



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Caracterización en Roedores Adultos de la Población de
Células Ganglionares de Retina Melanopsínicas y Estudio
de la Degeneración de las Células Ganglionares tras
Hipertensión Ocular y Neuroprotección

D. Francisco Javier Valiente Soriano
2015



Universidad de Murcia

Laboratorio de Oftalmología Experimental

Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía

Patológica

Facultad de Medicina

Programa de posgrado en “Ciencias de la Visión”

**“Caracterización en roedores adultos de la población de células
ganglionares de retina melanopsínicas y estudio de la
degeneración de las células ganglionares tras hipertensión
ocular y neuroprotección”**

Presentada por:

Francisco Javier Valiente Soriano

**para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia con la mención
internacional de Doctor**

Dirigida por:

Manuel Vidal Sanz, Marta Agudo Barriuso y Marcelino Avilés Trigueros

2015



University of Murcia

**Laboratory of Experimental Ophthalmology
Department of Ophthalmology, Optometry, Otolaryngology and Pathology
Faculty of Medicine**

Postgraduate program in “Visual Science”

“Characterization in adult rodents of the melanopsin retinal ganglion cells population and study of the retinal ganglion cells degeneration after ocular hypertension and neuroprotection”

Dissertation submitted by:

Francisco Javier Valiente Soriano

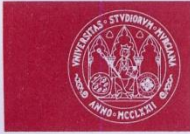
**to obtain the PhD DEGREE from the University of Murcia with the
“International Doctor” mention**

Directed by:

Manuel Vidal Sanz, Marta Agudo Barriuso and Marcelino Avilés Trigueros

2015

ANEXOS ADMINISTRATIVOS



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

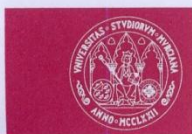
D. Manuel Vidal Sanz, Catedrático de Universidad del Área de Oftalmología y Presidente de la Comisión Académica del Programa de Ciencias de la Visión,

INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "**Caracterización en roedores adultos de la población de células ganglionares de retina melanopsínicas y estudio de la degeneración de las células ganglionares tras hipertensión ocular y neuroprotección**", realizada por **D. Francisco Javier Valiente Soriano**, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Manuel Vidal Sanz, Dña. Marta Agudo Barriuso y D. Marcelino Avilés Trigueros, en sesión celebrada en fecha 22/04/2015, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión general de Doctorado.

Murcia, a 22 de abril de 2015.

Fdo.: Prof. Manuel Vidal Sanz



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Manuel Vidal Sanz, Catedrático de Universidad del Área de Oftalmología en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica, y

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

D. Marcelino Avilés Triguero, Profesor de Universidad del Área de Oftalmología en el Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y Anatomía Patológica

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Caracterización en roedores adultos de la población de células ganglionares de retina melanopsínicas y estudio de la degeneración de las células ganglionares tras hipertensión ocular y neuroprotección**", bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia, con mención internacional.

En Murcia, a venticuatro de marzo de dos mil quince.

Prof. Manuel Vidal Sanz

Dra. Marta Agudo Barriuso

Dr. Marcelino Avilés Trigueros



Università degli Studi di Roma Tor Vergata

Facoltà di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia

Corso di Laurea ORTOTTISTI ed ASSISTENTI in OFTALMOLOGIA

Presidente Prof. Carlo Nucci

Prof. Manuel Vidal-Sanz
Departamento de Oftalmología
Facultad de Medicina, Universidad de Murcia
Campus Universitario de Espinardo
E-30100 Espinardo, Murcia, Spain
Fax. 868 883962
e.mail: manuel.vidal@um.es

March 16th, 2015

Re: Francisco Javier VALIENTE-SORIANO, Ph.D. Thesis Report

The thesis entitled "Caracterización en roedores adultos de la población de células ganglionares de retina melanopsínicas y estudio de la degeneración de las células ganglionares tras hipertensión ocular y neuroprotección" presents the work accomplished by Francisco Javier Valiente-Soriano, towards his Doctor of Philosophy degree within the programme of Visual Science.

The experimental work has been done primarily in the rodent visual system, both in adult rats and mice. In a first part Francisco Javier has characterized the population of intrinsically photosensitive, melanopsin expressing retinal ganglion cells (m+RGCs) in adult albino and pigmented mice. The second part deals with the analysis of the effects of laser-induced ocular hypertension (OHT) on the visual system of adult pigmented mice. The last part examines in adult albino rats the responses to OHT and intraocular administration of Brain derived neurotrophic factor (BDNF) of the general population of RGCs (identified with Brn3a antibodies) and the population of m+RGCs (identified with anti-melanopsin antibodies).

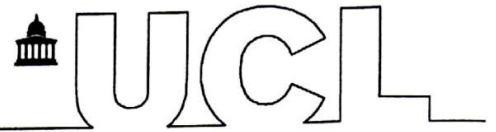
Francisco Javier uses with great skill a variety of modern neurobiological techniques, which include the induction of ocular hypertension using a laser beam to cauterize the episcleral and limbal veins, as well as a number of anatomical tracers (orthogradely and retrogradely transported) to identify the retinal terminals within the superior colliculus and RGCs, immunocytochemical markers such as Brn3a, melanopsin, and RECA1 to identify the general population of RGCs, the population of intrinsically photosensitive RGCs and the inner retinal vessels.

This work by Francisco Javier appears published in several original publications in the following journals: i) *Frontiers in Neuroanatomy* 2014; 8:131; ii) *Plos ONE* 2015 (in Press), and; iii) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; doi: 10.1167/iovs.15-16454). In addition, during his PhD training Francisco Javier has contributed to a number of important scientific communications that have also been published in a number of very prestigious journals.

Thus, the experimental work presented in this Thesis is of an excellent quality, and thus I do inform very favourably this work to obtain the Ph.D. Degree within the postgraduate program of Visual Sciences.

Prof. Carlo Nucci MD, PhD
Associate Professor in Ophthalmology
University of Rome "Tor Vergata"
"Fondazione Policlinico Tor Vergata" University Medical Center
Viale Oxford 81, 00133 Rome, Italy
Ph. +39 06 7259 6145; 6147. Fax +39 06 2026232. Mob. +39 338 7545359
nucci@med.uniroma2.it

UCL INSTITUTE OF OPHTHALMOLOGY



27 March 2015

Re: Francisco Javier VALIENTE-SORIANO Ph.D. Thesis Report

The thesis entitled "**Caracterización en roedores adultos de la población de células ganglionares de retina melanopsínicas y estudio de la degeneración de las células ganglionares tras hipertensión ocular y neuroprotección**" presents the work accomplished by Francisco Javier Valiente-Soriano, towards his Doctor of Philosophy degree in the Visual Sciences Programme.

The manuscript is very scholarly indeed. The introduction and rationale for the thesis is clear and the methods chapter describes very nicely the techniques and protocols used in the various experiments. The results chapters also describe concisely the main findings, and the discussion highlights the main points and novel findings of the work. Overall it is an excellent, well thought out and well written Ph.D. Thesis. The experimental work is performed on the visual system of adult rats and mice. The first part of this thesis is dedicated to the characterization of intrinsically photosensitive, melanopsin expressing retinal ganglion cells (m^+ RGCs) in adult albino and pigmented mice. The second part deals with the analysis of the effects of laser-induced ocular hypertension (OHT) on the visual system of adult pigmented mice, while the last part examines (in adult albino rats) the response of the general population of RGCs (identified with Brn3a antibodies) and the population of m^+ RGCs (identified with anti-melanopsin antibodies) to OHT and intraocular administration of Brain derived neurotrophic factor (BDNF). Francisco Javier Valiente-Soriano has used, with great expertise, a number of techniques to induce ocular hypertension in adult albino rats and pigmented mice. In addition Francisco J. has used a great deal of modern neurobiological techniques, which include the use of neuronal tracers to identify RGCs, immunocytochemical markers such as Brn3a, melanopsin, and RECA1 to identify the general population of RGCs, the population of intrinsically photosensitive RGCs and inner retinal vessels.

Major contributions of his important work are: i) The detailed characterization of the normal population of orthotopic and displaced melanopsin RGCs in adult albino and pigmented mice, with the description of a novel melanopsin expressing retinal interneuron subtype; ii) The effects of OHT on the degeneration of RGCs in adult pigmented mice, including the m^+ RGCs and the orthograde degeneration of the retinotectal terminals, and; iii) The effects of BDNF on the survival of the general population of injured but surviving Brn3a⁺RGCs as well as on the population of m^+ RGCs. All of these contributions have been published as separate original articles in prestigious ophthalmology research journals (Frontiers in Neuroanatomy 2014; 8:131; Plos ONE 2015 (in Press) and Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; doi: 10.1167/iovs.15-16454). It is my considered opinion that the experimental work presented in this Thesis is of truly EXCELLENT scientific quality and makes a very important contribution to the field of visual neuroscience. **Thus, I unreservedly recommend this work to obtain the Ph.D. Degree in the postgraduate programme of Visual Sciences.**

Anthony Vugler Ph.D

Dr Anthony Vugler, Lecturer in Retinal Neurobiology, Ocular Biology and Therapeutics,
UCL Institute of Ophthalmology, 11-43 Bath Street, London EC1V 9EL
Tel: +44 (0)20 7608 4064. Email: a.vugler@ucl.ac.uk

**“Una sola puerta de tres, abierta.
Una sola puerta.
enfrente, la montaña.”
(Manuel Chinato)**

ÍNDICE

i) AGRADecIMIENTOS	v
ii) RESUMEN.....	viii
iii) SUMMARY	xiv
iv) LISTA DE ABREVIATURAS	xx
v) LISTA DE ILUSTRACIONES (Figuras y Tablas).....	xxii
vi) ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....	xxvi
vii) HALLAZGOS ORIGINALES.....	xxviii
viii) PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS	xxx
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. ANATOMÍA DEL OJO	2
1.1.1. Organización histológica de la retina	3
1.2. SISTEMA VISUAL DEL ROEDOR	5
1.2.1. Los fotorreceptores	6
1.2.2. Las células ganglionares de la retina (CGR).....	7
1.2.2.1. Proyecciones de las células ganglionares de la retina.....	8
1.2.2.2. Identificación de las células ganglionares de la retina	10
1.2.2.2.1. Identificación morfológica por medio de microscopía óptica.....	10
1.2.2.2.2. Marcaje retrógrado con trazadores neuronales	10
1.2.2.2.3. Inmunodetección.....	11
1.2.2.2.4. Hibridación “in situ”: Gamma-sinucleína.....	13
1.2.2.3. Cuantificación de las células ganglionares de la retina	13
1.2.2.4. Mapas de distribución espacial de las células ganglionares de la retina	15
1.2.3. Las células ganglionares de la retina melanopsínicas (CGRm).....	16
1.2.3.1. Proyecciones de las células ganglionares de retina melanopsínicas.....	18
1.2.3.2. Tipos células ganglionares de retina melanopsínicas	19
1.2.4. Zona marginal ciliar de retina (ZMC).....	20
1.3. EL GLAUCOMA.....	22
1.3.1. Clasificación	22
1.3.2. Epidemiología.....	22
1.3.3. Fisiopatología	23
1.3.4. Patogenia	24
1.3.5. Clínica.....	25
1.4. MÉTODOS DE REGISTRO DE PRESIÓN INTRAOCULAR	26
1.5. MODELOS DE GLAUCOMA EN ROEDOR.....	26
1.5.1. Genéticos	27
1.5.1.1. Modelos con incremento de HTO	27
1.5.1.2. Modelos normotensos	28
1.5.1.3. Modelos de alteración de la cámara anterior	28
1.5.2. Inducción de hipertensión ocular	29
1.5.2.1. Láser	29
1.5.2.2. Inyección epiescleral de suero salino hipertónico	30
1.5.2.3. Cauterización de las venas epiesclerales.....	31
1.5.2.4. Inyección de sustancias que inducen un aumento de PIO.....	31
1.5.3. Inducción de muerte de las CGR.....	32

1.5.3.1.	<i>Lesión en nervio óptico</i>	32
1.5.3.2.	<i>Inyección intraocular de agentes excitotóxicos</i>	34
1.5.3.3.	<i>Isquemia de retina</i>	34
1.5.3.4.	<i>Neuropatía óptica inducida por endotelina</i>	35
1.5.3.5.	<i>Sistemas in vitro</i>	35
1.5.3.6.	<i>Cultivos de células ganglionares de la retina</i>	35
1.5.3.7.	<i>Cultivos de explantes de retina</i>	35
1.6.	SIMILITUDES ENTRE GLAUCOMA HUMANO Y DE RATÓN	36
1.7.	NEUROPROTECCIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	37
1.7.1.	<i>Ventajas de trabajar en retina como modelo de degeneración del sistema nervioso central</i>	38
1.7.2.	<i>Terapias de neuroprotección</i>	39
1.7.2.1.	<i>Factores neurotróficos</i>	39
1.7.2.1.1.	<i>Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)</i>	40
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
2.1.	OBJETIVOS GENERALES	43
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
2.2.1.	<i>Caracterizar la población de CGRm del ratón pigmentado y albino adulto</i>	44
2.2.2.	<i>Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO en ratón pigmentado</i>	44
2.2.3.	<i>Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO y su protección con BDNF en rata albina adulta</i>	45
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA	47
3.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL	48
3.2.1.	<i>Caracterización de la población de CGR melanopsínicas del ratón pigmentado y albino adulto:</i>	48
3.2.2.	<i>Estudio de la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO:</i>	49
3.2.3.	<i>Efecto del BDNF sobre las CGR y las CGRm en retinas de rata albina tras HTO:</i>	50
3.3.	TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CGR	51
3.3.1.	<i>Marcaje retrógrado de las CGR desde los CS</i>	51
3.3.2.	<i>Marcaje retrógrado de las CGR desde el nervio óptico</i>	53
3.4.	MARCAJE ANTERÓGRADO DE LAS REGIONES RETINOTECTALES	54
3.5.	FOTOCOAGULACIÓN MEDIANTE LÁSER DIODO	55
3.6.	MEDIDA DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR	56
3.7.	INYECCIÓN EN CÁMARA VÍTREA	56
3.8.	PROCESADO HISTOLÓGICO	57
3.8.1.	<i>Perfusión-fijación del animal</i>	57
3.8.2.	<i>Enucleación de los ojos</i>	58
3.8.3.	<i>Disección y montaje de la retina a plano</i>	58
3.8.4.	<i>Procesado histológico de la retina para secciones transversales</i>	58
3.8.5.	<i>Procesado histológico del cerebro</i>	59
3.9.	INMUNOHISTOFLUORESCENCIA	59
3.9.1.	<i>Montajes globales de retina</i>	59

3.9.2.	Secciones transversales de retina	60
3.10.	ANTICUERPOS, TINCIONES Y DILUCIONES UTILIZADOS EN LOS ESTUDIOS	61
3.10.1.	Inmunodetección de las CGR	61
3.10.2.	Inmunodetección de las CGRm	61
3.10.3.	Tinción de los núcleos de la capa de las CGR con DAPI.....	62
3.10.4.	Inmunodetección de los terminales axonales de las CGR en el cerebro-medio	62
3.10.5.	Inmunodetección de los vasos superficiales de retina.....	63
3.11.	ESTUDIO MORFOLÓGICO Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA RETINA	65
3.11.1.	Procesado de imágenes	66
3.11.1.1.	Cuantificación de las CGR trazadas con OHSt o FG e inmunodetectadas con Brn3a...	66
3.11.1.2.	Cuantificación de las CGR Brn3a ⁺	67
3.11.1.3.	Mapas de isodensidad.....	67
3.11.1.4.	Cuantificación de las CGRm	69
3.11.1.5.	Mapa de vecinos.....	69
3.11.1.6.	Análisis morfométrico del plexo vascular superficial de la retina	70
3.12.	ESTUDIO MORFOLÓGICO Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL CEREBRO DE RATÓN.....	71
3.12.1.	Procesado de imágenes y medida del volumen de las regiones inmunopositivas.....	72
3.13.	ESTADÍSTICA.....	73
4.	RESULTADOS.....	75
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CGR MELANOPSÍNICAS DEL RATÓN PIGMENTADO Y ALBINO ADULTO.....	75
4.1.1.	Inmunohistofluorescencia para detectar las CGR que expresan melanopsina en montajes globales de retina.....	76
4.1.2.	Tamaño del soma	78
4.1.3.	Estudio de la proyección retinofugal y retinotectal de las CGRm. Análisis específico en la zona marginal ciliar de retina.....	78
4.1.4.	Contaje y análisis de la distribución espacial de las CGRm en los montajes globales de retina.....	81
4.1.5.	Estudio de la población y distribución espacial de las CGRm desplazadas a la capa nuclear interna	84
4.2.	ESTUDIAR LA DEGENERACIÓN DE LAS CGR Y LAS CGRM DESPUÉS DE HTO EN RATÓN PIGMENTADO	88
4.2.1.	Evolución de la presión intraocular tras fotocoagulación con láser (FL) de las venas episclerales y perilimbaires	88
4.2.2.	Estudio de la población y distribución de las CGR Brn3a ⁺ y las CGRm a diferentes tiempos post-lesión y su relación con las CGR que mantienen un TAR viable desde los CS.....	89
4.2.3.	El daño causado por la HTO en la capa de CGR es selectivo de las CGR y no afecta a otra población celular en esta capa.....	96
4.2.4.	Estudio del transporte axonal anterógrado de las CGR y los terminales axonales de las CGR a largos tiempos post lesión	98
4.3.	ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CGR Y LAS CGRm DESPUÉS DE HTO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF EN RATA ALBINA ADULTA.....	100
4.3.1.	Estudio el daño axonal provocado y la supervivencia de las CGR y las CGRm en ratas tratadas con BDNF o vehículo a 12 y 15 días tras HTO.....	100

4.3.2.	<i>Estudio de la distribución de la población de las CGRm en retinas de rata tratadas con BDNF o vehículo a 12 y 15 tras HTO</i>	105
4.3.3.	<i>Análisis de los vasos retinianos internos tras HTO</i>	105
5.	DISCUSIÓN	109
5.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CGR MELANOPSÍNICAS DEL RATÓN PIGMENTADO Y ALBINO ADULTO	109
5.1.1.	<i>Población total de las CGRm y su distribución en retina</i>	110
5.1.2.	<i>CGRm desplazadas</i>	111
5.1.3.	<i>Proyecciones de las CGRm</i>	112
5.1.4.	<i>Zona marginal ciliar de retina</i>	113
5.2.	ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CGR Y LAS CGRm DESPUÉS DE HTO EN RATÓN PIGMENTADO	115
5.2.1.	<i>Degeneración de las CGR tras HTO</i>	115
5.2.2.	<i>Degeneración de las CGRm tras HTO</i>	117
5.2.3.	<i>Muerte selectiva de las CGR en la capa de CGR tras HTO</i>	118
5.3.	ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CGR Y LAS CGRm DESPUÉS DE HTO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF EN RATA ALBINA ADULTA	119
5.3.1.	<i>Evolución de la PIO tras inducción de HTO tras administración de BDNF o Vehículo</i>	120
5.3.2.	<i>La HTO provoca una pérdida de CGR y de CGRm</i>	120
5.3.3.	<i>La distribución de la pérdida de las CGRm es diferente del resto de CGR y no tiene relación con los vasos internos de la retina</i>	121
5.3.4.	<i>La administración intravítrea de BDNF protege a las CGR pero no a las CGRm tras HTO inducida por láser</i>	121
6.	CONCLUSIONES	124
7.	CONCLUSIONS	127
8.	BIBLIOGRAFÍA	130
9.	ANEXO I	148
10.	ANEXO II	166
11.	ANEXO III	189

i) AGRADECIMIENTOS

El primer apartado de esta tesis son los agradecimientos, como no podía ser de otra manera, ya que sin la ayuda de las personas que durante todo este tiempo me han acompañado, guiado, ayudado y, a veces, abroncado, nada de lo que sigue hubiera sido posible.

Las líneas que les dedico están escritas con el corazón y, algún día, espero poder devolverles toda la ayuda que me han brindado. Y como, no nos engañemos, esta parte es la que lee todo el mundo, espero que quede bien.

He de empezar estos agradecimientos por el profesor don Manuel Vidal Sanz. A él no sólo le agradezco su ayuda en la consecución de esta tesis doctoral, sino también su ayuda en todo lo bueno que me ha sucedido a nivel profesional durante mi estancia en el laboratorio. Él me brindó la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación, lo que le agradeceré siempre y, con su liderazgo, tanto mis compañeros como yo hemos crecido profesional y personalmente. Su capacidad de trabajo, de crítica, de constancia, de “si haces algo, lo haces bien”, por ello, por tanto, siempre será un referente en mi vida.

A Marta Agudo Barriuso le tengo que agradecer gran parte de esta tesis. Por sus consejos constantes, por su ayuda infinita, por ser una fuente inagotable de buenas ideas, paciencia, esfuerzo y sobre todo por tener siempre la puerta abierta.

Subrayar también mi agradecimiento a Marcelino Avilés Trigueros, el cual ha lidiado con gran soltura, determinación y eficacia, mis dudas y problemas presentados a lo largo del desarrollo de esta tesis, sin escatimar tiempo ni medios. Ha sido durante todo este tiempo un apoyo constante y necesario, tanto para mí, como para mis compañeros.

Mi agradecimiento también a María Paz Villegas Pérez por varias razones. Entre ellas por su inteligencia, su buen juicio y su crítica perspicaz que siempre demuestra en los seminarios que impartimos y, que sin duda, me ayudan a mejorar día a día.

Paloma Sobrado, Ana Gómez e Inma Sellés, a pesar de no colaborar directamente con esta tesis, sí que lo han hecho de forma indirecta. Y lo han hecho de manera inconsciente, con pequeñas charlas, consejos o risas en los pasillos de la facultad o el hospital. Gracias.

A Manuel Salinas, un grande. Cuando aterricé en el laboratorio, él me acogió como su pupilo. Me enseñó todas las técnicas habidas y por haber sin reparar en tiempo ni energías. Sólo él sabe cuánta paciencia tuvo que tener pero, por eso, y, por todo, siempre le estaré en deuda.

A Luis Alarcón, quien me amparó en el laboratorio como a un hermano pequeño. No hay día que no se le eche de menos en el trabajo, en las pachangas y en las cervezas. Todo un ejemplo de trabajo y de buena persona.

A Diego García, Arturo Ortín y Francisco Nadal. Mis compañeros para todo. Con ellos he vivido todos (o casi todos) mis años en el lab. Hemos vivido grandes experiencias juntos: nuestra estancia en Londres, los experimentos que salen, los que no, los “cambia la figura”, los “ahora no me gusta”,.... En fin, grandes compañeros. Grandes amigos.

A Manuel Jiménez, indispensable en esta tesis, y en todas las del laboratorio. Sin él no seríamos nada y sin nosotros él...sería más feliz. Lamentablemente emigró pero nos dejó su trabajo como legado y un buen número de macros informáticos que nos hacen la vida más sencilla a la hora de contar poblaciones neuronales.

A los demás ópticos de lab, Caridad Galindo, Johnny Di Pierdomenico, Miriam Sánchez-Migallón y José Miguel Sánchez. Compañeros de lab y de profesorado, muchas gracias por el apoyo diario y por estar siempre disponibles.

A José por su ayuda en todo momento y porque no es lo mismo decir “Jose, ¿me puedes hacer paraformaldehido, por favor?” que “¡¡¡Pepeiiiiin, una de para!!!”. A Lola, nuestra madre administrativa. A Leti y Sergio por todos los momentos compartidos, que en este laboratorio, no son pocos.

A todas las personas que más o menos tiempo, pasaron por el laboratorio: Isa, Juanjo, Luis Montalbán, Fernando, Yolanda, Giuseppe, Maria Helena Madeira, Lidia y Mari Cruz.

A Anthony Vugler, Ma’ayan Semo y Pete Coffey por acogerme en su laboratorio para realizar una estancia de 3 meses allá por el año 2010 y empezar una colaboración investigadora que aún sigue a día de hoy.

También mencionar a Ulla Näpänkangas, Nicolas Mars-Armstrong, Nicolas Froger y Lieve Moons, responsables de mis estancias de colaboración por sus laboratorios en Oulu, Baltimore, París y Leuven, respectivamente.

Y estas últimas líneas se las quiero dedicar a mi familia. A mis padres, Juan y Paqui, que me han apoyado en todo momento, siempre a mi lado y han contribuido de una manera muy especial, con gran interés y preocupación. ¡Al fin la terminé! A mi hermano Juan, que siempre ha sido un referente para mí, y a mi hermana Elena, “mi ojico” derecho. También me gustaría dedicar la consecución de esta tesis a mis abuelos Antonio, Mercedes, Esteban y Paquita.

Y para terminar, mi Mariluz. Mi apoyo constante, mi luz, mi equipo, mi amor.

ii) RESUMEN

Introducción

La retina es una parte del cerebro que se separa de él durante las etapas iniciales del desarrollo, pero que conserva sus conexiones por medio de un haz de fibras que forman el nervio óptico y, por lo tanto forma parte del sistema nervioso central (SNC). La función principal de la retina es la fototransducción; es decir, la captación de la energía de las ondas electromagnéticas comprendidas en el espectro de luz visible y su transformación en energía eléctrica. Esta función es llevada a cabo por los fotorreceptores, que se encuentran en la capa externa de la retina. La información visual generada pasa a través de las células bipolares a las células ganglionares de retina (CGR), que se localizan en la capa interna. Las CGR son las únicas neuronas eferentes de la retina y transmiten la información visual a través de sus axones, que forman el nervio óptico, al cerebro para su procesamiento. Además de la formación de imágenes, existen otras funciones que se desencadenan en respuesta a la luz como son el reflejo pupilar o la sincronización del ritmo circadiano, que son conocidas como “extravisuales”, o como sistema visual no formador de imágenes. Los ritmos circadianos son ciclos biológicos endógenos que regulan y sincronizan nuestro cuerpo con la luz solar durante las 24 horas del día. Los ritmos circadianos se mantienen incluso cuando el organismo está privado de luz o de señales ambientales que marcan los cambios de horario, lo que indica que se mantienen por la actividad de un reloj interno endógeno. Este sistema visual no formador de imágenes, paralelo al sistema formador de imágenes, o visual, depende de CGR que expresan un fotorreceptor, la melanopsina, y que son sensibles a la luz (CGRm). En rata, las CGRm constituyen el 2,6% de la población total de CGR y su distribución no es homogénea a lo largo de la retina, ya que son más abundantes en la zona superior-temporal de la misma (Nadal-Nicolás y cols., 2012, 2014; Galindo-Romero y cols., 2013b).

La neuropatía óptica glaucomatosa (NOG) es una de las enfermedades oculares neurodegenerativas más frecuentes. Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración paulatina de la capa de fibras nerviosas de la retina, que cursa con escotomas en el campo visual y puede evolucionar a la ceguera completa. El aumento de la presión intraocular es el factor de riesgo más importante aunque en la actualidad aún se desconocen las causas por las se produce esta degeneración en las fibras. Para intentar profundizar en los mecanismos neurodegenerativos del glaucoma hemos utilizado un modelo experimental de hipertensión ocular (HTO) inducido por fotocoagulación láser en ratón y en rata.

Existen numerosos estudios con diferentes estrategias de neuroprotección en modelos animales de HTO. El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es una neurotrofina implicada en la supervivencia, crecimiento, regeneración, proliferación, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis de las neuronas en el sistema nervioso. Tras una lesión en los axones de las CGR se produce una sobreexpresión de BDNF antes de que éstas mueran por apoptosis, por lo que la administración de este factor neurotrófico en un modelo animal de HTO puede ser de ayuda para comprender mejor el curso de esta enfermedad y su posible retraso.

Objetivos

Los objetivos generales de esta tesis son:

- Caracterizar la población de CGRm del ratón pigmentado y albino adulto.
- Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO en ratón pigmentado.
- Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO y su protección con BDNF en rata albina adulta.

Material y métodos

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratones machos pigmentados adultos (C57BL/6) (25-35 gr), ratones machos albinos (Swiss) (30-35 gr) y ratas hembras adultas albinas Sprague-Dawley (SD) (180-220 gr). Las manipulaciones de los animales se realizaron siguiendo la normativa europea (Directiva 2010/63/UE) y nacional (RD 53/2013) vigente sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. De la misma forma, se siguieron las directrices de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO). Además, se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor y el malestar después de la cirugía.

Caracterización de la población de CGRm del ratón pigmentado y albino adulto:

Para estudiar la localización de las CGRm y las CGR en la capa de CGR y en la capa nuclear interna (n = número de retinas; n=4), se inmunodetectaron secciones transversales de retina con el anticuerpo contra la melanopsina, con el anticuerpo contra Brn3a y se contratiñeron los núcleos de todas las células de la retina con DAPI.

Para estudiar si las CGRm proyectan sus axones a través del NO (n=10 en pigmentados, n=8 en albinos) se marcaron retrógradamente toda la población de CGR con un trazador neuronal (OHSt) aplicado en el muñón del NO y las retinas se inmunodetectaron frente a melanopsina en montajes globales a plano.

Para estudiar la proyección de las CGRm a los colículos superiores (CS) (n=7 en pigmentados, n=10 en albinos) se aplicó en ambos CS el trazador neuronal OHSt y las retinas se inmunodetectaron frente a melanopsina en montajes globales a plano.

Para estudiar el número y la distribución de las CGRm y su colocalización con el marcador de CGR, el Brn3a (n=12 en pigmentados, n=11 en albinos), las retinas se inmunodetectaron frente a melanopsina y Brn3a.

Estudio de la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO en ratón pigmentado:

Para caracterizar el modelo de hipertensión ocular y poder estudiar la curva de presión intraocular inducida y el daño en el transporte axonal anterógrado provocado, los ratones (n=44) fueron sometidos a fotocoagulación láser de las venas perilimbareas y episclerales. Cuatro días antes de ser procesados, a los ojos experimentales se les inyectó intraocularmente el trazador neuronal anterógrado de la subunidad B de la toxina colérica (CTB), y se estudiaron los CS a los 10 días, 8 y 14 semanas.

Para estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR y las CGRm provocado (n=14), las CGR fueron trazadas retrógradamente desde los CS con OHSt y las retinas se inmunodetectaron con Brn3a y melanopsina, y se analizaron a las 2 y 4 semanas.

Para analizar si el daño provocado tras HTO es selectivo de las CGR en la capa de CGR o si afecta a otra población celular (n=8) las retinas hipertensas de 4 semanas se inmunodetectaron con Brn3a y los núcleos se contratiñeron con DAPI.

Degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO y su protección con BDNF en rata albina adulta:

Para estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR tras HTO en retinas tratadas con BDNF o vehículo (n=24 BDNF; n=21 Vehículo) las CGR fueron trazadas retrógradamente desde los CS con FG, las retinas se inmunodetectaron con Brn3a y se analizaron a 12 y 15 días tras la inducción de la HTO.

Para estudiar la distribución de la población de las CGRm en retinas tratadas con BDNF o vehículo, se utilizaron parte de las retinas del grupo anterior (n=8 BDNF; n=8 Vehículo) y se inmunodetectaron con melanopsina.

Para analizar si los vasos retinianos superficiales se ven afectados tras HTO, se utilizaron parte de las retinas del primer grupo analizado a los 15 días (n=2 BDNF; n=2 Vehículo) y se inmunodetectaron con el anticuerpo rat endothelial antigen 1 (RECA-1).

Todas las retinas fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia equipado con una platina motorizada controlada por un sistema de análisis de imagen, Image-pro plus® 5.1 para Windows™ (IPP, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EEUU). Para hacer reconstrucciones de las retinas completas, se capturaron imágenes individuales de forma secuencial y no solapada comprendiendo toda la superficie de la retina. Las imágenes digitales individuales fueron procesadas por una serie de rutinas específicas para cada marcador y especie,

desarrolladas con el programa de análisis de imagen IPP para realizar el contaje automático. Los datos cuantitativos obtenidos de cada retina se usaron para generar los correspondientes mapas de isodensidad de las CGR. Las CGRm fueron contadas manualmente y posteriormente se realizaron sus correspondientes mapas de vecinos más próximos.

Las secciones de cerebro de ratón se examinaron y fotografiaron en un microscopio (Axiosphot; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con una cámara digital de alta resolución (AxioCam HR; Carl Zeiss Vision GmbH, München-Hallbergmoos, Alemania). Las imágenes fueron procesadas por medio de una subrutina informática específica para cuantificar el área de inmunoreactividad positiva frente a CTB en secciones de cerebro.

Todos los datos de promedio se presentan como medias con desviaciones estándar (DE). El análisis estadístico se realizó usando el programa SigmaStat® 3.1 para Windows™ versión 3.11 (Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU). El test Kruskal-Wallis se utilizó cuando se compararon dos o más grupos y el test Mann-Whitney cuando se compararon dos grupos solamente. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

Resultados

Los datos experimentales muestran que tanto los ratones pigmentados como los ratones albinos tienen un número similar de CGRm (1.021 ± 109 CGRm en pigmentado y 962 ± 169 CGRm en albino). En cambio, su distribución espacial es ligeramente diferente; mientras que en los ratones pigmentados las CGRm son más abundantes en la retina temporal, en los albinos están más localizadas en la retina superior. En ambas cepas, las CGRm están localizadas mayoritariamente en la periferia de la retina, que se corresponde con el área de baja densidad de las CGR marcadas con Brn3a. Ambos ratones también tienen CGRm desplazadas (CGRm-d) en la capa nuclear interna, que representan el 14% del total de CGRm en ratones pigmentados y el 5% en los albinos. El marcaje desde ambos CS muestra que el 98% (pigmentado) y el 97% (albino) de la población total de CGRm se marcan retrógradamente, mientras que el estudio de colocalización de melanopsina y Brn3a confirma que un porcentaje muy pequeño de CGRm expresa este factor de transcripción en ratones. Un dato llamativo en el estudio del marcaje retrógrado colocando OHSt en el muñón del nervio óptico fue que no todas las CGRm eran trazadas. Existía una subpoblación de CGRm-d (14% en pigmentados y 28% en albinos) y CGRm residentes en la zona ciliar marginal de la retina (20% en pigmentados y 24% en albinos) que no se trazaban desde el nervio óptico; por lo que estas células no envían el axón a través del nervio óptico.

En el estudio de la caracterización del modelo de hipertensión ocular en el ratón pigmentado observamos un aumento significativo de la presión intraocular (PIO) significativo en el ojo experimentales (izquierdo) desde las primeras 6 horas de la fotocoagulación láser hasta los 5 días. A partir del séptimo día los valores de PIO son basales y siguen normales durante el resto

del experimento. Los ojos derechos no tuvieron ninguna variación de la PIO durante todo el experimento y se utilizaron como ojos control.

