Haverkamp y Wässle, 2000). Se puede considerar que en la retina de ratón no existe fovea.

Los fotorreceptores hacen sinapsis con dos tipos de células, las horizontales y las bipolares. Los circuitos que unen a los conos y los bastones con las CGR contribuyen al proceso de modulación de la información nerviosa en la retina. Una de las principales diferencias entre ambos circuitos es su grado de convergencia. Cada célula bipolar de bastón contacta con varios bastones y diferentes células bipolares de bastón contactan con varias células amacrinas. En contraste, el circuito de los conos es mucho menos convergente, sobre todo en la mácula. Este tipo de relación menos convergente es la necesaria para que la agudeza visual sea máxima en la mácula. Sin embargo, el hecho de que el circuito de los bastones sea más convergente lo convierte en un mejor detector de luz, ya que la unión de pequeñas señales provenientes de diferentes bastones genera una respuesta mayor en la célula bipolar. Además, existen diferencias en los mecanismos de transducción utilizados por los conos y los bastones, lo que hace que respondan de diferente forma a una intensidad determinada de luz; así, un bastón responde de forma clara al estímulo provocado por un único fotón, mientras que para provocar una respuesta similar en un cono necesitaríamos más de 100 fotones (Mustafi y cols., 2009). Otro aspecto a tener en cuenta es que la convergencia reduce la resolución espacial en el sistema de los bastones.

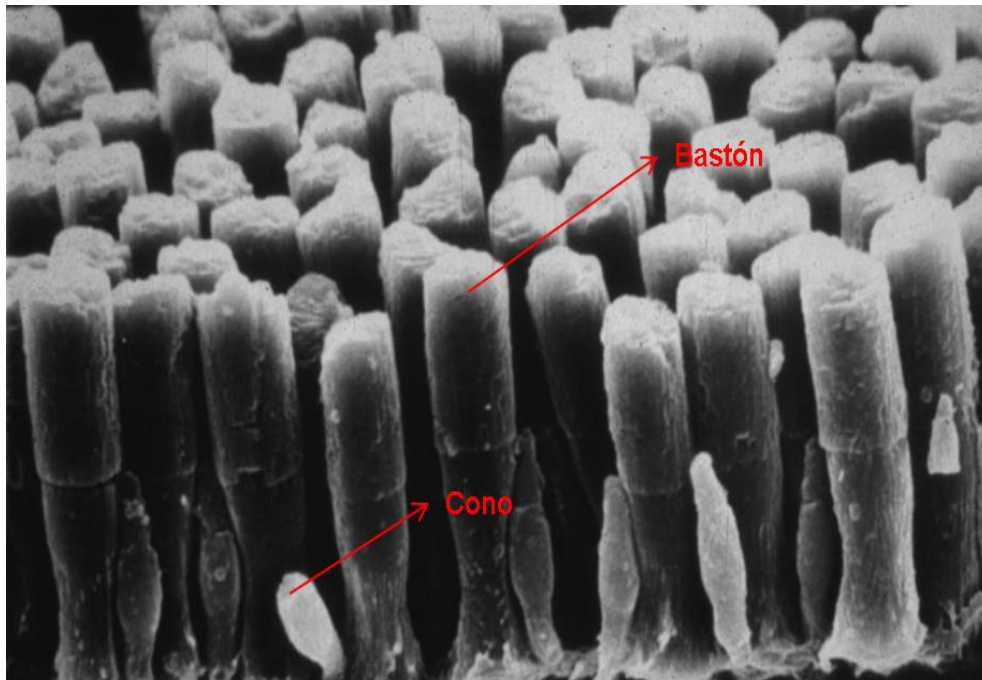


Figura 6. Microscopía electrónica de conos y bastones. Imagen de la morfología del segmento externo de conos y bastones tal y como se observa en la Microscopía Electrónica de Barrido (Modificado de Schnapf y Baylor, 1987).

1.3.2.2. Células bipolares.

Constituyen la segunda neurona de la vía óptica. Se extienden desde la capa plexiforme externa hasta la interna, situándose de modo vertical con respecto a las capas de la retina. Su cuerpo está en la capa nuclear interna y tienen dendritas que ascienden por la capa plexiforme externa donde hacen conexión con las células fotorreceptoras y el axón se ramifica en la capa plexiforme interna donde hacen sinapsis con las células ganglionares y las amacrinas.

En la retina de ratón, se ha estimado que constituyen aproximadamente el 40% de las células cuyo soma está localizado en la capa nuclear interna (Jeon y cols., 1998; Haverkamp y Wässle, 2000). Se han realizado múltiples clasificaciones de células bipolares, si bien, lo que diferencia a unas de otras es el tipo de fotorreceptor con quien establece sinapsis y la distinta localización de sus terminales axónicas en el espesor de la capa plexiforme interna.

Cajal (1893) describió dos tipos básicos de células bipolares; bipolares de bastón y bipolares de cono. Hasta la fecha, se ha descrito un solo subtipo de células bipolares

INTRODUCCIÓN

de bastón, cuya terminal axónica se arboriza en la sublámina más interna de la capa plexiforme interna. Sin embargo, se han descrito al menos 9 tipos de células bipolares de cono (Boycott y Wässle, 1991; Wässle, 2004).

Funcionalmente, las células bipolares se dividen en células ON y células OFF, en función de su respuesta a la luz. Las células bipolares de tipo OFF se hiperpolarizan cuando los fotorreceptores con los que contactan reciben un estímulo luminoso y se despolarizan cuando se suprime el estímulo luminoso sobre sus fotorreceptores. Las células bipolares de tipo ON se despolarizan cuando los fotorreceptores con los que contactan reciben un estímulo luminoso y se hiperpolarizan cuando se suprime el estímulo luminoso sobre sus fotorreceptores (Ghosh y cols., 2004). Las células bipolares de bastón son todas ellas de tipo ON, mientras que las células bipolares de cono pueden ser de tipo ON o de tipo OFF.

1.3.2.3. Células horizontales.

Como ya describiera Cajal (1893), las células horizontales son neuronas típicas cuyos cuerpos se encuentran en la capa nuclear interna y sus ramas dendríticas se encuentran en la capa plexiforme externa donde establecen conexiones sinápticas con los fotorreceptores. De su soma parte un axón fino que se dispone horizontalmente y se arboriza en terminales axónicas muy finas que también establecen sinapsis con los fotorreceptores. Aunque la tipología y conexiones de las células horizontales varía enormemente de unos vertebrados a otros, su disposición horizontal ha llevado a pensar que representan un papel fundamental en los mecanismos de inhibición lateral, regulando la información que pasa de los fotorreceptores a las células bipolares en circuitos de retroalimentación.

En mamíferos primates existen tres tipos de células horizontales (Ahnelt y Kolb., 1994). En retina de ratón sólo hay un tipo de célula horizontal, equivalente a uno de los tipos de célula horizontal de los primates. Son células de axón corto, que establecen sus conexiones sinápticas a nivel de la capa plexiforme externa. Las células horizontales de ratón constituyen aproximadamente el 3 % de las células de la capa nuclear interna (Haverkamp y Wässle, 2000). Las conexiones de las células horizontales con los fotorreceptores muestran cierta especificidad. Las dendritas que

parten del soma celular establecen conexiones con los pedículos o terminales axónicas de los conos, mientras que sus ramificaciones axónicas hacen conexión exclusivamente con las esférulas o terminales axónicas de los bastones.

1.3.2.4. Células amacrinas.

En cuanto a las células amacrinas, existen varios tipos en función de su tamaño, morfología y función. Aunque no se ha llegado a un acuerdo sobre la forma de clasificarlas, se estima que los tipos de células amacrinas en retina de mamíferos puede ser de 20 a 30 subtipos (Haverkamp y Wässle, 2000). En retina de ratón, constituyen el 41% de todas las células de la capa nuclear interna (Haverkamp y Wässle, 2000; Jeon y cols., 1998). Estas neuronas tienen numerosas dendritas, pero carecen de axón. Su cuerpo se encuentra en la capa nuclear interna y sus dendritas se extienden a la capa plexiforme interna conectándose entre sí y con los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares. Al igual que las células horizontales, las células amacrinas, son células de asociación lateral, que regulan la actividad eléctrica de sus células postsinápticas, bipolares y ganglionares. Responden a la estimulación de la retina con una despolarización o una hiperpolarización, generalmente transitoria, dependiendo del tipo de estímulo luminoso y de la localización del estímulo dentro de su campo receptor (Lagnado, 1998). El papel funcional de las células amacrinas sería modular las características temporo-espaciales de las señales transmitidas por las células bipolares.

1.3.2.5. Células interplexiformes.

Proporcionan una vía centrífuga para transportar señales desde la capa plexiforme interna a la externa.

1.3.2.6. Células ganglionares.

Las células ganglionares de retina (CGR), son las únicas neuronas de la retina que proyectan sus axones fuera de la misma, formando en su conjunto el nervio óptico. Son las encargadas de enviar la información visual, una vez codificada por el resto de

INTRODUCCIÓN

las células retinianas anteriormente descritas, hacia otros centros nerviosos mediante la creación de potenciales de acción. En ratón, las CGR proyectan sus axones predominantemente sobre los colículos superiores (Salinas Navarro y cols., 2009a, 2009b).

La morfología de las CGR en mamíferos fue descrita por Cajal ya en 1899, basándose en el tamaño del soma, en su morfología y en la posición de sus dendritas, las clasificó en: monoestratificadas (con uno o varios tallos dendríticos que ascienden para hacerse horizontales en uno de los pisos de la plexiforme interna), bi o poliestratificadas (con árboles dendríticos que acaban en dos o más estratos de la plexiforme interna) y CGR difusas (cuyas dendritas recorren oblicuamente todo o casi todo el espesor de la capa plexiforme interna, sin mostrar predilección por ningún tipo).

Desde entonces, las CGR en roedores se han seguido clasificando en función del tamaño de su soma y la morfología de sus dendritas (Fukuda, 1977; Perry, 1979; Ni y Dreher, 1981; Perry y cols., 1983;; Dreher y cols., 1985; Dann y Buhl, 1987; Peichl, 1989; Tauchi y cols., 1992). Fukuda (1977) fue el primero en clasificar las CGR de rata en tres grandes grupos según el tamaño del soma. Las CGR grandes tienen diámetros mayores a 14,5 μm , se distribuyen de forma regular por toda la retina, y constituyen el 5% del total de CGR. Las CGR medianas tienen diámetros de entre 11,5 y 14,5 μm , predominan en la zona central de la retina, y representan aproximadamente un 30% del total de las CGR. Por su parte, las CGR pequeñas tienen un diámetro de entre 6 μm y 11,5 μm , se distribuyen regularmente por la retina y constituyen aproximadamente un 65% del total de CGR. Estos tres tipos de tamaño se han correlacionado también con axones de diferente grosor y velocidad de conducción y, recientemente, con la expresión de los factores de transcripción Pou4f (Nadal-Nicolás y cols., 2012). Más tarde, siguiendo también criterios morfológicos y utilizando la tinción de Golgi, Perry (1979) dividió las CGRs en tipos I, II, y III, aunque esta técnica presentaba el problema de que, en ocasiones, las células teñidas no podían distinguirse como CGRs de forma inequívoca, porque los axones no se visualizaban siempre. Posteriormente, Ni y Dreher (1981) y Dreher y cols., (1985), marcando retrógradamente con peroxidasa las CGR, subdividieron los tipos II y III de Perry en dos subclases cada uno, con la dificultad de que esta técnica tampoco

permitía en ocasiones el marcaje completo de los árboles dendríticos de las CGR. Utilizando técnicas de inyección intracelular (Tauchi y cols., 1992) identificaron nuevos tipos morfológicos de CGRs no descritos hasta entonces y subdividieron el tipo I de Perry en otras dos subclases que llamaron alfa y delta por su parecido a las células alfa y delta del gato (Boycott y Wässle, 1974). Ante la gran cantidad de clasificaciones y la existencia de solapamientos entre muchas de ellas, en la última década se han producido nuevos intentos de clasificación de las CGR, en un afán por aclarar y simplificar las previas (Badea y Nathans, 2004; Sun y cols., 2002). Huxlin y Goodchild (1997), tiñendo las CGRs con DiI o neurobiotina, las clasificaron en células A (somas y diámetro de campo dendrítico grandes), B (somas y diámetro de campo dendrítico pequeños), y C (somas y campo dendrítico de tamaño pequeño-mediano). Kong y cols., (2005) idearon un sistema informático que permitía la división de las CGR en 13 tipos utilizando 26 parámetros morfológicos del árbol dendrítico de las mismas (nivel de estratificación, extensión, densidad de las arborizaciones, etc.). En la práctica, sin embargo, muchas de estas clasificaciones son difíciles de utilizar y no tienen relevancia para el propósito del estudio, por lo que en la mayoría de los casos siguen empleándose las más sencillas de ellas, como las de Fukuda o Perry.

Recientemente, se ha descubierto en retina de mamífero, un nuevo tipo de célula ganglionar, las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs, *intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells*) (Berson, 2003). Dichas células contienen un pigmento visual (la melanopsina) que las hace sensibles a estímulos luminosos. Estas células constituyen del 1 al 3% de toda la población de células ganglionares de la retina. Sus proyecciones axónicas alcanzan el núcleo supraquiasmático (NSQ), ciertos centros visuales subcorticales y el cerebro medio o pretectum (Berson, 2003). Los estudios electrofisiológicos realizados en las ipRGCs revelan que son intrínsecamente sensibles a la luz, pues responden incluso cuando la transmisión sináptica entre las células retinianas es bloqueada farmacológicamente. Funcionalmente, parecen estar implicadas en la regulación del ritmo circadiano y el reflejo pupilar (Wässle, 2004). También encontramos CGR “desplazadas” localizadas en la capa plexiforme y nuclear interna (Dreher y cols., 1985, Linden, 1986). Se les llama células de Dogiel (Dogiel, 1888) y suponen aproximadamente el 0,35% de la población total de CGRs de la rata y el 1-2% en ratón (Dräger y Olsen, 1981). Sus

INTRODUCCIÓN

características morfológicas son similares a las CGR no desplazadas, se localizan en la zona periférica temporal inferior y proyectan de manera contralateral.

También existen CGRs de asociación, cuyos axones no proyectan fuera de la retina, fueron descritas inicialmente en retinas humanas y de perro (Gallego y Cruz, 1965), y posteriormente se han observado en rata y ratón (Drager y Hofbauer, 1984).

1.3.3. Tipos celulares no neuronales. Células gliales.

En la retina de los mamíferos, además de células de naturaleza neuronal, existen células neurogliales, y se han descrito tres tipos de células de glía: Células de Müller, Astrocitos y Microglía (Davies y cols., 2006).

1.3.3.1. Células de Müller.

Células de gran tamaño que se extienden a lo ancho de toda la retina de manera radial, encontrándose sus somas en la CNI, aunque sus prolongaciones llegan a alcanzar la MLE y la MLI. La función de estas células además de aportar el sustento metabólico a las neuronas retinianas, también desarrolla acciones de limpieza de productos de desecho metabólico, reciclaje de aminoácidos de los neurotransmisores liberados en las sinapsis, control de la homeostasis y protección frente a los cambios en el ambiente iónico. (Bringmann y Reichenback, 2001; García y cols., 2002).

1.3.3.2. Astrocitos.

Células con forma estrellada que tienen su soma en la capa de CGR y excepcionalmente en la CNE. Rodean las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos proporcionando el soporte estructural y metabólico, así como la participación en la detoxificación durante procesos de envejecimiento. (Ramírez y cols., 1996, 2001). A diferencia de los humanos o primates, los roedores no tienen lamina cribosa en la cabeza del nervio óptico, en su lugar poseen una extensa lámina celular de astrocitos que rodea las fibras del nervio óptico.

1.3.3.3. Células microgliales.

Las células microgliales aparecen en todas las capas de la retina y del NO, tienen pequeño tamaño y morfología variable (procesos cortos e irregulares), forman parte del sistema inmune siendo su función fagocítica (Sobrado-Calvo y cols., 2007; Galindo-Romero y cols., 2013).

1.3.3.4. Oligodendrocitos.

El nervio óptico, o II par craneal, está formado por la unión de todos los axones de las CGR que convergen formando la papila o disco óptico, forma parte del SNC y, como tal, sus axones son mielinizados por oligodendrocitos (mientras que en los nervios periféricos la mielina la generan las células de Schwann).

En su trayectoria podemos diferenciar distintas partes; ***parte intraocular***, formada por los axones de las células ganglionares de retina que convergen en la papila óptica perforando las capas superficiales (esclerótica y coroides) en lo conocido como zona cribosa; ***parte intraorbitaria***, el nervio queda convertido en un cono formado por los músculos rectos oculares, y sumergiéndose en la grasa retroocular. En el vértice de la órbita, cruza el anillo fibroso de inserción muscular (anillo de Zinn) teniendo contacto con la arteria oftálmica y con el ganglio oftálmico; ***parte intracanalicular***; el nervio atraviesa el foramen óptico con la arteria oftálmica, en esta zona es frecuente la lesión del nervio óptico por fracturas que implican a la base del cráneo o al vértice de la órbita; ***parte intracraneal***, comprende la trayectoria desde el foramen óptico hasta llegar al quiasma óptico, aquí el nervio está situado sobre la hipófisis y el canal óptico del esfenoides.

1.4. ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LA RETINA.

1.4.1. Fototransducción.

La fototransducción o transducción visual es el proceso por el cual la energía luminosa (fotones) es transformada por las células de la retina (conos y bastones) en energía electroquímica. La energía luminosa genera en las células una variación eléctrica de su potencial de membrana que se propaga a lo largo de la membrana celular hasta los terminales axónicos, lugar donde se lleva a cabo la liberación de neurotransmisores. El neurotransmisor liberado (glutamato) provoca cambios en los potenciales de membrana sobre sus células post-sinápticas (células bipolares y células horizontales) que serán transmitidos a lo largo de la membrana celular hasta las terminaciones distales. Las células ganglionares son las últimas células sinápticas y por tanto son ellas las que envían la información visual mediante potenciales de acción a través del nervio óptico.

En oscuridad, en los bastones de la retina, los niveles de la guanosina cíclica monofosfato (GMPc) en el citoplasma celular están elevados lo que provoca la apertura de los canales dependientes de GMPc, permitiendo la entrada de cargas iónicas hacia el interior del segmento externo, principalmente Na^+ y Ca^{2+} (Lagnado, 2000), generando una corriente eléctrica (corriente oscura). El proceso de fototransducción se inicia con la absorción de luz por la rodopsina (pigmento visual de los bastones) que provoca un cambio conformacional en el cromóforo (provocando la isomerización del retinal cambiando del 11-cis-retinal a 11-trans-retinal). Este cambio determina la separación entre cromóforo y opsina, con la consiguiente activación de la misma. La rodopsina activada, activa a su vez una proteína G, la Transducina, que a su vez activa una enzima, la fosfodiesterasa del GMPc.

La captura de un fotón de luz por el pigmento visual causa una disminución en la concentración de GMPc que determina el cierre de los canales dependientes de GMPc, el cese de corriente de entrada y por tanto un cambio en el potencial de membrana consistente en la hiperpolarización del fotorreceptor.

El proceso de fototransducción en los conos sería similar al realizado en los bastones, si bien sus pigmentos visuales (fotopsinas) presentan una menor sensibilidad a la luz y son necesarios "cientos" de fotones para producir el cambio conformacional del cromóforo (Guyton y Hall, 2006).

La fototransducción actúa como una cascada bioquímica de amplificación, de manera que la "captura" de un simple fotón en el segmento externo de un bastón provoca el cierre de cientos de canales iónicos. La capacidad de amplificación de esta cascada no es constante; dependiendo de la "luz de fondo" que reciba el fotorreceptor, el efecto producido por un estímulo luminoso será mayor o menor. Estos fenómenos han sido ampliamente descritos dentro de los procesos fisiológicos de adaptación (Lagnado, 2000).

Una vez finalizado el estímulo luminoso, el pigmento visual activado ha de inactivarse. Cuanto mayor sea la velocidad en la que puede ocurrir esta recuperación más rápido podrá la célula detectar el estímulo siguiente, y así el sistema visual detectar la llegada de una nueva señal lumínica. Al igual que otras células de la retina, los fotorreceptores no tienen capacidad de división mitótica, pero sus segmentos externos están sometidos a una renovación constante. Los discos de membrana en los bastones se desprenden de forma continua de la porción más apical del segmento extremo y son eliminados por la actividad fagocitaria de las células del epitelio pigmentario (Haines, 2003; Kandel, 2001). La rodopsina de los bastones tras finalizar el estímulo luminoso tiene que recuperarse mediante inactivación. Para ello interviene la rodopsina kinasa o recoverina, enzima que fosforila residuos de serina y treonina de la rodopsina, inactivándola. A su vez, otra proteína, la arrestina, se une a la rodopsina fosforilada impidiendo que así pueda unirse a la transducina y con ello paralizar el proceso bioquímico de la activación.

Para que los niveles de nucleótidos cíclicos se recuperen en la oscuridad, tanto conos como bastones expresan la guanilato ciclasa (GC) que sintetiza GMPc. La actividad de la GC está regulada negativamente por la concentración de calcio intracitoplásmica. Como ya se ha comentado, en la oscuridad existe un flujo de calcio hacia el interior del segmento externo, que es equilibrado por el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$. Cuando el fotorreceptor es iluminado, los canales de

INTRODUCCIÓN

calcio se cierran y esto hace decrecer la concentración de calcio intracelular; este descenso de calcio es detectado por una "Proteína Activadora de la Guanilato Ciclasa" (GCAP). Estas proteínas se asocian con la parte citoplásmica de la guanilato ciclasa, de manera que cuando la concentración de calcio disminuye hace que el calcio se separe de las GCAP estimulando la ciclasa que sintetiza GMPc (Fain, 2003). La resíntesis del GMPc induce de nuevo la apertura de los canales iónicos en la membrana del segmento externo, con lo que el fotorreceptor recupera su potencial de membrana original.

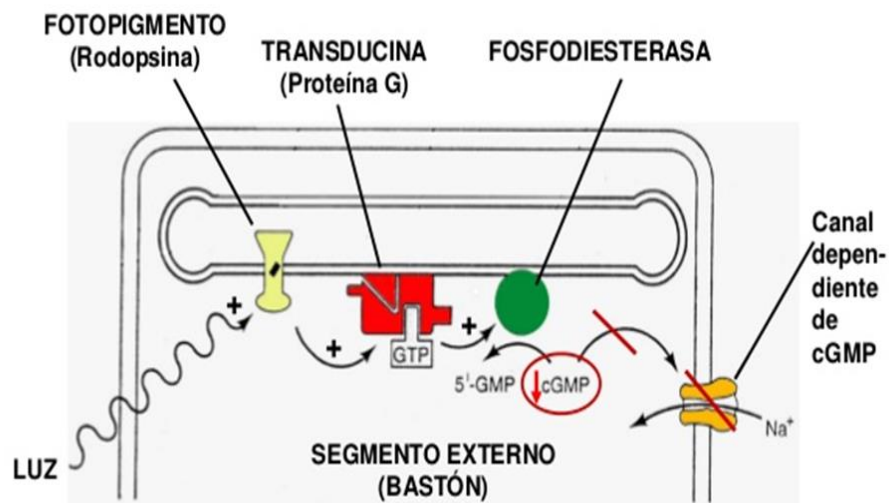


Figura 7. Esquema del proceso de la fototransducción en los segmentos externos de los fotorreceptores. (Adaptada de Kandel, Shwartz y Jessell, 2001).

Los fotorreceptores de la retina de vertebrados tienen cierta capacidad para adaptarse a un estímulo luminoso constante. El calcio juega un papel clave en la adaptación tanto de conos como de bastones, pues modula la actividad de la GC. En presencia de un fondo de luz, existe un incremento de hidrólisis de GMPc por la fosfodiesterasa y, por el mecanismo descrito más arriba, una disminución de la concentración de calcio intracelular. Mientras que el calcio decrece, la actividad de la GC aumenta hasta que la síntesis de GMPc se iguale a la hidrólisis. Esto causa que una fracción de los canales se reabra previniendo que el bastón se sature con la luz de fondo y

permitiendo al receptor responder continuamente, incluso cuando la estimulación se produce de forma mantenida.

Si los fotorreceptores de la retina han estado expuestos a una luz radiante (*condiciones fotópicas*) durante horas, una gran parte de los pigmentos fotosensibles en los conos y los bastones habrá quedado reducida a retinal y opsinas. Por añadidura, gran parte del retinal presente en ambos tipos de receptores se habrá convertido en vitamina A. Debido a esto, las concentraciones de productos fotosensibles que quedan en los conos y los bastones, son considerablemente bajas y la sensibilidad del ojo a la luz está reducida de forma proporcional, este estado es conocido como *adaptación a la luz*.

Por el contrario, si los fotorreceptores de la retina permanecen en la oscuridad (*condiciones escotópicas*) durante un periodo prolongado, el retinal y las opsinas de los conos y los bastones son capaces de regenerar los pigmentos sensibles a la luz; la vitamina A se transforma de nuevo en retinal para suministrar aún más pigmentos. La cantidad total de fopigmento dependerá de cuánta opsina, presente en los conos y bastones, se encuentre disponible para combinarse con el retinal. Este estado de gran cantidad de pigmento visual y máxima sensibilidad se denomina, *adaptación a la oscuridad*.

Cuando se pasa de un estado de adaptación a la luz a uno de adaptación a la oscuridad, la sensibilidad de la retina es muy baja, pero en el plazo de 1 minuto ya ha aumentado 10 veces; pasados 20 minutos, la sensibilidad se ha incrementado unas 6000 veces, y a los 40 minutos, 25000 veces. La curva de adaptación a la oscuridad consta de dos fases, una primera fase es debida a la adaptación de los conos (más rápida, pero de menor sensibilidad absoluta), mientras que una segunda fase se debe a la adaptación de los bastones (más lenta, pero de mayor incremento de sensibilidad).

Además de la adaptación ocasionada por los cambios en las concentraciones de la rodopsina de bastones o fopsinas de conos, el ojo posee otros dos mecanismos de adaptación. El primero consiste en un *cambio del diámetro pupilar* debido a la modificación de la cantidad de luz que se deja pasar a través de la abertura pupilar.

INTRODUCCIÓN

El segundo es la *adaptación neural*, en el que participan las neuronas que integran las sucesivas etapas de la cadena visual en la propia retina y en el encéfalo. Entre los límites de la adaptación máxima a la oscuridad y a la luz, el ojo puede modificar su sensibilidad lumínica de quinientas mil a un millón de veces, con una corrección automática ante los cambios de iluminación.

1.4.2. Células ON y OFF.

La retina está organizada para la detección de presencia o ausencia de luz, mediante canales denominados como ON y OFF, respectivamente. Las células bipolares y CGR, tienen una organización centro-periferia antagónica. Tanto el centro como la periferia de estas células puede estar dominada por la vía ON o la OFF y así formar parte de una vía o de la otra. Esto es debido a la integración y procesamiento de la información que se desarrolla a nivel de la retina y que tiene en cuenta características del estímulo visual como es el color o la forma. Diferenciamos en la retina dos tipos de células bipolares, las de cono ON y OFF (reciben la información de los conos), y las bipolares de bastón ON (reciben información de los bastones). Posteriormente, las células bipolares proyectan a las CGR que también tienen naturaleza ON-OFF, manteniendo el signo de la célula bipolar de la cual reciben la información.

Una vez generada la señal eléctrica en los fotorreceptores, estos han de procesar la información sensorial a través de las células retinianas y a través de las conexiones que éstas establecen entre sí. La organización laminar de la retina permite distinguir dos “vías” de procesamiento de la información: una vía centripeta, que utiliza el glutamato como neurotransmisor y que atraviesa todas las capas de la retina (células fotorreceptoras - células bipolares / amacrinas - células ganglionares) y unas vías transversales que utilizan GABA y Glicina como neurotransmisores y se localizan puntualmente en las dos capas plexiformes, la externa (mediada por células horizontales) y la interna (mediada por células amacrinas).

Respecto a la vía centripeta, ya se ha comentado que cada tipo de fotorreceptor, conos y bastones, dan lugar a una vía paralela de información, una mediada por las células bipolares de cono y otra por las células bipolares de bastón, pudiéndose hablar de vía de los conos y vía de los bastones (Guyton y Hall, 2006).

Por otra parte, los fotorreceptores liberan glutamato como neurotransmisor (Kandel y cols., 2001; Haines, 2003; Guyton y Hall, 2006), por lo que las células bipolares han de expresar receptores para dicho neurotransmisor en sus dendritas. Como ya se ha mencionado, las células bipolares tampoco generan potenciales de acción y responden ante un estímulo luminoso con variaciones graduales del potencial de membrana. Algunas células bipolares responden a estímulos luminosos con una despolarización (células bipolares ON) y otras con una hiperpolarización (células bipolares OFF). Si asumimos que todas las células bipolares son sensibles a glutamato, hemos de pensar que las células bipolares de tipo ON presentan un receptor de membrana para glutamato distinto a las células de tipo OFF. Las células bipolares de cono tipo OFF presentan en sus dendritas receptores ionotrópicos de glutamato de tipo AMPA/kainato que abren canales para cationes. De esta manera, en oscuridad y debido a la liberación tónica de este neurotransmisor por parte de los fotorreceptores, las células bipolares de tipo OFF se encuentran despolarizadas de forma tónica. Cuando un estímulo luminoso incide sobre los conos, el glutamato deja de llegar a estos receptores ionotrópicos, los canales se cierran y la célula se hiperpolariza (Wässle & Boycott, 1991). Las células bipolares de tipo ON expresan en sus dendritas un receptor metabotrópico para glutamato, el mGluR6, acoplado a la proteína G_o (Nakajima y cols., 1993). Además, en estas células de tipo ON existen canales catiónicos dependientes de GMPc, al igual que en los fotorreceptores. De esta forma, en ausencia de estímulos luminosos, el glutamato está liberándose de la terminal del fotorreceptor y el receptor de glutamato está activado, activando a su vez una fosfodiesterasa que mantiene el GMPc disminuido en el interior de la célula, por lo que los canales para cationes están cerrados; cuando un estímulo luminoso alcanza la retina, el fotorreceptor deja de liberar el glutamato que activaba este receptor metabotrópico, los canales catiónicos en las células bipolares de tipo ON dejan de estar inhibidos y se produce una entrada de iones que la despolariza (De la Villa y cols., 1995).

Las sinapsis entre células bipolares de cono y sus células postsinápticas (amacrinas y ganglionares) en la capa plexiforme interna es siempre de naturaleza excitatoria, mediada por glutamato sobre receptores ionotrópicos de tipo NMDA y no-NMDA. Por dicho motivo, las células postsinápticas respecto a las células bipolares mantienen el “signo” (ON u OFF) generado en las células bipolares. Las células

INTRODUCCIÓN

bipolares de bastón, en la capa plexiforme interna, no hacen conexiones sinápticas con células ganglionares, sino que establecen sus conexiones con las células amacrinas AII. La sinapsis es glutamatérgica y excitatoria, por lo que las células amacrinas AII también se despolarizan cuando incide un estímulo luminoso sobre los bastones.

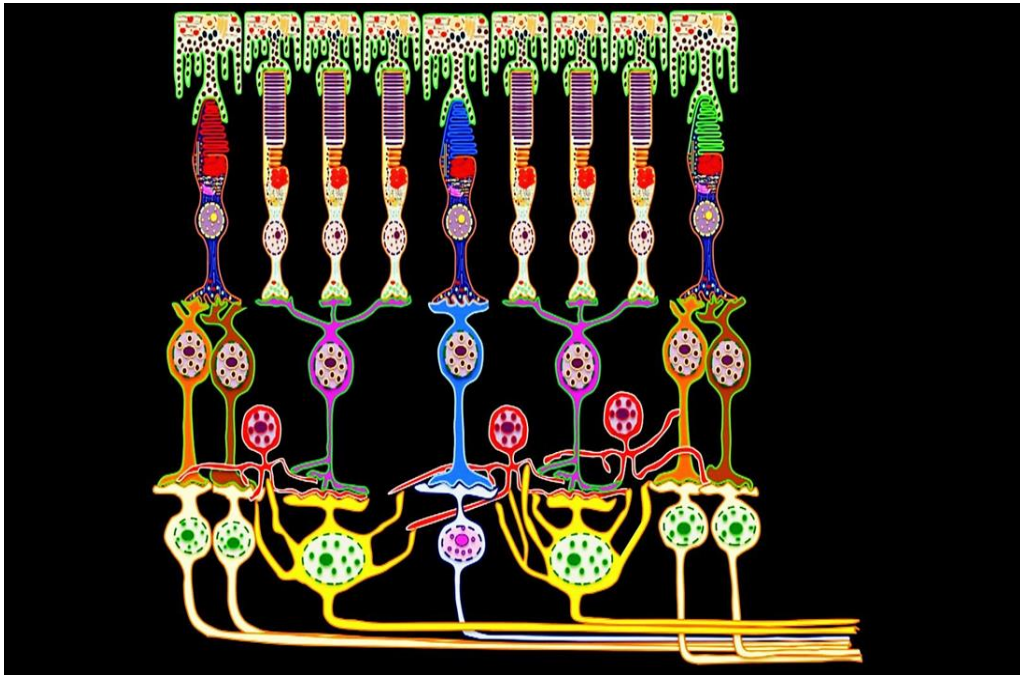


Figura 8. Conexiones retinianas entre células. Vía de los conos; Conos M y L, conectan con células bipolares ON y OFF y estas con células Ganglionares ON y OFF. Los Conos S sólo conectan con célula bipolar ON y Ganglionar ON. Vía de los bastones, los bastones conectan de manera directa sólo con células bipolares ON que conectan de manera indirecta mediante células amacrinas a células ganglionares o de manera lateral influyendo a la vía de los conos activando o inhibiendo a las células bipolares tipo ON u OFF respectivamente y transmitiendo la respuesta a las células ganglionares (Tomado de <https://www.youtube.com/watch?v=LeFvR-6kc>,2014).

Dentro de la capa plexiforme interna las células amacrinas AII establecen sinapsis glicinérgicas inhibitorias sobre las terminales axónicas de las células bipolares de cono de tipo OFF, inhibiendo estas células mientras dure el estímulo luminoso.

Asimismo, las amacrinas AII establecen *sinapsis* eléctricas con las terminales axónicas de las células bipolares de cono de tipo ON, activando estas células mientras dura el estímulo luminoso. De esta manera, en la vía visual de los bastones, la aparición de las vías ON y OFF se produce en la retina interna gracias a dos tipos distintos de *sinapsis* entre las células amacrinas AII y las células bipolares de cono. Las células ganglionares de la retina reciben los *inputs* sinápticos (glutamatérgicos) procedentes de las células bipolares de cono, ya sea por estimulación directa de los conos (*cono – bipolar de cono – ganglionar*) o por estimulación de los bastones (*bastón – bipolar de bastón – amacrina AII – bipolar de cono – ganglionar*). Las células ganglionares son capaces de integrar las distintas señales y generar potenciales de acción.

1.4.3. Vías transversales en el procesamiento de la señal visual.

En relación a las vías transversales de la retina es mucho lo que se ha escrito (Guyton y Hall, 2006). Entre ellas, quizá el mecanismo mejor estudiado sea el proceso de inhibición lateral que ejercen las células horizontales de la retina sobre fotorreceptores y células bipolares a nivel de la capa plexiforme externa. Como ya se ha comentado, las dendritas de las células horizontales reciben su principal *input* en el pedículo de los conos, para los que expresan receptores ionotrópicos de glutamato. Sin embargo, sus terminales axónicas establecen sus conexiones sinápticas en la esférula del bastón. A este nivel, las células horizontales son capaces de liberar GABA (Yang, 2004), ejerciendo un *input* sináptico tanto sobre la propia terminal axónica del bastón como sobre las dendritas de las células bipolares de bastón.

En relación a la vía de información transversal mediada por las células amacrinas, también es mucho lo que se ha descrito (véase Rodieck, 1998). Para ejercer sus funciones, las células amacrinas emplean distintos neurotransmisores como GABA, glicina, acetilcolina, serotonina, dopamina y ciertos neuropéptidos (encefalina, somatostatina, neurotensina, glucagón, colecistoquinina, sustancia P y neuropéptido Y). Mediante una organización estructural altamente diferenciada, las células amacrinas serían las responsables de los mecanismos de inhibición lateral en la capa plexiforme interna.

1.5. TRANSMISIÓN SINÁPTICA EN LA RETINA.

1.5.1. Neurotransmisores excitatorios: Glutamato.

Las sinapsis glutamatérgicas constituyen el sistema de neurotransmisión excitatoria rápida más abundante en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos. En los últimos años se ha producido un avance espectacular en el conocimiento molecular, bioquímico, farmacológico y funcional de estas sinapsis, cuyo interés obedece fundamentalmente a dos razones; por un lado, porque cambios duraderos en la eficacia de la transmisión glutamatérgica constituyen un aspecto esencial en los fenómenos de plasticidad sináptica y en los procesos de aprendizaje y memoria cerebrales y en segundo lugar, porque una elevación anormal de la concentración de glutamato en la sinapsis es la causa de la degeneración y muerte neuronal asociada a determinadas patologías, tanto de aparición aguda, como las derivadas de situaciones de hipoglucemia, hipoxia e isquemia cerebrales, como de evolución crónica, asociadas a algunos procesos neurodegenerativos (enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington).

Dentro del sistema nervioso central el glutamato no se limita a mediar la neurotransmisión excitatoria, sino que presenta gran número de funciones adicionales (Michaelis, 1998):

- Actúa como neurotransmisor excitador de acción rápida.
- Participa en la inducción y mantenimiento de cambios a medio y largo plazo en la excitabilidad neuronal (plasticidad sináptica), asociados a procesos de memoria y aprendizaje.
- Actúa como estímulo quimiotáctico durante la sinaptogénesis y el desarrollo embrionario.
- Actúa como desencadenante de procesos de migración neuronal.
- Modula el crecimiento axonal y la formación de sinapsis.
- Promueve la supervivencia de ciertas poblaciones neuronales.
- Produce cambios en la actividad metabólica, la expresión génica y la síntesis de proteínas.

- Presenta un papel destacado en procesos neurodegenerativos.

El glutamato ejerce sus acciones a través de varias clases de receptores que pueden ser diferenciados no solo molecularmente, sino también en función de sus características farmacológicas y electrofisiológicas. De forma general los receptores de glutamato se clasifican en; receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos.

1.5.1.1. Receptores ionotrópicos de glutamato.

Los receptores ionotrópicos están constituidos por canales catiónicos que son activados por ligando. Su activación conlleva un incremento en la permeabilidad de la membrana celular a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , fundamentalmente. Se clasifican en función de su ligando específico:

1. Receptores tipo NMDA (sensibles a N-metil-Daspártato),
2. Receptores tipo AMPA (sensibles a α -amino-3-hidroxi-5metilisoxazolil-4-propionato),
3. Receptores tipo Kainato (sensibles al ácido kaínico).

La localización subcelular de los receptores NMDA y AMPA es fundamentalmente postsináptica, mientras que los de kainato se localizan tanto a nivel postsináptico como presináptico. Los receptores AMPA activan canales iónicos permeables a Na^+ y K^+ y en algunos casos a Ca^{2+} , e intervienen principalmente en la transmisión glutamatérgica rápida. Los receptores NMDA, por su parte, activan canales permeables tanto a Na^+ y K^+ como a Ca^{2+} , y parecen tener un papel más especializado en los procesos de plasticidad neuronal. El papel fisiológico de los receptores de kainato es menos conocido, aunque se sospecha que podrían estar implicados, a nivel presináptico, en la modulación de la transmisión Gabaérgica.

