



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE MEDICINA**

**Estudio de la Respuesta Glial y de las Células Ganglionares  
intrínsecamente Fotosensibles en dos Modelos  
Animales de Degeneración Hereditaria de  
Fotorreceptores y tras Inyecciones Intravítreas.**

**D. Johnny Di Pierdomenico**

2017





University of Murcia

Laboratory of Experimental Ophthalmology

Department of Ophthalmology, Optometry, Otolaryngology and Pathology

Faculty of Medicine

Postgraduate program in Vision Science

**“STUDY OF THE GLIAL CELL RESPONSE AND THE INTRINSICALLY PHOTSENSITIVE RETINAL  
GANGLION CELLS IN TWO ANIMAL MODELS OF HEREDITARY PHOTORECEPTOR DEGENERATION  
AND AFTER INTRAVITREAL INJECTIONS”**

Dissertation submitted by

**Johnny Di Pierdomenico**

to obtain the PhD DEGREE from THE UNIVERSITY OF MURCIA with  
the “INTERNATIONAL DOCTOR” mention

This PhD Thesis has been submitted in the form of “COMPENDIUM OF  
PUBLICATIONS”

Directed by:

**M<sup>a</sup> Paz Villegas Pérez, Diego García Ayuso y Marta Agudo Barriuso**

**2017**



*Al amor de mi vida Lorena.*

*A mi familia.*

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS - ACKNOWLEDGEMENTS .....	IX
ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS .....	XI
ANEXO DE DOCUMENTOS ADMINISTRATIVOS .....	XII
HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO.....	XVII
CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS:.....	XVII
Publicaciones y comunicaciones en congresos. ....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XXIII
<b>1 RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2 SUMMARY.....</b>	<b>4</b>
<b>3 INTRODUCCIÓN. ....</b>	<b>7</b>
3.1. ANATOMÍA DEL OJO.....	7
3.1.1. <i>El ojo de la rata</i> .....	7
3.1.2. <i>Estructura de la retina de rata</i> .....	8
3.1.2.1. <i>Los fotorreceptores</i> .....	10
3.1.2.2. <i>Las células ganglionares de la retina (CGR)</i> .....	13
3.1.2.2.1 <i>Las células ganglionares de la retina melanopsinicas (CGRm)</i> .....	14
3.1.2.3. <i>Las células gliales de la retina</i> .....	17
3.1.2.3.1. <i>Células de microglia</i> .....	17
3.1.2.3.2. <i>Células de macroglía</i> .....	20
3.1.2.3.2.1 <i>Los Astrocitos</i> .....	21
3.1.2.3.2.2 <i>Las Células de Müller</i> .....	22
3.2. MODELOS DE DEGENERACIÓN HEREDITARIOS DE LOS FOTORRECEPTORES .....	23
3.2.1 <i>Las ratas P23H</i> .....	24

3.2.2	<i>Las ratas Royal College of Surgeons (RCS)</i> .....	26
3.3.	TRATAMIENTOS OFTALMOLÓGICOS: LAS INYECCIONES INTRAVÍTREAS.....	28
<b>4</b>	<b>COMPENDIO DE PUBLICACIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>GENERAL CONCLUSIONS .....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>37</b>





## AGRADECIMIENTOS - ACKNOWLEDGEMENTS

El primer apartado de esta tesis, como no podía ser de otra manera, son los agradecimientos.

En las siguientes líneas voy a intentar describir mi gratitud a todas las personas que me han acompañado en estos años, porque sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

Sin duda me gustaría empezar agradeciendo a la Profesora **María Paz Villegas**, directora de esta tesis. A ella no solo debo agradecerle la consecución de la misma, sino haberme permitido trabajar juntos, aprender y crecer como investigador. Además, he de agradecerle su gran paciencia, sus consejos y también sus críticas que me han ayudado a mejorar día a día. Gracias por todo lo que me has enseñado.

En segundo lugar, sin duda, he de agradecer al Dr **Diego Garcia**, director de esta tesis y sobre todo amigo. A él quiero agradecerle el “estar siempre ahí”, tanto para cuestiones científicas como personales, además no puedo obviar que sin su ayuda y sus rápidas y acertadas correcciones esta tesis no hubiese sido la misma.

A Dra. **Marta Agudo**, directora de esta tesis, le agradezco sinceramente sus aportaciones diarias que a nivel científico me han hecho evolucionar muchísimo y además han proporcionado valor científico a esta Tesis Doctoral. Por sus consejos, por ser una fuente inagotable de buenas ideas, por su infinita paciencia y por tener siempre la puerta abierta.

Al profesor **Manuel Vidal**, muchísimas gracias por permitirme trabajar en este magnífico grupo de investigación, y por enseñarme a trabajar con constancia y rigor científico.

Al Dr. **Marcelino Avilés**, por su disponibilidad a resolver con soltura y eficacia los problemas que han surgido durante el desarrollo de la tesis sin escatimar ni en tiempo ni en recursos.

También quiero agradecer a dos compañeros y amigos. Al Dr. **Javier Valiente** por su gran profesionalidad como científico y por los momentos inolvidables que hemos vivido en el laboratorio como las partidas de fútbol-cesto y fuera como los viajes a los congresos. A la Dra. **Caridad Galindo** por sus consejos y por hacer los momentos difíciles mucho más llevaderos.

Al Dr. **Francisco Nadal**, o mejor dicho “Fraaaannnnn..!!!!” gracias por su complicidad y amistad, las horas se pasan mucho más rápido cuando tienes un amigo cantando contigo canciones inventadas, anué después no nos acordemos de las grandes composiciones que habíamos hecho. A **Giuseppe Rovere** per le ore passate a chiaccherare tanto al telefono come tra un caffè e l'altro piene di grandi perle di saggezza e di infiniti consigli.

A los demás compañeros del Lab, la Dra. **Miriam Sanchez-Migallón**, **Fernando Lucas**, **Manuel Jiménez**, **Juan Antonio Miralles**, **Arturo Ortín** y **Manuel Salinas** quiero agradecerles su interés en todo momento por el desarrollo de esta tesis, su profesionalidad y por el día a día. En especial, me gustaría agradecer a **Manuel Jiménez** “el Infor” el desarrollo del programa d análisis de imagen que ha sido utilizado en esta tesis.

A los que por razones logísticas y profesionales hemos pasado menos tiempo juntos, pero no olvido, **Juanjo Alburquerque** y **Luis Alarcón**.

A **José Manuel Bernal Garro**, o mejor dicho “¡¡¡Don Josééééééé!!!” gracias por tu ayuda y por tu buen humor.

A **Mª Dolores Soria** por sus infinitas gestiones, su paciencia y por su gran ayuda en todos los líos de papeleos que he tenido, que no son pocos. Porque gracias a ti no sé lo que son los problemas burocráticos.

A los coautores de los artículos de fuera de nuestro Lab, cuya colaboración ha permitido desarrollar con éxito los experimentos que se plasman en las publicaciones del compendio, **Nicolás Cuenca**, **Gema Esquivá** y **Isabel Pinilla**.

Many thanks to **Thomas Langmann** for his kind welcome in his research, for the amazing scientific collaboration that began last summer and it continues today, and hopefully will continue much longer. Thanks to all the Department of Ophthalmology Experimental Immunology of the Eye University of Cologne, especially to **Rebecca Sholz** for her help in my research, **Anne Wolf**, **Katharina Dannhausen**, **Khalid Rashid** and **Isha Akhtar** who made me feel at home. I will be forever grateful to you all

También quiero agradecer a todos los miembros del servicio de Oftalmología del hospital Virgen del Castillo de Yecla por su ayuda, enseñanzas y comprensión. En especial quiero mencionar a los médicos **Arturo Gómez Subiela, Oriol Sullá y José Ramon Sala**, por su confianza y explicaciones; Y las “jefas” del servicio **Beatriz y Ana** (Anita) por su cariño y apoyo.

Quiero transmitir un agradecimiento especial a todos los trabajadores del animalario, en especial a **Yolanda Martinez, Fran Zapata y Nuria García**. No solo por “cuidarme las ratitas” sino por recibirme y tratarme con los brazos abiertos. Ha sido un placer teneros para todo.

Por último, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia, todo lo que he conseguido ha sido gracias a vosotros. A mi familia en Italia mi madre **Carolina** y mis hermanos **Alan, Michael, Nicholas, Evelyn, Christopher y Edward** y a **nonna Francisca** per essere stati sempre al mio lato a avermi appoggiato in ogni ogni momento. A la familia que tengo en España, mis suegros, **Antonio y María**, y mi cuñada **Virginia** porque me habéis dado un cariño y apoyo infinito. A mi hermano **Kevin** por su gran ayuda en los malos momentos, gracias por estar ahí.

Y para terminar, mi apoyo constante, mi luz, mi amiga y compañera, mi amor, **Lorena**. Coautora de mi felicidad.

## ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS

Esta Tesis Doctoral se presenta en la modalidad de “Tesis Doctoral como compendio de publicaciones” con acuerdo a lo expuesto en el artículo 11.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero. Además se solicita para el Doctorando la mención de “Doctor Internacional” cumpliendo con lo expuesto en el Real Decreto 1393/2007, de 29 de Octubre que regula los Programas de Doctorado.

Por consiguiente, y para cumplir los requisitos recogidos en la normativa, se adjunta en su presentación para la correspondiente autorización en la Comisión General de Doctorado:

- Una copia de cada trabajo publicado en relación a esta Tesis Doctoral incluido en el compendio.
- Informe de los codirectores de la tesis justificando el compendio de publicaciones como Tesis Doctoral.
- Informe del doctorando, avalado por los codirectores, en el que se especifica las aportaciones a los trabajos adjuntados al compendio.
- Documentación de conformidad, con el compromiso de no presentar los trabajos presentados en esta tesis como parte de otra Tesis Doctoral y la declaración de la relevancia de las aportaciones del doctorando a estos trabajos, por cada uno de los trabajos que componen esta tesis.
- Acreditación de una estancia de Investigación de tres meses en el “**experimentellen Immunologie des Auges am Zentrum für Augenheilkunde**” en la “**Uniklinik Köln**” bajo la supervisión y tutela del Profesor Thomas Langmann.
- Informes favorables de los Doctores Serge Picaud (Institut de la Vision-Paris) y António Francisco Ambrosio (University of Coimbra).

Asimismo, y cumpliendo con la normativa que regula esta modalidad de Tesis Doctoral por compendio de publicaciones y la solicitud de la mención de Doctor internacional, en esta tesis aparece:

- Un resumen global en castellano e inglés en el que se presentan como una unidad científica todos los trabajos aportados al compendio, a la vez que se documenta el objetivo general de la tesis y los objetivos específicos y las conclusiones finales de los trabajos que compilan esta Tesis Doctoral.
- Una introducción que presenta conceptos necesarios para la comprensión de los trabajos y justifica la unidad científica de la tesis.

## ANEXO DE DOCUMENTOS ADMINISTRATIVOS

En los siguientes anexos se encuentra:

1. Informe del presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión.
2. Autorización de los Directores de la Tesis Doctoral para su presentación.
3. Acreditación de estancia de tres meses en el *experimentellen Immunologie des Auges am Zentrum für Augenheilkunde en la Uniklinik Köln* bajo la supervisión y tutela del Profesor *Thomas Langmann*.
4. Informe favorable del Dr. Serge Picaud del *Institut de la Vision* de la *Universite Pierre & Marie Curie* de Paris en Francia
5. Informe Favorable de Dr. António Francisco Ambrosio del *Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences* de la *University of Coimbra* en Portugal.
6. Informe de los Directores de la Tesis Doctoral justificando su presentación en la modalidad de compendio de publicaciones.
7. Informe del Doctorando avalado por los Directores de las aportaciones a cada trabajo presentado.
8. Declaración de los coautores por cada artículo presentado.

Informe del presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión.



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Manuel Vidal Sanz, Catedrático de Universidad del Área de Oftalmología y Presidente de la Comisión Académica del Programa de Ciencias de la Visión,

**INFORMA:**

Que el Proyecto de Tesis Doctoral titulado “**Estudio de la respuesta glial y de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en dos modelos animales de degeneración hereditaria de fotorreceptores y tras inyecciones intravítreas**”, ha sido realizado por Don. **Johnny Di Pierdomenico**, bajo la inmediata dirección y supervisión de Dña. Maria Paz Villegas Pérez; D. Diego García Ayuso y Dña. Marta Agudo Barriuso, y que la Comisión Académica ha dado su conformidad para que sea presentado ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a diez de abril de dos mil diecisiete.

Fdo.: Prof. Manuel Vidal Sanz

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia  
T. 868 883961 – F. 868 883962 – [www.um.es/dp-oftalmologia/](http://www.um.es/dp-oftalmologia/)



Autorización de los Directores de la Tesis Doctoral para su presentación.



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Dña. María Paz Villegas Pérez, Catedrática de Universidad del Área de Oftalmología en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica,

D. Diego García Ayuso, Profesor Contratado Doctor del Área de Optometría en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica,

Dña. Marta Agudo Barriuso, Investigadora de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia (FFIS),

**AUTORIZAN:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA RESPUESTA GLIAL Y DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES INTRÍNECAMENTE FOTOSENSIBLES EN DOS MODELOS ANIMALES DE DEGENERACIÓN HEREDITARIA DE FOTORRECEPTORES Y TRAS INYECCIONES INTRAVITREAS", realizada por **D. Johnny Di Pierdomenico**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia con mención internacional y bajo la modalidad de compendio de publicaciones.

En Murcia, a treinta de marzo de dos mil diecisiete.

Prof. María Paz Villegas Pérez

Dr. Diego García Ayuso

Dra. Marta Agudo Barriuso

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Edificio Departamental/LAIB 5ª planta, Cra. Buenavista s/n, 30120 El Palmar, Murcia T. 868 887574 – F. 868 883962 – [www.um.es/dp-oftalmologia/](http://www.um.es/dp-oftalmologia/)

Acreditación de estancia de tres meses en el *experimentellen Immunologie des Auges am Zentrum für Augenheilkunde* en la Uniklinik Köln bajo la supervisión y tutela del Profesor Thomas Langmann.



**UNIKLINIK  
KÖLN**

Department of Ophthalmology  
University Hospital of Cologne

Experimental  
Immunology  
of the Eye

Uniklinik Köln | Zentrum für Augenheilkunde |  
Lehrstuhl für Experimentelle Immunologie des Auges

Dpto. Oftalmología  
IMIB-Arrixaca, Edificio LAIB 5ª Planta  
Carretera Buenavista s/n.  
CP:30120  
El Palmar, Murcia  
Spain

**Univ.-Prof. Dr. Thomas Langmann**  
*Professor and Chair*

Gebäude 35 (Anatomie), 3. OG  
Joseph-Stelzmann-Str. 9  
D-50931 Köln

Phone: +49 221 478-7324  
thomas.langmann@uk-koeln.de

**Secretariat:**  
Anja Volkmann  
Phone: +49 221 478-84590  
Fax: +49 221 478-84591  
anja.volkmann@uk-koeln.de

Cologne, 16<sup>th</sup> September 2016

**Letter of confirmation**

Dear Madam, dear Sir,

I hereby confirm that Mr. Johnny Di Pierdomenico has successfully completed his research stay in the Laboratory of Experimental Immunology of the Eye at the University of Cologne from 14<sup>th</sup> June to 16<sup>th</sup> September 2016.

The topic was "Anti-inflammatory drug screening in microglia cells".

It was a pleasure to host Mr. Di Pierdomenico in our department.

I wish him all the best for his future professional career.

Kind regards  
Experimentelle Immunologie des Auges  
Zentrum für Augenheilkunde  
**UNIKLINIK KÖLN**  
Gebäude 35 (Anatomie), 3. OG  
Joseph - Stelzmann - Str. 9 · 50931 Köln  
Univ.-Prof. Thomas Langmann

Kerpener Straße 62  
50937 Köln  
Telefon +49 221 478-0  
Telefax +49 221 478-4095  
[www.uk-koeln.de](http://www.uk-koeln.de)

**Universitätsklinikum Köln (AöR)**  
Vorstand: Prof. Dr. Edgar Schömig (Vorsitzender und Ärztlicher Direktor) • Dipl.-Kfm. Günter Zwilling (Kaufmännischer Direktor)  
Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas Krieg (Dekan) • Vera Lux (Pflegedirektorin) • Prof. Dr. Peer Eysel (stellv. Ärztlicher Direktor)  
Bank für Sozialwirtschaft Köln • BLZ: 370 205 00 • Konto: 815 0000 • IBAN: DE04 3702 0500 0008 1500 00 • BIC: BFSWDE33XXX  
Steuernummer: 223/5911/1092 • Ust-IdNr.: DE 215 420 431 • IK: 260 530 283  
ÖPNV: Straßenbahn Linie 9 Hst. Lindenburg, Linie 13 Hst. Gleueler Str./Gürtel • Bus Linie 146 Hst. Leibplatz



Informe favorable del Dr. Serge Picaud del *Institut de la Vision* de la *Universite Pierre & Marie Curie* de *Paris* en Francia (1/2)

Institut de la Vision



Dr Serge Picaud  
Department Chair  
Visual information processing  
Team Leader  
Retinal information  
processing, pharmacology  
and pathology

Prof. María Paz Villegas Pérez  
Departamento de Oftalmología, Optometría,  
Otorrinolaringología y Anatomía Patológica  
30120 El Palmar,  
Murcia, Spain

March 16<sup>th</sup>, 2017

**Re: Johnny DI PIERDOMENICO, Ph.D. Thesis Report**

The thesis entitled "**Study of the glial cell response and the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in two animal models of hereditary photoreceptor degeneration and after intravitreal injections**" presents the work accomplished by Johnny Di Pierdomenico, towards his Doctor of Philosophy Degree within the Programme of Vision Sciences.

The experimental work has been done primarily in the rodent visual system, in adult rats. In a first part Johnny has characterized the early events observed in inherited retinal degenerations using two different rat models, the P23H and the RCS. The second part characterizes the population of intrinsically photosensitive melanopsin expressing retinal ganglion cells (m+RGCs) in the degenerate P23H rat retina. The last part examines in adult albino rats the responses to one or several intravitreal injections of different substances currently used in clinical ophthalmology.

Johnny uses with great skill a variety of modern neurobiological techniques, which include intraocular injections, mainly intravitreal injections, immunocytochemical markers such as Brn3a, melanopsin, S- and L- opsins, GFAP and IBA-1 to identify the general population of RGCs, the population of intrinsically photosensitive RGCs, S- and L- cone populations, and macro- and microglial cells.

This work by Johnny has been published in three original publications in the following international journals: i) Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Jul; 56:4592-604. doi: 10.1167/iovs.15-16808. ii) Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Jul 1; 57:3533-44. doi: 10.1167/iovs.16-19618; and; iii) Front. Neuroanat., 06

17 rue Moreau  
75012 Paris  
France  
Phone : (33) 1 53 46 25 92  
Cell : (33) 6 31 03 04 85

**Inserm**  
Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITE  
PIERRE & MARIE CURIE  
LA SCIENCE A PARIS



Informe favorable del Dr. Serge Picaud del *Institut de la Vision* de la *Universite Pierre & Marie Curie* de Paris en Francia (2/2)

March 2017; <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00014>. In addition, during his PhD training Johnny has presented his work in several national and international meetings and congresses.

Thus, the experimental work presented in this Thesis is of an excellent quality, and thus **I do inform very favourably this work for the alumnus to obtain the Ph.D. Degree in the Program in Vision Sciences.**

**Dr Serge PICAUD**  
INSTITUT DE LA VISION  
17 RUE MOREAU  
75012 PARIS  
Tél. : 33 1 53 46 25 92

Serge Picaud

**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITE  
PIERRE & MARIE CURIE  
LA SCIENCE A PARIS



Informe Favorable de Dr. António Francisco Ambrosio del *Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences* de la *University of Coimbra* en Portugal.



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Prof. María Paz Villegas Pérez  
Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica  
Edificio Departamental Planta 5ª  
Carretera Buenavista s/n  
30120 El Palmar, Murcia, Spain  
Phone +34 868 887574 Fax. 868 883962  
e.mail: [mpville@um.es](mailto:mpville@um.es)

**Re: Johnny Di Pierdomenico**  
**Ph.D. Thesis Report**

March 16<sup>th</sup>, 2017

The thesis entitled: “**Study of the glial cell response and the intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in two animal models of hereditary photoreceptor degeneration and after intravitreal injections**” presents the work accomplished by Johnny Di Pierdomenico, towards his Doctor of Philosophy degree in the Vision Sciences Programme.

The manuscript is very scholarly organised. The abstract is concise and well written. The objectives are precise and clear and state the goals of the study. The introduction chapter is a very comprehensive review of the subject. The three papers containing this work have been published in prestigious journals. The experimental work has been performed primarily in the rodent visual system, in adult rats. The **first paper** characterizes the evolution of the population of intrinsically photosensitive, melanopsin expressing retinal ganglion cells (m+RGCs) in the P23H rat retina at different ages from birth to **24 months**. The **second paper** examines in adult albino rats the glial cell responses to one or several intravitreal injections of different pharmacologic substances: vehicle, triamcinolone or anti-VEGF substances. **The last paper** characterizes the microglial cell reaction in the early phases of the inherited retinal degenerations using two different models, the P23H rat and the RCS rat. The conclusions are derived from the work and are original observations, clear and concise. Overall it is a well done, well thought, and well written Ph.D. Thesis.

Johnny Di Pierdomenico has used various modern techniques, which include intraocular injections, mainly intravitreal injections, and immunocytochemical markers such as Brn3a, melanopsin, S- and L- opsins, GFAP and IBA-1 to identify different neuronal and non-neuronal retinal populations: the general population of RGCs, the population of intrinsically photosensitive RGCs, the S- and L- cones, and the macro- and microglial cells. He has also used the TUNEL technique and the PCNA to identify apoptosis and cellular proliferation.

Major contributions of his work are: i) The detailed study of the course of photoreceptor cell death and macro and microglial reactivity in two rat models of retinal degeneration with different etiologies: the P23H-1 (rhodopsin mutation) and RCS (pigment epithelium malfunction) rats; ii) The effects of inherited photoreceptor degeneration in the Brn3a+RGC and m+RGC populations, and in addition the phenotypic and molecular changes of these cells during the degeneration, and; iii) The micro- and macroglial responses in the retina to one or repeated intravitreal injections of different factors. All of these contributions have been published as separate original articles in prestigious international journals (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Jul; 56:4592-604. doi: 10.1167/iovs.15-16808; Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Jul 1; 57:3533-44. doi: 10.1167/iovs.16-19618; Front. Neuroanat., 06 March 2017; <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00014>).

It is my appreciation that the experimental work presented in this Thesis is in general, and from the scientific point of view of an EXCELLENT quality. **Thus, I do inform very favourably this work for the alumnus to obtain the Ph.D. Degree in the postgraduate Programme Vision Sciences.**

Prof. António F. Ambrósio  
Faculty of Medicine, University of Coimbra  
IBILI - Azinhaga de Santa Comba  
3000-548 Coimbra  
Portugal

## Informe de los Directores de la Tesis Doctoral justificando su presentación en la modalidad de



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Por este informe, se solicita a la Comisión General de Doctorado que autorice la presentación bajo la modalidad de “compendio de publicaciones” la Tesis Doctoral titulada: “Estudio de la respuesta glial y de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en dos modelos animales de degeneración hereditaria de fotorreceptores y tras inyecciones intravitreas” realizada por **Johnny Di Pierdomenico**, para la obtención del título de Doctor en el programa de doctorado de Ciencias de la Visión.