En ratón pigmentado, la HTO resulta en una pérdida difusa y/o sectorial de CGR trazadas con el trazador neuronal OHSt (CGR OHSt⁺) (50% a las 2 semanas y 62% a las 4 semanas). Sin embargo, a las 2 semanas aún se observa un 66% de CGR marcadas con Brn3a (CGR Brn3a⁺). Esto indica que sobreviven en la retina aproximadamente un 16% de CGR cuyo transporte axonal retrógrado está comprometido. Parte de estas CGR acaban muriendo y a las 4 semanas el número de CGR trazadas con OHSt e inmunodetectadas con Brn3a se iguala. La población de CGRm disminuyó aproximadamente al 59% a las 2 semanas y al 46% a las 4 semanas, valores similares a los de las CGR Brn3a⁺ para los mismos tiempos. La distribución topográfica de la pérdida de CGRm, aunque era mayor en la zona supero-temporal de retina no era sectorial, sino más bien difusa a lo largo de la retina y no se complementaba con la distribución de la pérdida del resto de CGR. En la capa de CGR, la pérdida de células tras la HTO es selectiva para las CGR y no afecta a otras neuronas de esta capa. La inervación retino-tectal se redujo significativamente a los 10 días (55,7%) y se mantuvo hasta las 14 semanas (46,6%).

En rata albina, la HTO resulta en una pérdida sectorial de las CGR FG⁺ (78 y 84% a los 12 y 15 días, respectivamente). El número de CGR Brn3a⁺ fue significativamente mayor para ambos tiempos de estudio, esto indica que una proporción considerable (≈21 - 26%) de CGR sobreviven en la retina con su transporte axonal retrógrado deteriorado. Las CGRm también presentaron una disminución significativa de aproximadamente 50-51% y esta pérdida, al igual que en ratón, fue difusa. La administración intravítrea de BDNF aumentó la supervivencia de las CGR Brn3a⁺ a 81% y 67% a los 12 y 15 días, respectivamente, pero no tuvo ningún efecto sobre las CGRm. El estudio de la vascularización de la retina interna no presentaba ninguna anomalía que pudiera explicar la pérdida sectorial de CGR.

Conclusiones

Las CGRm son más abundantes en las regiones periféricas y supero-temporales de la retina del ratón pigmentado y albino, y la gran mayoría de ellas proyectan sus axones a los CS. En general, las CGRm no expresan el factor de transcripción Brn3a. Existe un tipo de CGRm que no proyecta su axón a través del nervio óptico y que puede ser considerada una interneurona de la retina, quizá relacionada con el reflejo pupilar intrínseco.

En el ratón pigmentado, tras dos semanas de la fotocoagulación láser, una población de CGR cuyo transporte axonal está dañado sobrevive en la retina y, a las 4 semanas parte de estas CGR degeneran. Las CGRm mueren en igual proporción que el resto de CGR tras HTO, pero su distribución no se correlaciona con la topografía del resto de la población de CGR, siendo principalmente difusa y no sectorial. El daño provocado tras HTO es selectivo de las CGR en la

capa de CGR y no afecta a otras neuronas de esta capa. Los CS, principales núcleos retinorecipientes del cerebro, reciben menos de la mitad de las aferencias procedentes de la retina tras HTO, respecto a un animal normal.

En rata albina, a los 12 ó 15 días después de la fotocoagulación láser existe una pérdida de aproximadamente el 57 o 58% de la población de CGR y el 50 o 51% de la población de CGRm, respectivamente. La distribución de las CGRm supervivientes, al igual que en ratón, difiere de la distribución del resto de CGR. La administración intravítrea de BDNF antes del láser resulta en un rescate de aproximadamente el 39 o 26% de CGR no melanopsínicas en comparación con los controles tratados con vehículo a los 12 o 15 días tras HTO, respectivamente. La administración intravítrea de BDNF no tiene ningún efecto en la supervivencia de las CGRm. Por lo tanto, los datos indican que las CGRm no son más resistentes a la HTO que el resto de CGR.

iii) SUMMARY

Introduction

The retina is a part of the brain that has been separated from this structure during the early stages of development but retains its connections by a bundle of fibers that form the optic nerve and therefore forms part of the central nervous system (CNS). The main function of the retina is the phototransduction, which consists in capturing the energy of electromagnetic waves in the visible light spectrum and its transformation into electric energy. This function is carried out by the photoreceptors that are located in the outer layer of the retina. This generated visual information passes through the bipolar cells to ganglion cells of the retina (RGC), which are located in the inner layer. The RGC are the unique efferent neurons of the retina and sent this visual information through their axons, which form the optic nerve to the brain for processing. In addition to the formation of images, there are other functions that are triggered in response to light such as pupillary reflex and synchronization of circadian rhythms that are known as "extravisuals" or non-image forming visual system. The circadian rhythms are endogenous biological cycles that regulate and synchronize our body with sunlight 24 hours a day. These circadian rhythms are maintained even when the body is private of light or environmental signs that indicate timetable changes, indicating that are kept by the activity of an endogenous internal clock. This non-image forming visual system, parallel to the image forming or visual system, depends on the RGC which express a photopigment, the melanopsin, and which are sensitive to light (m^+ RGC). In rat, the m^+ RGC constitute 2.6% of the total population of RGC and its distribution is not homogeneous throughout the retina, they are more abundant in the supero-temporal area of the retina (Nadal-Nicolás et al., 2012, 2014; Galindo-Romero et al., 2013b).

Glaucomatous optic neuropathy (GON) is one of the most frequent neurodegenerative ocular diseases. This disease is characterized by the gradual degeneration of the nerve fiber layer of the retina that courses with scotomas in the visual field and which without treatment may evolve to complete blindness. The increase of intraocular pressure is the most important risk factor although currently, the causes of why the degeneration is produced in the fibers remain unknown. To try to understand the degenerative mechanisms of glaucoma we have used an experimental model of ocular hypertension (OHT) induced by laser photocoagulation in mouse and rat.

There are numerous studies with different strategies of neuroprotection in animal models of OHT. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin that acts in the survival, growth, regeneration, proliferation, differentiation and maintenance of homeostasis in neurons in the CNS and in the peripheral nervous system (PNS). After an injury to RGC's axons an overregulation of BDNF is produced before they die by apoptosis, so the administration of this neurotrophic factor in an animal model of OHT can be help to understand a bit more the course of this disease and its possible delay.

Objectives

The main objectives of this thesis are:

- Characterization of the mRGC population of adult pigmented and albino mouse.
- Study the RGC and mRGC degeneration after OHT in the pigmented mouse.
- Study the RGC and mRGC degeneration after OHT and their protection with BDNF in adult albino rat.

Material and methods

To perform the experiments we used adult pigmented (C57BL/6) mice with a weight ranging 25-35 grs, adult albino (Swiss) mice with a weight ranging 30-35 grs and female adult albino Sprague-Dawley (SD) rats with a weight ranging 180-220 grs. Manipulations of animals were carried out according to the European (Directive 2010/63/UE) and National (RD 53/2013) regulations existing on the protection of animals used for experimentation and other scientific purposes. We also followed the guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). In addition, adequate measures were taken to minimize pain and discomfort of animals after surgery.

Characterization of the mRGC population of the adult pigmented and albino mouse:

To study the location of the mRGC and the RGC in the RGC layer and in the inner nuclear layer (n = number of retinas; n=4), cross sections of retina were immunoreacted with anti-melanopsin antibody, with anti-Brn3a antibody and stained with DAPI to label the nuclei of all cells of the RGC layer.

To study whether the mRGC project their axons through the ON (n=10 in pigmented, n=8 in albino) the entire population of RGC was retrogrady traced with a neuronal tracer (OHSt) applied to the stump of the ON and retinas were immunodetected against melanopsin in whole mounts.

To study the projection of the mRGC to the superior colliculi (SC) (n=7 in pigmented, n=10 in albino), the neuronal tracer OHSt was applied in both SC and retinas were immunodetected against melanopsin in whole mounts.

To study the number and the distribution of the mRGC and its colocalization with the RGC marker, Brn3a (n=12 in pigmented, n=11 in albino), retinas were immunodetected against melanopsin and Brn3a in whole mounts.

Study of the degeneration of the RGC and the mRGC after OHT in the pigmented mouse:

To characterize the ocular hypertension model and to study the time course of the intraocular pressure and the damage induced in the antegrade axonal transport induced (n=44), mice were subjected to laser photocoagulation of the perilimbar and episcleral veins. Four days before being processed, experimental eyes were intraocularly injected with the neuronal anterograde tracer CTB (subunit β of the cholera toxin) and the SCi were studied at 10 days, 8 and 14 weeks after the induction of OHT.

To study the time course of the axonal damage and RGC and mRGC death caused (n=14), the RGC were traced from the SC with OHSt and retinas were immunodetected with Brn3a and melanopsin and analyzed at 2 and 4 weeks.

To analyze whether the damage caused by OHT was selective for the RGC in the RGC layer or if another cell population was affected (n=8), 4 weeks hypertensive retinas were immunodetected with Brn3a and stained with DAPI.

Study of the degeneration of the RGC and the mRGC after OHT and its protection with BDNF in the adult albino rat:

To study the time course of the axonal damage and RGC death after OHT in BDNF or vehicle-treated retinas (n=24 BDNF, n=21 vehicle), RGC were retrogradely traced from the SC with the retrogradely transported tracer fluorogold (FG), retinas were immunodetected with Brn3a and analyzed at 12 and 15 days after the induction of OHT.

To study the distribution of the mRGC population in BDNF or vehicle-treated retinas, some retinas from the previous group (n=8 BDNF, n=8 vehicle) were immunodetected with melanopsin.

To analyze whether the superficial retinal vessels were affected after OHT, some retinas from the first group analyzed at 15 days (n=2 BDNF, n=2 vehicle) were immunodetected with rat endothelial antigen 1 antibody (RECA-1).

All retinas were examined and photographed under a fluorescence microscope equipped with a motorized stage controlled by an image analysis system: Image-pro plus[®] (IPP 5.1 for Windows[®]; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). To make reconstructions of the complete retinas, we captured individual images in a sequential and not overlapping manner to cover the entire surface of the retina. Individual digital images were processed by a series of specific routines for each marker and species, developed with the analysis image program IPP to perform the automatic counting. The quantitative data obtained from each retina were used to generate the

corresponding isodensity maps of the RGC. The mRGC were manually counted and their corresponding neighbors maps were made.

Sections of the mouse brain were examined and photographed under a microscope (Axiosphot; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with a digital camera of high resolution (AxioCam HR; Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos-München, Germany). The images were processed by a specific computer subroutine for counting the area marked with CTB in the brain sections.

All data are presented as means with standard deviations (SD). Statistical analysis was done using SigmaStat® 3.1 for Windows® (SigmaStat® for Windows™ Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA). Kruskal–Wallis was used when comparing more than two groups and Mann–Whitney when comparing two groups only. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Our data show that both pigmented and albino mice have a similar number of mRGC ($1,021 \pm 109$ mRGC in pigmented, 962 ± 169 mRGC in albino). On the other hand, their distribution is slightly different: the mRGC are most abundant in the temporal retina in pigmented mice, and in dorsal retina in albino mice. In both strains, the mRGC are located in the periphery of the retina, which is the area of low density of the rest of RGC labeled with Brn3a. Both mice also have displaced mRGC (d-mRGC) located in the inner nuclear layer representing 14% of the total population of mRGC in pigmented mice and 5% in albino mice. The 98% (pigmented) or 97% (albino) of the total population of mRGC were marked retrogradely from both SC, while the colocalization study of melanopsin and Brn3a confirms that a very small percentage of this transcription factor was expressed by mice mRGC. A surprising fact in the study of retrograde labeling with OHSt applied on the ON stump was that not all the mRGC were traced. A subpopulation of d-mRGC (14% in pigmented and 28% in albino) and mRGC located in the ciliary marginal zone of the retina (20% pigmented and 24% in albino) that were not traced from the optic nerve, and that means that these cells do not send an axon into the optic nerve.

In the study of the characterization of ocular hypertension model in pigmented mouse, a significant increase of the intraocular pressure (IOP) was observed from 6 hours of laser photocoagulation up to 5 days. From the seventh day, values of IOP returned to basal. Right eyes did not have any IOP variation throughout the experiment and were used as control eyes.

In the pigmented mouse, OHT results in a sectorial and/or diffuse loss of RGC traced with OHSt (OHSt⁺RGC) (50% at 2 weeks and 62% at 4 weeks). However, at 2 weeks, 66% of RGC, which were immunodetected with Brn3a (Brn3a⁺RGC) were still present. This indicates that at this time around 16% of RGC survive in the retina with their retrograde axonal transport committed.

These RGC, however, died at 4 weeks and the number of traced OHSt⁺RGC and immunodetected Brn3a⁺RGC was equal. The mRGC population decreased to 59% at 2 weeks and to 46% at 4 weeks. These percentages of loss were similar to the Brn3a⁺RGC at the same time points. The loss of the mRGC was higher in the supero-temporal area of the retina. However, this loss was not sectorial, but was diffuse along the retina, and did not parallel the distribution of loss of the rest of RGC. In the RGC layer, the loss of cells after OHT was selective for the RGC and did not affect other cells of this layer. The retino-tectal innervation was significantly reduced at 10 days (55.7%) and remained reduced until 14 weeks (46.6%).

In albino rat, OHT resulted in a sectorial loss of FG⁺RGC (78-84% at 12 and 15 days, respectively). The number of Brn3a⁺RGC was significantly higher in both times of study, which indicates that a significant proportion (\approx 21-26%) of RGC survive in the retina with their impaired retrograde axonal transport. The mRGC also presented a significant reduction of approximately 50-51%, and this loss, as in mice, was diffuse. The intravitreal administration of BDNF increased the Brn3a⁺RGC survival to 81% and 67% at 12 and 15 days, respectively, but had no effect on the mRGC. The study of the inner retinal vasculature did not show any abnormality that could explain the sectorial loss of RGC.

Conclusions

mRGC are most abundant in the peripheral and supero-temporal regions of the retina of the albino and the pigmented mouse and the vast majority of them project their axons to the superior colliculi. In general, mRGC do not express the transcription factor Brn3a. There is a type of mRGC that does not project its axon into the optic nerve and can be considered an interneuron of the retina, perhaps related to the intrinsic pupil reflex.

In the pigmented mouse, two weeks after laser photocoagulation, a population of RGC whose axonal transport is damaged survives in the retina and at 4 weeks these RGC degenerate. mRGC die in the same proportion as the rest of RGC after OHT, but their topographical loss mainly being diffuse and not sectorial, does not correlate with the topography of the rest of the population of RGC. Damage caused after OHT is selective to RGC in the RGC layer and does not affect other cells of this layer. The superior colliculi, major retinorecipient nuclei of the brain in rodents, receive less than half of signal from the retina after OHT than in normal animals.

In albino rat, at 12 or 15 days after laser photocoagulation there is a loss of approximately 57% or 58% of the population of RGC and 50% or 51% of the population of mRGC, respectively. The distribution of the surviving mRGC, as in mouse, differs from the distribution of the rest of RGC. Intravitreal administration of BDNF before laser results in a rescue of approximately 39% or 26% of RGC in comparison with the controls treated with vehicle at 12 or 15 days after OHT, respectively. The intravitreal administration of BDNF has no effect on the survival of the mRGC.

Therefore, the data indicate that mRGC are not more OHT-resistant than the rest of RGC and that their response to neuroprotective therapies might differ from the general RGC population.

iv) LISTA DE ABREVIATURAS

AI:	Áreas de interés
BDNF:	Factor neurotrófico derivado de cerebro (Brain-derived neurotrophic factor)
BSA:	Albúmina de suero bovino
CCGR:	Capa de células ganglionares de la retina
CFN:	Capa de fibras nerviosas de la retina
CGR Brn3a⁺:	Células ganglionares de la retina inmunodetectadas con Brn3a
CGR FG⁺:	Células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con FG
CGR OHSt⁺:	Células ganglionares de la retina trazadas retrógradamente con OHSt
CGR:	Células ganglionares de la retina
CGRm:	Células ganglionares de la retina melanopsínicas
CGRm-d:	Células ganglionares de la retina melanopsínicas desplazadas
CNE:	Capa nuclear externa
CNI:	Capa nuclear interna
CNTF:	Factor neurotrófico ciliar (ciliary neurotrophic factor)
Cols.:	Colaboradores
CPE:	Capa plexiforme externa
CPI:	Capa plexiforme interna
CS:	Colículos superiores
CTB:	Subunidad B de la toxina colérica
d:	Días
DS:	Desviación estándar
DAPI:	4', 6 diamidino-2 fenilindol
EPR:	Epitelio pigmentario de retina
ERG:	Electrorretinograma
FG:	Fluorogold
FL:	Fotocoagulación por láser
GDNF:	Factor neurotrófico derivado de células gliales (Glial cell line-derived neurotrophic factor)

HTO:	Hipertensión ocular
i.p.:	Intraperitoneal
IPP:	Image-Pro Plus
MLE:	Membrana limitante externa
MLI:	Membrana limitante interna
MTZ:	Myelination transition zone
NO:	Nervio óptico
NOP:	Núcleo de la oliva pretectal
NDS:	Suero normal de burro
NRS:	Suero normal de conejo
NSQ:	Núcleo supraquiasmático
NTG:	Glaucoma normotenso
OHSt:	Metanosulfonato de hidroxistilbamidina
PBS:	Tampón fosfato salino (0,1 M; pH 7,2-7,4)
PF:	Paraformaldehido.
PIO:	Presión intraocular
s:	Segundos
SD:	Sprague-Dawley
SE:	Segmentos externos de los fotorreceptores
SI:	Segmentos internos de los fotorreceptores
SNC:	Sistema nervioso central
SNO:	Sección del nervio óptico
SNP:	Sistema nervioso periférico
STR:	Respuesta umbral escotópica
TAR:	Transporte axonal retrógrado
Tx:	Tritón
W:	Vatios
ZMC:	Zona marginal ciliar de retina (ciliary marginal zone)

v) LISTA DE ILUSTRACIONES (Figuras y Tablas)

Figuras:

INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1**, pág. 2 Globo ocular
- Figura 1.2**, pág. 5 Esquema representativo de las capas de la retina
- Figura 1.3**, pág. 9 Localización de los colículos superiores en el cerebro del ratón
- Figura 1.4**, pág. 9 Esquema de las zonas correspondientes del campo visual en retina y colículo superior en roedor
- Figura 1.5**, pág. 16 Distribución de las CGR trazadas con OHSt desde los colículos superiores en ratón
- Figura 1.6**, pág. 19 Principales proyecciones neuronales de las CGRm de ratón
- Figura 1.7**, pág. 21 Esquema de los tipos de CGRm, sus conexiones dendríticas y sus proyecciones
- Figura 1.8**, pág. 24 Esquema de las rutas de drenaje del humor acuoso

MATERIAL Y MÉTODOS

- Figura 3.1**, pág. 52 Esquema del trazado retrógrado de las CGR aplicando el trazador en el colículo superior o en el muñón del nervio óptico
- Figura 3.2**, pág. 53 Células ganglionares de la retina (CGR) trazadas con OHSt (A, ratón) o con FG (B, rata)
- Figura 3.3**, pág. 54 Representación del trayecto seguido por el marcador neuronal, inyectado intravítreo en el ojo izquierdo y transportándose anterógradamente hasta acumularse en los terminales axonales situados en las regiones retino-tectales
- Figura 3.4**, pág. 55 Método de inducción de la hipertensión ocular mediante la fotocoagulación por láser
- Figura 3.5**, pág. 56 Tonómetro de rebote y contacto TonoLab[®] (Tiolat Oy, Helsinki, Finlandia) para animales de experimentación
- Figura 3.6**, pág. 57 Esquema de la inyección de BDNF o vehículo en los ojos experimentales de rata previo a la FL
- Figura 3.7**, pág. 66 Fotomontaje de retina

Figura 3.8 , pág. 68	Mapa de isodensidad de las CGR representado a partir de los datos de densidad celular de la retina de la Figura 3.7
Figura 3.9 , pág. 70	Distribución espacial de las CGRm en una retina derecha de rata representado por medio de un mapa de vecinos
Figura 3.10 , pág. 71	Distribución espacial de los vasos sanguíneos marcados con RECA1 en una retina derecha naïve
Figura 3.11 , pág. 72	Microfotografía de un corte de cerebro de un animal control
Figura 3.12 , pág. 73	Procesado de imagen de un corte de cerebro

RESULTADOS

Figura 4.1 , pág. 77	Identificación de CGRm en retinas trazadas desde el colículo superior y montadas a plano
Figura 4.2 , pág. 80	Retinas trazadas con OHSt desde el nervio óptico revelan que no todas las CGRm presentes en la ZMC colocalizan con OHSt
Figura 4.3 , pág. 81	Esquemas representativos de las células melanopsínicas positivas (M^+) en la ZMC de ratones pigmentados y albinos, trazados con OHSt desde el NO o los CS
Figura 4.4 , pág. 84	Distribución de las CGRm y las CGR Brn3a en retinas derechas e izquierdas de ratón pigmentado y albino
Figura 4.5 , pág. 85	Análisis cuantitativo de la distribución retiniana de las CGRm
Figura 4.6 , pág. 87	Localización de CGRm y CGRm-d en secciones transversales de retina de ratones pigmentados
Figura 4.7 , pág. 88	Distribución espacial de las CGRm-d en retinas de ratones pigmentados y albinos
Figura 4.8 , pág. 89	Cuantificación de las CGRm-d en las retinas de ratones pigmentados y albinos trazados con OHSt desde el nervio óptico
Figura 4.9 , pág. 91	Evolución de la presión intraocular tras HTO
Figura 4.10 , pág. 92	Distribución de las CGR trazadas con OHSt e inmunodetectadas con Brn3a y melanopsina en una retina control
Figura 4.11 , pág. 94	Análisis de la distribución espacial de las CGR OHSt ⁺ , Brn3a ⁺ y CGRm en retinas hipertensas a las 2 y 4 semanas tras la HTO
Figura 4.12 , pág. 96	Variabilidad en los contajes de las poblaciones de CGR tras HTO
Figura 4.13 , pág. 96	Correlación entre daño axonal y muerte de CGR

Figura 4.14 , pág. 98	La HTO afecta de forma selectiva a las CGR en la capa de células ganglionares de retina
Figura 4.15 , pág. 100	Terminales axonales trazados desde las retinas hipertensas en los CS contralaterales a la lesión
Figura 4.16 , pág. 101	Valores de la evolución de la PIO en ratas tratadas o sin tratar tras HTO
Figura 4.17 , pág. 103	Distribución espacial de las CGR FG ⁺ marcadas retrógradamente desde los CS, CGR Brn3a ⁺ y CGRm en retinas intactas
Figura 4.18 , pág. 105	Distribución espacial de las CGR FG ⁺ , CGR Brn3a ⁺ y CGRm a los 12 y 15 días tras HTO, con tratamiento BDNF o vehículo
Figura 4.19 , pág. 107-108	Estudio de los vasos retinianos internos en retinas hipertensas tratadas con BDNF o vehículo tras 15 días de HTO

Tablas:

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1 , pág. 21	Clasificación, propiedades morfológicas y proyecciones de las distintas clases de CGRm
----------------------------	--

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3.1 , pág. 48	Ratones utilizados para la caracterización de la población de CGRm
Tabla 3.2 , pág. 49	Ratones utilizados la caracterización de un modelo de HTO en ratón pigmentado y estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR provocado
Tabla 3.3 , pág. 50	Ratones utilizados la caracterización de un modelo de HTO en ratón pigmentado y estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR provocado
Tabla 3.4 , pág. 64	Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los diferentes estudios

RESULTADOS

Tabla 4.1 , pág. 76	Diámetro del soma de las CGRm y las CGRm desplazadas en la capa nuclear interna (CGRm-d) en ratones pigmentados y albinos
Tabla 4.2 , pág. 78	Las CGRm son marcadas retrógradamente en gran proporción desde los colículos superiores
Tabla 4.3 , pág. 82	Cuantificación de las CGR OHSt ⁺ , Brn3a ⁺ y CGRm

Tabla 4.4 , pág. 95	Cuantificación de las poblaciones de CGR OHSt ⁺ , Brn3a ⁺ y CGRm en las retinas experimentales y controles a las 2 y 4 semanas tras la inducción de HTO
Tabla 4.5 , pág. 97	Número total de CGR Brn3a ⁺ y núcleos DAPI ⁺ en la CCG a las 4 semanas tras la HTO
Tabla 4.6 , pág. 104	Número total de CGR FG ⁺ y CGR Brn3a ⁺ después de HTO en rata
Tabla 4.7 , pág. 106	Número total de CGRm después de HTO en rata

vi) ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Los objetivos generales de esta tesis son tres:

- Caracterizar la población de las CGR melanopsínicas del ratón adulto pigmentado y albino.
- Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO en ratón pigmentado.
- Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO y su protección con BDNF en rata albina adulta.

En esta tesis se distinguen los siguientes capítulos: introducción, objetivos, material y métodos, resultados, discusión, conclusiones, bibliografía y anexos.

La introducción consta de varios apartados. En ellos se repasa la anatomía del ojo y el sistema visual del roedor, animal de experimentación utilizado en este estudio. Dentro de este apartado se describe en profundidad la retina y sus poblaciones celulares y, en particular, las CGR. También se describe el glaucoma y se detallan los modelos de experimentación existentes, sus ventajas e inconvenientes. El último apartado se centra en el neuroprotección en el SNC y las terapias neuroprotectoras utilizadas en los modelos de degeneración del sistema visual.

En el segundo capítulo se exponen de forma breve y concreta los objetivos de este trabajo original y se justifica su realización.

El tercer capítulo corresponde a la descripción del material y métodos utilizados para la realización de la tesis. En este capítulo se describe detalladamente la organización de los grupos de animales estudiados para realizar cada uno de los objetivos marcados. La metodología utilizada para la identificación de las diferentes poblaciones celulares (trazadores neuronales retrógrados y anterógrados, inmunohistoquímica y marcadores celulares), y los métodos de análisis de imagen empleados. También se detallan las distintas técnicas empleadas, como son la inducción de hipertensión ocular en ratón y en rata, la inyección intravítrea, la toma de presión intraocular y las técnicas de marcaje retrógrado y anterógrado.

El capítulo de resultados se divide en tres apartados principales correspondientes a cada uno de los objetivos fundamentales. El primer apartado muestra los resultados de la caracterización de las células ganglionares de retina que expresan melanopsina (CGRm) en la retina de ratón pigmentado y albino adulto. El segundo, los resultados de la afectación de las células ganglionares de la retina generales (CGR) y de las CGRm tras inducción de hipertensión ocular en el ratón pigmentado adulto. En el tercer apartado se exponen los resultados obtenidos de la afectación de las CGR y de las CGRm tras inducción de HTO y su neuroprotección mediante la administración intravítrea de BDNF en rata albina adulta. En cada uno de estos apartados, tras

la descripción analítica de los resultados, se incluyen las tablas, gráficos e imágenes que ilustran y documentan las observaciones realizadas.

El quinto capítulo corresponde a la discusión, en la que se analizan de forma crítica los resultados obtenidos y se comparan con los resultados obtenidos por otros autores en estudios previos. Este capítulo está dividido en tres apartados; el primero referido a la población de CGRm del ratón pigmentado y albino, el segundo, a la degeneración de las CGR y las CGRm del ratón pigmentado adulto tras HTO y el tercero, a la degeneración de las CGR y las CGRm de la rata albina adulta tras HTO y su neuroprotección con BDNF.

En el sexto capítulo se enumeran las principales conclusiones del trabajo y los hallazgos originales más relevantes.

En la séptima y última parte, la bibliografía, se incluyen las referencias de los trabajos científicos consultados para esta tesis.

Por último, se incluyen como anexos (I, II y III) las tres publicaciones principales que recogen gran parte de los trabajos experimentales presentados en esta tesis doctoral.

vii) HALLAZGOS ORIGINALES

El desarrollo de este trabajo ha permitido documentar los siguientes hallazgos originales:

En referencia al estudio de las células ganglionares de retina melanopsínicas (CGRm) de ratón albino y pigmentado adulto:

- I. En esta tesis se ha caracterizado en profundidad la población normal y la distribución de las CGRm ortotópicas y desplazadas en ratones albinos y pigmentados adultos.
- II. Se ha estudiado la co-expresión de la melanopsina con el factor de transcripción Brn3a. Además se han descrito unas interneuronas que expresan melanopsina, no descritas previamente.

En referencia al estudio de la degeneración de las células ganglionares de retina (CGR) y de las CGRm en ratón pigmentado adulto tras hipertensión ocular (HTO):

- I. En esta tesis se han estudiado los efectos de la HTO en la degeneración de las CGR y las CGRm del ratón pigmentado adulto.
- II. En el estudio de la distribución de las CGRm tras HTO, se observó que su distribución no se correlaciona con la topografía del resto de la población de CGR, siendo principalmente difusa y no sectorial.
- III. Se ha documentado que la muerte celular causada por el incremento de la presión intraocular (PIO) en la capa de células ganglionares de retina (CGR) , es selectiva de estas células y no afecta a otra población celular en esta capa.
- IV. Se ha analizado que las regiones retinorecipientes del cerebro reciben menos de la mitad de señal procedente de la retina tras HTO que un ratón normal.

En referencia al estudio de la degeneración de las CGR y de las CGRm en rata albina adulta tras HTO y su neuroprotección con la administración del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF):

- I. Se han analizado los efectos de la administración intravítrea del BDNF en la supervivencia de la población de las CGR y de las CGRm.
- II. Al igual que ocurre en ratón, la distribución de las CGRm supervivientes tras HTO, se ha evidenciado que no se correlaciona con la topografía del resto de la población de CGR, siendo principalmente difusa y no sectorial.

- III. La administración intravítrea de BDNF antes del láser produce un rescate de CGR pero no tiene ningún efecto en la supervivencia de las CGRm.

viii) PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

Durante mi estancia en el Laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia he participado en diversos proyectos de investigación, cuyos resultados se han divulgado a través de diferentes publicaciones científicas y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales. A continuación se recopilan esas contribuciones; las señaladas con asteriscos constituyen la base experimental de esta tesis doctoral.

Artículos

Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, **Valiente-Soriano FJ**, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration.** Exp Eye Res. 2010; 90:168-83. doi:10.1016/j.exer.2009.10.003.

Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, **Valiente-Soriano FJ**, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution.** Vision Res. 2009; 49:637-47. doi:10.1016/j.visres.2009.01.010.

Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, **Valiente-Soriano FJ**, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M. **Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice.** Mol Vis. 2009; 15:2578-98

Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, **Valiente-Soriano J**, Agudo-Barriuso M, Villa P de L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection.** Vision Res. 2010; 50:2176-87. doi:10.1016/j.visres.2010.08.014.

Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, **Valiente-Soriano FJ**, Yang Z, Davis CH, Bedont JL, Son JL, Wei JO, Buchman VL, Zack DJ, Vidal-Sanz M, Ellisman MH, Marsh-Armstrong N. **Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108:1176-81. doi:10.1073/pnas.1013965108.

Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, **Valiente-Soriano FJ**, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses.** Exp Eye Res. 2011; 92:377-87. doi:10.1016/j.exer.2011.02.008.

Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, **Valiente-Soriano FJ**, de Imperial JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. **Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas.** Prog Retin Eye Res. 2012; 31:1-27. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.08.001.

Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, Ortín-Martínez A, **Valiente-Soriano FJ**, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. **IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma.** J Neuroinflammation. 2012; 9:92. doi:10.1186/1742-2094-9-92.

- Galindo-Romero C*, **Valiente-Soriano FJ***, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54:974-85. doi:10.1167/iovs.12-11207.
- de Hoz R, Gallego BI, Ramírez AI, Rojas B, Salazar JJ, **Valiente-Soriano FJ**, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. **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. 2013; 8:e83733. doi:10.1371/journal.pone.0083733.
- Pérez de Lara MJ, Santano C, Guzmán-Aránguez A, **Valiente-Soriano FJ**, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, de la Villa P, Pintor J. **Assessment of inner retina dysfunction and progressive ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma.** Exp Eye Res. 2014; 122:40-9. doi:10.1016/j.exer.2014.02.022.
- Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, **Valiente-Soriano FJ**, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. **Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers.** J Neuroinflammation. 2014; 11:133. doi:10.1186/1742-2094-11-133.
- Ortín-Martínez A*, **Valiente-Soriano FJ***, García-Ayuso D, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Nieto-López L, Nadal-Nicolás FM, Villegas-Pérez MP, Wheeler LA, Vidal-Sanz M. **A novel in vivo model of focal light emitting diode-induced cone-photoreceptor phototoxicity: neuroprotection afforded by brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF.** PLoS One. 2014; 9:e113798. doi:10.1371/journal.pone.0113798.
- **Valiente-Soriano FJ***, García-Ayuso D*, Ortín-Martínez A*, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vugler AA, Vidal-Sanz M. **Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina.** Front Neuroanat. 2014; 8:131. doi:10.3389/fnana.2014.00131.
- Vugler A, Semo M, Ortín-Martínez A, Rojanasakul A, Nommiste B, **Valiente-Soriano FJ**, García-Ayuso D, Coffey P, Vidal-Sanz M, Gias C. **A role for the outer retina in development of the intrinsic pupillary light reflex in mice.** Neuroscience. 2015; 286:60-78. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.11.044.
- Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, **Valiente-Soriano FJ**, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. **Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors.** Exp Eye Res. 2015; 132C:17-33. doi:10.1016/j.exer.2015.01.006.
- Dekeyster E, Aerts J, **Valiente-Soriano FJ**, De Groef L, Vreysen S, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Arckens L, Moons L. **Ocular Hypertension Results in Retinotopic Alterations in the Visual Cortex of Adult Mice.** Curr Eye Res. 2015; 23:1-15.
- **Valiente-Soriano FJ***, Nadal-Nicolás FM*, Salinas-Navarro MA, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M. **BDNF rescues RGCs but not ipRGCs in ocular hypertensive albino rat retinas.** Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015; 56:1924-36. doi:10.1167/iovs.15-16454.
- **Valiente-Soriano FJ**, Salinas-Navarro M, Jiménez López M, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso, M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, **Effects of ocular hypertension in the visual system of pigmented mice.** Plos One, 2015. 10:e0121134. doi:10.1371/journal.pone.0121134.

Vidal-Sanz M, **Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, García-Ayuso D, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. **Retinal neurodegeneration in experimental glaucoma**. Prog Brain Res. 2015. Submitted.