1.5.1.2. Receptores metabotrópicos de glutamato.

Los receptores metabotrópicos de glutamato constituyen un conjunto de receptores acoplados a proteínas G que realizan sus funciones, bien a través de la modulación de

INTRODUCCIÓN

la producción de segundos mensajeros intracelulares y de la regulación de la fosforilación de proteínas, o bien a través de la modulación directa de canales de Ca^{2+} o K^+ .

Durante mucho tiempo se pensó que la transmisión glutamatérgica estaba mediada únicamente por receptores ionotrópicos. Sin embargo, en 1985, Sladeczek y colaboradores demostraron la presencia, en cultivos neuronales del núcleo estriado, de receptores de glutamato insensibles a AMPA, kainato y NMDA, y que estimulaban la actividad de fosfolipasa C y la formación de inositol trifosfato (IP3) a través de la activación de proteínas G. Poco después se observaron efectos similares en rodajas de hipocampo (Nicoletti y cols., 1986a, b), en cultivos de células granulares de cerebelo (Nicoletti y cols., 1986c) y en cultivos de astrocitos (Pearce y cols., 1986). Estos hallazgos llevaron al clonaje en 1991 del primer receptor metabotrópico de glutamato (mGluR1) (Masu y cols., 1991; Houamed y cols., 1991) y en un breve período de tiempo al del resto de los mGluRs (Tanabe y cols., 1992; Abe y cols., 1992; Nakajima y cols., 1993; Saugstad y cols., 1994, 1997; Okamoto y cols., 1994; Flor y cols., 1995; Duvoisin y cols., 1995).

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se dividen en 3 grupos en función de la homología de su secuencia de aminoácidos, su farmacología y la vía de transducción de señales que activan. Los receptores del grupo I estimulan la actividad de fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfoinosítidos, promoviendo la formación de diacilglicerol e IP3 (Manzoni y cols. 1990; Schoepp y cols., 1990), con la consiguiente activación de proteína quinasa C e incremento en la liberación de Ca^{2+} desde los compartimentos intracelulares, respectivamente. Este grupo está integrado por los receptores mGluR1 y mGluR5. El grupo II está integrado por los receptores mGluR2 y mGluR3, mientras que el grupo III comprende los subtipos mGluR4, mGluR6 mGluR7 y mGluR8. Tanto los receptores del grupo II como los del grupo III están acoplados negativamente a adenilato ciclasa y, por tanto, a la reducción de los niveles de AMPc (Conn y Pin, 1997).

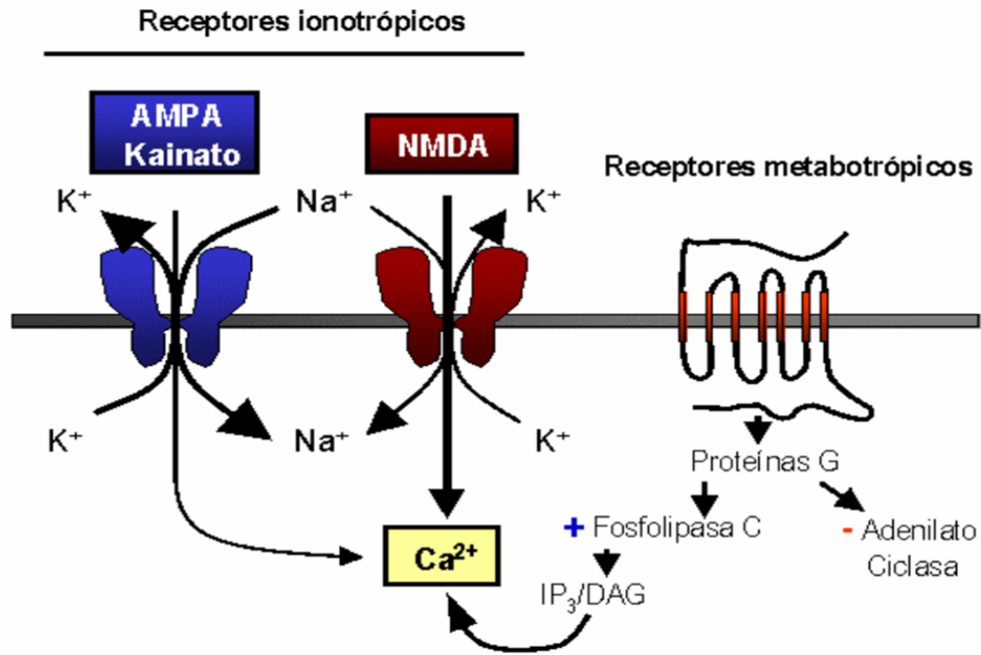


Figura 9. Receptores de Glutamato. Receptores tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico); Receptores tipo Kainato (ácido kaínico); Receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato)). (Modificado de García Galloway, 2003).

1.5.2. Neurotransmisores inhibitorios.

La Glicina (Gly) y el ácido gamma-aminobutírico (GABA), son los principales neurotransmisores inhibitorios en los vertebrados. Mientras el Glutamato es el neurotransmisor principal a través de la vía vertical de las células de la retina (fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares) el GABA y la Gly son neurotransmisores en la vía horizontal, encontrándose principalmente en las células amacrinas.

El GABA es un neurotransmisor inhibitorio derivado del ácido glutámico que se encuentra en todo el SNC, su liberación al espacio sináptico y su unión a receptores específicos de membrana provoca la apertura de canales iónicos que permite el flujo de Cl^- hacia el interior celular provocando un potencial negativo y la hiperpolarización de la célula. Existen tres clases de receptores de GABA; GABA A,

INTRODUCCIÓN

B y C. Los A y C son canales iónicos y los B están acoplados a proteínas G que afecta a canales de calcio o potasio.

La Gly es un aminoácido sintetizado a partir de la serina, derivada del metabolismo de la glucosa, y se encuentra en la médula espinal.

1.6. ELECTORRETINOGRAFÍA.

El electroretinograma (ERG) de campo completo, es una técnica de registro electrofisiológico que representa la actividad eléctrica que generan todas las células de la retina cuando reciben un estímulo luminoso. Las respuestas recogidas en el ERG son producidas por el movimiento de iones en las distintas células de la retina, el potasio y el sodio son los iones fundamentales que provocan la apertura y cierre de canales. Es una técnica no invasiva, que permite evaluar de forma objetiva el estado funcional de la retina y por ello es ampliamente utilizada tanto en animales de experimentación como en seres humanos para el diagnóstico de enfermedades retinianas.

1.6.1. Principios generales. Componentes del ERG.

El ERG es la representación gráfica compuesta por una serie de deflexiones positivas y negativas que son el resultado de las respuestas obtenidas por los distintos tipos celulares de retina cuando se presenta un estímulo luminoso. Fue Eindhoven en 1908, los que realizaron una interpretación inicial de los componentes del ERG, definiendo mediante la letra “a” a la deflexión inicial negativa, con la letra “b” a la onda secundaria de valor positiva y con la letra “c” a la última deflexión generada también de valor positivo.

Granit en 1933, demostraron mediante estudio con retinas de gato que las ondas generadas en el ERG eran debidas a la suma de tres procesos o potenciales llamados PI, PII, PIII. Siendo PI de potencial positivo generado en el epitelio pigmentario, PII de potencial positivo generado en la retina interna y relacionada principalmente con las células bipolares, y PIII de potencial negativo con dos componentes separados (fases), que se produce desde dos clases diferentes de células. La fase uno, llamada potencial receptor o fase PIII debida al cierre de canales de sodio en los

fotorreceptores, y la fase dos llamada *show* PIII debida a la hiperpolarización de la porción distal de las células de Müller. Los potenciales PI, PII, PIII corresponden con las ondas c, b y a respectivamente (Fishman y cols., 2001; Lam, 2005).

1.6.1.1. La onda “a”.

Cuando hay un estímulo luminoso que llega a la retina este es absorbido por los pigmentos visuales de los fotorreceptores que inician un proceso de activación en su segmento externo (fototransducción). En dicho proceso se estimula la enzima GMPc fosfodiesterasa causante de la reducción de la concentración de GMPc en el citoplasma celular provocando la hiperpolarización del fotorreceptor y el cierre de los canales iónicos. En la oscuridad, la concentración de GMPc es relativamente elevada, lo que determina que los canales iónicos regulados por esta molécula se encuentren abiertos y permitan la corriente de entrada (llamada corriente oscura) que mantiene a la célula en un estado relativamente despolarizado. En la hiperpolarización del fotorreceptor hay una disminución en la entrada de sodio que conlleva una disminución en la concentración extracelular de potasio. Ese cambio de potencial de membrana es medido como la onda “a” del ERG y es generada principalmente por los bastones en condiciones escotópicas y por los conos en condiciones fotópicas aunque se ha demostrado en retinas de monos que existe una aportación a la onda “a” de otras células situadas en regiones más internas de retina (Robson y cols., 2003).

1.6.1.2. La onda “b”.

La onda “b” es la primera onda positiva del ERG y la más fácil de registrar debido a que tiene mayor amplitud. Su tiempo implícito depende de la intensidad del estímulo luminoso, pero en todos los casos es una respuesta mucho más lenta y tardía a la de la onda “a”.

Existen dos hipótesis sobre el origen de la onda “b”, autores como Miller y Dowling, relacionaron la generación de esta onda con las células de Müller (Miller y Dowling, 1970) explicando que tras la transducción visual hay una disminución en la liberación de neurotransmisor en los terminales sinápticos de los fotorreceptores lo

INTRODUCCIÓN

que provocaría la hiperpolarización o despolarización de las células bipolares según fueran OFF u ON, respectivamente. Las células despolarizadas por la luz, provocarían la liberación de potasio al medio extracelular a nivel de la capa plexiforme externa y en menor cuantía en la capa plexiforme interna provocando un gran aumento de potasio por el cual las células de Müller con el fin de restablecer las condiciones fisiológicas del medio extracelular provocarían una corriente transretiniana que generaría la onda “b”. Otros autores asocian la generación de la onda “b” exclusivamente a las células bipolares ON (Bolnick y cols., 1979; Frishman, 2006) dado que en experimentos realizados con Ba^{2+} , bloqueante de canales de potasio de las células de Müller, se observó que la onda “b” se mantenía respaldando esta idea.

1.6.1.3. La onda “c”.

La onda c, es una onda positiva que aparece de manera más tardía en el tiempo con respecto a las ondas “a” y “b”. La generación de la onda “c” es un compendio entre dos componentes; uno negativo generado por las células de Müller responsables de la conductividad del potasio que se activa al disminuir la concentración de potasio; y otro componente positivo generado por las células del epitelio pigmentario de la retina (EP). En general, es este último componente el más prominente en la generación de la onda “c” de ahí que dicha onda tenga una polaridad positiva en el ERG. Casos clínicos en los que existe una alteración de la retina donde el EP se encuentra afectado se observa una onda “c” negativa, reflejo de la importancia de este componente en la generación de la onda c del ERG.

1.6.1.4. Otras ondas electrofisiológicas.

- **Respuesta umbral escotópica (“Scotopic Threshold Response”, STR):** Es la respuesta registrada cuando presentamos estímulos de luz muy tenues en retinas que están adaptadas a condiciones escotópicas, de potencia positiva está compuesta por dos componentes uno positivo denominado pSTR y otro negativo denominado nSTR. El origen de la respuesta se ha demostrado que es generado por células de la retina interna como las células amacrinas o ganglionares, y se

diferencia de la onda b, que es generada por un estímulo luminoso más intenso en la región más externa de la retina.

- **Respuesta fotópica negativa (“Photopic Negative Response” PhNR):** La respuesta fotópica negativa es una onda que se registra en condiciones fotópicas de adaptación a la luz y que se asocia a CGR (Colotto y cols., 2000; Machida y cols., 2008a; Gari y cols., 2009). Se ha estudiado esta respuesta en pacientes de glaucoma de ángulo abierto y se ha descrito la disminución de esta respuesta en el estudio del ERG relacionándolo con la pérdida neural en la retina. (Machida y cols., 2008a), estudios en ratas con sección del nervio óptico se observó la disminución de la respuesta fotópica negativa, situando el origen de esta respuesta en la retina interna, aunque no se puede asegurar completamente la asociación con las CGR por lo menos en el caso del roedor. (Machida y cols., 2008b).
- **Potenciales Oscilatorios:** Los potenciales oscilatorios son ondas que se observan superpuestas a la onda b cuando el estímulo luminoso es intenso. Tienen una frecuencia muy alta (100-160 Hz) y se suelen diferenciar hasta cinco oscilaciones. Se relacionan con la respuesta de la retina externa y más explícitamente con las células amacrinas (Korol y cols., 1975). De los cinco potenciales oscilatorios se diferencian PO₁, PO₂ y PO₃ relacionados con los circuitos retinianos ON; mientras que PO₄ y PO₅ con los circuitos OFF.
- **Flicker:** El registro se obtiene ante la estimulación continuada con *flashes* de luz blanca de corta duración (5ms), de gran intensidad (2,71 log cd·s/m²), aplicados con una frecuencia de 20 – 50 Hz (duración cada 50 ms), en condiciones fotópicas de luminosidad.

1.6.2. Estandarización de las respuestas del ERG.

Tras la gran diversidad de modelos para obtener un registro de la actividad eléctrica de la retina y con el fin de poder comparar los resultados de forma internacional, la ISCEV (*International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) resumió en cinco las respuestas a analizar en un ERG de campo completo teniendo en cuenta las condiciones lumínicas y el tipo de estímulo utilizado.

- **Respuesta de bastones:** Corresponde al trazado electroretinográfico obtenido en condiciones de adaptación a la oscuridad (condiciones escotópicas) cuando se

INTRODUCCIÓN

aplica un *flash* luminoso de pocos milisegundos de duración, campo completo y de tal intensidad que no llega a inducir respuesta alguna en los conos. El trazado electroretinográfico muestra una deflexión positiva (onda b) de unos cientos de μV que es generada por las células bipolares de bastón.

- **Respuesta máxima escotópica, o *respuesta mixta de conos y bastones*:** Es el trazado electroretinográfico registrado tras un flash de luz blanca de gran intensidad y durante una corta duración y capaz de activar tanto a conos como a bastones. El registro consiste en una deflexión negativa (onda a), generada por la activación eléctrica de los fotorreceptores, seguida de una deflexión positiva (onda b), generada, como en el caso anterior, por la activación eléctrica de las células bipolares despolarizadas.
- **Potenciales oscilatorios:** Es una serie de deflexiones positivas y negativas, de curso temporal rápido y que se obtienen al filtrar eléctricamente el registro de la respuesta máxima escotópica. Una vez filtrados los componentes lentos de la respuesta electroretinográfica (generados en fotorreceptores y células bipolares), las deflexiones del trazado corresponden a la actividad eléctrica generada en neuronas retinianas con capacidad de producir potenciales de acción: células amacrinas y ganglionares.
- **Respuesta de conos:** El trazado electroretinográfico obtenido tras *flash* de luz blanca de gran intensidad y corta duración, capaz de activar los conos, obtenido tras haber adaptado la retina a la luz (condiciones fotópicas) mediante la aplicación de una luz de fondo. El registro consiste en una deflexión negativa, generada por la activación eléctrica de los conos, seguida de una serie de deflexiones positivas (onda b) generadas por activación de células bipolares despolarizadas e hiperpolarizadas.
- **Respuesta a estímulos repetidos o *respuesta flicker*:**
El registro consiste en una serie de deflexiones positivas y negativas, generadas por la activación de los conos y sus células postsinápticas.

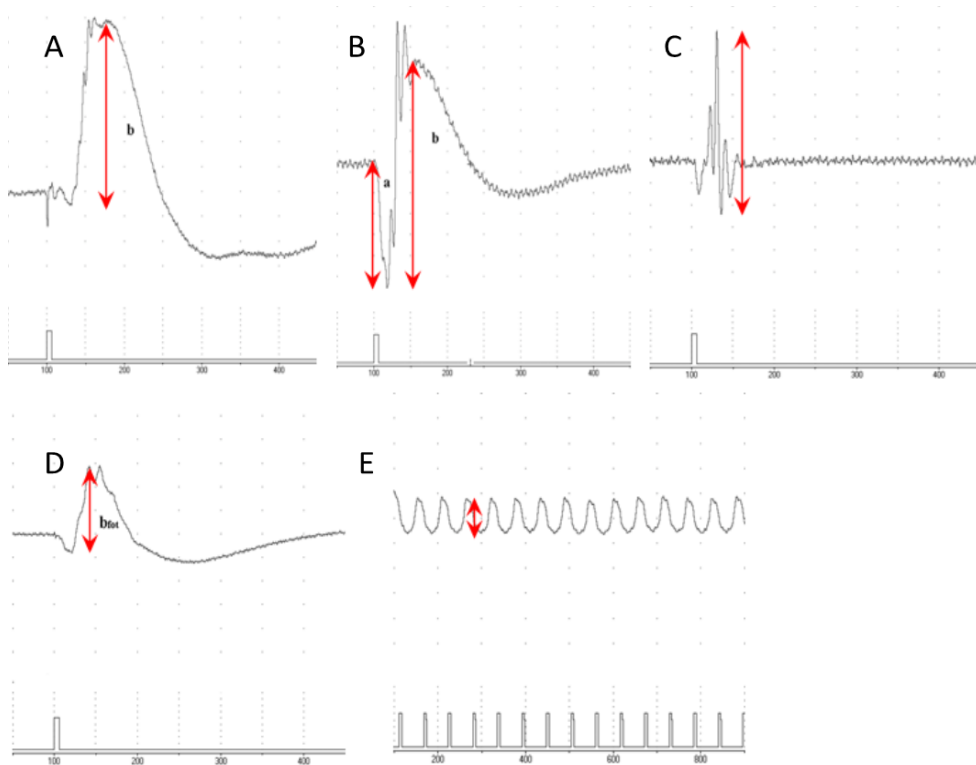


Figura 10: Respuestas electroretinográficas estándar en un ratón con visión normal. A, B, C, Respuestas electroretinográficas registradas en condiciones escotópicas. A, Respuesta de bastones. B, Respuesta mixta. C, Potenciales Oscilatorios. D, E, Respuestas electroretinográficas registradas en condiciones fotópicas. D, Respuesta de conos. E, Respuesta Flicker. Las flechas indican los valores de máxima amplitud de cada onda. Se muestra bajo cada registro, en línea fina, el estímulo aplicado (Tomado de Vicente Tejedor, 2009).

1.6.3. Tipos de Electrorretinografía.

Tras los orígenes de la técnica electroretinográfica han ido surgiendo variantes en la técnica que ha proporcionado distintos métodos de registro electroretinográfico. El ERG nos aporta información sobre la funcionalidad de la retina, sin embargo, el modo de estimular ésta, representar la información y posteriormente analizarla difiere según qué modelo de ERG estemos usando.

Dentro de los distintos tipos de ERG, podemos destacar:

INTRODUCCIÓN

- **ERG de campo completo:** consiste en el estímulo global e "isoluminante" de toda la retina. Será la técnica utilizada en nuestro estudio y por tanto se describirá en detalle en material y métodos.
- **ERG focal o macular:** esta técnica aparece como consecuencia de la limitación del ERG de campo completo para detectar una disfunción local de la retina. En enfermedades que cursan con afectación de pequeñas regiones retinianas como por ejemplo la fovea, el ERG de campo completo no es capaz de discriminar dicha alteración. En el ERG focal, un estímulo de luz focal es usado para registrar una respuesta de ERG local. Es la técnica utilizada para la valoración de las respuestas de conos en la fovea. Se aplica un estímulo focal (cíclico blanco de 30-42 Hz) centrado dentro de un fondo fijo. El haz de luz es circundado con un anillo de luz más brillante para evitar las respuestas de bastones y conos cercanos a la mácula. Los valores normales del ERG focal varían en función del diámetro, la frecuencia y la intensidad del estímulo.
- **ERG multifocal:** se utiliza para aportar información funcional topográfica de la retina. Se utiliza en pacientes que sufren de degeneración macular, degeneración paracentral o glaucoma incipiente. El electroretinograma multifocal (mfERG) fue desarrollado por Sutter y Tran (1992). En esta prueba, se utiliza un estímulo compuesto por un patrón de hexágonos dispuestos en una malla concéntrica que es capaz de estimular específicamente áreas retinianas centrales (maculares) o periféricas (campos retinianos nasales y temporales, superiores e inferiores). El número de hexágonos para el estímulo multifocal abarca rangos desde 61 a 241. Un menor número de hexágonos requiere más cortos tiempos de registro, produciendo respuestas más largas pero disminuyendo la resolución espacial. Mediante el uso de recursos informáticos y herramientas de computación se pueden analizar la contribución de cada área focal de la retina al registro conjunto, obteniéndose con ello trazados electroretinográficos de áreas precisas. La disposición espacial de los conos en la retina, con una mayor densidad en la mácula y menor en retina periférica, determina que los trazados electroretinográficos registrados en cada área sean de distinta magnitud. Este tipo de registros está permitiendo en el momento actual llegar a diagnosticar lesiones retinianas de tan solo unos pocos milímetros cuadrados de superficie, en fases precoces de enfermedades degenerativas.

- **ERG de potencial temprano de receptores (ERP):** Es una respuesta muy rápida registrada inmediatamente tras un estímulo de gran intensidad (1-2 ms), y tiene su origen en el blanqueo de los fotorreceptores. La respuesta se obtiene en el ERG de campo completo y está formada por dos componentes, uno positivo (R_1) y otro negativo (R_2). El ERP ha sido utilizado en investigación para conocer, de forma no invasiva, la concentración del pigmento visual durante la adaptación a la luz y a la oscuridad seguida de una exposición a una luz intensa que puede causar un blanqueamiento del pigmento. En humanos, se utiliza de forma ocasional para estimar la densidad de la rodopsina en pacientes que sufren retinitis pigmentosa.
- **ERG patrón (ERG *pattern*):** La respuesta obtenida por la retina a un estímulo estructural definido, un dámetro de estímulos que presentan alternancia negro-blanco. Este modelo aporta información de la funcionalidad de las células ganglionares, con contribución de otros elementos celulares intrarretinianos. Clínicamente, se utiliza para la evaluación de la función macular y de las células ganglionares. Mientras que el ERG de campo lleno mide la actividad retiniana en respuesta a un cambio en la luminancia, el ERG *pattern* detecta actividad de la retina en respuesta a un estímulo reversible blanco-negro. Existen dos categorías de respuestas reconocidas por este ERG: transitorias y estado estático. Las primeras ocurren cuando las ratios de alternancia son lo suficientemente bajas como para permitir a la retina recuperarse entre estímulos. Las respuestas estado estático ocurren por todo lo contrario, cuando la alternancia es demasiado rápida para la recuperación.
- **Potenciales visuales evocados (VEP):** Es el registro de la respuesta cortical a estímulos visuales, refleja la actividad eléctrica generada a la estimulación del campo visual central.

1.7. PROYECCIONES CENTRALES DE LA RETINA.

1.7.1. Vía visual y núcleos de relevo.

La vía visual está compuesta por un conjunto de estructuras conectadas entre sí que hacen posible la percepción visual, desde la captación de la información lumínica por las células de la retina hasta el procesamiento de la información en la corteza cerebral. Anatómicamente, la vía óptica está formada por la retina, el nervio óptico, el quiasma óptico, las cintillas ópticas, el núcleo geniculado lateral, las radiaciones ópticas y la corteza visual.

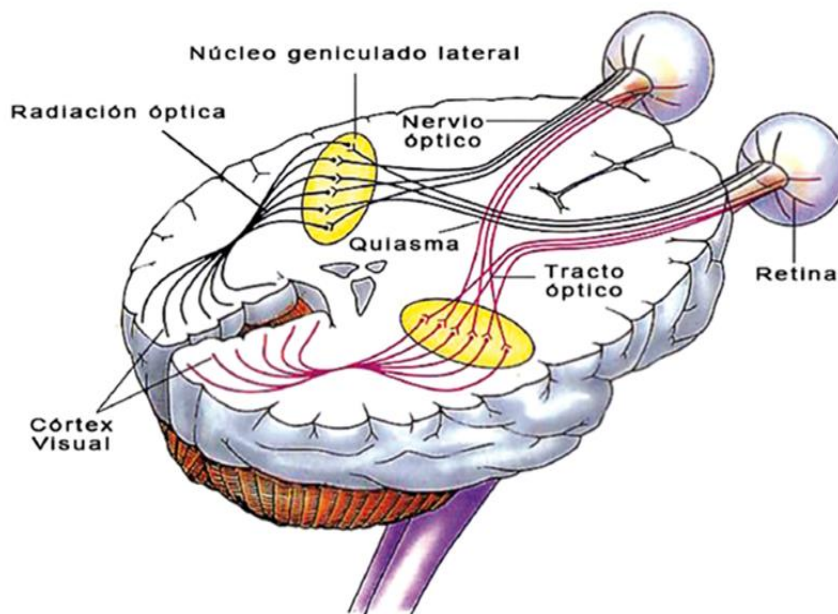


Figura 11. La vía visual. Esquema de la vía óptica, recorrido de la información procedente del exterior hasta la corteza visual. (Modificado de <https://apuntesudomedicina.files.wordpress.com/2015>).

Los axones de las CGR al salir del globo ocular forman el nervio óptico o II par craneal. El nervio óptico de ambos ojos se une en el quiasma óptico, lugar donde se decusan las fibras. En humanos y primates, el 50% de todos los axones se decusan en dicha zona, cruzándose las fibras de la hemirretina nasal y manteniéndose las fibras

de la hemirretina temporal ipsilateralmente. Las fibras de la retina temporal ipsilateral y la retina nasal contralateral de cada lado se reúnen para formar las cintillas o tractos ópticos, que por tanto conducen a cada hemisferio cerebral la información del hemimundo visual contralateral. Posteriormente, las cintillas ópticas proyectan a tres zonas subcorticales principales; tubérculo cuadrigémino o colículo superior (CS o tectum), pretectum mesencefálico y núcleo geniculado lateral del tálamo (NGL). Además de estas tres estructuras subcorticales, las cintillas ópticas proyectan también, a los núcleos supraquiasmáticos, al pregeniculado y a los núcleos que componen el sistema visual accesorio. En el NGL terminan el 90% de los axones retinianos, siendo considerada la estación de relevo más importante encargada del transporte de la información visual a la corteza cerebral. Los axones de las CGR sinaptan con las neuronas que forman este núcleo y que está organizado de manera retinotópica (los axones de las CGR se proyectan de forma ordenada en las distintas zonas del NGL), por lo tanto, el NGL tiene una representación retinotópica de la mitad contralateral del campo visual. Las neuronas del NGL, envían sus axones formando las radiaciones ópticas hacia la corteza visual primaria que se encuentra en la superficie media de los polos posteriores de los hemisferios cerebrales, en diferentes áreas cada una de las cuales está dedicada a partes específicas del campo visual. La información recogida en la corteza visual primaria alcanza múltiples centros superiores del procesamiento visual, que están situados fuera de la corteza primaria, y que son los encargados de la percepción del movimiento, la profundidad, la forma y el color.

En el caso de los roedores, los axones salen de la papila óptica de manera ordenada agrupados en haces diferenciados organizados retinotópicamente respecto al cuadrante de la retina y a su posición centrípeta (Guillery y cols., 1995; Fitzgibbon y Reese, 1996; Jeffery, 2001; Jeffery y cols., 2008; May y Lütjen-Drecoll, 2002; Schlamp y cols., 2006; Howell y cols., 2007). El porcentaje de CGR que se proyectan ipsilateralmente en ratones y ratas es del 2,6% y 5% respectivamente, por lo que se decusan alrededor del 95-97% de las mismas (Métin y cols., 1995, Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b, Nadal-Nicolas y cols., 2012).

Las CGR proyectan a las siguientes regiones del cerebro: núcleo supraquiasmático, núcleo óptico accesorio, núcleo pretectal, núcleo geniculado ventrolateral, el núcleo

INTRODUCCIÓN

geniculado latero dorsal (DLGN) y el colículo superior, siendo el CS la principal zona de proyección de las CGR (Lund, 1965; Perry, 1981; Linden y Perry, 1983, Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b). Los CS son dos protuberancias situadas en la parte dorsal del mesencéfalo, rostrales al colículo inferior y compuestas, de varias capas; tres capas que reciben el nombre de capas superficiales o visuales; *Stratum Zonale*, *Stratum Griseum Superficiale*, *Stratum Opticum*, que reciben aferencias retinianas y se encargan de procesar los estímulos visuales y cuatro capas más profundas: *Stratum Griseum Intermediale*, *Stratum Album Intermediale*, *Stratum Griseum Profundum*, y *Stratum Album Profundum* encargadas de procesar la información auditiva y somato-sensorial. Los axones de las CGR llegan al *Stratum Opticum*, arborizan, y forman terminales sinápticas que terminan sobre todo en el *Stratum Griseum* y en el *Stratum Zonale*. Las distribuciones de los axones de las CGR en el CS siguen una topografía determinada, de forma que los axones de la retina nasal proyectan a la mitad caudal del CS, los de la retina temporal a la mitad rostral, los de la retina superior a la parte lateral del CS, y los de la retina inferior a la parte medial del CS (Sauvé y cols., 2001, 2002). En roedores, la información visual que llega a la corteza cerebral también procede de los núcleos geniculados laterales correspondientes. Lo que ocurre es que el mayor núcleo retino-recipiente subcortical es el colículo superior, pero la información relacionada con la formación de imágenes visuales de las que el animal es consciente procede de los cuerpos geniculados laterales.

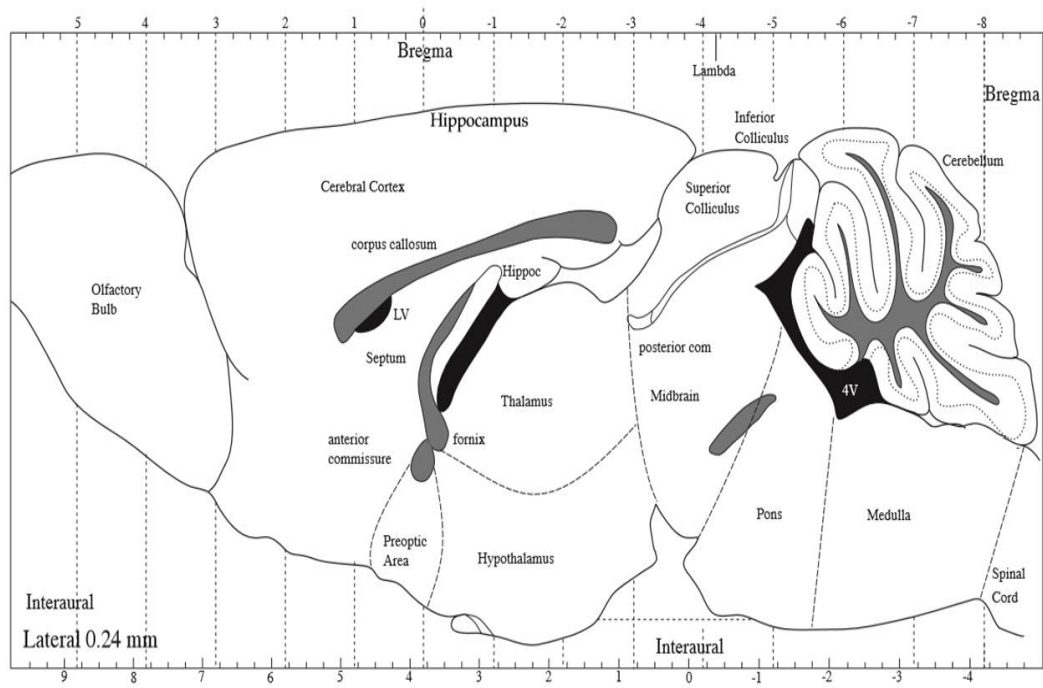


Figura 12. Esquema sagital del cerebro de ratón. Se aprecia el CS (*superior colliculus*) como una protuberancia situada en la parte dorsal del mesencéfalo, rostral al colículo inferior (*inferior colliculus*) (Tomada de Paxinos y Franklin, 2001)).

1.8. EXCITOTOXICIDAD.

La excitotoxicidad es el término utilizado para definir la muerte neuronal debido a la activación sostenida de receptores de aminoácidos. Estudios experimentales sobre la muerte neuronal inducida, demostraron que la administración sistémica de glutamato en ratones provocaba la degeneración de la retina, iniciando la sospecha sobre que el glutamato pudiera tener un papel neurotóxico (Lucas y cols., 1957). Estudios posteriores asociaron el proceso de neurotoxicidad con la activación de receptores de aminoácidos excitatorios, y se acuñó el término “excitotoxina” (Olney y cols., 1969).

Posteriores estudios relacionaron los aminoácidos excitatorios con la muerte celular mediada por anoxia en cultivos de hipocampo y se demostró que los antagonistas de NMDA podían disminuir el daño isquémico en el hipocampo (Rothman y cols., 1984)

INTRODUCCIÓN

Con el uso de técnicas de excitotoxicidad “*in vitro*”, se observó que la neurotoxicidad generada por el glutamato podía ser dependiente de calcio (Choi, 1987). A partir de esta relación, se describieron en cultivos de neuronas de hipocampo de rata tres etapas del calcio intracelular antes de que se produjera la muerte celular por excitotoxicidad de glutamato (Randall y cols., 1992). Se describió una fase inicial que tras cinco minutos de exposición a glutamato, se incrementaba la concentración de calcio intracelular durante unos 5-10 minutos, una segunda fase de latencia de duración dos horas, en las cuales el calcio volvía a sus niveles normales y una tercera fase anterior a la muerte celular donde se producía una subida gradual del calcio intracelular.

En la actualidad, el término excitotoxicidad se utiliza para referirse de manera más amplia a la muerte neuronal que produce la excitación prolongada de las neuronas, ya sea a través de la activación directa de receptores sensibles a glutamato, o por algún otro mecanismo, incluso por sobre-activación de receptores sensibles a GABA (Núñez y cols., 2003).

1.8.1. Agentes excitotóxicos.

El ácido glutámico o glutamato, es el neurotransmisor excitatorio principal en el SNC, incluido la retina y la vía visual, donde es responsable del 75% de la transmisión excitatoria (Honkanen y cols., 2003). En una sinapsis normal la acción del glutamato es rápida, una vez liberado es captado por las células de la glía y las terminaciones nerviosas, que lo transforman en glutamina para mantenerlo en el espacio extracelular. La glutamina vuelve al interior de la neurona y allí la enzima glutaminasa vuelve a transformarlo en glutamato, siguiendo el ciclo del glutamato para usarlo en las siguientes sinapsis.

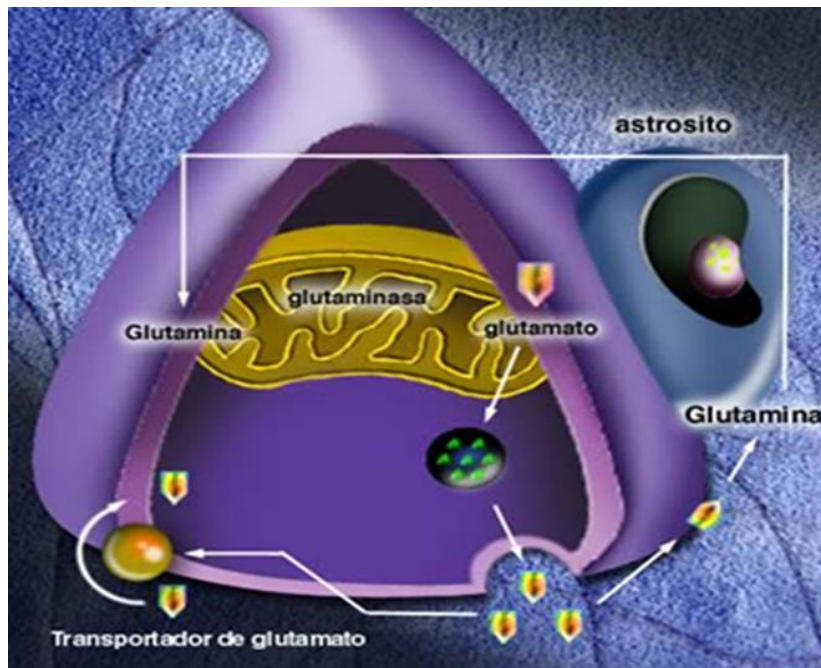


Figura 13. Ciclo del glutamato. Vías de síntesis y degradación del glutamato en una sinapsis química. (Modificado de <http://www.psicofarmacos.info>, 2008).

En el proceso de excitotoxicidad mediada por glutamato, los diferentes receptores no actúan de la misma forma siendo los receptores de NMDA activados con mayor rapidez durante la muerte celular que los receptores AMPA y kainato (Choi, 1992). La excitotoxicidad mediada por los receptores de AMPA/ kainato no solo daña a las neuronas sino también a las células productoras de mielina en el SNC (oligodendrocitos) (McDonald y cols., 1998). Ejemplo de ello se observan en enfermedades como la esclerosis múltiple donde un ataque inflamatorio en el SNC, debido a la activación de las células inmunes (Piani y cols., 1991), provoca que se pierdan la vaina de mielina, oligodendrocitos e incluso los axones.

La prevención con antagonistas AMPA/kainato puede ser una terapia efectiva para el tratamiento de esta enfermedad (Pitt y cols., 2000).

1.8.2. Mecanismos de muerte celular.

El daño excitotóxico provocado por el glutamato desata una pérdida del equilibrio osmótico ocasionado por la entrada de Na^+ y Cl^- , lo que conlleva la elevación masiva de la concentración citoplasmática de Ca^{++} (Doble, 1999) y por ende a la muerte celular. La entrada de Na^+ altera la dirección y funcionalidad de todos los transportadores, bombas y canales iónicos que dependen del gradiente de Na^+ (Greene y Greenamyre, 1996; Doble, 1999). El influjo de Cl^- , además de alterar diferentes mecanismos de transporte a nivel de la membrana plasmática, estimula la liberación de glutamato y promueve la muerte neuronal por excitotoxicidad (Babot y cols., 2005).

Finalmente, el aumento excesivo de la concentración citoplasmática de Ca^{++} promueve:

- La síntesis del óxido nítrico, el cual puede difundir a la terminal presináptica glutamatérgica y estimular la liberación de más glutamato, a través de un mecanismo dependiente de GMPc (monofosfato cíclico de guanidina).
- La generación de radicales libres, peroxinitrito o superóxido, que promueven la lipoperoxidación y desestabilización de las membranas celulares.
- La pérdida del potencial electroquímico mitocondrial, que suspende la fosforilación oxidativa y promueve la generación de radicales libres a nivel mitocondrial, hasta invalidar completamente el metabolismo energético mitocondrial.

Además, al elevarse la concentración citoplasmática de Ca^{++} , diversas vías de señalización intracelular dependientes de proteínas cinasas o fosfatasa pueden activarse y promover la proteólisis del contenido citoplasmático (Greene y Greenamyre, 1996; Montal, 1998; Arundine y Tymianski, 2003).