Durante el periodo de formación del Doctorando, su producción científica ha sido satisfactoria, habiendo publicado tres artículos como primer autor, en revistas con una excelente posición en el campo científico, todas ellas en el primer cuartil del Journal Citation Report (JCR), que además configuran una unidad como Tesis Doctoral.

Los artículos que se presentan son los siguientes:

- García-Ayuso D\*, **Di Pierdomenico J\***, Esquiva G, Nadal-Nicolás FM, Pinilla I, Cuenca N, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. **Inherited Photoreceptor Degeneration Causes the Death of Melanopsin-Positive Retinal Ganglion Cells and Increases Their Coexpression of Brn3a**. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015 Jul;56(8):4592-604. doi: 10.1167/iovs.15-16808. PubMed PMID: 26200499. **Impact Factor: 3.427; Rank: Ophthalmology 6/56 Q1.** (\*First joint authors).
- **Di Pierdomenico J**, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. **Different Ipsi- and Contralateral Glial Responses to Anti-VEGF and Triamcinolone Intravitreal Injections in Rats**. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016 Jul 1;57(8):3533-44. doi: 10.1167/iovs.16-19618. PubMed PMID: 27379578. **Impact Factor: 3.427; Rank: Ophthalmology 6/56 Q1.**
- **Di Pierdomenico J**, García-Ayuso D, Pinilla I, Cuenca N, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M and Villegas-Pérez MP. **Early events in retinal degeneration caused by rhodopsin mutation or pigment epithelium malfunction: differences and similarities**. Front. Neuroanat. 2017 11:14. doi: 10.3389/fnana.2017.00014. **Impact Factor: 3.260; Rank: Anatomy & Morphology 2/21 Q1.**

Por todo lo anteriormente expuesto, bajo el criterio de los codirectores de esta Tesis, queda justificada la presentación del compendio de publicaciones como Tesis Doctoral.

En Murcia a 21 de febrero de 2017

María Paz Villegas Pérez

Diego García Ayuso

Marta Agudo Barriuso

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Edificio Departamental/LAIB 5ª planta, Ctra. Buenavista s/n, 30120 El Palmar, Murcia T. 868 887574 – F. 868 883962 – www.um.es/dp-oftalmologia/

compendio de publicaciones.

Informe del Doctorando avalado por los Directores de las aportaciones a cada trabajo presentado.



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Por este informe, se solicita a la Comisión General de Doctorado que autorice la presentación bajo la modalidad de **compendio de publicaciones** de la **Tesis Doctoral** titulada “**Estudio de la respuesta glial y de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles en dos modelos animales de degeneración hereditaria de fotorreceptores y tras inyecciones intravitreas**” para la obtención del título de Doctor en el programa de doctorado de Ciencias de la Visión

Mis aportaciones, en cada uno de los tres artículos presentados que abajo se referencian y se adjuntan, han sido las de:

- Participación como autor principal en cada uno de los artículos
- Contribución a la concepción y diseño de los experimentos
- Desarrollo de los experimentos
- Análisis de resultados
- Escritura del artículo

Los artículos que se presentan son los siguientes:

García-Ayuso D\*, **Di Pierdomenico J\***, Esquivia G, Nadal-Nicolás FM, Pinilla I, Cuenca N, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. **Inherited Photoreceptor Degeneration Causes the Death of Melanopsin-Positive Retinal Ganglion Cells and Increases Their Coexpression of Brn3a**. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015 Jul;56(8):4592-604. doi: 10.1167/iovs.15-16808. PubMed PMID: 26200499. **Impact Factor:** 3.427; **Rank:** Ophthalmology 6/56 Q1. (\*First joint authors).

**Di Pierdomenico J**, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. **Different Ipsi- and Contralateral Glial Responses to Anti-VEGF and Triamcinolone Intravitreal Injections in Rats**. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016 Jul 1;57(8):3533-44. doi: 10.1167/iovs.16-19618. PubMed PMID: 27379578. **Impact Factor:** 3.427; **Rank:** Ophthalmology 6/56 Q1.

**Di Pierdomenico J**, García-Ayuso D, Pinilla I, Cuenca N, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M and Villegas-Pérez MP. **Early events in retinal degeneration caused by rhodopsin mutation or pigment epithelium malfunction: differences and similarities**. Front. Neuroanat. 2017 11:14. doi: 10.3389/fnana.2017.00014. **Impact Factor:** 3.260; **Rank:** Anatomy & Morphology 2/21 Q1.

Por todo lo anteriormente expuesto, bajo el criterio de los codirectores de esta Tesis, queda justificada la presentación del compendio de publicaciones como Tesis Doctoral.

Johnny Di Pierdomenico

María Paz Villegas Pérez

Diego García Ayuso

Marta Agudo Barriuso

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina

Edificio Departamental/LAIB 5ª planta, Ctra. Buenavista s/n, 30120 El Palmar, Murcia T. 868 887574 – F. 868 883962 – www.um.es/dp-oftalmologia/

Declaración de los coautores por cada artículo presentado (1/3).

21 de febrero de 2017

Por la presente, los abajo firmantes, coautores del artículo con la siguiente referencia bibliográfica:

García-Ayuso D\*, Di Pierdomenico J\*, Esquiva G, Nadal-Nicolás FM, Pinilla I, Cuenca N, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. **Inherited Photoreceptor Degeneration Causes the Death of Melanopsin-Positive Retinal Ganglion Cells and Increases Their Coexpression of Brn3a**. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Jul;56(8):4592-604. doi: 10.1167/iops.15-16808. PubMed PMID: 26200499. (\*First joint authors)

Declaran:

- Su conformidad con la utilización de este artículo científico como parte del compendio de publicaciones que Johnny Di Pierdomenico presentará con el propósito de formular su Tesis Doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar este artículo científico como parte de otra Tesis Doctoral.
- La participación de Johnny Di Pierdomenico como autor principal de este artículo contribuyendo a la concepción y diseño de los experimentos, al desarrollo de los mismos, al análisis de los datos y a la escritura de los artículos.



D. Diego García Ayuso



Dña. Isabel Pinilla



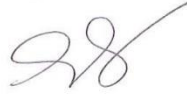
D. Nicolás Cuenca



D. Manuel Vidal Sanz



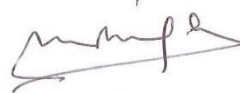
Dña. Gema Esquiva



D. Francisco Manuel Nadal Nicolás



Dña. Marta Agudo Barriuso



Dña. María Paz Villegas Pérez

Declaración de los coautores por cada artículo presentado (2/3).

21 de febrero de 2017 Febrero de 2017

Por la presente, los abajo firmantes, coautores del artículo con la siguiente referencia bibliográfica:

Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. **Different Ipsi- and Contralateral Glial. Responses to Anti-VEGF and Triamcinolone Intravitreal Injections in Rats.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Jul 1;57(8):3533-44. doi: 10.1167/iovs.16-19618. PubMed PMID: 27379578.

Declaran:

- Su conformidad con la utilización de este artículo científico como parte del compendio de publicaciones que Don Johnny Di Pierdomenico presentará con el propósito de formular tesis doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar este artículo científico como parte de otra tesis doctoral.
- La participación de Don Johnny Di Pierdomenico como autor principal de este artículo contribuyendo a la concepción y diseño de los experimentos, al desarrollo de los mismos, al análisis de los datos y a la escritura de los artículos.



D. Diego García Ayuso



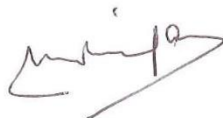
D. Manuel Jiménez López



Dña Marta Agudo Barriuso



D. Manuel Vidal Sanz



Dña María Paz Villegas Pérez

Declaración de los coautores por cada artículo presentado (3/3).

21 de febrero de 2017

Por la presente, los abajo firmantes, coautores del artículo con la siguiente referencia bibliográfica:

Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, Pinilla I, Cuenca N, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M and Villegas-Pérez MP (2017). **Early events in retinal degeneration caused by rhodopsin mutation or pigment epithelium malfunction: differences and similarities.** *Front. Neuroanat.* 11:14. doi: 10.3389/fnana.2017.00014

Declaran:

- Su conformidad con la utilización de este artículo científico como parte del compendio de publicaciones que Johnny Di Pierdomenico presentará con el propósito de formular su Tesis Doctoral como compendio de publicaciones.
- Su compromiso de no presentar este artículo científico como parte de otra Tesis Doctoral.
- La participación de Johnny Di Pierdomenico como autor principal de este artículo contribuyendo a la concepción y diseño de los experimentos, al desarrollo de los mismos, al análisis de los datos y a la escritura de los artículos.



D. Diego García Ayuso



Dña. Isabel Pinilla



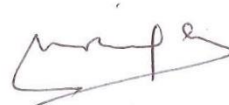
D. Nicolás Cuenca



D. Manuel Vidal Sanz



Dña. Marta Agudo Barriuso



Dña. María Paz Villegas Pérez



## HALLAZGOS ORIGINALES DE NUESTRO TRABAJO

Las siguientes son observaciones originales recogidas de nuestros estudios sobre la respuesta de las células de microglía, macroglía y ganglionares intrínsecamente fotosensibles a la luz en dos modelos animales de degeneración hereditaria de los fotorreceptores la rata P23H-1 y la rata RCS y en ratas normales tras una o varias inyecciones intravítreas.

### **Contribuciones científicas:**

Hemos desarrollado un método fiable y reproducible para la cuantificación de las células de microglía en secciones retinianas de criostato, y que nos permite establecer la capa de la retina en la que se encuentran estas células.

Hemos perfeccionado un método semiautomático de cuantificación de células de microglía por inferencia en retinas montadas a plano previamente desarrollado en nuestro laboratorio.

Hemos caracterizado el curso temporal de pérdida de fotorreceptores en las ratas P23H-1 y RCS describiendo que éste comienza antes del mes de edad y que avanza de manera progresiva.

Hemos caracterizado el curso temporal y cuantificado la migración de las células de microglía desde las capas internas hacia las externas de la retina en los dos modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores.

Hemos documentado que en las primeras fases de degeneración retiniana existe división celular en las células de microglía en los dos modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores.

Hemos descrito la relación espacio-temporal de la degeneración de los fotorreceptores y la respuesta de las células de glía retiniana en animales muy jóvenes en los dos modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores. Hemos analizado, en detalle, las similitudes y diferencias entre los dos modelos.

Hemos descrito que en las ratas P23H-1, las mRGCs se ven afectadas por la degeneración de los fotorreceptores de manera similar a la población general de CGRs. Además, hemos descrito como la expresión de Brn3a en las mRGCs aumenta de manera significativa tras la degeneración de fotorreceptores.

Hemos documentado que la degeneración del árbol dendrítico de las mRGCs es similar en las ratas P23H de la línea 1 y de la línea 3, cepa en la cual la degeneración de los fotorreceptores es más lenta.

Hemos demostrado que las inyecciones intravítreas, independientemente de la sustancia

utilizada, producen una respuesta en las células de micro y macro glía de la retina. Y que esta respuesta es mayor tras la inyección de ciertas sustancias y varias inyecciones. Hemos descrito que tras una inyección intravítrea encontramos una leve respuesta/activación de las células de microglía de los ojos contralaterales.

Hemos documentado que la inyección intravítrea del anticuerpo humanizado bevacizumab produce una gran activación de las células de microglía de la retina de rata.

#### **Publicaciones y comunicaciones en congresos.**

Durante mi estancia en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia los trabajos de investigación en los que he participado se han divulgado en las siguientes publicaciones científicas y comunicaciones a congresos.

#### **Artículos:**

Francisca Iniesta Martinez; María Elena Rodriguez Herrero; **Johnny Di Pierdomenico**; Rosa Reigadas Lopez; Natalia García Iniesta; María Dolores López Lucas; Ana Maria García Hernandez; Jose Maria Moraleda Jimenez; Ana Vanesa García Navarro; Jose Maria Marín Sanchez; María Paz Villegas Pérez.

#### **Retinosis pigmentaria.**

Terapia celular. Thea Información. I-2017 - 078, 01/2017.

**Tipo de producción:** Artículo de divulgación.      **Tipo de soporte:** Revista

**Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, Pinilla I, Cuenca N, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M and Villegas-Pérez MP. Early events in retinal degeneration caused by rhodopsin mutation or pigment epithelium malfunction: differences and similarities. Front. Neuroanat. 2017 11:14. doi: 10.3389/fnana.2017.00014.**

**Impact Factor:** 3.260; **Rank:** Anatomy & Morphology 2/21 Q1.

**Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. Different Ipsi- and Contralateral Glial Responses to Anti-VEGF and Triamcinolone Intravitreal Injections in Rats. Invest..Ophthalmol. Vis. Sci. 2016 Jul 1;57(8):3533-44. doi: 10.1167/iovs.16-19618. PubMed PMID: 27379578. **Impact Factor:** 3.427; **Rank:** Ophthalmology 6/56 Q1.**

Francisca Iniesta Martinez; María Elena Rodríguez Herrero; **Johnny Di Pierdomenico**; Rosa Reigadas Lopez; Natalia García Iniesta; María Dolores López Lucas; Ana Maria García Hernandez; Jose Maria Moraleda Jimenez; Ana Vanesa García Navarro; Jose Maria Marín Sanchez; María Paz Villegas Pérez. **Investigación con terapia celular en retinosis pigmentaria**. VISION. 2º semestre 2015 - 47, pp. 10 - 15. 09/2015.

**Tipo de producción:** Artículo de divulgación      Tipo de soporte: Revista

García-Ayuso D\*, **Di Pierdomenico J\***, Esquivia G, Nadal-Nicolás FM, Pinilla I, Cuenca N, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. Inherited **Photoreceptor Degeneration Causes the Death of Melanopsin-Positive Retinal Ganglion Cells and Increases Their Coexpression of Brn3a**. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015 Jul;56(8):4592-604. doi: 10.1167/iovs.15-16808. PubMed PMID: 26200499.

**Impact Factor:** 3.427; **Rank:** Ophthalmology 6/56 Q1.

**\*First joint authors.**

#### **Contribuciones a congresos:**

**Autores:** Johnny Di Pierdomenico; Diego García Ayuso; Marta Agudo Barriuso; Manuel Anton Vidal Sanz; Maria Paz Villegas Perez. "Glial Retinal Response to Intravitreal Injections.

**Título:** Effect of different neurotrophic factor in the retinal glial of two rats model of retinitis pigmentosa

**Tipo de conferencia:** Comunicación oral

**Nombre del congreso:** SIRCOVA 2016

**Ciudad de celebración:** Valencia, Comunidad Valenciana, España

**Fecha de celebración:** 30/06/2016

**Autores:** Johnny Di Pierdomenico -; Diego García Ayuso; Marta Agudo Barriuso; Manuel Vidal Sanz; Maria Paz Villegas Pérez.

**Título:** Glial cell activation and migration during photoreceptor death in two rat models of inherited retinal degeneration

**Tipo de conferencia:** Póster

**Nombre del congreso:** ARVO 2016

**Ciudad de celebración:** SEATTLE, Estados Unidos de América

**Fecha de celebración:** 01/05/2016

**Publicación:** Invest.Ophthalmol. Vis. Sci.. 2016; 57(12):2241

**Autores:** Diego García Ayuso; Caridad Galindo Romero; Johnny Di Pierdomenico -; Jose Manuel Bernal Garro; Marcelino Aviles Trigueros; Manuel Vidal Sanz; Marta Agudo Barriuso; Maria Paz Villegas Pérez.

**Título:** Phototoxicity causes a transient downregulation of melanopsin in the rat retina.

**Tipo de conferencia:** Póster

**Nombre del congreso:** ARVO 2016

**Ciudad de celebración:** SEATTLE, Estados Unidos de América

**Fecha de celebración:** 01/05/2016

**Publicación:** Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.. 2016; 57(12):2747.

**Autores:** Maria Paz Villegas Pérez; Johnny Di Pierdomenico -; Diego García Ayuso; Manuel Jimenez Lopez; Ana María Gomez Ramirez; Marta Agudo Barriuso; Manuel Vidal Sanz.

**Título:** Repeated intravitreal injections cause stronger microglial and macroglial reactions than single injections

**Tipo de conferencia:** Póster

**Nombre del congreso:** ARVO 2016

**Ciudad de celebración:** SEATTLE, Estados Unidos de América

**Fecha de celebración:** 01/05/2016

**Publicación:** Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.. 2016; 57(12):2676.

**Autores:** Diego García Ayuso; Johnny Di Pierdomenico -; Francisco Javier Valiente Soriano; Marta Agudo Barriuso; Maria Paz Villegas Perez.

**Título:** Afectación de las células ganglionares melanopsinicas en un modelo animal de retinosis pigmentaria.

**Nombre del congreso:** OPTOM 2016

**Tipo de conferencia:** Póster

**Ciudad de celebración:** MADRID, Comunidad de Madrid, España

**Fecha de celebración:** 08/04/2016

**Autores:** Francisco Javier Valiente Soriano; Francisco Manuel Nadal Nicolas; Diego García Ayuso; Johnny Di Pierdomenico -; Marta Agudo Barriuso; Anthony Vugler; Manuel Vidal Sanz

**Título:** Caracterización de las células ganglionares melanopsinicas en raton.Descripcion de una interneurona fotosensible.

**Nombre del congreso:** OPTOM 2016

**Tipo de conferencia:** Póster

**Ciudad de celebración:** MADRID, Comunidad de Madrid, España

**Fecha de celebración:** 08/04/2016

**Autores:** Johnny Di Pierdomenico -; Diego García Ayuso; Francisco Javier Valiente Soriano; Marta Agudo Barriuso; Manuel Vidal Sanz; María Paz Villegas Pérez.

**Título:** Efecto de las inyecciones intravítreas en las células de microglía y macroglía en la retina de rata

**Tipo de conferencia:** Póster

**Nombre del congreso:** OPTOM 2016

**Ciudad de celebración:** MADRID, Comunidad de Madrid, España

**Fecha de celebración:** 08/04/2016

**Autores:** Johnny Di Pierdomenico; Diego García Ayuso; Manuel Jimenez Lopez; Marta Agudo Barriuso; Manuel Anton Vidal Sanz; María Paz Villegas Perez.

**Título:** Glial Retinal Response to intravitreal injection

**Tipo de conferencia:** Comunicación oral

**Nombre del congreso:** SIRCOVA 2014

**Ciudad de celebración:** Valencia, Comunidad Valenciana, España

**Fecha de celebración:** 07/11/2014

**Publicación:** Ophthalmic Research. 2014 - 52, pp. 175 - 197.

**Autores:** Diego Garcia Ayuso; Johnny Di Pierdomenico; Nicolas Cuenca; Isabell Pinilla; Manuel Anton Vidal Sanz; Marta Agudo Barriuso; María Paz Villegas Perez

**Título:** Influence of Photoreceptor Degeneration in the Population of Melanopsin+ and Brn3a+RGCs

**Tipo de conferencia:** Comunicación oral

**Nombre del congreso:** SIRCOVA 2014

**Ciudad de celebración:** Valencia, Comunidad Valenciana, España

**Fecha de celebración:** 07/11/2014

**Entidad organizadora:** Society of Research in Retina and Visual Sciences (SIRCOVA)

**Publicación:** Ophthalmic Research. 2014 - 52, pp. 175 - 197.

**Autores:** Johnny Di Pierdoemnico; Diego Garcia Ayuso; Francisco Javier Valiente Soriano; Marta Agudo Barriuso; Manuel Vidal Sanz; María Paz Villegas Perez.

**Título:** Efectos de la inyección intravítrea de triamcinolona sobre la retina de la rata adulta

**Tipo de conferencia:** Póster

**Nombre del congreso:** OPTOM 2014

**Ciudad de celebración:** MADRID, Comunidad de Madrid, España

**Fecha de celebración:** 04/04/2014

**Autores:** Diego Garcia Ayuso; Manuel Salinas Navarro; Marta Agudo Barriuso; Johnny Di Pierdoemnico; Francisco Javier Valiente Soriano; Manuel Vidal Sanz; Maria Paz Villegas Perez.

**Título:** Implicaciones de la degeneración de los Fotorreceptores en la supervivencia de las células ganglionares de la retina en un modelo animal

**Tipo de conferencia:** Comunicación oral

**Nombre del congreso:** OPTOM 2014

**Ciudad de celebración:** MADRID, Comunidad de Madrid, España

**Fecha de celebración:** 04/04/2014

**Autores:** Francisco Javier Valiente Soriano; Francisco Manuel Nadal Nicolas; Diego Garcia Ayuso; Manuel Salinas Navarro; Johnny Di Pierdoemnico; Marta Agudo Barriuso; Manuel Vidal Sanz.

**Título:** Neuroprotección en un modelo e hipertensión ocular en rata

**Tipo de conferencia:** Comunicación oral

**Nombre del congreso:** OPTOM 2014

**Ciudad de celebración:** MADRID, Comunidad de Madrid, España

**Fecha de celebración:** 04/04/2014

**Autores:** Johnny Di Pierdomenico; Marcelino Avilés Triguero; Manuel Vidal Sanz

**Título:** Presence of monocyte cells as a bilateral response to unilateral optic nerve lesion

**Tipo de conferencia:** Comunicación oral

**Nombre del congreso:** Sircova 2013

**Ciudad de celebración:** Valencia, Comunidad Valenciana, España

**Fecha de celebración:** 08/06/2013

**Autores:** Francisco Javier Valiente Soriano; Manuel Jimenez Lopez; Johnny Di Pierdoemnico; Manuel Salinas Navarro; Jose Manuel Bernal Garro; Marta Agudo Barriuso; Maria Paz Villegas Perez; Manuel Vidal Sanz

**Título:** Selective loss of retinal ganglion cells in the ganglion cell layer after ocular hypertension in pigmented mice

**Tipo de conferencia:** Póster

**Nombre del congreso:** 8th FENS Forum of Neuroscience Ciudad de celebración: Barcelona, Cataluña, España **Fecha de celebración:** 14/07/2012

**Autores:** Johnny Di Pierdomenico; Ana Maria Gómez Ramírez

**Título:** Screening de la visión cromática en la consulta de Oftalmología general

**Tipo de conferencia:** Póster

**Nombre del congreso:** OPTOM 2012

**Ciudad de celebración:** Madrid, Comunidad de Madrid, España

**Fecha de celebración:** 19/02/2012

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BDNF:</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro. Brain-derived neurotrophic factor.
<b>bFGF:</b>	Factor básico del crecimiento fibroblástico. Basic fibroblast growth
<b>BSS:</b>	Balanced salt solution
<b>CCG:</b>	Capa células ganglionares
<b>CFN:</b>	Capa fibras nerviosas
<b>CGR:</b>	Células ganglionares de retina.
<b>CGRm:</b>	Células ganglionares melanopsinicas de retina
<b>CM:</b>	Células de microglia
<b>CNE:</b>	Capa nuclear externa
<b>CNI:</b>	Capa nuclear interna
<b>CNTF:</b>	Factor neurotrófico ciliar. Ciliary neurotrophic factor
<b>CPE:</b>	Capa plexiforme externa
<b>CPI:</b>	Capa plexiforme interna
<b>CPI:</b>	Capa plexiforme interna
<b>CS:</b>	Colículo superior
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidina-2-fenilindol
<b>DBA:</b>	Diluted brown non-agouti
<b>DMAE:</b>	Degeneración asociada a la edad
<b>DTMR:</b>	Dextrano tetrametil-rodamina
<b>EP:</b>	Epitelio pigmentario
<b>EPR:</b>	Epitelio pigmentario de la retina
<b>ERG:</b>	Electroretinograma
<b>FG:</b>	Fluorogold
<b>FR:</b>	Fotorreceptores
<b>GFAP:</b>	Glial fibrillary acid protein
<b>Iba1:</b>	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
<b>IIV:</b>	Inyecciones intravitreas
<b>m+RGC:</b>	Melanopsin positive
<b>MLE:</b>	Membrana limitante interna

<b>MLI:</b>	Membrana limitante interna
<b>NGF:</b>	Factor de crecimiento nervioso. Nerve growth factor
<b>P:</b>	Post-natal time
<b>PBS:</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PEDF:</b>	Factor derivado del epitelio pigmentario. Pigment epithelium-derived factor
<b>PVG:</b>	Piebald Voril Glaxo
<b>RCS:</b>	Royal College of Surgeons rats
<b>RGC:</b>	Retinal ganglion cells retinal ganglion cells
<b>RP:</b>	Retinosis pigmentaria. Retinitis pigmentosa
<b>SD:</b>	Sprague-Dawley
<b>SE:</b>	Segmento externo de los fotorreceptores
<b>SI:</b>	Segmento interno de los fotorreceptores
<b>SNC:</b>	Sistema nervioso central



## 1 RESUMEN

### Objetivos

Estudiar el curso temporal de muerte de los fotorreceptores y la respuesta de las células de macro y microglia en el inicio de la degeneración de la retina, en dos modelos animales de degeneración hereditaria de los fotorreceptores con diferentes mecanismos: la rata P23H-1 y la rata Royal College of Surgeons (RCS).