Nadal-Nicolás FM*, **Valiente-Soriano FJ***, Salinas_navarro M, Jiménez-López M, Vidal-Sanz, Agudo-Barriuso M. **Retino-retinal projection in juvenile and Young adult rats and mice**. Exp. Eye. Res. 2015. In press. doi: 10.1016/j.exer.2015.03.015.

Capítulos de libros

M. Vidal-Sanz, M. Salinas-Navarro, L. Alarcón-Martínez, **F.J. Valiente-Soriano**, M. Jiménez-López, A. Ortín-Martínez, S. Sánchez-Llerena, M. Avilés-Trigueros, M.P. Villegas-Pérez. **Elevation of the intraocular pressure results in devastating damage to the retinal ganglion cell population in adult albino rats and mice. (Actualización en investigación de retina)**. ISBN: 978-84-693-8491-6. 2010. Editorial: M^a Dolores Pinazo Durán, Impresión Ramírez S.L.

****F.J. Valiente-Soriano**, L. Alarcón-Martínez, M. Salinas-Navarro, M. Jiménez-López, M. Avilés-Trigueros, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **Ocular hypertension after laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins in adult pigmented mice: Effects on electroretinography and retino-tectal projection. (Actualización en investigación de retina)**. ISBN: 978-84-693-8491-6. 2010. Editorial: M^a Dolores Pinazo Durán, Impresión Ramírez S.L.

Galindo-Romero, C, Avilés-Trigueros, M., Jiménez-López M., **Valiente-Soriano, FJ.**, Nadal-Nicolás, FM., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso, M. **Temporal course of axotomy-induced retinal ganglion cell loss in adult mice. Actualización en investigación de retina)**. ISBN: 978-84-693-8491-6. 2010. Editorial: M^a Dolores Pinazo Durán, Impresión Ramírez S.L.

Contribuciones a congresos internacionales

M. Salinas-Navarro, M. Jiménez-López, **F.J. Valiente-Soriano**, L. Alarcón-Martínez, I. Cánovas, J.M. Bernal, M.I. Soro, M. Avilés-Trigueros, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **Laser photocoagulation of perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Effects on the retinal ganglion cell population of the albino mouse**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci. 49: E-Abstract 4353. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2007.

M. Vidal-Sanz, M. Salinas-Navarro, M. Jiménez-López, **F. J. Valiente-Soriano**, D. García-Ayuso, J.M. Bernal, I. Cánovas, T. Holmes, R.D. Lund, M.P. Villegas-Pérez. **Spatial distribution and quantitative analysis of retinal ganglion cells in adult albino rodents**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48: E-Abstract 2031. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2007.

M. Salinas-Navarro, U. Napankangas, N. Turunen, J. Veijola, **F. Valiente-Soriano**, M. P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **Effects of acute increase of intraocular pressure in adult pigmented rats: assessment of the retinal nerve fiber layer (in vivo) and the retinal ganglion cell population**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49: E-Abstract 5482. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2008.

****F. Valiente-Soriano**, M. Salinas-Navarro, M. Jiménez-López, A. Ortín-Martínez, L. Alarcón-Martínez, I. Cánovas, J.M. Bernal, M. Avilés-Trigueros, M. Vidal-Sanz. **Effects of Elevated Intraocular Pressure on the Retinal Ganglion Cell Population in Adult Pigmented Mice**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 49: E-Abstract 5480. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2008.

- **F. Valiente-Soriano**, M. Salinas-Navarro, L. Alarcon-Martinez, M. Jiménez-López, A. Ortín-Martínez, I. Cánovas-Martínez, M. Avilés-Trigueros, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **Effects of Elevated Intraocular Pressure on the Retinotectal Projection in Adult Pigmented Mice**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: E-Abstract 2779. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2009.
- **F. Valiente-Soriano**, M. Salinas-Navarro, L. Alarcón-Martínez, M. Jiménez-López, A. Ortín-Martínez, M. Avilés-Trigueros, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **Alteraciones electroretinográficas y de la innervación retino-tectal tras la fotocauterización de las venas episclerales y perilibares en ratones pigmentados adultos**. Comunicación Oral. Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid, España. 2010.
- Alarcón Martínez, Luis; Avilés Trigueros, Marcelino; **Valiente Soriano, F. Javier**; De la Villa Polo, Pedro; Vidal Sanz, Manuel. **La respuesta umbral escotópica como un índice de la función de las células ganglionares de retina en un modelo de neuropatía óptica glaucomatosa en el ratón albino**. Póster. Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica. Madrid, España. 2010.
- C. Galindo-Romero, M. Avilés-Trigueros, M. Jiménez-López, **F. Valiente-Soriano**, F. Nadal-Nicolás, S. Rodríguez-Llarena, L. Nieto-López, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso. **Time Course of Retinal Ganglion Cell Degeneration in Adult Mice After Optic Nerve Axotomy**. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: E-Abstract 637. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2010.
- L. Alarcon-Martinez, M. Avilés-Trigueros, P. De la Villa, **J. Valiente-Soriano**, M. Salinas-Navarro, M. C. Sánchez-Migallón Carreras and M. Vidal-Sanz. **Short and Long Term Axotomy-Induced ERG Changes in Albino and Pigmented Mice**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: E-Abstract 5566. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2010.
- N. Marsh-Armstrong, I. Soto, E. Oglesby, C.-H.O. Davis, E.H. Mules, **F. Valiente-Soriano**, M. Vidal-Sanz, V. Buchman, P.A. Watkins, J.V. Nguyen. **Gamma-Synuclein Aggregation and Activation of Optic Nerve Head Astrocytes**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50: E-Abstract 2100. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2010.
- Ortín-Martínez, M. Jiménez-López, F. Nadal-Nicolás, M. Salinas-Navarro, L. Alarcón-Martínez, **F. Valiente-Soriano**, Y. Sauvé, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso. **Whole Number And Retinal Topography Of S, L And Dual Cones In Retinas Of Albino And Pigmented Adult Rats**. Póster. 7th Fens Federation Of European Neuroscience Meeting. Amsterdam. Amsterdam, Holanda. 2010.
- **F. Valiente-Soriano**, L. Alarcón-Martínez, M. Salinas-Navarro, M. Avilés-Trigueros, M. Vidal-Sanz. **Alterations in electroretinography and Retino-Tectal Innervation After the Photocoagulation of the Episcleral and Perilimbal Veins in Adult Pigmented Mice**. Presentación oral. I Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Research 26: 244. Valencia, España. 2010.
- C. Galindo-Romero, M. Avilés-Trigueros, M. Jiménez-López, **F. Valiente-Soriano**, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso. **Quantitative Analysis of Retinal Ganglion Cell Degeneration in Adult Mice After Optic Nerve Axotomy**. Presentación oral. I Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Research 26: 225. Valencia, España. 2010.
- Luis Alarcon-Martinez, Luis Montalban-Soler, Manuel Jimenez-Lopez, Marcelino Aviles-Trigueros, **Francisco Javier Valiente-Soriano**, Caridad Galindo-Romero, Francisco Manuel Nadal-Nicolas, María del Cielo Sánchez-Migallón Carreras, Manuel Vidal-Sanz and Maria Paz Villegas-Perez. **Compensatory Functional Retinal Changes After Light Damage In Albino Mice**. Póster. Congreso Annual Meeting

of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci. 52: E-Abstract 708. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2011.

Arturo Ortín-Martínez, Diego García-Ayuso, **F Javier Valiente-Soriano, Manuel Jiménez-López, María P. Villegas-Pérez, Marta Agudo-Barriuso, Pete Coffey, Anthony A. Vugler, Manuel Vidal-Sanz and Ma'ayan Semo. **Population Of Melanopsin-expressing Retinal Ganglion Cells In Aging Wildtype And Rodless/coneless Mice: A Detailed Quantitative And Topographical Analysis**. Póster. Congreso Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci. 52: E-Abstract 3466. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2011.

F Javier Valiente-Soriano, Diego García-Ayuso, Arturo Ortín-Martínez, Ma'ayan Semo, Manuel Jiménez-López, Carlos Gias, María Paz Villegas-Pérez, Peter Coffey, Manuel Vidal-Sanz and Anthony A. Vugler. **Patterns Of Light-mediated C-fos Activity In The Medial Visual Cortex Of Mice Lacking Both Rods And Cones**. Póster. Congreso Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci. 52: E-Abstract 3464. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2011.

F. Javier Valiente-Soriano, García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Ma'ayan Semo, Jiménez-López M, Gias C, Nommiste B, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Coffey P, Vidal-Sanz M, Vugler AA. **Study of light-mediated C-fos activity in the medial visual cortex and the retrosplenial cortex of mice lacking rods and cones**. Presentación oral. II Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. 46:254. Valencia, España. 2011.

Beatriz I Gallego, Salazar JJ, De Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, Ortín-Martínez A, **Valiente-Soriano FJ**, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. **MHC-II Changes in the Glia of Contralateral Mice Retina to Experimental Glaucoma**. Presentación oral. II Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. 46:237. Valencia, España. 2011.

A. Ortín-Martínez, **F.J. Valiente-Soriano**, D. García-Ayuso, L. Alarcón-Martínez, M. Jiménez-López, J.M. Bernal-Garro, F. Nadal-Nicolás, M^a C. Sánchez-Migallón, M. Salinas-Navarro, M. Agudo-Barriuso, M^a P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **Characterization of a Focal Model of Photoreceptor Degeneration Induced by Phototoxicity**. Presentación oral. II Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. 46:247. Valencia, España. 2011.

Caridad Galindo-Romero, **Francisco J. Valiente-Soriano**, Francisco M. Nadal-Nicolás, Manuel Salinas-Navarro, Arturo Ortín-Martínez, M^a Cielo Sánchez-Migallón, Diego García-Ayuso, M^aPaz Villegas-Perez, Marta Agudo-Barriuso, Manuel Vidal-Sanz. **Effect of brain-derived neurotrophic factor on the survival of axotomized retinal ganglion cells in the adult pigmented mice**. Presentación oral. II Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Research. 46: 236. Valencia, España. 2011.

Manuel Salinas-Navarro, Francisco Nadal-Nicolás, Leticia López-Nieto, Manuel Jiménez-López, Arturo Ortín-Martínez, Caridad Galindo-Romero, **F. Javier Valiente-Soriano**, M^a Cielo Sánchez-Migallón, M. Avilés-Trigueros, Marta Agudo Barriuso, M^aP. Villegas-Pérez, Manuel Vidal-Sanz. **Ocular Hypertension Induces in the Ganglion Cell Layer of Adult Albino Rats Specific Retinal Ganglion Cell Loss**. Presentación oral. II Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. 46:251. Valencia, España. 2011.

M^a Cielo Sánchez-Migallón, Manuel Salinas-Navarro, Francisco Nadal-Nicolás, Leticia Nieto López, Paloma Sobrado Calvo, Diego Gracia Ayuso, **Francisco J. Valiente-Soriano**, Caridad Galindo-Romero, Sergio Rodríguez-Llanera, M^a Paz Villegas-Pérez, Manuel Vidal-Sanz, Marta Agudo-Barriuso. **Nerve Fiber Layer Degeneration After Optic Nerve Axotomy in Adult Mouse**. Presentación oral. II Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. 46:252. Valencia, España. 2011.

- M. Soro-Martínez, D. García Ayuso, **F.J. Valiente-Soriano**, L. Alarcón-Martínez, J. García-González, P.Sobrado-Calvo. **Evolución de la agudeza visual en población pediátrica**. Poster. OPTOM2012: 22 CONGRESO INTERNACIONAL DE OPTOMETRÍA, CONTACTOLOGÍA Y ÓPTICA OFTÁLMICA. Madrid, España. 2012.
- M. Soro-Martínez, D. García Ayuso, **F.J. Valiente-Soriano**, L. Alarcón-Martínez, J. García-González, P.Sobrado-Calvo. **Evolución de la agudeza visual en población pediátrica**. Poster. OPTOM2012: 22 CONGRESO INTERNACIONAL DE OPTOMETRÍA, CONTACTOLOGÍA Y ÓPTICA OFTÁLMICA. Madrid, España. 2012.
- C. Galindo-Romero, **F.J. Valiente-Soriano**, D. García Ayuso, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso. **Efecto de la inyección intravítrea de BDNF en la muerte de células ganglionares de retina en un modelo murino de lesión traumática**. Comunicación oral. OPTOM2012: 22 CONGRESO INTERNACIONAL DE OPTOMETRÍA, CONTACTOLOGÍA Y ÓPTICA OFTÁLMICA. Madrid, España. 2012.
- Beatriz I. Gallego, Ana I. Ramirez, Rosa De Hoz, Juan J. Salazar, Blanca Rojas, Alberto Trivino, **F Javier Valiente-Soriano**, Manuel Salinas-Navarro, Marcelino Aviles-Trigueros, Jose-Manuel Ramirez. **IOP Induces MHC-II Overexpression In Microglia And Macroglia In Contralateral Mice Retina To Experimental Glaucoma**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci. 52: E-Abstract 2027. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2012.
- Arturo Ortin-Martinez, Francisco M. Nadal-Nicolás, Manuel Salinas-Navarro, **Francisco-Javier Valiente-Soriano**, Juan-Jose Alburquerque-Bejar, Jose M. Bernal-Garro, Leticia Nieto-Lopez, Maria-Paz Villegas-Perez, Marta Agudo-Barriuso, Manuel Vidal-Sanz. **Ocular Hypertension In The Adult Rat Retina Results In Protracted Loss Of S- And L-cones**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci. 52: E-Abstract 2488. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2012.
- Maria-Cielo Sanchez-Migallon, Manuel Salinas-Navarro, Manuel Jimenez-Lopez, Francisco Nadal-Nicolas, Leticia Nieto-Lopez, **F. Javier Valiente-Soriano**, Paloma Sobrado-Calvo, Maria-Paz Villegas-Perez, Manuel Vidal-Sanz, Marta Agudo-Barriuso. **Quantitative And Qualitative Analyses Of The Nerve Fiber Layer Degeneration After Optic Nerve Axotomy In Adult Mice**. Póster. Annual Meeting of "The Association for Research in Vision and Ophthalmology" (ARVO). Invest Ophthalmol Vis Sci. 52: E-Abstract 3488. Fort Lauderdale, Miami, USA. 2012.
- **Valiente-Soriano F.J.**, Jimenez-López M., Salinas-Navarro M., Di Pierdomenico J., Bernal-Garro J.M., Agudo-Barriuso M., Villegas-Pérez M.P., Vidal-Sanz M. **Selective loss of retinal ganglion cells in the ganglion cell layer after ocular hypertension in pigmented mice**. Póster. 8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain. 2012.
- Galindo-Romero C., **Valiente-Soriano, FJ.**, Villegas-Pérez, MP., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M. **Brain-derived neurotrophic factor delays axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult pigmented mice**. Póster. 8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain. 2012.
- A. Ortín-Martínez, **F.J. Valiente-Soriano**, D. García-Ayuso, L. Alarcón-Martínez, M. Jiménez-López, J.M. Bernal-Garro, L. Nieto-López, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **Phototoxicity induced by a single LED emitting diode (LED) results in focal loss of s- and l/m-cones**. Neuroprotection with brimonidine. Poster. XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER 2012). Berlín, Alemania. 2012.
- A. Ortin-Martinez, FM. Nadal-Nicolás, M. Salinas-Navarro, **F.J. Valiente-Soriano**, JJ. Alburquerque-Béjar, MP. Villegas-Perez, M. Agudo-Barriuso, M. Vidal-Sanz. **Estudio cuantitativo y topográfico de la degeneración tardía de los fotorreceptores en un modelo de hipertensión ocular en mamífero adulto**. Poster. I Reunión de la Sociedad Gallega de Optometría Clínica. Santiago de Compostela, España. 2012.

- **M Vidal-Sanz, M. Salinas-Navarro, **FJ. Valiente-Soriano**, A Ortín-Martínez, FM. Nadal-Nicolás, L Alarcón-Martínez, M. Avilés-Trigueros, M. Agudo-Barriuso, MP. Villegas-Pérez. **Retinal neuronal death caused by ocular hypertension**. Comunicación oral. EVER 2012. Acta Ophthalmologica, 90: 0. doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.3233.x. Niza, Francia. 2012.
- Dekeyster E., De Groef L., Salinas-Navarro M., **Valiente-Soriano F.J.**, Aerts J., Vidal-Sanz M., Arckens L., Moons L. **Glaucoma and the brain: effects of ocular hypertension on the central visual pathway**. Comunicación oral. LIND Seminar. Leuven, Bélgica. 2012.
- Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, **Valiente-Soriano FJ**, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M. **Computerized measurement of rat retinal ganglion cell somatic area**. Presentación oral. III Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. Valencia, España. 2013.
- **Valiente-Soriano FJ**, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Bernal-Garro J, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M. **BDNF delays ocular hypertension-induced RGC death in rat**. Presentación oral. III Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. Valencia, España. 2013.
- M^o Cielo Sánchez-Migallón, **Valiente-Soriano FJ**, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, , Vidal-Sanz M Agudo-Barriuso M. **Mouse retinal ganglion cell loss after optic nerve crush and transaction: a comparative study**. Presentación oral. III Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. Valencia, España. 2013.
- Caridad Galindo-Romero, **Valiente-Soriano FJ**, Jiménez-López M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. **Phagocytic microglia in both eyes after unilateral intraorbital optic nerve transaction**. Presentación oral. III Congreso Anual Congreso Inaugural Internacional Sircova. Ophthalmic Res. Valencia, España. 2013.
- Montanana, RD, Gallego, BI, Rojas, B, Salazar, JJ, Ramirez, AI, Trivino, A, **Valiente-Soriano, FJ**, Vidal-Sanz, M, Ramirez, JM. **IOP Induces Upregulation Of MHC-II and GFAP In The Glia Of Contralateral Mice Retina To Experimental Glaucoma**. Póster. 11th European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. Berlin, Germany. 2013.
- Trivino, A, Gallego, BI, Rojas, B, de Hoz, R, Ramirez, AI, Salazar, JJ, **Valiente-Soriano, FJ**, Villegas-Perez, MP, Ramirez, J. **IOP Induces Qualitative But Not Quantitative Changes In Astrocytes In Mice Retina Contralateral To Experimental Glaucoma**. Póster. 11th European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease. Berlin, Germany. 2013.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo-Barriuso M, Di Pierdomenico J, **Valiente-Soriano FJ**, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. **Neuroprotección en un modelo de hipertensión ocular en rata**. Comunicación oral. OPTOM 2014 (23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica). Madrid, España. 2014.
- **Valiente-Soriano FJ**, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, García-Ayuso D, Di Pierdomenico J, Agudo-Barriuso M; Vidal-Sanz M. **Neuroprotección en un modelo de hipertensión ocular en rata**. Comunicación oral. OPTOM 2014 (23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica). Madrid, España. 2014.
- Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, **Valiente-Soriano FJ**, Agudo-Barriuso M; Vidal-Sanz M; Villegas-Pérez MP. Efecto **de la inyección intravítrea de triamcinolona sobre la retina de la rata adulta**. Póster. OPTOM 2014 (23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica). Madrid, España. 2014.
- Ortín-Martínez, A, **Valiente-Soriano, FJ**; García-Ayuso, D, Jimenez-Lopez, M; Alarcon-Martinez, L; Bernal-Garro, JM; Nieto-López, L, Agudo, M, Villegas-Perez, MP; Vidal-Sanz, M. **Characterization of a new model of focal cone degeneration induced by a Light-emitting-diode (LED)**. Póster. Association

for Research in Vision and Ophthalmology. Invest Ophthalmol Vis Sci. 55 E-Abstract 4369. Orlando, USA. 2014.

Valiente-Soriano, FJ; Ortin-Martinez, A; García-Ayuso, D, Jimenez-Lopez, M; Alarcon-Martinez, L; Bernal-Garro, JM; Nadal-Nicolas, FM; Agudo, M, Villegas-Perez, MP; Vidal-Sanz, M. **Characterization of a new model of focal cone degeneration induced by a Light-emitting-diode (LED).** Póster. Association for Research in Vision and Ophthalmology. Invest Ophthalmol Vis Sci. 55 E-Abstract 4369. Orlando, USA. 2014.

FJ Valiente-Soriano, A. Ortín-Martínez, D. García-Ayuso, M. Jiménez-López, F. Nadal-Nicolás, M Agudo-Barriuso, MP. Villegas-Pérez M. Vidal-Sanz. **Characterization of a new model of focal cone degeneration induced by a Light-emitting-diode (LED).** Póster. PAAO. Pan American Research Day. Orlando, USA. 2014.

****F.J. Valiente-Soriano,** D. García-Ayuso, A. Ortín-Martínez, M. Jiménez-López, M. Agudo-Barriuso, A.A. Vugler, M. Vidal-Sanz. **ipRGC Population in Pigmented and Albino Mice.** Comunicación oral. IV SIRCOVA INTERNATIONAL CONGRESS. Ophthalmic Res. Valencia, España. 2014.

A. Ortín-Martínez, **F.J. Valiente-Soriano,** D. García-Ayuso, M. Jiménez-López, F.M. Nadal-Nicolás, M.P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz. **Cone-Photoreceptor Neuroprotection by Brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF in a Novel in Vivo Model of Focal light Emitting Diode-Induced Phototoxicity in Adult Albino Rats.** Comunicación oral. IV SIRCOVA INTERNATIONAL CONGRESS. Ophthalmic Res. Valencia, España. 2014.

M.C. Sánchez-Migallón Carreras, **F.J. Valiente-Soriano,** F.M. Nadal-Nicolás, M. Jiménez-López, L. Nieto-López, M. Vidal-Sanz, M. Agudo-Barriuso. **Retinal Ganglion Cell Loss and caspase 3 Activation After Optic nerve Crush or transection in Mice.** Comunicación oral. IV SIRCOVA INTERNATIONAL CONGRESS. Ophthalmic Res. Valencia, España. 2014.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA DEL OJO

El globo ocular es un órgano de estructura casi esférica, formada por tres capas concéntricas: la túnica externa, la capa intermedia o úvea y la capa más interna o retina (**Figura 1.1**).

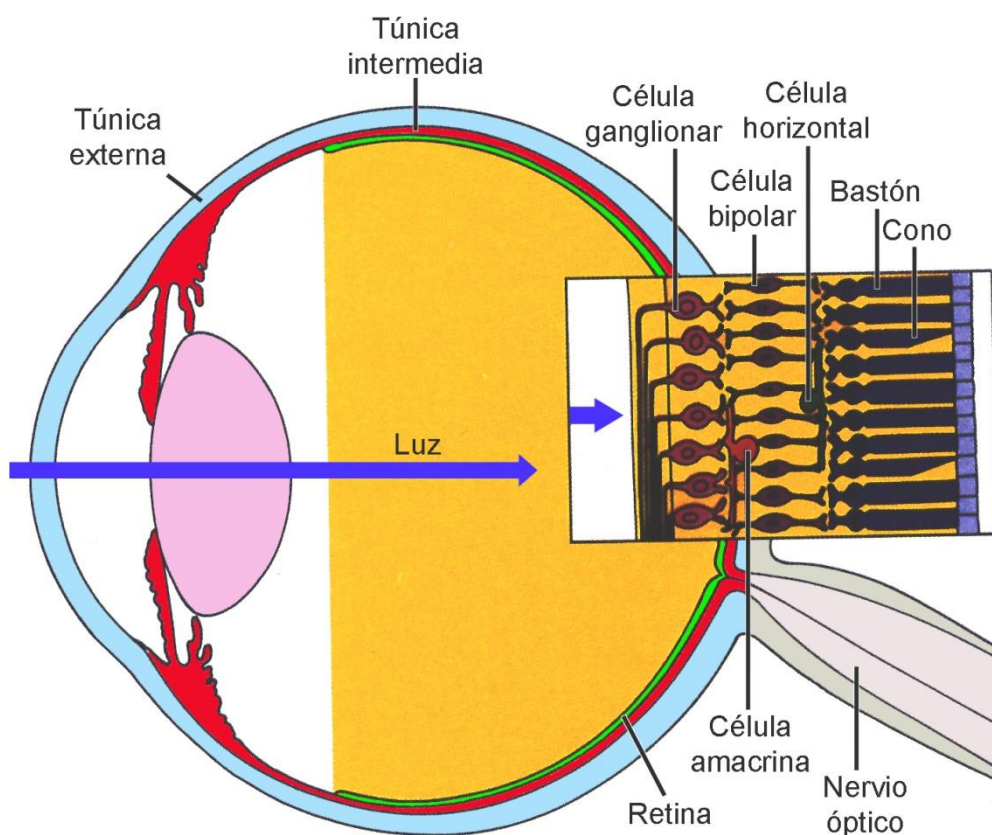


Figura 1.1. Globo ocular. Esquema del globo ocular en el que están representadas las capas que lo componen: túnica externa, intermedia y retina. Modificada de Hubel (1999).

La túnica externa está formada en el polo anterior por la córnea avascular, transparente gracias a la disposición de sus fibras de colágeno, es la primera lente del sistema óptico ocular y se encarga de refractar los rayos luminosos hacia el cristalino. A lo largo del resto del globo ocular, la túnica externa está formada por la esclerótica, de naturaleza opaca y recubierta por la conjuntiva. La unión de estas dos estructuras 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, además de evitar la reflexión de los rayos luminosos hacia el exterior. En el polo anterior del globo ocular se encuentra el cuerpo ciliar, que presenta pliegues en su superficie interna denominados procesos ciliares, que segregan el humor acuoso, un líquido que rellena y nutre el segmento anterior del ojo, por delante del cristalino. El cuerpo ciliar contiene el músculo ciliar, cuya contracción permite el abombamiento de cristalino por relajación de las fibras zonulares o ligamento suspensorio, con el fin de poder enfocar sobre la retina los objetos cercanos. A continuación del cuerpo ciliar se encuentra el iris, que es un disco opaco con un orificio central denominado pupila, situado entre la córnea y el cristalino. Posee fibras musculares radiales y circulares, las cuales se contraen o se dilatan dependiendo de la intensidad de luz, variando el tamaño de la pupila y permitiendo así el paso de luz hacia el interior del ojo.

La capa más interna o retina es el elemento neural del globo ocular. Está formada por diversas capas neuronales que transforman la luz en impulso eléctrico, procesan y envían la información visual al cerebro.

1.1.1. Organización histológica de la retina

La retina es una parte del cerebro que se ha segregado de él durante las etapas iniciales del desarrollo, pero conserva sus conexiones por medio de un haz de fibras, el nervio óptico (NO). La retina proviene, como el resto del sistema nervioso, del neuroectodermo y se forma a raíz de la vesícula óptica. La capa externa de la vesícula forma el epitelio pigmentario, mientras que la interna forma el resto de capas de la retina neurosensorial. Su fácil acceso, unido a la posibilidad de estudiar el procesamiento de la información en una porción intacta del sistema nervioso central (SNC), convierten a esta estructura en un modelo único y de gran utilidad para estudios fisiológicos y morfológicos del sistema nervioso en general (Dowling, 1987). La retina es una extensión del SNC especializada en la captación de estímulos luminosos que se encuentra alojada en el polo posterior del globo ocular. Los ojos funcionan como cámaras fotográficas sencillas; la córnea y la lente del cristalino forman en la retina una imagen invertida de los objetos que enfocan, el iris hace de diafragma pues regula la cantidad de luz que pasa a través de la pupila y la retina se corresponde con la película fotográfica sensible a la luz. La primera función de la retina consiste en la captación de la energía de las ondas electromagnéticas comprendidas en el espectro de luz visible y su transformación en energía eléctrica. Existen seis tipos neuronales en la retina: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células interplexiformes, células amacrinas y células ganglionares. Además de elementos neurales la retina está formada por elementos gliales, células de Müller, astrocitos y células de microglía.

A la retina llega la energía electromagnética dentro del espectro visible (la luz) que las células fotorreceptoras traducen en un impulso nervioso a partir de un cambio en el potencial de

membrana del fotorreceptor, esto se conoce como fototransducción. La retina está organizada en diferentes capas (**Figura 1.2**), que del exterior al interior son:

- Epitelio pigmentario de retina (EPR), formado por una monocapa de células epiteliales que limita externamente con la coriocapilar (capa más interna de la coroides, altamente vascularizada). Contiene numerosos gránulos de pigmento responsable de los fenómenos de absorción y reflexión de la luz en el interior del ojo. Además se ocupa del soporte del segmento externo de los fotorreceptores. Este epitelio no forma parte de la retina neural.
- Membrana limitante externa (MLE), formada por un entramado de complejos de unión, entre la región más externa de las células de Müller y entre éstas y los fotorreceptores.
- Capa de los segmentos externos (SE) e internos (SI) de los fotorreceptores, las células receptoras de la luz.
- Capa nuclear externa (CNE), formada por los núcleos de los fotorreceptores.
- Capa plexiforme externa (CPE), donde se producen la sinapsis entre fotorreceptores, células bipolares, células horizontales y células interplexiformes.
- Capa nuclear interna (CNI), formada por los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas, interplexiformes y células de Müller.
- Capa plexiforme interna (CPI), donde se produce la sinapsis de células bipolares, células ganglionares, células amacrinas y células interplexiformes.
- Capa de células ganglionares de la retina (CCGR), son las encargadas de enviar la información visual procesada en la retina al cerebro por medio de sus axones.
- Capa de fibras nerviosas de la retina (CFN), formada por los axones de las células ganglionares de retina.
- Membrana limitante interna (MLI), formada por los terminales de las células de Müller.

Además de neuronas, existen otras poblaciones gliales de elementos no neural como las células de Müller, de gran tamaño, que se extienden a lo largo de toda la retina de manera radial aportando sustento a las neuronas de la retina. También existen otros tipos celulares, los astrocitos, de forma estrellada que se sitúan en la capa de CGR rodeando a las fibras nerviosas y a los vasos sanguíneos (Ramírez y cols., 1996; Triviño y cols., 1996), y las células de microglía, de naturaleza fagocítica y morfología variable.

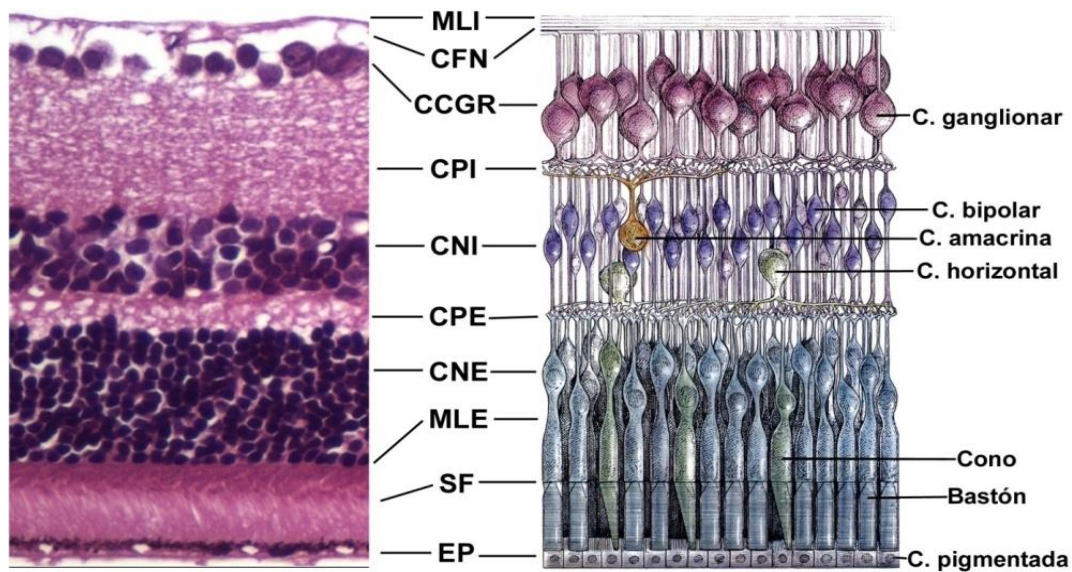


Figura 1.2. Esquema representativo de las capas de la retina. Esquema de las capas de la retina y sus partes correspondientes en una sección de retina de ratona pigmentada adulta (Imagen de la derecha modificada de Hubel, 2000).

1.2. SISTEMA VISUAL DEL ROEDOR

El sistema visual del roedor presenta una serie de ventajas técnicas que hacen que sea muy utilizado en estudios de neuroprotección y neurodegeneración. Algunas de estas ventajas son:

- La retina y el nervio óptico son parte del SNC, fácilmente accesibles para la manipulación experimental.
- La población de las células ganglionares, constituidas aproximadamente por 40.000 CGR en ratón pigmentado C57BL/6, y 50.000 CGR en ratón albino Swiss (Salinas-Navarro y cols., 2009b) han sido bien caracterizadas funcional y morfológicamente (Dowling, 2012).
- La aplicación de trazadores neuronales (tanto retrógrados como anterógrados) permiten la identificación de las CGR o sus terminales axonales en las regiones retino-tectales del cerebro (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Avilés-Trigueros y cols., 2000).

Todas estas características, junto con el hecho de que la retina de todos los mamíferos tienen la misma estructura, han hecho que el sistema visual del roedor se haya empleado ampliamente para estudiar los fenómenos de degeneración neuronal inducida por lesión.

A continuación, se detallan en profundidad dos poblaciones de neuronas fundamentales del procesamiento visual en la retina, los fotorreceptores y las CGR.

1.2.1. Los fotorreceptores

Los fotorreceptores son neuronas presentes en la retina externa, cuya función es la captación y la transformación de un estímulo luminoso en una señal eléctrica (transducción), y la transmisión de esta señal a las células bipolares y/u horizontales para continuar el procesamiento visual. Las retinas de los vertebrados tienen, al menos, dos tipos de fotorreceptores, bastones y conos. Los bastones son sensibles a bajas intensidades de luz y visión nocturna (escotópica) y los conos son sensibles a mayores intensidades lumínicas y son responsables de la visión cromática y visión diurna (fotópica). Morfológicamente, los fotorreceptores tienen tres partes: el SE, el SI, y el terminal sináptico. El segmento externo es el responsable de realizar la fototransducción y está formado por pilas de membranas que contienen los pigmentos visuales, la opsina de los bastones y las opsinas de los conos. El segmento interno es el encargado de suministrar la energía y renovar las moléculas que necesita el segmento externo, contiene el núcleo y la mayoría de las organelas citoplasmáticas; está unido al segmento externo por un cilio de conexión. El terminal sináptico varía entre bastones o conos, y se denomina esférula o pedículo, respectivamente. Los bastones son mucho más numerosos que los conos (la retina humana contiene 4-5 millones de conos y 80-110 millones de bastones). Además, los bastones tienen mayor sensibilidad, aunque los conos poseen una mayor resolución temporal (Arendt, 2003). Los encargados de captar el estímulo luminoso son las opsinas, o fotopigmentos, que se sitúan en los segmentos externos de los fotorreceptores.