El proceso excitotóxico descrito anteriormente como un continuo, puede ser demasiado agudo en su fase inicial y desencadenar la muerte neuronal por **necrosis**, o evolucionar más lentamente y producir muerte neuronal por **apoptosis**. En este sentido, estudios “*in vitro*” han demostrado que el glutamato puede generar diferentes procesos neurodegenerativos, dependiendo del esquema de aplicación

(Bonfoco y cols., 1995; Portera-Cailliau y cols., 1997; Almeida y cols., 1998). Así, exposiciones breves a concentraciones elevadas de glutamato producen **muerte neuronal aguda**, con cambios neurodegenerativos inmediatos, como la inflamación edematosa del soma neuronal y las dendritas, así como cambios picnóticos del núcleo, en un proceso que se caracteriza por ser dependiente de Na^+ y Cl^- . En tanto que, la exposición prolongada a concentraciones menos elevadas de glutamato produce **muerte neuronal retardada**, la cual depende del influjo de Ca^{++} y requiere de varias horas para presentarse (Romano y cols., 1995; Portera-Cailliau y cols., 1997). El proceso degenerativo estimulado por glutamato depende en gran medida del estado funcional inicial de la mitocondria. De esta forma, cuando existe una disminución en la tasa metabólica celular, la mitocondria es incapaz de mantener la homeostasis de Ca^{++} , presentándose la muerte neuronal por apoptosis (Almeida y cols., 1998; Portera-Cailliau y cols., 1997).

1.9. NEURODEGENERACIÓN.

La neurodegeneración es el proceso por el cual las células nerviosas o neuronas sufren un deterioro o daño que conlleva a la muerte celular. Las neuronas en el SNC, exceptuando en la fase de desarrollo, no tienen capacidad de multiplicarse ni de regenerarse y por tanto, tras sufrir una lesión, las células mueren.

1.9.1. Modelos de degeneración retiniana.

Las CGR, al igual que el resto de las neuronas del SNC, no tiene capacidad de regeneración y tras sufrir una lesión dichas células degeneran y mueren, es por ello que los modelos de degeneración de CGR sean muy utilizados en investigación para el estudio del SNC. Los procesos degenerativos retinianos pueden ser de distinta índole, para su estudio los modelos más caracterizados y frecuentes de muerte de CGR, son:

- **Isquemia retiniana.** Se provoca cuando hay una falta o disminución de la circulación sanguínea para cubrir las necesidades metabólicas del tejido retiniano. Las capas más externas de la retina se nutren a través de la coroides que aporta los

INTRODUCCIÓN

nutrientes mediante su alto entramado vascular. Sin embargo, las capas más internas de la retina se nutren de las ramas de la arteria central de la retina que proviene de la arteria oftálmica y que entra al ojo a través del NO, junto con las venas de la retina. La alteración o disminución del flujo sanguíneo provoca la muerte de las CGR. Los modelos experimentales más utilizados para inducir un proceso de isquemia retiniana son elevación de la presión intraocular, los métodos más utilizados para aumentar la presión intraocular son la cauterización de las venas epiesclerales (Shareef y cols., 1995), la deformación del globo ocular (Sellés-Navarro y cols., 1996), la inyección de suero salino hipertónico en las venas epiesclerales (Morrison y cols., 1997), la fotocauterización por láser de las venas limbares y epiesclerales (WoldeMussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2010), la inyección de microesferas en la cámara anterior (Sappington y cols., 2010; Chen y cols., 2011), la ligadura selectiva de los vasos oftálmicos (Vidal-Sanz y cols., 2001a, 2001b; Lafuente y cols., 2002a, 2002b; Lönnngren y cols., 2006) y la ablación fotodinámica (revisado en Osborne y cols., 2004). En todos los casos, la muerte de las células ganglionares es dependiente del intervalo de supervivencia que tengan las células, así como del tiempo que perdure la situación de isquemia, siendo el daño mayor en situación de isquemia prolongada.

- **Lesión del Nervio óptico: Axotomía o aplastamiento del nervio óptico.** La lesión o aplastamiento del NO, provoca la interrupción de los axones de las CGR que degeneran retrógradamente muriendo de manera inmediata e induciendo la muerte de gran parte de la población de CGR durante los meses posteriores. Se realiza cortando o aplastando el nervio óptico habiendo abierto previamente la vaina que contiene los vasos sanguíneos para evitar la isquemia. La muerte de las CGR es mayor y más rápida cuanto más cerca del globo ocular se realiza la axotomía (Villegas- Pérez 1993). Así la sección a 0,5 mm del ojo induce mayor porcentaje de muerte que la sección a 3 mm, cuando se comparan periodos de supervivencia iguales. (Villegas-Pérez y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993). Los estudios de dicho modelo en la rata adulta han permitido conocer que dicha lesión induce una fase de muerte rápida durante las dos semanas siguientes a la sección del NO, en la que se pierde el 80% de la población de las células ganglionares y posteriormente una fase de muerte más lenta que afecta a las

neuronas que sobreviven en la primera fase. En estudios realizados en rata y ratón adultos, seccionando el NO a 0,5 mm del globo ocular, se ha observado que la muerte de CGR aparece antes cuando éstas se identifican por su expresión de Brn3a que cuando se marcan con Fluorogold (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011). Creemos que se debe a la distinta naturaleza de ambos marcadores, ya que el primero es un marcador endógeno cuya expresión desaparece al morir la neurona y el segundo es un marcador exógeno que sólo desaparece del tejido cuando la CGR es fagocitada por la microglía.

- **Neuropatía óptica glaucomatosa.** Las neuropatías ópticas glaucomatosas (NOG) cursan con la degeneración progresiva de las CGR, provocando defectos en el campo visual hasta llegar a la ceguera. La etiología no es del todo conocida, aunque todo apunta al aumento de la presión intraocular como factor de riesgo principal. Aunque no todos los glaucomas cursan con una elevada presión intraocular la mayoría de los tratamientos utilizados tienen como inicial objetivo la disminución de la misma.
- **Excitotoxicidad.** En la retina, la neurotransmisión mediada por glutamato es la que se produce en las sinapsis de los FR a las células bipolares, de éstas a las CGR, y de las CGR al cerebro. Los receptores glutamatérgicos de la retina están localizados en la CPE, donde se producen las conexiones sinápticas entre los FR y las células bipolares y horizontales; y en la CPI, donde sinaptan las bipolares con CGR y amacrinas. El daño excitotóxico se produce cuando el exceso de glutamato se une a sus receptores como el N-metil-D-Aspartato (NMDA) desencadena un influjo de calcio que activa las cascadas de señalización intraneuronales proapoptóticas, que llevan a la neurodegeneración. Las células gliales son las responsables de eliminar el exceso de glutamato y si hay un déficit en esta función, se produce un daño de las CGR (revisado en Almasieh y cols., 2012). El método más utilizado es mediante inyección con agonistas glutamatérgicos como el NMDA.

1.10. NEUROPROTECCIÓN. AGENTES NEUROPROTECTORES.

Diversos estudios se llevan a cabo con el fin de evitar la degeneración neuronal en el SNC, ya que el efecto generado en cualquier patología que cursa con degeneración de neuronas es irreversible. Los tratamientos protectores tienen la finalidad de aumentar la supervivencia neuronal frente a la lesión y mantener la conectividad de sus células. Términos como neurorecuperación y neurorescate, insisten no sólo en la supervivencia celular, sino en la posibilidad de restablecer la funcionalidad de las conexiones que se encuentran afectadas por la lesión mediante la restauración de la población neuronal dañada hasta su estado funcional.

La retina, como hemos indicado en varias ocasiones, sirve de modelo para el estudio de la degeneración celular dentro del SNC por su fácil acceso y manejo en el desarrollo de terapias protectoras. Nuestro objetivo en neuroprotección es preservar o reducir la pérdida de las CGR, así como de la de sus axones (fibras del NO), y mantener su función fisiológica (visual).

En los últimos años se ha progresado de forma importante en el conocimiento de sustancias que actúan en diferentes puntos de las cascadas que conllevan a la muerte por necrosis o por apoptosis y que interfieren con estos procesos prolongando la vida de la neurona. Estos fármacos resultan prometedores como estrategia neuroprotectora y representan la base para estudios en animales de experimentación y estudios clínicos en el humano.

1.10.1. Factores neurotróficos.

Los factores neurotróficos son necesarios en la supervivencia, desarrollo y vida adulta de las neuronas del sistema nervioso central. Datos obtenidos de sistemas “*in vitro*” sugieren que los factores neurotróficos (NTFs) protegen a las neuronas reduciendo el exceso en la concentración de calcio intracelular inducida por la activación de receptores ionotrópicos de glutamato, así como la expresión en la superficie celular de receptores ionotrópicos de glutamato, modulando proteínas que impiden el aumento de la concentración del calcio o disminuyendo la acumulación de superóxidos intracelulares.

Los factores neurotróficos más relevantes son:

- **BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro)**, es el factor neurotrófico que mejor protege a las CGR. Su efecto sobre las CGR se ha estudiado en diversos modelos de lesión axonal e hipertensión ocular (HTO) tanto en rata como ratón. Se observó tras axotomía del NO en rata que el BDNF protegía el 100% de las CGR hasta una semana después de producirse la lesión, degenerándose el 50% de las CGR en los casos que no habían sido tratados con BDNF (Parrilla-Reverter y cols., 2009; Peinado-Ramón. y cols., 1996; Sánchez-Migallón y cols., 2011), y en el ratón, que el BDNF retrasaba la muerte celular tras axotomía en cinco días (Galindo-Romero y cols., 2013). Por lo que podemos indicar que a los 15 días tras axotomía en ambas especies, la supervivencia de las CGR es del 50% en comparación con animales no tratados con BDNF.

En modelos de HTO tratados con inyección con BDNF, se obtuvo tras un mes de la lesión la supervivencia del 10% más de las CGR frente a animales que no fueron tratados. Ciertos estudios revelan que la combinación de BDNF con secuestradores de radicales libres aumentaron este porcentaje hasta la supervivencia del 15% en animales tratados frente a no tratados (Ko y cols., 2000).

- **El CNTF (Factor neurotrófico ciliar)** es una proteína citoplasmática que actúa como factor activado por la agresión bajo condiciones patológicas estimulando el crecimiento axonal.
- **El GDNF (Factor neurotrófico derivado de células gliales)**. Estudios realizados revelan que la administración intravítrea de GDNF encapsulado en microesferas protege a las CGR en un 50% frente a las CGR sin tratamiento (Jiang y cols., 2007).

Por el contrario, algunos factores neurotróficos son capaces de hacer que las neuronas sean más sensibles a la excitotoxicidad. En este sentido se ha hipotetizado que los factores neurotróficos pueden tener un papel en el aumento de la vulnerabilidad a la excitotoxicidad acelerando su maduración (Samdani y cols., 1997).

1.10.2. Brimonidina (agonista alfa adrenérgico).

Investigaciones recientes sugieren que el proceso neurodegenerativo que sufren las CGR durante el glaucoma puede asemejarse a la degeneración secundaria producida tras una lesión primaria en el SNC, ya sea de origen traumático o vascular. Los fármacos neuroprotectores, deben ser capaces de neutralizar la toxicidad de las sustancias liberadas al espacio extracelular durante los procesos de neurodegeneración secundaria bien inhibiendo el proceso de muerte celular o bien aumentando la resistencia frente a esa muerte celular programada. Los mecanismos de los agonistas α -adrenérgicos como neuroprotectores son desconocidos de manera global, pero se han descrito procesos independientes que afectan en la neuroprotección de la lesión como son:

- La reducción o modulación en la excitabilidad inducida por glutamato,
- El bloqueo del estrés oxidativo debido a la excitotoxicidad del glutamato,
- La inducción en la expresión de factores neurotróficos,
- La inhibición de la apoptosis.

La activación de los receptores agonistas α -adrenérgicos provoca la salida de los iones K^+ al medio extracelular, generando una hiperpolarización que contrarresta la despolarización masiva que induce la excitotoxicidad mediada por glutamato.

Entre los agonistas α -adrenérgicos disponibles que más han demostrado efecto neuroprotector es la Brimonidina, sobre todo en la retina, debida a su gran especificidad frente a los receptores α -adrenérgicos, que son los mayoritariamente presentes en la retina, más concretamente en las células ganglionares de la retina (Yoles y cols., 1999; Carlsson y cols., 2000). Desde el punto de vista molecular, se evidenció que la brimonidina favorece la producción de factor de crecimiento fibroblástico básico y de agentes anti-apoptóticos como Bcl-2 y reduce los niveles de glutamato y aspartato en el humor vítreo, siendo el único hipotensor ocular con efecto neuroprotector demostrado (García y cols., 2008). Además de tener un doble mecanismo de acción mediante la disminución de la producción del humor acuoso, y el aumento del flujo de salida por las vías de drenaje uveo-escleral (Sedeño y cols., 2002).

En un modelo experimental de isquemia tras daño mecánico en el NO, el uso neuroprotector de la brimonidina demostró la reducción de la muerte de las CGR (Vidal y cols., 2001). Además, se observó su efecto tanto cuando se administra por vía intraperitoneal como cuando se administra por vía tópica, y es dependiente de la dosis (Wheeler y Woldemussie, 1999). Otros autores han sugerido que el efecto neuroprotector de la brimonidina estaría mediado por el aumento de BDNF en las células ganglionares; así, la inyección intravítrea de brimonidina en ratas produce un aumento en el número de células ganglionares de la retina positivas a BDNF. Mediante *Northern blot* se demuestra un incremento del 28% en la expresión de BDNF en el grupo de brimonidina comparado con el grupo control (Gao y cols., 2002).

1.10.3. Antagonistas de los canales de Calcio.

El exceso de calcio es una de las causas de muerte neuronal que se asocia a isquemia y excitotoxicidad. Los antagonistas de los canales del Calcio son los fármacos neuroprotectores que se han estudiado más ampliamente. La nimodipina, una dihidropiridina, con efecto predominante sobre el sistema nervioso, ha demostrado ser de utilidad en la prevención de vaso-espasmo cerebral secundario a hemorragia subaracnoidea. Estudios con flunarizina, otro antagonista del Calcio, evidencian la supervivencia de células ganglionares tras la sección del nervio óptico en ratas adultas (Eschweiler y cols., 1993).

1.10.4. Antagonistas de Glutamato.

La acción del glutamato se encuentra mediada por los receptores ionotrópicos y en mayor cuantía por los receptores de NMDA, un exceso de glutamato conlleva a un proceso de muerte neuronal, sustancias como la ketamina, dextrometorfano, metadona, memantina y amantadina actúan como antagonistas de dichos receptores, consiguiendo una disminución de los efectos nocivos del glutamato.

1.10.5. Agentes anti-inflamatorios.

Los agentes anti-inflamatorios son mediadores en procesos que cursan con daño celular, en el que de manera innata se obtiene una respuesta inflamatoria con el fin de aislar y destruir el agente que resulta dañino.

El enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), es una enzima que pertenece a la familia de las quinasas y se encuentra implicada en la regulación de rutas de señalización celular, el ciclo de división celular, la respuesta de daño en el ADN, la muerte y supervivencia celular y la diferenciación neuronal entre otras (Van Waue y cols., 2003). Estudios recientes demuestran que una sobreexpresión de GSK-3 es suficiente para inducir la muerte neuronal (Hetman y cols., 2000), relacionándose con diversas patologías. En los últimos años se han sintetizado numerosos inhibidores de GSK-3, que resultan moléculas prometedoras para el tratamiento de enfermedades diversas, como la diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Martínez, 2008). Además, la inhibición de quinasas que inhiben la proteína tau (proteína abundante en el SNC y en el SNP nivel de los axones y que está vinculada en el mantenimiento del citoesqueleto neuronal) podría ser beneficioso para enfermedades neurodegenerativas (Martínez y Castro, 2000).

En concreto, en este tipo de enfermedades, estos inhibidores están demostrando su eficacia, y a día de hoy existe un inhibidor de GSK-3 que está en fases clínicas para el tratamiento del Alzheimer, y para la parálisis supranuclear progresiva.

1.10.6. Ácido Tauroursodesoxicólico (TUDCA).

El TUDCA (Ácido Tauroursodesoxicólico), es un ácido biliar ambifílico, que se encuentra mayoritariamente en la bilis de animales como el oso. Es conocido su uso en el continente asiático desde hace más de 3000 años como tratamiento en patologías oculares. Sus propiedades neuroprotectoras frente a procesos provocados en la apoptosis o muerte celular programada actúan como una chaperona química que protege a las mitocondrias en dichos procesos frente a enfermedades oculares.

Investigaciones desarrolladas encuentran una disminución de los efectos apoptóticos cuando son tratados con TUDCA, así como el efecto protector a nivel de trastornos degenerativos de la retina. Estudios recientes realizados en ratón, demuestran los efectos protectores del TUDCA frente enfermedades oculares como la retinitis pigmentosa, (Phillips y cols., 2008; Oveson y cols., 2011; Fernández-Sánchez y cols., 2011), así como su efecto protector frente a procesos de neovascularización coroidea en rata (Woo y cols., 2010), obteniendo resultados muy alentadores.

1.11. ESTUDIO DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN ROEDORES.

1.11.1. Identificación de la población de CGR en roedores.

La retina, y específicamente las CGR, son utilizadas para el estudio de los cambios degenerativos asociados a lesiones del SNC, así como para el estudio neuroprotector de diversas sustancias. Para ello necesitamos saber con exactitud la proporción de CGR que mueren tras una lesión, así como aquellas que sobreviven tras un tratamiento. La identificación de las CGR y su diferenciación con las células amacrinadas desplazadas que se encuentran en igual proporción en la capa de CGR de roedores, es de vital importancia para la obtención de resultados y conclusiones. Para identificar las CGR se han utilizado diversas técnicas:

- **Identificación por criterios morfológicos clásicos.** Actualmente esta técnica está en desuso debido a la dificultad de diferenciar en tinciones celulares observadas por microscopía óptica las CGR pequeñas de las amacrinadas desplazadas.
- **Identificación mediante trazadores neuronales o inmunodetección.** Es el método más utilizado debido a que permite la identificación inequívoca de las CGR. Esta técnica consiste en aplicar en el muñón del nervio óptico o en otras regiones de proyección de los axones de las CGR (CS y NGL) sustancias que actúan de marcadores que se transportan de manera retrógrada por los axones de las CGR marcando el núcleo celular y sus proyecciones. De las sustancias aplicadas como marcadores, las más utilizados en la práctica experimental son: *el*

INTRODUCCIÓN

fluorogold (FG) que es un neuro trazador que se aplica en el NO o en los CS; *el Brn3a*, que es un factor de transcripción, en CGR de la retina de rata, el 92,2% de la población de CGR lo expresan y en el ratón adulto solamente se expresa en las CGR y su expresión no se ve afectada después de una lesión. Tanto el trazado con FG como la inmunodetección de Brn3a tienen sus ventajas e inconvenientes. El trazado nos informa de que las CGR mantienen su transporte axonal retrógrado activo, ya que el FG se transporta activamente. Sin embargo, si las retinas se marcan antes de que ocurra la pérdida de CGR, aparecen en la retina células de microglía transcelularmente marcadas con el trazador, este marcaje se produce porque las células de la microglía fagocitan las CGR trazadas y que posteriormente han muerto y acumulan el trazador en los fagosomas, de manera que también se “marcan”. Este proceso se conoce como marcaje trans-celular (Thanos y cols., 1991b, 1992). Aunque manualmente se puede contar el número de CGR, ya que son morfológicamente distintas de las células de microglía, el marcaje transcelular impide el conteo automático de las CGR.

La posibilidad de detectar las CGR usando técnicas inmunohistofluorescentes tiene ciertas ventajas sobre el uso de trazadores, ya que no requiere de manipulaciones experimentales previas al procesado del animal y no se produce marcaje de las células de microglía. Sin embargo, la inmunodetección de Brn3a no nos informa del transporte axonal, pero se sabe que el Brn3a es una proteína endógena que deja de expresarse en las CGR cuando éstas entran en apoptosis. Así, la inmunodetección de Brn3a permite realizar un curso temporal de muerte más real (Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2012). El uso de ambos métodos combinados es muy útil y ha permitido, por ejemplo, describir que en modelos de hipertensión ocular hay primero una pérdida del transporte axonal, seguida de muerte de CGR (Salinas-Navarro y cols., 2010). Así pues el Brn3a es un marcador fiable para identificar cuantificar y valorar la pérdida de CGR del ratón adulto “*ex vivo*”.

1.11.2. Cuantificación de la población de CGR en roedores.

La cuantificación de las CGR una vez identificadas puede desarrollarse por métodos automáticos o manuales. Los métodos más utilizados son:

- **Cuantificación indirecta de CGR.** Las fibras nerviosas forman el NO y por tanto se acepta que la totalidad de esas fibras pertenecen a los axones de las CGR, por lo que cada axón se correspondería con una CGR, mediante el recuento de los axones del NO se estima el número de CGR. Estimaciones realizadas en rata indican que el número de CGR de la retina de rata adulta oscila entre 96.200 y 118.300 (De Juan y cols., 1978; Forrester y Peters, 1967). En el ratón, el número de axones cuantificado es 64.746 (Honjin y cols., 1977).
- **Cuantificación manual de CGR.** Este método se realiza seleccionando tres áreas de recuento preestablecidas en montaje completo de retina en plano, en la cual se realiza el cálculo de la densidad celular media tras el contaje de manera manual de las CGR inmuno-teñidas. (Villegas-Pérez y cols., 1988,1993; Sellés-Navarro y cols., 1996; Peinado-Ramón y cols., 1996).
- **Cuantificación automática de las CGR.** Este método utiliza mapas de isodensidad celular para conocer el patrón de distribución de CGR y consigue la cuantificación del total de las CGR de rata y ratón. La densidad celular es cuantificada automáticamente mediante áreas de interés y los datos obtenidos se transportan a un programa informático de hoja de cálculo para su representación en una gráfica de contorno rellena usando software de representación gráfica (SigmaPlot® 9.0 para Windows®, *Systat Software, Inc., Richmond, CA*) que construye mapas de isodensidad. Este método permite el recuento celular con células marcadas mediante trazadores neuronales (fluorogol ó OHSt (Hidroxistilbamidina metanosulfonato)) como inmunodetectadas con Brn3a (Salinas-Navarro y cols., 2009).

2. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El sistema nervioso visual ha sido empleado como modelo de investigación del Sistema Nervioso Central, tanto en experimentación fisiológica como fisiopatológica. En este sentido, los modelos animales han sido utilizados para el estudio de los procesos degenerativos del sistema nervioso visual.

Como hipótesis planteamos que es posible la estandarización de un modelo animal de degeneración retiniana mediante la inducción controlada de la muerte celular por diferentes dosis de agentes excitotóxicos. Dicho modelo puede servir para evaluar la efectividad terapéutica de agentes farmacológicos y neurotróficos.

Para demostrar nuestra hipótesis utilizaremos ratones pigmentados adultos y aplicaremos técnicas de estudio estructural y funcional tras someterlos a la acción de agentes excitotóxicos y agentes terapéuticos.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es la creación y evaluación de un modelo experimental de neurodegeneración de las células ganglionares de la retina, fiable y reproducible. El modelo será inducido por agentes lesivos celulares con el fin de recrear los cambios estructurales y funcionales con los que cursan diversas patologías retinianas.

Los objetivos específicos son:

1. Estudio estructural y funcional de la retina en ratones pigmentados sometidos a procesos lesivos inducidos por Ácido kaínico (KA) inyectado intraocularmente.
2. Estudio estructural y funcional de la retina en ratones pigmentados sometidos a procesos lesivos inducidos por N-metil D-Aspartato (NMDA) inyectado intraocularmente.
3. Estudio estructural y funcional de la retina en ratones pigmentados sometidos a procesos lesivos inducidos por la combinación de KA y NMDA inyectados intraocularmente y su estudio comparativo a distintas dosis.
4. Estudio funcional de la retina en ratones pigmentados con degeneración neuronal inducida por excitotoxicidad que han sido tratados preventivamente con factores neurotróficos o agentes neuroprotectores. Valoración de la efectividad de agentes terapéuticos y neurotróficos sobre la degeneración neuronal inducida por excitotoxicidad.
5. Estudio estructural de las proyecciones de las células ganglionares de la retina y análisis de la vía visual en ratones pigmentados sometidos a procesos lesivos inducidos por agentes excitotóxicos inyectados intraocularmente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

En la presente Tesis Doctoral perseguimos la creación de un modelo experimental de neurodegeneración de retina controlada, mediado por dosis crecientes de sustancias excitotóxicas (NMDA y KA). Para ello empleamos como animal de experimentación al ratón casero (*Mus musculus*, L.1758).

4.1.1. Descripción del modelo animal utilizado.

El modelo murino utilizado para llevar a cabo los diversos experimentos fue el ratón C57BL/6J, también conocido como ratón silvestre o *wild-type* (wt), el cual fue adquirido a los Laboratorios Jackson. La cepa de ratón C57BL/6J es probablemente la mejor conocida en investigación científica y está siendo utilizada en diversos campos de la investigación, como en biología del desarrollo, genética, inmunología, neurobiología o estudio de enfermedades metabólicas (diabetes y obesidad) véase "Mouse Genome Sequencing Consortium" (2002). Se puede observar su fenotipo en la Figura 14. El ratón C57BL/6J es comúnmente utilizado como cepa origen para la generación de ratones transgénicos. Tienen una vida media larga (entre los 2 y 3 años) y baja susceptibilidad a los tumores. Todas estas características, junto con la fácil adquisición y cría, nos llevaron a elegir a esta cepa como animal de experimentación.



Figura 14: Imagen del ratón C57BL/6J. Fotografía del modelo fenotípico de ratón empleado en la realización de los experimentos.

4.1.2. Cuidados y mantenimiento.

Los animales fueron tratados según la normativa Europea (Directiva 86/609/CEE) y nacional (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero) vigente sobre la protección de los animales que son utilizados para la experimentación y otros fines científicos y la Ley 32/2007 para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; además, se siguieron las directrices de la asociación para la investigación en visión y oftalmología (*The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, ARVO).

El mantenimiento y manipulación de los ratones utilizados en la presente Tesis, se realizó en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá, el cual cumple en todos sus extremos las recomendaciones del Convenio del Consejo de Europa ETS 123 y la normativa vigente sobre Protección Animal para experimentación y fines científicos antes descrita. Cumpliendo dicha normativa, el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá se encuentra registrado en la Dirección General de Agricultura de la Consejería de Economía e Innovación Tecnológica de la Comunidad de Madrid, con el número ES280050001165.

Los ratones fueron estabulados en jaulas que disponían de un sistema de ultrafiltración de aire de entrada y salida a través de filtros HEPA (*High Efficiency Particulate Air Filtres*) absolutos, de una eficiencia de 99,997% (filtra las partículas < 0,3 micras). Las jaulas se encontraban en “*racks*”. La temperatura de mantenimiento fue de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, la humedad relativa del aire fue de $55 \pm 10\%$, y la ventilación fue de >30 renovaciones/hora. Los animales se alimentaron “*ad libitum*” con pienso A04 de mantenimiento de la empresa Panlab L.S. (Barcelona, España) y el lecho fue de madera de chopo. Los ciclos circadianos fueron de 12h/12h luz/oscuridad, mantenidos con luz emitida desde los fluorescentes de la habitación (luz indirecta >200 cd/m²) en la fase de día y completa oscuridad en la fase de noche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de las pruebas electrofisiológicas que se describen más abajo, los animales se ubicaron en unas cajas de adaptación a la oscuridad con suficiente antelación al experimento para permitir su realización.

4.1.3. Procedimientos anestésicos.

Con el fin de facilitar la manipulación quirúrgica de los animales en el proceso de inyección intraocular así como en los registros electrofisiológicos, todos ellos se efectuaron bajo anestesia general, inducida por inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla de Ketamina (70mg/Kg de peso corporal; Ketolar® 5% Pfizer, Alcobendas, Madrid, España) y Xilacina (7mg/Kg de peso corporal, Rompun® 2% Bayer, Kiel, Alemania) diluidos en 0,1 ml suero salino estéril (NaCl, 0,9%) produciendo una relajación muscular de grado medio-moderado. Esta concentración de anestésico es suficiente para la realización de nuestros estudios, ya que permite mantener al animal en estado de anestesia durante 40-50 minutos. Las manipulaciones experimentales se realizaron en condiciones no estériles, pero sí de minuciosa limpieza, especialmente de todo el instrumental microquirúrgico. Las manipulaciones microquirúrgicas se efectuaron con la ayuda de un microscopio binocular (Wild Heerbrugg, MDG13, Suiza) y con el instrumental de microcirugía apropiado.

En el postoperatorio inmediato, se les aplicó por vía tópica en la córnea un ungüento oftalmológico, Methocel 2% (Ciba Vision AG, 8442 Hetlingen, Suiza), para prevenir la desecación corneal y una posible lesión corneal. Los animales fueron devueltos a la jaula y colocados encima de una manta eléctrica emisora de calor hasta su recuperación de la anestesia. Posteriormente, fueron enviados al animalario, donde permanecieron una semana hasta los registros electroretinográficos y posteriores pruebas. Tras realizar todas las pruebas, los animales se sacrificaron con una sobredosis letal de una solución de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal®, Vetoquinol S. A., Lure, Francia) inyectado i.p. (0,5- 1 ml).

4.2. INYECCIÓN INTRAOCULAR.

El proceso de inyección intraocular fue realizado bajo una lupa binocular de laboratorio con una fuente de iluminación de luz fría (WILD HEERBRUGG, Intralux HE, Suiza) y mediante una jeringuilla (Nanofil [™], World Precisión Instruments, Florida, EEUU) con aguja de calibre 34G (Nanofil [™], NF35BV-2, World Precisión Instruments, Florida, EEUU).

El volumen vítreo del ratón adulto es de 5,3 μ l (Jeon y cols., 1998) teniendo en cuenta esto, el volumen de los agentes excitotóxicos inyectados fue de 1 μ l con el fin de asegurar que la técnica de inoculación sea reproducible. La jeringuilla fue cargada con la concentración indicada en cada caso del agente farmacológico a inyectar (NMDA, KA). A modo de control el ojo contralateral fue inyectado con la misma cantidad de volumen, pero de Buffer Fosfato Salino (PBS).

Anestesiado el animal según las indicaciones anteriores se colocó en posición de decúbito prono bajo la lámpara de aumento donde se procedió a la inyección intraocular. La localización de la inyección se realizó en la zona temporal del globo ocular por detrás del limbo esclero-corneal con la intención de que las sustancias inoculadas difundieran por la cavidad ocupada por el humor vítreo y entraran en contacto con las células de la capa retiniana, así como de sus células (véase Figura 15).

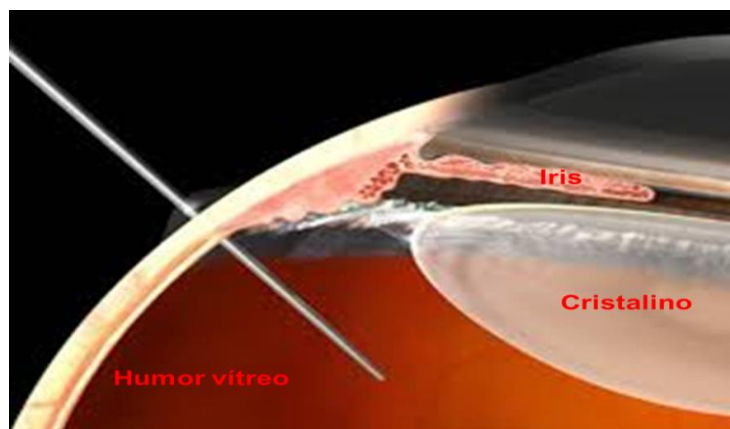


Figura 15. Localización de la zona de inyección intraocular. (Modificado de conojossano.blogspot.com, 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso de inoculación se realizó con el máximo cuidado a fin de no generar daños en los tejidos adyacentes, por ello se llevó a cabo bajo control óptico (Véase Figura 16). En los primeros ensayos se procedió a la aplicación de la inyección intraocular en ambos ojos del mismo animal para realizar una comparativa del daño generado en función de la técnica aplicada. Dado que dicho análisis demostró que la inyección “*per se*” no generaba daño en las células ganglionares de la retina, se decidió utilizarlo en la presente investigación.



Figura 16: Proceso de inyección intraocular. Mediante microscopio binocular con jeringuilla NF. 35BV-S.WPI.

4.3. REGISTRO ELECTORRETINOGRÁFICO.

Para la realización de los experimentos de registro electroretinográfico en animales de experimentación, se siguieron las normas dictadas por la ISCEV 2008 (de acuerdo a las siglas de *Internacional Society for Clinical Electrophysiology of Vision*) (Marmor y cols., 2009), para los estudios clínicos sobre humanos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, son diversas las formas de registro electroretinográfico descritas hasta el momento; en el presente estudio desarrollamos la técnica de registro electroretinográfico de ERG de campo completo, en la cual evaluamos la función de la retina en su conjunto y para conseguirlo la iluminación de la misma debe ser lo más homogénea posible.

El estudio electroretinográfico se realizó una semana después de la inyección intraocular con agentes neurotóxicos, con el fin de que la anestesia no afectase a la obtención de los datos ya que en ambos procedimientos se necesita de un estado anestésico previo del animal.

4.3.1. Fuentes de iluminación.

Las fuentes de luz utilizadas para la estimulación lumínica en los experimentos de registro electroretinográfico fueron dos:

- ***Pantalla de Ganzfeld*** (figura 17A).

Consiste en una semiesfera o cúpula como campo de estimulación que proporciona una luz homogénea en los 120° centrales de la retina (Dieterle y Gordon, 1956; Chou y Porciatti, 2012; Chou y cols., 2014). La estructura esférica de la pantalla permite que la iluminación del fondo de la misma se distribuya de forma homogénea por todo su interior. La pantalla de Ganzfeld fue diseñada en nuestro propio laboratorio y calibrada convenientemente de acuerdo a los criterios de la ISCEV 2008 (Marmor y cols., 2009). La iluminación del interior de la esfera se consiguió gracias a la utilización de LEDs (Kooijman y Damhof, 1980; Seiple y cols., 1986; Weymouth y Vingrys, 2008) cuya intensidad lumínica fue calibrada convenientemente como en el caso anterior.

- ***Diodos de emisión de luz*** (LED, *Light Emission Diode*) (figura 17B).

Debido al pequeño tamaño del ojo de ratón, la utilización de LEDs permite una iluminación homogénea de toda la retina (Viswanathan y cols., 2001). Se emplearon LED de la firma comercial RS-Amidata (ref. nº 310-6707), cuya intensidad era controlada mediante una fuente de alimentación diseñada por la casa CIBERTEC S.A. Los LEDs son dispositivos electrónicos que emiten una cantidad de luz proporcional a la corriente eléctrica que circula por sus polos. La iluminación proporcionada por los LEDs fue medida por un fotómetro (Mavo Monitor USB, Gossen, Nürnberg, Alemania) y ajustada a las necesidades de cada protocolo experimental.

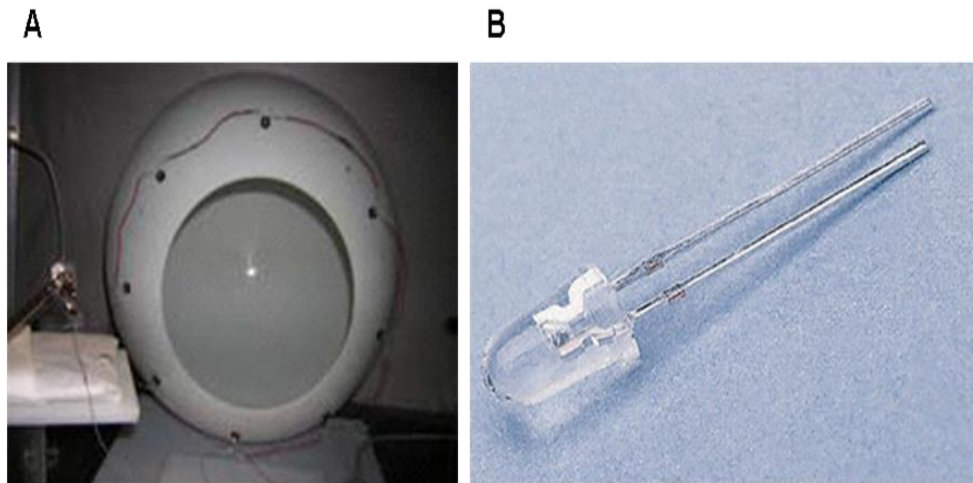


Figura 17: Fuentes de iluminación en los registros electroretinográficos. A: Campana de Ganzfeld. B: LED (*Light Emission Diode*, ref310-6707, RS-Amidata).

4.3.2. Preparación del animal.

Adaptación a la oscuridad. Antes del registro electroretinográfico. Se adaptó al animal a unas condiciones de oscuridad superiores a las 12 horas y se le anestesió por vía intraperitoneal con la mezcla anteriormente indicada (ketamina y xilacina). Las tareas de anestesia, instilación ocular y aplicación de los electrodos se realizaron bajo condiciones de oscuridad con una pequeña iluminación monocromática roja (~650 nm) tenue, para evitar la sensibilización de la retina de los animales.

Colocación del animal. El animal anestesiado fue introducido en el interior de una caja de Faraday, donde se siguió con las tareas preparatorias y se llevó a cabo el registro electrofisiológico. La caja de Faraday es una caja metálica que protege de campos electromagnéticos externos y evita ruidos eléctricos exteriores debido a que tiene una toma de tierra. Dentro de la caja los animales fueron mantenidos a una temperatura corporal de 37°C mediante una manta eléctrica (*Hot-Cold, Pelton-Sherpherd Industries, CA, EEUU*).

Condiciones del animal durante el registro. Previamente a la realización del registro se aplicaba en los ojos del animal una gota de colirio midriático

(Tropicamida al 1%, Colircusí Tropicamida, Alcon Cusí, SA, Barcelona, España) con el fin de dilatar la pupila y facilitar la iluminación homogénea de la retina. Para optimizar el registro electrofisiológico y preservar la superficie corneal de la desecación, se administró tópicamente Methocel (Ciba Vision AG, 8442 Hetlingen, Suiza) al 2%, en cada ojo antes de colocar el electrodo corneal.

Colocación de los electrodos. En cada registro se procedió a colocar los tres electrodos:

- Electrodo de tierra, conectado a una aguja intradérmica (30G) pinchada de forma subcutánea en la cola del animal.
- Electrodo de referencia, conectado a una placa de oro ubicada en la boca del animal.
- Electrodo corneal o de registro, (electrodo comercial Burian-Allen, *Hansen Ophthalmic Development Lab, Coralville, IA*) (Chou y Porciatti, 2012; Chou y cols., 2014). Estos electrodos corneales, están fabricados en metacrilato transparente y oro (véase figura C), se coloca en el eje visual a 5 mm de la córnea.

Adecuación lumínica. Una vez colocados los electrodos, y debido a que los animales están adaptados a un periodo de 12h de oscuridad y su manipulación se ha realizado en condiciones de baja luminosidad, se procede a la toma de datos según el protocolo establecido para la realización de los registros en condiciones escotópicas. En condiciones fotópicas se deja reposar al animal durante al menos 5 minutos con luz de fondo para su adaptación. La intensidad de dicha luz es dependiente del experimento a desarrollar, y lo que permite es la saturación de los bastones, para contribuir a la respuesta electrorretinográfica únicamente de los conos.