Estudiar la población de células ganglionares de la retina intrínsecamente sensibles a la luz que expresan melanopsina (mCGRs) en uno de los modelos de degeneración hereditaria de fotorreceptores: la rata P23H-1.

Investigar la respuesta de las células de macro y microglia de la retina de la rata adulta tras una o varias inyecciones intravítreas (IIV).

### Material y métodos.

Para estudiar la evolución de la degeneración de la retina se utilizaron dos modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores con paradigmas diferentes, la rata P23H-1 y la RCS, y como controles sanos la rata Sprague Dawley (SD) y la Pieval Virol Glaxo (PVG), respectivamente. Los animales fueron procesados entre los 10 y 60 días de edad y se realizaron secciones transversales en criostato de sus retinas. Las secciones fueron inmunodetectadas con anticuerpos contra; i) rodopsina para detectar los segmentos externos de los bastones, ii) Opsinas L/M y S para detectar los segmentos externos de los conos, iii) molécula ionizadora adaptadora de enlace de calcio1 (Iba1) para detectar las células de microglia, iv) proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para detectar las células de macroglia, v) antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) para detectar células en división celular, vi) isolectina B4 (IB4) para detectar las células de microglia y vasos sanguíneos. Además, se cuantificaron las filas de núcleos de los fotorreceptores en la capa nuclear externa y las células de microglia en todas las capas de la retina.

Para estudiar la población de mCGRs en las ratas P23H-1 y P23H-3 se utilizaron animales con 30, 365 y 540 días de edad y como control se utilizaron ratas SD con la misma edad. Tras diseccionar y montar a plano las retinas, éstas se inmunodetectaron con anticuerpos contra melanopsina y/o Brn3a para detectar la población de mCGR y la población general de células ganglionares de la retina (CGR), respectivamente. Finalmente, se cuantificaron dichas poblaciones y se representó gráficamente su distribución en la retina mediante el uso de mapas de isodensidad para las CGRs y mapas de vecinos para las mCGRs. Además, de estas últimas se analizó su arborización dendrítica.

Para investigar la respuesta de las células de macro y microglia tras una o varias IIV se utilizaron ratas hembra adultas SD. Estas recibieron una o tres IIV (una cada 7 días) de anticuerpo anti VEGF derata (5 µl, 0,015 µg / µl), triamcinolona (2,5 o 5 µl, 40 µg / µL, Trigón Depot), bevacizumab (5 µL y 25 µg / µL, Avastin), o sus vehículos (PBS y solución salina equilibrada (BSS)). Las retinas se analizaron 7 días después de la última inyección, se montaron a plano y se incubaron con anticuerpos contra: i) Iba1, ii) GFAP y iii) vimentina (marcador específico de las células de Müller). Las células de macro y microglia fueron analizadas

cualitativamente, además las células de microglia fueron analizadas cuantitativamente mediante un método semiautomático.

En todos los estudios las retinas fueron examinadas con un microscopio de fluorescencia. En el estudio de las IIV también se utilizó además microscopía confocal.

## Resultados.

Al analizar las retinas en los animales con degeneración retiniana, se observó que la degeneración de los fotorreceptores comenzaba antes y progresaba más rápidamente en las ratas P23H-1 que en las ratas RCS. Sin embargo, en ambos modelos de degeneración, la activación de las células de microglía ocurría simultáneamente a la muerte de los fotorreceptores; mientras que la sobreexpresión de GFAP en los astrocitos y células de Müller, comenzaba más tarde y con mayor intensidad en estas últimas. A medida que progresaba la degeneración, en contraste con los animales sanos, encontramos células microgliales en las capas nuclear externa y de los segmentos externos de los fotorreceptores. Además, el número de células microgliales aumentó en la totalidad de la retina, pero disminuyendo en la retina interna y aumentando en la retina externa. Tanto el número total de células de microglia como la migración de las mismas desde las capas internas hacia las externas fue mayor en las ratas RCS. El mayor número de células microgliales en las retinas degeneradas no se puede explicar solamente con la migración intrarretiniana y además la inmunodetección de PCNA reveló proliferación microglial en ambos modelos, aunque más importante en las ratas RCS.

Cuando se analizó la población de mRGCs y de CGRs en las ratas P23H-1 jóvenes comparadas con los animales controles se observó una disminución significativa en las CGRs que expresan Brn3a, pero no de mRGCs. Sin embargo, en las ratas P23H-1 adultas se observó una disminución del número de mRGCs y de CGRs de un 22.6% y un 28,2% a los 365 y 540 días de edad, respectivamente. Además, con el tiempo se observó una disminución en los parámetros de arborización dendrítica de las mRGCs tanto en las ratas P23H-1 como en las ratas P23H-3 (cepa en la que la degeneración de la retina es más lenta).

Al analizar la coexpresión de Brn3a y melanopsina en las ratas P23H-1 se encontró un porcentaje significativamente superior de coexpresión de ambos marcadores ya a 30 días de edad (3.31%) con respecto a los animales control (0.27%), además, este porcentaje de coexpresión aumentaba con la edad en las ratas P23H-1 (10,65% a 540 días de edad). Estos cambios celulares y de expresión se observaron solamente en los animales con degeneración hereditaria de los fotorreceptores (P23H-1), ya que en las ratas SD no se observó ningún cambio en la población general de CGR, ni en la población de mRGCs, ni en el porcentaje que mostró coexpresión (0.27%).

Finalmente, en las retinas tratadas con las IIV se encontró en la zona de la inyección y a lo largo de toda la retina una importante respuesta de las células de macro y microglia, sin importar la sustancia inyectada; y esta respuesta fue mayor en las retinas que habían recibido varias inyecciones. También se observó una leve respuesta de las células de microglia tras las IIV en las retinas contralaterales que no habían sido

inyectadas. Cuando se inyectó el anticuerpo humanizado bevacizumab, este causó una reacción/respuesta microglial tan fuerte que no se pudieron cuantificar las células de microglia.

Al analizar la respuesta de las células de macroglia a las IIV se observaron dos tipos de respuesta: hipertrofia astrocítica e hipertrofia de los pies de las células de Müller. La hipertrofia de los astrocitos se observó en toda la superficie de las retinas inyectadas, mientras que la hipertrofia de los pies de las células de Müller sólo se observó en zonas bien definidas de la retina tras las inyecciones de triamcinolona y/o tras inyecciones repetidas.

### **Conclusiones.**

En las degeneraciones hereditarias de los fotorreceptores la degeneración de la retina tiene un patrón diferente dependiendo del mecanismo etiopatogenico. En los dos modelos estudiados, la activación y migración de las células de microglia es simultánea a la muerte de los fotorreceptores, mientras que la respuesta de las células de macroglia es más tardía. La respuesta de la microglia no se puede explicar solamente en base a la muerte de los fotorreceptores ya que en los dos modelos existe una muerte severa de los fotorreceptores pero la respuesta de la microglia es mayor en las ratas RCS. Por lo tanto, en las ratas RCS la inflamación retiniana es mayor y probablemente respondería mejor a un tratamiento antiinflamatorio dirigido a la inhibición de las células de microglia.

Tras la degeneración de los fotorreceptores hay una pérdida secundaria de la población general de CGRs y de mCGRs. Las mCGRs supervivientes mostraron parámetros de arborización dendrítica disminuidos y aumento de la coexpresión de Brn3a y melanopsina. Estos cambios fenotípicos y moleculares pueden representar un esfuerzo de las mCGRs capaces de expresar Brn3a para resistir a la degeneración y / o supervivencia preferencial de las mCGRs.

Las inyecciones intravítreas causan una respuesta en las células de macro y microglia que varía dependiendo de las sustancias inyectadas y del número de inyecciones. A mayor número de inyecciones mayor respuesta. Además la respuesta inflamatoria de la glía puede influir en los efectos de las sustancias inyectadas en la retina.

## 2 SUMMARY.

### **Purpose.**

To study the temporal course of photoreceptor cell death and macro and microglial reactivity in two rat models of retinal degeneration with different etiologies: the P23H-1 and the Royal College of Surgeons (RCS) rat strains.

To study the population of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (melanopsin-expressing RGCs, m+RGCs) in a rat model of inherited photoreceptor degeneration: the P23H-1 strain.

To investigate the macro and microglial response of the normal rat retina after one or several intravitreal injections.

### **Material y methods.**

To study the evolution of degeneration in two models of inherited retinal degeneration, we have used the P23H-1 and Royal College of Surgeon rat strains, and control age-matched animals: Sprague Dawley (SD) for the P23H1 rats and Pieval Virol Glaxo (PVG) for the RCS rats. The animals were sacrificed at different postnatal ages (P) (from P10 to P60), and their retinas were cryostat cross-sectioned. Sections were immunodetected with antibodies against: i) rhodopsin to label the rod outer segment, ii) L/M and S opsin to label the cone outer segments, iii) ionized calcium-binding adapter molecule1 (Iba1) to label microglial cells, iv) glial fibrillary acid protein (GFAP) to label macroglial cells, v) proliferating cell nuclear antigen (PCNA) to label cellular proliferation, and vi) isolectin B4 (IB4) to detect microglial cells and blood vessels. The numbers of photoreceptor nuclei rows in the outer nuclear layer and of microglial cells in the different-retinal layers were quantified.

To study the population of m+RGCs in P23H-1 rats we have used 30, 365, and 540 days old animals (P30, P365 and P540). As controls, we have used age-matched SD rats. The retinas were dissected as whole-mounts and immunodetected with antibodies against melanopsin and Brn3a to detect m+RGCs and the general population of RGCs, respectively. These populations were quantified and their distribution graphically represented with isodensity maps (for RGCs) and neighbour maps (for mRGCs). In addition, some morphometric dendritic parameters of m+RGCs were analysed.

To investigate the response of macro and microglial cells after one or more intravitreal injections (IVI) we used SD rats. The left eye received one or three (one every 7 days) IVI of anti-rat VEGF (5  $\mu$ L; 0.015  $\mu$ g/ $\mu$ L), triamcinolone (2.5 or 5  $\mu$ L; 40  $\mu$ g/ $\mu$ L; Trigón® Depot), bevacizumab (5  $\mu$ L; 25  $\mu$ g/ $\mu$ L; Avastin®), or their vehicles (PBS and balanced salt solution). Seven days after the last injection retinas were dissected as whole mounts and incubated with antibodies against: i) Iba1, ii) GFAP, and iii) vimentin (to label Müller cells). Macroglial cells were qualitatively analysed, while microglial cells were quantified using a semiautomatic method.

In all studies retinas were examined with a fluorescence microscope, and some retinas that received IVI were observed with confocal microscopy.

**Results.**

In young animals with inherited retinal degeneration, photoreceptor degeneration starts earlier and progresses quicker in P23H-1 rats than in RCS rats. However, in both models, microglial cell activation occurs simultaneously with the initiation of photoreceptor death while GFAP over-expression in astrocytes and Müller cells begins later. As degeneration progresses, the total numbers of microglial cells in the retina increase and the numbers of microglial cells in the different layers increase in the outer retinal layers, but decrease in the inner retinal layers, more markedly in RCS rats. Microglial cells reach the outer nuclear and outer segment layers in both models. The higher number of microglial cells in dystrophic retinas cannot be fully accounted by intraretinal migration and PCNA immunodetection revealed microglial proliferation in both models, but more importantly in the RCS rats.

Young (P30) P23H-1 rats had significantly lower numbers of Brn3a+RGCs than P30 SD control rats, while the population of m+RGCs was similar in both strains at this age. However, in adult P23H-1 rats there was a decrease in the number of m+RGCs and RGCs of 22.6% and 28.2% at 365 and 540 days of age, respectively. In addition, a decrease in morphometric dendritic parameters of m+RGCs was observed over time in both P23H-1 and P23H-3 rats (a rat line with a slower retinal degeneration).

When analysing the co-expression of Brn3a and melanopsin in the P23H-1 rats, a significantly higher percentage of co-expression of both markers was found in m+RGCs already at P30 (3.31%) when compared to control animals (0.27%). This co-expression increased with age reaching 10.65% at P540.

Finally, in the retinas treated with IVI we found that all the injected substances caused an important micro- and macroglial response locally at the injection site and all throughout the injected retina. This response was exacerbated by repeated IVI. In the contralateral non-injected eyes there was a microglial response as well, but it was milder than in the injected eye. The IVI of the humanized antibody bevacizumab caused a very strong microglial reaction in the treated retina. Two types of macroglial response were observed: astrocyte hypertrophy and Müller end-feet hypertrophy. While astrocyte hypertrophy was widespread throughout the injected retina, Müller end-feet hypertrophy was observed only in a specific area of the retina and was more extensive with triamcinolone or after repeated injections.

## Conclusions.

In hereditary photoreceptor degenerations, the observed retinal changes vary depending on the etiopathogenic mechanism. In both models, photoreceptor death and microglial cell activation and migration occurred simultaneously, while the macroglial cell response is delayed. The activation of microglial cells in the degeneration process cannot be explained in the basis only of photoreceptor death: these cells participate more actively in the RCS model. Thus, this model is more inflammatory and would probably respond better to interventions aimed to inhibit microglial cells.

Inherited photoreceptor degeneration was followed by secondary loss of RGCs labelled with Brn3a and mRGCs. Surviving mRGCs showed decreased dendritic morphometric parameters and increased coexpression of Brn3a and melanopsin. These phenotypic and molecular changes may represent an effort of mRGCs to resist degeneration and/or preferential survival of the cells capable of synthesizing Brn3a.

Intravitreal injections cause micro- and macroglial responses that vary depending on the injected agent and the number of injections. The higher the number of injections, the greater the response. This inflammatory glial response may influence the effects of the injected substances on the retina.

### 3 INTRODUCCIÓN.

#### 3.1. Anatomía del ojo

El ojo es el órgano principal del sentido de la vista, su forma es casi esférica y está formado por tres capas concéntricas: la túnica más externa que se compone de esclera y córnea, la capa intermedia o úvea y la capa más interna o retina (Figura 1).

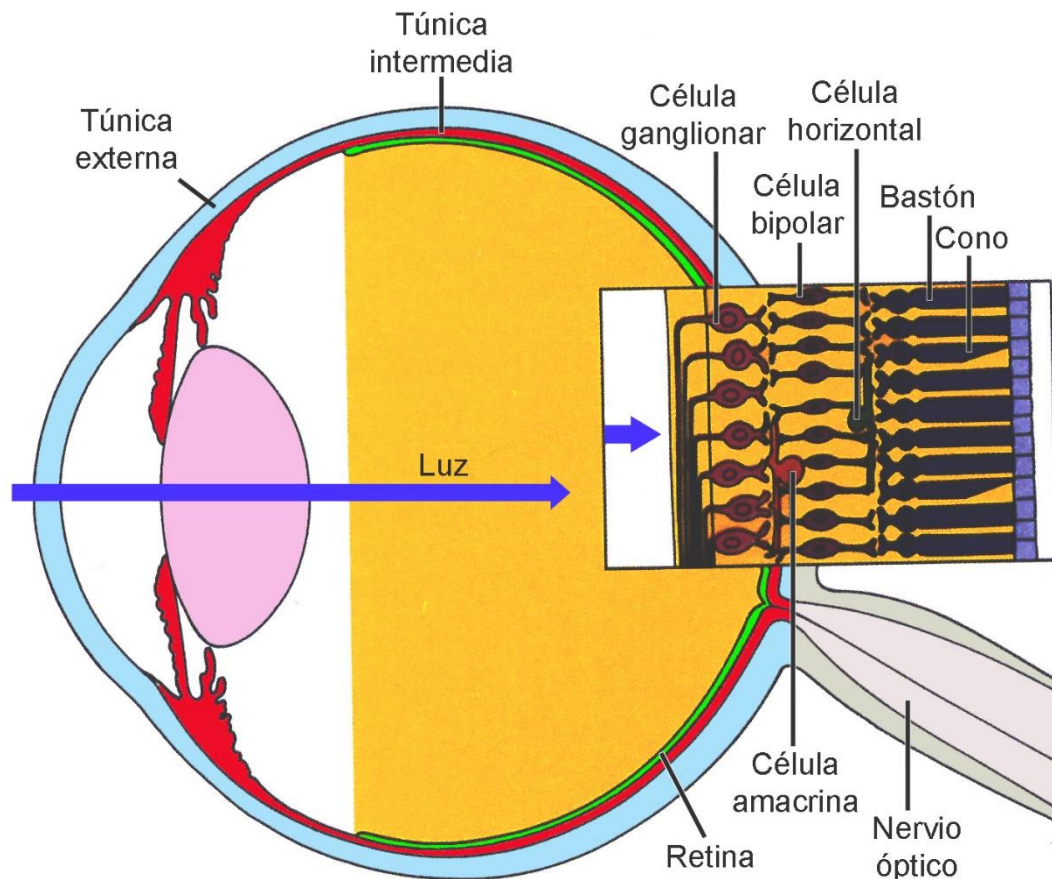
La túnica externa del ojo está formada en el polo anterior por la córnea (la primera “lente” del sistema óptico del ojo), ésta es transparente y se encarga de refractar los rayos luminosos hacia el cristalino (segunda “lente” del sistema óptico del ojo). En el resto del ojo la túnica externa está formada por la esclera; membrana opaca, gruesa, resistente y rica en fibras de colágeno; sus funciones son la de darle forma y proteger las capas más internas del ojo. La zona de transición entre la córnea y la esclera se conoce como limbo esclerocorneal.

La capa intermedia o úvea está formada en la parte posterior del globo ocular por la coroides, que tiene como principal función aportar nutrientes a la retina más externa; y en el polo anterior por el cuerpo ciliar e iris. El cuerpo ciliar está formado por el musculo ciliar y los procesos ciliares, los cuales se encargan respectivamente de abombar el cristalino para enfocar objetos cercanos y segregar humor acuoso; un líquido que rellena y nutre el segmento anterior del ojo. El iris es un disco opaco con un orificio central denominado pupila, situado entre la córnea y el cristalino; y su función es la regular la cantidad de luz que entra en el ojo y ayudar a enfocar la imagen en la retina.

La capa más interna o retina es el elemento neural del ojo. Ésta recibe el estímulo luminoso y lo transforma en impulso eléctrico para, seguidamente, enviarlo hasta los centros superiores del cerebro, donde se procesa la información luminosa.

##### 3.1.1. El ojo de la rata

La morfología del globo ocular de la rata es similar a la del resto de los mamíferos (Figura 1). En la rata, el iris es muy fino y cubre prácticamente toda la cara anterior del cristalino y la pupila es pequeña, aunque el diámetro pupilar es variable según la intensidad de la luz, ya que la rata posee reflejo fotomotor directo y consensual. El cristalino de la rata es casi esférico y tiene un gran tamaño, por lo que ocupa gran parte del segmento anterior del globo ocular. El resto del contenido ocular está ocupado por el humor acuoso y el vítreo. Algunas de las ratas que hemos utilizado como animales de experimentación para este estudio, las Sprague-Dawley (SD) y las P23H-1, son ratas albinas, por lo que no tienen pigmento en el epitelio pigmentario del iris y de la retina, lo que permite observar los vasos del iris y los vasos de la coroides a través de la retina.



**Figura 1. Globo ocular.** Esquema del globo ocular en el que están representadas las capas que lo componen: túnica externa, intermedia y retina. Modificada de Hubel (2000).

### 3.1.2. Estructura de la retina de rata

La retina de la rata es la capa sensible del ojo y es una prolongación del sistema nervioso central (SNC) dentro del globo ocular. Al ser fácilmente accesible, la retina se utiliza a menudo para realizar estudios fisiológicos y morfológicos del sistema nervioso central (Dowling, 1987). Por este motivo la organización de la retina ha sido objeto de estudio para muchos investigadores a lo largo de los últimos 150 años, Santiago Ramón y Cajal (1892) fue uno de los pioneros en este campo y la mayoría de sus descripciones anatómicas de la retina todavía continúan siendo vigentes.