Estos fotopigmentos son distintos para bastones y para conos: los bastones expresan la rodopsina, y los conos expresan una opsina específica, dependiendo del tipo de conos y de la longitud de onda a la que sea sensible. En humanos, existen tres tipos de conos, y cada cual tiene su propia opsina: opsina azul, opsina verde y opsina roja. La rodopsina responde óptimamente a longitudes de onda 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 a 450 nm y se conoce como opsina S (del inglés "*short-wavelength*"), la opsina verde a 530 nm y se conoce como opsina M ("*medium wavelength*") y la opsina roja a 565 nm y se conoce como opsina L ("*long wave length*") (Yokoyama, 2000).

En los roedores, aparte de los bastones, 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 son capaces de percibir, como la luz roja. En numerosos estudios utilizan esta luz para poder manipular al animal sin que éste perciba luz, y se mantenga en "condiciones de oscuridad" (Alarcón-Martínez y cols., 2009, Salinas-Navarro y cols., 2009c).

En nuestro laboratorio de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, se han caracterizado los segmentos externos de las poblaciones de fotorreceptores en rata y ratón, y se ha 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 segmentos externos tienen ambas opsinas y, por tanto, se les considera conos duales (Ortín-Martínez y cols., 2010).

En cambio, en el ratón pigmentado, se ha documentado que el número de conos L y S es muy parecido ($135,155 \pm 8,742$ vs $119,616 \pm 8,756$, respectivamente) y el 40% de ellos son duales (Ortín-Martínez y cols., 2014). Los conos L presentan una distribución similar a la observada en la retina de rata, con mayor densidad en la zona central de la retina; mientras que los conos S se localizan preferentemente en la zona inferotemporal de la retina (Ortín-Martínez y cols., 2014).

Hasta hace una década se pensaba que en los mamíferos los fotorreceptores (conos y bastones) eran las únicas neuronas capaces de ser sensibles a los estímulos luminosos. Sin embargo, actualmente sabemos de la existencia de un tercer tipo de neurona sensible a la luz en la retina: las CGR intrínsecamente fotosensibles, también denominadas melanopsínicas (CGRm) ya que expresan el fotopigmento melanopsina. Se trata de un subtipo de CGR que responde directamente a la luz (Provencio y cols., 1998). Sus propiedades se tratarán en profundidad en el apartado 1.2.3 de esta tesis.

1.2.2. Las células ganglionares de la retina (CGR)

Las CGR son las únicas neuronas eferentes de la retina, se encargan de recoger la información visual procesada en la retina y la envían a través de sus axones, que forman el NO, al cerebro para su procesamiento. La inmensa mayoría de las CGR se encuentran en la CCGR, aunque una minoría, las llamadas células ganglionares desplazadas, se encuentran en la CNI (Dogiel, 1985; Perry, 1979; Dräger y Olsen 1981; Nadal-Nicolás y cols., 2014).

Existen muchas clasificaciones de las CGR, dependiendo del tamaño del soma, de sus conexiones dendríticas, de su estratificación, de sus características funcionales o moleculares. Se han descrito hasta 22 subtipos de CGR en la retina del ratón adulto (Coombs y cols., 2006; Volgyi y cols., 2009), una clasificación similar a la descrita en el gato y hombre (Kolb y cols., 1981, 1992). Existen anticuerpos específicos que nos permiten identificar a una subpoblación de CGR con una determinada funcionalidad. Por ejemplo, podemos identificar el pigmento melanopsina que se expresa en una determinada subpoblación (CGRm) y que tiene funciones “no formadoras de imágenes”, como la regulación del tamaño pupilar o la sincronización de los ciclos circadianos (Provencio y cols., 2000; Berson y cols., 2010; González-Menéndez y cols., 2009; Hattar y cols.,

2002). Otro ejemplo es la proteína Jam-B que se encuentra en un subtipo de CGR-OFF y responden a la supravversión (movimiento hacia arriba de mirada) (Kim y cols., 2008).

La población de CGR de roedores ha sido muy bien caracterizada por nuestro laboratorio (Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2012, 2014, 2015; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b) y debido a que con las técnicas actuales se puede estudiar el estado de sus somas, núcleos y axones, se utiliza en muchos estudios de degeneración de estas neuronas del SNC y su respuesta a tratamientos de neuroprotección.

1.2.2.1. Proyecciones de las células ganglionares de la retina

En mamíferos, la información visual procesada en la retina es conducida por los axones de las CGR a los núcleos retinorecipientes del cerebro. A la salida del globo ocular, los axones convergen para formar el NO, por donde llegan al quiasma óptico. En roedores, más del 95% de los axones de las CGR se decusan a nivel del quiasma (Lund, 1965; Perry, 1979; Drager y Olsen, 1981; Linden y Perry, 1983; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Nadal-Nicolás y cols., 2012) conduciendo la mayor parte del procesado visual a la zona contralateral del cerebro. En el ser humano, esta decusación de axones es de alrededor del 50% de los axones. Las CGR del roedor proyectan, principalmente, a seis regiones del cerebro, que son: núcleo supraquiasmático, núcleo óptico accesorio, núcleo pretectal, núcleo accesorio, núcleo geniculado dorsolateral y el CS (Rodiek, 1979). En roedores, la principal región retinorecipiente es el CS o tectum óptico, donde proyectan la inmensa mayoría de las CGR (Lund, 1965; 1969; Linden y Perry, 1983). Esta estructura está implicada en la generación de respuestas integradas a estímulos visuales, auditivos y somatosensoriales (*para una revisión ver* Sefton y Dreher, 1985; Sefton y cols., 2004).

Los CS están situados en la parte dorsal del mesencéfalo, rostrales al colículo inferior (**Figura 1.3**). Están compuestos por varias capas, que del estrato más superficial al más profundo son: stratum zonale, stratum griseum superficiale, stratum opticum, stratum griseum Intermediale, stratum album intermediale, stratum griseum profundum, y stratum album profundum. Las tres primeras capas, denominadas capas superficiales o visuales, reciben aferencias retinianas y se encargan de procesar estímulos visuales (Hofbauer y Dräger, 1985; Sefton y Dreher, 1985; Sefton y cols., 2004); mientras que las cuatro restantes procesan información auditiva y somatosensorial (Stein, 1984).

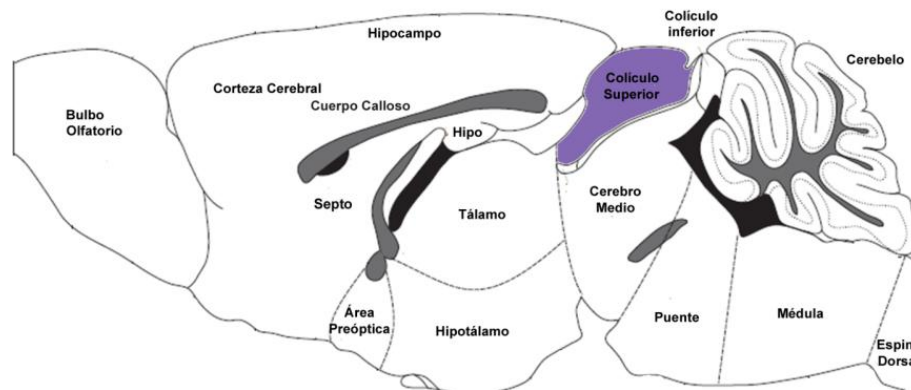


Figura 1.3. Localización de los colículos superiores en el cerebro del ratón. Esquema de un corte sagital del cerebro de ratón donde se muestra el CS (colículo superior) como una protuberancia situada en la parte dorsal del mesencéfalo, rostral al colículo inferior (inferior colliculus) (Esquema modificado de "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates", Paxinos y Franklin, 2001).

Los axones de las CGR que llegan a los CS, lo hacen a la capa más inferior de las capas visuales, el stratum opticum. Desde esta capa se extienden hacia las capas más superficiales, el stratum griseum superficial (Beckstead y Frankfurter, 1983) y el stratum zonale en la que arbolizan y forman terminales sinápticas. Los axones de las CGR se distribuyen en el CS en un orden topográfico muy preciso (Linden y Perry, 1983; Sauvé y cols., 2001, 2002). De esta forma, los axones de la retina nasal proyectan a la mitad caudal del CS, los de la retina temporal a la mitad rostral, los de la retina superior a la parte lateral del CS, y los de la retina inferior a la parte medial del CS (**Figura 1.4**) (Siminoff y cols., 1966; Linden y Perry, 1983; O'Leary y cols., 1986; Simon y O'Leary, 1990; Sauvé y cols., 2001, 2002).

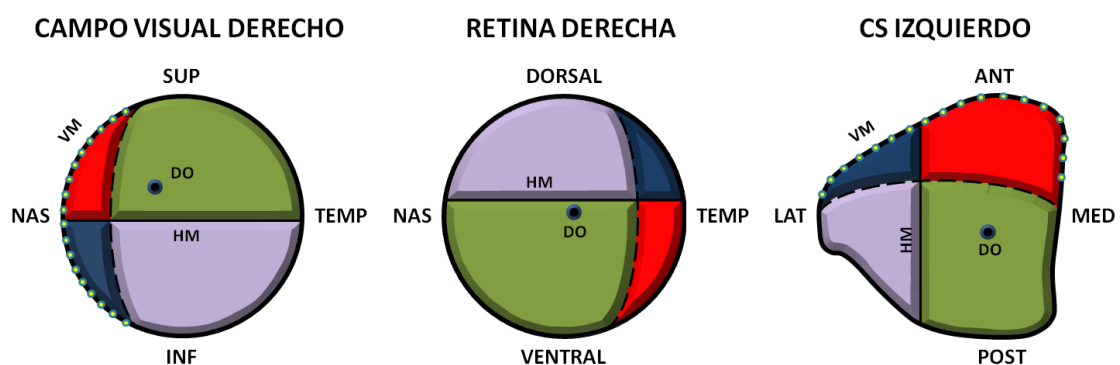


Figura 1.4. Esquema de las zonas correspondientes del campo visual en retina y colículo superior en roedor. Esquema donde se muestra la organización retinotópica que existe entre los diferentes puntos del campo visual del ojo con la retina y las zonas de proyección en el colículo superior contralateral. La figura nos muestra un esquema de diferentes puntos en el campo visual del ojo derecho, que tienen puntos correspondientes en retina derecha, y estas zonas de retina, proyectan a su vez a regiones específicas en el colículo contralateral (izquierdo). SUP: superior; NAS: nasal; TEMP: temporal; INF: inferior; ANT: anterior; LAT: lateral; MED: medial; POST: posterior (Modificado de Sefton y cols., 2004).

1.2.2.2. Identificación de las células ganglionares de la retina

Las CGR se utilizan como modelo para estudiar los cambios degenerativos asociados a la lesión axonal en el SNC y las propiedades neuroprotectoras de diversas sustancias. Para poder conocer con exactitud tanto la proporción de CGR que mueren tras una lesión como la que sobrevive tras un tratamiento determinado, es muy importante su identificación para diferenciar estas células de las células amacrinas desplazadas, ya que ambos tipos celulares se encuentran en la CCG. Para la identificación de las CGR existen diferentes procedimientos que detallaremos a continuación.

1.2.2.2.1. Identificación morfológica por medio de microscopía óptica

La identificación de las CGR por su morfología utilizando tinciones clásicas, como la hematoxilina/eosina o el azul de metileno, ha sido muy utilizada, pero debido a la falta de discriminación entre las CGR y las células amacrinas desplazadas en la capa de CGR (Villegas-Pérez y cols., 1988) este sistema no es del todo exacto. Además, en roedores, estas células pueden llegar a comprender casi el 50% de las neuronas que se localizan en la capa de CGR (Perry, 1981).

1.2.2.2.2. Marcaje retrógrado con trazadores neuronales

Para la identificación de las CGR se han usado distintos trazadores retrógrados, aplicados de distintas formas y en distintos lugares de la vía visual, dependiendo del estudio a desarrollar. Este método de marcaje permite, colocando el trazador neuronal correspondiente en el centro de proyección de las CGR, marcar toda la población a estudiar (revisado en Vidal-Sanz y cols., 2012). El trazador se transporta retrógradamente por los axones de las CGR desde el centro de proyección hasta el soma celular. Para identificar la inmensa mayoría de las CGR, en rata y ratón, los trazadores son aplicados en los CS, bien estereotáxicamente, o bien sobre su superficie completa, como. También pueden aplicarse en el muñón del NO o alrededor del mismo (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2012, 2015), para trazar la población retinofugal completa. Otra técnica recientemente descrita por Nadal-Nicolás y colaboradores (2015), muestra el marcaje retrógrado de FG con la inyección estereotóxica de FG en el tracto óptico.

Se han utilizado distintos tipos de trazadores neuronales para marcar las CGR: la peroxidasa de rábano (HRP; horseradish peroxidase) (Perry, 1981); las carbocianinas como: Dil (Vidal-Sanz y cols., 1988), 4Di-10ASP (Thanos, 1993; Lafuente y cols., 2001); el Fast Blue (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988); las rodaminas (Thanos y cols., 1987),

principalmente el dextrano de tetrametil rodamina (DTMR) (WoldeMussie y cols., 2001); y el Fluorogold (FG) o su análogo, el metanosulfonato de hidroxistilbamidina (OHSt) (Mansour-Robaey y cols., 1994; Sellés-Navarro y cols., 1996; Vidal-Sanz y cols., 2001; Lafuente y cols., 2002a; Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2015; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011). El número y la distribución espacial de las CGR trazadas con FG y OHSt colocados tanto en los CS como en los NO, han sido muy bien caracterizados por nuestro grupo (Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2012, 2015; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011; Vidal-Sanz y cols., 2012).

1.2.2.3. Inmunodetección

Se puede realizar el marcaje de las CGR utilizando la inmunodetección mediante anticuerpos contra proteínas que se expresan en estas células. Se han descrito varias proteínas que se expresan específicamente en las CGR:

- **Thy-1.** Es una proteína de superficie celular que se expresa en las CGRs de la retina de roedores (Barnstable y Dräger, 1984; Perry y cols., 1984). Leung y colaboradores (2008) han descrito que la expresión de proteína fluorescente azul cian (CFP, cyan fluorescent protein) bajo el promotor de Thy-1 marca el 96,1% de la población de CGR de ratón. La proteína Thy-1 ha sido utilizada como marcador de CGR en modelos experimentales de isquemia y excitotoxicidad (Nash y cols., 1999). Sin embargo, otros estudios posteriores han documentado una disminución de la expresión de Thy-1 después de una lesión, sin que suponga la muerte o desaparición de las CGR, tanto en modelos de lesión inducida por glaucoma experimental (Schlamp y cols., 2001; Huang y cols., 2006) como en modelos experimentales de sección o aplastamiento del NO (Schlamp y cols., 2001; Chidlow y cols., 2005). Otros estudios indican que la proteína Thy-1 no se expresa en todos los subtipos de CGR (Huang y cols., 2006) y que, a consecuencia de la lesión, también se expresa en las células de Müller (Dabin y Barnstable, 1995). Por lo tanto, estos datos sugieren que esta proteína no es un marcador de CGR recomendable en modelos experimentales de lesión.
- **Proteínas Bex1 y Bex2.** Estas proteínas se expresan en los somas y en los axones de las CGR (Bernstein y cols., 2006). El hecho de que marquen también los axones de las CGR, hace imposible su cuantificación automática, por lo que son poco utilizadas en los estudios de población.
- **Rbpms.** Es una proteína de la familia de “proteínas de unión a RNA” que ha sido estudiada como marcador de las CGR en modelos de excitotoxicidad, aplastamiento del NO e hipertensión ocular (Kwong y cols., 2010, 2011, 2013). Se expresa aproximadamente en el 99,5% de las CGR que son trazadas con FG.

- **NeuN.** La proteína nuclear NeuN es específica de neuronas y se expresa en la mayoría de las neuronas del SNC (Mullen y cols., 1992). En retina, se expresa mayoritariamente en las CGR y ha sido utilizada como marcador de éstas en distintos modelos de lesión (Wang y cols., 2000; Buckingham y cols., 2008). Sin embargo, esta proteína también marca las células amacrinas desplazadas en la CCGR, que forman aproximadamente el 50% de las neuronas de esta capa. Este hecho hace que no sea un marcador específico de CGR y cada vez está más en desuso.
- **Factores de transcripción con dominio POU clase IV (Pou4f) o Brn3 (brain-specific homeobox 3).** Estos factores de transcripción se expresan en las neuronas sensoriales, y juegan un papel importante en el desarrollo, diferenciación y supervivencia de las mismas. En la retina de roedor adulto, los factores de transcripción Brn3 se expresan únicamente en las CGR (Xiang y cols., 1993, 1995; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013b). Dentro de la familia de Brn3 se diferencian tres miembros: Brn3a (POU4f1), Brn3b (POU4f2) y Brn3c (POU4f3). Todos ellos se expresan en mayor o menor medida en las CGR, en algunos casos se co-expresan a la vez y cada uno de ellos tiene un papel diferente en el desarrollo de las CGR (Badea y Nathans, 2011; Badea y cols., 2012; Nadal-Nicolás y cols., 2012).

El Brn3a se encarga de controlar la estratificación dendrítica dentro de las CGR (Badea y cols., 2009). Estudios en nuestro laboratorio muestran que, en rata adulta, el Brn3a se expresa en el 92,2% de la población total de CGR que son marcadas retrógradamente con Fluorogold (FG) (Nadal-Nicolás y cols., 2009) y en ratón pigmentado en el 85,6% (Galindo-Romero y cols., 2011). Además, un punto muy importante a favor de este marcador, es que la expresión de Brn3a permanece en las CGR mientras éstas estén vivas y su patrón de expresión no cambia tras una lesión, por ejemplo, tras axotomía del NO o HTO. Por lo tanto, se considera un buen marcador de CGR para el estudio del curso temporal de muerte neuronal en distintos modelos de lesión experimental, como la sección o aplastamiento del NO (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013b), hipertensión ocular (Salinas-Navarro y cols., 2010), o las degeneraciones retinianas (García-Ayuso y cols., 2010, 2011) y en el estudio de su supervivencia tras la administración de un tratamiento neuroprotector (Sánchez-Migallón y cols., 2011; Galindo-Romero y cols., 2013b).

El Brn3b está involucrado en la diferenciación, en la supervivencia y en la formación de axones de las CGR. En ratones modificados genéticamente que no contienen esta proteína Brn3b, las células que empiezan a diferenciarse en CGR acaban por diferenciarse como células amacrinas u horizontales, por lo que el número final de CGR en un animal adulto, después de la diferenciación, se reduce hasta en un 30% (Badea y cols., 2009). Algunos estudios documentan que la proteína Brn3b marca la totalidad de las CGR de ratón (Leahy y cols., 2004; Buckingham y cols., 2008) y rata

(Leahy y cols., 2004; Bernstein y cols., 2006), aunque se ha de constatar un error en dichos artículos, ya que realmente estaban usando el marcador Brn3, que engloba las proteínas Brn3a, Brn3b y Brn3c. En nuestro laboratorio hemos descrito que en rata, la proteína Brn3b se expresa en aproximadamente el 65% del total de las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2012).

El Brn3c está implicado en la diferenciación de las proyecciones ipsilaterales de las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2012). Es el factor de transcripción de la familia Brn3 que se expresa en menor proporción tanto en rata como en ratón. En rata se expresa aproximadamente en el 51% del total de las CGR (Nadal-Nicolás y cols., 2012) y en ratón aproximadamente en el 30% (Xiang y cols., 1995).

- **Melanopsina.** Es una proteína descubierta por Provencio y colaboradores (1998, 2000), que se expresa únicamente en la subpoblación de CGR que son sensibles a la luz (CGRm). Como uno de los objetivos de esta tesis es caracterizar esta población celular en la retina de ratón pigmentado y albino adulto, sus propiedades están detalladas más adelante (*ver apartado 1.2.3*).

1.2.2.2.4. Hibridación “in situ”: Gamma-sinucleína

Otra técnica que se utiliza para marcar las CGR es la hibridación *in situ* que, en vez de identificar una proteína, identifica su ARNm. Esta técnica se utiliza en la detección del ARNm de la γ -sinucleína, una proteína específica de las CGR y que se expresa mayoritariamente en sus somas y en menor medida en sus axones. Aunque esto dificulta en parte su cuantificación, su uso es cada vez más común (Surgucheva y cols., 2008; Soto y cols., 2008, 2011; Nguyen y cols., 2011).

1.2.2.3. Cuantificación de las células ganglionares de la retina

A la hora de evaluar lesiones o tratamientos neuroprotectores sobre la población de CGR es muy importante la cuantificación de las mismas, y que esta cuantificación sea lo más objetiva, fiable y reproducible posible entre diferentes retinas y grupos experimentales.

La cuantificación de la población de CGR se ha realizado en distintas especies de animales de experimentación y en diferentes modelos experimentales de daño retiniano, como por ejemplo, en isquemia-reperfusión (Lafuente y cols., 2001, 2002b; Lam y cols., 1997; Sellés-Navarro y cols., 1996; Vidal-Sanz y cols., 2000), aplastamiento del nervio óptico (NO) (Yoles y cols., 1999; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla-Reverter y cols., 2009a, 2009b; Galindo-Romero y cols., 2013a), sección del NO (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1988; Peinado-Ramón y cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009), excitotoxicidad (Vorwerk y cols., 1996),

degeneración retiniana (García-Ayuso y cols., 2010, 2011) o modelos de hipertensión ocular (Laquis y cols., 1998; Sawada y Neufeld, 1999; Salinas-Navarro y cols., 2010; Vidal-Sanz y cols., 2012; Ortín-Martínez y cols., 2015).

Existen numerosos métodos de cuantificación de CGR y uno difiere en la técnica utilizada para su identificación. Podemos diferenciar entre métodos de contaje manuales y métodos de contaje automáticos. También podemos diferenciar los métodos entre contajes de CGR totales o estimaciones en función de las CGR contadas por unidad de superficie en determinadas áreas. A continuación se detallan varios de los métodos más utilizados:

- Cuantificación indirecta de CGR por contaje del número total de axones en el NO.

Dado que en mamíferos las CGR proyectan su axón fuera de la retina formando el NO, podemos asumir que cada axón se corresponde con una CGR. El contaje de axones en secciones de NO es un método muy utilizado a la hora de estimar el número total de CGR. Estudios previos basados en el contaje de axones estiman un número total de CGR en rata entre 96.200 y 118.300 (De Juan y cols., 1978; Forrester y Peters, 1967). Las estimaciones en ratón calculan que el número de axones y, por tanto, de CGR, es de 64.746 (Honjin y cols., 1977).

- Cuantificación manual de CGR.

Esta forma subjetiva de cuantificar el número de CGR es menos exacta que la cuantificación total de la retina, pero muy útil para estimar una población numerosa determinada. Se realiza mediante el cálculo de su densidad media tras el contaje manual de varias áreas de muestreo estándar preestablecidas (Villegas-Pérez y cols., 1988, 1993; Sellés-Navarro y cols., 1996; Peinado-Ramón y cols., 1996) en montajes globales de retina. El principal problema de este método es que la población de CGR no es uniforme a lo largo de la retina, por lo que las densidades varían dependiendo de dónde se tomen las áreas de muestreo. Otro inconveniente para validar este método, al ser totalmente subjetivo, es que hacen falta, al menos, los contajes de tres investigadores.

- Cuantificación automática de las CGR.

Este método permite cuantificar objetivamente la totalidad de la población de CGR de rata y ratón. Depende de la técnica empleada para la detección de las CGR, pero se puede aplicar tanto para contar células trazadas retrógradamente (Daniais y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b), inmunodetectadas con Brn3a (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013a), o identificadas con γ -sinucleína (Soto y cols., 2008; Nguyen y cols., 2011).

Estudios previos del laboratorio, han caracterizado el número medio de CGR trazadas con FG desde los CS (81.486 ± 4.340) o inmunodetectadas con Brn3a (83.449 ± 4.541) en la rata albina SD (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a) y el número medio de CGR trazadas con OHSt desde los CS (cepa albina Swiss: 41.192 ± 3.395 ; cepa pigmentada C57Bl/6: 48.733 ± 3.954) o inmunodetectadas con Brn3a (cepa albina Swiss: 47.211 ± 1.346 ; cepa pigmentada C57Bl/6: $34,697 \pm 1.821$) en ratones (Salinas-Navarro y cols., 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013b).

Al interpretar los datos obtenidos de los contajes de las CGR marcadas retrógradamente con FG u OHSt, o inmunodetectadas con Brn3a, hay que considerar diferentes aspectos. Si una CGR está marcada retrógradamente con FG u OHSt significa que su transporte axonal retrógrado es funcional; ya que su actividad es necesaria para que el trazador llegue al soma de la CGR. En cambio, si una CGR es inmunodetectada con Brn3a no nos da información de su estado axonal, pero nos dice si dicha célula está viva, ya que el Brn3a es una proteína endógena que deja de expresarse en las CGR cuando éstas entran en apoptosis (Nadal-Nicolás y cols., 2012). La inmunodetección tiene ciertas ventajas en comparación con el uso de trazadores, ya que no es necesario someter al animal a ninguna cirugía previa a su procesado y permite realizar un estudio de curso temporal de muerte más efectivo (Nadal-Nicolás y cols., 2009, 2012; Galindo-Romero y cols., 2013b). Por tanto, la utilización de ambos métodos en un mismo animal es muy útil, ya que permite estudiar el estado funcional del transporte axonal y la supervivencia en modelos de lesión del nervio óptico o de hipertensión ocular; p. ej. usando ambos métodos nuestro grupo ha descrito que en modelos de hipertensión ocular hay primero una pérdida del transporte axonal seguida de muerte de CGR (Salinas-Navarro y cols., 2010; Galindo-Romero y cols., 2013b).

1.2.2.4. Mapas de distribución espacial de las células ganglionares de la retina

El estudio de la distribución espacial de las CGR en la retina es muy importante para estudiar cualquier lesión o degeneración de las mismas. Por ello, en nuestro laboratorio se han diseñado y desarrollado rutinas informáticas que utilizan los datos de cuantificación automática de las CGR por áreas de interés a lo largo de toda la retina y los traduce en densidad (CGR/mm²). Esta técnica permite obtener mapas de isodensidad detallados de las CGR, que muestran de manera fidedigna la distribución de la densidad de las CGR en retinas de rata (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a) y ratón (Salinas-Navarro y cols., 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011). Esta herramienta posibilita realizar mapas de distribución de las CGR trazadas con FG u OHSt (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013) o inmunodetectadas con Brn3a (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013). Con ayuda de estos mapas se ha podido caracterizar el patrón de distribución de las CGR en la retina, y como vemos en la **Figura 1.5**, la distribución no es homogénea a lo largo de la retina y existe una mayor densidad de CGR en el área dorsal de la retina a lo largo del eje nasotemporal, aproximadamente a 1 mm del NO; este área también es conocida como estría visual

(Figura 1.5) (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Ortín-Martínez y cols., 2010).

Estos mapas de distribución permiten estudiar si una lesión afecta de forma homogénea a toda la retina, como ocurre en la lesión de NO por axotomía (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2013b) o si por el contrario, la pérdida de CGR es selectiva para áreas concretas (Salinas-Navarro y cols., 2010). De la misma forma, estos mapas pueden servir para determinar si un tratamiento neuroprotector aumenta la supervivencia de las CGR en toda la retina o solamente en algunas regiones de ésta (Sánchez-Migallón y cols., 2011; Galindo-Romero y cols., 2013b).

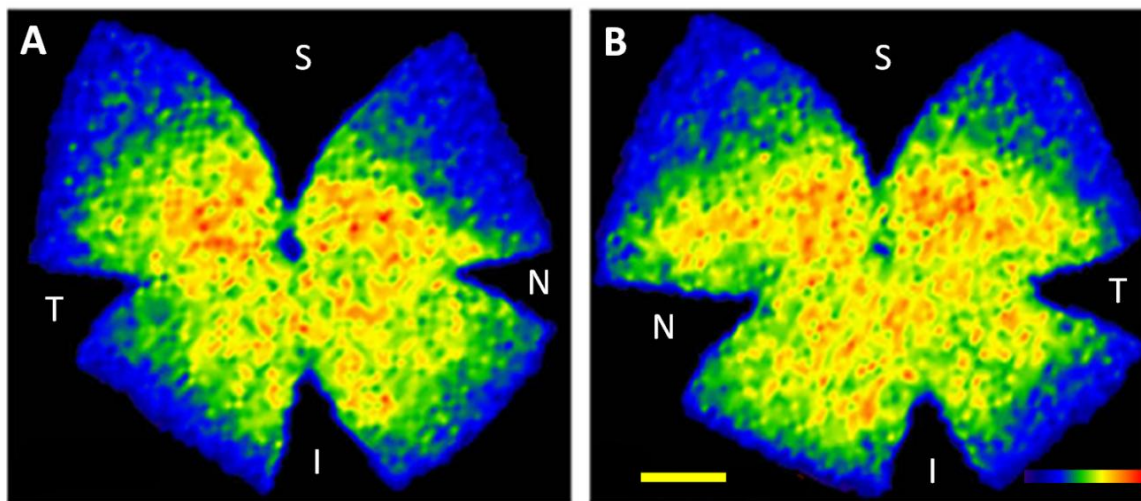


Figura 1.5. Distribución de las CGR trazadas con OHSt desde los colículos superiores en ratón. En estos mapas de isodensidad podemos ver la distribución de las CGR en un montaje global de una retina derecha (A) y una izquierda (B). Se puede observar que las CGR no se distribuyen homogéneamente por toda la retina y que hay una zona de mayor densidad en la hemirretina superior. Estos mapas se generan en base a la densidad de CGR en cada una de las 36 divisiones de cada fotografía individual que compone el fotomontaje (154 fotos por retina), y se asigna a cada densidad un código de color que va desde 0 (azul) a 5.625 o más (rojo) CGR/mm² (modificada de Salinas-Navarro y cols., 2009b). S= superior, T= temporal, N= nasal, I= inferior. Barra= 1mm.

1.2.3. Las células ganglionares de la retina melanopsínicas (CGRm)

Además de las funciones puramente visuales del ojo relacionadas con la formación de imágenes y la percepción visual, existen otras funciones que se desencadenan en respuesta a la luz como son el reflejo pupilar y la sincronización del ritmo circadiano. Las funciones son conocidas como “extravisuales”, o sistema visual no formador de imágenes. Los ritmos circadianos son ciclos biológicos endógenos que regulan y sincronizan nuestro cuerpo con la luz solar durante las 24 horas del día. Los ritmos circadianos se mantienen incluso cuando el organismo está privado de luz o de señales ambientales que marcan los cambios de horario, lo que indica que se mantienen por la actividad de un reloj endógeno. El proceso por el que se acompasa nuestro reloj endógeno con los ciclos de luz/oscuridad se conoce como sincronización a la luz y permite regular

funciones como por ejemplo el sueño, mantener la temperatura corporal, regular los niveles hormonales y otros procesos fisiológicos que sufren variaciones a lo largo del día (Hankins y cols., 2008).

Hasta hace unos años, se pensaba que, en mamíferos, las únicas células capaces de estimularse ante la luz, y por tanto fotosensibles, eran los fotorreceptores clásicos, conos y bastones. Así, se consideraba que los fotorreceptores eran los encargados de gestionar tanto la función visual formadora de imágenes como la no formadora de imágenes. Clyde Keeler en 1928, documentó que en ratones debía existir otro tipo de células fotosensibles, aparte de los conos y bastones. Observó que en ratones con degeneración de las capas externas de la retina, donde residen los núcleos de los fotorreceptores y, por tanto, funcionalmente ciegos, aún se podían registrar reflejos pupilares en respuesta a la luz (Keeler y cols., 1928). Estudios posteriores documentaron cómo esta estirpe de ratones eran capaces de modificar o readaptar sus ritmos biológicos conforme varían los ciclos de luz y oscuridad (Foster y Hankins, 2002). Sin embargo, esta capacidad desaparecía en ratones que habían sido enucleados o sufrían un daño o una degeneración de las CGR (Van Gelder, 2003). El descubrimiento de las CGR que expresan melanopsina (CGRm) (Provencio y cols., 1998, 2000; Hattar y cols., 2002), permitió explicar estos hechos. Así, en la retina de mamífero, existe otro tipo de células fotosensibles que son las CGRm que, junto con los fotorreceptores (encargados de la función visual), forman vías paralelas, y actúan en el sistema visual no formador de imágenes y formador de imágenes, respectivamente (Graham, 2008).

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 en respuesta a la luz (Provencio y cols., 1998). Este mismo autor también documentó la presencia de melanopsina en una subpoblación de CGR en roedores, las CGRm (Provencio y cols., 2000). La expresión de la melanopsina es responsable de que esta subpoblación de células ganglionares posea la capacidad de estimularse directamente por la luz. La sensibilidad de las CGRm es mucho menor que la de los fotorreceptores, su señal es más lenta, muestran una baja resolución espacial y son sensibles a 480 nm de longitud de onda (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).

En embriones de rata, la melanopsina empieza a ser detectada a partir del día 18 de gestación y comienza a responder a la luz en el momento del nacimiento. En cambio, los fotorreceptores clásicos, conos y bastones, comienzan a responder a la luz el día 10 después del nacimiento. Este hecho puede deberse a la necesidad de adaptación de los mamíferos a los ritmos circadianos de luz y oscuridad incluso antes de tener percepción visual (Nayak y cols., 2007).

El gen de la melanopsina es el OPN4 y en la rana africana (*Xenopus Laevis*) se expresa en el núcleo supraquiasmático (NSQ), en las células horizontales de la dermis y en el ojo, en el epitelio pigmentario de la retina y en el iris. En mamíferos, este gen ha sido estudiado en varias especies como el ratón, la rata, el mono o el ser humano, su expresión ha sido localizada únicamente en la población de CGRm (Xue y cols., 2011). La melanopsina tiene una estructura de aminoácidos de 7 dominios transmembrana, al igual que las opsinas de los fotorreceptores, que se unen a una proteína G, encargada de la transducción de la señal. En cambio, la fototransducción de la melanopsina se realiza por la despolarización de membrana, un proceso similar al de las opsinas de los invertebrados, a diferencia de la fototransducción de conos y bastones, que se produce por hiperpolarización (Davies y cols., 2010).