4.3.3. Técnica de registro.

El comienzo del registro de ERG se realiza con un protocolo preestablecido que permite el registro de la respuesta de todas las células retinianas al ser estimuladas con diferentes intensidades lumínicas, utilizando para intensidades de luz baja y media la campana de Ganzfeld y para intensidades superiores de luz los LED.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante la utilización del estimulador eléctrico diseñado específicamente para el control de las fuentes de iluminación (CIBERTEC S.L.) (Figura 18A) se procedía a alimentar los dispositivos luminosos (Figura 18B1, 18B2), consiguiendo luminosidades entre los $-2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ y $2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$. Esta señal lumínica era conducida por los electrodos (Figura 18C) debidamente colocados.

Las intensidades lumínicas aplicadas en cada caso fueron medidas con un fotómetro (*Mavo Monitor USB, Gossen, Nurenberg, Alemania*). La señal electrofisiológica registrada, después de ser amplificada y filtrada con un amplificador Grass (CP511 *AC amplifier, Grass Instruments, Quincy, Massachuset, EEUU*) (Figura 18D) era digitalizada a 10 KHz con una tarjeta de adquisición de datos Power Lab (Figura 18E) (*ADInstruments Ltd, Oxfordshire, Reino Unido*).

La señal era finalmente representada en la pantalla de un ordenador PC-compatible (Figura 18F). Tanto para la representación gráfica de las señales registradas como para el control del estimulador luminoso se empleó el software comercial Scope v6.4 del Power Lab (*ADInstruments Ltd, Oxfordshire, Reino Unido*).

La Figura 18 muestra esquemáticamente todo el equipamiento utilizado en la realización de los registros electroretinográficos.

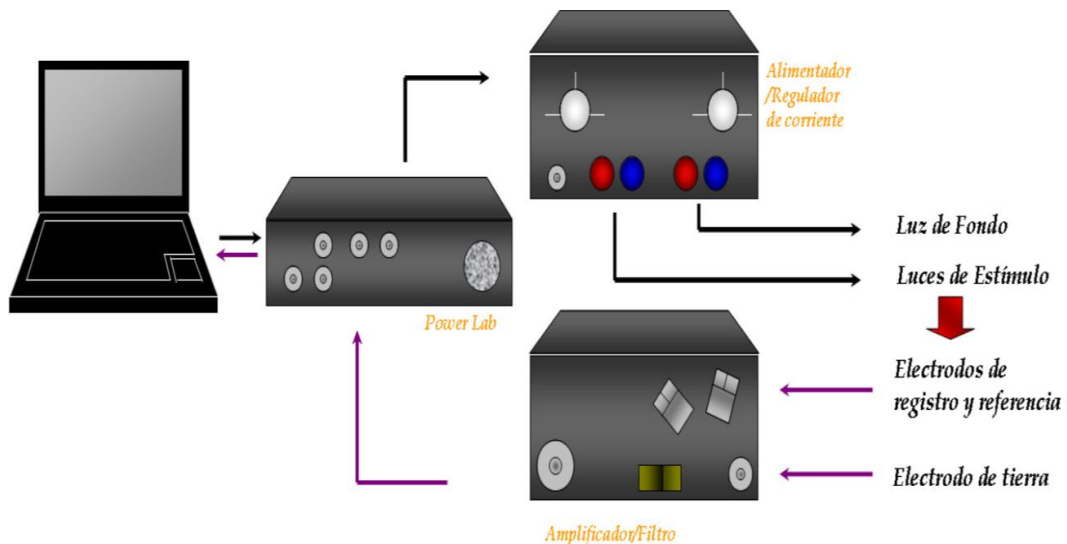


Figura 18: Equipo de electroretinografía. El protocolo de estimulación, configurado en el ordenador, es emitido a la tarjeta digitalizadora (Power Lab). La señal pasa al alimentador que permite el encendido de las diferentes fuentes de luz. El estímulo es recogido por los electrodos y amplificado para volver a la tarjeta digitalizadora; ésta convierte la información para su lectura y representación digital en el ordenador (tomado de Vicente Tejedor, 2009).

4.3.4. Protocolo de iluminación.

Para la realización de los experimentos de electroretinografía se utilizó un mismo protocolo de iluminación (Tabla I).

REGISTRO Nº	PROTOCOLO	INTENSIDAD (Cd·s/m ²)	DURACIÓN BARRIDO (ms)	ADAPTACIÓN	ESTIMULADOR	Av. Nº Reg.	INTERVALO ENTRE ESTÍMULOS (sg)
1	STR (-6)	1,0·10 ⁻⁶	500	DA	Ganzfeld	>10	10
2	STR (-5)	5,0·10 ⁻⁶	500	DA	Ganzfeld	>10	10
3	STR (-4)	1,0·10 ⁻⁵	500	DA	Ganzfeld	>10	10
4	STR (-3)	5,0·10 ⁻⁵	500	DA	Ganzfeld	>10	10
5	STR (-2)	1,0·10 ⁻⁴	500	DA	Ganzfeld	>10	10
6	ROD	1,0·10 ⁻³	500	DA	Ganzfeld	>10	15
7	ROD	5,0·10 ⁻³	500	DA	Ganzfeld	>10	15
8	ROD	1,0·10 ⁻²	500	DA	Ganzfeld	>10	15
9	MIXED	5,0·10 ⁻²	500	DA	Ganzfeld	>10	20
10	MIXED	1,0·10 ⁻¹	500	DA	Ganzfeld	>10	20
11	MIXED	1,0·10 ⁰	500	DA	LED	>10	20
12	MIXED	1,0·10 ¹	500	DA	LED	>10	30
13	MIXED	5,0·10 ¹	500	DA	LED	>10	30
14	MIXED	1,0·10 ²	500	DA	LED	>10	30
15	P.O.	1,0·10 ²	500	DA	LED	>5	30
16	CONE	1,0·10 ⁻²	500	LA	LED	>20	1
17	CONE	5,0·10 ⁻²	500	LA	LED	>20	1
18	CONE	1,0·10 ⁻¹	500	LA	LED	>20	1
19	CONE	5,0·10 ⁻¹	500	LA	LED	>20	1
20	CONE	1,0·10 ⁰	500	LA	LED	>20	1
21	CONE	5,0·10 ⁰	500	LA	LED	>20	1
22	CONE	1,0·10 ¹	500	LA	LED	>20	1
23	CONE	5,0·10 ¹	500	LA	LED	>20	1
24	CONE	1,0·10 ²	500	LA	LED	>20	1
25	FLICKER	1,0·10 ²	1000	LA	LED	>20	0,05

Tabla I: Protocolo ERG. STR; (*scotopic threshold response*) respuesta umbral escotópica, ROD: respuesta exclusiva de bastones, MIXED: respuesta mixta producida por conos y bastones, P.O.: respuesta de potenciales oscilatorios, CONE: respuesta exclusiva de conos, FLICKER: respuesta estímulos repetidos de alta frecuencia (20 Hz). Valores de intensidad y tiempo de los estímulos (DA: Adaptación a la oscuridad.LA: Adaptación a la luz.)

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de electroretinografía se elaboró en el propio Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá (UAH) para la evaluación de la sensibilidad en condiciones fotópicas y escotópicas de los animales de experimentación mediante la aplicación de estímulos luminosos con intensidades crecientes y por periodos de tiempo concretos.

Los diez primeros registros fueron desarrollados en la campana de Ganzfeld y en condiciones de adaptación a la oscuridad (>12 horas de adaptación) para obtener la respuesta generada por los fotorreceptores más sensibles (bastones) a estímulos de duración variable y de intensidad de luz hasta los 4 mV.

A partir de intensidades superiores a 5 mV se comenzaron a observar otras respuestas generadas por células fotorreceptoras mixtas (conos y bastones). En adaptación a la luz (>5 minutos de adaptación a una luz de fondo de 30 cd·m²) y sometidos a estímulos de intensidad variable mediante LED, con una duración fija de 6 ms, las respuestas de los fotorreceptores fueron principalmente generadas por los conos.

4.3.5. Respuestas electroretinográficas.

Para la realización del protocolo estándar se ha intentado normalizar los registros electroretinográficos en animales de experimentación siguiendo las mismas normas que la ISCEV (2008) dicta para los registros electroretinográficos en humanos. Siguiendo dichas normas, se han obtenido tres de las respuestas electroretinográficas estándar ya descritas en el apartado de introducción y que describimos a continuación de forma detallada:

- **Respuesta de bastones:** Se obtuvo tras >12 horas de adaptación a la oscuridad; se utilizó la pantalla de Ganzfeld y se procedió a aplicar estímulos luminosos de escasa intensidad ($-2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$). Tras 100 ms de registro basal, se aplicó un estímulo de 6 ms de duración; a continuación, se registró durante 500 ms la respuesta retiniana. Durante la realización del registro se utilizó un filtro de paso

alto de 1 Hz y de paso bajo de 1000 Hz. Se promedió un total de 60 respuestas, con un intervalo inter-estímulo de 10 segundos.

- **Respuesta mixta:** Se registra en el animal tras haber obtenido las respuestas de bastones. Se procede a aplicar estímulos luminosos de intensidad media ($1,5 - 2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$). Como en el caso anterior, tras 100 ms de registro basal, se aplicó un estímulo de 6 ms de duración; a continuación, se registró durante 500 ms la respuesta retiniana. Durante la realización del registro se utilizó un filtro de paso alto de 1 Hz y de paso bajo de 1000 Hz. Se promedió un total de 60 respuestas, con un intervalo inter-estímulo de 30 segundos.
- **Respuesta de conos:** Finalizados los registros en condiciones escotópicas, se sometió al animal de experimentación a una iluminación basal de $30 \text{cd}\cdot\text{m}^{-2}$ durante 5 minutos, con el fin de adaptar la retina a la luz (condiciones fotópicas). El registro de las respuestas de conos se llevó a cabo mediante iluminación con LED. Para ello, una vez adaptada la retina a la luz, se procedía a aplicar estímulos luminosos de gran intensidad ($2 \log \text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$). Tras 100 ms de registro basal, se aplicaba un estímulo de 6 ms de duración; a continuación, se registraba durante 500 ms la respuesta retiniana. Durante la realización del registro se utilizó un filtro de paso alto de 1 Hz y otro de paso bajo de 1000 Hz. Se promediaron un total de 60 respuestas, con un intervalo inter-estímulo de 1 segundo. Durante todo el registro se mantuvo la iluminación basal, lo cual permitía conservar el estado de adaptación a la luz.

Finalizado el protocolo experimental, se procedía a retirar los electrodos del animal y a devolverle a la jaula, vigilando su recuperación vital. Con la anestesia utilizada, la recuperación del animal se conseguía a los 45 – 50 minutos de su administración.

4.4. INMUNOCITOQUÍMICA.

4.4.1. Anticuerpos utilizados.

Las características de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en nuestro estudio se muestran esquemáticamente en la tabla II. Respecto a los anticuerpos primarios utilizados:

- **Brn3a:** es un factor de transcripción que se expresa específicamente en la población de células ganglionares. La inmunodetección del Brn3a ha demostrado que es un marcador fidedigno para la identificación y la cuantificación de CGR en condiciones normales y después de una lesión en rata y ratón albinos (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011). Es un miembro de la familia de los factores de transcripción Brn3, que se localiza en el núcleo y tiene un dominio POU de unión al ADN. El estudio de su expresión es una forma indirecta de conocer el estado fisiológico de las CGR. Para identificar, cuantificar y estudiar la distribución de la población total de CGR que sobreviven en los ojos de los ratones sometidos a inyección intraocular con elementos excitotóxicos, se realizó la inmunohistoquímica contra la proteína Brn3a.
- **PKC α :** Para la detección de células bipolares de los bastones se utiliza un anticuerpo dirigido contra la proteína kinasa C (PKC), ya que se había observado en la retina de varios mamíferos, la presencia de inmunorreactividad de PKC α en las células bipolares, pero sólo en las que tenían la morfología de las células bipolares de los bastones (Greferath y cols., 1990). La PKC es una enzima que juega un papel importante en la regulación de la neurotransmisión tanto pre- como en postsinapsis y se denomina así por ser dependiente de Ca²⁺, es miembro de una gran familia de proteínas kinasas, que consiste en al menos 11 subespecies de PKC descritas: alpha, beta I, beta II, gamma, delta, epsilon, eta, theta, mu, zeta y lambda. La señal de inmunorreactividad de PKC α es importante en las

células bipolares de bastones, aunque también son inmunorreactivas algunas células amacrinas.

- **Syt2:** Es una proteína de membrana asociada a las vesículas sinápticas, que actúan como sensores de calcio para la liberación de manera rápida a través de las terminales nerviosas presinápticas de neurotransmisores. Dentro de las isoformas sinaptotagmicas en el sistema nervioso central del ratón podemos diferenciar Syt1 y Syt2, ambas se localizan predominantemente en diferentes subconjuntos de sinapsis en retina, hipocampo, cerebelo y núcleo mediano del cuerpo trapezoidal (MNTB). En la retina, los terminales de las células horizontales y de las bipolares OFF contienen Syt2, mientras que la mayoría de los otros terminales contienen Syt1. La localización de Syt1 en la retina inmadura es similar a la observada en el adulto; Sin embargo, la localización Syt2 aparece sorprendentemente diferente a las edades perinatales y continúa cambiando drásticamente antes de la apertura del ojo. Por ejemplo, las células amacrinas de primera generación, que carecen de Syt2 en la retina adulta, expresan transitoriamente Syt 2 durante las primeras dos semanas posnatales.
- **GNB3:** Es una proteína de unión a nucleótidos de guanina beta3 (GNB3), se encuentra asociado a los receptores transmembrana. Diversos estudios indican la presencia de GNB3 en células fotorreceptoras y posiblemente en células bipolares en retinas murinas, bovinas y de primates (Lee y cols., 1992; Peng y cols., 1992; Huang y cols., 2003). En ratones la mayor concentración de GNB3 se encuentra en los segmentos externos de los fotorreceptores (Huang y col., 2003), mientras que en la retina central hay una respuesta mayoritaria positiva al GNB3 cuando se marca con opsina rojo/verde, indicando la presencia de GNB3 en los conos, y otra respuesta minoritaria negativa en la capa de fotorreceptores asociada a los conos S (cono azul).
El marcaje de GNB3 también se ha observado en la capa nuclear interna en células bipolares, y marcajes conjuntos con PKC demuestran que una minoría de células bipolares positivas para GNB3 fueron negativas para

MATERIALES Y MÉTODOS

PKC, lo que indica que GNB3 es expresado por un subtipo de células bipolares en la retina de ratón (Huang y cols., 2003).

Anticuerpo	Clasificación	Tipo	Donador	Concentración	Procedencia
Anti-Brn3a	1°	Poli-clonal	Cabra	1/200	Santa Cruz
Anti-Pkca	1°	Poli-clonal	Conejo	1/1000	Sigma
Syt2	1°	Poli-clonal	Conejo	1/500	Synaptic systems
GNB3	1°	Poli-clonal	Conejo	1/50	Sigma
Cy2(FITC) donkey antigoat	2°	Cy™2	Mono	1/200	Jackson
Cy3 donkey antirabbit	2°	Cy™3	Mono	1/200	Jackson

Tabla II. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en protocolos de inmunotinción.

- **DAPI** ó (4',6-diamino-2-fenilindol) es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias del ADN en el núcleo celular. Es capaz de emitir una fuerte fluorescencia cuando se intercala en la doble cadena del ADN tiñendo por tanto los núcleos de todas las células. Su máximo de absorción se produce a una longitud de onda de 360 nm (ultravioleta) y su máximo de emisión a 460 nm (azul) (véase Tabla III). Por lo tanto, en la microscopía de fluorescencia, DAPI es excitado con luz ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul / cian.

Compuesto	Absorción	Emisión	Concentración	Procedencia
DAPI	350nm	470nm	0,01%	Sigma

Tabla III. Características del DAPI.

4.4.2. Microscopía utilizada.

Para la observación de las muestras se utilizaron dos tipos de microscopios: el de fluorescencia y el confocal. Ambos microscopios cuentan con el conjunto de filtros y láseres que permiten tanto la excitación como la emisión de las señales lumínicas de los anticuerpos secundarios utilizados. Dichos microscopios fueron:

- El microscopio de fluorescencia de la marca Olympus, modelo Provis AX-ZO Turbo interroller (Olympus, EEUU). Se emplearon los objetivos 4x, 10x, 20x y 40x.
- El microscopio confocal de la marca Leika, modelo TCS SP2 (Leika, Wetzlar, Alemania) Se emplearon objetivos de inmersión en aceite 40x y 63x y se hicieron proyecciones Z de amplitud máxima para abarcar la totalidad de las células estudiadas. Todo el manejo del software informático del microscopio confocal fue realizado por el técnico del laboratorio de Fisiología de la Universidad de Alcalá de Henares, Madrid.

4.4.3. Protocolos de inmunotinción.

En nuestro estudio se realizaron diversos tipos de inmunotinciones según la finalidad de las pruebas, en todos ellos se realizaron unos pasos previos comunes:

- Sacrificio del animal; los ratones fueron sacrificados mediante sobredosis de pentobarbital (95mg/Kg), administrado por inyección intraperitoneal.
- Extracción de los ojos; se enuclearon los ojos mediante el corte de los músculos periorbitales.
- Post-fijación de ojos; los ojos se sumergieron en una solución aproximada de 5 ml de Paraformaldehído (PFA) al 4% durante hora y media a temperatura ambiente y en el volteador para la fijación de los tejidos. Con el fin de facilitar el acceso del PFA se realizó dos pequeños cortes en la zona del limbo esclero-corneal. Transcurrido el plazo de inmersión, se realizó el corte del polo anterior ocular para extraer el cristalino y se mantuvo los ojos en la

MATERIALES Y MÉTODOS

misma solución a 4°C de temperatura durante al menos 14 horas. Pasado ese periodo de tiempo, se procedió al lavado de los ojos con solución de PBS al 0,1 M en tres periodos de diez minutos de duración.

Para la realización de los lavados tanto del globo ocular como de la retina, además de las soluciones limpiadoras indicadas en cada caso, se utiliza el volteador para mejorar la eficacia de los lavados.

4.4.3.1. Inmunotinción de retina completa en plano.

Para hacer el recuento de las CGR, se realizó el protocolo de inmunotinción con BRn3a en retina completa montada en plano. Tras realizar los pasos previos a la inmunotinción, mediante el microscopio óptico y material adaptado se procedió a la extracción de la retina con sumo cuidado para no romperla. La retina se colocó abierta hacia arriba en un eppendorf de 1,5 ml para proceder a su lavado que se realizó por triplicado durante 10 minutos con el uso de una mezcla de PBS 0,1M y Tritón X-100 al 0,5% (denominada, a partir de ahora, solución limpiadora).

Tras el último lavado, se dejó la retina con la copa hacia arriba en un volumen mínimo de solución para cubrirla (1-2 mm) y se congeló a -80°C durante 15 minutos. Mediante el uso del agitador se procedió a la descongelación del tejido, que previamente a la incubación fue lavado con la solución limpiadora en tres ocasiones y durante diez minutos cada una. Se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (*Brn3a goat polyclonal*, 1/200) diluido en una mezcla compuesta por Tritón X-100 al 2%, suero de mono al 5% y PBS 0,1M. Se dejó el tejido en agitación durante dos horas y posteriormente se mantuvo en agitación, pero a temperatura de 4°C durante 24 horas. Al término del cual y para eliminar el exceso de anticuerpo primario tras la incubación, se procedió al lavado con la solución limpiadora en tres ocasiones con una duración de diez minutos por cada lavado.

El segundo anticuerpo (*Cy2 donkey anti goat*) fue diluido en una solución compuesta por PBS 0,1M, Tritón X-100 0,5% y suero de mono al 5% y se realizó la incubación del tejido durante un periodo de dos horas en agitación y protegido totalmente de la

luz. Se muestra un esquema del proceso de inmunotinción en la figura 19. Posteriormente, se procedió a la realización de tres lavados de diez minutos con la solución limpiadora.

Para finalizar, se realizó el montaje de la retina en un portaobjetos de vidrio. Con el fin de mantener la fluorescencia del marcaje, se cubrió el tejido de FluorSave™ Reagent (Calbiochem, Canadá). El portaobjetos fue cubierto con un cubreobjetos y mantenido a 4°C hasta su observación a microscopia óptica de fluorescencia (Objetivo 10X y filtro cy2).

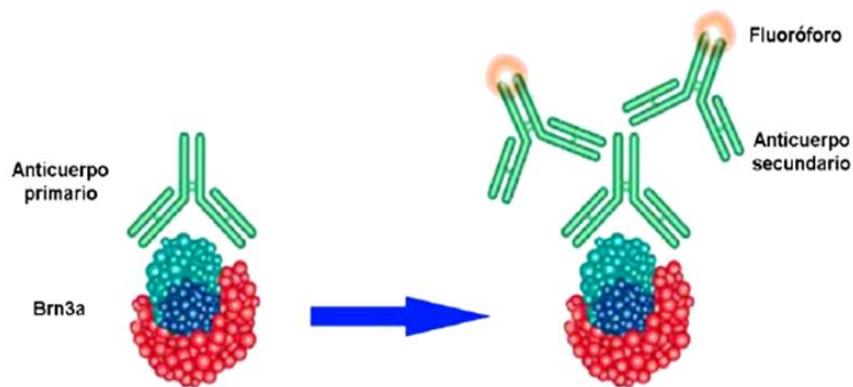


Figura 19. Esquema representativo de la técnica de inmunohistoquímica para la detección de las proteínas Brn3a en el núcleo de las CGR. El anticuerpo primario de cabra anti-Brn3a reconoce y se une de manera específica al antígeno (Brn3a) presente en los núcleos de las células ganglionares de la retina. En un segundo paso se detecta la parte conservada del anticuerpo primario por un anticuerpo secundario de burro que está acoplado a un fluoróforo y que al excitarse emite una fluorescencia roja o verde (Alexa 594 o alexa 488, respectivamente). (Modificado de García Ayuso, 2011).

4.4.3.2. Inmunotinción de secciones transversales de retina.

Para la observación de las capas celulares de la retina, así como de las células que las componen, el protocolo a seguir de inmunotinción fue con Brn3a, PKC α y DAPI, sobre secciones transversales de retina. Tras los pasos previos comunes a la inmunotinción, se procedió a la crioprotección del globo ocular mediante soluciones de sacarosa crecientes. El agua que contienen los tejidos, cristaliza al congelarse

MATERIALES Y MÉTODOS

pudiendo rasgar las muestras, para evitar esto la crioprotección se lleva a cabo mediante baños seriados en diferentes concentraciones de sacarosa. Las concentraciones utilizadas fueron 20, 30, 40% de sacarosa diluida en PBS 0,1M, durante una hora para las dos primeras concentraciones a temperatura ambiente y en agitación continua. El último paso consistió en la inmersión del tejido en sacarosa al 40% durante toda la noche en agitación y a una temperatura de 4°C.

Una vez realizada la crioprotección los ojos fueron incluidos en un medio adecuado para la congelación (*Optimal Cutting Temperature media, Sakura Finetek, CA 90501, EEUU*) donde se mantuvieron durante una hora en volteador y a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron colocados en moldes de plástico para congelación con OCT y se procedió a su congelación siendo almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

Se realizaron cortes sagitales dejando secciones de retina de 15 μm de espesor, mediante el criostato (*Bright OTF Cryostat, Bright Instrument Company LTD; Huntington, Reino Unido*). Los cortes eran montados sobre portaobjetos de vidrio que habían sido previamente gelatinizados y que se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Para proceder a la inmunotinción de las secciones de retina, se siguieron los procedimientos que se describen a continuación durante los dos días siguientes

Día 1:

- *Aclimatación*: Los cortes son retirados del congelador y mantenidos durante una hora a temperatura ambiente.
- *Lavado*: Para eliminar el exceso de OCT y optimizar el efecto de los anticuerpos, los cortes de retina fueron sometidos a tres lavados de 10 minutos con PBS 0,1M en agitación.
- *Preincubación*: Con el fin de bloquear señales inespecíficas, las secciones se sumergieron en una dilución de Tritón X-100 al 0,2% en suero de mono al 2% y PBS 0,1M durante 1 hora en cámara húmeda.
- *Incubación con anticuerpos primarios*: las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios (Brn3a y PKC α) diluidos en una solución con

Tritón X-100 al 0,2%, suero de mono al 2% y PBS 0,1M durante toda una noche (aproximadamente 16 horas) a temperatura ambiente y en la cámara húmeda.

Día 2:

- *Lavado*: Al día siguiente se retiró el exceso de anticuerpo primario con tres lavados en PBS 0,1M de 10 minutos cada uno y en agitación.
- *Incubación con anticuerpo secundarios*: Igualmente que, con los primarios, los anticuerpos secundarios (Cy2 *donkey antigoat* y Cy3 *donkey antirabbit*) se diluyeron en Tritón X-100 al 0,2%, suero de mono al 2% y PBS 0,1M.
- *Lavado*: Nuevamente se realizaron tres veces por diez minutos en PBS con agitación para retirar el exceso de los segundos anticuerpos.
- *Contraste*: Usamos marcadores intercaladores de ADN para determinar las capas nucleares de la retina. De esta forma, tenemos referencia de la localización de los marcajes en la retina. Para ello, se empleó la molécula 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una dilución de 1:1000. Los portaobjetos se mantienen con este marcador nuclear durante diez minutos.
- *Lavado*: Nuevamente tres veces por diez minutos en PBS en agitación.
- *Montaje y lacado*: Para el montaje se utilizó un medio adecuado con propiedad de protección de la fluorescencia, *Fluorsave Reagents (Bionova, Calvbiochem)*.

En la Figura 20 se muestra esquemáticamente toda la secuencia del marcaje inmunohistoquímico.

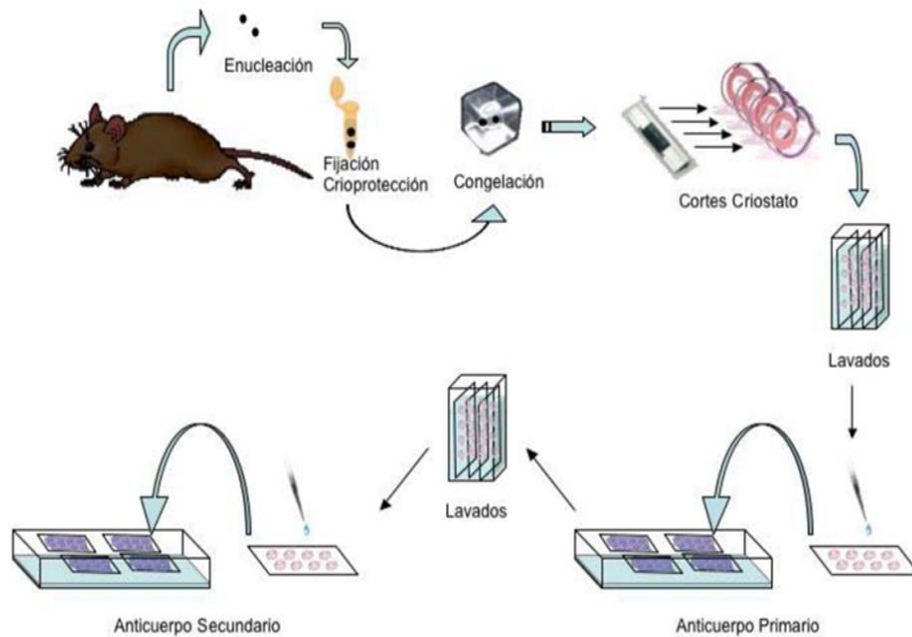


Figura 20: Esquema del proceso de marcaje inmunohistoquímico. Tras sacrificar al animal, se procedió a la enucleación de los dos ojos y fijación en PF (4%). Posteriormente se crioprotegieron en concentraciones crecientes de sacarosa y se congelaron en OCT. Se realizaron las secciones transversales en el criostato y fueron sometidas a los procesos de lavado y marcaje con anticuerpo primario y secundario antes de ser observadas en el microscopio.

4.4.4. Recuento de células ganglionares de la retina. Cuantificación manual.

Todas las retinas montadas en plano e inmunológicamente teñidas con Brn3a se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico y de fluorescencia (Olympus, modelo Provis AX-ZO Turbo interroller, EEUU) equipado con tres filtros: el ultravioleta (BP 365/12, LP 397), que permite la observación de la fluorescencia del DAPI (marcador nuclear) así como de la hidroxistilbamidina metanosulfonato (OHSt, *Molecular Probes, Leiden*, Holanda) pequeña molécula con propiedades fluorescentes utilizada como trazador retrógrado de CGR; el de rodamina (BP 546/12, LP 590) para observar la fluorescencia roja de los anticuerpos conjugados

con Alexa-594 (Brn3a) y el de fluoresceína (BP 450/490, LP 515-565) que permite la observación de los anticuerpos conjugados con Alexa-488 (pNFH y NFH).

La cuantificación del número de CGRs se realiza por la extrapolación del conteo manual de una serie de áreas de muestreo establecidas previamente y que son estándar. Estas áreas son representativas de la retina y engloban áreas de baja densidad y áreas de alta densidad para poder promediar el número de CGRs por unidad de superficie. El número de CGRs detectadas varía según el marcador utilizado. Los recuentos de células ganglionares de retina se realizaron en las fotografías de retina en plano inmuno-teñidas con Brn3a, en ellas se seleccionaron distintas localizaciones (tres en cada retina) para proceder al recuento celular de la zona acotada (700x300 μm^2).

Para el recuento celular manual se utilizó el programa Imagen J, programa de procesamiento de imágenes digitales desarrollado en 1997 por el *National Institutes of Health*, en EEUU y de dominio público. Con el programa se seleccionaban las zonas acotadas de la retina donde las CGR teñidas con Brn3a eran marcadas de manera manual y anotada automáticamente para su cuantificación.

Aunque este método manual de conteo es más complicado y menos fidedigno que los conteos computarizados, se sigue utilizando para cuantificar el número de CGRs trazadas que sobreviven a una lesión axonal, ya que las células de microglía se marcan transcelularmente impidiendo la cuantificación automática.

4.5. MARCAJE ANTERÓGRADO DE LA VÍA ÓPTICA.

4.5.1. Marcadores utilizados.

Para el marcaje de la vía visual en ratones inicialmente inoculados con agentes excitotóxicos utilizamos dos tipos de colerotoxina como marcaje anterógrado: CTX488 (CY2 con marcaje en color verde) y CTX555 (CY3 con marcaje en color rojo) ambas en concentraciones del 2% y disueltas en PBS 0,1M y DMSO 1% (dimetil-sulfóxido). El marcaje se realizó mediante inoculación intraocular,

MATERIALES Y MÉTODOS

siguiendo el mismo protocolo e instrumental utilizado para la inoculación de los agentes excitotóxicos. El volumen inyectado fue de 1µl de CTX488 en el ojo derecho y el mismo volumen de CTX555 en el ojo izquierdo. Posteriormente a la inoculación de colerotoxina se dejó un mínimo de 5 días antes de proceder a la perfusión de los animales y extracción del cerebro.

4.5.2. Perfusión de los animales.

Los animales se sacrificaron con una sobredosis inyectada intraperitoneal de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal, Vetoquinol Especialidades Veterinarias S.A., Alcobendas, Madrid) y se procedió a la realización de una esternotomía media para exponer el corazón y los grandes vasos sanguíneos. Se introdujo una aguja de insulina en la aorta ascendente a través del ventrículo izquierdo, para perfundir inicialmente con aproximadamente 15 ml de suero salino (NaCl al 0,9%) para limpiar el contenido hemático de los vasos y órganos del animal. Simultáneamente a la inserción de la aguja, se practicó un corte en la orejuela de la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y suero salino. A continuación, se perfundió con aproximadamente 25 ml de solución de paraformaldehído (PF) al 4% en tampón fosfato 0,1 M a 4°C de temperatura.

Tras este proceso se enuclearon los ojos y se extrajo el cerebro, el cual fue cortado para su estudio mediante un molde diseñado para reproducir el plano de la sección del cerebro de ratón en coordenadas estereotáxicas (Figura 21)

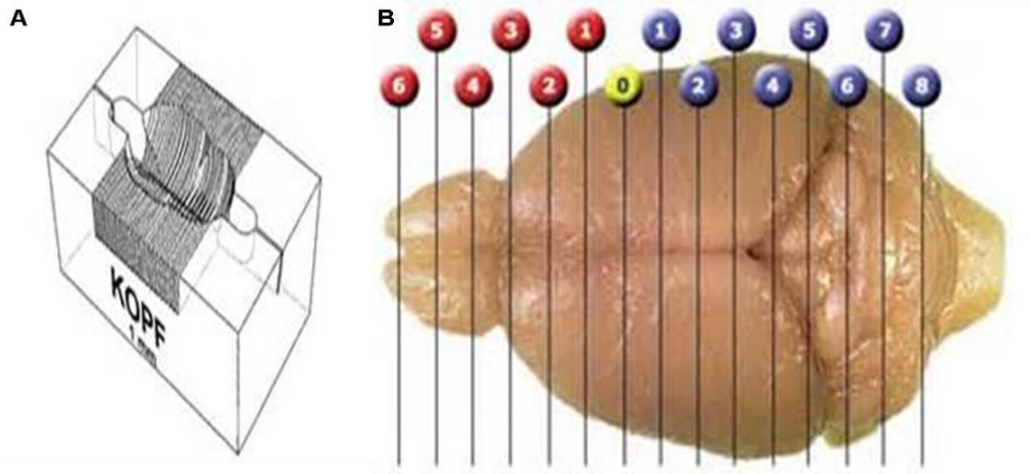


Figura 21. Molde de cerebro con coordenadas estereotáxicas. A ; Molde para la sección coronal de cerebro de ratón en coordenadas estereotáxicas. **B;** Representación de las secciones de cerebro de ratón. Imagen modificada de www.cientificasenna.com, 2015.

Los cortes se realizaron desde el nivel de la línea 0 (Bregma), que corresponde a la zona quiasma óptico, hasta la línea 5 que corresponde al extremo caudal del colículo superior. Las secciones se realizaron con el máximo cuidado de no cortar los nervios ópticos. Posteriormente, fue postfijado en PF 4% durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a tratar los cerebros con el mismo protocolo de crioprotección utilizado anteriormente mediante inmersión en porcentajes crecientes de sacarosa (20%, 30%, 40%). En el caso del cerebro, el tiempo que lo mantenemos en las distintas dosis es de una noche en cada caso a una temperatura de 4°C y en agitación constante. Una vez realizada la crioprotección, los ojos fueron embebidos en un medio adecuado para la congelación (OCT) donde se mantuvieron durante una hora en volteador y a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron colocados en moldes de plástico para congelación con OCT siendo almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

4.5.3. Secciones encefálicas.

Para realizar los cortes de las distintas secciones encefálicas, se recuperaron los cerebros embebidos en OCT a -80 °C y mediante el criostato (*Bright OTF Cryostat*,

Bright Instrument Company LTD; Huntington, Reino Unido) se realizaron cortes de 30 μm de espesor. Todos los cortes eran montados sobre portaobjetos de vidrio que habían sido previamente gelatinizados y que se conservaron a -20°C hasta su utilización. El estudio de los cortes se realizó mediante microscopía de fluorescencia (Olympus, modelo Provis AX-ZO Turbo interroller EEUU) con ayuda del objetivo 10X.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaStat® 3.1 para Windows® (*Systat Software, Inc, Richmond, CA, EEUU*). Previamente todos los datos a comparar de cada grupo se almacenaron en hojas de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003, *Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU*). La significación estadística se situó en $p < 0,05$ para todos los test estadísticos. Para comparar los datos cuantitativos del número total de CGRs entre ojos derechos e izquierdos se utilizó el test de *Mann-Whitney* y el test de la *t* de *Student*. Los datos estadísticos se mostraron mediante media aritmética, el tamaño de la muestra y la desviación estándar o error estándar de la media.

5. RESULTADOS

5.1. RECuentos de células ganglionares de retina de animales sometidos a la inyección intraocular de agentes excitotóxicos.

5.1.1. Recuento de células ganglionares de retina ante la inyección intraocular con distintas dosis de KA.

Para la cuantificación de las células ganglionares tras la inyección intraocular de agentes tóxicos, se realizó un marcaje inmunohistoquímico específico sobre retinas montadas en plano siguiendo el protocolo indicado en Materiales y Métodos. La observación a baja amplificación de las retinas tras realizar la inmunohistoquímica permite la visualización de las células ganglionares (véase Figura 22 A y B). A mayor amplificación se observa como la inyección de KA provoca una disminución similar en distintas regiones retinianas (compárese las Figuras a1 con b1 y a2 con b2).

El número de células marcadas con Brn3a se encuentra disminuido en el ojo inoculado con KA (OD) con respecto al ojo inoculado con PBS (OI). Esta clara disminución de la densidad CGR (CG/mm²) es debida al efecto deletéreo generado por el agente neurotóxico. Por lo tanto, la inyección intraocular con 10 mM de KA provoca una disminución en el número de células ganglionares de retina (CG/mm²) independientemente de la zona seleccionada, frente a la inyección intraocular de PBS, que no provoca daño celular. Esta afirmación nos confirma la inocuidad del procedimiento de inyección intraocular, con lo que el daño celular observado no es atribuible a la técnica utilizada.

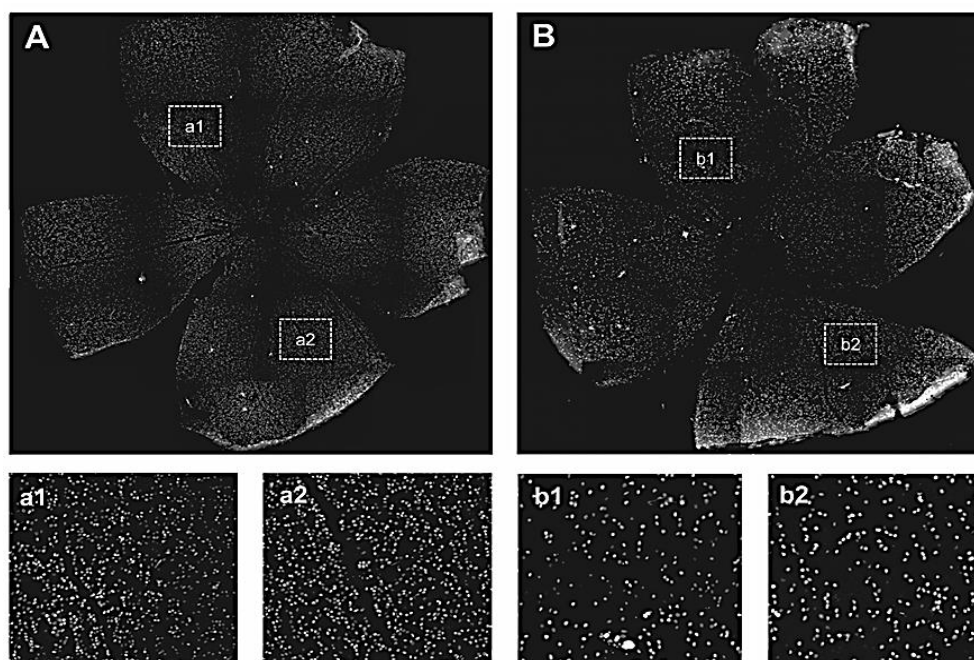


Figura 22. Imagen de una retina montada en plano e immuno-marcada con anticuerpo contra Brn3a. El ojo izquierdo (A) inyectado con una solución de PBS; el ojo derecho (B) del mismo animal inyectado con una concentración de 10 mM de KA. Se muestra a mayor escala, las áreas a1, a2 de A y b1, b2 de B, que corresponden a una superficie de $700 \times 500 \mu\text{m}^2$. Se aprecia la menor densidad de células ganglionares en la retina del ojo inyectado con KA.