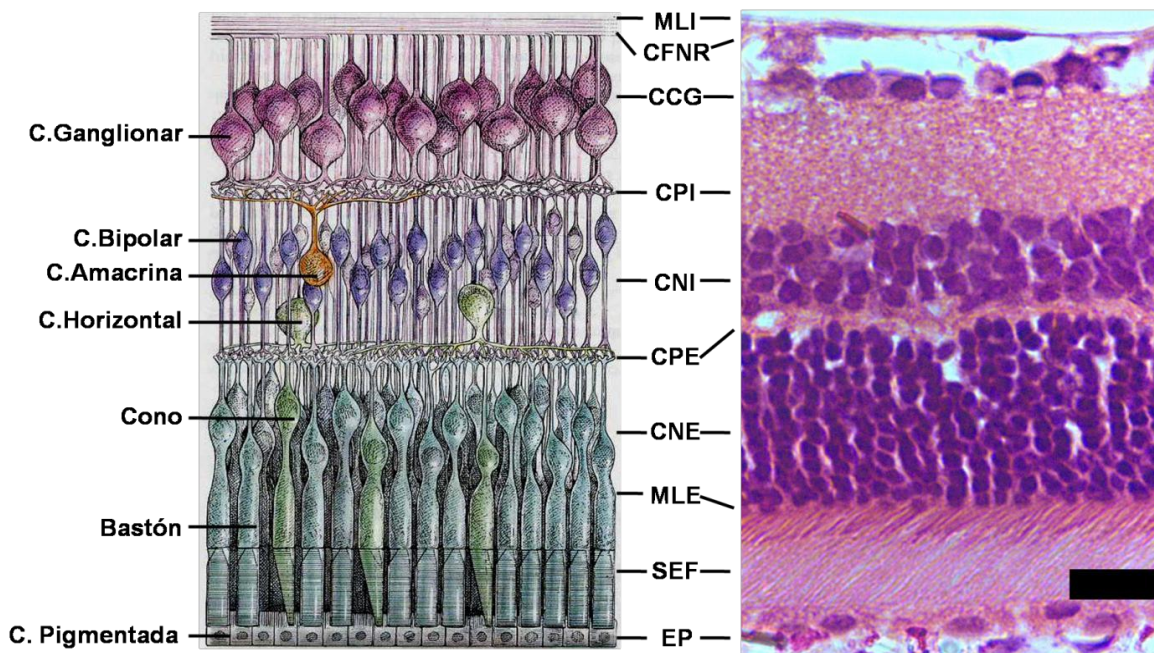
En la retina encontramos seis tipos diferentes de células neurales: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células interplexiformes, células amacrinas y células ganglionares; y además encontramos tres tipos de células no neuronales o gliales (células de Müller, astrocitos y células de microglía); estas células están organizadas en 10 capas (Figura 2), estando cada una especializada en una función distinta, pero trabajando todas en conjunto para la recepción y el proceso del estímulo visual.

Las 10 capas de la retina, desde la más interna (en contacto con el vítreo) hasta la más externa (en contacto con la coroides), son:



1. Membrana limitante interna (MLI): Es la capa que contacta con el vítreo y está formada por los procesos internos de las células de Müller.
2. Capa de fibras nerviosas (CFN): Está formada principalmente por los axones de las células ganglionares de la retina (CGR) en su trayecto hacia la papila óptica.
3. Capa de células ganglionares (CCG): Está constituida por las CGR y las células amacrinas desplazadas en esta capa.
4. Capa plexiforme interna (CPI): Está formada por los procesos de las CGR y las amacrinas y por los axones de las células bipolares.
5. Capa nuclear interna (CNI): Está formada por los núcleos de células amacrinas, bipolares, interplexiformes, de Müller y de las células horizontales.
6. Capa plexiforme externa (CPE): Está formada por los terminales axonales (pedículos y esférulas) de los fotorreceptores y los procesos de las células bipolares, horizontales e interplexiformes.
7. Capa nuclear externa (CNE): Está formada por los núcleos de los fotorreceptores.
8. Capa de los segmentos externos de los fotorreceptores (CSEFR): Está formada por el segmento externo de estas neuronas.
9. Membrana limitante externa (MLE): Formada por un entramado de uniones del tipo zónula adherens entre la región más externa de las células de Müller y entre éstas y los fotorreceptores.
10. Epitelio pigmentario de la retina (EPR): una monocapa de células epiteliales que limita externamente con la coroides. El EPR, actúa como regenerador de los pigmentos visuales y como depósito de melanina, y tiene importantes funciones como la fagocitosis del segmento externo de los fotorreceptores. En animales albinos este epitelio no contiene gránulos de melanina y, por lo tanto, como todas las capas de la retina (excepto los vasos sanguíneos) es transparente y permite ver la vascularización coroidea.

Las células de Müller, los astrocitos y las células de microglía, son tan importantes como las neuronas, aunque cumplen funciones diferentes, las cuales se explicarán más adelante.



**Figura 2. Organización laminar de la retina y sus principales tipos celulares.** Esquema de las capas de la retina y sus partes correspondientes en una sección de retina de ratona pigmentada adulta (Imagen de la izquierda modificada de Hubel, 2000).

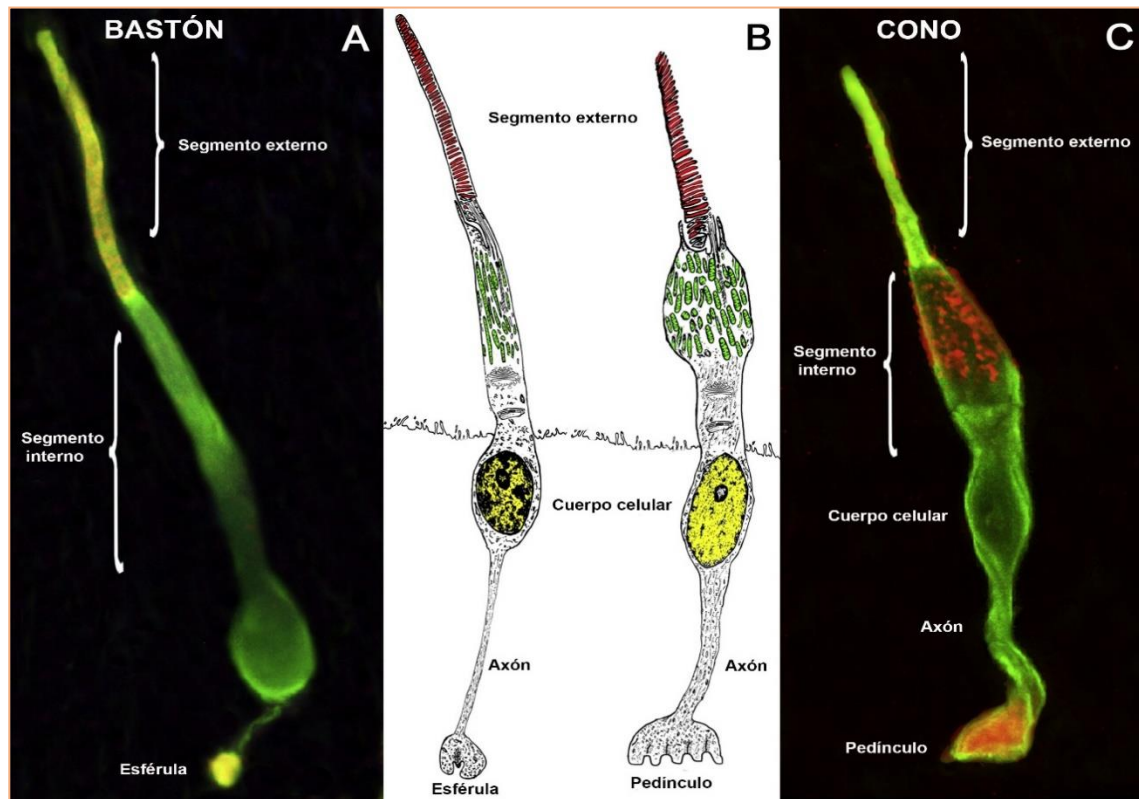
La retina necesita una gran cantidad de oxígeno y nutrientes para su perfecto funcionamiento (Palkovits y cols., 2015; Koorayala y cols., 2015; Li y cols., 2016), y por ello existe una red vascular retiniana que le aporta el oxígeno y los nutrientes necesarios. En los mamíferos la vascularización de la retina depende de la arteria central de la retina. Ésta se dirige a la retina pasando entre las fibras del nervio óptico (NO) y emergiendo a nivel de la papila óptica. A este nivel, en los roedores, la arteria central se divide normalmente en 6 ramas terminales, aunque a veces pueden ser 5 ó 7, y estas ramas se extienden radialmente hacia el ecuador. Las venas de la retina siguen un camino radial similar al de las arterias (Janes y Bounds, 1955; Morrison JC y cols., 1999; Sugiyama y cols., 1999). El número de venas es similar al de arterias y suelen alternarse. A pesar de que tanto las venas como las arterias tienen un recorrido radial se distinguen morfológicamente ya que las arterias son más estrechas y tienen un color rojo más vivo que las venas. Por otra parte, el tercio externo de la retina se sabe que recibe la nutrición de los vasos coroideos (Maruko y cols., 2017; Spaide y cols., 2017; Pandey y cols., 2017).

### 3.1.2.1. Los fotorreceptores

La percepción visual comienza cuando se activan los elementos fotosensibles de la retina, los fotorreceptores. Éstos se encargan de la fototransducción, es decir, transformar la energía luminosa en señales eléctricas mediante cambios en su potencial de membrana. Después transmiten esta información nerviosa mediante contactos sinápticos a través de las otras neuronas intermediarias (bipolares, horizontales y amacrinas) hasta las CGR y estas se encargan de llevar la información hasta los núcleos retino-recipientes del cerebro (Figura 3).

Existen tres tipos diferentes de fotorreceptores, los bastones, los conos y las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles. Los bastones son mucho más numerosos que los conos

(por ejemplo, la retina humana contiene 4-5 millones de conos y 80-110 millones de bastones) y son sensibles a bajas intensidades luminosas, interviniendo en la visión nocturna (escotópica), pero tienen menor resolución temporal que los conos. Los conos son sensibles a mayores intensidades de luz e intervienen por tanto en la visión diurna (fotópica) y cromática (Dowling, 1987).



**Figura 3. Estructura de los fotorreceptores.** Imágenes de confocal (A, C) y dibujos esquemáticos (B) de un bastón de mono (izquierda) y de un cono (derecha) que muestra las partes principales de las células fotorreceptoras. Modificada de Cuenca y colaboradores (2014).

Morfológicamente, los fotorreceptores tienen tres partes: el segmento externo (SE) (Maruko y cols., 2017), el segmento interno (SI), y el terminal sináptico. El terminal sináptico se halla en la CPE y varía entre bastones o conos. En los bastones se denomina esférula, mientras que en los conos se llama pedículo. En los bastones el terminal sináptico conecta principalmente con las bipolares de bastón y con los terminales axodentrícos de las células horizontales H1. Por su parte, en los conos sinapta predominantemente con las bipolares de cono y con los procesos dendríticos las células horizontales H1 y H2 (Dowling, 1987; Hubel, 2000; Kolb; 2003).

En el SI es donde se encuentra el núcleo y el resto de organelas celulares de los fotorreceptores. En el núcleo se encuentran un gran número de mitocondrias debido a gran cantidad de energía que necesitan los fotorreceptores para realizar el proceso de fototransducción. El SI está unido al SE por un cilio de conexión y el conjunto de núcleos de los fotorreceptores conforma la CNE.

El SE es el elemento diferencial entre los dos tipos de fotorreceptores: en el bastón su estructura es cilíndrica y alargada, mientras que en el cono es relativamente corto, cónico y afilado. Los SE están formados por apilamientos de varios cientos de discos formados por una bicapa lipídica en la que se ubican los fotopigmentos. Los fotopigmentos u opsinas son los encargados de captar el estímulo luminoso y son

distintos para bastones y para conos, los bastones expresan la rodopsina, y los conos expresan una opsina específica que variará dependiendo del tipo de cono y de la longitud de onda a la que sea sensible. En humanos, existen tres tipos de conos, que se clasifican según la longitud de onda a la que responde la opsinas que expresan y que son: opsina azul, opsina verde y opsina roja. La rodopsina responde óptimamente a longitudes de onda ( $\lambda$ ) de 500 nm. Los conos, responsables de la percepción cromática, deben abarcar todo el espectro visible (380 - 780 nm) y por ello, cada opsina es más sensible a una determinada longitud de onda. La opsina azul responde máximamente a  $\lambda$  de 450 nm y se conoce como opsina S (del inglés "short-wavelength"), la opsina verde a  $\lambda$  de 530 nm y se conoce como opsina M ("medium wavelength") y la opsina roja a  $\lambda$  de 565 nm y se conoce como opsina L ("long wavelength") (Yokoyama, 2000).

En los roedores, existen solamente dos tipos de conos: los conos S, que expresan la opsina S (Szel y cols., 1993; Bowmaker y cols., 2006) y los conos L, que expresan la opsina L-M (Jacobs y cols., 2001). Por esto, los roedores no son sensibles a longitudes de onda largas que los humanos sí somos capaces de percibir, como la luz roja.

En el laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, hemos caracterizado la expresión de opsinas en los SE de fotorreceptores en rata y ratón, y hemos documentado la existencia de conos duales, los cuales expresan ambas opsinas (S y L) (Ortín- Martínez y cols., 2010, 2014). En la retina de rata (SD), los conos L son más numerosos ( $231,736 \pm 14,517$ ) y están distribuidos por toda la retina, con una mayor densidad en la zona dorsal. Los conos S son menos numerosos ( $41,028 \pm 5,074$ ) y se localizan principalmente en la zona ventral y en la periferia de la retina. En esta especie, alrededor del 3% de los SE expresan ambas opsinas y, por tanto, son conos duales (Ortín-Martínez y cols., 2010).

Actualmente sabemos que los conos y los bastones no son las únicas células de la retina sensibles a la luz, sino que existe una tercera neurona capaz de reaccionar a estímulos luminosos: las CGR intrínsecamente fotosensibles, también denominadas melanopsínicas (CGRm). Se trata de un subtipo de CGR que responde directamente a la luz gracias a que contienen el fotopigmento melanopsina en su citoplasma (Provencio y cols., 1998). Su descripción y propiedades se tratarán en profundidad en el apartado 1.1.2.4.1 de esta tesis.

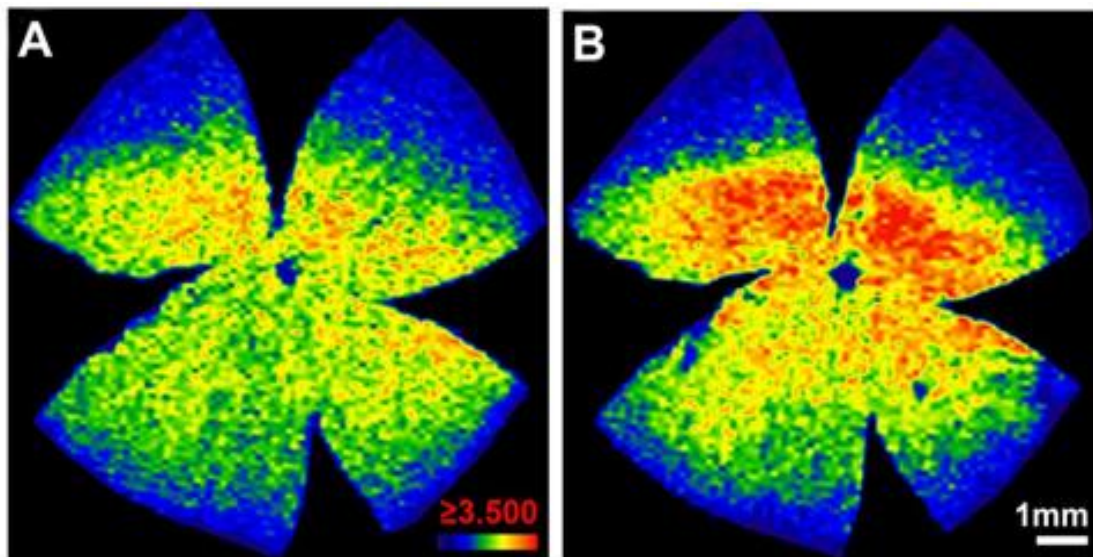
### 3.1.2.2. Las células ganglionares de la retina (CGR)

Las CGR son las únicas neuronas aferentes de la retina, se encargan de recoger la información visual procesada en la retina y de enviarla a través de sus axones al cerebro para su procesamiento. La mayoría de las CGR se encuentran en la CCG, aunque una minoría, las llamadas CGR desplazadas, se encuentran en la CNI (Dogiel, 1985; Perry, 1979; Dräger y Olsen 1981; Nadal-Nicolás y cols., 2014). La población de CGR de la rata no se distribuye por la retina homogéneamente, ya que se ha descrito una región de máxima densidad de estas neuronas en la retina superotemporal (Figura 4; Dreher y cols., 1985; Perry, 1981; Reese y Cowey 1986; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009 a; Ortín-Martínez y cols., 2010).

A la salida del globo ocular, los axones de las CGR convergen para formar el NO, por donde llegan al quiasma óptico. Aquí en los roedores más del 95% de estos se decusan conduciendo la mayor parte del proceso visual a la zona contralateral del cerebro (Lund, 1965; Perry, 1979; Dräger y Olsen, 1981; Linden y Perry, 1983; Salinas-Navarro y cols., 2009 b; Nadal-Nicolás y cols., 2012). En el ser humano, sin embargo, a nivel del quiasma solamente decusan alrededor del 50% de los axones.

Las CGR, en los roedores, proyectan principalmente a seis regiones del cerebro que son: núcleo supraquiasmático, núcleo óptico accesorio, núcleo pretectal, núcleo accesorio, núcleo geniculado dorsolateral y el colículo superior (CS) (Rodieck, 1979). No obstante, en los roedores la gran mayoría de las CGR proyectan sus axones al colículo superior (Lund, 1965; Perry, 1981; Salinas-Navarro y cols., 2009 a), por lo que el uso de trazadores neuronales retrógrados como el fluoroglod (FG) aplicados en esta estructura del cerebro permiten identificar y diferenciar las CGR de otras células situadas en la CCG: las células amacrinias desplazadas (Villegas-Pérez y cols., 1988; Salinas-Navarro y cols., 2009 a).

Un método alternativo para identificar las CGR es la inmunodetección de proteínas expresadas específicamente por estas células (Dräger y Olsen, 1981). La familia de los factores de transcripción Brn3 con dominio POU (Pit-Oct-Unc) al que pertenecen el Brn3a, Brn3b y el Brn3c, se localizan exclusivamente en el núcleo de las CGR participando en la regulación genética (Eng y cols., 2004). Se ha demostrado que los factores de transcripción de la familia Brn3 pueden ser utilizados como marcadores de las CGR. Dentro de estos, nuestro grupo ha descrito que el Brn3a se expresa específicamente en las CGR y hemos demostrado que puede ser utilizado en retinas control, después de lesión y para evaluar terapias neuroprotectoras como un marcador fidedigno y eficiente para identificar y cuantificar las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2009; García-Ayuso y cols., 2010; Sanchez-Migallón y cols., 2011, 2016; Rovere y cols. 2016). Estudios realizados en nuestro laboratorio han estimado que el número medio de CGR de la retina de rata inmunodetectadas utilizando anticuerpos contra el factor de transcripción Brn3a es de  $83.449 \pm 4.541$ , siendo este valor similar al anteriormente descrito utilizando el trazador neuronal FG (Salinas-Navarro y cols., 2009; Nadal-Nicolás y cols., 2009)



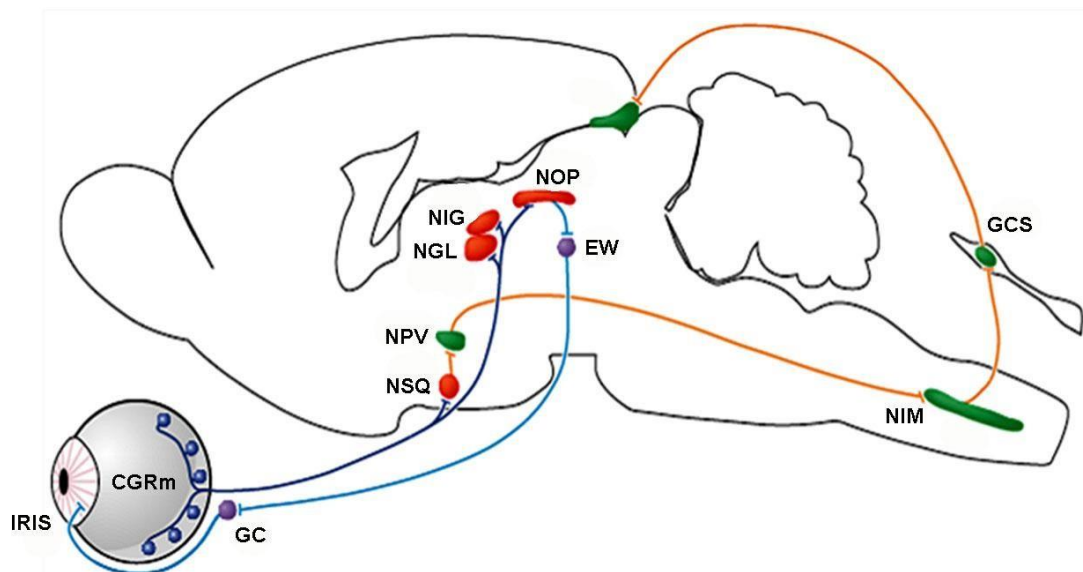
**Fig.4. Distribución de células CGR en la retina de la rata adulta.** Mapas de isodensidad de las CGR, trazadas con fluorogold (A) o inmunodetectadas con Brn3a (B) en la misma retina izquierda de una rata adulta. Se observa un área de mayor densidad de éstas células en la región superotemporal. *Modificada de Nadal-Nicolás y cols. 2009.*

### 3.1.2.2.1 Las células ganglionares de la retina melanopsínicas (CGRm)

Las CGR se pueden clasificar de acuerdo a criterios como tamaño del soma, conexiones dendríticas, estratificación y características funcionales o moleculares. Hasta ahora se han descrito 22 subtipos de CGR en la retina del roedor adulto (Coombs y cols., 2006; Volgyi y cols., 2009) y existen anticuerpos específicos que nos permiten identificar una subpoblación de CGR con una determinada funcionalidad. Por ejemplo, podemos identificar el pigmento melanopsina que se expresa en una determinada subpoblación de CGR, las melanopsínicas (CGRm).

La melanopsina, un fotopigmento homólogo a la rodopsina y la opsina de conos, fue descubierta por Provencio y colaboradores (1998) en los melanóforos dérmicos de la rana africana (*Xenopus laevis*), es responsable de la redistribución del pigmento en la piel de esas ranas en respuesta a la luz (Provencio y cols., 1998). Este mismo autor también documentó la presencia de melanopsina en una subpoblación de CGR, las CGRm en roedores y en humanos (Provencio y cols., 2000). La expresión de la melanopsina es responsable de que esta subpoblación de CGR posea la capacidad de estimularse directamente por la luz.

La sensibilidad de las CGRm a la luz es mucho menor que la de los fotorreceptores, su señal es más lenta, muestran una baja resolución espacial y son sensibles máximamente a longitudes de onda de 480 nm (Berson y cols., 2002). Por ejemplo, para regular el ciclo circadiano la intensidad luminosa debe ser mayor que para la función puramente visual (Davies y cols., 2010). En los últimos años se está documentado la participación de las CGRm en otras funciones visuales como la discriminación del brillo (Brown y cols., 2012).