La duda existente sobre qué células eran las encargadas del sistema visual no formador de imágenes quedó resuelto con el descubrimiento de las CGRm (Berson y cols., 2002; Hattar y cols., 2002). En rata y ratón, las CGRm constituyen aproximadamente el 2-3% de la población total de CGR y su distribución no es homogénea en la retina; son más abundantes en la zona supero-temporal (Nadal-Nicolás y cols., 2012, 2014; Galindo-Romero y cols., 2013b). La melanopsina se expresa mayoritariamente en el soma, la membrana y dendritas de las células. Las CGRm se encuentran en la CCGR y, en menor proporción, en la CNI (Hattar y cols., 2002; Jain y cols., 2012; Nadal-Nicolás y cols., 2014) y forman extensas conexiones con sus dendritas dentro de la capa plexiforme interna (CPI) (Hattar y cols., 2002; Provencio y cols., 2002; Berson, 2003).

1.2.3.1. Proyecciones de las células ganglionares de retina melanopsínicas

Las CGRm proyectan sus axones a núcleos cerebrales diferentes de los que proyecta la población de CGR que no expresan melanopsina (**Figura 1.6**). 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 y cols., 1995).

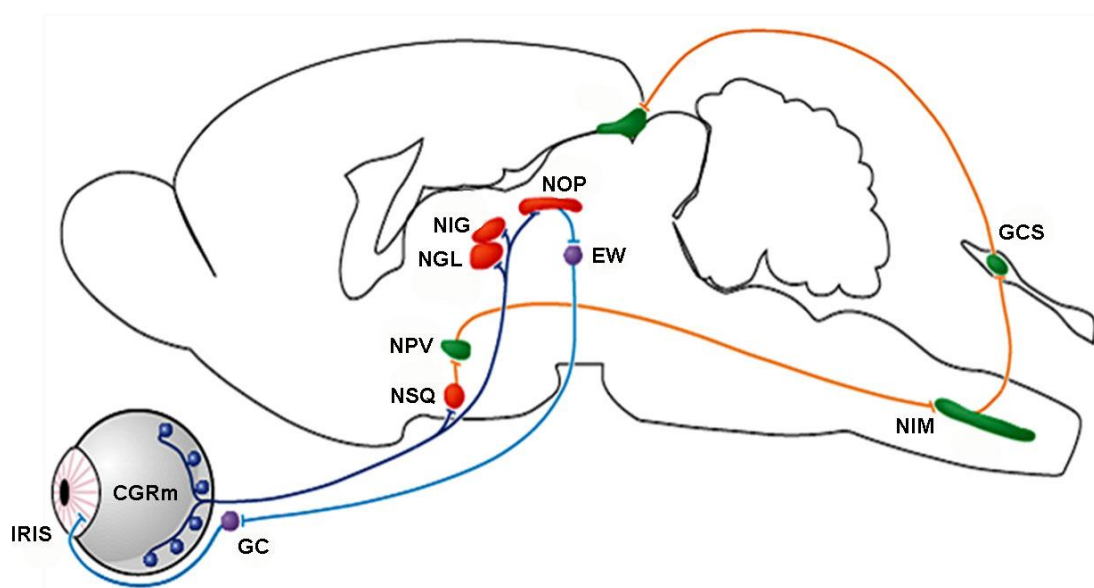


Figura 1.6. Principales proyecciones neuronales de las CGRm de ratón. Los axones de las CGRm (azul oscuro) proyectan principalmente al núcleo supraquiasmático (NSQ), encargado de la regulación de los ritmos circadianos, y una minoría a la lámina intergeniculada lateral y núcleo de la oliva pretectal (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).

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 y cols., 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).

1.2.3.2. Tipos células ganglionares de retina melanosínicas

Según la bibliografía, se distinguen 5 tipos de células ganglionares melanosínicas (M1-M5) (**Figura 1.7**). Esta clasificación viene determinada según sus conexiones dendríticas en la capa plexiforme interna, 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 los subtipos. Las CGRm más comunes son las denominadas M1, que sinaptan con la sublámina externa de la capa plexiforme interna y su axón proyecta al CS, y/o a NOP y/o a NSQ (Karnas y cols., 2013). Este subtipo de células melanosínicas 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 capa plexiforme interna, 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 capa plexiforme interna. El resto de tipos son menos numerosos y están menos caracterizados. Los subtipos M4 y M5 no expresan cantidades detectables de melanopsina. 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 β -galactosidasa que es una proteína que codifica el gen tau-lacZ (Hattar y cols., 2006). Por lo tanto, en este trabajo hemos analizado únicamente las GRm M1-M3.

1.2.4. Zona marginal ciliar (ZMC) de retina

La zona marginal ciliar (ZMC) de retina se encuentra en la parte más periférica de la retina ($\approx 100 \mu\text{m}$ espesor). En esta región se encuentran tanto células madre como progenitoras, y están presentes en retinas en desarrollo y adultas (Vicizian, 2013). En esta zona de la retina residen CGR, y algunas de ellas expresan melanopsina. Semo y colaboradores (2014) observaron que estas CGRm, tenían un árbol dendrítico muy característico, sobre todo en la región nasal de la retina. Estos autores postulan que podrían mandar su axón al cuerpo ciliar o al iris y así intervenir en la respuesta pupilar intrínseca del ojo ante un estímulo luminoso.

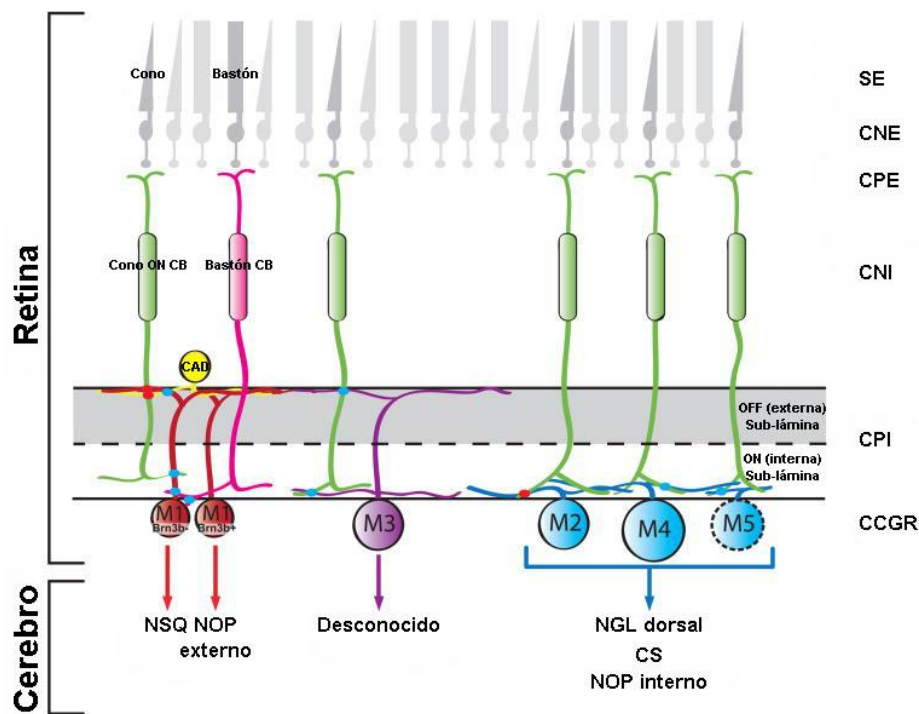


Figura 1.7. Esquema de los tipos de CGRm, sus conexiones dendríticas y sus proyecciones. Modificada de Schmidt y cols., 2011. NSQ: Núcleo supraquiasmático. NOP: Núcleo de la oliva pretectal. NGL: Núcleo geniculado lateral. CS: Colículo superior. SE: Segmentos externos de los fotorreceptores. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CCGR: Capa de células ganglionares de retina.

Tipo de CGRm	Conexión dendrítica en capa plexiforme	Campo dendrítico	Tamaño de soma	Proyección
M1	Sub-lámina externa	<M2, M4	<M2, M4	CS, NOP, NSQ
M2	Sub-lámina interna	>M1, <M4	<M4	CS, NOP, dLGN
M3	Sub-lámina externa e interna	=M2	=M2	Desconocido
M4	Sub-lámina interna	>todos	>todos	CS, NOP, dLGN
M5	Sub-lámina interna	Pequeño y simétrico	Desconocido	CS, NOP, dLGN

Tabla 1.1. Clasificación, propiedades morfológicas y proyecciones de las distintas clases de CGRm. Schmidt y cols., 2011.

1.3. EL GLAUCOMA

El glaucoma es una neuropatía óptica que se caracteriza por ser una enfermedad neurodegenerativa, que cursa con degeneración progresiva de las CGR, una excavación y palidez progresivas de la papila, y los correspondientes defectos en el campo visual que evolucionan de forma característica (OMS, 2004).

1.3.1. Clasificación

Existen diversas formas de clasificación para los múltiples tipos de glaucoma:

- Según la localización de la causa que impide el correcto drenaje del humor acuoso: glaucomas pretrabeculares cuando la causa es un obstáculo delante del trabeculum, glaucomas postrabeculares cuando se debe a un aumento de la presión de las venas episclerales o, los más frecuentes, los glaucomas trabeculares debidos a una resistencia localizada en el mismo trabeculum.
- Según la edad de comienzo: congénito, infantil, juvenil o adulto.
- Según el origen: glaucoma primario si no está relacionado con otras patologías conocidas o glaucoma secundario si es debido a que sí existe relación.
- Según la amplitud del ángulo formado por la raíz del iris y la córnea (ángulo iridocorneal): glaucoma de ángulo cerrado, en los que las dos estructuras están en contacto, o glaucoma de ángulo abierto, en los que existe separación (estos son los más comunes).

1.3.2. Epidemiología

La prevalencia del glaucoma crónico simple es del 1,5-2% de la población en individuos mayores de 40 años y aumenta entre las personas con edad superior a los 60 años. Se estima que 4,5 millones de personas en el mundo son ciegas debido al glaucoma, constituyendo el 12,3% de la ceguera global (OMS, 2004). Se calcula que en España hay unos 800.000 afectados. Es la segunda causa de ceguera en los países desarrollados y la principal causa de ceguera prevenible en el mundo (Ferreiro López y cols., 2003; OMS, 2004).

Se desconoce la causa que provoca el glaucoma (Goldblum y cols., 2002; Pastor Jimeno, 2002; Ferreiro López y cols., 2003; Vidal-Sanz y cols., 2012; Agudo-Barriuso y cols., 2013); sin embargo, entre los factores de riesgo nos podemos encontrar los siguientes, revistiendo especial importancia los tres primeros:

1. Presión intraocular (PIO): el aumento de la PIO es el factor de riesgo más importante para padecer glaucoma, el único sobre el que podemos actuar para detener el progreso de la enfermedad y sobre el que van dirigidos la mayoría de los tratamientos

antiglaucomatosos; pero no es determinante, solamente existe glaucoma si hay un daño en el nervio óptico. La naturaleza de los mecanismos que vinculan una PIO elevada con una muerte de CGR no está claramente establecida, se piensa que pueden intervenir factores patogénicos relacionados con la isquemia transitoria de la retina y con la axotomía o compresión axonal. Se ha postulado que puede ocasionarse una compresión o presión sobre los axones de las CGR a nivel de su punto de salida del globo ocular, la cabeza del NO (Pang y Clark, 2007; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2010).

2. Antecedentes familiares: se cifra en un 4-16% el riesgo de padecer glaucoma si el individuo presenta antecedentes familiares de primer grado (Ferreiro López y cols., 2003).
3. Edad: Incrementa el riesgo de padecer la enfermedad a partir de los 40 años, multiplicándose por 7 su prevalencia a los 60 años (Rudnicka y cols., 2006).
4. Sexo: Mayor afección de glaucoma de ángulo abierto en los varones (Rudnicka y cols., 2006).
5. Diabetes: Mayor incidencia en diabéticos, que en no diabéticos.
6. Miopía: Los miopes suelen tener la PIO más elevada que el resto.
7. Raza: Las personas de color tienen mayor incidencia (Rudnicka y cols., 2006).
8. Pacientes con problemas cardiovasculares y hematológicos.

1.3.3. Fisiopatología

El humor acuoso se origina a partir del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar en la cámara posterior del ojo, penetra en la cámara anterior a través de la pupila y se dirige por el ángulo iridocorneal a la malla trabecular, drenando a través del canal de Schlemm hacia los canales colectores que convergen en los vasos perilimbares y éstos a su vez en los vasos episclerales, por los que el humor acuoso abandona el globo ocular para pasar a la circulación sanguínea general (**Figura 1.8**). Por esta ruta, la vía trabecular o convencional, se elimina el 90% del humor acuoso; mientras que el 10% restante va a seguir la vía uveoescleral o no convencional, atravesando directamente el cuerpo ciliar y llegando a los espacio supracoroideo donde drena a través de los vasos ciliares, coroideos y esclerales (Pastor Jimeno y cols., 2002; Ferreiro López y cols., 2003).

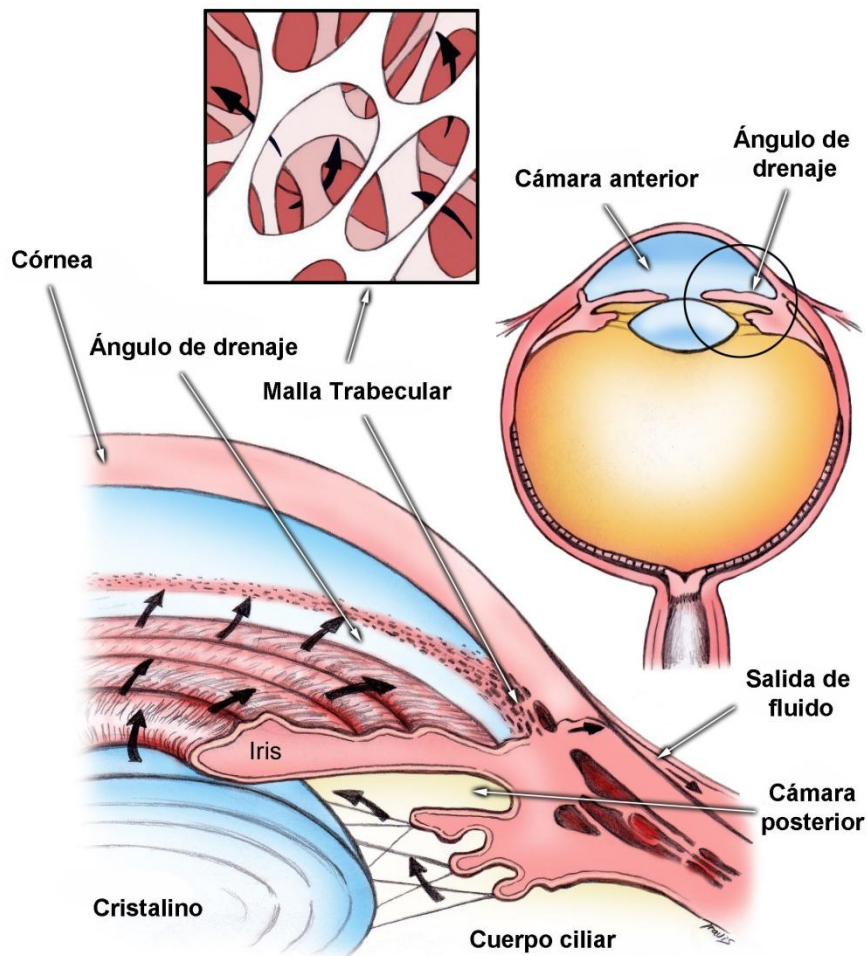


Figura 1.8. Esquema de las rutas de drenaje del humor acuoso (Tomado de www.emedicinehealth.com).

1.3.4. Patogenia

La elevación mantenida de los niveles de PIO conlleva lesiones de las CGR o de su proyección, el NO, que producen alteraciones de la función visual para las que no existe tratamiento alguno y puede llevar a una pérdida irreversible de la función visual. Esta irreversibilidad se debe a la degeneración y muerte de las CGR, las cuales pertenecen al SN, y proyectan la información visual procesada en la retina a los centros encefálicos. Aunque la etiopatología del glaucoma se desconoce, se han barajado entre sus posibles causas etiopatogénicas el daño axonal (axotomía) y la isquemia retiniana.

Existen dos teorías para explicar estos hechos. La directa o mecánica, defiende que el aumento de la PIO por encima de los valores considerados normales provoca la compresión de las fibras nerviosas a su salida a través de la lámina cribosa de la esclera a nivel de la cabeza del nervio óptico. La segunda teoría, la indirecta o vascular, resalta que un aumento de la PIO dificulta el flujo sanguíneo de la microcirculación en la cabeza del nervio óptico y esto provoca una

isquemia crónica y atrofia de las fibras nerviosas. Probablemente, ambas teorías estén implicadas a la hora de explicar esta alteración (Vidal-Sanz y cols., 2012; Agudo-Barriuso y cols., 2013).

La neuropatía óptica glaucomatosa es una enfermedad que principalmente afecta a la población de CGR pero que también afecta otras poblaciones neuronales de la retina incluyendo las capas interna (Panda y Jonas, 1992a) y externa de la retina (Panda y Jonas, 1992b; Nork y cols., 2000), provocando cambios a nivel del disco óptico y pérdida de campo visual, pudiendo progresar a una ceguera completa. La afectación de otras poblaciones neuronales de la retina interna y externa se ha estudiado tanto morfológicamente como funcionalmente con registro electrofisiológicos (Fazio y cols., 1986; Korth y cols., 1994). Además los principales componentes del electroretinograma (ERG) se han visto afectados severamente en pacientes con glaucoma (Holopigian y cols., 1990; Vaegan y cols., 1995) o con hipertensión ocular (Mehaffey y cols., 1993); así como en glaucomas experimentales (Grozdanic y cols., 2003; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Vidal-Sanz y cols., 2012). Modelos experimentales en los que se elevaba la PIO (Feghali y cols., 1991; Chauhan y cols., 2002; Bui y Fortune, 2004; Fortune y cols., 2004; Holcombe y cols., 2008; Salinas-Navarro y cols., 2009c; Cuenca y cols., 2010; Vidal-Sanz y cols., 2012) han mostrado importantes alteraciones de varios componentes del ERG de campo completo, incluyendo la respuesta umbral escotópica (STR, *Scotopic Threshold Response*), las ondas a y b, las cuales están asociadas con CGR, fotorreceptores y células bipolares de la retina, respectivamente.

1.3.5. Clínica

El glaucoma es una enfermedad silente y de progresión lenta que cursa asintómicamente hasta estadios muy evolucionados en los cuales el campo visual se reduce considerablemente, en estadios avanzados puede conducir a la ceguera. Un aumento de PIO sólo provoca síntomas si se produce de forma brusca y es de una cuantía considerable, el paciente presenta entonces una disminución de la agudeza visual, visión de halos alrededor de un foco de luz, dolor ocular, hiperemia ciliar, edema corneal y síntomas vegetativos como náuseas, vómitos, etc. (Pastor Jimeno y cols., 2002; Ferreiro López y cols., 2003).

Dada la irreversibilidad de los daños anatómicos y funcionales producidos, el diagnóstico precoz de esta enfermedad es de gran importancia ya que posibilita mediante un adecuado tratamiento, ralentizar e incluso detener el curso de la enfermedad.

Hasta la fecha, el tratamiento de esta patología ha ido dirigido a actuar sobre el principal factor de riesgo, la PIO. Sin embargo, últimamente se está investigando la mejora de la microcirculación de la papila y la prevención de la muerte celular, lo que se ha denominado neuroprotección. El objetivo es detener o ralentizar la progresión de la enfermedad.

Los métodos de tratamiento para disminuir la PIO se dividen, básicamente, en tratamiento médico y tratamiento quirúrgico. De éstos, el tratamiento médico mediante diferentes alternativas

farmacológicas es el más común en la actualidad, reservando el tratamiento quirúrgico para casos refractarios a la medicación o complicaciones agudas. Los mecanismos de actuación de los fármacos se pueden resumir en tres: reducción de la producción de humor acuoso, incremento de la facilidad de salida del humor acuoso, o bien, una combinación de ambos mecanismos (Pastor Jimeno y cols., 2002; Ferreiro López y cols., 2003).

1.4. MÉTODOS DE REGISTRO DE PRESIÓN INTRAOCULAR

Para una interpretación eficaz de los modelos de hipertensión ocular en roedores, es necesaria una toma de PIO fiel y precisa en animales vivos. Del sistema utilizado va a depender la fiabilidad de los resultados a la hora de analizarlos y de compararlos con otros trabajos. Existen dos formas de medición, el método directo y el indirecto.

El método directo más factible para la medición de PIO en roedores, es mediante un manómetro de fluido, usando un transductor de presión, junto con la adecuada canulación de una microaguja en la cámara anterior (John y cols., 1997). Aunque este método es altamente preciso, es invasivo y tiene muchas limitaciones. Entre medida y medida, la córnea debe regenerarse en el sitio de la canulación. Además, la medición debe ser realizada con anestesia general, lo cual puede provocar una disminución de PIO.

Para reducir las limitaciones de las técnicas invasivas, se han desarrollado métodos no invasivos de tonometría en roedores. Modificaciones del tonómetro de Goldmann y tonómetros de aire han sido adaptados y usados para la medición de PIO en estos animales. La señal de una fibra con forma de punta equipada con un transductor de presión ha sido utilizada satisfactoriamente en roedores anestesiados (Filippopoulos y cols., 2006). El TonoPen ha sido utilizado con bastante éxito en roedores (Moore y cols., 1993), pero su punta excesivamente grande, inicialmente diseñada para humanos, resulta menos fiable en las mediciones de la PIO en ratones. Más reciente, el TonoLab, un tonómetro de rebote, diseñado específicamente para roedores y ha mostrado gran eficacia en la medición de PIO. Algunos trabajos han comparado la fiabilidad de las mediciones entre TonoPen, TonoLab y manometría con canulación, resultando el TonoLab como el método más preciso de medición de la PIO (Pease y cols., 2006; Saeki y cols., 2008). Tanto para el uso del TonoPen como del TonoLab se requiere un entrenamiento previo del investigador para obtener unas mediciones correctas.

1.5. MODELOS DE GLAUCOMA EN ROEDOR

Las enfermedades neurodegenerativas son actualmente un desafío para la ciencia. Como su propio nombre indica, dichas enfermedades cursan con la degeneración y muerte de las neuronas. Excepto durante la fase de desarrollo, las neuronas del SNC son, en general, incapaces

de suplir su propia muerte por medio de mecanismo de multiplicación como la mitosis. Debido a esta característica inherente de las neuronas, la curación y/o ralentización de los signos y síntomas de enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson o el Glaucoma no es posible actualmente.

La retina es una proyección del SNC situada dentro del globo ocular y aislada del resto del SNC, lo que la hace fácilmente accesible a la manipulación experimental. El vítreo es un reservorio natural en el que se pueden administrar fármacos para tratar la retina o se pueden introducir trazadores neuroanatómicos que de manera específica y selectiva marcan la totalidad de la proyección retiniana, sin afectar al resto del SNC. Además existe la posibilidad de identificar las CGR y su proyección axonal por medio de trazadores neuronales retrógrados, la opción de identificar diferentes tipos neuronales retinianos por medio de técnicas inmunohistoquímicas, la oportunidad de realizar estudios funcionales con técnicas no invasivas y la posibilidad de llevar a cabo análisis de comportamiento visual (Vidal-Sanz y cols., 2012). Existen numerosos modelos experimentales que imitan de algún modo, uno o varios de los diferentes mecanismos patológicos, que se cree intervienen en la neuropatía óptica glaucomatosa.

1.5.1. Genéticos

Existen numerosas líneas de roedores en las cuales se producen alteraciones y/o patologías similares a las observadas en glaucoma, que ocurren por mutaciones genéticas y generan una alteración de la fisiología normal del humor acuoso o de la biología de las CGR. La principal ventaja de trabajar con estos modelos de una línea específica es que las alteraciones provocadas en retina, nervio óptico y aumento de PIO muestran, relativamente, en muchos casos, una mayor semejanza con las alteraciones que se observan en la enfermedad glaucomatosa humana que los inducidos por los métodos quirúrgicos. Otra ventaja añadida es la gran población que se puede generar con este modelo y no hace falta ninguna manipulación experimental del investigador para obtener los ratones afectados. Estos modelos son muy útiles para identificar las predisposiciones genéticas de los humanos de padecer glaucoma.

1.5.1.1. Modelos con incremento de HTO

El ratón DBA/2J es el modelo más común de glaucoma secundario y uno de los modelos mejor caracterizados de glaucoma en general (Libby y cols., 2005). El ratón DBA/2J tiene mutaciones en dos genes, *Tyrp1* y *Gpnmb*, que codifican la tiroquinasa y la glicoproteína NMB, respectivamente. Estas mutaciones provocan dispersión del pigmento, defectos de transiluminación y atrofia del iris y, una sinequia anterior (Anderson y cols., 2002; Crish y cols., 2010). Estas alteraciones generan un aumento de PIO, que empieza a ser significativa a los 9

meses de edad, y se acompañan de daños típicos del glaucoma, como la muerte de CGR y la atrofia en el nervio óptico (Libby y cols., 2005). Aunque no se ha documentado que existan subtipos de CGR más resistentes que otros a la muerte en este modelo, sí se ha caracterizado un patrón de muerte, que ocurre en sectores de forma triangular con base en la periferia retiniana y ápice en el disco óptico (Jakobs y cols., 2005). Varios trabajos han indicado que este patrón de muerte celular sugiere un daño axonal en la cabeza del NO como desencadenante de la lesión primaria, que, *a posteriori*, resulta en la muerte de las CGR (Jakobs y cols., 2005; Holcombe y cols., 2008; Buckingham y cols., 2008; Salinas-Navarro y cols., 2009c, 2010; Vidal-Sanz y cols., 2012); este patrón recuerda a la lesión producida en humanos, en los que se observan escotomas localizados. Otra cepa de estos animales son los ratones DBA/2NNia; que cursan, al igual que los anteriores, sufren un aumento de PIO acompañado de muerte de CGR. Sin embargo, en estos ratones, se observa una afectación de población celular a nivel de retina externa como interna, lo que sugiere un daño añadido en retina externa (Bayer y cols., 2001). Uno de los principales inconvenientes de este modelo experimental es la gran variabilidad intra e inter individual que presenta (Pérez de Lara y cols., 2014).

1.5.1.2. Modelos normotensos

El glaucoma se asocia comúnmente con un aumento de la PIO; sin embargo, los cambios provocados en la retina y en el nervio óptico a veces pueden ocurrir con valores de PIO normales, lo cual, se conoce como glaucoma normotenso o NTG (del inglés, *normal-tension glaucoma*). La relación fisiológica entre los glaucomas normo e hipertensos ha sido foco de debate a la hora de recrear un modelo de estudio. Los modelos en ratones con glaucomas normotensos deben ser utilizados para la investigación en desarrollos de terapias dirigidas a controlar los mecanismos de muerte de las CGR independientes del aumento de PIO. Ejemplos de este modelo son los ratones deficientes para los transportadores de glutamato GLAST o EAAC1, ambas cepas de ratón muestran patrones de muerte de CGR y de degeneración a nivel del nervio óptico típicos del glaucoma, pero sin aumento de la PIO (Harada y cols., 2007). Otro modelo es el ratón transgénico que expresa el gen *optineurin mutado* (E50K) bajo el promotor de actina, que desemboca en la muerte de CGR y degeneración axonal en el nervio óptico sin elevación de la PIO (Johnson y Morrison, 2009).

1.5.1.3. Modelos de alteración de la cámara anterior

Alteraciones en la cámara anterior pueden resultar en glaucomas desarrollados. Estos modelos son objeto de estudio, aunque en la clínica humana, sólo suponen un 1% del total de casos de glaucoma. Varios genes están involucrados en este tipo de glaucoma congénito y alteración del segmento anterior en humanos. Modelos de ratón *knockout* de estos genes son

letales en edad embrionaria o neonatal. Un ejemplo es el ratón $Foxc1^{-/-}$ que muere al nacer, mientras que los $Foxc1^{+/-}$ son viables, pero tienen defectos en las estructuras de drenaje del humor acuoso sin alteración de la PIO (Smith y cols., 2000); algo similar se ha observado en el ratón $Foxc2^{+/-}$. Estos ratones son buenos modelos para el estudio de las anomalías producidas y desarrolladas en el segmento anterior, ya que permiten identificar genes que interactúan con $Foxc1^{+/-}$ y $Foxc2^{+/-}$ provocando un fenotipo con aumento de PIO y glaucoma (Smith y cols., 2000).

1.5.2. Inducción de hipertensión ocular

Existen diferentes técnicas experimentales que pueden ser usadas con el propósito de aumentar la PIO en roedores, sin necesidad de emplear excesivo tiempo y teniendo un gran control de las lesiones ocasionadas. Dentro de estas técnicas se encuentran la fotocoagulación de los vasos episclerales y perilimbares, la inyección de suero salino hipertónico en las venas episclerales, la cauterización de las venas episclerales y la inyección de sustancias en la cámara anterior que obstruyan el drenaje del humor acuoso. Algunos de estos métodos requieren un equipamiento especializado para su correcto uso, además de un entrenamiento básico por parte del investigador, y cada modelo induce una elevación de PIO de intensidad y duración diferente, cursando con una determinada curva de PIO (Morrison y cols., 2011).

1.5.2.1. Láser

Como hemos visto anteriormente en el capítulo de la fisiología de humor acuoso, el drenaje de éste de la cámara anterior sigue dos vías: a través de la malla trabecular, drenando vía canal de Schlemm que converge en los vasos perilimbares y episclerales, y la vía uveoescleral. En la clínica humana se asocia el aumento de PIO con alteraciones en los sistemas de drenaje de humor acuoso.

La fotocoagulación láser de las vías de drenaje del humor acuoso genera daños oculares que comparten numerosas características con la neuropatía óptica glaucomatosa. Esta técnica se basa en la fotocoagulación con láser de las vías de drenaje del humor acuoso, malla trabecular, venas perilimbares y episclerales (Ueda y cols., 1998; Hare y cols., 2001; WoldeMussie y cols., 2001; Salinas-Navarro y cols., 2009b; Vidal-Sanz y cols., 2012) lo que genera una subida de la PIO. Este método fue descrito originalmente descrito en mono (Quigley y Hohman, 1983) y posteriormente modificado para rata (WoldeMussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009b; Vidal-Sanz y cols., 2012) y ratón (Aihara y cols., 2003b; Grozdanic y cols., 2003; Salinas-Navarro y cols., 2009c; Gallego y cols., 2012; Rojas y cols., 2014). Al igual que el resto de modelos, éste no simula exactamente las condiciones del glaucoma en el ser humano pero puede ser útil para comprender la fisiopatología involucrada en el daño retiniano

inducido por la HTO (para una revisión, ver Morrison y cols., 2008). Esta técnica tiene ciertas variaciones entre autores, así en diversos experimentos se introduce tinta china dentro de la cámara anterior previo a la aplicación de láser para un resultado más eficiente (Ueda y cols., 1998). En otros trabajos en ratón, se inyecta verde de indocianina en el segmento anterior para obtener un efecto más crónico en el aumento de la PIO (Grozdanic y cols., 2003). Este modelo cursa con la característica degeneración y muerte de las CGR y sus axones, de forma similar a como sucede en la neuropatía óptica glaucomatosa humana (Hare y cols., 2001; WoldeMussie y cols., 2001; Ji y cols., 2005; Li y cols., 2006; Holcombe y cols., 2008; Salinas-Navarro y cols., 2009c, 2010; Vidal-Sanz y cols., 2012).

El daño de las CGR cursa con déficits funcionales tempranos (Schlamp y cols., 2001; Holcombe y cols., 2008), incluyendo alteraciones en las propiedades de su flujo axoplásmico (Quigley y Anderson, 1976; 1977; McKerracher y cols., 1990a, 1990b; Lafuente López-Herrera y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2010), alteraciones en varias funciones metabólicas (Nash y Osborne, 1999; Schlamp y cols., 2001; Casson y cols., 2004; Chidlow y cols., 2005) y en la regulación de un sustancial número de genes (Agudo y cols., 2008, 2009), que incluye la inhibición de Brn3a (Nadal-Nicolás y cols., 2009) poco antes de su muerte.

En nuestro laboratorio hemos caracterizado modelos de hipertensión ocular tanto en rata albina (Salinas-Navarro y cols., 2009b; Vidal-Sanz y cols., 2012) como en ratón albino (Salinas-Navarro y cols., 2009c; Gallego y cols., 2012; Rojas y cols., 2014). En ambos modelos observamos un aumento rápido de la PIO tras la fotocoagulación de las venas episclerales y perilimbares. Primero se observa un daño en el transporte axonal de las CGR, normalmente en forma de sector con vértice en el nervio óptico, más acusado en la retina dorsal. Derivado de este daño axonal, se produce la muerte progresiva de las CGR residentes en los sectores con daño axonal. Una vez cuantificado el daño axonal, contado las CGR marcadas desde los colículos superiores con un trazador, se equipara a la población de células ganglionares supervivientes en la retina, inmunodetectadas con Brn3a, la muerte de las CGR no progresa.

1.5.2.2. Inyección episcleral de suero salino hipertónico

La inyección episcleral de suero salino hipertónico es un modelo que produce la escleriosis de la vía de drenaje del humor acuoso a nivel de la malla trabecular, provocando un aumento de la resistencia en su drenaje con el consecuente aumento de la PIO (Morrison y cols., 1997, 2005). Esta técnica reproduce la muerte de las CGR (Schlamp y cols., 2001; Hänninen y cols., 2002; Guo y cols., 2005), la degeneración axonal del NO (Morrison y cols., 1997; Johnson y cols., 2000; Chauhan y cols., 2002) y la morfología típica de la cabeza del NO en la neuropatía óptica glaucomatosa (Chauhan y cols., 2002; Guo y cols., 2005). Variando la PIO se observó que existía una afectación selectiva de la funcionalidad de la retina interna para aumentos de PIO medios, mientras que para incrementos de PIO muy elevados se veía incluso afectada la retina

externa (Fortune y cols., 2004). También se observaron cambios en los patrones de expresión génica en la retina y en la cabeza del NO en un modelo en rata (Ahmed y cols., 2004; Johnson y cols., 2007).