Se llevó a cabo una serie de experimentos con el fin de seleccionar la concentración más idónea para la creación de un modelo excitotóxico válido. Para ello, inicialmente se utilizaron concentraciones crecientes de orden micro molar (μM) de KA. Los ensayos demostraron que los daños generados en la población de células ganglionares de la retina fueron mínimos, obteniendo recuentos celulares similares a los de las retinas control, por lo que no fueron aptos para nuestro estudio. Se repitieron los experimentos con concentraciones crecientes de orden milimolar (mM) y se obtuvieron datos de daño celular significativo. Las concentraciones seleccionadas y aplicadas para el estudio del modelo excitotóxico fueron 5, 10 y 20 mM de KA. La disminución media de la densidad de CGR del ojo lesionado con KA (OD) respecto al inyectado con PBS (OI) fue de 816, 1073 y 1368 CG/ mm^2 para 5, 10 y 20 mM de KA, respectivamente (véase Tabla IV).

RESULTADOS

KA	5 mM	10 mM	20 mM
OI	2431 ± 198	2206 ± 229	2102 ± 631
OD	1615 ± 435	1133 ± 410	734 ± 428
p	0,17	0,02	0,01

Tabla IV. Densidad promedio de CGR (cel. /mm²) en animales sometidos a la inyección intraocular con KA. Se muestran las densidades celulares medias (y los errores estándar) de animales sometidos a la inyección intraocular con 5 (n=4); 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA en el ojo derecho (OD). Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), ojo control inyectado con PBS. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

Se observó que los valores de pérdida celular en el ojo inyectado con el agente excitotóxico (OD) aumentan con el incremento de la dosis aplicada. Las diferencias fueron estadísticamente significativas para concentraciones de 10 y 20 mM de KA. El porcentaje de células ganglionares de la retina fue inferior en todos los ojos inoculados (OD) con respecto a los ojos controles (OI), resultando para concentraciones de 5, 10 y 20 mM de KA unas pérdidas celulares del 33%, 52,03% y 68,37%, respectivamente en el ojo tratado con respecto al ojo control (véase Figura 23).

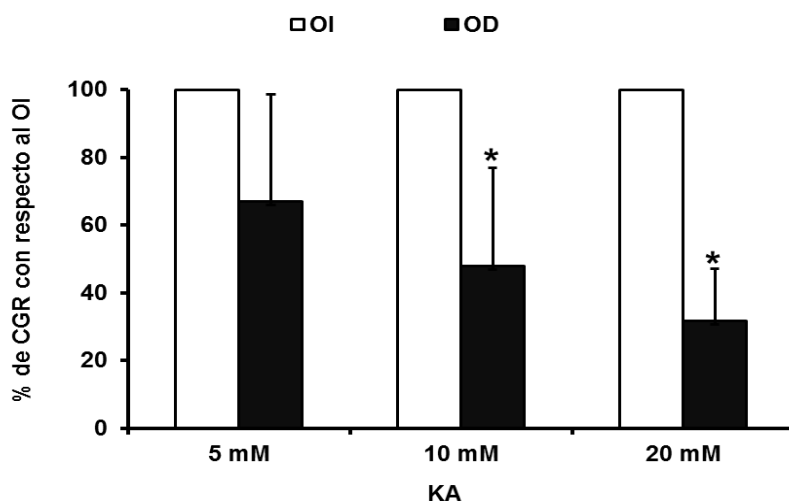


Figura 23. Porcentaje de células ganglionares de la retina (CGR) en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA. Animales sometidos a la inyección intraocular con 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA. Los valores en OD están referidos al porcentaje de células en ojo izquierdo (OI), así como su desviación estándar. La significación estadística se indica: * p< 0,05.

Los resultados obtenidos muestran que la pérdida de células ganglionares de la retina aumenta de manera progresiva al aumentar la dosis administrada de agente tóxico.

5.1.2. Recuento de células ganglionares de retina ante la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA.

Al igual que el estudio realizado con KA, se llevaron a cabo experimentos con NMDA, con el fin de seleccionar la concentración más idónea para la creación de un modelo de excitotoxicidad. Se obtuvieron los valores de densidad promedio de las células ganglionares de la retina en animales sometidos a la inyección intraocular en el ojo derecho con concentraciones crecientes de NMDA, frente a los valores obtenidos para el ojo izquierdo (ojo control) (véase Tabla V).

RESULTADOS

La disminución media de la densidad de CGR del ojo lesionado con NMDA (OD) respecto al inyectado con PBS (OI) fue de 714, 425 y 1532 CG/ mm² para 10, 30 y 100 mM de NMDA, respectivamente.

NMDA	10 mM	30 mM	100 mM
OI	2789 ± 325	2433 ± 308	2761 ± 302
OD	2075 ± 853	2008 ± 403	1229 ± 457
p	0,5	0,19	0,03

Tabla V. Densidad promedio de CGR (cel. /mm²) en animales sometidos a la inyección intraocular con NMDA. Densidad promediada y error estándar en animales sometidos a la inyección intraocular con 10 (n=3), 30 (n=4) y 100 (n=4) mM de NMDA en ojo derecho (OD). Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), ojo control. La probabilidad (p) se considera significativa para p<0,05.

La pérdida celular en el ojo inyectado (OD) se incrementó con el aumento de la concentración de NMDA, siendo su efecto leve ante concentraciones pequeñas, pero de efecto muy acusado ante la concentración mayor y estadísticamente significativa (p=0,03).

El porcentaje de células ganglionares de la retina fue inferior en todos los ojos inoculados (OD) con respecto a los ojos controles (OI), resultando para concentraciones de 10, 30 y 100 mM de NMDA unas pérdidas celulares del 25,6%, 17,5% y 55,5%, respectivamente en el ojo tratado con respecto al ojo control (véase Figura 24).

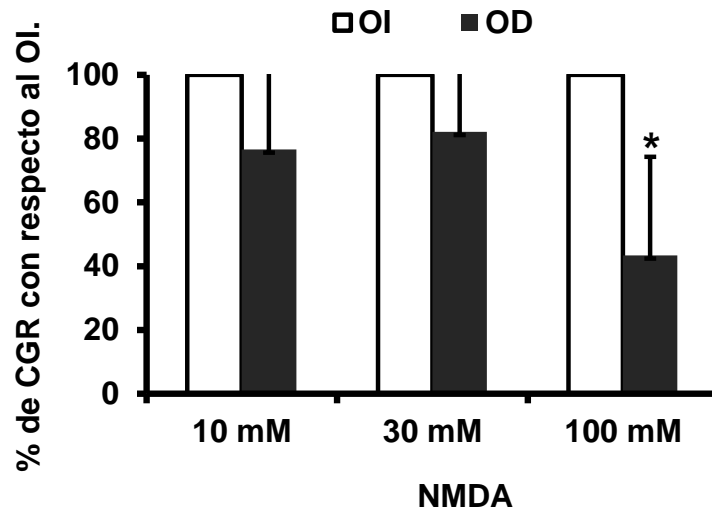


Figura 24. Porcentaje de células ganglionares de la retina (CGR) en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA. Animales sometidos a la inyección intraocular con 10 (n=3), 30 (n=4) y 100 (n=4) mM de NMDA. Los valores en OD están referidos al porcentaje de células en el ojo izquierdo (OI) así como su desviación estándar.

Los resultados obtenidos son indicativos de que a mayor concentración de NMDA, mayor es la pérdida de células ganglionares de la retina, de modo que la concentración de 100 mM de NMDA tiene un efecto muy lesivo. La diferencia entre ambos compuestos utilizados como agentes excitotóxicos queda patente, se necesita una mayor concentración de NMDA que de KA para provocar daño celular.

5.1.3. Recuento de células ganglionares de retina ante la inyección intraocular simultánea con distintas dosis de NMDA y KA.

Cuantificado el efecto individual provocado en las células ganglionares de retina tras la inyección intraocular de agentes excitotóxicos (KA y NMDA) a las concentraciones seleccionadas, se procedió a evaluar el efecto generado tras la

RESULTADOS

inyección de dichos compuestos de forma conjunta. Para ello se tomaron cinco animales y a cada uno se le administró una de las siguientes combinaciones de NMDA: KA, las cuales fueron de: 10:5; 10:10; 15:5; 30:5 y 30:10, todos ellos expresados en mM.

El porcentaje de células ganglionares de la retina fue inferior en todos los ojos inyectados con ambos agentes (OD) con respecto a sus ojos controles (OI), excepto para la concentración de 10:5 mM de NMDA: KA (véase Figura 25). La pérdida celular en los ojos inyectados fue del 15%, 75%, 63% y 55% para las concentraciones de NMDA: KA de 10:10; 15:5; 30:5 y 30:10, respectivamente.

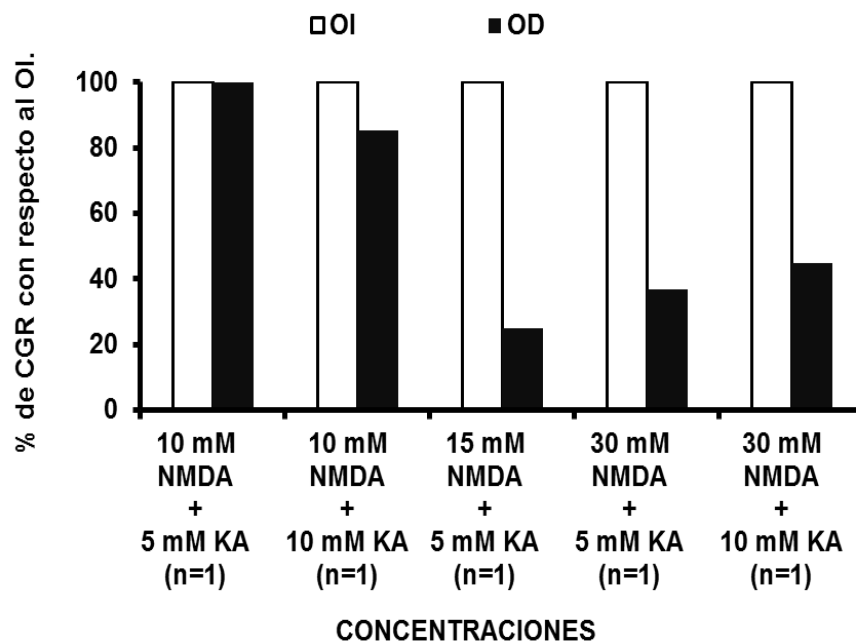


Figura 25. Porcentaje de células ganglionares de la retina (CGR) en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis conjunta de KA y NMDA. Animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA: KA. Los valores en OD están referidos al porcentaje de células en ojo izquierdo (OI).

A pesar del escaso número de animales utilizados en este experimento, observamos que a partir de una dosis de 15:5 mM de NMDA: KA, se produce un efecto deletéreo tan marcado como el producido por la inyección individual de 100 mM de NMDA o 20 mM de KA.

En el estudio de toxicidad mixto se constata la variabilidad de los datos obtenidos, por lo que no se puede establecer una correlación de la concentración inoculada frente al daño generado. La realización del mismo estudio con un número superior de animales facilitaría el estudio de dicha correlación.

En función de todo lo anterior, de las tres concentraciones donde se encontraron efectos tóxicos, se seleccionó la concentración de 30:10 mM de NMDA: KA, ya que, aunque parece la menos dañina, es previsible que al aumentar el grupo de muestra el daño generado por esta dosis sea mucho más marcado, disminuyendo la variabilidad de los datos para nuestro estudio.

5.1.4. Recuento de células ganglionares de retina ante la inyección intraocular simultánea con una dosis de NMDA y KA seleccionada.

Se obtuvieron los valores de densidad promedio de las células ganglionares de retina obtenidos en una muestra de siete animales sometidos a la inyección intraocular en el ojo derecho con concentraciones 30:10 mM de NMDA: KA y se compararon con los valores obtenidos en el ojo izquierdo (véase Tabla VI).

		30mM NMDA + 10mM KA						
n		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
OI		2747 ± 113	2609 ± 243	1994 ± 266	2658 ± 117	1835 ± 66	2252 ± 66	2514 ± 270
OD		1233 ± 109	909 ± 32	931 ± 16	2186 ± 356	520 ± 6	600 ± 53	1046 ± 91
p		0,06	0,04	0,16	0,59	0,14	0,01	0,02

Tabla VI. Densidad promedio de CGR (cel. /mm²) en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA. Densidad media y error estándar en una muestra de siete ratones sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para p<0,05.

RESULTADOS

Se observó una gran variabilidad entre los distintos individuos, ya que en cuatro de ellos no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el ojo inyectado con la mezcla de NMDA y KA y el inyectado con PBS. Los datos del animal número cuatro resultaron ser los más alejados a los esperados, evidenciando una mínima disminución celular entre ambos ojos. Con el fin de asegurar que no se habían cometido errores metodológicos, en todos ellos se confirmó la generación del daño mediante estudio electrofisiológico, tras la inyección de agentes excitotóxicos.

Para concentraciones de 30:10 mM de NMDA: KA, se obtuvieron densidades celulares promediada de 2372 ± 133 CGR/mm² en ojo control (OI) y de 1060 ± 209 CGR/mm² en ojo inyectado. El análisis estadístico (t de *Student* pareada) mostró que la diferencia de recuentos celulares entre el ojo inyectado y el control era muy significativa (p= 0,002).

Tras los datos obtenidos en la muestra de siete animales, se confirma que la inyección intraocular con concentración de 30:10 mM de NMDA: KA genera un efecto excitotóxico que provoca la muerte celular a un 55 % de sus células ganglionares, resultando estos valores significativos (p <0,01) (véase Figura 26).

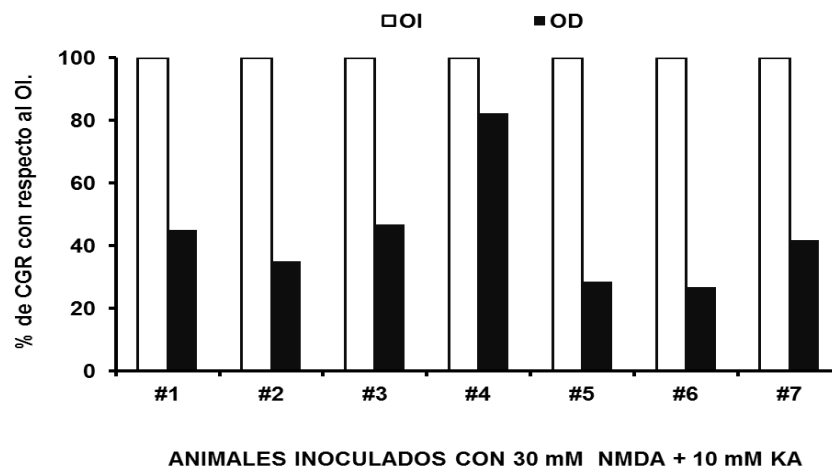


Figura 26. Porcentaje de células ganglionares de la retina (CGR) en una muestra de siete animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA. Los valores en el OD están referidos al porcentaje de células en el ojo izquierdo (OI).

5.2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA RETINA DE ANIMALES SOMETIDOS A INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.

El análisis funcional de la retina tras la inyección intraocular de agentes excitotóxicos (30:10 mM de NMDA:KA), se evaluó mediante el estudio electroretinográfico (ERG), siguiendo el protocolo anteriormente indicado en Materiales y Métodos. Las respuestas electroretinográficas binoculares se registraron en ratones adultos ante la aplicación de estímulos lumínicos de corta duración y de intensidad creciente (véase Figura 27 y 28).

Observamos que para intensidades lumínicas de -5,0 hasta -2,5 log cd.seg.m² se registra una onda positiva en el ojo control (OI), onda b, que está ausente en el ojo inoculado (OD). A partir de -1,5 log cd.seg.m² también se comienza a diferenciar la onda a, que es observada en ambos ojos. Para intensidades lumínicas superiores a -1,5 log cd.seg.m² en el OI la onda b aumenta en magnitud al aumentar la intensidad lumínica, mientras que en el OD se observa una onda b de menor magnitud (véase Figura 27 A). La amplitud de la onda a, generada por los fotorreceptores, en condiciones escotópicas de luz fue similar en ambos ojos, aumentando su magnitud al aumentar la intensidad lumínica aplicada (véase Figura 27 B). Por el contrario, la amplitud de la onda b, generada por las células postsinápticas a fotorreceptores, mostró una disminución importante en el ojo inyectado frente al ojo control aumentando de forma exponencial a la intensidad de luz aplicada (véase Figura 27 C).

La respuesta electroretinográfica de ambos ojos en condiciones fotópicas mostró que para intensidades lumínicas de 0 a 2 log cd.seg.m² se observa una onda positiva en el OI debida a la respuesta específica de las células postsinápticas a los conos, la cual aumenta a medida que se aumenta la intensidad lumínica aplicada, pero se

RESULTADOS

encuentra ausente para el OD en cualquiera de las intensidades aplicadas. (véase Figura 28 A). La amplitud de la onda b, generada por la vía de conos en condiciones de luz fotópica, frente a intensidades lumínicas crecientes sólo se observa en el OI mientras que en el OD es inexistente (véase Figura 28 B). Por lo tanto, según los resultados obtenidos, podemos afirmar que la administración intraocular de 30:10 mM de NMDA:KA ha generado un daño funcional en la retina.

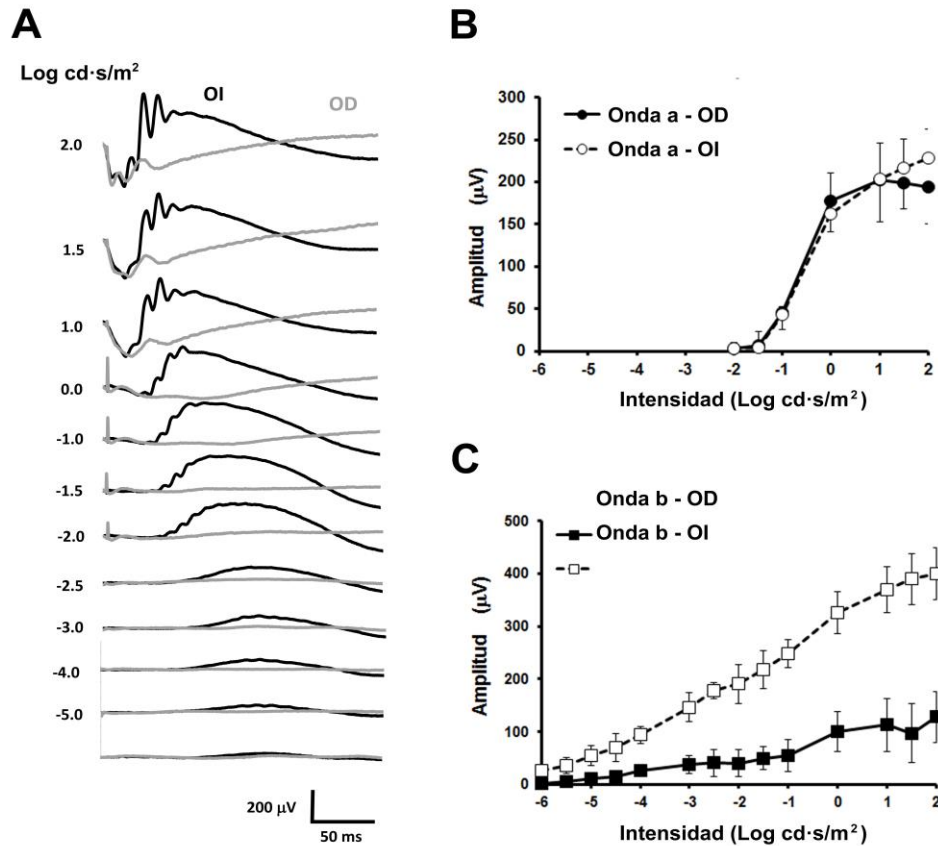


Figura 27. Registros electroretinográficos (ERG) en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA bajo condiciones de luz escotópicas. A, Ejemplo de los registros electroretinográficos obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) ante diferentes intensidades de luz, bajo condiciones escotópicas. **B,** Relación entre la amplitud de la onda “a” del ERG y la intensidad de luz. **C,** Relación entre la amplitud de la onda “b” escotópica del ERG y la intensidad de luz. Los valores mostrados en A, B y C corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de ocho animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

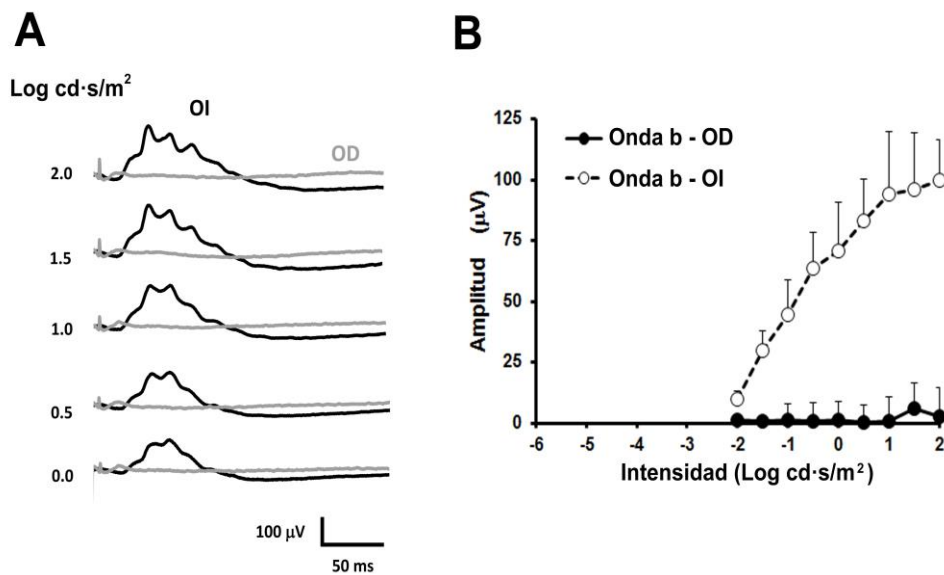


Figura 28. Registros electroretinográficos (ERG) en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA bajo condiciones de luz fotópica. A, Ejemplo de los registros electroretinográficos obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) del mismo animal mostrado en Figura 27, ante diferentes intensidades de luz, bajo condiciones fotópicas. **B,** Relación entre la amplitud de la onda “b” fotópica del ERG y la intensidad de luz. Los valores mostrados en A y B corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de ocho animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

5.2.1. Valores electroretinográficos tras la inyección intraocular de dosis crecientes de KA. Comparación con los ojos control.

5.2.1.1. Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de KA sobre la onda STR. Comparación con ojos control.

Las concentraciones crecientes de KA utilizadas en el estudio electrofisiológico fueron las mismas que en el recuento celular: 5, 10 y 20 mM de KA en el ojo inyectado (OD) frente al ojo control (OI).

RESULTADOS

Se observa que la amplitud de la onda STR, obtenida en un periodo de tiempo que varía entre 0 y 0,5 sg de registro en el ojo inoculado con concentraciones crecientes de KA seleccionadas, se encuentra disminuida con respecto al ojo control (véase Figura 29).

Cuando se comparan los valores medios de amplitud de la onda STR tras la inyección intraocular de soluciones que contienen KA a concentraciones crecientes podemos observar como dicha amplitud va disminuyendo.

Los resultados registrados muestran, para concentraciones de 5,10 y 20 mM de KA una disminución del 54,67 %, 85,35 % y 73,39 %, respectivamente de la amplitud de la onda STR (μV) en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla VII).

[KA]	Amplitud STR (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud STR (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
5 mM	41,78 \pm 24,06	18,94 \pm 19,22	0,16
10 mM	56,80 \pm 27,17	8,32 \pm 28,22	0,13
20 mM	37,02 \pm 15,70	9,85 \pm 9,17	0,19

Tabla VII. Valores de la amplitud de la onda STR (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

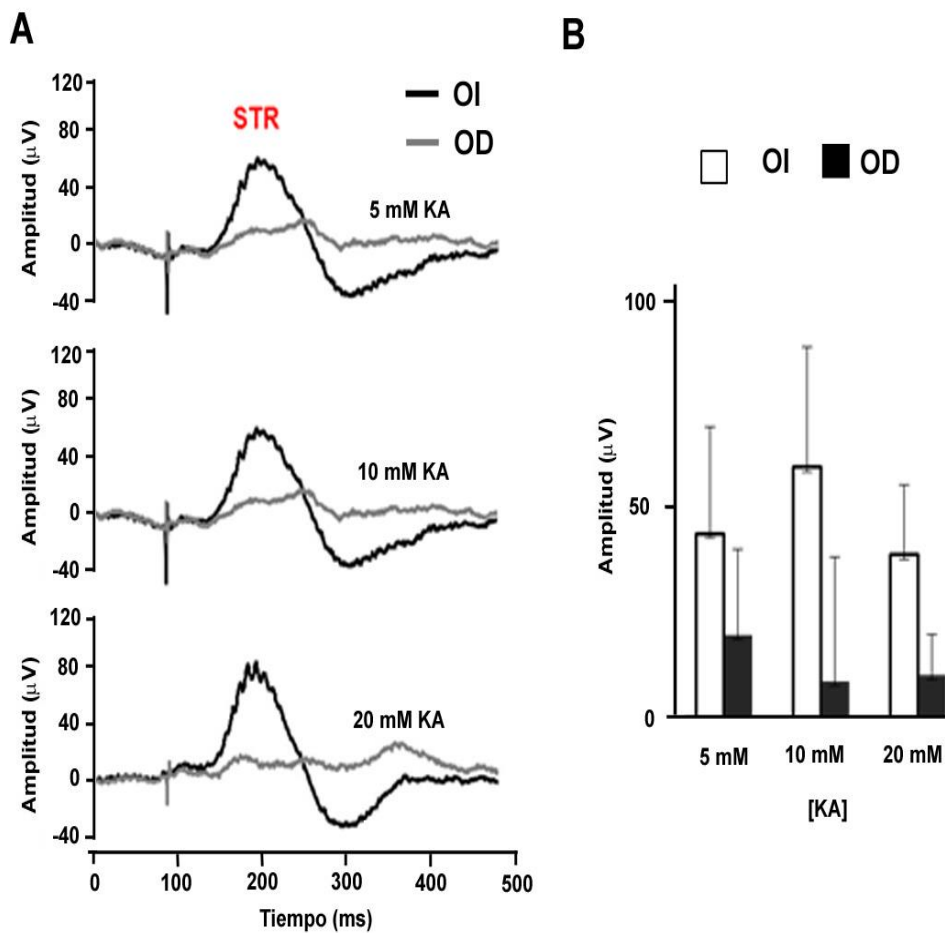


Figura 29: Registro electroretinográfico de la onda STR en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA. **A;** Ejemplo de los registros electroretinográficos de la onda STR, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de un animal ante dosis crecientes de KA. **B,** Relación entre la amplitud de la onda “STR” del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA y ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS

5.2.1.2.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de KA sobre la onda b escotópica. Comparación con ojos control.

En el ojo inoculado con KA se observa una disminución significativa de la amplitud media de la onda b escotópica obtenida en el primer 0,5 sg de registro respecto al ojo control. La mayor diferencia se observó para la concentración de 10 mM de KA (véase Figura 30).

Cuando se comparan los valores medios de amplitud de la onda b escotópica tras la inyección intraocular de soluciones que contienen KA a concentraciones crecientes podemos observar como dicha amplitud disminuye.

Los resultados registrados muestran, para concentraciones de 5,10 y 20 mM de KA una disminución del 31,44 %,79,90 % y 71,92 %, respectivamente de la amplitud de la onda b escotópica (μV) en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla VIII).

[KA]	Amplitud Onda b escotópico (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda b escotópico (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
5 mM	250,67 \pm 41,96	171,86 \pm 130,59	0,28
10 mM	254,89 \pm 69,87	51,22 \pm 139,43	0,08
20 mM	205,21 \pm 97,79	57,62 \pm 120,11	0,15

Tabla VIII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

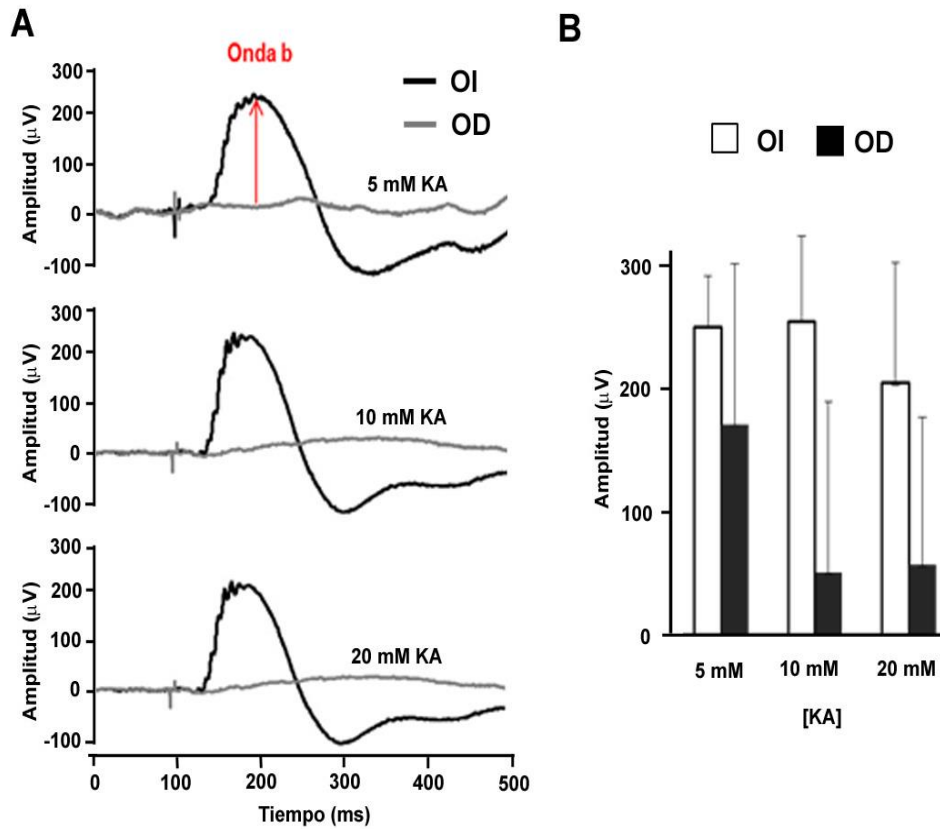


Figura 30: Registro electroretinográfico de la respuesta de bastones en condiciones de luz escotópicas, en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA. A; Ejemplo de los registros electroretinográficos donde se muestra la onda b escotópica, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de un animal ante distintas dosis de KA. **B,** Relación entre la amplitud de la onda b escotópica del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA y ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS

5.2.1.3.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de KA sobre la onda b fotópica. Comparación con ojos control.

La amplitud de la onda b fotópica obtenida en el primer 0,5 sg de registro en el ojo inoculado con KA está disminuida significativamente con respecto al ojo control para todas las concentraciones inyectadas. Dicha diferencia es mayor cuanto mayor es la concentración del agente tóxico. (véase Figura 31).

Cuando se comparan los valores medios de amplitud de la onda b en condiciones fotópicas tras la inyección intraocular de soluciones que contienen KA a concentraciones crecientes podemos observar como dicha amplitud va disminuyendo. Los resultados registrados muestran, para concentraciones de 5, 10 y 20 mM de KA una disminución del 39,92 %, 68,74 % y 76,14 %, respectivamente de la amplitud de la onda b fotópica (μV) en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla IX).

[KA]	Amplitud Onda b fotópica (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda b fotópica (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
5 mM	63,38 \pm 17,14	38,08 \pm 44,66	0,37
10 mM	68,66 \pm 29,88	21,46 \pm 53,48	0,07
20 mM	72,62 \pm 35,78	17,33 \pm 34,10	0,07

Tabla IX. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

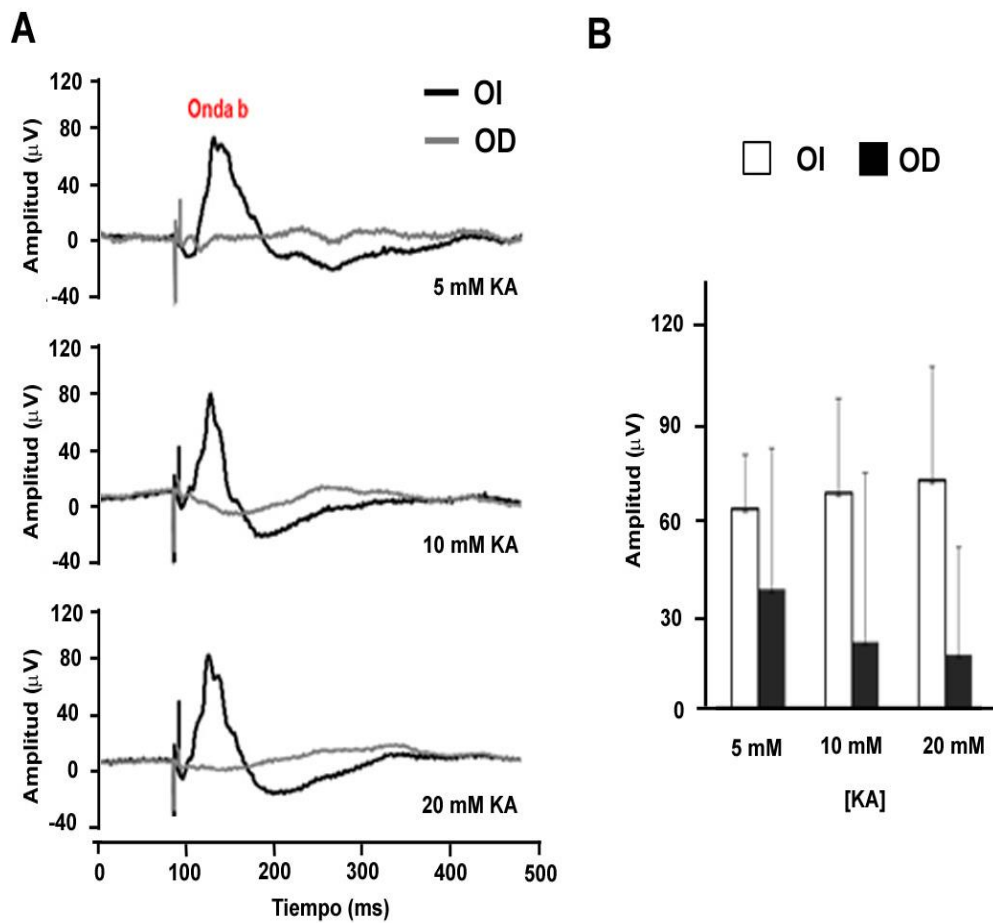


Figura 31: Registro electroretinográfico de la respuesta de conos, en condiciones de luz fotópicas, en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA. **A;** Ejemplo de los registros electroretinográfico de la onda b fotópica, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de un animal ante distintas dosis crecientes de KA. **B,** Relación entre la amplitud de la onda b fotópica del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a la inyección intraocular con 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA y ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS

5.2.1.4.Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de KA sobre la onda de potenciales oscilatorios. Comparación con ojos control.

La amplitud de la onda de potenciales oscilatorios obtenida en el primer 0,5 sg de registro en el ojo inoculado con KA está disminuida con respecto al ojo control para todas las concentraciones inyectadas, dicha disminución es mayor cuanto mayor es la concentración del agente tóxico (véase Figura 32).

Cuando se comparan los valores medios de amplitud de la onda de potenciales oscilatorios (PO) tras la inyección intraocular de soluciones que contienen KA a concentraciones crecientes podemos observar como dicha amplitud va disminuyendo. Los resultados registrados muestran, para concentraciones de 5, 10 y 20 mM de KA una disminución del 39,35 %, 50,48 % y 69,89 %, respectivamente de la amplitud de la onda de PO (μV) en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla X).

[KA]	Amplitud Onda P.O. (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda P.O. (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
5 mM	219,84 \pm 165,05	133,34 \pm 128,52	0,45
10 mM	202,23 \pm 222,57	100,14 \pm 137,60	0,35
20 mM	234,07 \pm 114,71	70,49 \pm 71,05	0,10

Tabla X. Valores de la amplitud de la onda de Potenciales Oscilatorios (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

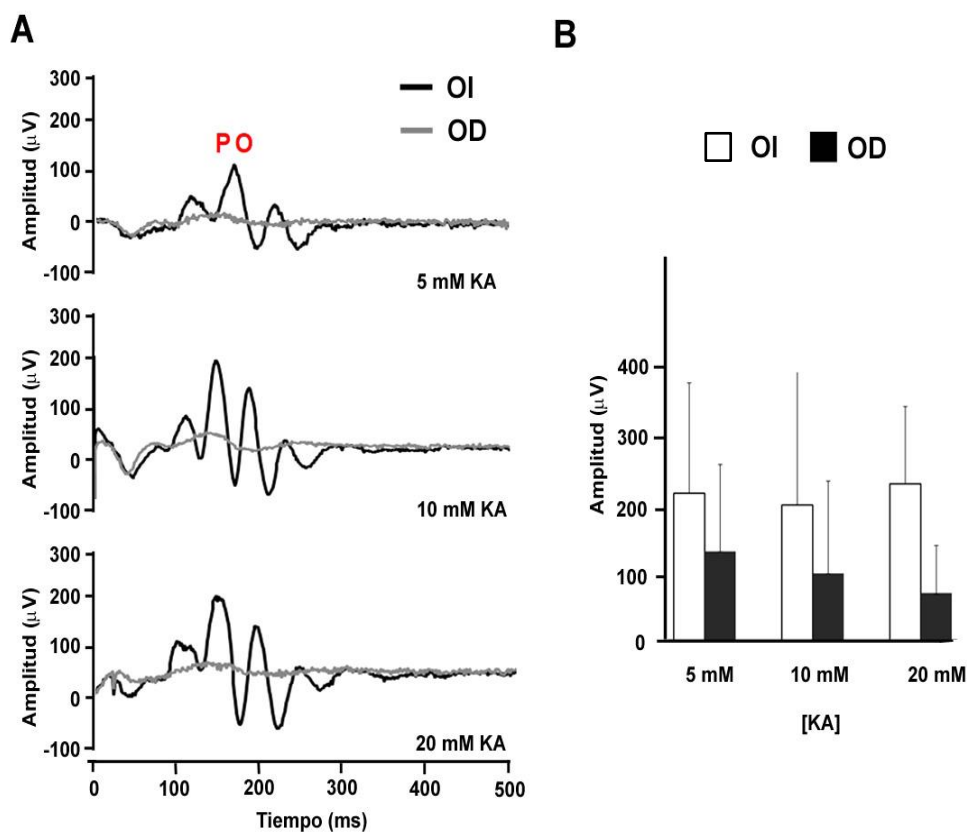


Figura 32: Registro electroretinográfico de la onda de potenciales oscilatorios en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de KA. A; Ejemplo de los registros electroretinográficos de la onda de potenciales oscilatorios, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de un animal ante distintas dosis crecientes de KA. **B,** Relación entre la amplitud de la onda de potenciales oscilatorios del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 5 (n=4), 10 (n=4) y 20 (n=3) mM de KA y ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS

5.2.2. Valores electroretinográficos tras la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA. Comparación con los ojos control.