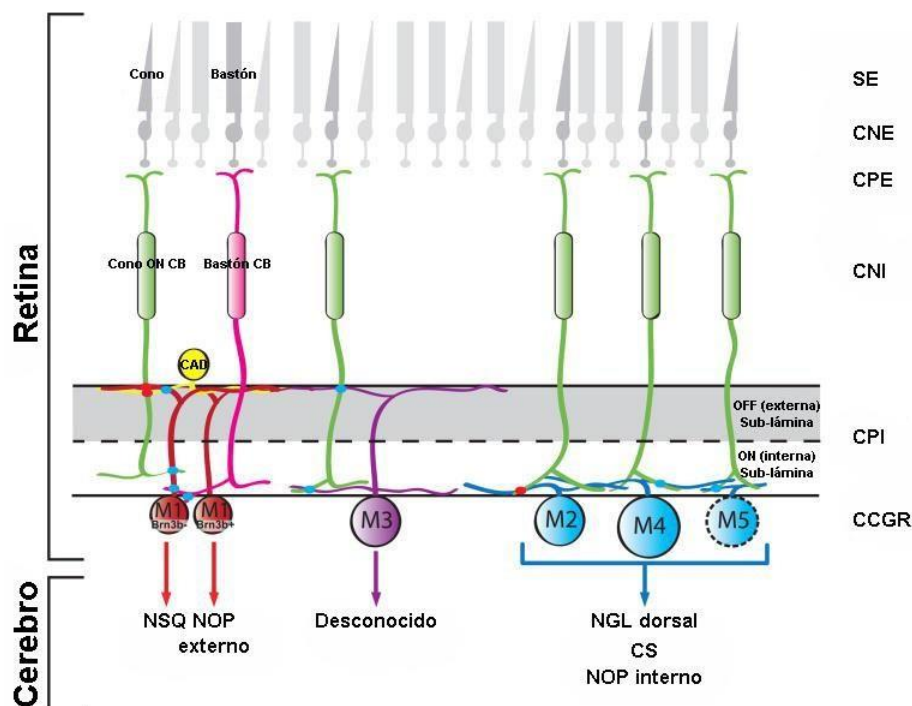
**Figura 5. Principales proyecciones neuronales de las CGRm de ratón.** Los axones de las CGRm (azul oscuro) proyectan principalmente al núcleo supraquiasmático (NSQ), encargado de la regulación de los ritmos circadianos, y una minoría a la lámina intergeniculada lateral y núcleo de la oliva pretectal (NOP), encargado del reflejo pupilar. Además, existen circuitos sinápticos (naranja) que se originan en el NSQ hacia el núcleo paraventricular, el núcleo intermediolateral, y el ganglio cervical superior. A su vez, el NOP establece conexiones con el núcleo de Edinger-Westphal que a su vez conecta con el ganglio ciliar y éste inerva el músculo del iris (azul claro) (Modificada de Berson, 2003).

Las CGRm proyectan sus axones a núcleos cerebrales diferentes de los que proyecta la población de CGR que no expresan melanopsina (Figura 5). Las CGRm envían la mayoría de sus axones a través del tracto retinohipotalámico al núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ es el núcleo encargado de la sincronización y regulación de los ritmos circadianos mediante la estimulación de la secreción de melatonina por la glándula pineal (Gooley y cols., 2001; Hannibal y cols., 2002), está formado por un conjunto de neuronas del hipotálamo medial, en su parte central, que conforman este marcapasos o reloj interno (endógeno). A este núcleo proyectan menos del 1% de los axones del total de la población de las CGR (Provencio y cols., 1998) a través del tracto retinohipotalámico, vía por la que también discurre el sistema para la formación de imágenes (Moore, 1995).

La actividad de este núcleo viene definida por factores externos, sobre todo la variación de luz que llega al ojo. Se ha demostrado que los ritmos circadianos, y por tanto el reloj interno, sufren cambios con la edad y varía de jóvenes a adultos (Biello, 2009). Además de al NSQ, estas células también proyectan a la lámina intergeniculada y al núcleo de la oliva pretectal, que es el responsable del reflejo pupilar. También se ha descrito la proyección de las CGRm a otras áreas del cerebro, como el área preóptica ventrolateral (que regula el sueño), la zona hipotalámica subparaventricular, el núcleo geniculado ventro-lateral y el CS (Hattar y cols., 2006).

Según la bibliografía, se distinguen 5 tipos de células ganglionares melanosínicas (que se denominan M1- M5) (Figura 6). Esta clasificación viene determinada por sus conexiones dendríticas en la capa CPI, el tamaño de su soma y sus proyecciones al cerebro (Berson y cols., 2010; Ecker y cols., 2010;

Schmidt y cols., 2011; Jain y cols., 2012; Karnas y cols., 2013). En la Tabla 1.1 se puede ver en detalle las características de cada uno de estos subtipos. Las CGRm más comunes son las denominadas M1, que sinaptan con la sublámina externa de la CPI y su axón proyecta al CS, y/o a NOP y/o a NSQ (Karnas y cols., 2013). Este subtipo de células melanopsínicas tienen el soma más pequeño que el resto y muestran un marcaje fuerte y claro con el anticuerpo anti-melanopsina (Karnas y cols., 2013). Las M2, son mucho menos numerosas, pero son mayores en tamaño. Tienen conexiones dendríticas en la sublámina interna de la CPI, y su marcaje es mucho más tenue que las M1. Las M3 se caracterizan por tener conexiones dendríticas tanto con la sublámina interna como con la externa de la CPI. El resto de tipos son menos numerosos y están menos caracterizados. Los subtipos M4 y M5 no expresan cantidades inmunodetectables de melanopsina de hecho fueron identificadas usando un animal transgénico ( $\tau$ -lacZ+/+), el cual es modificado para reemplazar el gen que codifica la melanopsina (*opn4*) por el *tau-lacZ*. Los autores pudieron identificar las CGRm por medio de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, enzima codificada por el gen *lacZ* del constructo introducido (Hattar y cols., 2006). En este trabajo, como hemos utilizado anticuerpos contra la melanopsina para identificar la CGRm, hemos analizado únicamente las CGRm M1- M3.



**Figura 6. Esquema de los tipos de CGRm, sus conexiones dendríticas y sus proyecciones** (Modificada de Schmidt y cols., 2011). NSQ: Núcleo supraquiasmático. NOP: Núcleo de la oliva pretecal. NGL: Núcleo geniculado lateral. CS: Colículo superior. SE: Segmentos externos de los fotorreceptores. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCGR: Capa de células ganglionares de retina.



### 3.1.2.3. Las células gliales de la retina

Las células gliales: microglia, astrocitos y oligodendrocitos, son células del tejido nervioso que se encuentran en el sistema nervioso central donde actúan realizando funciones auxiliares, complementando a las neuronas, de las cuales se diferencian por no formar contactos sinápticos (Taleisnik, 2010).

La función principal de las células gliales es de soporte de las neuronas, pero como sus membranas contienen canales iónicos y receptores capaces de percibir cambios ambientales también tienen la importante función de controlar el microambiente celular en lo que respecta a la composición iónica, los niveles de neurotransmisores, el suministro de citoquinas y otros factores de crecimiento (Jäkel y Dimou 2017; Kuthan, 1964). Además tras una lesión o insulto las células gliales se activan con el objetivo de reparar daños tisulares, normalizar niveles de nutrientes y neurotransmisores y fagocitar detritus (Thanos y cols., 1992; Ramirez y cols., 2001).

Las células gliales se pueden dividir en general en dos grupos dependiendo de su función principal: un primer grupo estaría formado por las células de microglia, cuya función principal es la fagocitosis de los desechos celulares (Thanos y cols., 1992; 1993), y el segundo grupo estaría formado por las células de macroglia (astrocitos y oligodendrocitos) cuya función principal es de sostén y nutrición de las neuronas (Ramirez y cols., 2001).

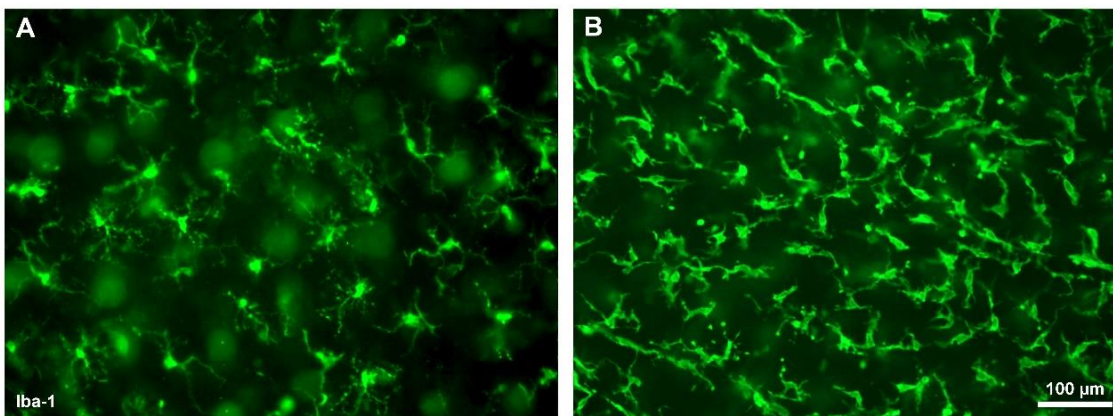
En la retina, a diferencia del resto del SNC, no encontramos oligodendrocitos sino células de Müller. Estas células forman parte del grupo de células de macroglia y solos se encuentran de la retina.

Tanto las células de Müller como el resto de células gliales presentes en la retina serán descritas con más detalle en el siguiente apartado.

#### 3.1.2.3.1. Células de microglia

Las células de microglía (CM) fueron descubiertas por del Río Hortega (1932), quien además describió su principal función: la fagocitosis de los desechos celulares.

En función de su morfología, se distinguen tres tipos de células de microglía: ameboide, ramificada o inactiva y activa (Figura 7). Las CM ameboides se caracterizan por un cuerpo celular grande de forma ovalada con pequeñas ramificaciones y poseen capacidad para migrar largas distancias, proliferar y fagocitar; las CM ramificadas (en reposo o inactivas) se caracterizan por tener un cuerpo celular pequeño y numerosas ramificaciones largas y tortuosas. Las CM activas presentan una gran variedad morfológica, pero todas ellas comparten que corresponde al paso de CM ramificada a ameboide por lo que se produce en ellas una retracción de sus procesos.



**Figura 7. Células de microglia.** Microfotografías de retinas a plano donde se muestran CM en condiciones normales (reposo) (A) o tras una lesión (activas) (B).

Durante el desarrollo embrionario las células precursoras de la microglía entran en la retina a través de dos fuentes principales: el nervio óptico y la periferia de la retina, a través de los vasos sanguíneos centrales de la retina, del cuerpo ciliar y el iris (Díaz-Araya y cols., 1995). Una vez que los precursores microgliales entran en la retina, migran paralelamente a los fascículos axonales de la CFN y se distribuyen por todo el parénquima retiniano. La mayoría de las células de microglía se encuentran en la superficie vítrea en el estado embrionario E12; mientras que en E16, ya se encuentran localizadas en las CCG, CPI y ocasionalmente, en la CNi de la retina. Éstas son CM ameboides, que tienen forma ovalada y pequeñas ramificaciones y juegan un papel muy activo fagocitando los detritus de las neuronas que mueren durante el desarrollo de la retina (Boya y cols., 1987; Pearson y cols., 1993; Payne y cols., 1993; Navascues y cols., 1995; Huang y cols., 2012; Kaur y cols., 2013).

Una vez terminado el desarrollo embrionario y cuando han alcanzado su destino final, las CM se diferencian en células maduras ramificadas en reposo y su morfología se ve modificada, pasando a mostrar numerosas ramificaciones y un cuerpo celular pequeño ocupando y vigilando cada una de ellas un territorio definido. En la retina, estas células se localizan en cuatro capas de la retina: CFNR, CCG, CPI y CPE (Ling, 1982; Terubayashi y cols., 1984; Sobrado-Calvo y cols., 2007). En la CFNR, las células de microglía son más abundantes en el centro de la retina que en la periferia, tienen una morfología bipolar y sus procesos se alargan paralelos a los axones de las CGR. En la CCG y CPI, se distribuyen por toda la retina en forma de mosaico, sin solapamiento entre células. En la CPE también hay células de microglía, pero en menor número (Terubayashi y cols., 1984; Sobrado-Calvo y cols., 2007).

La función de las CM maduras en situaciones fisiológicas es de limpieza de sustancias del espacio extracelular. En esta fase, a diferencia de la microglía durante el desarrollo, la microglía realiza sólo cortos desplazamientos de sus procesos sin translocación del cuerpo celular. Las células de microglía maduras expresan el antígeno MCH de clase II, que está involucrado en la presentación de antígenos y en el control de la respuesta inmune (Itagaki y cols., 1988; Nagamoto-Combs y cols., 2010; Sanchez-Guajardo y cols. 2010).

Tras una lesión del tejido nervioso, las CM maduras ramificadas se transforman en microglía activas de manera transitoria, adquiriendo una forma ameboide similar a la que presentaban durante el desarrollo embrionario vuelven a tener capacidad de migrar, con el fin de llegar a los territorios dañados por el insulto, y seguidamente proliferar y fagocitar los detritus celulares (revisado en Kettenmann y cols., 2011). Dependiendo de la lesión, las CM pueden presentar diferentes morfologías, pero en todas ellas se produce el paso de la forma ramificada a la ameboide y la retracción de sus procesos. Si las CM presentes en el tejido afectado son insuficientes para depurar los detritus de la lesión, se produce la incorporación al tejido de monocitos sanguíneos que se convierten en macrófagos para seguir fagocitando; y cuando el proceso de fagocitosis de detritus se acaba tanto las CM fagocíticas como los macrófagos recién llegados adquieren de nuevo la forma de las CM ramificadas en descanso (Wohl y cols., 2010).

Se ha postulado que tras una lesión las CM pueden facilitar la diferenciación, la supervivencia y la regeneración neuronal produciendo factores neurotróficos, ya se ha documentado que estas células producen factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT4/5), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). También se ha postulado que su activación puede ser lesiva, ya que también producen sustancias citotóxicas y expresan receptores y sustancias relacionadas con la presentación de antígenos y endocitosis (Sobrado-Calvo y cols., 2007).

En la retina la activación de las CM ha sido descrita en modelos experimentales de glaucoma (Gallego y cols., 2012; de Hoz y cols., 2013; Naskar y cols., 2002; Rojas y cols., 2014; Tezel y cols., 2003; Wang y cols., 2000; revisado en Johnson y Morrison, 2009), en ratones con glaucoma hereditario (Inman y Horner, 2007), tras la lesión del nervio óptico (Bodeutsch y Thanos, 2000; Garcia-Valenzuela y cols., 2005; Garcia-Valenzuela y Sharma, 1999; Panagis y cols., 2005; Sobrado-Calvo y cols., 2007) y en modelos hereditarios de degeneración de los fotorreceptores (Tahnos, 1992; Thanos y Richter, 1993; Noalles y cols., 2014).

Dado que las CM tienen funciones diferentes tanto en el desarrollo embrionario como en la vida adulta y en condiciones patológicas es muy importante el estudio de estas células en la retina. Existen diversas técnicas para marcar e identificar las CM. Las más utilizadas son:

- a) Marcaje por inmunohistofluorescencia, este actualmente es la técnica más utilizada para identificar las CM y para ello existen anticuerpos contra proteínas específicas de estas células como por ejemplo la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba1) (Naskar y cols., 2002).
- b) Trazadores fluorescentes, en este caso las CM una vez que han fagocitado los detritus de células que habían sido previamente teñidas con trazadores fluorescentes se detectan gracias a un marcaje transcelular (Thanos, 1991, 1993; Thanos y cols., 1992; Naskar y cols., 2002; Zhang y Tso, 2003).
- c) Lectinas, la más común es la isolectina B4 aunque no es un marcador específico de microglía, ya que también marca los vasos sanguíneos (revisado en Ellis-Behnke y cols., 2013);

- d) Marcaje por Histoquímica enzimática, gracias a la nucleosido difosfatasa una enzima que reconoce la actividad de la membrana celular de la microglía (Murabe y cols., 1981; Murabe and Sano, 1981).

### 3.1.2.3.2. Células de macroglía

Las células de macroglía fueron descritas por primera vez en 1859 por el patólogo Rudolf Virchow, quien las caracterizó como elementos estáticos sin una función relevante para el tejido neuronal excepto al rellenar espacios entre neuronas. Fue Santiago Ramón y Cajal en 1891 quien las diferenció de las neuronas y las identificó claramente como parte del tejido nervioso. Actualmente sabemos que las células de macroglía participan activamente en la transmisión sináptica, actuando como reguladoras de los neurotransmisores (liberando factores como ATP y sus propios neurotransmisores) (Taleisnik, 2010).

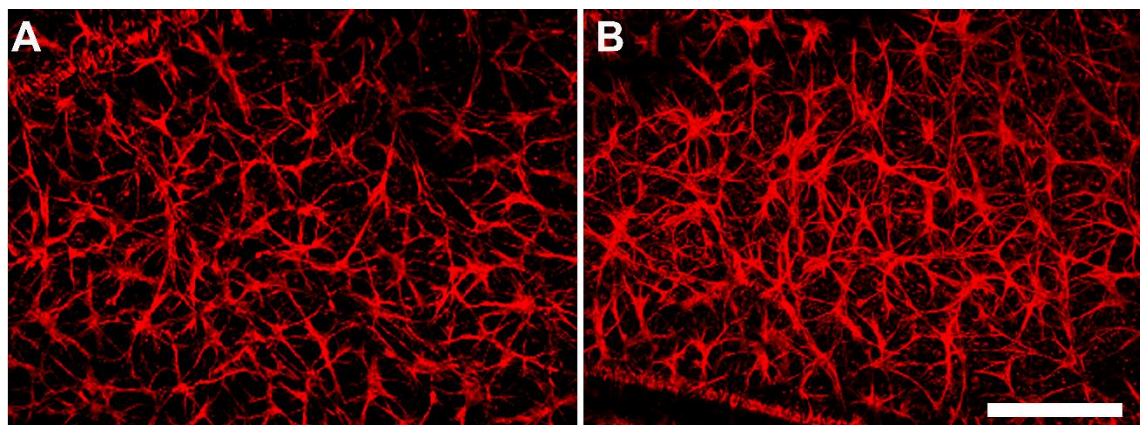
Las células de macroglía, derivan del ectodermo y son fundamentales en el desarrollo normal de la neurona, ya que se ha visto que en cultivo las neuronas no crecen en ausencia de células macrogliales (Kumar y Mallick, 2016). De hecho, las células de macroglía cumplen un rol fundamental durante el desarrollo del sistema nervioso y de la retina, ya que son el sustrato físico para la migración neuronal (Ramírez y cols., 2001).

La función más importante de estas células es el de sostén y nutrición de las neuronas (Ramírez y cols., 2001), pero a pesar de ser consideradas básicamente células de sostén del tejido nervioso, existe una dependencia funcional muy importante entre neuronas y células gliales (Kumar y Mallick, 2016) permitiendo la comunicación e integración de las redes neuronales (Murphy-Royal y cols., 2017; Paupin y cols., 2017). Otras funciones de las células macrogliales son servir de aislante en los tejidos nerviosos, conformando las vainas de mielina que protegen y aíslan los axones de las neuronas, mantener las condiciones homeostáticas y regular las funciones metabólicas del tejido nervioso (Ramírez y cols., 1996; Dossi y cols., 2017; Geraku y cols., 2017). Además, debido a que han seguido un desarrollo filogénico y ontogénico diferente a las neuronas, las células de macroglía están menos diferenciadas que estas, por lo que conservan la capacidad mitótica y son las que se encargan de la reparación y regeneración de las lesiones del sistema nervioso (Loov y cols., 2015; Davis y cols., 2015; Couturier y cols., 2016; Kanamori y cols., 2005; Tezel, 2009; Young y Elliott, 1989).

En la retina de los mamíferos encontramos dos tipos de células macrogliales: los astrocitos, que también se encuentran en otros lugares del SNC; y las células de Müller que son células gliales solo se observan en la retina.

### 3.1.2.3.2.1 Los Astrocitos

Los astrocitos tienen generalmente morfología estrellada y numerosas prolongaciones citoplasmáticas que irradian desde su cuerpo celular. Estas prolongaciones suelen ser largas, finas, rectilíneas, poco ramificadas y de superficie lisa y se entremezclan con los axones de las neuronas (Figura 9). En la retina, los astrocitos se sitúan solamente en la CFN y forman pies terminales alrededor de los capilares sanguíneos (Ramírez y cols., 1996; Triviño y cols., 1996). Su citoplasma presenta muchos fascículos de filamentos intermedios (o gliofibrillas) compuestos fundamentalmente de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la cual es usada para su identificación (Kanamori y cols., 2005; Ramírez y cols., 2010).



**Figura 9. Morfología de los astrocitos.** Microfotografías de astrocitos en montajes globales de retina inmunodelectada frente a GFAP en un animal control (A) y uno tratado con una inyección intravitrea de PBS (B). Barra 100  $\mu\text{m}$ .

Los astrocitos forman una trama tridimensional que al estar unida a los capilares proporciona un soporte estructural a los elementos neuronales, sirviendo de sostén mecánico de las neuronas (Ramírez y cols., 2001). Aunque no se ha demostrado que los pies terminales de los astrocitos realicen la transferencia de sustancias desde los vasos sanguíneos hasta las neuronas, función que se les atribuyó al principio, hoy se acepta generalmente que existe un intercambio de productos metabólicos entre las neuronas y los astrocitos (Ramírez y cols., 1996; Dossi y cols., 2017; Geraku y cols., 2017). Además, se ha postulado que impiden la difusión de los neurotransmisores fuera de la hendidura sináptica y ayuda a mantener la individualidad de los impulsos nerviosos de los diferentes circuitos neuronales. Esto es gracias a la existencia de uniones tipo "gap" entre los astrocitos, que hacen que el aumento de la concentración intraglial de  $\text{K}^+$  (cuando se produce la transmisión de un impulso nervioso en una sinapsis se produce una salida de  $\text{K}^+$  al espacio extracelular) difunda inmediatamente a las células gliales vecinas permitiendo la transmisión de dos impulsos nerviosos consecutivos sin que el periodo de latencia se alargue mucho (Murphy-Royal y cols., 2017; Paupin y cols., 2017).

Durante el desarrollo y durante los procesos de reparación y regeneración después de una lesión, en la retina los astrocitos producen moléculas de adhesión celular neuronal (N-CAM) y otros elementos de la matriz extracelular (laminina, fibronectina, etc) que son necesarios para la formación y elongación de las prolongaciones neuronales (Doucette y cols., 1984; García y cols., 2009; Del Puerto y cols., 2013). Además,

sintetizan factores neurotróficos como el NGF, BDNF, el GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía) o el bFGF (del inglés, factor básico de crecimiento de los fibroblastos) para favorecer la supervivencia de las neuronas y la diferenciación de otras células gliales (Endo, 2005; Takahashi y cols., 2006; Albrecht y cols., 2007; Zhang y cols., 2011).

Sin embargo, solamente tras una lesión los astrocitos se hipertrofian y proliferan para rellenar los espacios que estaban ocupados por el tejido lesionad., Este proceso recibe el nombre de astrogliosis reactiva y su resultado final suele ser la formación de una cicatriz glial (Loov y cols., 2015; Davis y cols., 2015; Couturier y cols., 2016). Es importante destacar que, aunque existe la barrera hemato-retiniana que hace que la retina esté aislada del sistema inmunitario, en condiciones patológicas los astrocitos pueden ejercer como fagocitos y también pueden actuar como células presentadoras de antígenos a los linfocitos (Kanamori y cols., 2005; Tezel, 2009; Young y Elliott, 1989).