1.5.2.3. Cauterización de las venas epiesclerales

Otro modelo de elevación de PIO por cambios en la vía de drenaje del humor acuoso es la cauterización de las venas epiesclerales (Shareef y cols., 1995). En este modelo el número de venas cauterizadas se correlaciona con la gravedad de la lesión ocasionada y el aumento de PIO provocado. La cauterización de una vena no tiene repercusión sobre la PIO, pero la cauterización de dos venas ya ocasiona una elevación significativa de unos 10 mmHg sobre el valor basal. La cauterización de las cuatro venas provoca un aumento excesivo de más de 60 mmHg. El número de venas cauterizadas más utilizado es de tres venas, ya que ocasiona un aumento de 50 mmHg en el ojo experimental que se normaliza a 15-20 mmHg, manteniéndose en estos valores hasta un periodo máximo de 2 meses. Esta elevación de PIO provoca una muerte de CGR en un ratio aproximado del 4% de la población por semana. Mientras que en los modelos de aumento de PIO anteriormente expuestos, el daño axonal ocasionado causaba una muerte de CGR más clara en la zona superior, con este modelo se observa un patrón de muerte más difuso y en periferia de la retina (Morrison y cols., 2005).

1.5.2.4. Inyección de sustancias que inducen un aumento de PIO

Mientras que las técnicas de aumento de PIO anteriormente descritas tienen como objetivo alterar las vías de drenaje del humor acuoso, este modelo se basa en el bloqueo de dichas vías. Esto se consigue por medio de distintas sustancias inyectadas en la cámara anterior, las cuales, siguen el flujo normal del humor acuoso hasta quedar localizadas en el ángulo de la cámara, lo que provoca una alteración en el drenaje con la subsecuente elevación de la PIO. La administración intracamerular periódica (semanalmente) de ácido hialurónico, que se asocia a la malla trabecular bloqueandola, produce un incremento significativo de la PIO hasta los 10 meses en ratas (Moreno y cols., 2005). Por otro lado, la inyección de microesferas de látex con o sin suplemento de hidroxipropilmetilcelulosa también produce un bloqueo en el drenaje a nivel de malla trabecular y resulta en un aumento de la PIO (Urcola y cols., 2006; Sappington y cols., 2010). En este caso, múltiples inyecciones semanales fueron necesarias para obtener un aumento significativo de la PIO. Este modelo tiene la desventaja de tener que realizar reiteradas inyecciones para alcanzar valores significativos de HTO; lo que conlleva el riesgo de provocar inflamación y/o alteración corneal.

La administración sistémica de antígeno-S en adyuvante completo de Freund permite recrear en roedores un modelo de glaucoma uveítico, que alcanzar valores medios de PIO sobre 35 mmHg durante alrededor de 2 semanas. Este aumento de PIO se atribuye a un cierre del ángulo acompañado de un incremento en la producción de humor acuoso y, posiblemente, a una reducción de la facilidad de su drenaje (Mermoud y cols., 1994).

1.5.3. Inducción de muerte de las CGR

En algunos casos, se opta por ocasionar un daño específico en las CGR como simulación de lesión por glaucoma sin alterar la PIO. Esto se consigue mediante el daño mecánico en el nervio óptico, la inyección intraocular de agentes tóxicos o la inducción de isquemia transitoria. Hay que tener en cuenta que estos modelos no siguen el patrón directo de glaucoma humano, pero el daño ocasionado en la población de CGR y su posible neuroprotección, han sido objeto de numerosos estudios con estas técnicas.

1.5.3.1. Lesión en nervio óptico

La sección o aplastamiento del nervio óptico (SNO) en mamíferos induce en pocos días la degeneración y muerte de una gran parte de la población de CGR, las células no mueren inmediatamente después de la lesión sino que siguen degenerando durante meses (Barron y cols., 1986; Thanos, 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993). Así, la SNO es un modelo clásico para inducir la muerte de las CGR (Vidal-Sanz y cols., 1987, 1991, 1993, 2000; Villegas-Pérez y cols., 1988, 1993; Peinado-Ramón y cols., 1996; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla-Reverter y cols., 2009a; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b, 2010; Galindo-Romero y cols., 2013a) que recuerda la muerte secundaria por daño mecánico de dichas células inducida por patologías como el glaucoma.

La interrupción del axón por medio de la sección o aplastamiento del NO produce una degeneración en ambos sentidos; anterógrada que afecta al segmento axonal distal desconectado del soma celular, y retrógrada que afecta al segmento proximal y termina produciendo la muerte del soma neuronal. La hipótesis que intenta explicar la muerte de las CGR tras la axotomía es la falta de aportes tróficos por parte de las neuronas que eran sus centros de proyección o diana para la célula ganglionar (Hendry, 1975; Bray y cols., 1992).

La muerte de las CGR tras la SNO en rata sigue un patrón temporal. Existe una fase de muerte temprana o rápida que ocurre hasta las 2 semanas tras la lesión axonal en la que mueren el 80% de la población de CGR y una fase de muerte tardía o lenta que llega hasta los 6 meses en la que degeneran y mueren un 15% más de CGR (Barron y cols., 1986; Thanos, 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993). A los 6 meses sobrevive un 5% de CGR a la lesión axonal; se ha postulado

que estas CGR tendrían diferentes necesidades tróficas que serían suplidas por la propia retina (De Araujo y Linden, 1993; Gao y cols., 1997; So y Yip, 1998). La SNO en el ratón cursa con patrones de muerte similares a la rata, así el 85% de las CGR mueren a las 2 semanas tras la SNO y 2 meses después del daño axonal todas las CGR desaparecieron (Kilic y cols., 2002; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013).

Aunque la SNO induce siempre la degeneración retrógrada de una parte de las CGR, se ha documentado que en la rata adulta el patrón temporal de muerte neuronal tras las SNO varía en función de la distancia a la que se seccione el NO con respecto al globo ocular (Villegas-Pérez y cols., 1988; Domenici y cols., 1991), las secciones proximales al globo ocular inducen un patrón de muerte más rápido que las secciones más distales al ojo (Villegas-Pérez y cols., 1993), del mismo modo las lesiones inducidas por la sección completa del NO inducen una muerte de CGR más rápida que las inducidas por el aplastamiento del NO (Parrilla-Reverter y cols., 2009a).

Aunque aparentemente la SNO sólo afecta a la capa de CGR, no viéndose afectadas otras neuronas de la retina (Villegas-Pérez y cols., 1993; Kielczewski y cols., 2005), se han descrito alteraciones funcionales en la población de células amacrinas, bipolares y fotorreceptores de la retina (Schremser y Williams, 1992; Günhan-Agar y cols., 2000; Germain y cols., 2004).

Funcionalmente, la afectación de la retina a los 3 meses tras la sección del NO es mínima para las ondas electroretinográficas relacionadas con la retina externa, ondas a y b, y muy alta para las ondas relacionadas con retina interna, ondas pSTR y nSTR (Bui y Fortune, 2004; Alarcón-Martínez y cols., 2009).

Aunque este tipo de lesión en el sistema visual del roedor adulto produce alteraciones funcionales (Mckerracher y cols., 1990a, 1990b; Schlamp y cols., 2001; Casson y cols., 2004), metabólicas (Lindqvist y cols., 2002; Chidlow y cols., 2005; Agudo-Barriuso y cols., 2013) y génicas (Agudo y cols., 2008, 2009; Nadal-Nicolás y cols., 2009); comúnmente se acepta que la SNO resulta en una pérdida de CGR, pero no de otras neuronas (Carter y cols., 1987; Villegas-Pérez y cols., 1993). Por tanto, este modelo experimental de lesión de las CGR es adecuado para estudiar estrategias de neuroprotección que podrían ser adaptadas a otros modelos experimentales de lesión de las CGR que cursan con aumento de PIO.

En nuestro laboratorio, este tipo de lesión ha sido estudiada y caracterizada en profundidad tanto en rata albina (Vidal-Sanz y cols., 1987, 1991, 1993, 2000; Villegas-Pérez y cols., 1988, 1993; Peinado-Ramón y cols., 1996; Alarcón-Martínez y cols., 2009; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Parrilla-Reverter y cols., 2009a; Sánchez-Migallón y cols., 2011) como en ratón albino y pigmentado (Alarcón-Martínez y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011, 2013a), siendo un buen modelo tanto para el estudio de sustancias neuroprotectoras como para valorar el curso de muerte de las CGR y de la expresión de marcadores moleculares tras lesión. Dependiendo de la técnica de detección, la muerte de CGR se observa antes cuando éstas se identifican por su expresión de Brn3a que cuando se identifican con trazadores neuronales retrógrados (FG/OHSt),

debido a la distinta naturaleza de ambos marcadores. Mientras que el Brn3a es un marcador endógeno cuya expresión desaparece al morir la neurona, el FG/OHSt es un marcador exógeno, que sólo desaparece del tejido cuando los detritus de las CGR son fagocitados por las células de microglía (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2013b).

1.5.3.2. Inyección intraocular de agentes excitotóxicos

El glutamato es el principal neurotransmisor en numerosas sinapsis de la retina, pero un gran exceso de esta sustancia en el medio extracelular produce lo que se denomina excitotoxicidad. La excitotoxicidad se ha asociado al glaucoma (Pang y Clark, 2007) por lo que la inyección intravítrea de aminoácidos como el glutamato o el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA, N-Methyl-D-aspartate) podría imitar el mecanismo de excitotoxicidad observado en pacientes con glaucoma. Por medio de este modelo excitotóxico se ha inducido la apoptosis de las CGR y la degeneración de sus axones tanto en ratón (Li y cols., 1999, 2002) como en rata (Siliprandi y cols., 1992; Morizane y cols., 1997; Lam y cols., 1999; Osborne y cols., 1999; Honjo y cols., 2000; Mizuno y cols., 2001). Estudios usando estos componentes han demostrado que existe una muerte celular en capas internas de retina y que la muerte no se limita sólo a las CGR (Sun y cols., 2001).

1.5.3.3. Isquemia de retina

La disminución del aporte sanguíneo a la retina se ha asociado con la neuropatía óptica glaucomatosa existiendo varios modelos experimentales que lo reproducen (*para una revisión ver* Pang y Clark, 2007). Existen técnicas de isquemia reversibles, aquellas que una vez finalizado el periodo de isquemia deseado permite la reperusión retiniana; e irreversibles, aquellas en las que el bloqueo de la circulación se mantiene hasta el sacrificio del animal. Este modelo produce muerte de las CGR, pero además, otras capas de la retina se ven afectadas, por lo que está aceptado que éste es un modelo degenerativo de la retina más que de glaucoma per sé. Sin embargo, este modelo es muy utilizado para investigar la muerte y disfunción de las CGR y particularmente la importancia del papel potencial de la insuficiencia vascular en glaucoma.

Las técnicas desarrolladas para inducir una isquemia transitoria o reversible de la retina, se basan principalmente en la compresión intraocular de las arterias retinianas (Hughes, 1991), en aumentar la presión intraocular por encima de los valores sistólicos (Sellés-Navarro y cols., 1996), en la disección y ligadura selectiva de los vasos sanguíneos retrobulbares que se dirigen a irrigar la retina (Lafuente López-Herrera y cols., 2002).

Las técnicas irreversibles de isquemia retiniana son aquellas en las que el bloqueo de la circulación se mantiene hasta el sacrificio del animal. El cierre de los vasos retinianos por medio

de la fotocoagulación láser produce una obstrucción circulatoria. Esta técnica permite inducir isquemias permanentes de regiones selectivas de retina (Levkovitch-Verbin, 2004).

1.5.3.4. Neuropatía óptica inducida por endotelina

La endotelina es un péptido vasoconstrictor producido por las células endoteliales vasculares, un exceso en la concentración de dichos péptidos se ha relacionado con el glaucoma (Sugiyama y cols., 1995; Tezel y cols., 1997; Emre y cols., 2005). Así la administración intravítrea de endotelina-1 puede producir una disminución del flujo sanguíneo o isquemia parcial de la retina (Bursell y cols., 1995; Nishimura, 1996) con pérdida de CGR (Chauhan y cols., 2004), afectación del transporte anterógrado (Stokely y cols., 2002) y activación astrocítica (Prasanna y cols., 2002).

1.5.3.5. Sistemas *in vitro*

Los modelos *in vivo* son muy útiles a la hora de probar fenómenos que ocurren en los mecanismos vivos, pero existen factores que no son posibles de controlar en estas condiciones. Los modelos *in vitro* tienen la gran ventaja de poder recrear modelos neurodegenerativos en unas condiciones altamente controladas y en un microambiente muy específico. Existen dos tipos de sistema *in vitro*: el cultivo de CGR como células primarias aisladas de roedores y el cultivo de retina explantada. En este modelo se debe tener en cuenta que la célula se encuentra axotomizada, por lo que no se pueden hacer modelos de degeneración axonal.

1.5.3.6. Cultivos de células ganglionares de la retina

El cultivo de CGR, el principal tipo celular afectado en glaucoma, es un modelo útil para estudiar la respuesta biológica, farmacológica y/o electrofisiológica de estas células en condiciones de aislamiento del resto del ojo (Otori, 2008).

1.5.3.7. Cultivos de explantes de retina

Los explantes de retina se han utilizado para el estudio de su desarrollo y su electrofisiología (Seigel, 1999). Este sistema es especialmente útil para experimentos que requieren mantener las células integradas en el complejo estructural de la retina, pero que no pueden reproducirse *in vivo* por limitaciones de acceso al tejido, un menor control del experimento u otros factores.

1.6. SIMILITUDES ENTRE GLAUCOMA HUMANO Y DE RATÓN

En nuestros experimentos se ha utilizado un modelo de glaucoma desarrollado en ratón para el estudio de la vía visual y sus patologías. Por ello es importante identificar las diferencias y analogías en la anatomía ocular entre el primate y el roedor.

Un rasgo característico del glaucoma humano es el frecuente defecto visual focal asociado a una pérdida específica de CGR. Los defectos visuales más acusados son los escotomas arcuatos, los cuales son fácilmente detectables con test específicos (Shields, 2004). En estos casos, las fibras nerviosas dañadas se sitúan en la región temporal de la retina y justo un poco encima y debajo de la fóvea. En el caso de modelos en ratón, dado que los axones de las CGR están dispuestos de manera radial, siendo el eje la cabeza del NO, el patrón de daño es equivalente al humano ya que ocurre en sectores. Por ejemplo, en ratones transgénicos DBA/2, las CGR y sus axones dañados siguen un patrón en forma de abanico o regiones incompletas (Danias y cols., 2003; Jakobs y cols., 2005; Schlamp y cols., 2006; Crish y cols., 2010). Este tipo de muerte por sectores también lo hemos caracterizado en nuestro modelo en ratones albinos Swiss (Salinas y cols., 2009c; Gallego y cols., 2012; Rojas y cols., 2014) y en rata (Salinas y cols., 2009a, 2010; Vidal-Sanz y cols., 2012). Este patrón es comparable a los escotomas humanos, esta muerte celular de amplios sectores de retina en roedores es resultado de la afectación de “paquetes” de axones a nivel de la lámina cribosa en la cabeza del NO.

Los roedores no tienen una lámina cribosa típica en la cabeza del nervio óptico, como los humanos o los primates (Ramirez y cols., 1996; Triviño y cols., 1996); pero en su lugar poseen una extensa lámina celular de astrocitos que rodea las fibras del nervio óptico (Morrison y cols., 1995b; Morcos y Chang-Ling, 2000; May y Lütjen-Drecoll, 2002). Además, la cabeza del NO de rata posee una lámina vertical que contiene colágeno, elastina, laminina y proteoglicanos (Morrison y cols., 1995b).

El estudio, identificación y caracterización del mecanismo o mecanismos que desencadenan el daño axonal a nivel de la lámina cribosa y los procesos involucrados en su propagación a través del axón hasta el soma celular son de gran importancia a la hora de abordar terapias de éxito en humanos. Puede que el daño inicial sea un hecho intrínseco de las propias CGR o extrínseco, comprometiendo a otro tipo de células. Otros tipos de células presentes en el nervio óptico son las células gliales (astrocitos, microglía y oligodendrocitos). Los astrocitos forman una red celular en la lamina glial del ratón. Algunos estudios han apuntado que una elevación de la PIO puede alterar los astrocitos y resultar en daño o muerte de CGR (Hernández, 2000). En dos estudios independientes, el primero en un modelo inducido en rata y el segundo con ratones DBA/2, mostraron un incremento de la expresión de genes relacionados con astrocitos en respuesta a la elevada PIO (Ahmed y cols., 2004; Steele y cols., 2006). La microglía es otro tipo de células presentes en el nervio óptico y que pueden contribuir al desarrollo del glaucoma (May y Mittag, 2006; Nakazawa y cols., 2006; Son y cols., 2010). Nakazawa y colaboradores (2006) han

sugerido la participación de los oligodendrocitos en el daño axonal producido en el nervio óptico por glaucoma. Los oligodendrocitos son muy numerosos en el nervio óptico desde el inicio de la porción mielinizada. Según estos estudios, la muerte de oligodendrocitos provoca un daño en las CGR (Nakazawa y cols., 2006, Son y cols., 2010). Dentro de la cabeza del nervio óptico, la denominada “myelination transition zone” (MTZ), se ha demostrado que tras una subida de PIO, los astrocitos presentes en esta zona presentan una sobrerregulación de Mac-2, lo que puede indicar que el daño axonal que se produce tras la HTO, se inicia en esta zona (Nguyen y cols., 2011; Davis and Marsh-Armstrong, 2014).

Otras similitudes se dan en las estructuras del ángulo irido-corneal (Van der Zypen, 1977; Morrison y cols., 1995a; Smith y cols., 2001) entre roedores y primates. Las vías de drenaje del humor acuoso son comparables en ambas especies; los roedores poseen una malla trabecular, un canal de Schlemm y una dinámica del humor acuoso similar a la de humanos (Aihara y cols., 2003a). Las estructuras de drenaje del humor acuoso juegan un papel importante a la hora de determinar la PIO y su elevación en glaucoma. Las dos vías de drenaje de humor acuoso presentes en los humanos, la convencional y la uveoescleral, existen en los roedores (John y cols., 1999). Ambas especies tienen el canal de Schlemm y la malla trabecular situadas en el ángulo del ojo (Smith y cols., 2001). Además de las similitudes en la estructura, existen respuestas funcionales parecidas a drogas que inhiben la producción y la facilidad de salida de humor acuoso (Aihara y cols., 2003b; Avila y cols., 2003), indicando que el roedor representa un modelo muy válido para el estudio de la PIO y su elevación por glaucoma.

1.7. NEUROPROTECCIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En el SNC, un daño producido en el axón de una neurona provoca una interrupción inmediata de los impulsos nerviosos y la consecuente pérdida de funcionalidad neuronal. Las neuronas del SNC no tienen la capacidad de dividirse, por lo que tras una lesión, degeneración o cualquier daño provocado no pueden sustituir las neuronas comprometidas por otras viables y terminan degenerando y muriendo. Solamente se podría restablecer la funcionalidad mediante la regeneración de los axones dañados de tal manera que vuelvan a conectar con sus territorios de inervación y restablezcan sinapsis funcionales. No ocurre así en el sistema nervioso periférico (SNP), ya que la mayoría de las neuronas tienen la capacidad de sobrevivir, regenerar y restablecer la sinapsis y funcionalidad tras una lesión axonal. Al producir un daño en un axón de una neurona se produce una degeneración retrógrada, desde el sitio de lesión al soma, que provoca la degeneración y posterior muerte de la neurona y otra degeneración anterógrada, en la que el axón degenera hacia su extremo distal, en el caso del nervio óptico, hacia las regiones retinotectales. Estas lesiones en el sistema nervioso vienen acompañadas de una activación de la glía, que intenta mantener la homeostasis tisular.

La degeneración neuronal en el SNC produce muerte celular programada o apoptosis (Bekelaar y cols., 1994), un proceso ordenado y regulado desencadenado por la activación de cascadas moleculares proapoptóticas que provocan una degradación interna de la neurona afectada y que se caracteriza por una disminución del volumen celular, degradación de proteínas, fragmentación del ADN, condensación cromatínica, fragmentación del núcleo, formación de los cuerpos apoptóticos (rodeados de membrana) y fagocitosis de estos cuerpos apoptóticos por células fagocíticas; sin que en ningún caso se vierta el contenido celular al exterior. La muerte celular por apoptosis está implicada en numerosas enfermedades neurodegenerativas y neurológicas del SCN, como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson, entre otras.

A lo largo de los años se ha tratado de evitar o, al menos, ralentizar la degeneración de las neuronas del SNC mediante la administración de múltiples agentes neuroprotectores; ya que estas neuronas, al contrario que las del SNP, no tienen capacidad de regenerar. Se han desarrollado diversas terapias neuroprotectoras con el fin de promover y aumentar la supervivencia neuronal y su conectividad para preservar los circuitos neuronales, (Harvey y cols., 2009).

1.7.1. Ventajas de trabajar en retina como modelo de degeneración del sistema nervioso central

La retina, al formar parte del SNC, presenta una serie de ventajas a la hora de realizar estudios de terapia neuroprotectora. La principal es su fácil accesibilidad, además de poder administrar fármacos o drogas vía sistémica o vía local mediante administración intravítrea, intracameral, subretiniana, o intracraneal desde sus territorios de proyección en el SNC por transporte retrogrado y, también, por vía local tópica, mediante colirios o ungüentos oculares aplicados sobre la superficie ocular (Aguayo y cols., 1987; Bray y cols., 1987; Isenmann y cols., 2006; Vidal-Sanz y cols., 2012).

La localización de la retina, aislada del resto del SNC dentro del globo ocular permite que sea fácilmente accesible para manipulaciones experimentales, registro de parámetros fisiológicos y seguimiento a largo plazo (Vidal-Sanz y cols., 1991). Además, la población de las CGR de roedor, constituida aproximadamente por 40.000 en ratón y 80.000 en rata, ha sido muy bien caracterizada, anatómica y funcionalmente (Alarcón-Martínez y cols., 2009, 2010; Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Ortín-Martínez y cols., 2010). Los axones de las CGR forman el NO y presentan su máxima organización retinotópica en la cabeza del NO (Guillery y cols., 1995; Fitzgibbon y Taylor, 1996; Jeffery, 2001; Jeffery y cols., 2008). Otra ventaja del estudio de la retina en roedores es que podemos analizar su funcionalidad *in vivo* mediante electroretinogramas y diferenciar las ondas emitidas por los distintos tipos celulares de la retina, como los fotorreceptores o CGR (Alarcón-Martínez y cols., 2009, 2010).

1.7.2. Terapias de neuroprotección

Son numerosos los estudios que han aplicado una gran variedad de terapias neuroprotectoras ante la pérdida de CGR tras la elevación de la PIO. Como son:

El tratamiento crónico con aminoguanidina, un inhibidor del óxido nítrico sintetasa 2 (NOS-2, *nitric-oxide synthase 2*), induce la bajada de la PIO, principal factor de riesgo del glaucoma. El tratamiento resulta en la conservación de las CGR y de su transporte axonal (Neufeld y cols., 1999). Pero se ha demostrado que bajando únicamente los niveles de PIO no es suficiente para rescatar o prevenir las muerte de las CGR tras HTO (Pascale y cols., 2012).

Otras terapias, que actúan directamente sobre las CGR como la administración sistémica de galantamina (Almasieh y cols., 2010), un inhibidor de la acetilcolinesterasa, provoca la activación de los receptores muscarínicos y promueve la protección de los somas y los axones de las CGR tras HTO, sin tener ningún efecto sobre la PIO, o la administración intraperitoneal del agonista del receptor opioide delta (Abdul y cols., 2013) que recupera la supervivencia de las CGR y su funcionalidad. La administración de agonistas de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos como la brimonidina, aumentan la producción de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*) y neuroprotege la retina (Lambert y cols., 2001; Woldemussie y cols., 2001). También se ha documentado que la administración oral de memantina, un antagonista del receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA), mejoraba la respuesta electrofisiológica en monos con HTO (Hare y cols., 2001).

Además, se ha constatado que las inyecciones intravítreas de factores neurotróficos como el factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Pease y cols., 2009), el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (Jiang y cols., 2007) o el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) administrado sólo (DiPolo y cols., 1998; Quigley y cols., 2000; Ko y cols., 2001; Martin y cols., 2003; Lebrun-Julien y DiPolo, 2008; Wilson y DiPolo, 2012) o en combinación con el antagonista del receptor Lingo-1 (Fu y cols., 2009) aumentan la supervivencia de las CGR en diferentes modelos de glaucoma.

Sin embargo, otras estrategias como la administración de lamotrigina, un bloqueador de canales de sodio, han demostrado ser ineficaces en la prevención de la pérdida de CGR tras la inducción de HTO (Marina y cols., 2012; Sandalon y cols., 2013).

1.7.2.1. Factores neurotróficos

Los factores neurotróficos o neurotrofinas son factores de crecimiento endógenos que se unen a receptores de determinados grupos neuronales y están involucrados en su supervivencia, crecimiento, regeneración, proliferación, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis de las

neuronas en el SNC y SNP. Trófico, que proviene del griego, significa *nutriente*, pues su aporte es indispensable para el correcto desarrollo neuronal. Al igual que el resto de neuronas, las CGR reciben un aporte continuo de factores neurotróficos procedentes retrógradamente desde el cerebro y dentro del ojo, desde las células de Müller, que son las principales células gliales en la retina, y, además, desde el epitelio pigmentario (Almasieh y cols., 2012; Kolomeyer y Zarbin, 2014).

Como se ha descrito en el apartado anterior, existen numerosos estudios de neuroprotección en HTO que describen la eficacia de la administración de estas neurotrofinas (DiPolo y cols., 1998; Quigley y cols., 2000; Ko y cols., 2001; Martin y cols., 2003; Jiang y cols., 2007; Lebrun-Julien y DiPolo, 2008; Fu y cols., 2009; Pease y cols., 2009; Wilson y DiPolo, 2012). Tras la HTO aguda se produce una rápida degeneración de los axones de las CGR que desencadena la muerte de la propia célula. Esto podría deberse a la falta total o parcial de aporte de estos factores tróficos, que reciben desde sus centros de proyección en el cerebro, por lo que una administración exógena de neurotrofinas puede ser clave para su supervivencia (Mansour-Robaey y cols., 1994).

Existen dos familias de neurotrofinas. La primera incluye el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina (NT-3) y las neurotrofinas 4/5 (NT-4/5). El NGF se une al receptor p75 y al receptor de tropomiosina quinasa A (TrkA, *tropomyosin-related kinase A*). El BDNF y la NT-4/5 se unen al receptor TrkB y el NT-3 al receptor TrkC (Ebadi y cols., 1997). La segunda familia la compone el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), la neurturina, artemina, y la persefina. Todos ellos comparten el receptor Ret (Jing y cols., 1996; Treanor y cols., 1996; Trupp y cols., 1996), que presenta actividad tirosina quinasa, al igual que los receptores Trk de las neurotrofinas. Mientras que la especificidad de la unión del ligando con su receptor viene determinada por los receptores α (GFR α , del inglés *GDNF family receptor alpha*), se han descrito cuatro (GFR α 1-4) que presentan una afinidad específica para cada miembro de la familia del GDNF. Otras clases de factores tróficos son el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*), factor neurotrófico ciliar (CNTF, *ciliary neurotrophic factor*), el factor de crecimiento ligado a heparina (HB-EGF, *heparin-binding EGF-like growth factor*), el factor de crecimiento insulínico (IGF, *insulin-like growth factor*) o el factor crecimiento transformante (TGF, *transforming growth factor*) (Kolomeyer y cols 2014).

1.7.2.1.1. Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), el segundo miembro de la familia de las neurotrofinas, fue descubierto en 1982 y se demostró que era capaz de promover la supervivencia de una subpoblación de células de la médula de cerdo (Barde y cols., 1982).

La supervivencia, el desarrollo y la plasticidad sináptica de las neuronas del SNC dependen del aporte de una serie de agentes moleculares como el NGF y el BDNF. El BDNF es una proteína purificada del cerebro de los mamíferos, vital en la supervivencia y el desarrollo de las neuronas del SNC y SNP (Johnson y cols., 1986; Binder y Scharfman, 2004).

La expresión del gen BDNF es regulada por la actividad neuronal mediante mecanismos dependientes de calcio. Como hemos introducido en el apartado anterior, el receptor del factor BDNF es el receptor tropomiosina kinasa B (TrkB) y al igual que la neurotrofina, su función también está regulada por la actividad neuronal.

El BDNF es la neurotrofina más abundante en el cerebro del adulto y en la retina se expresa en neuronas de la CCG y la CNI (Cohen-Cory y Fraser, 1994; Pérez y Caminos, 1995; Vecino y cols., 1998). En cerebro el BDNF se expresa mayoritariamente en el hipocampo, en el cortex y en los CS (Hofer y cols., 1990; Maisonpierre y cols., 1990; Wetmore y cols., 1990), que como hemos visto anteriormente, son los principales territorios de proyección de las CGR. Esto indica que una vía de aporte de BDNF a las CGR es su transporte retrógrado desde los CS (Herzog y Von Bartheld, 1998; Ma y cols., 1998).

Tras una lesión en los axones de las CGR, bien por aumento de la PIO, por sección o aplastamiento del NO, se produce una sobreexpresión de BDNF aunque las CGR acaban muriendo por muerte celular programada o apoptosis (Almasieh y cols., 2012). Se ha demostrado que la administración de BDNF en modelos de HTO ralentiza la muerte de las CGR (DiPolo y cols., 1998; Quigley y cols., 2000; Ko y cols., 2001; Martin y cols., 2003; Lebrun-Julien y DiPolo, 2008; Wilson y DiPolo, 2012); pero este efecto neuroprotector es transitorio (Isenmann y cols., 2004).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el desarrollo de la parte conceptual de esta tesis, hemos partido como base de los resultados de varios estudios previos. Semo y colaboradores (2014) muestran un subtipo de CGRm localizadas en la ZMC de las retinas de ratón pigmentado, con una morfología dendrítica particular. Los autores sostienen que estas células podrían estar involucradas en la respuesta intrínseca del reflejo pupilar (Semo y cols., 2014; Vugler y cols., 2015). Estos resultados nos sugieren que, realizando un marcaje retrógrado de las CGR con un trazador neuronal desde el muñón del NO, seríamos capaces de discernir si esas CGRm, localizadas en la ZMC de la retina, mandan su axón a través del NO. Nuestra hipótesis en este apartado es que el axón de estas CGRm localizadas en la ZMC de retina, no pasará por el NO.

En otro estudio, Galindo-Romero y colaboradores (2013a) muestran la distribución de las CGRm en ratas albinas y estudian su colocalización con el factor de transcripción Brn3a, y las proyecciones de las CGRm a cerebro. En este trabajo nos planteamos el estudio de las CGRm en ratón pigmentado y albino, ya que esta especie es mucho más común en modelos experimentales. Además, existe gran controversia en la respuesta de las CGRm ante diferentes condiciones patológicas, como la HTO (Li y cols., 2006; Drouyer y cols., 2008; de Zavalía y cols., 2011; Cui y cols., 2015). Por esto, nos planteamos analizar la respuesta de las CGRm, y compararla con el resto de CGR no melanopsínicas en un modelo experimental de HTO en ratón pigmentado, similar al producido en otros estudios previos (Salinas-Navarro y cols., 2009c, 2010; Gallego y cols., 2012; Rojas y cols., 2014; de Hoz y cols., 2014). Nuestra hipótesis en este apartado es que habrá más supervivencia de CGRm que de CGR no melanopsínicas tras HTO.

Para seguir profundizando en el estudio de las CGRm, analizamos su neuroprotección mediante la administración intraocular del factor neurotrófico BDNF en un modelo de HTO en rata; ya que en estudios previos en modelos de axotomía, este factor ha demostrado ser muy eficaz sobre la población de CGR (Sánchez-Migallón y cols., 2011; Galindo-Romero y cols., 2013b). Nuestra hipótesis en este apartado es que la administración de BDNF ralentizará la muerte de las CGRm y de las CGR no melanopsínicas tras HTO.

2.1. OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de esta tesis son:

1. Caracterizar la población de CGRm del ratón pigmentado y albino adulto.
2. Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO en ratón pigmentado.

3. Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO y su protección con BDNF en rata albina adulta.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Caracterizar la población de CGRm del ratón pigmentado y albino adulto

1. Inmunohistofluorescencia para detectar las CGR que expresan melanopsina en montajes globales de retina.
2. Estudio de las CGRm en retinas trazadas con OHSt desde NO. Análisis específico en la zona marginal ciliar de retina.
3. Contaje y análisis de la distribución espacial de las CGRm en los montajes globales de retina.
4. Estudio de la población y distribución espacial de las CGRm desplazadas a la capa nuclear interna.

2.2.2. Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO en ratón pigmentado

1. Metodología de fotocoagulación con láser (FL) de las venas epiesclerales y perilimbares para inducir una elevación de la presión intraocular.
2. Estudio de la población y distribución de las CGR Brn3a⁺ y las CGRm a diferentes tiempos post-lesión y correlacionar esta población con las CGR marcadas retrógradamente desde los CS cuyos axones se mantienen viables.
3. Analizar si el daño provocado tras HTO es selectivo de las CGR en la capa de CGR o si afecta a otra población celular en esa capa.
4. Estudiar el transporte axonal anterógrado de las CGR y los terminales axonales de las CGR a tiempos largos post lesión.

2.2.3. Estudiar la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO y su protección con BDNF en rata albina adulta

1. Estudiar el daño axonal provocado y la supervivencia de CGR tras la HTO en ratas tratadas con BDNF o vehículo a 12 y 15 días tras HTO.
2. Estudiar la distribución de la población de las CGRm en retinas de rata tratadas con BDNF o vehículo a 12 y 15 días tras HTO.
3. Analizar el estado de los vasos retinianos internos tras HTO.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y ANESTESIA

Para la realización de los experimentos se utilizaron: ratones machos adultos pigmentados (C57BL/6) con un peso que oscilaba entre 25-35 gr, ratones machos albinos (Swiss) con un peso que oscilaba entre 30-35 gr y ratas hembras adultas albinas Sprague-Dawley (SD) con un peso que oscilaba entre 180-220 gr.

Los animales procedían de la colonia de cría de la Universidad de Murcia (Murcia, España). Se alojaron en habitaciones con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con una intensidad de luz de entre 5-30 lux (dependiendo de la ubicación de las cajas respecto a su posición en la habitación) y una temperatura constante de 25°C. La comida y el agua se les proporcionaron *ad libitum*.

Las manipulaciones de los animales se realizaron siguiendo la normativa europea (Directiva 2010/63/UE) y nacional (RD 53/2013) vigente sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. De la misma forma, se siguieron las directrices de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (The Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO). Además se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor y el malestar después de su manipulación, especialmente tras la cirugía.