5.2.2.1. Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA sobre la onda STR. Comparación con ojos control

Se utilizaron las concentraciones de NMDA seleccionadas anteriormente en el estudio de recuento celular, siendo estas 10, 30 y 100 mM NMDA en el OD y se compararon con los registros en el OI, el cual al no recibir NMDA sirvió como control. La amplitud de la onda STR obtenida en el primer 0,5 sg de registro en el ojo inoculado con NMDA mostró que no había diferencias significativas para ninguna concentración entre el ojo inoculado y el ojo control, aún siendo marcada la disminución de la amplitud de la onda para la concentración de 100 mM de NMDA ($p=0,22$) (véase Figura 33).

Cuando se comparan los valores medios de la amplitud de la onda STR tras la inyección intraocular de soluciones que contienen NMDA a concentraciones crecientes podemos observar como dicha amplitud va disminuyendo. Los resultados registrados muestran, para concentraciones de 10, 30 y 100 mM de NMDA una disminución del 23,46 %, 23,43 % y 77,84 %, respectivamente de la amplitud de la onda STR (μV) en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XI).

[NMDA]	Amplitud STR (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud STR (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
10 mM	54,52	41,73	--
30 mM	57,20 \pm 11,03	43,80 \pm 24,22	0,47
100 mM	52,40 \pm 47,66	11,61 \pm 10,64	0,22

Tabla XI. Valores de la amplitud de la onda STR (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p<0,05$.

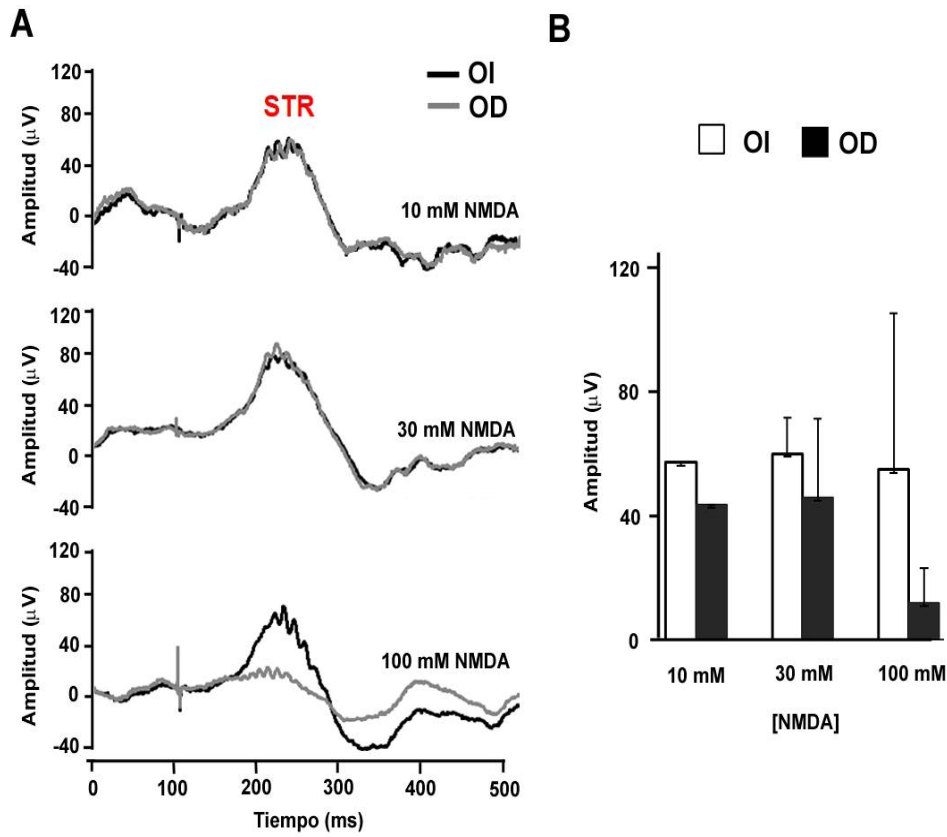


Figura 33: Registro electroretinográfico de la onda STR en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA. A; Ejemplo de los registros electroretinográficos de la onda STR, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de un animal ante distintas dosis crecientes de NMDA. **B,** Relación entre la amplitud de la onda “STR” del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA y ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS

5.2.2.2. Efecto de la inyección intraocular a dosis crecientes de NMDA sobre la onda b escotópica. Comparación con ojos control.

La amplitud de la onda b escotópica registrada en el primer 0,5 sg de registro en el ojo inoculado con NMDA mantiene valores muy similares al ojo control ante concentraciones bajas de agente tóxico, y aunque empieza a disminuir en el ojo inoculado con el aumento de la concentración, no llega a ser significativa en ninguno de los casos ($p=0,13$ para 100 mM NMDA) (véase Figura 34).

Cuando se comparan los valores medios de la amplitud de la onda b escotópica tras la inyección intraocular de soluciones que contienen NMDA a concentraciones crecientes podemos observar como dicha amplitud va disminuyendo. Los resultados registrados muestran, para concentraciones de 10, 30 y 100 mM de NMDA una disminución del 5,32 %, 17,79 % y 75,51 %, respectivamente de la amplitud de la onda b escotópica (μV) en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XII).

[NMDA]	Amplitud Onda b escotópica (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda b escotópica (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
10 mM	309,68	293,21	--
30 mM	245,42 \pm 36,70	201,75 \pm 136,82	0.57
100 mM	247,08 \pm 144,31	67,91 \pm 30,16	0.13

Tabla XII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p<0,05$.

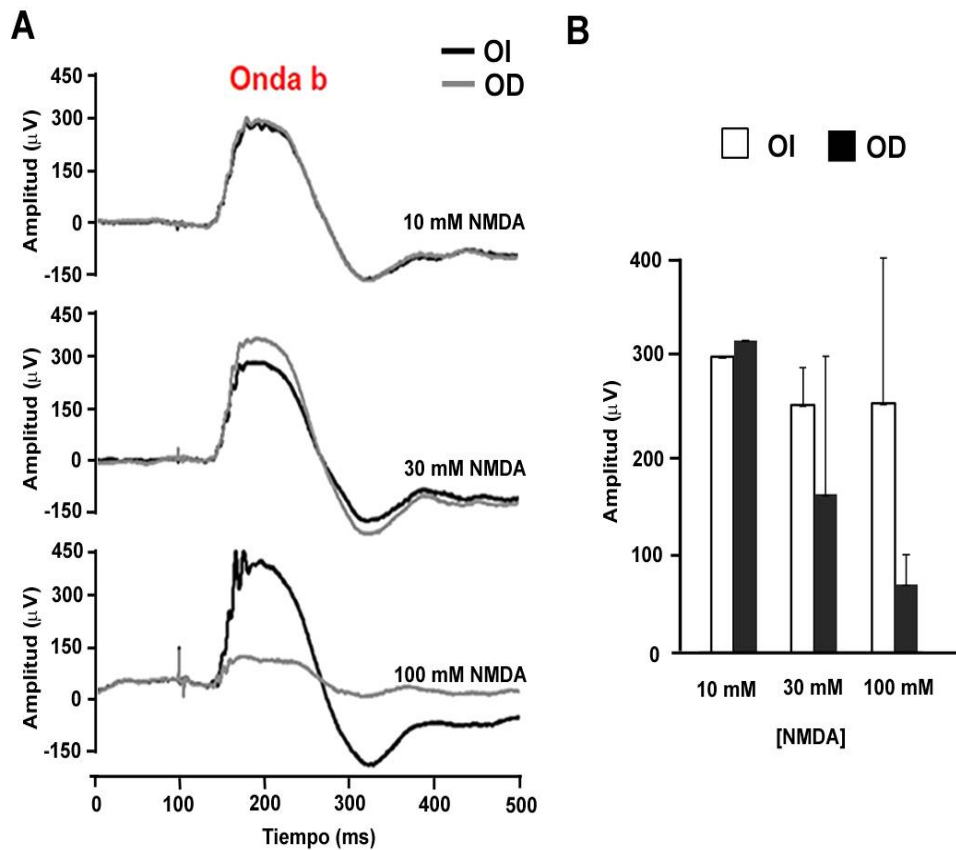


Figura 34: Registro electroretinográfico de la respuesta de bastones en condiciones de luz escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA. **A**, Ejemplo de los registros electroretinográficos donde se muestra la onda b escotópica, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de un animal ante distintas dosis crecientes de NMDA. **B**, Relación entre la amplitud de la onda “b” escotópica del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA y ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS

5.2.2.3. Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA sobre la onda b fotópica. Comparación con ojos control.

La amplitud de la onda b del electroretinograma, registrada en condiciones fotópicas obtenida en el primer 0,5 sg de registro en el ojo inoculado con NMDA mantiene valores muy similares ante concentraciones bajas de agente tóxico en relación al ojo control, pero empieza a disminuir de manera importante cuando aumenta la concentración de NMDA inoculado, siendo la diferencia más importante para 100 mM de NMDA, aunque tampoco llega a ser significativo ($p=0,10$) (véase Figura 35).

Cuando se comparan los valores medios de la amplitud de la onda b fotópica tras la inyección intraocular de soluciones que contienen NMDA a concentraciones crecientes muestra una disminución progresiva de dicha amplitud. Los resultados registrados muestran, para concentraciones de 10, 30 y 100 mM de NMDA una disminución del 13,52 %, 39,89 % y 86,23 %, respectivamente de la amplitud de la onda b fotópica (μV) en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XIII).

[NMDA]	Amplitud Onda b fotópica (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda b fotópica (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
10 mM	93,63	80,97	--
30 mM	89,90 \pm 7,08	54,04 \pm 40,60	0,30
100 mM	75,70 \pm 45,56	10,42 \pm 8,55	0,10

Tabla XIII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p<0,05$.

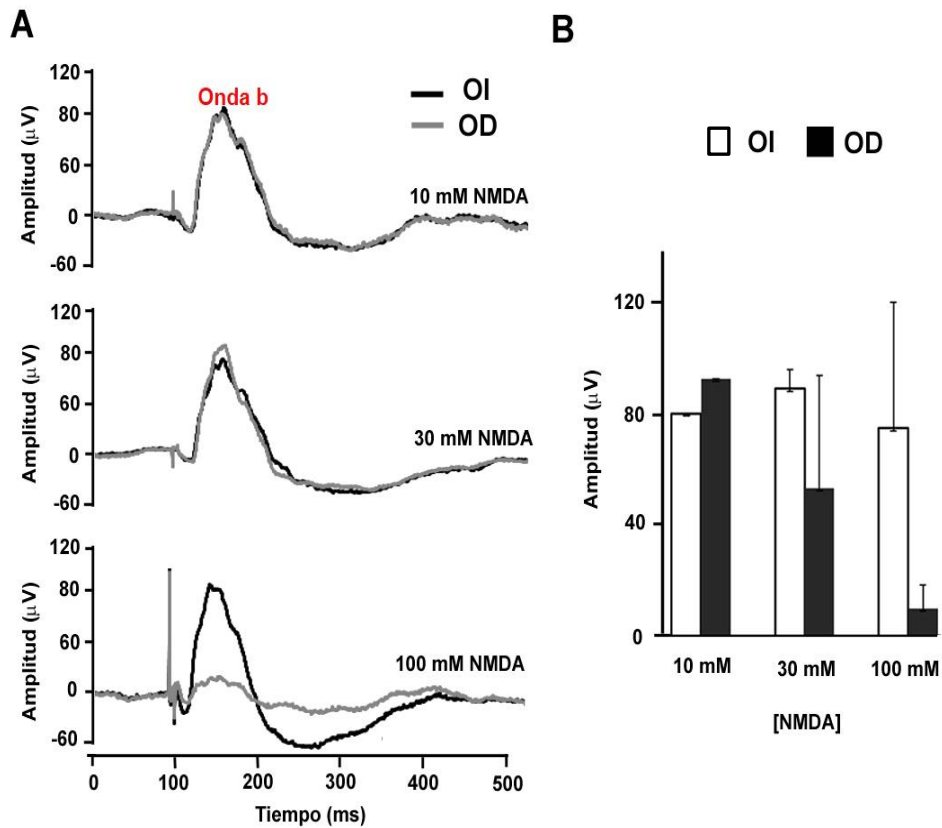


Figura 35: Registro electroretinográfico de la respuesta de conos en condiciones de luz fotópica en animales sometidos a la inyección intraocular con distintas dosis de NMDA. A, Ejemplo de los registros electroretinográficos donde se muestra la onda “b” fotópica, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de un animal ante distintas dosis crecientes de KA. **B,** Relación entre la amplitud de la onda “b” fotópica del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA y ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

RESULTADOS

5.2.2.4. Efecto de la inyección intraocular de dosis crecientes de NMDA sobre la onda de potenciales oscilatorios. Comparación con ojos control.

La amplitud de la onda de potenciales oscilatorios obtenida en el primer 0,5 sg de registro en el ojo inoculado con NMDA mantiene valores muy similares con el ojo control ante concentraciones bajas de agente tóxico, pero empieza a disminuir con el aumento de la concentración en el ojo inoculado respecto al control, encontrándose la diferencia más importante para la concentración de 100 mM de NMDA, aunque tampoco resultó significativa ($p=0,58$) (véase Figura 36).

Cuando se comparan los valores medios de la amplitud de la onda de PO tras la inyección intraocular de soluciones que contienen NMDA a concentraciones crecientes podemos observar como dicha amplitud va disminuyendo. Los resultados registrados muestran, para concentraciones de 10, 30 y 100 mM de NMDA una disminución del 0,05 %, 38,98 % y 36,10 %, respectivamente de la amplitud de la onda de PO (μV) en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XIV).

[NMDA]	Amplitud Onda P.O. (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda P.O. (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
10 mM	368,30	368,10	--
30 mM	277,87 \pm 74,83	169,57 \pm 105,75	0.36
100 mM	244,73 \pm 212,18	156,38 \pm 118,68	0.58

Tabla XIV. Valores de la amplitud de la onda de Potenciales Oscilatorios (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones crecientes de 10 (n=1), 30 (n=3) y 100 (n=3) mM de NMDA. Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p<0,05$.

RESULTADOS

5.2.3. Valores electroretinográficos tras la administración de dosis conjunta de NMDA y KA en animales sometidos a inyección intraocular frente a los valores obtenidos en animales control.

Se evaluó la amplitud de todas las ondas anteriormente estudiadas para un animal sometido a la inyección intraocular con una dosis conjunta de 15:5 mM de NMDA:KA en el ojo derecho frente a los valores obtenidos en el ojo izquierdo, ojo control.

Todos los valores de las ondas estudiadas aparecen disminuidos en el ojo inyectado, mostrando una disminución de los valores con respecto al ojo control. La onda STR y los potenciales oscilatorios (PO) son las ondas que muestran una mayor disminución en magnitud entre ambos ojos (véase Figura 37).

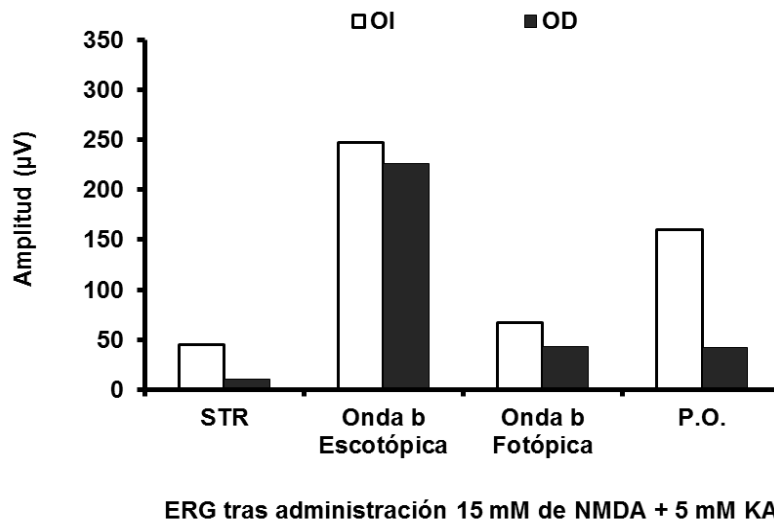


Figura 37: Amplitud de las ondas electroretinográficas (ERG) en un animal sometido a la inyección intraocular con 15:5 mM de NMDA:KA. Ejemplos de la amplitud de la onda “STR”, onda “b” escotópica, onda “b” fotópica y onda de potenciales oscilatorios (P.O) del ERG, en un animal sometido a inyección intraocular con 15:5 mM de NMDA: KA en el ojo derecho (OD) frente a los valores obtenidos para las mismas ondas en el ojo izquierdo, ojo control.

Así mismo, se evaluó la amplitud de todas las ondas anteriormente estudiadas para animales sometidos a la inyección intraocular con una dosis mezcla de 30:10 mM de NMDA: KA en el ojo derecho frente a los valores obtenidos en el ojo izquierdo, ojo control.

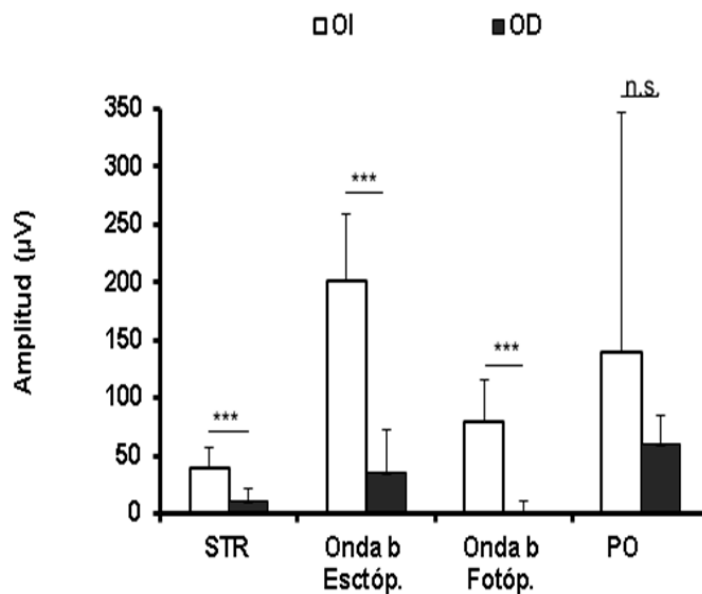
Todos los valores de las ondas estudiadas aparecen disminuidas en el ojo inyectado con respecto al ojo control. Las ondas b escotópica y fotópica son las que más disminución tienen entre ambos ojos, estas junto con las del STR mantienen una diferencia extremadamente significativa con sus controles ($p = 0,0001$ para onda STR, y $p < 0,0001$ para onda b escotópica y fotópica) (véase Figura 38).

Los resultados registrados muestran para un grupo ($n=11$) tratado con 30:10 mM de NMDA: KA se obtuvo una disminución en los valores medios de la amplitud de las ondas; STR, b escotópica, b fotópica y PO del 72,34 %, 82,16 %, 99,35 % y 56,68 % respectivamente en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XV).

[30:10 NMDA:KA]	Amplitud (μ V) Ojo Control (OI)	Amplitud (μ V) Ojo Inoculado (OD)	p
STR	40,17 \pm 16,45	11,11 \pm 11,18	0,0001
Onda b escotóp.	200,87 \pm 57,97	35,82 \pm 36,58	<0.0001
Onda b fotóp.	79,58 \pm 35,70	0,52 \pm 11,38	<0.0001
P.O.	139,78 \pm 206,14	60,57 \pm 24,88	0,20

Tabla XV. Valores de la amplitud de las ondas (μ V) en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones de 30:10 mM de NMDA:KA ($n=11$). Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

RESULTADOS



ERG tras administración de 30mM NMDA + 10 mM KA

Figura 38: Amplitud de las ondas electroretinográficas (ERG) en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA. Ejemplos de la amplitud de la onda “STR”, onda “b” escotópica, onda “b” fotópica y onda de potenciales oscilatorios (P.O) del ERG, en un grupo de once animales sometidos a inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA: KA en el ojo derecho (OD) frente a los valores obtenidos para las mismas ondas en el ojo izquierdo, ojo control.

5.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA RETINA DE ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.

El análisis estructural de la retina tras la inyección intraocular de agentes excitotóxicos se evaluó mediante el estudio inmunohistoquímico siguiendo el protocolo indicado en Materiales y Métodos. El estudio inmunohistoquímico se realizó con el fin de averiguar qué células de la retina habían sufrido daño estructural.

Se compararon ambas retinas del mismo animal sometido a la inyección intraocular con NMDA y KA. Inicialmente, se eligió una dosis de 30:10 mM de NMDA: KA en el ojo derecho frente al ojo izquierdo, ojo control. En el ojo tratado se observó que la mayor parte de la retina había sufrido daños estructurales importantes, desapareciendo parte de sus capas. Las capas más afectadas son la plexiforme externa, la nuclear interna, la plexiforme interna y la capa de las células ganglionares, mientras que la capa de los fotorreceptores no parecía estar alterada. Respecto a la capa desestructurada, además de mostrar un importante adelgazamiento de su grosor aparecen cuerpos celulares no identificables morfológicamente, salvo por el marcaje inmunológico (véase Figura 39).

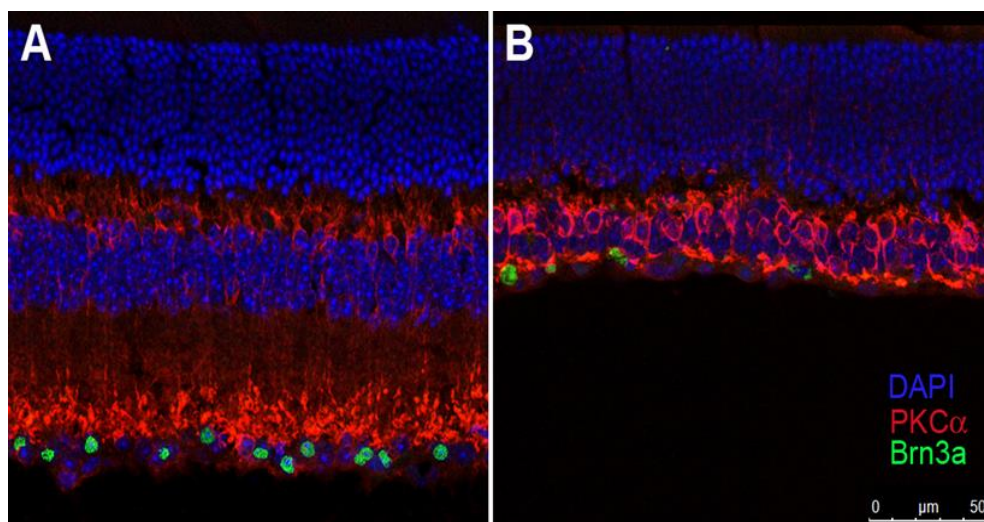


Figura 39: Secciones transversales de retina en un animal sometido a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA. A. Ojo izquierdo control. B. Ojo derecho inyectado con una proporción de 30:10 mM de NMDA: KA. Las células fueron marcadas con DAPI (marcador nuclear), PKC α (marcador de células bipolares de bastón), Brn3a (marcador de células ganglionares).

RESULTADOS

Estos datos muestran que los agonistas del glutamato ejercen un potente efecto lesivo, tanto a nivel estructural como funcional, excepto en la capa de los fotorreceptores.

Tras comprobar la agresividad del daño generado por los agonistas de glutamato en animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones de 30:10 mM de NMDA: KA se plantearon diversos ensayos utilizando concentraciones gradualmente inferiores. Las concentraciones probadas de NMDA:KA fueron cuatro: 10:3; 3:1; 1:0,3 y 0,3:0,1, todas ellas expresadas en mM.

Para concentraciones de 10:3 mM de NMDA: KA se observó la afectación de todas sus capas, manteniéndose la capa de fotorreceptores intacta.

Para concentraciones de 3:1 mM de NMDA: KA se observó la afectación de manera parcial de la capa de células bipolares y la de ganglionares.

Para concentraciones de 1:0,3 mM de NMDA: KA se observó la afectación de las capa de células bipolares y ganglionares, aunque en menor cuantía que la anterior.

Para concentraciones de 0,3:0,1 mM de NMDA: KA, no se observaron diferencias significativas, por lo que se deduce que no se produjo daño celular para esta dosis. Al igual que en el caso anterior se utilizaron marcadores nucleares y marcadores específicos de células retinianas para observar el grado de afectación estructural (véase Figura 40).

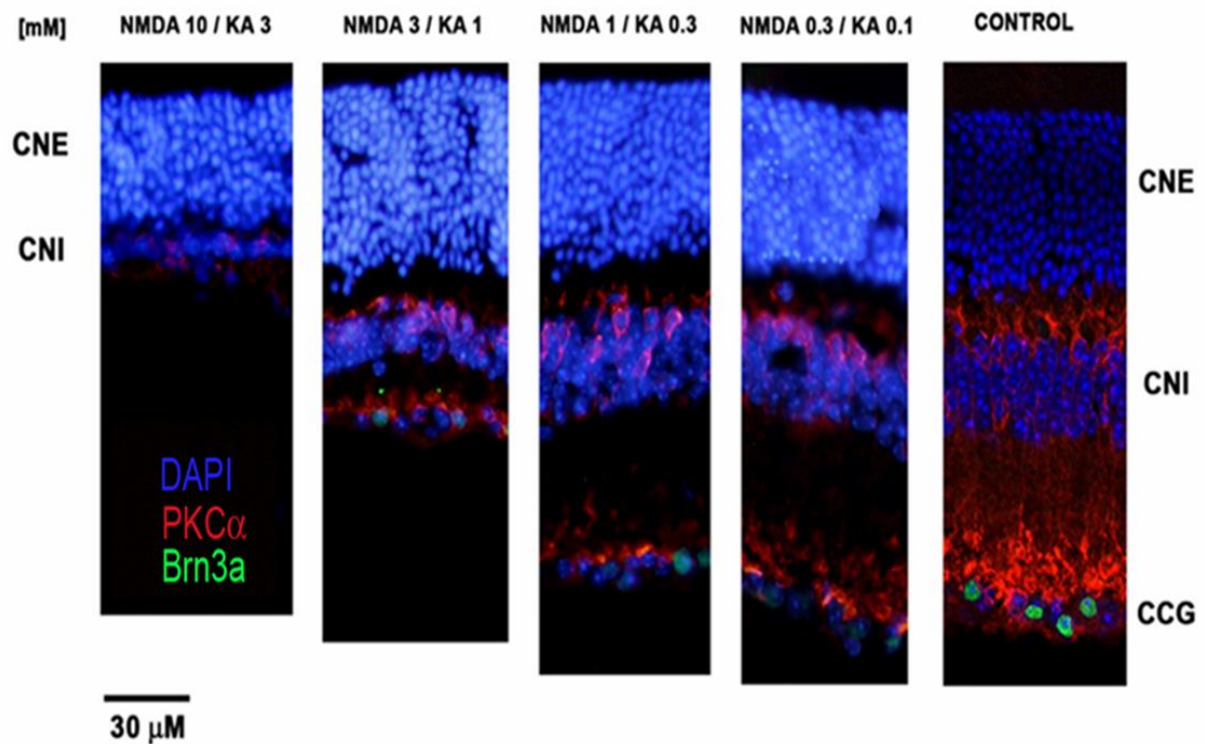


Figura 40: Secciones transversales de retina de animales sometidos a la inyección intraocular con concentraciones combinadas de NMDA y KA. Imágenes de retinas marcadas inmunocitoquímicamente de ojos inyectados con dosis crecientes de NMDA: KA (indicado en mM sobre cada imagen). Las células fueron marcadas con DAPI (marcador nuclear), PKC α (marcador de células bipolares de bastón), Brn3a (marcador de células ganglionares). CNE: capa nuclear externa, CNI: capa nuclear interna, CCG: capa células ganglionares.

En base a los resultados obtenidos, concluimos que a mayor dosis inyectada de NMDA:KA el efecto producido de degeneración celular es mayor, siempre respetando la capa de fotorreceptores. A concentraciones de 3:1 mM de NMDA:KA el daño retiniano producido es de intensidad intermedia entre la mínima dosis efectiva (1:0,3 mM de NMDA:KA) y la máxima dosis efectiva (30:10 mM de NMDA:KA), por lo que consideramos que la concentración 3:1 mM de NMDA:KA es la concentración efectiva 50 (EC₅₀), que provocaba una degeneración parcial de todas las capas de la retina, respetando la capa de células fotorreceptoras.

En una serie de experimentos realizados en colaboración con la Dra. Gómez Vicente, se estudió si la acción lesiva de NMDA: KA afectaba de forma significativa a algún

RESULTADOS

otro tipo específico de célula retiniana. Basándonos en la distinta sensibilidad de las células bipolares de la retina al glutamato (Marc, 1999; Nivison-Smith, y cols., 2013), se realizó una serie de experimentos en los que se inyectaron concentraciones crecientes de NMDA y KA en ojo derecho de animales adultos. Posteriormente, se realizaron marcajes inmunocitoquímicos específicos para células bipolares de tipo Off y de tipo On. Las células bipolares de tipo Off fueron marcadas con anticuerpos contra Syt2, y las células bipolares de tipo On mediante anticuerpos contra GNB3. En la figura 41 se muestran las imágenes de marcaje inmunocitoquímico a microscopía confocal de secciones de retinas de animales inyectados con dosis crecientes de NMDA y KA, donde se han marcado selectivamente células bipolares On y Off.

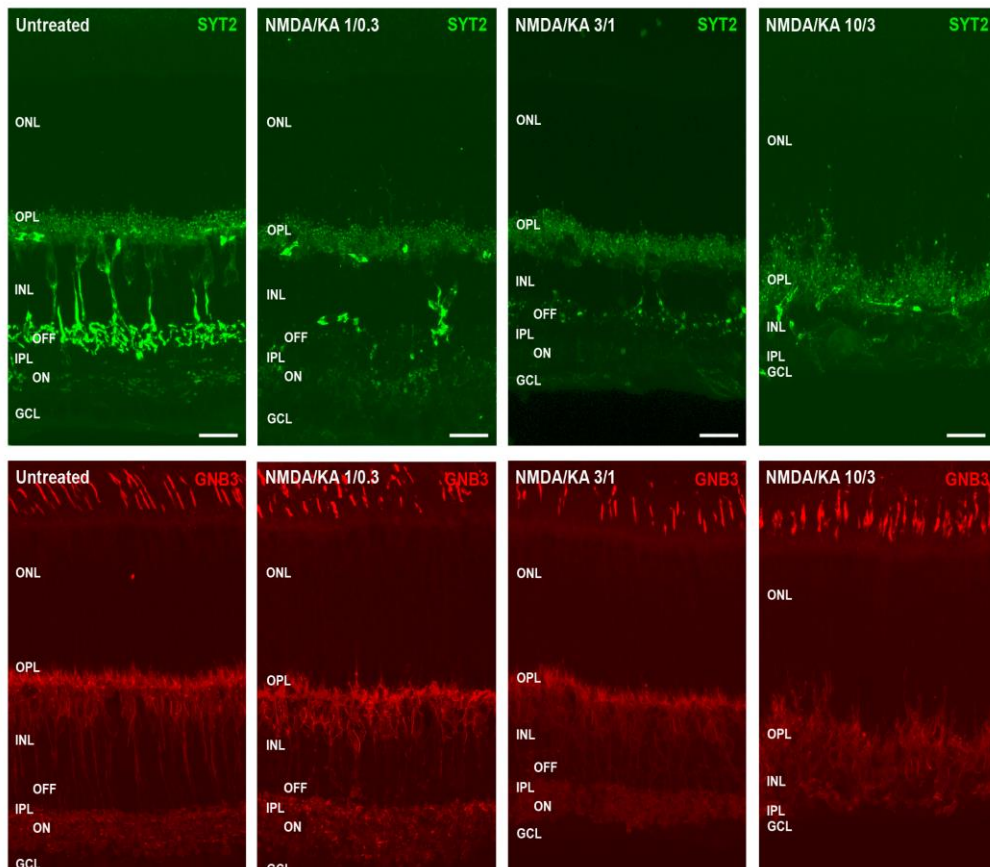


Figura 41: Efecto lesivo de NMDA y KA sobre células bipolares de la retina de ratón. Secciones transversales de retina de animales sometidos a la inyección intraocular de NMDA y KA. Imágenes de retinas marcadas inmunocitoquímicamente procedentes de ojos inyectados con dosis crecientes de NMDA/KA (indicado en mM en la esquina superior izquierda de cada imagen). Las células bipolares de tipo Off fueron marcadas con anticuerpos contra SYT2 (fila superior, color verde) y las células bipolares de tipo On fueron marcadas con anticuerpos contra GNB3 (fila inferior, color rojo). Se observa que este anticuerpo también marca de forma específica los segmentos externos de los conos. ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL; capa plexiforme interna, GCL: capa células ganglionares. Barra de calibración: 30 μ m.

5.4. EFECTO DE LOS AGENTES NEUROPROTECTORES SOBRE LA FUNCIÓN DE LA RETINA DE ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.

5.4.1. Análisis funcional de la retina tras ser sometida a la inyección intraocular con una dosis seleccionada de NMDA y KA y ser tratada con agentes neuroprotectores.

Los agentes utilizados como neuroprotectores, en los animales sometidos previamente a la inyección intraocular con agentes excitotóxicos, fueron la brimonidina (BMD); un inhibidor de la respuesta inflamatoria, que es modulador de la enzima GSK-3, (cedido generosamente por la Dra. Ana Martínez) y el ácido tauroursodeóxicólico (TUDCA). Todos ellos se utilizaron con el fin de minimizar el daño inducido por agonistas glutamatérgicos. Las dosis y vías de administración fueron: BMD 0,5% por vía tópica, inhibidor inflamatorio 0,25 mg/día por vía intraperitoneal y TUDCA 35 mg /ml también por vía intraperitoneal.

Para analizar el efecto protector de estos agentes sobre la amplitud de las diferentes ondas se diseñaron cuatro grupos de animales. En el primero sólo se administró la dosis lesiva (30:10 mM de NMDA: KA) en el ojo derecho (OD). En el resto de grupos, además de esta dosis, se inyectaron BMD, el inhibidor inflamatorio (modulador de la vía GSK-3) y TUDCA en el segundo, tercero y cuarto grupos, respectivamente. Los ojos izquierdos de los animales de todos los grupos fueron inyectados sólo con vehículo, por lo que fueron considerados como controles.

5.4.1.1.Efecto generado en la onda STR tras la administración de dosis conjunta de NMDA y KA seleccionada, en animales sometidos a la inyección intraocular y tratados con neuroprotección.

La amplitud de la onda STR tras la inyección intraocular de los agentes tóxicos (30:10 mM de NMDA:KA) y agentes neuroprotectores en el OD muestra que existe un efecto neuroprotector sobre la onda STR con todos los compuestos protectores utilizados (véase Figura 42).

El estudio comparativo de los valores medios de la amplitud de la onda STR (μV) para los distintas opciones de tratamiento; sin tratamiento protector, con BMD, con el inhibidor de la respuesta inflamatoria y con TUDCA , mostraron una disminución de la amplitud en un 72,34 %, 50,82 %, 64,88 % y 79,09% respectivamente en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XVI).

Onda y Tratamientos	Amplitud Onda STR (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda STR (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
STR	40,17 \pm 16,45	11,11 \pm 11,18	0,0001
STR+BMD	31,31 \pm 10,03	15,40 \pm 4,80	0,16
STR+Inh.Inf	18,65 \pm 13,83	6,55 \pm 6,53	0,28
STR+TUDCA	52,22 \pm 42,60	10,92 \pm 10,36	0,16

Tabla XVI. Valores de la amplitud de la onda STR (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA:KA y tratados con BMD (n=3), el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5). Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

RESULTADOS

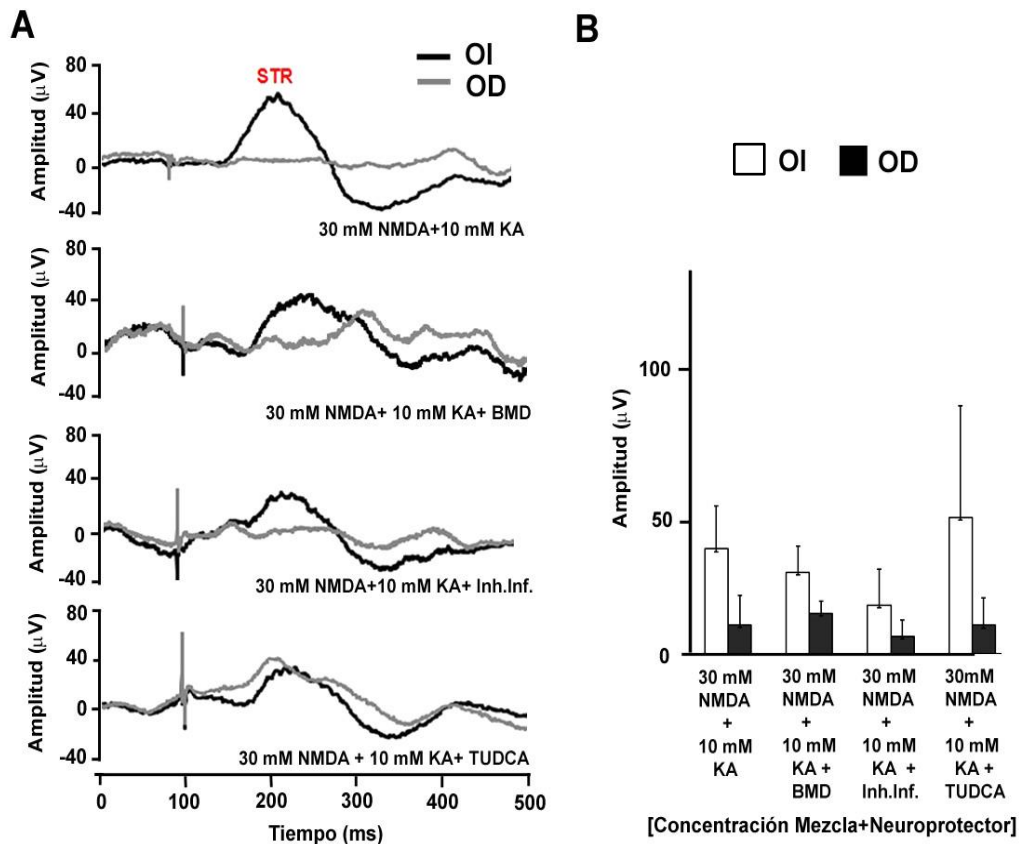


Figura 42. Efecto de agentes neuroprotectores sobre la amplitud de la onda STR del electroretinograma en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA. A. Ejemplo de los registros electroretinográficos de la onda STR, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de cuatro animales diferentes. **B.** Relación entre la amplitud de la onda “STR” del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA, tanto en animales no tratados (n=11), como en animales tratados con BMD (n=3), el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5), comparados con el ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

5.4.1.2.Efecto generado en la onda b escotópica tras la administración de dosis conjunta de NMDA y KA seleccionada en animales sometidos a la inyección intraocular y tratados con neuroprotección.

La amplitud de la onda b en condiciones escotópicas tras la inyección intraocular de los agentes tóxicos (30:10 mM de NMDA:KA) y agentes neuroprotectores muestra que existe un efecto neuroprotector sobre la onda b cuando es utilizado el TUDCA, inhibidor inflamatorio y BMD, aunque solo resultó significativo en el caso de la protección con TUDCA.

El estudio comparativo de los valores medios de la amplitud de la onda b escotópica (μV) para los distintas opciones de tratamiento; sin tratamiento protector, con BMD, con el inhibidor de la respuesta inflamatoria y con TUDCA, mostraron una disminución de la amplitud en un 82,17 %, 45,64 %, 83,96 % y 98,93% respectivamente en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XVII).