### **3.1.2.3.2.2 Las Células de Müller**

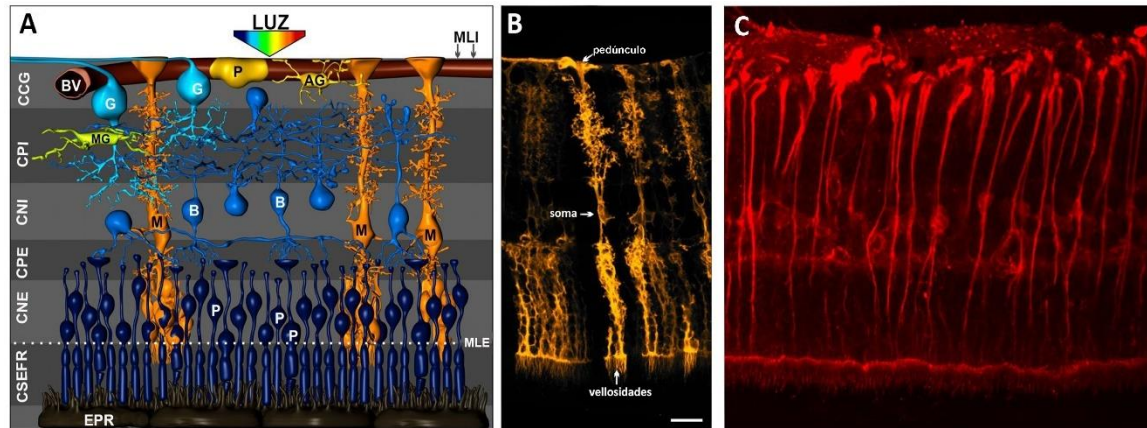
Las células de Müller fueron descubiertas por Henry Müller en 1851, y son un tipo de glia específica de la retina, que representa el 90% de su población glial (Uga y Smelser, 1973). Se disponen de forma radial ocupando todo el espesor y extensión de la retina, desde la MLE hasta la MLI (Figura 8). Gracias a esto, establecen contacto con todas las neuronas de la retina y actúan como un sistema de comunicación metabólica entre los vasos sanguíneos y las neuronas, ya que sus prolongaciones rodean los capilares sanguíneos (Reichenbach y Bringmann, 2013; Vecino y cols., 2016).

Las células de Müller participan desde el desarrollo embrionario en la formación y mantenimiento de la citoarquitectura neuroretiniana, conformando una estructura tridimensional que es el sustrato para la migración de las neuronas jóvenes durante la embriogénesis. Además, contribuyen a la formación y mantenimiento de la membrana limitante interna de la retina, que está formada principalmente por los pies de estas células.

En condiciones normales las células de Müller están involucradas en la regulación del metabolismo energético y en el mantenimiento del homeostasis retiniana eliminando los productos de desecho metabólicos (Bringmann y cols., 2006). Además, las células de Müller al conectar la superficie más interna de la retina con la más externa participan de forma activa en la transmisión de la señal lumínica a través de la retina (Reichenbach y Bringmann, 2013; Marov y cols.2017).

Las células de Müller son un importante indicador de inflamación o lesión en la retina. Estas células en condiciones normales expresan un nivel bajo de proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés "Glial fibrillary acidic protein") (Xue y cols., 2006), mientras que en respuesta a una lesión, patología o inflamación sobreexpresan esta proteína en su citoesqueleto (Xue y cols., 2006; Ramirez y cols., 2010); lo que se considera como un indicador de activación glial e indicador de que la homeostasis de la retina está comprometida. Además, las células de Müller ante determinadas condiciones patológicas son capaces de secretar diferentes factores como el factor derivado del epitelio pigmentario de la retina (PEDF; del inglés

pigment epithelium-derived factor, Eichler y cols., 2004) o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; del inglés vascular endotelial growth factor) promoviendo la supervivencia de las neuronas (Bringmann y cols., 2006).



**Figura 8. Células de Müller en la retina.** (A) Representación de las diferentes células que componen la retina de un mamífero y su localización. (B) morfología de las células de Müller en la retina de un roedor. (C) Expresión del GFAP en las células de Müller tras una lesión. Modificado de Reichenbach y Bringmann, 2010.

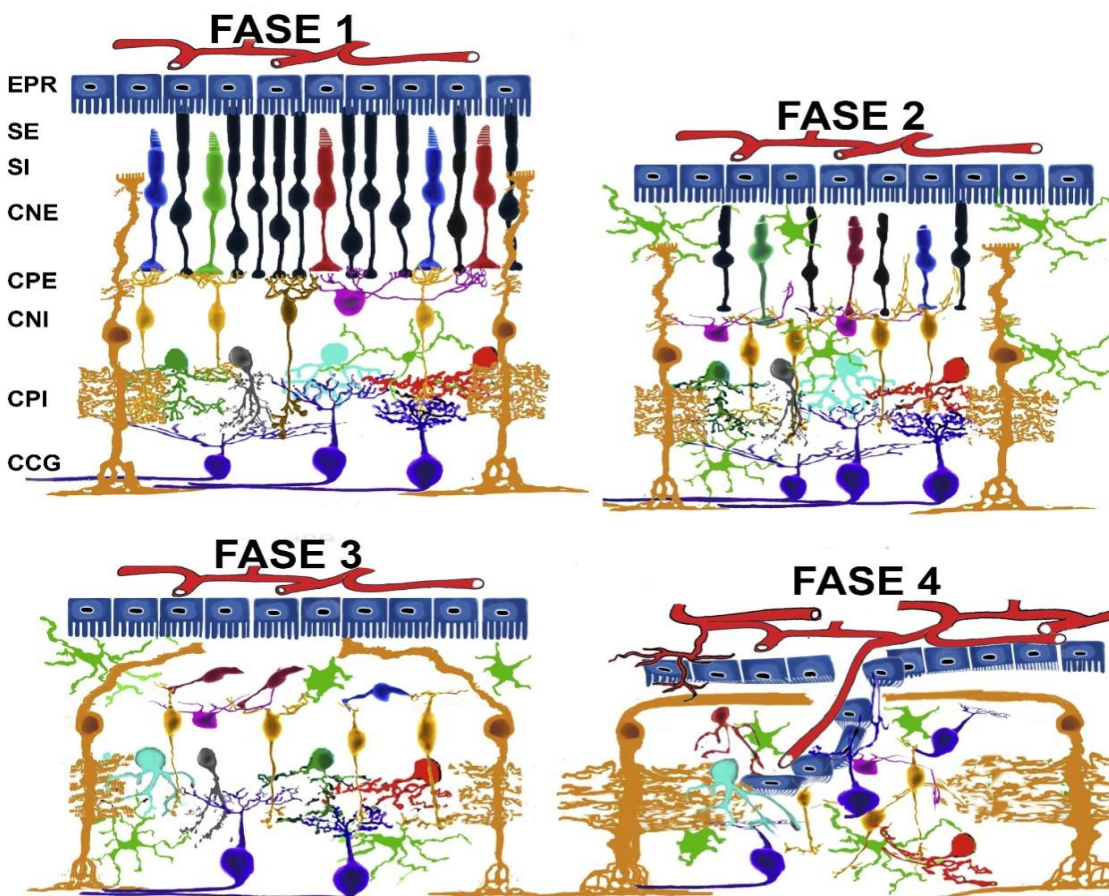
### 3.2. Modelos de degeneración hereditarios de los fotorreceptores

Muchas de las mutaciones genéticas que causan pérdida de visión afectan a una gran variedad de genes que se expresan en los fotorreceptores y las células del EPR. La degeneración resultante será distinta dependiendo de si el gen causante de la misma se expresa en los conos, los bastones o las células del EPR. Un ejemplo de degeneración hereditaria de los fotorreceptores es la retinosis pigmentaria, en esta patología las mutaciones suelen afectar a las proteínas de los bastones (ej. rodopsina) y, por ello, causa en un primer momento la muerte de estas neuronas. Otro ejemplo de degeneración hereditaria es la Amaurosis Congénita de Leber, en este caso la mutación provoca un desarrollo anómalo de los fotorreceptores, por lo que en esta enfermedad tanto la función de los conos como de los bastones está muy comprometida desde el nacimiento, y en casos extremos los fotorreceptores no llegan a desarrollarse.

Los modelos animales han sido muy útiles para el estudio de los mecanismos de estas y otras enfermedades hereditarias de los fotorreceptores retinianos. En 1924 Keeler describió por primera vez en un animal un defecto genético que producía la degeneración de los fotorreceptores retinianos: el ratón “*retinal degeneration*” (rd; Keeler, 1924; Baehr y Frederick, 2009). Desde entonces, en diferentes especies animales (ratón, rata, perro) se han descrito diferentes tipos de degeneración retiniana, producidos por mutaciones o por cambios genéticos. En algunos casos, estas mismas mutaciones han sido observadas en las enfermedades humanas, por lo que podemos decir que estos modelos animales reproducen fielmente estas enfermedades (Chader, 2002).

En esta tesis nos centraremos en dos modelos de degeneración hereditaria de los fotorreceptores: la rata P23H y la rata RCS. Ambos modelos animales sufren una degeneración de la retina muy similar a la

observada en las enfermedades humanas (Figura10).



**Figura 10. Representación gráfica de las diferentes fases de degeneración de una retina afectada por retinosis pigmentaria. Modificada de Cuenca y cols., 2014**

### 3.2.1 Las ratas P23H.

Las ratas P23H sufren una de las mutaciones más comunes asociadas a la retinosis pigmentaria: una sustitución de un aminoácido en el codón 23 de la molécula de rodopsina, en concreto una prolina por una histidina (Dryja y cols., 1990; Steinberg y cols., 1996). Esto causa un mal repliegue de la proteína rodopsina, la cual queda retenida produciendo un stress en el retículo endoplásmico de los bastones (Dryja y cols., 1990; Olsson y cols., 1992; Hartong y cols., 2006; Gorbatyuk y cols., 2010) y de consecuencia una distrofia de los fotorreceptores autosómica dominante (Chrysostomou y cols., 2009).

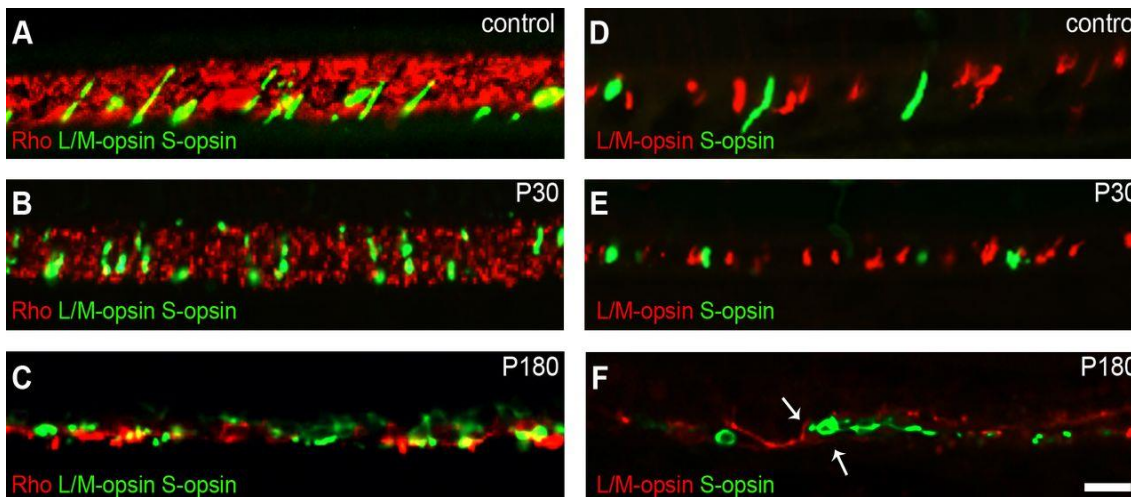
Este modelo mutante fue desarrollado con el objetivo de estudiar la neuroprotección y regeneración de los fotorreceptores retinianos (Lewin y cols., 1998; LaVail y cols., 2000). Debido a su mutación las ratas P23H sufren una pérdida progresiva de los fotorreceptores, en primer lugar, bastones y posteriormente los conos, y esta pérdida es más rápida en los animales homocigóticos que en los heterocigóticos. Existen tres líneas distintas de ratas P23H que se diferencian entre sí por la velocidad y agresividad de pérdida de los fotorreceptores (Pennesi y cols., 2008). La línea 1 (P23H-1) es la que sufre una degeneración más rápida y severa, mientras que en la línea 3 es donde los fotorreceptores degeneran más lentamente.



La degeneración de los fotorreceptores empieza ya en animales muy jóvenes. En las ratas P23H-1, entre los 21 y 28 días de edad, los segmentos externos de los bastones han perdido un 40% de su longitud, el número de núcleos en la CNE ha disminuido aproximadamente de un 45% (Machida y cols., 2000), la respuesta del electroretinograma escotópico es anormal indicando una afectación de los bastones (Machida y cols., 2000; Pinilla y cols., 2005; Chrysostomou y cols., 2009b) y se han descritos cambios evidentes en las bifurcaciones dendríticas de las células bipolares de bastón (Cuenca y cols., 2004). Sin embargo, la respuesta del electroretinograma fotópico comienza a disminuir a las 8 semanas de edad, y a este tiempo la respuesta eléctrica de los bastones está completamente alterada, lo que sugiere que debe haber una pérdida considerable de bastones antes de que se vean afectados también los conos. (Machida y cols., 2000).

Todos estos cambios progresan y empeoran con el tiempo, en las ratas P23H-1 a las 29 semanas de edad solamente obtenemos una repuesta del 20% de la amplitud de la onda b en el electroretinograma escotópico (Machida y cols., 2000; Lu y cols., 2003). Los fotorreceptores cambian su patrón de distribución y sus segmentos externos se acortan y cambian de orientación (Figura 11) (de vertical a horizontal) (Gracia-Ayuso y cols., 2013). Además de la degeneración de los fotorreceptores, con la evolución de la degeneración otros tipos de células muestran cambios tanto en la morfología como en los patrones de expresión de antígenos particulares y hay una severa alteración de la estructura y del orden de la retina. Se producen cambios sinápticos y morfológicos en la CPE, CNI y CPI (Jones y cols., 2003; Cuenca y cols., 2004), migración de las células de la CNI hacia a la CCG (Jones y cols., 2003), y nuevas conexiones sinápticas entre los conos y las células bipolares de cono y de bastón (Peng y cols., 2003).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que también las CGR se ven afectadas en las ratas P23H-1, de hecho, ya a 1 mes de edad la población de CGR es inferior a la de un animal sin degeneración (Gracia-Ayuso y cols., 2010). Pero es a los 180 días de edad cuando las CGR muestran sus primeros síntomas de degeneración, como revela una expresión anormal de proteínas del citoesqueleto, y es a año de vida cuando se encuentra una pérdida significativa de CGR. La muerte de las CGR es debida al estrangulamiento de los axones de las CGR producido por los vasos internos retinianos desplazados (Gracia-Ayuso y cols., 2010). Otros laboratorios también han documentado cambios eléctricos y Pósterior muerte de las CGR en las ratas P23H (Jones y cols., 2003; Kolomiets y cols., 2010).



**Figura 11. Degeneración de conos y bastones en la rata P23H-1.** En secciones transversales de criostato se muestran una rata SD control (A, D) y dos ratas P23H-1 procesadas a P30 (B, E) o P180 (C, F). (A-C). A medida que progresa la degeneración retiniana, se observa que primero en los bastones y seguidamente en los conos el segmento externo de los fotorreceptores se acorta y que la orientación cambia de vertical a horizontal (comparar [B, E] con [C, F]). Barra: 100  $\mu$ m. Tomada de *García-Ayuso y cols., 2013*.

La retina de las ratas P23H también sufre cambios no neuronales, principalmente debido a los detritus dejados por los fotorreceptores degenerados y por la neuroinflamación continua que sufre la retina durante todo el proceso de degeneración. Se produce una importante activación y aumento en el número de células de microglía (Noalles y cols., 2016). Además, se produce una migración de estas células desde las capas internas de la retina y de células ameboides CD11b positivas desde el espacio subretiniano a la retina externa para fagocitar y eliminar los desechos celulares dejados por los fotorreceptores (Thanos, 1992; Roque y cols., 1996; Y cols., 2014, Zhao y cols., 2015; Noalles y cols., 2016).

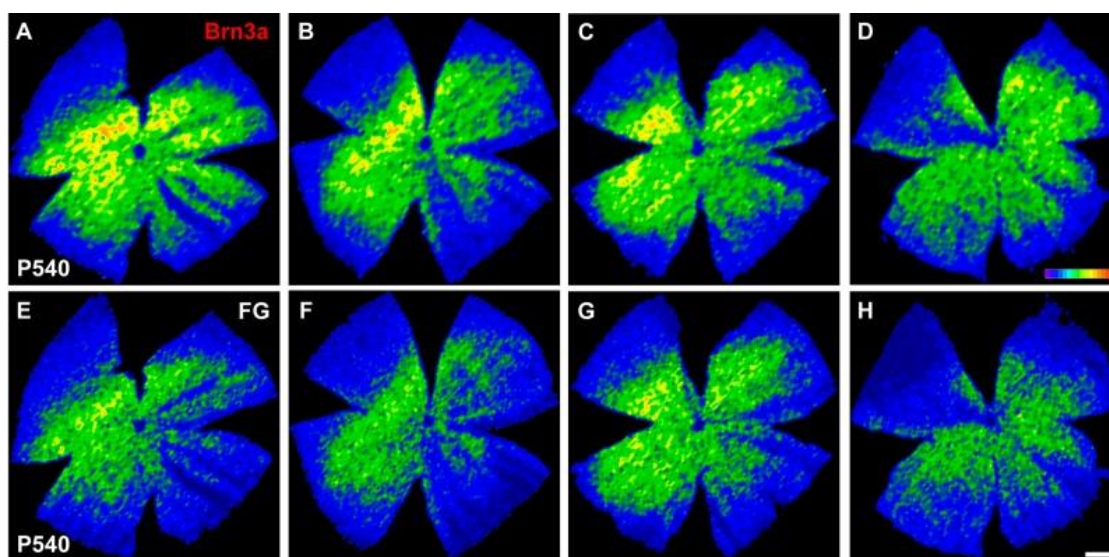
### 3.2.2 Las ratas Royal College of Surgeons (RCS).

La degeneración de la retina en las ratas RCS fue descrita por primera vez por Bourne y cols. (1938). Estos animales sufren una mutación recesiva del gen MERTK que impide la correcta fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores por parte de las células del EPR (D'Cruz y cols., 2000); como esta fagocitosis es un proceso vital para la supervivencia de los fotorreceptores, estos animales sufren una degeneración de los mismos. (Dowling y Sidman, 1962; LaVail y Battelle, 1975).

La degeneración de los fotorreceptores y de toda la retina es muy rápida en estos animales y ya en los tres primeros meses de vida, sufren una gran pérdida de fotorreceptores, tanto de conos como bastones, que sigue progresando con el tiempo hasta dejar el animal sin fotorreceptores (Dowling y Sidman, 1962; LaVail y Battelle, 1975). Adicionalmente a la pérdida de fotorreceptores, con la evolución de la degeneración se ha descrito un importante deterioro de la función visual, que incluye cambios en el electroretinograma tanto escotópico como fotópico (Bush y cols., 1995), la expansión progresiva de un escotoma relativo (Sauvé y cols., 2006), una disminución de la respuesta pupiloconstrictora (Whiteley y cols., 1998,) y pérdida

de agudeza visual (Coffey y cols., 2002).

Además de los defectos neurales, también se han descrito cambios en la vasculatura de la retina y en las células no neurales como la microglía. A nivel vascular con la evolución de la degeneración se observan un claro adelgazamiento del lecho vascular retiniano (Gerstein y Dantzer, 1969; Herron y cols., 1974; Caldwell y cols., 1989) el estrechamiento de las arterias y venas retinianas (LaVail, 1981 Caldwell y McLaughlin, 1983, Matthes y Bok, 1984; El-Hifnawi, 1992), neovascularización de la capa del epitelio pigmentario (Essner y cols, 1979; Van Driel y cols., 1988; Weber y cols., 1989; Seaton y cols., 1994) y lo más importante un desplazamiento de los vasos internos retiniano que llegan a estrangular los axones de las CGR produciendo su muerte. (Villegas Perez y cols., 1998).



**Figura 12. Muerte sectorial de CGR en las ratas RCS.** Mapas de isodensidad de retinas marcadas con Fluorogold y detectadas con Brn3a que muestran sectores sin CGR. Los valores de densidad RGC siguen un rango de escala de color (mostrado en D) va de 0 (púrpura) a 3500 o superior (rojo) CGR / mm<sup>2</sup>. Barra de escala = 1 mm. FG = Fluorogold.

La muerte de las CGR por compresión axonal se produce en estadios muy avanzados de la degeneración retiniana, y la pérdida de CGR no es uniforme en toda la retina, sino que existe una muerte sectorial de las CGR en las ratas RCS (García-Ayuso y cols., 2014) (Figura 11).

En la degeneración de la retina de las ratas RCS las células de microglía tienen un papel muy importante. Esto porque debido a la etiología de la degeneración se acumulan muchos detritus en la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores que el epitelio pigmentario no es capaz de fagocitar, y por este motivo existe una gran migración de células microgliales desde las capas internas de la retina hacia la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores para ayudar a fagocitar estos detritus (Tahnos, 1992; Thanos y Richter, 1993). Pero estas células de microglía liberan citoquinas aumentando la inflamación retiniana empeorando la degeneración de la misma (Liu y cols., 2013).

### 3.3. Tratamientos OFTALMOLÓGICOS: LAS INYECCIONES INTRAVÍTREAS

En la oftalmología clínica actual se utilizan diferentes métodos, invasivos y no invasivos, para suministrar medicamentos a los pacientes afectados por alguna patología. Los métodos no invasivos son por vía tópica o por vía oral. Por vía tópica el medicamento se aplica directamente en la superficie ocular a través de gotas o pomadas, y este es absorbido por la córnea (este método es muy útil para patologías que afectan el polo anterior del ojo). Por vía oral el paciente ingiere el medicamento y éste llega al ojo y a la retina a través del torrente sanguíneo. Sin embargo, también existen métodos invasivos como las inyecciones: intramusculares, intravenosas, subconjuntivales, subtenonianas o intravítreas que permiten a los oftalmólogos introducir el fármaco en el torrente sanguíneo o acercar el agente farmacológico al polo Pósterior del ojo.

Las inyecciones intravítreas (IIV) de sustancias farmacológicas son en la actualidad una importante estrategia terapéutica que está cambiando el pronóstico de muchas enfermedades de la retina, como la degeneración macular asociada a la edad, la retinopatía diabética, la neovascularización coroidea miópica, la uveítis Pósterior, la endoftalmitis, el edema macular, adherencias vitreoretinales, tumores intraoculares y muchos más (Peyman y cols., 2009; Fischer y cols., 2011; Williams y cols., 2015; Novack y Robin, 2015). Las IIV permiten a los oftalmólogos tratar las enfermedades del polo Pósterior directamente y al mismo tiempo minimizar o evitar completamente los efectos secundarios sistémicos de los fármacos inyectados (Bakri y cols., 2007; Peyman y cols., 2009; Fischer y cols., 2011; William y cols., 2015).