Todas las manipulaciones quirúrgicas y la medida de la PIO se efectuaron bajo anestesia general inducida por una inyección intraperitoneal (i.p.) de la mezcla de ketamina (70mg/Kg, Ketolar[®], Parke-Davies, S.L., Barcelona, España) y xilacina (10mg/Kg, Rompún[®], Bayer, S.A., Barcelona, España). Estas manipulaciones se realizaron con la ayuda de un microscopio quirúrgico OPMI-11-FC (Carl Zeiss, S.A.) instalado sobre una columna S-21 (Carl Zeiss, S.A.) y con el instrumental de microcirugía apropiado.

Antes de la medida de la PIO con el tonómetro de contacto se instiló una gota de anestésico tópico (Colircusí anestésico doble[®], Alcón Cusí, S.A., Barcelona, España) en los ojos de los roedores.

Durante la recuperación de la anestesia se aplicó a los ojos una pomada que contiene neomicina y prednisona (Oftalmolosa Cusí Prednisona-Neomicina[®]; Alcon S.A., Barcelona, España) para prevenir la desecación de la córnea. En los estudios de HTO se aplicó una pomada antibiótica con tobramicina (Tobrex[®]; Alcon cusí S.A., Barcelona, España) pero sin corticoides, para evitar el efecto de estos últimos sobre la PIO (Zhan y cols., 1992; Whitlock y cols., 2010). Posteriormente, los animales se devolvieron a sus cajas y se reacondicionaron en el estabulario. Para el sacrificio de los animales se inyectó i.p. una sobredosis de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal Vetoquino[®]; Especialidades Veterinarias, S.A. Alcobendas, Madrid, España).

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se detallan las diferentes manipulaciones experimentales, intervalos de supervivencia y el número de animales (tamaño muestral (n) utilizados para lograr los objetivos generales y específicos planteados en este estudio.

3.2.1. Caracterización de la población de CGR melanopsínicas del ratón pigmentado y albino adulto:

Objetivo	Procesado de la retina	Manipulación experimental	Marcadores utilizados	Tamaño muestral (n)	
				Pigmentado C57BL/6	Albino Swiss
Estudiar la localización de las CGRm y las CGRm desplazadas	Secciones transversales	-	Inmunodetección de melanopsina y Brn3a	4	-
Estudiar si las CGRm proyectan sus axones a través del NO	Montajes globales	OHSt aplicado en el MNO	Inmunodetección de melanopsina	10	8
Estudiar si las CGRm son marcadas retrógradamente desde los CS	Montajes globales	OHSt aplicado en los CS	Inmunodetección de melanopsina	7	10
Cuantificar y estudiar la distribución de las CGRm. Colocalización con Brn3a	Montajes globales	-	Inmunodetección de melanopsina y Brn3a	12	11

Tabla 3.1. Ratones utilizados para la caracterización de la población de CGRm. Abreviaturas: CS= colículo superior, MNO= muñón del nervio óptico, n= tamaño muestral.

3.2.2. Estudio de la degeneración de las CGR y las CGRm después de HTO:

Caracterización de un modelo de hipertensión ocular en ratón pigmentado y estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR provocado.

Estirpe	Objetivo	Procesado de la retina o cerebro	Manipulación experimental	Marcadores utilizados	Tamaño muestral (n)	Tiempo estudio post HTO
Ratón pigmentado C57BL/6	Caracterizar el modelo de hipertensión ocular. Curva de presión intraocular inducida y transporte axonal anterógrado	Secciones histológicas de cerebro	FL Inyección intravítrea del marcador CTB	Inmunodetección del trazador CTB	44	Intactos, 10 días, 8 y 14 semanas
	Estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR y CGRm provocado	Montajes globales	FL OHSt aplicado en CS	Inmunodetección de Brn3a y melanopsina	14	2 y 4 semanas
	Analizar si el daño provocado tras HTO es selectivo de las CGR en la capa de CGR o si afecta a otra población celular	Montajes globales	FL	Inmunodetección de Brn3a y tinción con DAPI	8	4 semanas

Tabla 3.2. Ratones utilizados la caracterización de un modelo de HTO en ratón pigmentado y estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR provocado. Abreviaturas: FL= Fotocoagulación láser. CS= colículo superior, n= tamaño muestral.

3.2.3. Efecto del BDNF sobre las CGR y las CGRm en retinas de rata albina tras HTO:

Estirpe	Objetivo	Procesado de la retina	Manipulación experimental	Marcadores utilizados	Tamaño muestral (n)	Tiempo estudio post HTO
Rata albina SD	Estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR tras HTO en animales tratados con BDNF o vehículo	Montajes globales	FL FG aplicado en CS	Inmunodetección de Brn3a	BDNF (n=24)	12 y 15 días
					Vehículo (n=21)	
	Estudiar la distribución de la población de las CGRm en animales tratados con BDNF o vehículo	Montajes globales	FL FG aplicado en CS	Inmunodetección de Brn3a y melanopsina	BDNF (n=8)	12 y 15 días
					Vehículo (n=8)	
	Analizar si los vasos retinianos superficiales se ven afectados tras HTO	Montajes globales	FL FG aplicado en CS	Inmunodetección de Brn3a y RECA	BDNF (n=2)	15 días
					Vehículo (n=2)	

Tabla 3.3. Ratonés utilizados para la caracterización de un modelo de HTO en ratón pigmentado y estudiar el curso temporal de daño axonal y muerte de las CGR provocado. Abreviaturas: FL= Fotocoagulación láser. CS= colículo superior, n= tamaño muestral.

3.3. TRAZADO RETRÓGRADO DE LAS CGR

El marcaje previo de la población de CGR es imprescindible para poder identificar posteriormente las CGR supervivientes y estimar su densidad, tanto en los animales controles como en los experimentales.

Para identificar las CGR se utilizó el trazador neuronal fluorescente metanosulfonato de hydroxistilbamidina (OHSt, hydroxystilbamide methanesulfonate, H22845; Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) para ratones y Fluorogold® (FG; Fluorochrome LLC, Denver, CO, EEUU) para ratas aplicado en ambos CS, los principales territorios de proyección cerebrales de las CGR (Perry, 1981), de acuerdo con técnicas previamente establecidas y descritas (Vidal Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993; Peinado y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 1996) o desde el nervio óptico (Villegas-Pérez y cols., 1993) (**Figura 3.1**). Estudios previos han descrito que la aplicación en los CS de OHSt en ratón y de FG en rata permiten marcar aproximadamente un 96,5% y un 98,4% del total de las CGR, respectivamente; considerando como el 100% las CGR marcadas desde el muñon del NO (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2014).

El OHSt es captado por los terminales axonales de las CGR y transportado activa y retrógradamente hasta el soma celular, donde se acumula. Este acúmulo es fácilmente reconocible, permitiendo identificar y estimar de forma fiable la densidad de CGR mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 3.2**). Únicamente se marcarán retrógradamente aquellas CGR que tengan transporte axonal retrógrado funcional.

3.3.1. Marcaje retrógrado de las CGR desde los CS

Para realizar este marcaje, tras rasurar la parte dorsal de la cabeza y cuello del animal, se realiza una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo, para exponer el cráneo del animal. Tras una craneotomía parietal bilateral, con ayuda de una fresadora (Free-Wheeler, Cordless Moto-tool, Model 850; Dremel, Breda, Holanda), se retira la porción de encéfalo e hipocampo necesaria para exponer bilateralmente la parte posterior del tálamo y ambos CS colículos superiores con ayuda de una micropipeta conectada a un sistema de aspirado (Ordisi S.A., L'Hospitalet, Barcelona, España). A continuación, se aplica en la superficie dorsal de los CS una pequeña porción de esponja de fibrina (Espogostan® Film, Ferrosan A/S, Dinamarca) previamente empapada en una solución salina al 0,9% que contiene un 10% de DMSO y 10% de OHSt (para ratón) o 3% de FG (para rata). Por último, se cubre la craneotomía con esponja de fibrina, se sutura la piel del animal con seda de 5/0 (LorcaMarín, Murcia, España), se aplica ungüento oftálmico de tobramicina (Tobrex®; Tobramicina 3 mg/g) sobre las córneas para evitar su desecación durante la recuperación de la anestesia y se devuelve el animal a una jaula al animalario. Estudios previos han determinado que el tiempo necesario para que el trazador se

transporte desde los CS hasta el soma celular es de 7 días, tanto en ratón como en rata (Villegas-Pérez y cols., 1993; Peinado y cols., 1996; Sellés-Navarro y cols., 1996; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011).

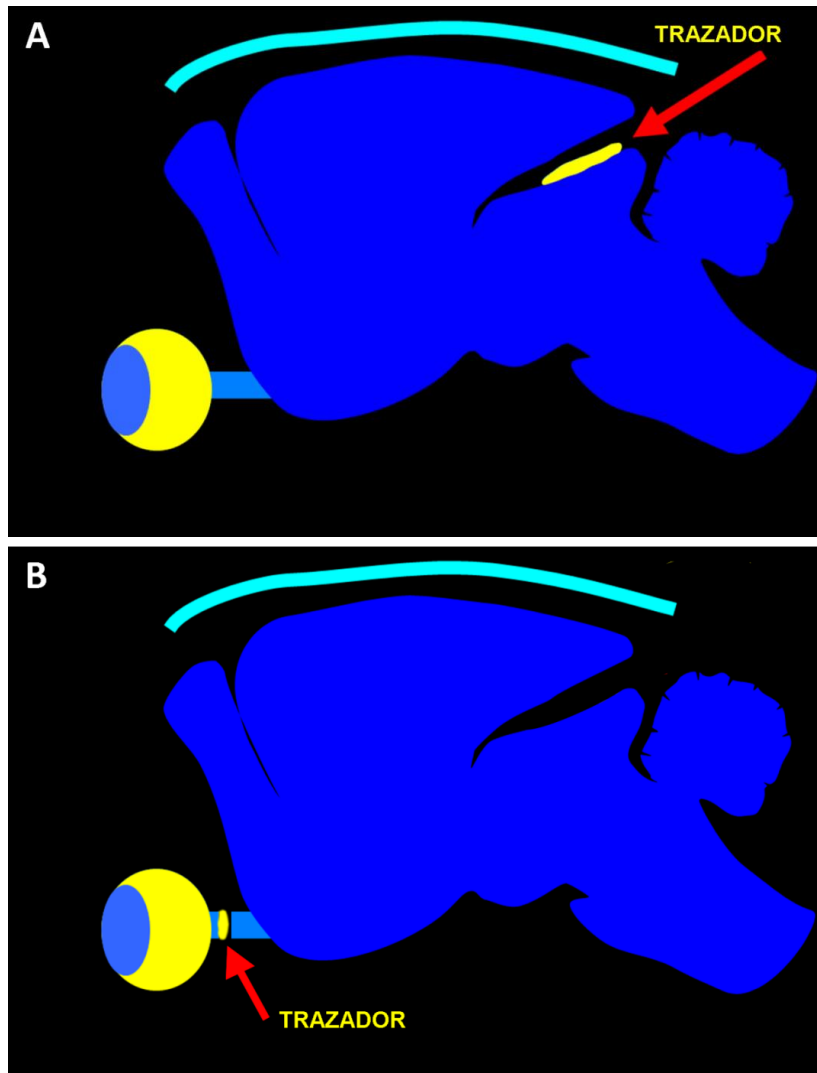
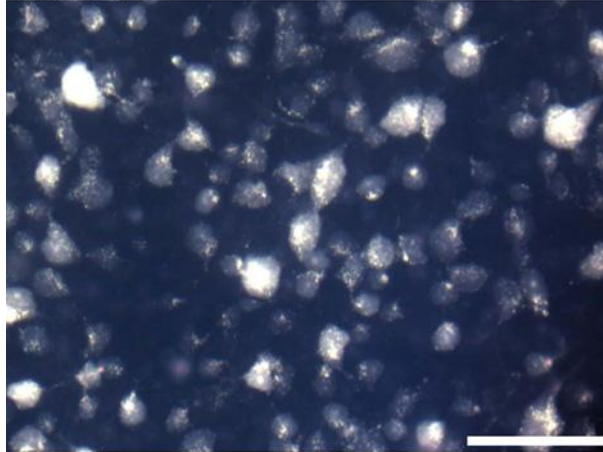


Figura 3.1. Esquema del trazado retrógrado de las CGR aplicando el trazador en el colículo superior o en el muñón del nervio óptico. El trazador, FG en rata y OHSt en ratón, se aplicó en ambos CS para marcar todas las CGR que proyectan a éstos (A). Para marcar la totalidad de las CGR, el trazador se aplicó en el muñón del MNO (B).

A: RATÓN



B: RATA

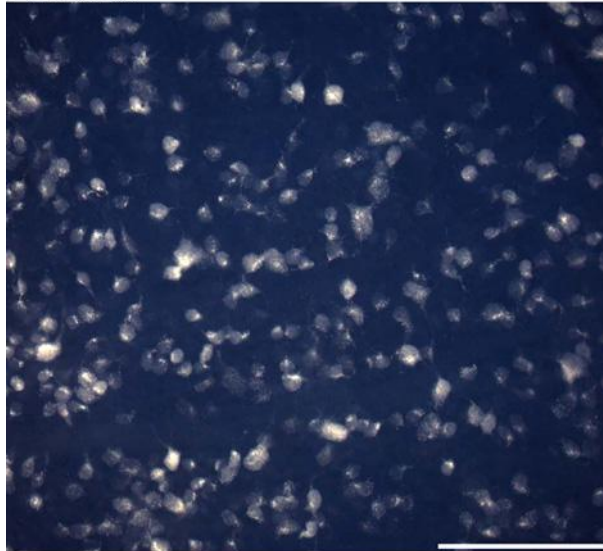


Figura 3.2. Células ganglionares de la retina (CGR) trazadas con OHSt o con FG. Imágenes representativas de la región periférica de una retina control de ratón Swiss (A) y de rata SD (B) montadas a plano. Las imágenes muestran las CGR marcadas retrógradamente por los trazadores neuronales retrógrados OHSt (A) y FG (B), aplicados en ambos CS 7 días antes de procesar el animal. Ambos trazadores se transportan desde los terminales axonales localizados en los CS hasta el soma, que está en la retina, por transporte axonal retrógrado activo. Las microfotografías ilustran el típico marcaje difuso y granular del neurotrazador que delinea el soma y en ocasiones las dendritas primarias de la célula. Se pueden apreciar diferentes tipos morfológicos de CGR (pequeñas, medianas y grandes) descritos inicialmente por Fukuda (1977). Barra (A= 50 μ m, B= 100 μ m).

3.3.2. Marcaje retrógrado de las CGR desde el nervio óptico

Para la aplicación del trazador en el NO, se siguió el método estándar descrito anteriormente en nuestro laboratorio (Vidal-Sanz y cols., 1988; Villegas-Pérez y cols., 1993; Lafuente López-Herrera y cols., 2002; Parrilla-Reverter y cols., 2009b; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Nadal-Nicolás y cols., 2012, 2015). Primero rasuramos la parte dorsal de la cabeza del animal, se hace una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo y se realiza una incisión a nivel del reborde supraorbitario, se disecciona el tejido adiposo que recubre el globo ocular y

se desinsertan los músculos recto superior y lateral. Tras exponer la región superoposterior del globo ocular se abren longitudinalmente las cubiertas durales del NO proximal al globo ocular y se secciona éste a 1 mm de su origen en el globo ocular, evitando lesionar la vascularización oftálmica que discurre en las vainas durales, principalmente en su aspecto ínferonasal (Morrison y cols., 1999; Sugiyama y cols., 1999). A continuación, se aplica una pequeña porción de Espongostan previamente empapada con OHSt al 10% en la superficie del muñón del NO. Se sutura la piel del animal con seda quirúrgica de 4/0 y, finalmente, se comprueba mediante funduscopia directa a través del microscopio quirúrgico que la irrigación retiniana es normal. Estudios previos han determinado, tanto en rata como en ratón, que el tiempo necesario para que el OHSt llegue hasta el soma de las CGR desde su aplicación en el MNO es de 3 días (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Galindo-Romero y cols., 2013b). Transcurrido este tiempo, se procesa el animal.

3.4. MARCAJE ANTERÓGRADO DE LAS REGIONES RETINOTECTALES

Para estudiar la proyección retinotectal se aplicaron técnicas de trazado neuronal anterógrado previamente desarrolladas (Angelucci y cols., 1996; Aviles-Trigueros y cols., 2000, 2003). Cuatro días antes de procesar los animales, éstos fueron anestesiados y 2,5 μ l de una solución al 1% de subunidad B de la toxina colérica (CTB; List Biological Laboratories, Campbell, CA, EEUU) se inyectaron con ayuda de una jeringa Hamilton (de 5 μ l de volumen y aguja de 34G) en la cámara vítrea del ojo izquierdo. Este marcador se transporta anterógradamente por los axones de las CGR hasta acumularse en los terminales axonales de las regiones retinotectales del cerebro (Figura 3.3).

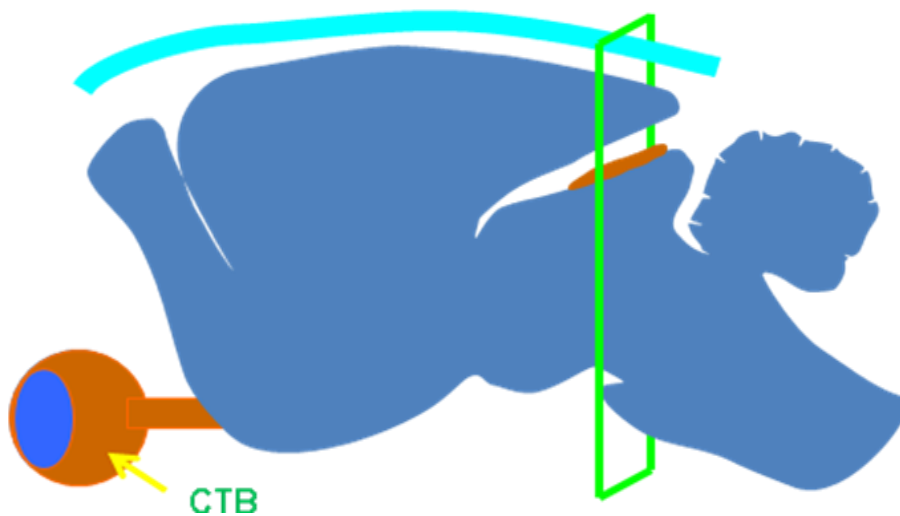


Figura 3.3. Representación del trayecto seguido por el marcador neuronal, inyectado intravítreo en el ojo izquierdo y transportándose anterógradamente hasta acumularse en los terminales axonales situados en las regiones retino-tectales.

3.5. FOTOCOAGULACIÓN MEDIANTE LÁSER DIODO

Para obtener un modelo de HTO experimental se elevó la PIO hasta niveles que provocasen daño sobre la población de CGR y en sus axones, pero sin comprometer la viabilidad ocular, mediante fotocoagulación con láser diodo de 532 nm, siguiendo la metodología de estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009c; Gallego y cols., 2012; Rojas y cols., 2014).

La fotocoagulación por láser (FL) se realizó en ratones pigmentados y ratas albinas anestesiados, en los cuales se dilató la pupila izquierda con una gota de tropicamida tópica al 1% (Colircusi tropicamida 1%®; Alcon-Cusí, S.A., El Masnou, Barcelona, España), y bajo control microscópico en el ojo experimental (izquierdo) se realizó una sola sesión de disparos con láser diodo (Viridis Ophthalmic Photocoagulator-532 nm laser, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, Francia). La FL se aplicó directamente sin ninguna lente, en una sola sesión, sobre los vasos perilimbares y episclerales en ratón y sobre la malla trabecular, los vasos perilimbares y episclerales en rata (**Figura 3.4**), de los ojos izquierdos experimentales, reservando el ojo derecho como control.

El tamaño del punto, la duración y la potencia fueron respectivamente: 50-100 μm , 0,05 s y 0,1 W en ratón y 50-100 μm , 0,5 s y 0,4 W en rata. A los ratones se les dio una media de 135 disparos y a las ratas 90 disparos.

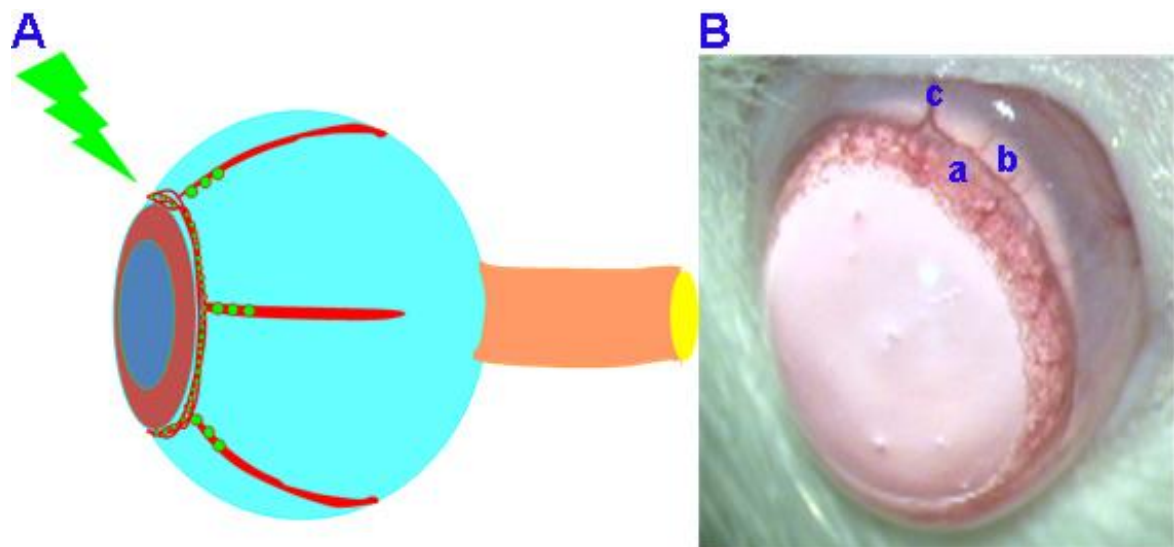


Figura 3.4. Método de inducción de la hipertensión ocular mediante fotocoagulación por láser. A. Esquema representativo que ilustra la localización de los vasos perilimbares y episclerales de un ojo de roedor. **B.** Fotografía de un ojo de rata SD, donde se muestra la malla trabecular (a), vasos perilimbares (b) y episclerales (c), donde es dirigido el láser para realizar la fotocoagulación de los vasos e impedir el drenaje del humor acuoso aumentando la presión intraocular.

3.6. MEDIDA DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR

La medida de la PIO se realizó con un tonómetro de rebote y contacto (**Figura 3.5**) (TonoLab[®]; Tiolat Oy, Helsinki, Finlandia) en animales anestesiados i.p. Con objeto de minimizar el error en la toma de datos, cada valor de PIO corresponde a la media aritmética de seis medidas; las cuales, a su vez, eran promedio de otras seis medidas registradas automáticamente por el tonómetro.

Para caracterizar los efectos de la fotocoagulación con láser de las venas perilibares y epiesclerales en ratón, y malla trabecular, venas perilibares y epiesclerales en rata, se determinaron los valores basales de PIO previos en los animales a los que se les iba a inducir HTO con FL y a diferentes periodos de tiempo post-lesión.



Figura 3.5. Tonómetro de rebote y contacto TonoLab[®] (Tiolat Oy, Helsinki, Finlandia) para animales de experimentación.

3.7. INYECCIÓN EN CÁMARA VÍTREA

Para evaluar el efecto de la administración intravítrea del BDNF sobre la PIO, el daño axonal provocado y la supervivencia de las CGR y las CGRm en ratas SD hipertensas, se realizaron dos grupos de estudio: En el primero de ellos se administró BDNF y en el segundo vehículo (PBS). El BDNF se diluyó en tampón fosfato salino 0.1 M (PBS) con 1% de albúmina de suero bovino (BSA), a una concentración final de 1µg/µl. La administración se llevó a cabo justo antes de la inducción de la HTO por láser diodo, mediante una inyección intravítrea (**Figura 3.6**) en el ojo experimental (ojo izquierdo). En ambos grupos se siguió el mismo protocolo; en primer lugar se hizo una punción con una aguja de 30G en la esclerótica, a 1mm del limbo esclerocorneal

y después se realizó una única inyección intravítrea de 5 μ l, con una jeringa Hamilton de 5 μ l con una aguja de 34G.

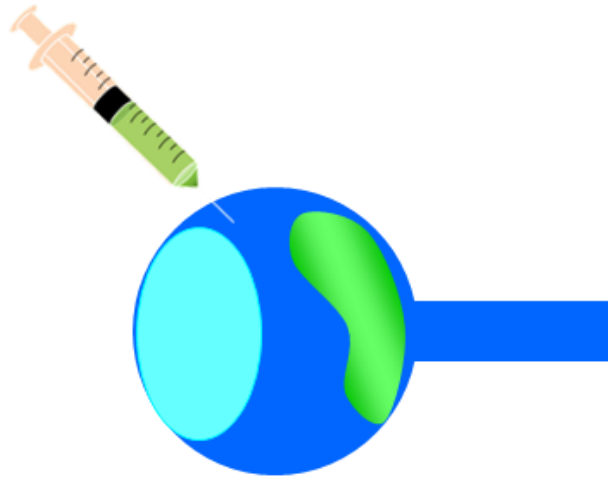


Figura 3.6. Esquema de la inyección de BDNF o vehículo en los ojos experimentales de rata previo a la FL.

3.8. PROCESADO HISTOLÓGICO

3.8.1. Perfusión-fijación del animal

Los animales se sacrificaron con una sobredosis inyectada intra peritoneal (i.p.) (0,5 ml en ratones, 1,0 ml en rata) de pentobarbital sódico al 20% (Dolethal, Vetoquinol, Especialidades Veterinarias S.A., Alcobendas, Madrid).

Después, los animales se perfundieron transcárdialmente a través de la aorta ascendente con suero salino al 0,9%, seguido de paraformaldehído al 4% en PB 0,1M (pH 7,2-7,4) a 4°C. Para ello se practicaba una esternotomía media para exponer el corazón y los grandes vasos. Se clampa la aorta descendente y, seguidamente, realizamos una pequeña incisión en el ventrículo izquierdo, donde introducimos una cánula hasta la aorta ascendente. La cánula estaba conectada por un sistema de tubos a una bomba peristáltica (ISM827; Ismatec S.A., Zurich, Suiza) y está a un reservorio de fluidos. De modo prácticamente simultáneo, seccionamos la orejuela de la aurícula derecha para permitir la salidad de la sangre y el líquido de perfusión.

3.8.2. Enucleación de los ojos

En el estudio de la distribución en retina de las CGR y las CGRm es necesario conservar la orientación de la retina y del ojo en todo momento. Para esto, después de la perfusión-fijación de animal, se realizó una sutura en el párpado superior del ojo, además se utilizaron como puntos de referencia adicionales la inserción del músculo recto en la parte dorsal de cada ojo, así como la carúncula nasal.

Para la enucleación de los ojos realizamos una incisión en la zona nasal y temporal de la ceja, para posteriormente seccionar el tejido que rodea y sujeta el globo ocular a la órbita, traccionamos el globo ocular hacia adelante y hacemos un corte a la altura de la cabeza del NO.

El globo ocular se postfija durante una hora adicional en PF al 4% en PB, a 4°C. Después se mantiene en PBS 0,1M (pH 7,2-7,4) a 4°C hasta la posterior disección de la retina.

3.8.3. Disección y montaje de la retina a plano

Para la disección y montaje global de la retina a plano, primero quitamos el tejido que rodea el ojo, a continuación realizamos una incisión en el limbo esclero-corneal y retiramos la córnea. Extraemos las estructuras del polo anterior del ojo: iris y cristalino, obteniendo la copa óptica donde se aprecia la retina. Para disecar la retina a plano hacemos 4 cortes: superior, inferior, nasal y temporal, el corte más largo indica el polo superior. Extraemos la retina separándola con una pinza de la ora serrata y posteriormente cortando el NO. La extendemos con la cara vítrea hacia arriba en un portaobjetos y la adherimos a papel de filtro Whatman® número 1 (Whatman International Ltd., Maidstone, Inglaterra). Se realizan lavados durante la disección del ojo con PBS 0,1 M. Se post-fija en PF al 4% durante una hora, quitamos el papel de filtro y hacemos 3 lavados en PBS. Se coloca la retina en un portaobjetos y se limpia el vítreo con un pincel.

Después se cubren con medio de montaje con base de glicerol al 50% en tampón carbonato sódico 0,1M (pH 9,0), para evitar el decaimiento de la fluorescencia. Finalmente, las retinas se protegen con un cubreobjetos y se sellan con esmalte de uñas.

3.8.4. Procesado histológico de la retina para secciones transversales

Para obtener secciones histológicas transversales de retina, una vez extraído el ojo se disecó la copa óptica. El tejido se crioprotegió por inmersión en sacarosa en soluciones crecientes de sacarosa (Panreac Química S.A. Barcelona, España), al 15% y al 30% en PB durante 8 y 24 horas, respectivamente. Después, la copa óptica se incluía en medio de montaje óptimo para

congelación (Tissue-Tek® O.C.T™; Sakura, Finetek U.S.A, Inc., Torrance, CA, EE.UU), manteniendo en todo momento la orientación correcta. Para ello, se conservaba la parte del párpado que contiene la sutura en el polo superior y el músculo recto superior y se congelaban rápidamente en isopentano preenfriado a -60°C. Seguidamente, se obtuvieron secciones histológicas de 14 µm de espesor con ayuda de un criostato (Jung CM 3000, Leica, Heidelberg, Alemania).

3.8.5. Procesado histológico del cerebro

Los cerebros de los animales estudiados se extraen cuatro días después de inyectar CTB en la cámara vítrea del ojo experimental. Para ello, una vez realizada la perfusión-fijación del animal, se extraen los cerebros del cráneo y se delimita la zona de interés experimental. Los cerebros se postfijan nuevamente en paraformaldehído al 4% en PB durante 1 día a 4°C. Seguidamente, se crioprotegen en soluciones crecientes de sacarosa, tal y como se a descrito previamente.

El cerebro se orientó correctamente para obtener secciones histológicas coronales, se incluyó en medio óptimo de montaje para congelación Tissue-Tek y se congeló siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Con ayuda de un criostato (Jung CM 3000, Leica, Heidelberg, Alemania) se realizaron secciones seriadas de 30 µm de espesor, y se recogieron las secciones ordenadamente en baños de flotación en PBS, tomando la habénula como referencia anatómica de la primera sección válida hasta agotar el CS. Los cortes son recogidos en placas de cultivos celulares de seis pocillos con PBS en cada pocillo se recogen 13-16 cortes, con lo que se obtienen unos 78-96 cortes por cerebro. Lo que representa la región situada entre -2,54 mm y -4,96 mm de bregma (Paxinos y cols., 2001).

3.9. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

El estudio de las diferentes poblaciones celulares y/o estructuras retinianas analizadas en la presente tesis, se llevó a cabo mediante la aplicación de técnicas de inmunohistofluorescencia; cuyos protocolos tanto para montajes globales como secciones transversales de retina, se detallan a continuación.

3.9.1. Montajes globales de retina

El protocolo de inmunohistofluorescencia genérico utilizado para el estudio de los montajes globales de retina fue el siguiente:

- **Permeabilización:** Las retinas se lavan en PBS 0,1M (pH 7,2-7,4) a temperatura ambiente y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente en PBS conteniendo un 0,5% de Triton 100 (Tx; Triton® X-100; Sigma X100, Sigma-Aldrich Química, Madrid, España) tras los cuales se congelan inmersas en el mismo tampón a -70°C durante 15 minutos. Después se atemperan y se lavan en PBS a temperatura ambiente.
- **Incubación en anticuerpo primario:** Las retinas se incuban en el anticuerpo primario diluido en el tampón de bloqueo (PBS que contiene un 2% de Tx y un 2% de suero normal de burro (Normal Donkey Serum, NDS, Jackson ImmunoResearch Inc., Cambridge, Reino Unido) durante 1 hora a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C. Tras atemperar de nuevo las retinas y posteriormente a un enjuague rápido en PBS, se lavan en Tx 0,5% en PBS, a temperatura ambiente.
- **Incubación en anticuerpo secundario:** Los anticuerpos secundarios que se usaban estaban unidos a distintos fluoróforos dependiendo de la longitud de onda a la que quisiéramos que se excite para su detección. Primero se realizó la incubación con el anticuerpo secundario diluido en Tx 2% en PBS durante 2 horas, a temperatura ambiente. Tras acabar la incubación, se lavaron las retinas en Tx 0,5% en PBS, a temperatura ambiente y posteriormente en PBS y se preparaban para su montaje.

3.9.2. Secciones transversales de retina

En las secciones transversales de retina, el protocolo de inmunofluorescencia que se aplicó para su estudio fue el siguiente:

- **Permeabilización:** Los cortes radiales obtenidos en el criostato se lavaron primero en PBS y después en Tx 0,1% en PBS a temperatura ambiente para disolver el medio de montaje adherido a la sección y al portaobjetos, y eliminarlo.
- **Incubación en anticuerpo primario:** Las retinas se incubaron en anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo (Tx 2% y NDS 2% en PBS) durante toda la noche a 4°C. Tras atemperar de nuevo las retinas, se lavaron en Tx 0,1% en PBS, a temperatura ambiente.
- **Incubación en anticuerpo secundario:** Se realizó la incubación en anticuerpo secundario diluido en Tx 2% en PBS durante 1 hora, a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las retinas en Tx 0,1% en PBS, a temperatura ambiente y, por último en PBS.

3.10. ANTICUERPOS, TINCIONES Y DILUCIONES UTILIZADOS EN LOS ESTUDIOS

A continuación se detallan los anticuerpos que se utilizaron para la inmunodetección de las diferentes poblaciones celulares analizadas en los estudios realizados:

3.10.1. Inmunodetección de las CGR

Las CGR que son marcadas retrógradamente desde los CS son aquellas que tienen un transporte axonal funcional, pero para cuantificar el número y la distribución de las CGR que se mantienen vivas tras una lesión necesitamos realizar un estudio inmunohistoquímico. Para ello, utilizamos un anticuerpo frente a la proteína Brn3a, que como hemos visto anteriormente es un miembro de la familia de los factores de transcripción Brn3, que se localiza en el núcleo y tiene un dominio POU de unión al ADN.