Onda y Tratamientos	Amplitud Onda b escotópica (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda b escotópica (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
b-escotópica	200,87 \pm 57,97	35,82 \pm 36,58	<0,0001
b-escotóp. +BMD	140,67 \pm 45,17	76,47 \pm 17,11	0,12
b-escotóp. +Inh.Inf	103,72 \pm 77,22	16,64 \pm 13,66	0,08
b-escotóp. +TUDCA	194,68 \pm 66,73	2,09 \pm 20,04	0,021

Tabla XVII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA:KA y tratados con BMD (n=3) , el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5). Comparación de valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

RESULTADOS

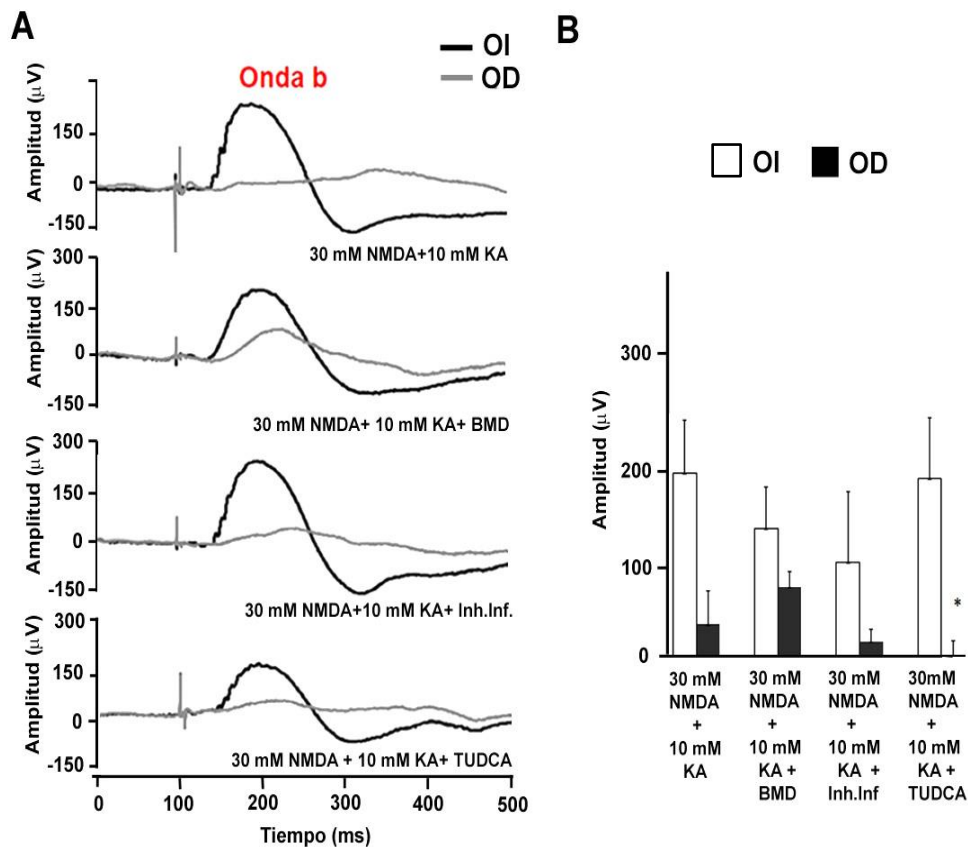


Figura 43. Efecto de agentes neuroprotectores sobre la amplitud de la onda b del electroretinograma bajo condiciones de luz escotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA :KA. A. Ejemplo de los registros electroretinográficos de la onda b escotópica, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de cuatro animales diferentes. **B.** Relación entre la amplitud de la onda b escotópica del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA, tanto en animales no tratados (n=11), como en animales tratados con BMD (n=3), el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5), comparados con el ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

5.4.1.3.Efecto generado en la onda b fotópica tras la administración de la dosis conjunta de NMDA y KA seleccionada en animales sometidos a la inyección intraocular y tratados con neuroprotección.

Los agentes utilizados (BMD, inhibidor inflamatorio y TUDCA) mostraron un mínimo efecto neuroprotector sobre la onda b fotópica. Sin embargo, los datos en el caso del TUDCA y el inhibidor inflamatorio resultaron significativos (véase Figura 44).

El estudio comparativo de los valores medios de la amplitud de la onda b fotópica (μV) para los distintas opciones de tratamiento; sin tratamiento protector, con BMD, con el inhibidor de la respuesta inflamatoria y con TUDCA, mostraron una disminución de la amplitud en un 99,35 %, 66,68 %, 96,73 % y 97,12 % respectivamente en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XVIII).

Onda y Tratamientos	Amplitud Onda b fotópica (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda b fotópica (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
b-fotópica	79,58 \pm 35,70	0,52 \pm 11,38	<0,0001
b-fotóp. + BMD	28,57 \pm 6,95	9,52 \pm 36,01	0,52
b-fotóp. + Inh.Inf	46,17 \pm 16,78	1,51 \pm 10,67	0,004
b-fotóp. + TUDCA	68,09 \pm 18,74	1,96 \pm 4,21	0,04

Tabla XVIII. Valores de la amplitud de la onda b (μV) en condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA:KA y tratados con BMD (n=3), inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5). Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

RESULTADOS

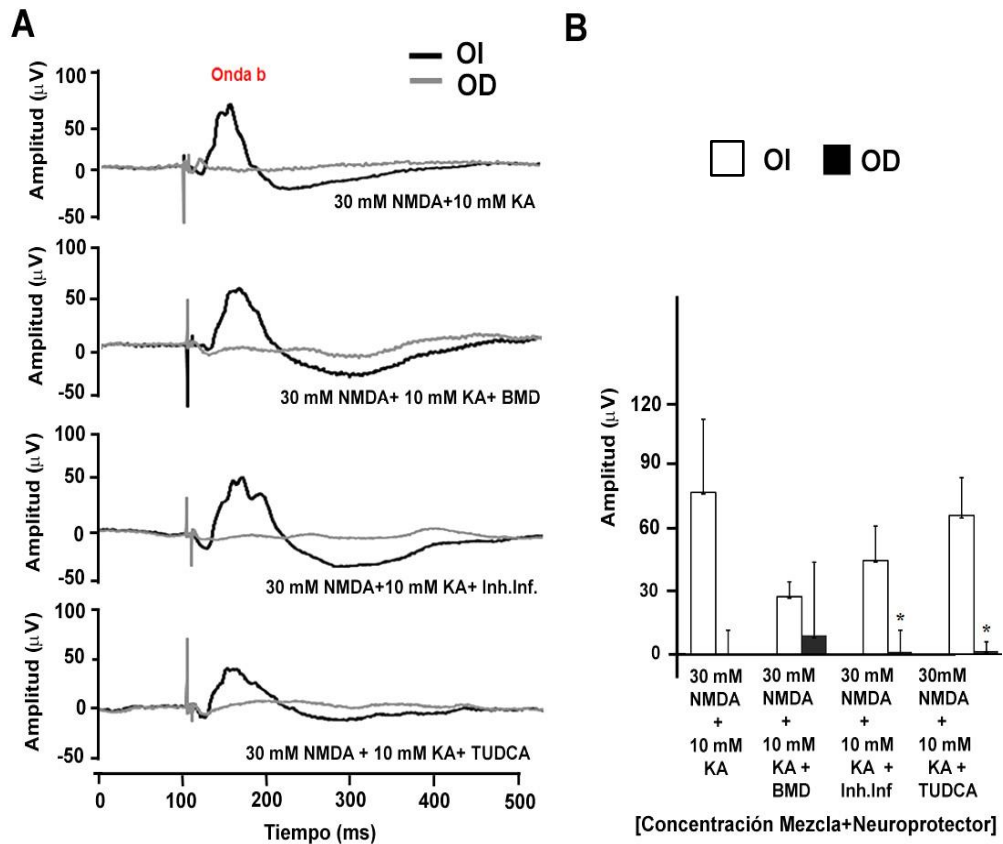


Figura 44. Efecto de agentes neuroprotectores sobre la amplitud de la onda b del electroretinograma bajo condiciones de luz fotópicas en animales sometidos a la inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA. A. Ejemplo de los registros electroretinográficos de la onda b fotópica, obtenidos en ojo derecho (OD, inyectado, trazo gris) y ojo izquierdo (OI, control, trazo negro) de cuatro animales diferentes. **B.** Relación entre la amplitud de la onda b fotópica del ERG obtenidos en ojo derecho en animales sometidos a inyección intraocular con 30:10 mM de NMDA:KA, tanto en animales no tratados (n=11), como en animales tratados con BMD (n=3), el inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5), comparados con el ojo izquierdo (ojo control). Los valores mostrados en B, corresponden a valores promediados (media y desviación estándar) de animales registrados en las mismas condiciones experimentales.

5.4.1.4.Efecto generado en la onda de potenciales oscilatorios tras la administración de dosis conjunta de NMDA y KA seleccionada en animales sometidos a la inyección intraocular y tratados con neuroprotección.

La amplitud de la onda de potenciales oscilatorios en los ojos sometidos a daño y agentes neuroprotectores (BMD, inhibidor inflamatorio, TUDCA) mostraron un efecto neuroprotector sobre la onda de potenciales oscilatorios, el cual fue más intenso en el caso de BMD. Se aprecia una diferencia significativa en el caso de TUDCA (véase Figura 45).

El estudio comparativo de los valores medios de la amplitud de la onda de PO (μV) para los distintas opciones de tratamiento; sin tratamiento protector, con BMD, con el inhibidor de la respuesta inflamatoria y con TUDCA, mostraron una disminución de la amplitud en un 56,67 %, 40,44 %, 77,13 % y 99,98 % respectivamente en el ojo inoculado con respecto al ojo control (véase Tabla XIX).

Onda y Tratamientos	Amplitud Onda P.O. (μV) Ojo Control (OI)	Amplitud Onda P.O. (μV) Ojo Inoculado (OD)	p
P.O.	139,78 \pm 115,38	60,57 \pm 24,88	0,20
P.O. + BMD	80,72 \pm 48,22	48,08 \pm 5,76	0,38
P.O. + Inh.Inf	125,13 \pm 71,65	28,61 \pm 15,46	0,10
P.O. + TUDCA	298,05 \pm 141,81	0,06 \pm 58,21	0,02

Tabla XIX. Valores de la amplitud de la onda de Potenciales Oscilatorios (μV) en animales sometidos a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA:KA y tratados con BMD (n=3), Inhibidor inflamatorio (Inh.Inf.) (n=4) y TUDCA (n=5). Comparativa con valores obtenidos en el ojo izquierdo (OI), control y ojo derecho (OD), inyectado. La probabilidad (p) se considera significativa para $p < 0,05$.

5.5. PROYECCIONES CENTRALES DE LA RETINA Y ANÁLISIS DE LA VÍA VISUAL EN ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.

En una última serie de experimentos, se intentó valorar si la inyección de agentes excitotóxicos en el globo ocular, al inducir un efecto deletéreo en las células ganglionares, también producía un efecto sobre las proyecciones de las células ganglionares, a nivel de sus núcleos de proyección central. El estudio de la vía visual se realizó de manera comparativa entre animales sanos y animales sometidos a la inyección intraocular de agentes excitotóxicos. La técnica utilizada fue la inyección intraocular mediante marcaje con colerotoxina (CTX), y para diferenciar las proyecciones del ojo sometido a agentes excitotóxicos y del ojo control se utilizaron dos CTX que marcan en distinta tonalidad cromática (rojo y verde). Se utilizó CTX 488 (Cy2 -verde) para marcar las fibras procedentes del OD (inoculado con agentes excitotóxicos) y CTX 555 (Cy3 -roja) para marcar las fibras procedentes del OI (control).

En la Figura 46, se observa el corte histológico del cerebro de un animal sano representado en cuatro zonas diferenciadas a lo largo de la vía visual que se corresponden con el Colículo Superior (CS), Cuerpo Geniculado Lateral (CGL), núcleo supraquiasmático (NS) y Quiasma óptico (QO). En la Figura 46A-D se indica para cada uno de dichos núcleos o regiones del sistema nervioso central, su localización precisa relativo al bregma (véase columna izquierda en la Figura 46). Mediante el marcaje de los axones de las células ganglionares de la retina que forman el nervio óptico se muestra la proyección del nervio óptico del OD en color verde y del nervio óptico del OI en color rojo. Dichas fibras sufren una decusación en la zona del quiasma óptico (véase Figura 46D). La decusación de las fibras determina el marcaje contralateral de ambos núcleos supraquiasmáticos (véase Figura 46C). A través de las cintillas ópticas el marcaje alcanza núcleo geniculado

RESULTADOS

lateral (véase Figura 46B); de ahí, la proyección alcanza el colículo superior (véase Figura 46A). En estos núcleos de proyección, gracias al uso de CTX que marcan en rojo y verde, se puede apreciar de forma diferenciada las regiones de marcaje ipsilateral y contralateral.

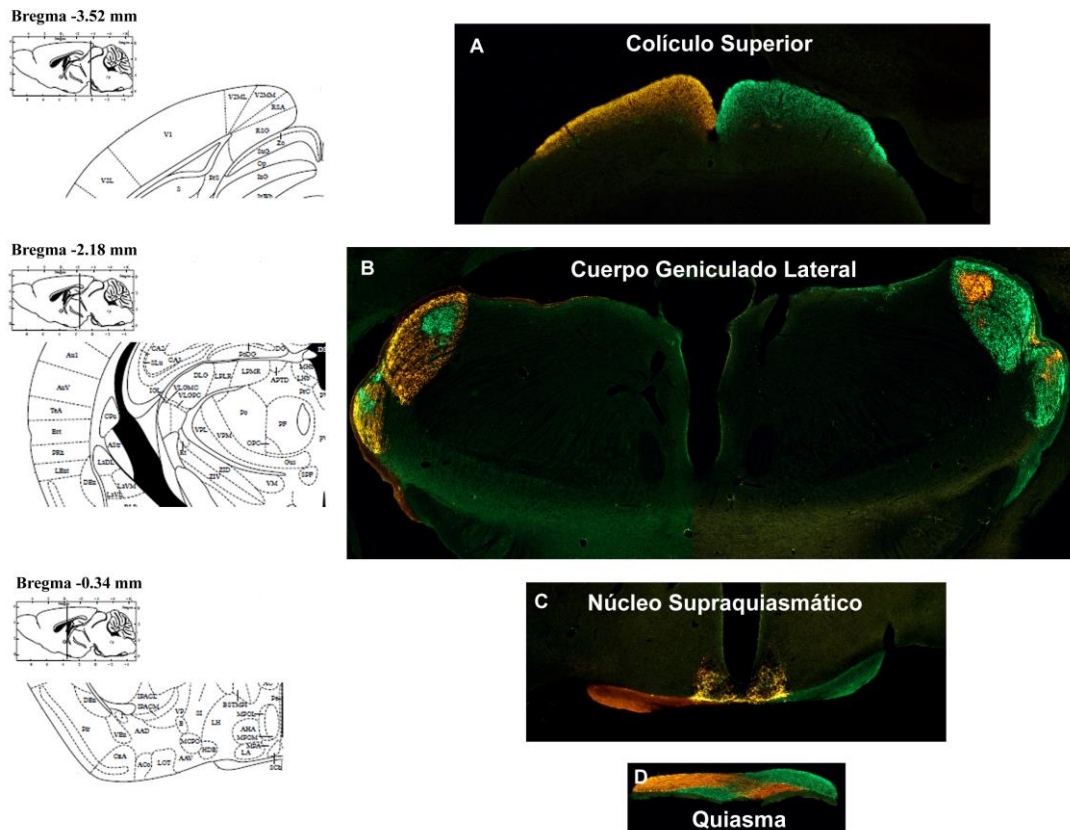


Figura 46: Corte histológico del cerebro de un animal sano tras el marcaje bilateralmente diferenciado de la vía óptica con colerotoxinas. **A.** Sección a nivel del Colículo Superior (-3,52 mm desde Bregma). **B.** Sección a nivel del Cuerpo Geniculado Lateral (-2,18 mm desde Bregma). **C.** Sección a nivel del Núcleo supraquiasmático (-0,34 mm desde Bregma). **D.** Sección a nivel del Quiasma óptico. Tinción con colerotoxina (CTX 488 (Cy2 -verde) en OD y CTX 555 (Cy3 -roja) en el ojo izquierdo). Se aprecian los núcleos de proyección central de las células ganglionares de ambos ojos. Las imágenes de la columna izquierda (Paxinos y Fahlin, 2001) corresponden a la región mostrada en los cortes histológicos.

En la figura 47 se muestra el marcaje mediante colerotoxinas de toda la vía visual en un animal sometido a la inyección selectiva en el ojo derecho de una solución que contiene 30:10 mM de NMDA: KA, mientras que en el ojo izquierdo no se ha inyectado agente excitotóxico. Se muestra el marcaje de las proyecciones de las células ganglionares de la retina a nivel del colículo superior, cuerpo geniculado lateral, núcleo supraquiasmático y quiasma óptico (Figura 47A-D). La imagen muestra una ausencia de marcaje de toda la vía visual y núcleos de proyección correspondientes a las células ganglionares del ojo derecho.

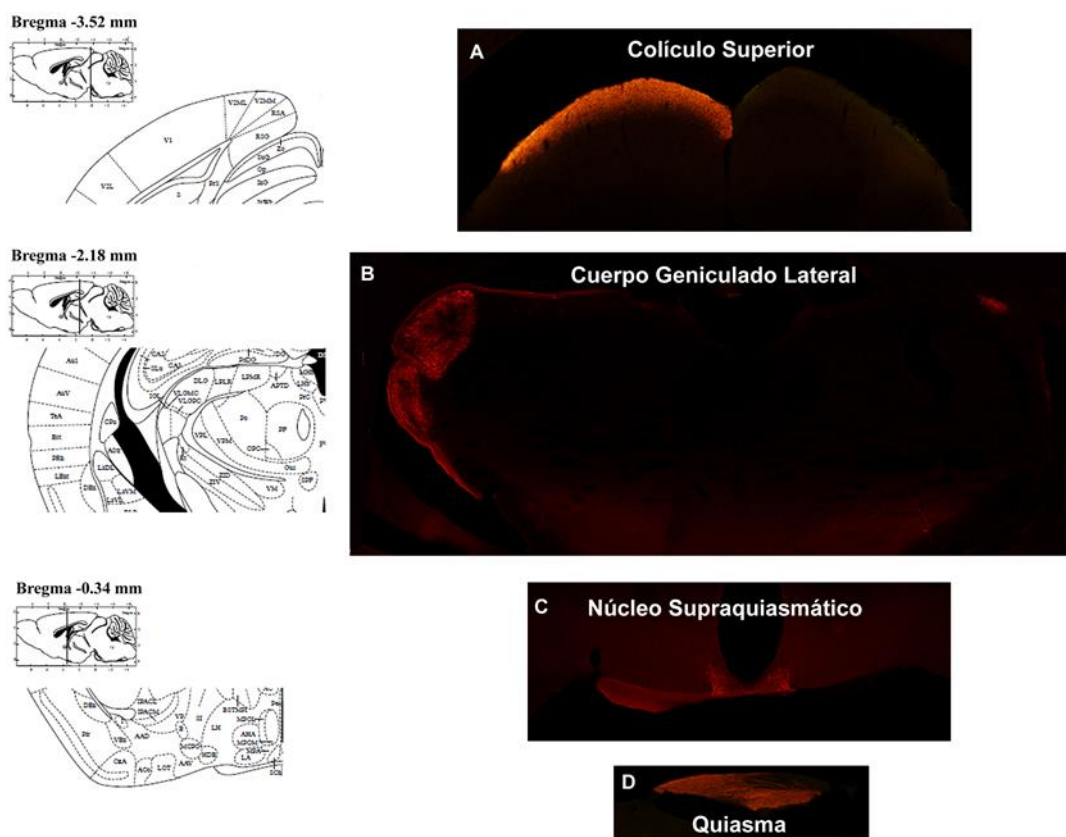


Figura 47: Corte histológico del cerebro de un animal sometido a la inyección intraocular de 30:10 mM de NMDA:KA en el ojo derecho (OD) ante el marcaje de ambas vías ópticas con colerotoxinas. A. Sección a nivel del Colículo Superior (-3,52 mm desde Bregma). **B.** Sección a nivel del Cuerpo Geniculado Lateral (-2,18 mm desde Bregma). **C.** Sección a nivel del Núcleo supraquiasmático (-0,34 mm desde Bregma). **D.** Sección a nivel del Quiasma óptico. Tinción con colerotoxina (CTX 488 (Cy2 -verde) en OD y CTX 555 (Cy3 -roja) en el ojo izquierdo). Se aprecian la ausencia de marcaje de los núcleos de proyección central de las células ganglionares del ojo derecho. Las imágenes de la columna izquierda (Paxinos y Fanhlin, 2001) corresponden a la región mostrada en los cortes histológicos.

RESULTADOS

Estos experimentos permiten afirmar que la lesión de las células ganglionares de la retina por efecto de la inyección intraocular de agentes excitotóxicos tiene una repercusión significativa en los núcleos de proyección central de dichas células. El marcaje selectivo de la vía óptica podrá por tanto ser empleado para evaluar el grado de lesión, así como el grado de neuroprotección, en su caso, en los experimentos de excitotoxicidad retiniana.

6. DISCUSION

6.1. SELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL.

Los modelos animales son necesarios para la investigación de los mecanismos causantes de las enfermedades oculares y particularmente en las patologías de la retina. Estudios realizados con diversas especies animales demuestran que la validez del modelo experimental depende del grado en el que emula a la condición humana. Los muridos, como la rata y el ratón, son especies utilizadas en la investigación de enfermedades debido a la similitud con el genoma humano. En 1981 Gordon y Ruddle con ayuda de los avances biotecnológicos, consiguieron la transgénesis en ratón, siendo el primer animal modificado genéticamente. Estas especies son también utilizadas en la investigación de enfermedades de la retina (Levkovitch-Verbin, 2004), aunque la estructura de su nervio óptico y retina guardan algunas diferencias con respecto a los humanos (p. ej. ausencia de mácula o fovea y decusación del 90% de las fibras del nervio óptico).

En nuestro estudio se seleccionó al ratón frente a la rata como modelo experimental por su fácil manejo, mantenimiento, coste económico y por su relativamente corto periodo de vida (aproximadamente 2 años), lo que supone una ventaja ante el rápido desarrollo de enfermedades.

6.2. SELECCIÓN DE LA RETINA COMO ZONA DE ESTUDIO.

El estudio del SNC en el ser humano ha sido constante a lo largo de la historia y los avances tecnológicos han permitido un conocimiento en profundidad. La retina que forma parte del SNC es un reflejo de lo que ocurre en otras localizaciones de éste. El fácil acceso y su ordenada estructura hacen de la retina un tejido óptimo para el estudio del daño neuronal que encontramos en muchas de las enfermedades neurodegenerativas.

Los modelos de enfermedades de la retina que cursan con afectación del nervio óptico nos permite conocer cómo y por qué mueren las células ganglionares mediante el estudio de los mecanismos de degeneración de las células y nos abre una vía de ensayo para nuevas terapias potenciales mediante la manipulación genética que nos facilita el conocimiento de los mecanismos patológicos con los que cursan las enfermedades

6.3. IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN RATÓN ADULTO.

Es conocido por estudios anteriores que las CGR no son las únicas células que forman la capa de células ganglionares de la retina de roedor, ya que en proporciones similares a las células ganglionares aparecen poblaciones de células amacrinas desplazadas (Drager y Olsen, 1981; Perry, 1981; Perry y cols., 1983). Diversos autores estiman que aproximadamente el 59% de las neuronas de la capa de CGR en el ratón son células amacrinas desplazadas (Drager y Olsen, 1981; Jeon y cols., 1998 y Schmidt y cols., 2001). Si nos basamos en criterios morfológicos, las células amacrinas desplazadas y las pequeñas CGR se solapan en tamaño, por lo que es difícil distinguir estas clases de neuronas de la retina (Villegas-Perez y cols., 1988, 1993) resultando la identificación de las CGR dentro de la capa de CGR una tarea ardua.

Para la identificación de las CGR necesitamos un marcador fiable, para ello la molécula utilizada como marcador debe cumplir dos requisitos, debe expresarse específicamente por la mayoría de las CGR (Perry y cols., 1984; Dabin y Barnstable, 1995) y la pérdida de dicha proteína después de una lesión debe correlacionarse con la muerte de CGR, es decir, el nivel de expresión del marcador.

La utilización de anticuerpos contra Thy-1, proteína que se expresa selectivamente en las CGR (Chidlow y cols., 2005; Huang y cols., 2006) ha sido utilizado para la identificación de las CGR, el descenso de la expresión de esta proteína en CGR lesionadas sin coincidencia con la muerte de las mismas hace este método inadecuado para determinar la supervivencia celular (Schlamp y cols., 2001). A su vez, en otros modelos de lesión celular, como en la sección del nervio óptico, se ha observado que Thy-1 comienza a expresarse en las células de Müller de la retina, por lo que deja de ser un marcador específico de CGR (Dabin y cols., 1995).

La inmunodetección de BEX $\frac{1}{2}$ reconoce los cuerpos celulares de las CGR y sus proyecciones, siendo un marcador adecuado para el estudio de los cambios morfológicos de las células asociados a la lesión. Sin embargo, debido a su expresión axonal no es el adecuado para el análisis cuantitativo. En el mismo sentido, otra técnica desarrollada para marcar específicamente CGR es la detección del ARNm de

DISCUSIÓN

la sinucleína en las CGR (Soto y cols., 2008). La sinucleína es una proteína que se expresa sólo en las CGR, pero no se puede detectar con anticuerpos (inmunodetección) porque esta proteína se expresa, además de en el cuerpo neuronal, en los axones y dendritas de las CGR, lo que dificulta la cuantificación automática.

Otro método establecido para la identificación de las CGR es el trazador neuronal retrógrado, FluoroGold™ (2-hidroxiestilbeno4,4'dicarboxamidinebis (metanosulfonato)) o su análogo Ohst (metanosulfonato hidroxistilbamidina), mediante inyección en la superficie de ambos CS (Mansour-Robaey y cols., 1994; Sellés-Navarro y cols., 1996; Vidal-Sanz y cols., 2001b; Lafuente y cols., 2002), principal territorio de proyección de las CGR (Perry, 1981), consiguiendo identificar prácticamente la totalidad de las CGR en roedores.

Es conocido que la familia de los factores de transcripción (Brn3a, Brn3b y Brn3c) desempeñan un papel importante en la diferenciación, la supervivencia y la elongación axonal en el desarrollo de las CGR murinas (Nadal-Nicolas y cols., 2009). Estudios comparativos realizados en rata (Peinado-Ramón y cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009) donde se analizó el curso temporal de muerte de las CGR tras la sección del NO, demostraron que la pérdida de CGR marcadas con Brn3a era significativa dos días después de la lesión, mientras que la pérdida de CGR marcadas con FG era significativa solamente a los 7 días después de la lesión (Nadal-Nicolás y cols., 2009). La causa de ello puede deberse a que el Brn3a es un marcador intrínseco de CGR que desaparece cuando la neurona ha iniciado el proceso de muerte celular, mientras que el FG es un marcador extrínseco que sólo desaparece cuando una célula de microglía fagocita y elimina la CGR muerta. En ratón, la pérdida de CGR comienza a ser significativa a los 3 días después de la sección del NO con ambos marcadores, ya que la microglía fagocítica en el ratón es más rápida frente a una lesión que en la rata, por tanto podríamos utilizar cualquiera de los marcadores (Nadal-Nicolás y cols., 2009).

6.4. CARACTERIZACIÓN DEL BRN3A COMO MARCADOR DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN RATON ADULTO.

En ratón se ha descrito que Brn3, en la retina, se expresaba únicamente en las CGR (Quina y cols., 2005). En estudios comparativos con las retinas de rata adulta, tras lesión del NO por sección o aplastamiento, se ha descrito que el factor de transcripción Brn3a se expresa en la mayoría de las CGR, ya fueran lesionadas o procedentes de retinas control (Nadal-Nicolás y cols., 2009), demostrando que la expresión del Brn3a se mantiene en las CGR aun estando lesionadas y se mantienen vivas tras un tratamiento neuroprotector (Sánchez-Migallón y cols., 2011).

Estudios que han utilizado el Brn3b como marcador de las CGR tanto en ratón (Leahy y cols., 2004; Buckingham y cols., 2008) como en rata (Leahy y cols., 2004; Bernstein y cols., 2006) demuestran que el Brn3b marca el 65% de las CGR-Brn3a⁺ en la rata (Nadal-Nicolás y cols., 2012) e identificando la mayoría de las CGR en el ratón (Leahy y cols., 2004). Por tanto, la fiabilidad del estudio queda en entredicho al utilizar un anticuerpo comercial anti-Brn3b que detecta indistintamente los tres miembros de la familia Brn3, no solamente el Brn3b. También se ha descrito que el Brn3c solamente se expresa en un 51% de las CGR Brn3a⁺ en la retina de la rata (Nadal-Nicolás y cols., 2012).

En resumen, las ventajas del Brn3a con respecto a los demás marcadores retrógrados, residen en su fiabilidad como marcador de las CGR tanto en rata como en ratón, en que su patrón de expresión de Brn3a no varía después de una lesión y que es un método fácil de desarrollar en el laboratorio, evitando otra cirugía necesaria en el caso de los marcadores retrógrados. Por todo ello, el Brn3a fue nuestra elección como marcador de CGR.

6.5. SELECCIÓN DE LAS ÁREAS DE RECuento CELULAR.

Es conocido por diversos estudios que la distribución de las CGR en los ratones no es uniforme. Las células ganglionares de la retina se distribuyen a lo largo de un gradiente centro-periferia, donde algunos autores refieren una región horizontal con mayor densidad de CGR en la retina superior cercana a la papila óptica y a nivel

DISCUSIÓN

temporal (Drager y Olsen, 1981; Jeon y cols., 1998; Jakobs y cols., 2005; Vidal-Sanz y cols., 2012). Esta información es importante ya que la distribución de las células refleja la especialización regional, la cual ha sido motivo de controversia para muchos autores (Dantias y cols., 2002; Reese, 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009), así como sobre el grado de resolución del sistema visual (Drager y Hubel, 1976; Prusky y cols., 2002).

Al igual que en otros estudios, la selección de las zonas de la retina para el recuento de las CGR se realizó de manera que la zona elegida estuviera alejada de la zona que ocupaba la cabeza del nervio óptico. También se indicaba la ventaja de una mayor diferencia morfológica con las células amacrinas desplazadas (Nakano y cols., 2011). Por lo tanto, en nuestro estudio se seleccionaron zonas acotadas de igual tamaño, todas ellas equidistantes a un punto de referencia, tomando como tal la salida de los axones de las CGR que forma el nervio óptico.

6.6. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA EN RATÓN ADULTO.

Recientemente, se han desarrollado metodologías de cuantificación automatizada que permiten contar automáticamente las CGR trazadas en rata y ratón y representar gráficamente su distribución espacial (Dantias y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009 a,b). Conocer la identidad de una población específica de neuronas, como las CGR, es necesario especialmente si tenemos en cuenta la variabilidad en el número de células ganglionares que existe en los diversos tipos de ratones, llegando a alcanzar rangos de entre 32.000 y 87.000 (Williams y cols., 1996).

La comparativa entre los métodos más tradicionales y el recuento automatizados se llevó a cabo en el estudio de Salinas-Navarro y cols. (2009). Para ello se seleccionó cuatro retinas normales de ratones albinos y pigmentados cuyas CGR fueron marcadas mediante hidroxiestilbamidina OHSThst y se comparó el recuento celular de manera manual realizado por cuatro investigadores experimentados y el recuento obtenido de forma automática en 40 fotogramas seleccionados al azar con varias

densidades de CGR. El estudio demostró la validación de ambos métodos de recuento.

Sin embargo, la cuantificación automática de las CGR presenta ciertos inconvenientes en relación con las células de la microglía, ya que si bien un observador entrenado puede diferenciarlas por criterios morfológicos con las CGR, el conteo automático no es capaz de discriminar entre ambas poblaciones. Esta situación se acrecienta con la utilización de trazadores anteriores a la lesión, donde parte de la población de CGR marcadas degeneraban, morían, y eran fagocitadas por células de microglía, quedando así mismo marcadas. En estas condiciones, el conteo automático no era capaz de diferenciarlas de las CGR, teniendo que utilizar un recuento semiautomático mediante marcaje con OHST y recuento manual.

Nuestro estudio se realizó utilizando la técnica de recuento manual de CGR debido a la falta de medios tecnológicos, así como a la adecuación de las técnicas a los objetivos marcados. El fin de nuestro estudio no estribaba en conocer el valor total de CGR en los animales estudiados, tanto porque la metodología utilizada no sería la idónea, como porque los datos obtenidos no supondrían ningún avance a lo que ya se sabía por otros estudios. Nuestro objetivo era demostrar que cierto proceso lesivo generaba muerte de CGR y por tanto una disminución de la densidad celular en la retina, así como mostrar la posibilidad de revertir ese daño mediante el uso de tratamientos protectores.

6.7. SELECCIÓN DE LA INYECCIÓN INTRAOCULAR COMO TÉCNICA GENERADORA DEL DAÑO CELULAR.

La técnica utilizada para el desarrollo del modelo degenerativo en retina mediado por la inyección intravítrea con agentes lesivos se realizó de manera minuciosa según la metodología indicada en materiales y métodos con el fin de evitar un proceso lesivo derivado de dicha técnica y no al propio agente.

El desarrollo de cataratas (opacidad del cristalino) en los ratones tratados con la técnica de inyección intraocular, fue una de las consecuencias observadas en estudios anteriores debido al posible rozamiento del cristalino con la aguja de inoculación y

DISCUSIÓN

asociado a una errónea elección en el grosor de la aguja utilizada (30G), lo que provocaba que estos ratones no fueran válidos para el estudio (Li y cols., 1999).

La posible relación entre el daño generado en las CGR y la técnica utilizada es descartada en nuestro estudio debido tanto a la elección de agujas más finas (33G) para la inyección intraocular, así como al desarrollo de la técnica por igual en ambos ojos, siendo inoculado el ojo control con una solución inocua (PBS) y el ojo tratado con el agente tóxico a estudiar.

Los resultados demostraron que, tras inyección intraocular, el ojo control no sufrió ningún daño, a diferencia del daño celular obtenido en el ojo tratado. Estos datos fueron corroborados posteriormente con el estudio de los patrones electroretinográficos. No se encontró ningún caso de cataratas en nuestro estudio.

Los registros ERG funcionaron como un modo de verificación del daño causado por la técnica de inyección intraocular, los animales inoculados que presentaron datos electrofisiológicos dispares fueron retirados del estudio. Por lo tanto, la técnica de inyección intraocular aplicada en nuestro estudio resultaba fiable.

6.8. DOSIFICACIÓN DE AGENTES EXCITOTÓXICOS.

Modelos excitotóxicos mediante inyección de NMDA y/o KA han sido descritos en diversos estudios tanto en rata como en ratón, y todos coinciden en que la inyección de NMDA y/o KA provoca una pérdida de las CGR (Siliprandi y cols., 1992; Sabel., 1995; Lam y cols., 1999; Li y cols., 1999; Nakano y cols., 2011) y que es dependiente de la dosis inoculada (Li y cols., 1999), asemejándose estos modelos a los obtenidos mediante aplastamiento del NO (Villegas-Perez y cols., 1993; Galindo Romero., 2011). En dichos estudios, se observó que las células que mueren contenían núcleos picnóticos condensados, fragmentación celular y del ADN, características propias de la apoptosis, no apareciendo la acumulación de residuos celulares ni inflamación normalmente asociada con necrosis. Que el proceso de muerte celular fuera de una forma u otra dependía de la magnitud de la respuesta excitatoria generada por la dosis inoculada (Li y cols., 1999).

Estudios comparativos realizados en ratones que fueron sometidos a inyección intraocular de entre 5 y 80 mM de NMDA demostraron que a los seis días de la

inoculación la dosis de 5 mM no provocaba ninguna pérdida celular mientras que la dosis de 80 mM provocaba una disminución celular de aproximadamente el 70% (Li y cols., 1999). Otros autores (Nakano y cols., 2011) desvelan el efecto generado por diversas dosis de NMDA crecientes en el transcurso de 14 días tras la inyección intraocular, afirmando tanto la disminución celular con el aumento de la dosis aplicada como el hecho de que los cambios se generaban tras la primera semana de la inyección, manteniéndose el número de CGR del séptimo día al decimocuarto.

Nuestros resultados en los recuentos celulares confirmaron para todas las concentraciones inyectadas, tanto de KA como de NMDA, que hubo una disminución de las CGR, siendo estos datos significativos para las concentraciones de 10 y 20 mM de KA. Sin embargo, aunque para la mayoría de las concentraciones inyectadas de NMDA hubo una disminución de las CGR, para la dosis de 10 mM de NMDA no se observó la disminución celular esperada. Se podría pensar que la pequeña dosis administrada era la causa de estos resultados, pero como hemos indicado anteriormente estudios previos indicaban una disminución del número de CGR con esta dosis de NMDA. La revisión de los datos electrofisiológicos posteriores a la inyección intraocular corroboraba un posible error metodológico en la técnica aplicada.

En el estudio de la inyección intraocular con distintas concentraciones combinadas de NMDA y KA se obtuvo una gran variabilidad de los datos. Un caso atípico con respecto a los datos esperados fue el porcentaje obtenido de las CGR en el ojo control con respecto al ojo tratado para la dosis de 10 mM de NMDA y 5 mM de KA, esto puede ser debido a diversas causas. La causa podría ser derivada del proceso de inyección intraocular para ello se observó el patrón electrofisiológico que contribuyó a evidenciar como causa de los datos el error cometido en el proceso de inyección intraocular.

Los porcentajes de CGR obtenidos en el ojo control con respecto al ojo tratado para la dosis de 15 mM de NMDA y 5 mM de KA resultan llamativos, debido al excesivo daño generado en el ojo tratado ya que cabría esperar que el efecto generado fuera correlativo a la dosis utilizada y por tanto, la dosis más dañina fuera la de mayor

DISCUSIÓN

concentración de ambos compuestos. Dado que esta premisa no se cumple en nuestro estudio, entendemos que la muestra utilizada no es la idónea para la afirmación de los datos. La comparación realizada entre distintas dosis es meramente una prueba para demostrar la variabilidad de los datos. Proponemos que sería necesaria la realización de nuevos estudios que permitan verificar la variación de los datos y poder confirmar el comportamiento del daño para las distintas concentraciones mezclas.

La selección de la concentración mezcla de 30 mM de NMDA y 10 mM de KA fue debida a los resultados obtenidos en la muestra de siete animales que confirmó una menor variabilidad de los datos y un daño controlado y efectivo en las CGR para el estudio y aplicación de posibles tratamientos protectores.

6.9. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA RETINA EN ANIMALES SOMETIDOS A LA INYECCIÓN INTRAOCULAR CON AGENTES EXCITOTÓXICOS.