Las IIV empezaron a utilizarse desde el comienzo del siglo veinte para introducir sustancias formadoras de espacio en el espacio vítreo con el fin de volver a colocar la retina (Ohm, 2011) tras un desprendimiento de retina. Pero su seguridad fue puesta en duda durante mucho tiempo y el uso de las IIV se restringió durante muchos años debido a los riesgos asociados a las inyecciones (Jager y cols., 2004; Falavarjani y Nguyen, 2013; Moja y cols., 2014; Morrison y Khutoryankiy, 2014; VanderBeek y cols., 2015). Sin embargo, recientemente, las ventajas y los beneficios de administrar las sustancias directamente dentro del ojo han superado los riesgos asociados a las inyecciones; así que el uso de las IIV se ha generalizado, sobre todo desde la introducción en oftalmología clínica de nuevos agentes farmacológicos: los corticosteroides y sobre todo los anticuerpos en contra del factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF). Estos fármacos se usan para tratar enfermedades como el edema macular quístico, la degeneración macular neovascular relacionada con la edad (DMAE), retinopatía diabética, la neovascularización coroidea miópica, la uveítis posterior, las endoftalmitis, las adherencias vítreo-retinianas y los tumores intraoculares (Peyman y cols., 2009; Fischer y cols., 2011; William y cols., 2015; Novak y Robin, 2015; Meyer y cols., 2016);

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; del inglés vascular endotelial growth factor) es un factor trófico que aumenta la supervivencia de las células endoteliales, promueve la proliferación y migración de las células endoteliales y aumenta la permeabilidad vascular. El VEGF tiene varias isoformas y se une a dos receptores, 1 y 2, y la isoforma responsable de la neovascularización ocular parece ser VEGF<sub>165</sub> (Stewart, 2015). La terapia anti-VEGF fue diseñada para neutralizar las formas solubles de VEGF, especialmente VEGF<sub>165</sub>, y las complicaciones neovasculares de las enfermedades oculares. El primer

fármaco contra el VEGF comercializado para IIV fue el aptamero pegabtanib (Macugen®, Pfizer, Nueva York, NY, EE.UU.), un fármaco que se une a la isoforma VEGF<sub>165</sub>. Posteriormente, los anticuerpos monoclonales humanizados bevacizumab (Avastin®, Roche, Basilea, Suiza) y ranibizumab (Lucentis®, Novartis, Basilea, Suiza) y el recombinante VEGF-trap aflibercept (Eylea®, Bayer, Leverkusen, Alemania). Pronto se reconoció que estos últimos tres fármacos tienen efectos superiores, y son el pilar del tratamiento en este momento. (Chang y cols., 2006; Braithwaite y cols., 2014; Virgili y cols., 2014; Solomon y cols., 2014; Stewart, 2015; Klein y Loewenstein 2016)

La terapia anti-VEGF ha revolucionado el tratamiento de muchas enfermedades de la retina, como la DMAE, la retinopatía diabética y la obstrucción de la vena de la retina, ya que mejoran el pronóstico de la recuperación visual (Martin 2011; Braithwaite y cols., 2014; Virgili y cols., 2014; Solomon y cols., 2014;). Además, investigaciones recientes han documentado que para una mejor respuesta al tratamiento son necesarias varias IIV independientemente de la respuesta a la terapia. (Stewart, 2015; Agarwal y cols., 2015; Chin-Yee y cols., 2015; García-Layana y cols., 2015). Sin embargo, se sabe muy poco sobre la dosificación y los posibles efectos secundarios locales en la retina de la IIV repetida. (Bhisitkul y cols., 2015) De hecho, al ser bevacizumab y ranibizumab anticuerpos monoclonales humanizados puede provocar incluso en los seres humanos una reacción inflamatoria, como se ha demostrado para altas dosis de estas sustancias (Xu y cols., 2010), y con el recombinante VEGF-trap aflibercept la reacción inflamatoria puede ser incluso mayor (Souied y cols., 2016). Además, los efectos terapéuticos (28) y los efectos adversos (29-31) de la administración intravítrea de anti-VEGF o corticosteroides se han documentado también en el ojo contralateral, pero se han atribuido a la absorción sistémica del fármaco.

#### 4 COMPENDIO DE PUBLICACIONES.

Todos los artículos pueden encontrarse en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=di pierdomenico j](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=di+pierdomenico+j)

1. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 Jul;56(8):4592-604. doi: 10.1167/iovs.15-16808.

##### **Inherited Photoreceptor Degeneration Causes the Death of Melanopsin-Positive Retinal Ganglion Cells and Increases Their Coexpression of Brn3a.**

García-Ayuso D<sup>1</sup>, Di Pierdomenico J<sup>1</sup>, Esquivia G<sup>2</sup>, Nadal-Nicolás FM<sup>1</sup>, Pinilla I<sup>3</sup>, Cuenca N<sup>2</sup>, Vidal-Sanz M<sup>1</sup>, Agudo-Barriuso M<sup>1</sup>, Villegas-Pérez MP<sup>1</sup>.

##### Author information

1 Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Hospital Virgen de la Arrixaca (IMIB-Virgen de la Arrixaca) and Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, Spain.

2 Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, Alicante, Spain.

3 Servicio de Oftalmología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain.

**PURPOSE:** To study the population of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (melanopsin-expressing RGCs, m+RGCs) in P23H-1 rats, a rat model of inherited photoreceptor degeneration.

**METHODS:** At postnatal (P) times P30, P365, and P540, retinas from P23H dystrophic rats (line 1, rapid degeneration; and line 3, slow degeneration) and Sprague Dawley (SD) rats (control) were dissected as whole-mounts and immunodetected for melanopsin and/or Brn3a. The dendritic arborization of m+RGCs and the numbers of Brn3a+RGCs and m+RGCs were quantified and their retinal distribution and coexpression analyzed.

**RESULTS:** In SD rats, aging did not affect the population of Brn3a+RGCs or m+RGCs or the percentage that

showed coexpression (0.27%). Young P23H-1 rats had a significantly lower number of Brn3a+RGCs and showed a further decline with age. The population of m+RGCs in young P23H-1 rats was similar to that found in SD rats and decreased by 22.6% and 28.2% at P365 and P540, respectively, similarly to the decrease of the Brn3a+RGCs. At these ages the m+RGCs showed a decrease of their dendritic arborization parameters, which was similar in both the P23H-1 and P23H-3 lines. The percentage of coexpression of Brn3a was, however, already significantly higher at P30 (3.31%) and increased significantly with age (10.65% at P540).

**CONCLUSIONS:** Inherited photoreceptor degeneration was followed by secondary loss of Brn3a+RGCs and m+RGCs. Surviving m+RGCs showed decreased dendritic arborization parameters and increased coexpression of Brn3a and melanopsin, phenotypic and molecular changes that may represent an effort to resist degeneration and/or preferential survival of m+RGCs capable of synthesizing Brn3a.



2. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Jul 1;57(8):3533-44. doi: 10.1167/iov.16-19618.

**Different Ipsi- and Contralateral Glial Responses to Anti-VEGF and Triamcinolone Intravitreal Injections in Rats.**

Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, Jiménez-López M, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP.

Author information

Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia and Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

**PURPOSE:** To investigate the glial response of the rat retina to single or repeated intravitreal injections (IIV).

**METHODS:** Albino Sprague-Dawley rats received one or three (one every 7 days) IIV of anti-rat VEGF (5  $\mu$ L; 0.015  $\mu$ g/ $\mu$ L), triamcinolone (2.5 or 5  $\mu$ L; 40  $\mu$ g/ $\mu$ L; Trigón Depot), bevacizumab (5  $\mu$ L; 25  $\mu$ g/ $\mu$ L; Avastin), or their vehicles (PBS and balanced salt solution) and were processed 7 days after the last injection. Retinas were dissected as whole mounts and incubated with antibodies against: Iba1 (Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1) to label retinal microglia, GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) to label macroglial cells, and vimentin to label Müller cells. The retinas were examined with fluorescence and confocal microscopy, and the numbers of microglial cells in the inner retinal layers were quantified using a semiautomatic method.

**RESULTS:** All the injected substances caused an important micro- and macroglial response locally at the injection site and all throughout the injected retina that was exacerbated by repeated injections. The microglial response was also observed but was milder in the contralateral noninjected eyes. The IIV of the humanized antibody bevacizumab caused a very strong microglial reaction in the ipsilateral retina. Two types of macroglial response were observed: astrocyte hypertrophy and Müller end-foot hypertrophy. While astrocyte hypertrophy was widespread throughout the injected retina, Müller end-foot hypertrophy was localized and more extensive with triamcinolone use or after repeated injections.

**CONCLUSIONS:** Intravitreal injections cause micro- and macroglial responses that vary depending on the injected agent but increase with repeated injections. This inflammatory glial response may influence the effects of the injected substances on the retina.



3. Front. Neuroanat., 06 March 2017 | <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00014>

### Early Events in Retinal Degeneration Caused by Rhodopsin Mutation or Pigment Epithelium Malfunction: Differences and Similarities

Johnny Di Pierdomenico<sup>1</sup>, Diego García-Ayuso<sup>1</sup>, Isabel Pinilla<sup>2</sup>, Nicolás Cuenca<sup>3</sup>, Manuel Vidal-Sanz<sup>1</sup>, Marta Agudo-Barriuso<sup>1</sup>, María P. Villegas-Pérez<sup>1</sup>

#### Author information

<sup>1</sup>Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia and Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Aragon Health Sciences Institute, Lozano Blesa University Hospital, Zaragoza, Spain

<sup>3</sup>Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, Spain

To study the course of photoreceptor cell death and macro and microglial reactivity in two rat models of retinal degeneration with different etiologies. Retinas from P23H-1 (rhodopsin mutation) and Royal College of Surgeon (RCS, pigment epithelium malfunction) rats and age-matched control animals (Sprague-Dawley and Pievald Viro Glaxo, respectively) were cross-sectioned at different postnatal ages (from P10 to P60) and rhodopsin, L/M- and S-opsin, ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), glial fibrillary acid protein (GFAP), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) proteins were immunodetected. Photoreceptor nuclei rows and microglial cells in the different retinal layers were quantified. Photoreceptor degeneration starts earlier and progresses quicker in P23H-1 than in RCS rats. In both models, microglial cell activation occurs simultaneously with the initiation of photoreceptor death while GFAP over-expression starts later. As degeneration progresses, the numbers of microglial cells increase in the retina, but decreasing in the inner retina and increasing in the outer retina, more markedly in RCS rats. Interestingly, and in contrast with healthy animals, microglial cells reach the outer nuclei and outer segment layers. The higher number of microglial cells in dystrophic retinas cannot be fully accounted by intraretinal migration and PCNA immunodetection revealed microglial proliferation in both models but more importantly in RCS rats. The etiology of retinal degeneration determines the initiation and pattern of photoreceptor cell death and simultaneously there is microglial activation and migration, while the macroglial response is delayed. The actions of microglial cells in the degeneration cannot be explained only in the basis of photoreceptor death because they participate more actively in the RCS model. Thus, the retinal degeneration caused by pigment epithelium malfunction is more inflammatory and would probably respond better to interventions by inhibiting microglial cells.





## 5 CONCLUSIONES GENERALES

En base a los resultados obtenidos en los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral:

Del modelo de degeneración hereditaria de los fotorreceptores causado por una mutación en el gen de la rodopsina, las ratas P23H-1, concluimos que:

La degeneración de los segmentos externos de los conos comienza a los 21 días de edad.

La expresión de rodopsina se ve afectada a partir de los 10 días de edad.

Con la edad se observa una disminución de las poblaciones de CGRs y mCGRs, que es similar para ambas poblaciones.

Al mes de edad se observa un aumento en la coexpresión de melanopsina y Brn3a en las mCGRs que sigue aumentando con el tiempo.

Con la edad se observa una disminución de los parámetros morfométricos dendríticos de las mCGRs.

Del modelo de degeneración hereditaria de los fotorreceptores causado por una mutación del gen MERTK, las ratas RCS, concluimos que:

La degeneración de los segmentos externos de los conos comienza a los 45 días de edad.

La expresión de rodopsina no se ve afectada hasta los 60 días de edad.

De la comparación de los dos modelos de degeneración hereditaria concluimos que:

En los dos modelos se observa activación de células microgliales que ocurre de forma simultánea al inicio de la muerte de los fotorreceptores.

En los dos modelos se observa migración de las células de microglia desde las capas internas hacia las externas de la retina.

En los dos modelos se observa un aumento en el número total de células de la microglia en la retina, que es mayor en las ratas RCS.

A los 21 días de edad en las P23H-1 y a los 45 días de edad en las RCS, se observa división de las células de microglia.

A estas mismas edades, se observa sobreexpresión de GFAP en las células de Müller.

Del estudio de las retinas de los animales a los que se les había realizado una o repetidas inyecciones intravítreas, concluimos que:

Las inyecciones intravítreas causan en la retina una importante reacción de las células de la microglía que es mayor al aumentar el número de inyecciones.

Una única inyección intravítrea de PBS, BSS o anti-rat-VEGF produce una reacción de hipertrofia de los astrocitos.

Una única inyección de triamcinolona o repetidas inyecciones intravítreas de esta o de otras sustancias producen además, una hipertrofia de los pies de las células de Müller.

Las inyecciones intravítreas causan una reacción de las células de microglia en los ojos contralaterales no inyectados.

La inyección intravítrea del anticuerpo humanizado bevacizumab en rata produce una intensa activación de las células de microglía.

## 6 GENERAL CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the experiments described in this Doctoral Thesis:

From the model of hereditary photoreceptor degeneration caused by a mutation in the rhodopsin gene, the P23H-1 rat, we conclude that:

The degeneration of the outer segments of cones begins 21 days post-natally (P21).

Rhodopsin expression is affected from P10.

With age there is a decrease in the populations of RGC and m+RGCs, which is similar for both populations.

At one month of age there is an increase in the coexpression of melanopsin and Brn3a in the mCGRs that increases with time.

With age there is a decrease in the morphometric dendritic parameters of the mCGRs.

From the model of hereditary photoreceptor degeneration caused by a mutation in the MERTK gene, the RCS rat, we conclude that:

The degeneration of the cone outer segments begins at P45.

The expression of rhodopsin is not affected until P60.

From the comparison of both models of hereditary photoreceptor degeneration, we conclude that:

In both models, activation of microglial cells occurs simultaneously with the initiation of photoreceptor death.

In both models there is microglial cell migration from the inner to the outer retinal layers

In both models, there is an increase of the total numbers of retinal microglia cells, that is greater in the RCS rats.

At P21 in P23H-1 rats and at P45 in RCS rats, there is proliferation of microglial cells.

At these same ages there is overexpression of GFAP in Müller cells.

From the study of the retinas of the animals that had received one or repeated intravitreal injections, we conclude that:

Intravitreal injections cause a significant microglial reaction in the retina that increases with the number of injections.

A single intravitreal injection of PBS, BSS or anti-rat-VEGF produces astrocyte hypertrophy.

A single injection of triamcinolone or repeated intravitreal injections of triamcinolone or other substances also cause hypertrophy of the end-feet of Müller cells.

Intravitreal injections cause a microglial reaction in the contralateral non-injected retinas.

The intravitreal injection in rats of the humanized antibody bevacizumab produces a severe microglial reaction.

---

## 7 BIBLIOGRAFÍA.

Agarwal, A., W. R. Rhoades, et al. (2015). "Management of neovascular age-related macular degeneration: current state-of-the-art care for optimizing visual outcomes and therapies in development." *Clin Ophthalmol* 9: 1001-1015.

Albrecht, P. J., J. C. Enterline, et al. (2007). "CNTF-activated astrocytes release a soluble trophic activity for oligodendrocyte progenitors." *Neurochem Res* 32(2): 263-271.

Baehr, W. and J. M. Frederick (2009). "Naturally occurring animal models with outer retina phenotypes." *Vision Res* 49(22): 2636-2652.

Bakri, S. J., M. R. Snyder, et al. (2007). "Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis)." *Ophthalmology* 114(12): 2179-2182.

Berson, D. M., A. M. Castrucci, et al. (2010). "Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice." *J Comp Neurol* 518(13): 2405-2422.

Berson, D. M., F. A. Dunn, et al. (2002). "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock." *Science* 295(5557): 1070-1073.

Bhisitkul, R. B., T. S. Mendes, et al. (2015). "Macular atrophy progression and 7-year vision outcomes in subjects from the ANCHOR, MARINA, and HORIZON studies: the SEVEN-UP study." *Am J Ophthalmol* 159(5): 915-924 e912.

Biello, S. M. (2009). "Circadian clock resetting in the mouse changes with age." *Age (Dordr)* 31(4): 293-303.

Bodeutsch, N. and S. Thanos (2000). "Migration of phagocytotic cells and development of the murine intraretinal microglial network: an in vivo study using fluorescent dyes." *Glia* 32(1): 91-101.

Bourne, M. C., D. A. Campbell, et al. (1938). "Hereditary Degeneration of the Rat Retina." *Br J Ophthalmol* 22(10): 613-623.

Bowmaker, J. K. and D. M. Hunt (2006). "Evolution of vertebrate visual pigments." *Curr Biol* 16(13): R484-489.

Boya, J., J. Calvo, et al. (1987). "Appearance of microglial cells in the postnatal rat retina." *Arch Histol Jpn* 50(2): 223-228.

Braithwaite, T., A. A. Nanji, et al. (2014). "Anti-vascular endothelial growth factor for macular oedema secondary to central retinal vein occlusion." *Cochrane Database Syst Rev*(5): CD007325.

Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." *Prog Retin Eye Res* 25(4): 397-424.

Brown, T. M., S. Tsujimura, et al. (2012). "Melanopsin-based brightness discrimination in mice and humans." *Curr Biol* 22(12): 1134-1141.

Bush, R. A., K. W. Hawks, et al. (1995). "Preservation of inner retinal responses in the aged Royal College of Surgeons rat. Evidence against glutamate excitotoxicity in photoreceptor degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(10): 2054-2062.

Caldwell, R. B. and B. J. McLaughlin (1983). "Permeability of retinal pigment epithelial cell junctions in the dystrophic rat retina." *Exp Eye Res* 36(3): 415-427.

Caldwell, R. B., R. S. Roque, et al. (1989). "Increased vascular density and vitreo-retinal membranes accompany vascularization of the pigment epithelium in the dystrophic rat retina." *Curr Eye Res* 8(9): 923-937.

Coffey, P. J., S. Girman, et al. (2002). "Long-term preservation of cortically dependent visual function in RCS rats by transplantation." *Nat Neurosci* 5(1): 53-56.

Coombs, J., D. van der List, et al. (2006). "Morphological properties of mouse retinal ganglion cells." *Neuroscience* 140(1): 123-136.

Couturier, J., I. C. Stancu, et al. (2016). "Activation of phagocytic activity in astrocytes by reduced expression of the inflammasome component ASC and its implication in a mouse model of Alzheimer disease." *J Neuroinflammation* 13: 20.

Cuenca, N., I. Pinilla, et al. (2004). "Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina." *Neuroscience* 127(2): 301-317.

Chader, G. J. (2002). "Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope." *Vision Res* 42(4): 393-399.

Chang, M. L., C. H. Wu, et al. (2006). "Microglia/macrophages responses to kainate-induced injury in the rat retina." *Neurosci Res* 54(3): 202-212.

Chin-Yee, D., T. Eck, et al. (2015). "A systematic review of as needed versus treat and extend ranibizumab or bevacizumab treatment regimens for neovascular age-related macular degeneration." *Br J Ophthalmol*.

Chrysostomou, V., K. Valter, et al. (2009). "Cone-rod dependence in the rat retina: variation with the rate of rod damage." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(6): 3017-3023.

D'Cruz, P. M., D. Yasumura, et al. (2000). "Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat." *Hum Mol Genet* 9(4): 645-651.

Davies, W. L., M. W. Hankins, et al. (2010). "Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors." *Photochem Photobiol Sci* 9(11): 1444-1457.

de Hoz, R., B. I. Gallego, et al. (2013). "Rod-like microglia are restricted to eyes with laser-induced ocular hypertension but absent from the microglial changes in the contralateral untreated eye." *PLoS One* 8(12): e83733.

Del Puerto, A., F. Wandosell, et al. (2013). "Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease." *Front Cell Neurosci* 7: 197.

Diaz-Araya, C. M., J. M. Provis, et al. (1995). "Development of microglial topography in human retina." *J Comp Neurol* 363(1): 53-68.

Dogiel A S. 1895. "Die Retina der Vögel". *Anat Entwicklungsgeschichte*. 44:622–648.

Dossi, E., F. Vasile, et al. (2017). "Human astrocytes in the diseased brain." *Brain Res Bull*.

- Doucette, J. R. (1984). "The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb." *Anat Rec* 210(2): 385-391.
- Dowling, J. E. and R. L. Sidman (1962). "Inherited retinal dystrophy in the rat." *J Cell Biol* 14: 73-109.
- Dowling J E (1987). "The retina. An approachable part of the brain." The Bleknap Press of Harvard University Press Cambridge (Massachusetts) and London (England).
- Drager, U. C. and J. F. Olsen (1981). "Ganglion cell distribution in the retina of the mouse." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20(3): 285-293.
- Dreher, B., A. J. Sefton, et al. (1985). "The morphology, number, distribution and central projections of Class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats." *Brain Behav Evol* 26(1): 10-48.
- Dryja, T. P., T. L. McGee, et al. (1990). "Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa." *N Engl J Med* 323(19): 1302-1307.
- Ecker, J. L., O. N. Dumitrescu, et al. (2010). "Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision." *Neuron* 67(1): 49-60.
- Eichler, W., Y. Yafai, et al. (2004). "PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis." *Exp Cell Res* 299(1): 68-78.
- el-Hifnawi, E. S., W. Kuhnel, et al. (1992). "[The effect of cyclooxygenase inhibitors on the course of hereditary retinal dystrophy in RCS rats]." *Ann Anat* 174(3): 251-258.
- Ellis-Behnke, R. G., R. A. Jonas, et al. (2013). "The microglial system in the eye and brain in response to stimuli in vivo." *J Glaucoma* 22 Suppl 5: S32-35.
- Endo, T. (2005). "Glycans and glycan-binding proteins in brain: galectin-1-induced expression of neurotrophic factors in astrocytes." *Curr Drug Targets* 6(4): 427-436.
- Eng, S. R., J. Lanier, et al. (2004). "Coordinated regulation of gene expression by Brn3a in developing sensory ganglia." *Development* 131(16): 3859-3870.
- Essner, E., R. M. Pino, et al. (1979). "Permeability of retinal capillaries in rats with inherited retinal degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18(8): 859-863.
- Falavarjani, K. G. and Q. D. Nguyen (2013). "Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature." *Eye (Lond)* 27(7): 787-794.
- Fischer, N., R. Narayanan, et al. (2011). "Drug delivery to the posterior segment of the eye." *Eur J Ophthalmol* 21 Suppl 6: S20-26.
- Gallego, B. I., J. J. Salazar, et al. (2012). "IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma." *J Neuroinflammation* 9: 92.
- Garcia-Ayuso, D., A. Ortin-Martinez, et al. (2013). "Changes in the photoreceptor mosaic of P23H-1 rats during retinal degeneration: implications for rod-cone dependent survival." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(8): 5888-5900.
- Garcia-Ayuso, D., M. Salinas-Navarro, et al. (2010). "Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina." *Exp Eye Res* 91(6): 800-810.

- Garcia-Ayuso, D., M. Salinas-Navarro, et al. (2014). "Sectorial loss of retinal ganglion cells in inherited photoreceptor degeneration is due to RGC death." *Br J Ophthalmol* 98(3): 396-401.
- Garcia-Layana, A., M. S. Figueroa, et al. (2015). "Individualized Therapy with Ranibizumab in Wet Age-Related Macular Degeneration." *J Ophthalmol* 2015: 412903.
- Garcia-Valenzuela, E. and S. C. Sharma (1999). "Laminar restriction of retinal macrophagic response to optic nerve axotomy in the rat." *J Neurobiol* 40(1): 55-66.
- Garcia-Valenzuela, E., S. C. Sharma, et al. (2005). "Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats." *Mol Vis* 11: 225-231.
- Garcia, D. M. and J. R. Koke (2009). "Astrocytes as gate-keepers in optic nerve regeneration—a mini-review." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 152(2): 135-138.
- Gerkau, N. J., C. Rakers, et al. (2017). "Differential effects of energy deprivation on intracellular sodium homeostasis in neurons and astrocytes." *J Neurosci Res*.
- Gerstein, D. D. and D. R. Dantzker (1969). "Retinal vascular changes in hereditary visual cell degeneration." *Arch Ophthalmol* 81(1): 99-105.
- Gooley, J. J., J. Lu, et al. (2001). "Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract." *Nat Neurosci* 4(12): 1165.
- Gorbatyuk, M. S., T. Knox, et al. (2010). "Restoration of visual function in P23H rhodopsin transgenic rats by gene delivery of BiP/Grp78." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(13): 5961-5966.
- Hannibal, J., P. Hindersson, et al. (2002). "The circadian photopigment melanopsin is expressed in the blind subterranean mole rat, *Spalax*." *Neuroreport* 13(11): 1411-1414.
- Hartong, D. T., E. L. Berson, et al. (2006). "Retinitis pigmentosa." *Lancet* 368(9549): 1795-1809.
- Hattar, S., M. Kumar, et al. (2006). "Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse." *J Comp Neurol* 497(3): 326-349.
- Herron, W. L., Jr., B. W. Riegel, et al. (1974). "Retinal dystrophy in the pigmented rat." *Invest Ophthalmol* 13(2): 87-94.
- Huang, T., J. Cui, et al. (2012). "The role of microglia in the neurogenesis of zebrafish retina." *Biochem Biophys Res Commun* 421(2): 214-220.
- Hubel D H. (2000). "Ojo cerebro y visión". Servicio de publicaciones. Universidad de Murcia. ISBN: 84-8371-143-5.
- Inman, D. M. and P. J. Horner (2007). "Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma." *Glia* 55(9): 942-953.
- Itagaki, S., P. L. McGeer, et al. (1988). "Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue." *Neurosci Lett* 91(3): 259-264.
- Jacobs, G. H., J. A. Fenwick, et al. (2001). "Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights." *J Exp Biol* 204(Pt 14): 2439-2446.



- Jager, R. D., L. P. Aiello, et al. (2004). "Risks of intravitreal injection: a comprehensive review." *Retina* 24(5): 676-698.
- Jain, V., E. Ravindran, et al. (2012). "Differential expression of Brn3 transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse." *J Comp Neurol* 520(4): 742-755.
- Jakel, S. and L. Dimou (2017). "Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation." *Front Cell Neurosci* 11: 24.
- Janes, R. G. and G. W. Bounds, Jr. (1955). "The blood vessels of the rat's eye." *Am J Anat* 96(3): 357-373.
- Johnson, E. C. and J. C. Morrison (2009). "Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma." *J Glaucoma* 18(5): 341-353.
- Jones, B. W., C. B. Watt, et al. (2003). "Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations." *J Comp Neurol* 464(1): 1-16.
- Kanamori, A., M. Nakamura, et al. (2005). "Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma." *Exp Eye Res* 81(1): 48-56.
- Karnas, D., J. Mordel, et al. (2013). "Heterogeneity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the mouse revealed by molecular phenotyping." *J Comp Neurol* 521(4): 912-932.
- Kaur, C., G. Rathnasamy, et al. (2013). "Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina." *J Neuroimmune Pharmacol* 8(1): 66-78.
- Keeler, C. E. (1924). "The Inheritance of a Retinal Abnormality in White Mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 10(7): 329-333.
- Kettenmann, H., U. K. Hanisch, et al. (2011). "Physiology of microglia." *Physiol Rev* 91(2): 461-553.
- Kimura, N., M. Takahashi, et al. (2006). "Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration." *J Neurosci Res* 84(4): 782-789.
- Klein, A. and A. Loewenstein (2016). "Therapeutic Monoclonal Antibodies and Fragments: Bevacizumab." *Dev Ophthalmol* 55: 232-245.
- Kolb, H. (2003). "How the retina works". *Am Sci*. 9: 28-35.
- Kolomiets, B., E. Dubus, et al. (2010). "Late histological and functional changes in the P23H rat retina after photoreceptor loss." *Neurobiol Dis* 38(1): 47-58.
- Kooragayala, K., N. Gotoh, et al. (2015). "Quantification of Oxygen Consumption in Retina Ex Vivo Demonstrates Limited Reserve Capacity of Photoreceptor Mitochondria." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(13): 8428-8436.
- Koyama, Y. and S. Michinaga (2012). "Regulations of astrocytic functions by endothelins: roles in the pathophysiological responses of damaged brains." *J Pharmacol Sci* 118(4): 401-407.
- Kumar, A. and B. N. Mallick (2016). "Long-term primary culture of neurons taken from chick embryo brain: A model to study neural cell biology, synaptogenesis and its dynamic properties." *J Neurosci Methods* 263: 123-133.

Kuthan, V. (1964). "[Functional Relations of Neural and Glial Structures. New Viewpoints on the Physiology of the Nervous System]." *Cesk Fysiol* 13: 108-125.

LaVail, M. M. (1981). "Photoreceptor characteristics in congenic strains of RCS rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20(5): 671-675.

LaVail, M. M. and B. A. Battelle (1975). "Influence of eye pigmentation and light deprivation on inherited retinal dystrophy in the rat." *Exp Eye Res* 21(2): 167-192.

LaVail, M. M., D. Yasumura, et al. (2000). "Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11488-11493.

Lewin, A. S., K. A. Drenser, et al. (1998). "Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa." *Nat Med* 4(8): 967-971.

Li, G. Y., S. A. Al-Wesabi, et al. (2016). "Retinal and choroidal oxygen saturation of the optic nerve head in open-angle glaucoma subjects by multispectral imaging." *Medicine (Baltimore)* 95(52): e5775.

Linden, R. and V. H. Perry (1983). "Massive retinotectal projection in rats." *Brain Res* 272(1): 145-149.

Ling, E. A. (1982). "A light microscopic demonstration of amoeboid microglia and microglial cells in the retina of rats of various ages." *Arch Histol Jpn* 45(1): 37-44.

Liu, Y., X. Yang, et al. (2013). "Correlation of cytokine levels and microglial cell infiltration during retinal degeneration in RCS rats." *PLoS One* 8(12): e82061.

Loov, C., C. H. Mitchell, et al. (2015). "Slow degradation in phagocytic astrocytes can be enhanced by lysosomal acidification." *Glia*.

Lu, B., C. W. Morgans, et al. (2013). "Retinal morphological and functional changes in an animal model of retinitis pigmentosa." *Vis Neurosci* 30(3): 77-89.

Lund, R. D. (1965). "Uncrossed Visual Pathways of Hooded and Albino Rats." *Science* 149(3691): 1506-1507.

Machida, S., M. Kondo, et al. (2000). "P23H rhodopsin transgenic rat: correlation of retinal function with histopathology." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(10): 3200-3209.

Makarov, V., L. Zueva, et al. (2017). "Quantum mechanism of light transmission by the intermediate filaments in some specialized optically transparent cells." *Neurophotonics* 4(1): 011005.

Martin, P. J. (2011). "ANG2/VEGF in steroid-refractory GVHD." *Blood* 118(6): 1437-1438.

Maruko, I., R. F. Spaide, et al. (2017). "Choroidal Blood Flow Visualization in High Myopia Using a Projection Artifact Method in Optical Coherence Tomography Angiography." *Retina* 37(3): 460-465.

Matthes, M. T. and D. Bok (1984). "Blood vascular abnormalities in the degenerative mouse retina (C57BL/6J-rd le)." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(3): 364-369.

Meyer, C. H., T. U. Krohne, et al. (2016). "Routes for Drug Delivery to the Eye and Retina: Intravitreal Injections." *Dev Ophthalmol* 55: 63-70.

- Mills, E. A., C. H. Davis, et al. (2015). "Astrocytes phagocytose focal dystrophies from shortening myelin segments in the optic nerve of *Xenopus laevis* at metamorphosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(33): 10509-10514.
- Moja, L., E. Lucenteforte, et al. (2014). "Systemic safety of bevacizumab versus ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration." *Cochrane Database Syst Rev*(9): CD011230.
- Moore, R. Y. (1995). "Organization of the mammalian circadian system." *Ciba Found Symp* 183: 88-99; discussion 100-106.
- Morrison, J. C., E. C. Johnson, et al. (1999). "Microvasculature of the rat optic nerve head." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(8): 1702-1709.
- Morrison, P. W. and V. V. Khutoryanskiy (2014). "Advances in ophthalmic drug delivery." *Ther Deliv* 5(12): 1297-1315.
- Murabe, Y., Y. Ibata, et al. (1981). "Morphological studies on neuroglia. II. Response of glial cells to kainic acid-induced lesions." *Cell Tissue Res* 216(3): 569-580.
- Murabe, Y. and Y. Sano (1981). "Thiaminepyrophosphatase activity in the plasma membrane of microglia." *Histochemistry* 71(1): 45-52.
- Murphy-Royal, C., J. Dupuis, et al. (2017). "Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission." *J Neurosci Res*.
- Nadal-Nicolas, F. M., M. Jimenez-Lopez, et al. (2012). "Whole number, distribution and co-expression of *brn3* transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats." *PLoS One* 7(11): e49830.
- Nadal-Nicolas, F. M., M. Jimenez-Lopez, et al. (2009). "*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* 50(8): 3860-3868.
- Nadal-Nicolas, F. M., M. Salinas-Navarro, et al. (2014). "Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats." *Front Neuroanat* 8: 99.
- Nagamoto-Combs, K., R. J. Morecraft, et al. (2010). "Long-term gliosis and molecular changes in the cervical spinal cord of the rhesus monkey after traumatic brain injury." *J Neurotrauma* 27(3): 565-585.
- Naskar, R., M. Wissing, et al. (2002). "Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(9): 2962-2968.
- Navascues, J., A. Moujahid, et al. (1995). "Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development." *J Comp Neurol* 354(2): 209-228.
- Noailles, A., L. Fernandez-Sanchez, et al. (2014). "Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects." *J Neuroinflammation* 11: 186.
- Noailles, A., V. Maneu, et al. (2016). "Persistent inflammatory state after photoreceptor loss in an animal model of retinal degeneration." *Sci Rep* 6: 33356.
- Novack, G. D. and A. L. Robin (2016). "Ocular pharmacology." *J Clin Pharmacol* 56(5): 517-527.

Ohm J. (2011) "Über die Behandlung der Netzhautablosung durch operative Entleerung der subretinalen Flüssigkeit and Ein- spritzung von Luft in den Glasskoper." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 79:442–450.

Okamoto, M., M. Yamashita, et al. (2017). "Choroidal Blood Flow and Thickness as Predictors for Response to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Macular Edema Secondary to Branch Retinal Vein Occlusion." Retina.

Olsson, J. E., J. W. Gordon, et al. (1992). "Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa." Neuron 9(5): 815-830.

Ortin-Martinez, A., M. Jimenez-Lopez, et al. (2010). "Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats." Invest Ophthalmol Vis Sci 51(6): 3171-3183.

Ortin-Martinez, A., F. M. Nadal-Nicolas, et al. (2014). "Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain." PLoS One 9(7): e102392.

Palkovits, S., M. Lasta, et al. (2015). "Relation of retinal blood flow and retinal oxygen extraction during stimulation with diffuse luminance flicker." Sci Rep 5: 18291.

Panagis, L., S. Thanos, et al. (2005). "Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation." Eur J Neurosci 21(8): 2305-2309.

Pandey, R., S. K. Paidi, et al. (2017). "Noninvasive Monitoring of Blood Glucose with Raman Spectroscopy." Acc Chem Res 50(2): 264-272.

Papouin, T., J. Dunphy, et al. (2017). "Astrocytic control of synaptic function." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 372(1715).

Payne, J. H., P. D. Wall, et al. (1992). "Repair and regeneration: experimental aspects of spinal cord disease." Curr Opin Neurol Neurosurg 5(4): 558-562.

Pearce, W., J. Hsu, et al. (2015). "Advances in drug delivery to the posterior segment." Curr Opin Ophthalmol 26(3): 233-239.

Pearson, H. E., B. R. Payne, et al. (1993). "Microglial invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina." Brain Res Dev Brain Res 76(2): 249-255.

Peng, Y. W., T. Senda, et al. (2003). "Ectopic synaptogenesis during retinal degeneration in the royal college of surgeons rat." Neuroscience 119(3): 813-820.

Pennesi, M. E., S. Nishikawa, et al. (2008). "The relationship of photoreceptor degeneration to retinal vascular development and loss in mutant rhodopsin transgenic and RCS rats." Exp Eye Res 87(6): 561-570.

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

Perry, V. H. (1981). "Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina." Neuroscience 6(5): 931-944.

- Peyman, G. A., E. M. Lad, et al. (2009). "Intravitreal injection of therapeutic agents." *Retina* 29(7): 875-912.
- Pinilla, I., R. D. Lund, et al. (2005). "Cone function studied with flicker electroretinogram during progressive retinal degeneration in RCS rats." *Exp Eye Res* 80(1): 51-59.
- Provencio, I., G. Jiang, et al. (1998). "Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1): 340-345.
- Provencio, I., I. R. Rodriguez, et al. (2000). "A novel human opsin in the inner retina." *J Neurosci* 20(2): 600-605.
- Ramirez, A. I., J. J. Salazar, et al. (2010).** "Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(11): 5690-5696.
- Ramirez, A. I., J. J. Salazar, et al. (2001). "[Application of confocal microscopy in the study of the relationships between astrocytes and blood vessels in the retina]." *Arch Soc Esp Ophthalmol* 76(7): 409-416.
- Ramirez, J. M., A. I. Ramirez, et al. (2001). "Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration." *Exp Eye Res* 73(5): 601-615.
- Ramirez, J. M., A. Trivino, et al. (1996). "Structural specializations of human retinal glial cells." *Vision Res* 36(14): 2029-2036.
- Ramón y Cajal S. (1892). "La rétine des vertèbres." *La cellule*, T. IX, Fasc. 1:121-225.
- Rathnasamy, G., E. A. Ling, et al. (2014). "Hypoxia inducible factor-1alpha mediates iron uptake which induces inflammatory response in amoeboid microglial cells in developing periventricular white matter through MAP kinase pathway." *Neuropharmacology* 77: 428-440.
- Reese, B. E. and A. Cowey (1986). "Large retinal ganglion cells in the rat: their distribution and laterality of projection." *Exp Brain Res* 61(2): 375-385.
- Reichenbach, A. and A. Bringmann (2013). "New functions of Muller cells." *Glia* 61(5): 651-678.
- Rodieck, R. W. (1979). "Visual pathways." *Annu Rev Neurosci* 2: 193-225.
- Rojas, B., B. I. Gallego, et al. (2014). "Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers." *J Neuroinflammation* 11: 133.
- Roque, R. S., C. J. Imperial, et al. (1996). "Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(1): 196-203.
- Rovere, G., F. M. Nadal-Nicolas, et al. (2016). "Topical Treatment With Bromfenac Reduces Retinal Gliosis and Inflammation After Optic Nerve Crush." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(14): 6098-6106.
- Salinas-Navarro, M., M. Jimenez-Lopez, et al. (2009) a.** "Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution." *Vision Res* 49(6): 637-647.
- Salinas-Navarro, M., S. Mayor-Torroglosa, et al. (2009) b. "A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats." *Vision Res* 49(1): 115-126.

Sanchez-Guajardo, V., F. Febbraro, et al. (2010). "Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease." *PLoS One* 5(1): e8784.

Sanchez-Migallon, M. C., F. M. Nadal-Nicolas, et al. (2011). "Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells." *Exp Eye Res* 92(4): 260-267.

Sanchez-Migallon, M. C., F. J. Valiente-Soriano, et al. (2016). "Apoptotic Retinal Ganglion Cell Death After Optic Nerve Transection or Crush in Mice: Delayed RGC Loss With BDNF or a Caspase 3 Inhibitor." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(1): 81-93.

Sauve, Y., I. Pinilla, et al. (2006). "Partial preservation of rod and cone ERG function following subretinal injection of ARPE-19 cells in RCS rats." *Vision Res* 46(8-9): 1459-1472.

Schmidt, T. M., S. K. Chen, et al. (2011). "Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions." *Trends Neurosci* 34(11): 572-580.

Seaton, A. D., H. J. Sheedlo, et al. (1994). "A primary role for RPE transplants in the inhibition and regression of neovascularization in the RCS rat." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(1): 162-169.

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

Solomon, S. D., K. Lindsley, et al. (2014). "Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration." *Cochrane Database Syst Rev*(8): CD005139.

Souied, E. H., P. U. Dugel, et al. (2016). "Severe Ocular Inflammation Following Ranibizumab or Aflibercept Injections for Age-Related Macular Degeneration: A Retrospective Claims Database Analysis." *Ophthalmic Epidemiol* 23(2): 71-79.

Spaide, R. F., M. Suzuki, et al. (2017). "Volume-Rendered Angiographic and Structural Optical Coherence Tomography Angiography of Macular Telangiectasia Type 2." *Retina* 37(3): 424-435.

Steinberg, R. H., Flannery, J. et al. (1996). "Transgenic rat models of inherited retinal degeneration caused by mutant opsin genes." [Abstract retrieved from ARVO]. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:S698. Abstract nr 3190.

Stewart, M. W. (2015). "Individualized Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: What are Patients Gaining? Or Losing?" *J Clin Med* 4(5): 1079-1101.

Sugiyama, K., T. Yokoyama, et al. (1999). "Localization of the optic tract by using subcortical visual evoked potentials (VEPs) in cats." *Clin Neurophysiol* 110(1): 92-96.

Szel, A., P. Rohlich, et al. (1993). "Spatial and temporal differences between the expression of short- and middle-wave sensitive cone pigments in the mouse retina: a developmental study." *J Comp Neurol* 331(4): 564-577.

Taleisnik, Samuel (2010). "En Encuentro. Neuronas: desarrollo, lesiones y regeneración". ISBN: 978-987-1432-52-3.

Takahashi, T., N. Amano, et al. (2006). "Correlation between glial fibrillary acidic protein-positive astrocytes and age in the human hippocampus." *Leg Med (Tokyo)* 8(3): 161-165.

- Terubayashi, H., Y. Murabe, et al. (1984). "Enzymohistochemical identification of microglial cells in the rat retina: light and electron microscopic studies." *Exp Eye Res* 39(5): 595-603.
- Tezel, G. (2009). "The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(3): 1001-1012.
- Tezel, G., B. C. Chauhan, et al. (2003). "Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(7): 3025-3033.
- Thanos, S. (1991). "Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration." *Neurosci Lett* 127(1): 108-112.
- Thanos, S., J. Mey, et al. (1993). "Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro." *J Neurosci* 13(2): 455-466.
- Thanos, S., C. Pavlidis, et al. (1992). "Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells." *Exp Eye Res* 55(1): 101-117.
- Thanos, S. and W. Richter (1993). "The migratory potential of vitally labelled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy." *Int J Dev Neurosci* 11(5): 671-680.
- Trivino, A., J. M. Ramirez, et al. (1996). "Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia." *Vision Res* 36(14): 2015-2028.
- Uga, S. and Smelser (1973). "Comparative study of the fine structure of retinal Muller cells in various vertebrates." *Invest Ophthalmol* 12(6): 434-448.
- Van Driel, D., J. M. Provis, et al. (1988). "Morphology of intraretinal new vessels in the PETH rat." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 226(6): 576-582.
- VanderBeek, B. L., S. G. Bonaffini, et al. (2015). "The Association between Intravitreal Steroids and Post-Injection Endophthalmitis Rates." *Ophthalmology* 122(11): 2311-2315 e2311.
- Vecino, E., F. D. Rodriguez, et al. (2016). "Glia-neuron interactions in the mammalian retina." *Prog Retin Eye Res* 51: 1-40.
- Villegas-Perez, M. P., J. M. Lawrence, et al. (1998). "Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium." *J Comp Neurol* 392(1): 58-77.
- Villegas-Perez, M. P., M. Vidal-Sanz, et al. (1988). "Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats." *J Neurosci* 8(1): 265-280.
- Virgili, G., M. Parravano, et al. (2014). "Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema." *Cochrane Database Syst Rev*(10): CD007419.
- Volgyi, B., S. Chheda, et al. (2009). "Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina." *J Comp Neurol* 512(5): 664-687.
- Wang, X., S. Sam-Wah Tay, et al. (2000). "Nitric oxide, microglial activities and neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus of glaucomatous rats." *Brain Res* 878(1-2): 136-147.

Weber, M. L., M. A. Mancini, et al. (1989). "Retinovitreal neovascularization in the Royal College of Surgeons rat." *Curr Eye Res* 8(1): 61-74.

Whiteley, S. J., M. J. Young, et al. (1998). "Changes in the pupillary light reflex of pigmented royal college of surgeons rats with Age." *Exp Eye Res* 66(6): 719-730.

Wohl, S. G., C. W. Schmeer, et al. (2010). "Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(5): 2686-2696.

Xu, W., H. Wang, et al. (2010). "Testing toxicity of multiple intravitreal injections of bevacizumab in rabbit eyes." *Can J Ophthalmol* 45(4): 386-392.

Xue, L. P., J. Lu, et al. (2006). "Muller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina." *Neuroscience* 139(2): 723-732.

Yokoyama, S. (2000). "Molecular evolution of vertebrate visual pigments." *Prog Retin Eye Res* 19(4): 385-419.

Young, R. A. and T. J. Elliott (1989). "Stress proteins, infection, and immune surveillance." *Cell* 59(1): 5-8.

Zhang, C. and M. O. Tso (2003). "Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy." *J Neurosci Res* 73(6): 840-845.

Zhang, X., J. Wang, et al. (2011). "Brain-derived neurotrophic factor-activated astrocytes produce mechanical allodynia in neuropathic pain." *Neuroscience* 199: 452-460.

Zhao, L., M. K. Zabel, et al. (2015). "Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration." *EMBO Mol Med* 7(9): 1179-1197.