La evaluación de los resultados obtenidos por ERG en animales sometidos a inyección intraocular con 30 mM de NMDA y 10 mM de KA tanto en condiciones escotópicas como fotópicas, marcó una visible diferencia entre el ojo control y el ojo tratado. Los datos obtenidos nos permiten afirmar que la inyección de agentes excitotóxicos no produce un daño directo de los fotorreceptores.,

Los registros de las ondas "a" y "b" muestran el daño generado en modelos degenerativos experimentales en las capas externas y medias de la retina, pero nuestro objetivo estriba en el estudio de la capa más interna de la retina y específicamente el de la población de las CGR. Hay pocas técnicas funcionales para cuantificar la población de CGR "*in vivo*" incluyendo el ERG multifocal (Ball y Petry, 2000) o el *pattern* ERG (Ben-Shlomo y cols., 2005). Debido a esta falta de pruebas funcionales, los registros de las respuestas STR (respuesta umbral escotópica) suponen una herramienta electrofisiológica para la medición de la función de las CGR de manera relativamente sencilla (Frishman y cols., 1996; Bui y Fortune, 2004).

La respuesta STR es una respuesta electrofisiológica que se debe en gran medida a la población de CGR, por ello la integridad de la población de CGR es necesaria para evocar una respuesta STR completa. La relación entre la pSTR y el número de CGR está relativamente aceptada, aunque es posible que en la génesis de la STR no solo participen las CGR sino también otras células retinianas como las amacrinas. La reducción significativa de la STR ha sido asociada con una hipertensión ocular (HTO) en ratones pigmentados (Holcombe y cols., 2008), así como en modelos de hipertensión en monos y en humanos con glaucoma (Korth y cols., 1994; Frishman y cols., 1996).

El análisis electrofisiológico obtenido en el estudio de los efectos generados por el KA, demostró una disminución de todos los componentes electrofisiológicos para todas las concentraciones de KA estudiadas. Se obtuvieron valores de la onda STR, Onda b, tanto en condiciones fotópicas como escotópicas, y de la onda de PO, disminuidos con respecto a los valores obtenidos en el ojo control, siendo estos valores más acusados según aumentamos la concentración de KA. Los resultados obtenidos no fueron en ningún caso significativos.

El análisis electrofisiológico obtenido en el estudio de los efectos generados por el NMDA, demostró una disminución de todos los componentes electrofisiológicos para la concentración de 100 mM NMDA. Se obtuvieron valores de la onda STR, Onda b, tanto en condiciones fotópicas como escotópicas, y de la onda de PO, disminuidos con respecto a los valores obtenidos en el ojo control únicamente para dicha concentración de NMDA manteniéndose valores similares para el resto de concentraciones. Los resultados obtenidos no fueron en ningún caso significativos.

6.10. TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA PROTECCIÓN DEL DAÑO CELULAR.

Son muchos los estudios previos que se han realizado buscando el mejor tratamiento frente a la degeneración de las CGR en los diversos modelos degenerativos. Para que un medicamento tenga actividad neuroprotectora, debe aumentar la resistencia de las CGR frente a una situación de estrés crónico o lesión y mejorar su supervivencia. En la literatura aparecen descritos varios tipos.

DISCUSIÓN

Un neuroprotector demostrado es la brimonidina (BMD). La brimonidina es un agonista alfa-2 adrenérgico. Mediante el análisis inmunohistoquímico se ha demostrado que los receptores específicos alfa-2 se encuentran en la retina interna. Algunos estudios demuestran la capacidad neuroprotectora de la activación de los receptores alfa-2 (Wheeler y Woldemussie, 2001).

Estudios previos demostraron que la BMD es un potente neuroprotector cuando se administra de manera tópica tras un proceso de isquemia transitoria inducida en la rata (Lafuente y cols., 2002). Se demostró, que el efecto neuroprotector de la BMD era dependiente de la concentración aplicada, así concentraciones pequeñas (0,0001%) no obtuvieron efectos neuroprotectores significativos, mientras que concentraciones intermedias (0,001 y 0,01%) mostraron datos de supervivencia del 76 al 90% respectivamente. Concentraciones de BMD al 0,1% genera un efecto neuroprotector óptimo contra la pérdida temprana de CGR. También se han conseguido efectos protectores óptimos ante el uso de la BMD tras un proceso isquémico inducido en ratas a dosis de 0,1% y 0,5% (Vidal-Sanz y cols., 2001). Estos resultados fueron precedidos por estudios anteriores (Wheeler, Lai y Woldemussie, 1999) que demostraron mediante el estudio de los patrones electrorretinográficos los efectos protectores de la BMD (0,5% tópica) sobre la amplitud de la onda a y b, generada por las células de la capa nuclear interna y externa de la retina.

Posteriormente, Mayor-Torroglosa, y cols. (2005), demostraron que el efecto con BMD frente a un modelo de isquemia inducido por la ligadura de los vasos oftálmicos en ratas, provocaba una marcada mejoría en los análisis electrorretinográficos. El efecto neuroprotector también se observaba en la afectación de las proyecciones retinotectal y en la reducción del espesor de la capa de retina interna, mejorando ambas tras el tratamiento. Lambert y colaboradores (2001) demostraron que el tratamiento continuo y sistémico en un modelo en rata de hipertensión intraocular, mejoró significativamente la supervivencia de las CGR mediante inyección subcutánea con BMD y de forma específica, que la región nasal de la retina era donde se conseguían los efectos más notables. Además, se demostró que la BMD también mantenía la morfología del axón de las CG, reduciendo significativamente el déficit en el transporte axonal en el colículo superior (CS) debido a la lesión, por ello la importancia de los efectos neuroprotectores de la BMD no sólo relevantes en el cuerpo celular sino en toda la proyección óptica.

Algunos estudios evidencian las propiedades anti-apoptóticas de la constituyente bilis, ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), en diversos modelos de degeneración. Modelos de excitotoxicidad por inyección intravítrea con NMDA en ratas, fue estudiado mediante la administración sistémica de TUDCA por vía intraperitoneal, en el que se demostró tanto a nivel funcional como fisiológico que atenuó el deterioro funcional inducido por el NMDA que se correlaciona con una densidad de CGR superior, lo que demuestra la eficacia de la administración de TUDCA *in vivo*. Por lo tanto, el TUDCA es un buen candidato en el tratamiento farmacológico de enfermedades degenerativas que cursan con pérdida de CGR (Gómez-Vicente y cols., 2015).

El tratamiento con TUDCA fue estudiado tanto respecto a sus efectos sobre la densidad celular de la retina como sobre sus respuestas electrofisiológicas. La densidad celular observada en los casos que fueron tratados mediante inyección intraperitoneal de TUDCA no demostró diferencias significativas respecto a los datos obtenidos en los casos en que no se aplicó tratamiento. Las respuestas electrorretinográficas mejoraron con respecto a los casos no tratados pero en ningún caso fue de manera significativa. Por lo tanto, por comparación con los resultados obtenidos en otros trabajos en que se usó el TUDCA como tratamiento, nuestros datos no se acercaron a lo esperado.

Nuestro trabajo se centró en la comparación electrorretinográfica entre distintos tratamientos neuroprotectores, para una misma concentración combinada de NMDA y KA. Por el contrario, el tratamiento con inhibidores inflamatorios no fue efectivo ya que los datos obtenidos en el análisis ERG en los ojos inyectados con agente lesivos no mejoraron con este protector respecto a los que no tuvieron tratamientos protectores, encontrándose todas las respuestas afectadas y en mayor cuantía la onda STR y la onda b. Para los agentes anti-inflamatorios se comprobó que tampoco a una dosis combinada menor (NMDA 15 mM: KA 5 mM) tenía efecto protector.

El tratamiento con BMD fue indicativo de la mejora de los resultados electrorretinográficos, obteniendo una mejor respuesta tanto del STR, como de la onda b, tanto en condiciones escotópicas como fotópicas de luz. El efecto protector de la BMD en nuestro estudio es leve pero observable, esto probablemente sea

DISCUSIÓN

debido a que partimos de una dosis inicial de agentes lesivos alta y por lo tanto es más difícil revertir el daño generado a nivel celular. Posteriores estudios realizados en nuestro laboratorio han confirmado este hecho, ya que siguiendo el mismo procedimiento pero utilizando una dosis combinada de NMDA y KA de menor concentración se han obtenido resultados protectores mucho más marcados con el tratamiento de BMD. El mismo efecto de recuperación celular se observó en el estudio fisiológico.

Por lo tanto podemos indicar que de los tratamientos protectores utilizados en nuestro estudio contra el efecto de agentes lesivos inoculados en retina de ratones, la BMD es el más efectivo, pero su efecto es dependiente de la dosis inoculada de agentes lesivos. Se ha demostrado que la dosis inyectada de los dos agentes lesivos es alta y por tanto el daño generado muy marcado y difícil de revertir, pero estudios posteriores de los miembros del laboratorio han demostrado que el tratamiento con BMD puede llegar a ser efectivo si la lesión excitotóxica es menos intensa (Barhoum, comunicación personal).

6.11. ESTUDIO DE LA VÍA VISUAL TRAS LA INYECCIÓN INTRAOCULAR CON AGENTES LESIVOS.

Nuestro estudio demuestra que los agentes lesivos utilizados (NMDA y KA) tienen un efecto deletéreo en las células de la retina, específicamente en CGR, confirmando la utilidad de dicho modelo animal para el estudio de patologías que cursan con una degeneración retiniana.

El estudio de la vía visual nos confirmó que el efecto producido en las CGR se reproduce también en las demás estructuras que componen la vía visual, encontrándose una marcada disminución de las fibras nerviosas decusadas hacia la zona contralateral del cerebro del ojo inyectado con los agentes lesivos. Dado el alto porcentaje de fibras decusadas en ratones (90%), sólo se observó una mínima respuesta en el lado contralateral del ojo afectado como cabría esperar. Lo que nos indica la utilidad de dicho modelo animal para el estudio también de la vía visual.

Nuestro estudio no engloba los tratamientos protectores utilizados y sus efectos en la vía visual, es de esperar que al igual que la BMD minimiza la muerte de las CGR en

la retina, mejore la supervivencia de las fibras nerviosas a lo largo de la vía visual. El efecto de los tratamientos protectores en la vía visual nos abre una oportunidad para estudios futuros.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta trabajo de Tesis Doctoral, concluimos:

- El uso de agentes excitotóxicos mediante inyección intraocular nos permite el desarrollo de un modelo experimental neurodegenerativo por muerte celular inducida válido y reproducible para el estudio y la valoración de los efectos generados en el sistema visual.
- El KA inyectado intraocularmente en ratones pigmentados adultos, produce un daño estructural en el sistema visual marcado por una disminución celular significativa, así como por una alteración funcional.
- El NMDA inyectado intraocularmente en ratones pigmentados adultos, produce un daño estructural en el sistema visual marcado por una disminución celular significativa, así como por una alteración funcional.
- La unión de KA y NMDA inyectados intraocularmente en ratones pigmentados adultos, potencia el efecto lesivo generado individualmente por cada agente. El efecto deletéreo en las células de la retina demuestra el daño estructural y funcional del sistema visual.
- La evaluación funcional de la vía visual en el modelo experimental neurodegenerativo inducido por agentes excitotóxicos inyectados intraocularmente permite valorar el grado de lesión generado en las células ganglionares de la retina y otros tipos celulares sensibles a la acción de dichos agentes excitotóxicos.
- Los agentes terapéuticos o neuroprotectores utilizados en nuestro estudio no demostraron una efectividad en su capacidad neuroprotectora.
- El efecto lesivo producido por la inyección intraocular de agentes excitotóxicos en las células ganglionares de la retina se traduce en un defecto de proyección de los axones de dichas células sobre cuerpo geniculado lateral y colículo superior.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem* 1992; 267(19):13361-13368.

Ahnelt P, Kolb H. Horizontal cells and cone photoreceptors in primate retina: a Golgi-light microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol* 1994, 343(3):387-405.

Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2012; 31(2):152-181.

Almeida A, Heales SJ, Bolanos JP, Medina JM. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res* 1998; 790(1-2):209-216.

Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003; 34(4-5):325-337.

Babot Z, Cristofol R, Sunol C. Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci* 2005; 21(1):103-112.

Badea TC, Nathans J. Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J Comp Neurol* 2004; 480(4):331-351.

Ball SL, Petry HM. Noninvasive assessment of retinal function in rats using multifocal electroretinography. *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 2000; 41(2):610-617.

Ben-Shlomo G, Bakalash S, Lambrou GN, Latour E, Dawson WW, Schwartz M, et al. Pattern electroretinography in a rat model of ocular hypertension: functional evidence for early detection of inner retinal damage. *Exp Eye Res* 2005; 81(3):340-349.

Bernstein SL, Koo JH, Slater BJ, Guo Y, Margolis FL. Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol Vis* 2006; 12:147-155.

Berson DM. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 2003; 26(6):314-320.

Bolnick DA, Walter AE, Sillman AJ. Barium suppresses slow PIII in perfused bullfrog retina. *Vision Res* 1979; 19(10):1117-1119.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(16):7162-7166.

Bowmaker JK, Dartnall HJ. Visual pigments of rods and cones in a human retina. *J Physiol* 1980; 298:501-511.

Bowmaker JK, Hunt DM. Evolution of vertebrate visual pigments. *Curr Biol* 2006; 16(13):R484-489.

Boycott BB, Wässle H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol* 1974; 240(2):397-419.

Boycott BB, Wässle H. Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur J Neurosci* 1991; 3(11):1069-1088.

Bringmann A, Reichenbach A. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 2001; 6:E72-92.

Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, et al. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 2008; 28(11):2735-2744.

Bui BV, Fortune B. Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *J Physiol* 2004; 555(1):153-173.

Carlsson AM, Chauhan BC, Lee AA, LeBlanc RP. The effect of brimonidine tartrate on retinal blood flow in patients with ocular hypertension. *Am J Ophthalmol* 2000; 129(3):297-301.

BIBLIOGRAFÍA

Chen H, Wei X, Cho KS, Chen G, Sappington R, Calkins DJ, et al. Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(1):36-44.

Chidlow G, Casson R, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Osborne NN. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis* 2005; 11:387-396.

Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987; 7(2):369-379.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23(9):1261-1276.

Chou TH, Porciatti V. The bioelectric field of the pattern electroretinogram in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(13):8086-8092.

Chou TH, Bohorquez J, Toft-Nielsen J, Ozdamar O, Porciatti V. Robust mouse pattern electroretinograms derived simultaneously from each eye using a common snout electrode. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(4):2469-2475.

Colotto A, Falsini B, Salgarello T, Iarossi G, Galan ME, Scullica L. Photopic negative response of the human ERG: losses associated with glaucomatous damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(8):2205-2211.

Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:205-237.

Dabin I, Barnstable CJ. Rat retinal Muller cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia* 1995; 14(1):23-32.

Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos-Esteban J, Podos SM, et al. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(3):587-594.

Dann JF, Buhl EH. Retinal ganglion cells projecting to the accessory optic system in the rat. *J Comp Neurol* 1987; 262(1) 141-158.

Davies MH, Eubanks JP, Powers MR. Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol Vis* 2006; 12:467-477.

De Juan J, Iniguez C, Carreres J. Number, diameter and distribution of the rat optic nerve fibers. *Acta Anat (Basel)* 1978; 102(3):294-299.

De la Villa P, Kurahashi T, Kaneko A. L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *J Neurosci* 1995; 15(1):3571-3582.

Dieterle P, Gordon E. Standard curve and physiological limits of dark adaptation by means of the Goldmann-Weekers adaptometer. *Br J Ophthalmol* 1956; 40(11):652-655.

Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 81(3):163-221.

Dogiel AS. Über das Verhalten der nervösen Elemente in der retina der Ganoiden, Reptilien, Vögel und Säugetiere. *Anatomischer Anzeiger*, 1888; 3:133-134. .

Dowling JE . The retina. An approachable part of the brain. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge (Massachusetts) and London (England) 1987.

Drager UC, Hubel DH. Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. *J Neurophysiol* 1976; 39(1):91-101.

Drager UC, Olsen JF. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 20(3):285-293.

Drager UC, Hofbauer A. Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina. *Nature* 1984; 309(5969):624-626.

Dreher B, Sefton AJ, Ni SY, Nisbett G. The morphology, number, distribution and central projections of Class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behav Evol* 1985; 26(1):10-48.

Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell K. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci* 1995; 15(4):3075-3083.

Eindthoven W JW. The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation at various intensities. *Exp Physiol* 1908; 1:373-416.

Eschweiler GW, Bahr M. Flunarizine enhances rat retinal ganglion cell survival after axotomy. *J Neurol Sci* 1993; 116(1):34-40.

BIBLIOGRAFÍA

- Fain G. Sensory Transduction. Sinauer Associates, Inc. USA. 2003.
- Fernández-Sánchez L, Lax P, Pinilla I, Martín-Nieto J, Cuenca N. Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(8):4998-5008.
- Fishman G, Birch D, Holder G, Brigell M. Electrophysiological Testing in disorders of the retina, optic nerve and visual pathway. Ed. The Foundation of the American Academy of Ophthalmology. San Francisco(California, USA).2001; pp 1-155.
- Fitzgibbon T, Reese BE. Organization of retinal ganglion cell axons in the optic fiber layer and nerve of fetal ferrets. *Vis Neurosci* 1996; 13(5):847-861.
- Flor PJ, Lindauer K, Puttner I, Ruegg D, Lukic S, Knopfel T, et al. Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of the human metabotropic glutamate receptor type 2. *Eur J Neurosci* 1995; 7(4):622-629.
- Forrester J, Peters A. Nerve fibres in optic nerve of rat. *Nature* 1967; 214(5085):245-247.
- Frishman LJ, Reddy MG, Robson JG. Effects of background light on the human dark-adapted electroretinogram and psychophysical threshold. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 1996; 13(3):601-612.
- Frishman L. Origins of the electroretinogram.:”Principles and practice of clinical electrophysiology of vision (second edition)”. Heckenlively JR, Arden GB. Ed. Massachusetts Institute of Technology (MIT). Cambridge (Massachusetts, USA).2006 pp 139-183.
- Fukuda Y. A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies. *Brain Res* 1977; 119(2):327-334.
- Galindo-Romero C, Aviles-Trigueros M, Jimenez-Lopez M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolas F, y cols. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res* 2011; 92(5):377-387.
- Galindo-Romero C, Jimenez-Lopez M, Garcia-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolas FM, Agudo-Barriuso M, y cols. Number and spatial distribution of intrinsically

photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp Eye Res* 2013; 108:84-93.

Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jimenez-Lopez M, Garcia-Ayuso D, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, y cols. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(2):974-985.

Galindo-Romero, C. Caracterización de las Células Ganglionares de la Retina Melanopsínicas y Neuroprotección de las Células Ganglionares de la Retina en el Roedor. [Tesis doctoral]. Murcia(España): Universidad de Murcia, 2014; 226p.

Gallego A, Cruz J. Mammalian Retina: Associational Nerve Cells in Ganglion Cell Layer. *Science* 1965; 150(3701):1313-1314.

Gao H, Qiao X, Cantor LB, WuDunn D. Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(6):797-803.

García Galloway E. Muerte neuronal excitotóxica: Interacción entre las rutas de señalización del IGF-I y el Glutamato. [Tesis doctoral]. Madrid (España), Universidad Complutense de Madrid; 2003.132 p.

García M, Vecino E. Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Arch Soc ESp Oft.*2008; 78(7).

Garcia M, Forster V, Hicks D, Vecino E. Effects of muller glia on cell survival and neuritogenesis in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(12):3735-3743.

García Ayuso, D. Estudio del efecto de la degeneración de los fotorreceptores en la población de células ganglionares de la retina. [Tesis doctoral].Murcia (España), Universidad de Murcia, 2011. 183p.

Gari M, Colotto A, Salgarello A, Fadda A, Di Renzo A, Anselmi G, et al. Photopic negative response from retinal hemifields in glaucoma. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.*2009; 50: E-Abstract 5302.

BIBLIOGRAFÍA

Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 2004; 469(1):70-82.

Gomez-Vicente V, Lax P, Fernandez-Sanchez L, Rondon N, Esquivia G, Germain F, et al. Neuroprotective Effect of Tauroursodeoxycholic Acid on N-Methyl-D-Aspartate-Induced Retinal Ganglion Cell Degeneration. *PLoS One* 2015; 10(9):e0137826.

Granit R. The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol* 1933; 77(3):207-239.

Greene JG, Greenamyre JT. Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 1996; 66(2):637-643.

Greferath U, Grunert U, Wässle H. Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity. *J Comp Neurol* 1990; 301(3):433-442.

Guillery RW, Mason CA, Taylor JS. Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J Neurosci* 1995; 15(7):4727-4737.

Guyton, A.C. y Hall, J.E. *Tratado de Fisiología Médica*. 12ª Ed. SA Elsevier. España. 2006. capítulos 49-50, 1112 p.

Haines DE. *Principios de Neurociencia*. Elsevier Science. Madrid, España. 2003.

Haverkamp S, Wässle H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 2000; 424(1):1-23.

Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 2000; 20(7):2567-2574.

Holcombe DJ, Lengefeld N, Gole GA, Barnett NL. Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model. *Br J Ophthalmol* 2008; 92(5):683-688.

Honjin R, Sakato S, Yamashita T. Electron microscopy of the mouse optic nerve: a quantitative study of the total optic nerve fibers. *Arch Histol Jpn* 1977; 40(4):321-332.

Honkanen RA, Baruah S, Zimmerman MB, Khanna CL, Weaver YK, Narkiewicz J, et al. Vitreous amino acid concentrations in patients with glaucoma undergoing vitrectomy. *Arch Ophthalmol* 2003; 121(2):183-188.

Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, et al. Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 1991 May 31; 252(5010):1318-1321.

Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, et al. Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol* 2007; 179(7):1523-1537.

Huang L, Max M, Margolskee RF, Su H, Masland RH, Euler T. G protein subunit G gamma 13 is coexpressed with G alpha o, G beta 3, and G beta 4 in retinal ON bipolar cells. *J Comp Neurol* 2003 1; 455(1):1-10.

Huang W, Fileta J, Guo Y, Grosskreutz CL. Downregulation of Thy1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Curr Eye Res* 2006 (3):265-271.

Hubel D. Ojo, cerebro y visión. 2ª Ed. Murcia. Universidad de Murcia. 2000. 233 p.

Huberman AD, Niell CM. What can mice tell us about how vision works? *Trends Neurosci* 2011; 34(9):464-473.

Huxlin KR, Goodchild AK. Retinal ganglion cells in the albino rat: revised morphological classification. *J Comp Neurol* 1997; 385(2):309-323.

Jacobs GH, Fenwick JA, Williams GA. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol* 2001; 204(14):2439-2446.

Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* 2005; 171(2):313-325.

Jeffery G. Architecture of the optic chiasm and the mechanisms that sculpt its development. *Physiol Rev* 2001; 81(4):1393-1414.

Jeffery G, Levitt JB, Cooper HM. Segregated hemispheric pathways through the optic chiasm distinguish primates from rodents. *Neuroscience* 2008; 157(3):637-643.

BIBLIOGRAFÍA

Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 1998; 18(21):8936-8946.

Jiang C, Moore MJ, Zhang X, Klassen H, Langer R, Young M. Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol Vis* 2007; 13:1783-1792.

Kandel E, Schwartz J, Jessell T. *Principios de Neurociencia*. 4ª Ed. LTC. Madrid. España. 2001. 1441 p.

Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(10):2967-2971.

Kong JH, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH. Diversity of ganglion cells in the mouse retina: unsupervised morphological classification and its limits. *J Comp Neurol* 2005; 489(3):293-310.

Kooijman AC, Damhof A. ERG lens with built-in Ganzfeld light source for stimulation and adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19(3):315-318.

Korol S, Leuenberger PM, Englert U, Babel J. In vivo effects of glycine on retinal ultrastructure and averaged electroretinogram. *Brain Res* 1975; 97(2):235-251.

Korth M, Nguyen NX, Horn F, Martus P. Scotopic threshold response and scotopic PII in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(2):619-625.

Lafuente MP, Villegas-Perez MP, Mayor S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Exp Eye Res* 2002a;74(2):181-189.

Lafuente MP, Villegas-Perez MP, Selles-Navarro I, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience* 2002b; 109(1):157-168.

Lagnado L. Retinal processing: amacrine cells keep it short and sweet. *Curr Biol* 1998; 8(17):R598-600.

- Lagnado L. The Wellcome Prize Lecture. Visual signals in the retina: from photons to synapses. *Exp Physiol* 2000; 85(1):1-16.
- Lam TT, Abler AS, Kwong JM, Tso MO. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(10):2391-2397.
- Lambert W, Agarwal R, Howe W, Clark AF, Wordinger RJ. Neurotrophin and neurotrophin receptor expression by cells of the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(10):2315-2323.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zhu Y, Gidday JM, Connor JR, et al. Quantitative ex vivo detection of rodent retinal ganglion cells by immunolabeling Brn-3b. *Exp Eye Res* 2004; 79(1):131-140.
- Lee RH, Lieberman BS, Yamane HK, Bok D, Fung BK. A third form of the G protein beta subunit. 1. Immunochemical identification and localization to cone photoreceptors. *J Biol Chem* 1992; 267(34):24776-24781.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(2):402-410.
- Levkovitch-Verbin H. Animal models of optic nerve diseases. *Eye (Lond)* 2004; 18(11):1066-1074.
- Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(5):1004-1008.
- Linden R, Perry VH. Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res* 1983 1; 272(1):145-149.
- Linden R, Cavalcante LA, Barradas PC. Mononuclear phagocytes in the retina of developing rats. *Histochemistry* 1986; 85(4):335-339.
- Lönngren U, Napankangas U, Lafuente M, Mayor S, Lindqvist N, Vidal-Sanz M, et al. The growth factor response in ischemic rat retina and superior colliculus after brimonidine pre-treatment. *Brain Res Bull* 2006; 71(1-3):208-218.

BIBLIOGRAFÍA

Lucas D, Newhouse J. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 1957; 58(2):193-201.

Lund RD. Uncrossed Visual Pathways of Hooded and Albino Rats. *Science* 1965; 149(3691):1506-1507.

Machida S, Gotoh Y, Toba Y, Ohtaki A, Kaneko M, Kurosaka D. Correlation between photopic negative response and retinal nerve fiber layer thickness and optic disc topography in glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008a; 49(5):2201-2207.

Machida S, Raz-Prag D, Fariss RN, Sieving PA, Bush RA. Photopic ERG negative response from amacrine cell signaling in RCS rat retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008b; 49(1):442-452.

Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(5):1632-1636.

Manzoni OJ, Finiels-Marlier F, Sasseti I, Blockaert J, le Peuch C, Sladeczek FA. The glutamate receptor of the Qp-type activates protein kinase C and is regulated by protein kinase C. *Neurosci Lett* 1990; 109(1-2):146-151.

Marc RE. Mapping glutamatergic drive in the vertebrate retina with a channel-permeant organic cation. *J Comp Neurol* 1999; 407(1):47-64.

Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol* 2009; 118(1):69-77.

Martínez, A., Castro, A. "Inhibition of tau phosphorylation: A new therapeutical strategy for the treatment of Alzheimer`s disease and other neurodegenerative disorders". *Expert Opin. Ther.Pat.* 2000; 10, 1519-1527.

Martínez A. Preclinical efficacy on GSK-3 inhibitors: towards a future generation of powerful drugs. *Med Res Rev* 2008; 28(5):773-796.

Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 1991; 349(6312):760-765.

May CA, Lütjen-Drecoll E. Morphology of the murine optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(7):2206-2212.

Mayor-Torroglosa S, De la Villa P, Rodriguez ME, Lopez-Herrera MP, Aviles-Trigueros M, Garcia-Aviles A, et al. Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(10):3825-3835.

McDonald JW, Althomsons SP, Hycr KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 1998; 4(3):291-297.

Métin C, Irons WA, Frost DO. Retinal ganglion cells in normal hamsters and hamsters with novel retinal projections. I. Number, distribution, and size. *J Comp Neurol* 1995; 353(2):179-199.

Michaelis M, Janig W. Sympathetic nervous system and pain: pathophysiological mechanisms. *Schmerz* 1998; 12(4):261-271.

Miller RF, Dowling JE. Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 1970; 33(3):323-341.

Montal M. Mitochondria, glutamate neurotoxicity and the death cascade. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366(1-2):113-126.

Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 1997; 64(1):85-96.

Mustafi D, Engel AH, Palczewski K. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28(4):289-302.

Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas-Navarro M, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(8):3860-3868.

BIBLIOGRAFÍA

Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Albuquerque-Bejar JJ, Vidal-Sanz M, et al. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One* 2012; 7(11):e49830.

Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, et al. Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem* 1993; 268(16):11868-11873.

Nakano N, Ikeda HO, Hangai M, Muraoka Y, Toda Y, Kakizuka A, et al. Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(12):8754-8762.

Ni S, Dreher B. Morphology of rat retinal ganglion cells projecting to the thalamus and midbrain. *Proc.Aust.Physiol.Pharmacol.Soc.*1981; 12:97.

Nicoletti F, Meek JL, Iadarola MJ, Chuang DM, Roth BL, Costa E. Coupling of inositol phospholipid metabolism with excitatory amino acid recognition sites in rat hippocampus. *J Neurochem* 1986a; 46(1):40-46.

Nicoletti F, Wroblewski JT, Iadarola MJ, Costa E. Serine-O-phosphate, an endogenous metabolite, inhibits the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis elicited by ibotenic acid in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 1986b; (3):335-338.

Nicoletti F, Wroblewski JT, Novelli A, Alho H, Guidotti A, Costa E. The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1986c;(7):1905-1911.

Nivison-Smith L, Sun D, Fletcher EL, Marc RE, Kalloniatis M. Mapping kainate activation of inner neurons in the rat retina. *J Comp Neurol* 2013; 521(11):2416-2438.

Núñez J, Alt J, McCarthy M. A new model for prenatal brain damage. I. GABAA receptor activation induces cell death in developing rat hippocampus. *Exp Neurol* 2003; 181(2):258-269.

Okamoto N, Hori S, Akazawa C, Hayashi Y, Shigemoto R, Mizuno N, et al. Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J Biol Chem* 1994; 269(2):1231-1236.

Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164(3880):719-721.

Ortin-Martinez A, Jimenez-Lopez M, Nadal-Nicolas FM, Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Sauve Y, et al. Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(6):3171-3183.

Ortin-Martinez A, Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Albuquerque-Bejar JJ, Nieto-Lopez L, Garcia-Ayuso D, et al. Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain. *PLoS One* 2014; 9(7):e102392.

Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23(1):91-147.

Oveson BC, Iwase T, Hackett SF, Lee SY, Usui S, Sedlak TW, et al. Constituents of bile, bilirubin and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration. *J Neurochem* 2011; 116(1):144-153.

Parrilla-Reverter G, Agudo M, Nadal-Nicolas F, Alarcon-Martinez L, Jimenez-Lopez M, Salinas-Navarro M, et al. Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vision Res* 2009; 49(23):2808-2825.

Paxinos G, Franklin K. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th Edition. Academic Press. 2001. 360p.

Pearce B, Albrecht J, Morrow C, Murphy S. Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neurosci Lett* 1986; 72(3):335-340.

BIBLIOGRAFÍA

Peichl L. Organization of the retina: structure/function relations and a species comparison of retinal ganglion cells. *Fortschr Ophthalmol* 1989; 86(1):47-53.

Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37(4):489-500.

Peng YW, Robishaw JD, Levine MA, Yau KW. Retinal rods and cones have distinct G protein beta and gamma subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(22):10882-10886.

Perry VH. The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1979; 204(1156):363-375.

Perry VH. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience* 1981; 6(5):931-944.

Perry VH, Henderson Z, Linden R. Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol* 1983; 219(3):356-368.

Perry VH, Morris RJ, Raisman G. Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve? *J Neurocytol* 1984; 13(5):809-824.

Phillips MJ, Walker TA, Choi HY, Faulkner AE, Kim MK, Sidney SS, et al. Tauroursodeoxycholic acid preservation of photoreceptor structure and function in the rd10 mouse through postnatal day 30. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(5):2148-2155.

Piani D, Frei K, Do KQ, Cuenod M, Fontana A. Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci Lett* 1991; 133(2):159-162.

Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2000; 6(1):67-70.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 1997; 378(1):88-104.

- Prusky GT, Harker KT, Douglas RM, Whishaw IQ. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behav Brain Res* 2002; 136(2):339-348.
- Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, et al. Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci* 2005; 25(50):11595-11604.
- Ramirez JM, Trivino A, Ramirez AI, Salazar JJ, Garcia-Sanchez J. Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res* 1996; 36(14):2029-2036.
- Ramirez JM, Ramirez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Trivino A. Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2001; 73(5):601-615.
- Randall RD, Thayer SA. Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 1992; 12(5):1882-1895.
- Reese BE. Rat retinal ganglion cell topography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43, 587-594.
- Remtulla S, Hallett PE. A schematic eye for the mouse, and comparisons with the rat. *Vision Res* 1985; 25(1):21-31.
- Robson JG, Saszik SM, Ahmed J, Frishman LJ. Rod and cone contributions to the a-wave of the electroretinogram of the macaque. *J Physiol* 2003; 547(2):509-530.
- Rodieck R. *The First Steps of Seeing*. Sinauer Associates, Massachusetts, USA. 1998.
- Romano C, Price MT, Olney JW. Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by excitatory amino acid agonists in isolated retina. *J Neurochem* 1995; 65(1):59-67.
- Rothman S. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* 1984; 4(7):1884-1891.
- Sabel BA, Sautter J, Stoehr T, Siliprandi R. A behavioral model of excitotoxicity: retinal degeneration, loss of vision, and subsequent recovery after intraocular NMDA administration in adult rats. *Exp Brain Res* 1995; 106(1):93-105.

BIBLIOGRAFÍA

Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jimenez-Lopez M, Aviles-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, et al. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res* 2009a; 49(1):115-126.

Salinas-Navarro M, Jimenez-Lopez M, Valiente-Soriano FJ, Alarcon-Martinez L, Aviles-Trigueros M, Mayor S, et al. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res* 2009b; 49(6):637-647.

Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, Jimenez-Lopez M, Mayor-Torroglosa S, Aviles-Trigueros M, et al. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 2010; 90(1):168-183.

Samdani AF, Newcamp C, Resink A, Facchinetti F, Hoffman BE, Dawson VL, et al. Differential susceptibility to neurotoxicity mediated by neurotrophins and neuronal nitric oxide synthase. *J Neurosci* 1997; 17(12):4633-4641.

Sanchez-Migallon MC, Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 2011; 92(4):260-267.

Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(1):207-216.

Saugstad JA, Kinzie JM, Mulvihill ER, Segerson TP, Westbrook GL. Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 1994; 45(3):367-372.

Saugstad JA, Kinzie JM, Shinohara MM, Segerson TP, Westbrook GL. Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile. *Mol Pharmacol* 1997; 51(1):119-125.

Sauve Y, Girman SV, Wang S, Lawrence JM, Lund RD. Progressive visual sensitivity loss in the Royal College of Surgeons rat: perimetric study in the superior colliculus. *Neuroscience* 2001; 103(1):51-63.

Sauve Y, Girman SV, Wang S, Keegan DJ, Lund RD. Preservation of visual responsiveness in the superior colliculus of RCS rats after retinal pigment epithelium cell transplantation. *Neuroscience* 2002; 114(2):389-401.

Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW. Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2001; 7:192-201.

Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickells RW. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci* 2006; 7:66-72.

Schmidt SL, Vitral RW, Linden R. Effects of prenatal ionizing irradiation on the development of the ganglion cell layer of the mouse retina. *Int J Dev Neurosci* 2001;19(4):469-473.

Schnapf JL, Baylor DA. How photoreceptor cells respond to light. *Sci Am* 1987; 256(4):40-47.

Schoepp D, Bockaert J, Sladeczek F. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1990; (12):508-515.

Sedeño Cruz I, Alemañy González J, Camacho Rúaigip F, Garcia González F. Estudio de la eficacia clínica de la brimonidina us timolol en el tratamiento del galucoma primario de ángulo abierto. *Revista Cubana de Oftalmología*; 2002; 15(1):35-9.

Seiple WH, Siegel IM, Carr RE, Mayron C. Evaluating macular function using the focal ERG. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27(7):1123-1130.

Sellés-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM, Vidal-Sanz M. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37(10):2002-2014.

Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res* 1995; 61(3):379-382.

BIBLIOGRAFÍA

Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R, et al. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci* 1992; 8(6):567-573.

Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 1985; 317(6039):717-719.

Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP. Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *J Comp Neurol* 2007; 501(6):866-878.

Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, et al. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci* 2008; 28(2):548-561.

Sun W, Li N, He S. Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 2002; 451(2):115-126.

Sutter EE, Tran D. The field topography of ERG components in man--I. The photopic luminance response. *Vision Res* 1992; 32(3):433-446.

Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Nakanishi S. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 1992; 8(1):169-179.

Tarres MA, Baron M, Gallego A. The horizontal cells in the retina of the owl, *Tyto alba*, and owllet, *Carinae noctua*. *Exp Eye Res* 1986; 42(4):315-321.

Tauchi M, Morigiwa K, Fukuda Y. Morphological comparisons between outer and inner ramifying alpha cells of the albino rat retina. *Exp Brain Res* 1992; 88(1):67-77.

Thanos S. The Relationship of Microglial Cells to Dying Neurons During Natural Neuronal Cell Death and Axotomy-induced Degeneration of the Rat Retina. *Eur J Neurosci* 1991; 3(12):1189-1207.

Thanos S. Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neurosci Lett* 1991b; 127(1):108-112.

Thanos S, Pavlidis C, Mey J, Thiel HJ. Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 1992; 55(1):101-117.

Van Wauwe J, Haefner B. Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention. *Drug News Perspect* 2003; 16(9):557-565.

Vicente Tejedor, J. Mecanismos neurales de adaptación a la luz y oscuridad. Estudio comparativo en ratones controles y modelos de degeneración retiniana. [Tesis doctoral]. Madrid (España): Universidad de Alcalá de Henares; 2009.271p.

Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, de Imperial JM, Villegas-Perez MP. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol* 2001a; 45 Suppl 3:S261-267

Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor-Torroglosa S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Perez MP. Brimonidine's neuroprotective effects against transient ischaemia-induced retinal ganglion cell death. *Eur J Ophthalmol* 2001b; 11 Suppl 2:S36-40.

Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 1988; 8(1):265-280.

Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 1993; 24(1):23-36.

Viswanathan S, Frishman LJ, Robson JG, Walters JW. The photopic negative response of the flash electroretinogram in primary open angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(2):514-522.

Wässle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 1991; 71(2):447-480.

Wässle H. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5(10):747-757.

West RW, Dowling JE. Anatomical evidence for cone and rod-like receptors in the gray squirrel, ground squirrel, and prairie dog retinas. *J Comp Neurol* 1975; 159(4):439-460.

BIBLIOGRAFÍA

Weymouth AE, Vingrys AJ. Rodent electroretinography: methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27(1):1-44.

Wheeler LA, Lai R, Woldemussie E. From the lab to the clinic: activation of an alpha-2 agonist pathway is neuroprotective in models of retinal and optic nerve injury. *Eur J Ophthalmol* 1999; 9 Suppl 1:S17-21.

Wheeler LA, Woldemussie E. Alpha-2 adrenergic receptor agonists are neuroprotective in experimental models of glaucoma. *Eur J Ophthalmol* 2001; 11 Suppl 2:S30-35.

Williams RW, Strom RC, Rice DS, Goldowitz D. Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J Neurosci* 1996; 16(22):7193-7205.

WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(12):2849-2855.

Woo SJ, Kim JH, Yu HG. Ursodeoxycholic acid and tauroursodeoxycholic acid suppress choroidal neovascularization in a laser-treated rat model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26(3):223-229.

Yang XL. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol* 2004; 73(2):127-150.

Yoles E, Wheeler LA, Schwartz M. Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(1):65-73.