El anticuerpo primario utilizado es un anticuerpo policlonal de cabra anti-Brn3a de origen humano (Goat anti-Brn3a, C-20; Santa Cruz Biotechnologies Heidelberg, Alemania) diluido 1:500 para ratón y 1:750 para rata. Para detectar este anticuerpo primario, se utilizaron anticuerpos policlonales secundarios de burro anti-cabra conjugados con Alexa Fluor[®] 488 ó Alexa Fluor[®] 594 (Donkey anti-goat IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor[®] 488 conjugate o Alexa Fluor[®] 595 conjugate; Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) que emiten fluorescencia verde y roja, respectivamente. El uso de un fluorocromo u otro dependió de las necesidades del estudio. Se estableció una dilución de trabajo óptima de 1:500 (**Tabla 3.4**).

3.10.2. Inmunodetección de las CGRm

Las CGRm son una subpoblación de CGR que expresan melanopsina. Para la inmunodetección de las CGR en retina, tanto en montajes globales de retinas como en secciones transversales de ratón se incubaron en el anticuerpo policlonal de conejo anti-melanopsina de ratón (UF006, AB-N38; Advance Targeting Systems, Thermo Scientific, Madrid, España) y las muestras de rata se inmunodetectaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-melanopsina de rata (PA1-781; Affynity Bioreagents. Fisher Scientific, Madrid, España) diluido 1:5000 y 1:500, respectivamente. Para detectar estos anticuerpos primarios, se utilizaron anticuerpos policlonales secundarios de burro anti-conejo conjugados con Alexa Fluor[®] 488 ó Alexa Fluor[®] 594 (Donkey anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor[®] 488 conjugate o Alexa Fluor[®] 595 conjugate; Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) que emiten fluorescencia verde y roja, respectivamente. El uso de un fluorocromo u otro dependió de las necesidades del estudio. Se estableció una dilución de trabajo óptima de 1:500 (**Tabla 3.4**).

3.10.3. Tinción de los núcleos de la capa de las CGR con DAPI

Con el objetivo de determinar si el daño producido tras la HTO en la retina de ratón es selectivo de las CGR y no afecta a otra población de la capa de CGR, en las retinas hipertensas se identificaron la totalidad de las células de la capa de CGR, con una tinción nuclear con DAPI. Esta capa en roedores está constituida en su mayoría por CGR, que se pueden identificar mediante inmunodetección de Brn3a, y por células amacrinas desplazadas, en igual proporción (Dräger y Olsen, 1981; Perry y cols., 1981, 1984; Jeon y cols., 1998) y en mucha menor proporción, por núcleos de las células endoteliales y de la microglía, que son alargados y distinguibles morfológicamente. Al no existir un marcador de todas las amacrinas desplazadas en esta capa, decidimos teñir la totalidad de células con DAPI, y al restar el número de CGR Brn3a⁺ contadas, obtendríamos una estimación de las células residentes en esta capa tras HTO, incluidas las células amacrinas.

El 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) emite una fuerte fluorescencia cuando se intercala en la doble hélice del ADN tiñendo, por tanto los núcleos de todas las células. El pico de excitación está en 358 nm y el de emisión en 461 nm (azul) y, por lo tanto, la señal del DAPI se observa con luz ultravioleta bajo el filtro azul.

Las retinas después de la inmunodetección del Brn3a se limpian de la suciedad y se montan con medio de montaje para fluorescencia que contiene DAPI (VECTASHIELD[®], laboratorios Vector, Inc., Burlingame, CA, EEUU).

3.10.4. Inmunodetección de los terminales axonales de las CGR en el cerebro-medio

Para la inmunolocalización de la CTB transportada anterógradamente hasta los terminales retino-tectales, se siguieron procedimientos previamente establecidos (Angelucci y cols., 1996; Aviles-Trigueros y cols., 2000, 2003).

Los cortes flotantes fueron lavados en PBS, la actividad peroxidasa endógena fue bloqueada con la inmersión de las secciones en 0,3% de H₂O₂ en PBS durante 20 minutos. Seguidamente las secciones se lavaron en PBS e incubaron 30 minutos en glicina 0,1 M en PBS. La actividad antigénica inespecífica se bloqueó durante una noche incubando a 4°C en PBS conteniendo 0,5% de Triton X-100, 4% de suero normal de conejo (NRS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU) y 2,5% de albúmina de suero bovino (BSA; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). A continuación las secciones fueron incubadas en una solución conteniendo el anticuerpo policlonal de cabra frente a la subunidad B de la toxina colérica (goat anti-CTB; List Biological Laboratories, Campbell, CA, EEUU) a una dilución 1:4.000 en PBS conteniendo 2% NRS, 2,5% BSA y 2% Triton X-100 durante 4 días a 4°C. El anticuerpo primario

fue detectado con un secundario policlonal biotinilado de conejo frente a IgG(H+L) de cabra (rabbit anti-goat IgG(H+L); Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU) diluido 1:200 en 2% NRS, 2,5% BSA y 2% Triton X-100 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por una incubación en complejo avidina-biotina peroxidasa (Vectastain® Elite ABC Kit system; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU) diluido 1:100 en PBS durante 1 hora; la peroxidasa fue detectada usando como cromóforo tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma Chemical CO., MO, EEUU) al 0,025% en PBS. Después de 5 minutos, se añadió H₂O₂ hasta una disolución final al 0,004%, dejándola actuar durante 3 minutos. Las secciones fueron lavadas en PBS a 4°C (**Tabla 3.4**).

Una vez concluido este proceso, con ayuda de un microscopio quirúrgico se montaron los cortes secuencialmente en portaobjetos tratados con polyilisina. Después de ordenarlos, se dejaron secar a temperatura ambiente, se lavaron en agua destilada y se deshidrataron en disoluciones crecientes de alcohol, se clarificaron en xileno y se cubrieron con un cubreobjetos con ayuda de medio de montaje (DePeX; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EEUU) para su conservación.

3.10.5. Inmunodetección de los vasos superficiales de retina

Con el fin de estudiar si los vasos superficiales de la retina se veían afectados tras la hipertensión ocular inducida por láser en ratas, se aplicaron técnicas histológicas de inmunodetección sobre las retinas, utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal de ratón frente al antígeno de superficie celular RECA-1 de rata (Mouse anti-rat RECA-1 (IgG1), clone HIS52, MCA970GA; Serotec, Bionova Scientific, Madrid, España) a una dilución de 1:1.000, que reconoce las células endoteliales presentes en los vasos. Como anticuerpo secundario (Molecular Probes, Invitrogen Inc., Madrid, España) usamos burro anti-mouse Alexa Fluor 488 (donkey anti-mouse, alexa-488), que emite fluorescencia verde, diluido 1:500 (**Tabla 3.4**).

Detección de	Marcador molecular	Estirpe	Anticuerpo primario	Compañía	Dilución	Anticuerpo secundario	Compañía	Dilución
CGR	Brn3a (Pou4f1)	Ratón	Cabra anti-Brn3a (C-20)	Sc-31984; Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Alemania)	1:500	Burro anti -cabra Alexa 594 / Burro anti-cabra Alexa 488	Molecular Probes, ThermoFisher, Madrid, España	1:500
		Rata				Burro anti- cabra Alexa 594		
CGRm	Melanopsin	Ratón	Conejo anti-melanopsin UF006 (N-terminal)	AB-N38; Advanced Targeting Systems (San Diego, California, EEUU)	1:5.000	Burro anti- conejo Alexa 594	Molecular Probes, ThermoFisher, Madrid, España	1:500
		Rata	Conejo anti-melanopsin (NH2-terminal)	PA1-780; Pierce, ThermoFisher, (Madrid, España)	1:500	Burro anti -conejo Alexa 488		
Trazado anterógrado	Cholera Toxin B subunit	Ratón	Cabra anti-CTB	703; List Biological Laboratories (Quadrantech, Surrey, UK)	1:4.000	Conejo anti-cabra IgG-biotin y Avidin-HRP	Vector Laboratories, EEUU	1:200
Vasos retinianos	Rat endotelial cell antigen 1	Rata	Ratón anti-rat RECA-1 clone HIS52	MCA970GA; Serotec, Bionova Scientific, Madrid, España	1:1.000	Burro anti-ratón AlexaFluor 488	Molecular Probes, ThermoFisher, Madrid, España	1:500

Tabla 3.4. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los diferentes estudios.

3.11. ESTUDIO MORFOLÓGICO Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA RETINA

Las retinas se examinaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con tres filtros: ultravioleta (BP 365/12, LP 397) que permite la observación de las células marcadas con OHSt o FG; rojo para la detección de los anticuerpos conjugados con Alexa Fluor-594 y otro verde para la detección de los anticuerpos conjugados con Alexa Fluor-488. El microscopio estaba equipado con una cámara digital de alta resolución (ProgRes[®] C10; Jenoptik, Jena, Alemania) y una platina motorizada controlados por ordenador (ProScan H128 Series Motor Controller; Prior Scientific Instruments Ltd., Cambridge, Reino Unido) mediante el programa informático de análisis de imagen Image-Pro[®] Plus 5.1 for Windows[®] (IPP; Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EEUU) con un módulo de control de microscopio (Scope-Pro[®] 5.0 for Windows[®]; Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EEUU).

Para la reconstrucción y fotomontaje de las retinas a plano (**Figura 3.7**), se realizó la adquisición secuencial de campos microscópicos contiguos, sin uniones ni solapamientos entre campos, siguiendo el patrón de muestreo de una matriz de celdas regulares con un área preestablecida que cubría la superficie de la retina, usando para retinas de ratón y rata, objetivos de x20 y x10 (Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania), respectivamente. El tamaño del campo de captura fue de 0,217 mm² para ratón y 0,627 mm² para rata. Cada microfotografía fue enfocada manualmente antes de ser capturada y almacenada digitalmente dentro del programa de análisis de imagen IPP. Todas las imágenes que componen una retina se guardaron en un archivo como imágenes de color de 24 bit usando el módulo control del microscopio Scope-Pro[®] 5.0 for Windows[®] del programa IPP. Estas imágenes pueden ser combinadas automáticamente dentro de una sola imagen de alta resolución de la retina a plano para un posterior estudio de la imagen.

Las retinas reconstruidas fueron tratadas con un programa de edición de imágenes (Adobe Photoshop[®] CS 8.0.1; Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, EEUU) para su mejor visualización, sin alterar la información relevante para su análisis y estudio.

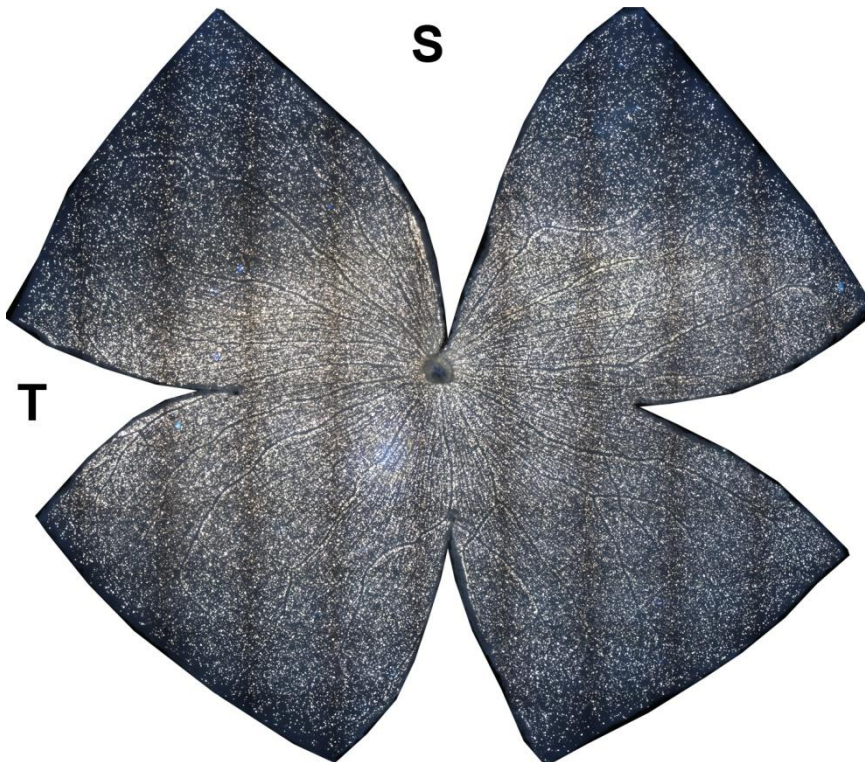


Figura 3.7. Fotomontaje de retina. Reconstrucción fotográfica obtenida en el microscopio de fluorescencia equipado con una cámara digital y una platina motorizada conectada a un sistema de análisis de imagen, que permitía obtener fotomontajes, de un montaje global de una retina de rata SD. Las CGR marcadas con FG aparecen distribuidas en los cuatro cuadrantes retinianos, con una densidad mayor en una región de forma arciforme situada en la región supero-temporal de la hemirretina superior. La parte superior de la retina se encuentra a las 12 horarias.

3.11.1. Procesado de imágenes

3.11.1.1. Cuantificación de las CGR trazadas con OHSt o FG e inmunodetectadas con Brn3a

Las imágenes fueron procesadas por medio de una subrutina informática específica para el conteo de las CGR en retinas a plano marcadas con OHSt o FG, previamente desarrollada (Salinas-Navarro y cols., 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011); automatizando las tareas repetitivas mediante la programación del lenguaje de macros del programa de análisis de imagen IPP. Así aplicando una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada imagen archivada podemos contar las células resultantes exportando los datos a una hoja de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003; Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) para su posterior análisis. Para contar el número de CGR OHSt⁺ y CGR FG⁺ y medir el área de la retina en una de las imágenes de alta resolución obtenidas a partir de los fotomontajes se aplica la correspondiente calibración espacial a la imagen reconstruida basada en las características usadas para su captura. En el

primer paso para realizar el conteo celular, las imágenes fueron convertidas a escala de grises 8-bit para descartar el exceso de información del color. Las aberraciones de iluminación causadas por la óptica del microscopio fueron eliminadas por el filtro de mejora “*flatten*” del programa IPP, el cual nos elimina las variaciones de iluminación de fondo. A continuación, se realzan los bordes de las células usando comandos de filtrado del IPP. Los agrupamientos de células fueron separados por medio del filtro “*watershed split*” del IPP el cual erosiona los objetos, para luego dilatarlos evitando que lleguen a tocarse. Las células son contadas dentro de unos parámetros predeterminados para excluir objetos que sean demasiado grandes o pequeños para ser una CGR. Finalmente, los datos de cada conteo se muestran y exportan a una hoja de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003) donde son guardados para su análisis posterior.

3.11.1.2. Cuantificación de las CGR Brn3a⁺

Para llevar a cabo la cuantificación del número total de CGR Brn3a⁺ en los montajes globales de retina de ratón o rata utilizamos una subrutina informática específica desarrollada previamente en el Laboratorio (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Galindo-Romero y cols., 2011). Este proceso informático consiste en la aplicación a cada imagen individual de una secuencia de filtros y transformaciones utilizando el lenguaje macro del programa de análisis de imagen IPP. En el primer paso, los datos de la imagen se procesan usando el filtro *HiGauss* que resalta los núcleos positivos. En un segundo paso, la imagen resultante se vuelve a procesar con el filtro *LoPass*, que normaliza las variaciones de fondo. Finalmente, la imagen resultante se procesa de nuevo con el filtro *HiPass*. Los grupos de núcleos se separaron aplicando dos veces el filtro de separación para poder diferenciarlos como objetos independientes. Los núcleos se cuentan bajo parámetros específicos que excluyen los objetos en función de su tamaño, descartando aquellos objetos que no cumplen dicho requisito y no puedan ser núcleos inmunodetectados con Brn3a. Finalmente, los datos de cada conteo (retina completa) se exportan (*dynamic data Exchange*) a una hoja de Excel (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) donde los datos se guardan para análisis posteriores.

3.11.1.3. Mapas de isodensidad

Para estudiar el patrón de distribución de las CGR sobre toda la retina, se calculó la densidad celular y se representó gráficamente como mapas de isodensidad (**Figura 3.8**). Los fotomontajes fueron procesados automáticamente, usando una rutina informática previamente desarrollada al efecto en el programa de análisis de imagen IPP (Nadal-Nicolás y cols., 2009; Salinas-Navarro y cols., 2009b; Galindo-Romero y cols., 2011).

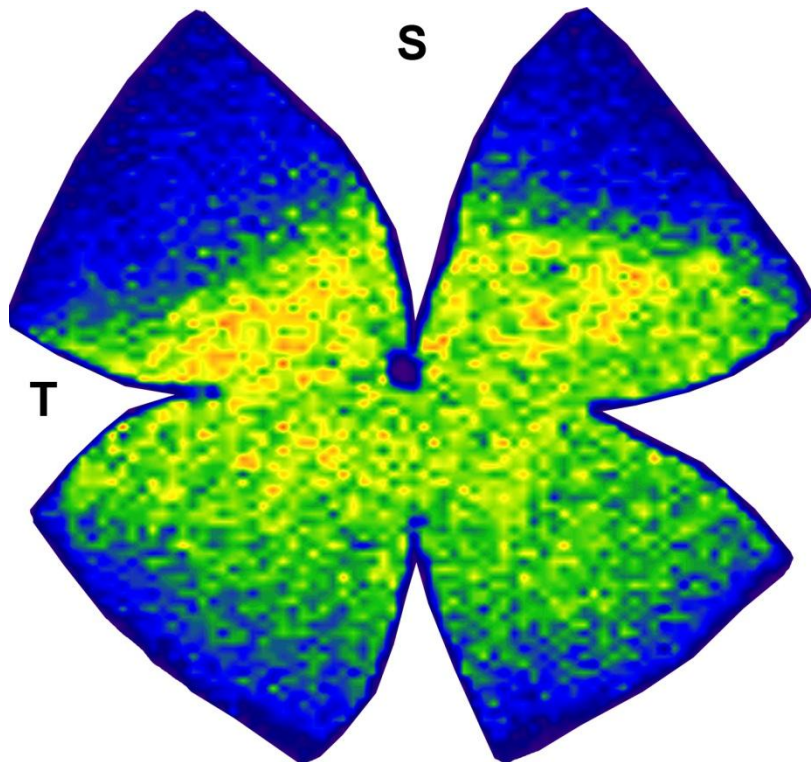


Figura 3.8. Mapa de isodensidad de las CGR representado a partir de los datos de densidad celular de la retina de la Figura 3.7. Se observa el patrón de distribución de las CGR sobre la retina. Como se observa, existe una mayor densidad (colores cálidos) en una región arciforme de la zona supero-temporal de la hemirretina superior.

La subrutina principal de procesamiento, consistió en la división de todos los campos microfotografiados en áreas rectangulares conocidas de igual tamaño, denominadas áreas de interés (AI), el número de estas áreas fue de 36. Para cada AI el número de CGR tanto para las marcadas desde los CS con OHSt o FG, o las inmunodetectadas con Brn3a, fue obtenido usando la subrutina de conteo celular descrita previamente (ver apartado anterior) y se calculó la densidad celular. Los datos de densidad de las CGR fueron exportados y salvados de manera secuencial y ordenada en una hoja de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003). Finalmente, los datos fueron representados como un mapa de isodensidad usando el programa de representación gráfica (SigmaPlot® 9.0 for Windows®; Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU).

El error en el cálculo de la densidad de las CGR, debido a campos microscópicos ocupados sólo parcialmente por tejido retiniano en el contorno de las retinas a plano, se minimizó por el alto número de áreas de interés con tamaño relativamente pequeño y la ausencia de CGR en la retina periférica.

3.11.1.4. Cuantificación de las CGRm

Las CGRm de la capa de CGR y de la capa nuclear interna, fueron contadas manualmente punteando sobre el fotomontaje realizado usando el programa de edición de imagen Adobe Photoshop CS 8.0.1 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, EEUU).

3.11.1.5. Mapa de vecinos

Una vez marcados los puntos en el fotomontaje, éstos se cuantificaron automáticamente y cada uno de ellos se localizaron en la retina utilizando una rutina de lenguaje de macros IPP teniendo como referencia en nervio óptico y delimitando el contorno de la retina (Galindo-Romero y cols., 2013a; Nadal-Nicolás y cols., 2014). El número de puntos que representan las CGRm y su ubicación espacial fueron exportados a una hoja de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003; Microsoft Corp., Redmond, WA, EEUU). Este programa realiza los siguientes cálculos para cada célula. En primer lugar, se realiza la translación con respecto al NO de cada célula, en segundo lugar se mide la distancia euclídea al NO y, en tercer lugar, se aplica el algoritmo de los K-vecinos más próximos con radio fijo, en este caso, el radio es de 0,165 mm para ratón y 0,220 mm para rata. Así, mediante este algoritmo, se contará para cada célula cuántas células se encuentran a una distancia menor o igual al radio dado. Una vez analizada la retina completa, los resultados son almacenados en un fichero de texto con columnas delimitadas por tabulaciones, que puede ser abierto por la mayoría de las hojas de cálculo disponibles en el mercado. Finalmente, mediante el programa Sigmaplot (SigmaPlot® 9.0 for Windows®; Systat Software, Inc., Richmond, CA, EEUU), realizaremos una representación de las células en función de su posición con respecto al NO y el número de vecinos. Para diferenciar el número de vecinos de cada una de las células, se estableció una escala de color, de manera que los colores más fríos (gama de azules) corresponden a las células con menor número de vecinos y los colores más cálidos (gama de rojos) a las que poseen mayor número de vecinos (**Figura 3.9**). Así, para ratones la escala es de 0 a 11 ó más vecinos y para rata de 0 a 23 ó más vecinos.

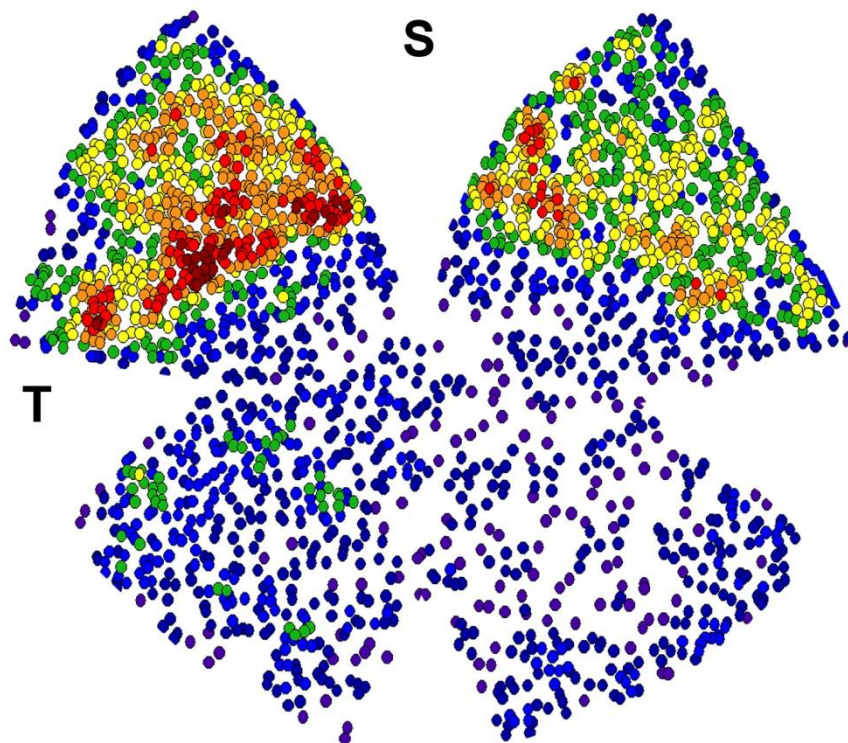


Figura 3.9. Distribución espacial de las CGRm en una retina derecha de rata representado por medio de un mapa de vecinos. Cada punto representa una célula, y el color que tiene asignado depende del número de células vecinas a un radio de 0,22 mm. Los colores fríos son para células con pocos vecinos y los colores cálidos para células con muchos vecinos (0, púrpura; 23 ó más, rojo oscuro).

3.11.1.6. Análisis morfométrico del plexo vascular superficial de la retina

Para facilitar el estudio morfométrico de los vasos de la retina, la señal de RECA-1 capturada fue transformada en una imagen en blanco y negro, donde los vasos se detectaban como señal positiva y se coloreaban de negro y la señal negativa (de fondo) se representaba en blanco. Para esto, una rutina informática en el programa IPP fue desarrollada para resaltar la red vascular y así evaluar cualitativamente las retinas. En un primer paso, se aplicaron variaciones de fondo aplicando un filtro de corrección de fondo y luego las imágenes fueron convertidas a una escala de grises de 16 bits, para descartar la información de color. Este paso fue seguido por la aplicación de varios filtros que limpiaban la imagen y permitían que la imagen resultante en blanco y negro de la red vascular fuera fidedigna al fotomontaje original. La densidad de los vasos sanguíneos se midió a través de un caliper de 3 mm de radio centrado en el NO y cada intercepción de los vasos marcados con RECA-1 en el perímetro de este caliper fue contado como vaso positivo (**Figura 3.10**).

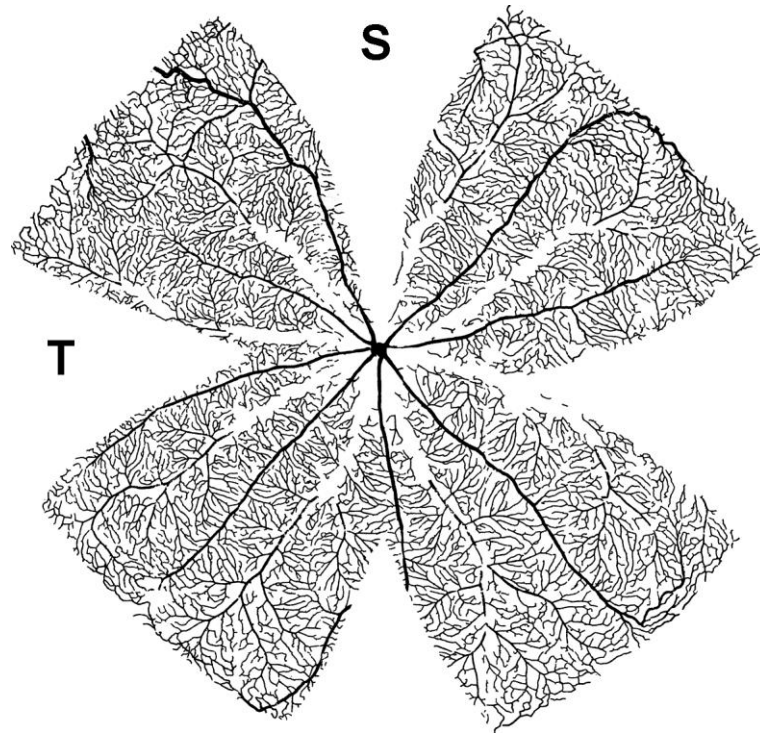


Figura 3.10. Distribución espacial de los vasos sanguíneos marcados con RECA1 en una retina derecha control. Imagen de una retina en blanco y negro donde cada vaso marcado con el anticuerpo RECA-1, que marca mayoritariamente arterias y arteriolas, es representado en negro y el fondo (resto de la retina) en blanco. En la ilustración se observa cómo la retina está irrigada de forma similar a lo largo de la misma y no parece haber diferencia entre los distintos cuadrantes.

3.12. ESTUDIO MORFOLÓGICO Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL CEREBRO DE RATÓN

Los cortes se examinaron y fotografiaron en un microscopio de luz transmitida (Axiosphot; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania) equipado con una cámara digital de alta resolución (AxioCam HR; Carl Zeiss Vision GmbH, München-Hallbergmoos, Alemania).

Para la obtención de las imágenes se utilizó un objetivo de 5x (Plan-Neofluar, 5x/0.15; Zeiss Mikroskopie, Jena, Alemania). El tamaño del campo de captura fue de 2,27 mm². Cada microfotografía fue enfocada manualmente antes de ser capturada y almacenada digitalmente en una carpeta reservada a cada cerebro (**Figura 3.11**).

Los cortes fueron tratados con un programa de edición de imágenes (Adobe Photoshop[®] CS 8.0.1; Adobe Systems, Inc., San José, CA, EEUU) para su mejor visualización, sin alterar la información relevante para su análisis y estudio. Este paso consistía en la eliminación de artefactos histológicos que pudieran interferir el correcto análisis de la imagen dando falsos positivos.

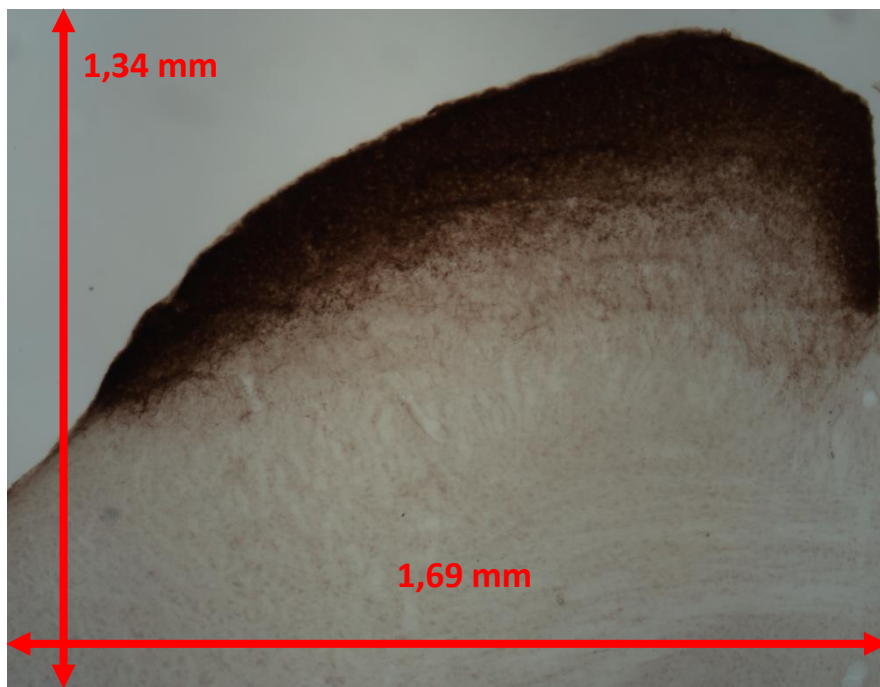


Figura 3.11. Microfotografía de un corte de cerebro de un animal control. En el cual se puede apreciar la parte del colículo superior intensamente marcada con el trazador anterógrado CTB inyectado 4 días antes en el ojo contralateral, el cual pone de manifiesto los axones y terminales de las CGR.

3.12.1. Procesado de imágenes y medida del volumen de las regiones inmunopositivas

Las imágenes fueron procesadas por medio de una subrutina informática específica para la cuantificación de las áreas marcadas con CTB en secciones de cerebro montadas a plano, previamente desarrollado (Avilés-Trigueros y cols., 2003). Este método permite automatizar las tareas repetitivas mediante la programación del lenguaje de macros del programa de análisis de imagen IPP. Así aplicando una secuencia de filtros y transformaciones sobre cada imagen salvada, y realizando una segmentación por color podemos cuantificar el área marcada como positiva, exportando los datos a una hoja de cálculo (Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) para su análisis (Figura 3.12).

Tomando como referencia la localización anatómica de la habénula, sólo se seleccionaron para su cuantificación aquellas secciones histológicas que comprendían el CS, 60-72 secciones por cerebro.

Para cada cerebro, se modificaba manualmente la discriminación de contraste de las zonas marcadas, ya que un oscurecimiento mayor en el resto del tejido, podría ocasionar que la segmentación por color lo identificase, creando así falsos positivos.



Figura 3.12. Procesado de imagen de un corte de cerebro. Microfotografía representativa de una sección de cerebro de un animal control (**Figura 3.11**), donde se observa la región marcada con el trazador anterógrado CTB, que es identificada positivamente con una segmentación por color por el programa de análisis de imagen IPP. Cuantificando el área marcada y exportando seguidamente los resultados a una hoja de cálculo.

3.13. ESTADÍSTICA

Todos los datos promedio se presentan como valores medios con sus desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó usando el programa SigmaStat® 3.1 para Windows® (SigmaStat® para Windows™ versión 3.11; SYSTAT Software, Inc., Richmond, CA, EEUU). El test Kruskal-Wallis se utilizó cuando se compararon dos o más grupos y el test Mann-Whitney cuando se compararon dos grupos solamente. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas para una $p < 0.05$. La correlación entre la población de CGR o de CGRm y la PIO fue obtenida mediante el test de correlación de Pearson.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CGR MELANOPSÍNICAS DEL RATÓN PIGMENTADO Y ALBINO ADULTO

4.1.1. Inmunodetección de células melanopsínicas en montajes globales de retina

El primer objetivo marcado en esta tesis fue la caracterización de las células ganglionares que expresan melanopsina en las retinas de ratón pigmentado y albino adultos. Para responder a este objetivo, abordamos los siguientes subapartados: i) coexpresión de Brn3a y melanopsina; ii) cuantificación y distribución de las CGRm y comparación con las CGR Brn3a⁺; iii) proyección de las CGRm a cerebro; iv) proyección retinofugal de las CGRm. Para realizar los subapartados i y ii, se inmunodetectaron las CGR con Brn3a y las CGRm con melanopsina. Para el subapartado iii, se trazaron las CGR con OHSt desde los CS 7 días antes de sacrificar a los animales, y las retinas se incubaron para detectar igualmente Brn3a y melanopsina. Finalmente, para el subapartado iv, las CGR se trazaron con OHSt desde el muñón del NO, 3 días antes de sacrificar a los animales, y las retinas también se incubaron para detectar Brn3a y melanopsina.

En la **Figura 4.1** se puede observar CGRm, CGR marcadas con Brn3a y CGR trazadas con OHSt desde los CS de una misma zona de retina. El protocolo para la inmunodetección de las CGRm que seguimos fue el utilizado por Vugler y colaboradores (2008), en el cual trabajaban estudiando estas células, tanto en retinas a plano como en secciones transversales. Con el anticuerpo Brn3a se puede identificar a la mayoría de las CGR, tanto en ratones pigmentados (Jain y cols., 2012; Galindo-Romero y cols., 2013a) como en ratas albinas y pigmentadas (Nadal-Nicolás y cols., 2012; Galindo-Romero y cols., 2013a). El marcaje de las CGR trazadas con OHSt desde CS o desde el NO en ratones ha sido caracterizado previamente en nuestro laboratorio (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009c; Vidal-Sanz y cols., 2012) y permite detectar las CGR de proyección retinotectal y retinofugal, respectivamente. Así, una doble inmunodetección de Brn3a y melanopsina en ratones trazados previamente con OHSt desde los CS es un buen método para estudiar en la misma retina, la población en general de CGR y CGRm.

En rata y ratón, la mayoría de las CGR son Brn3a⁺ (Galindo-Romero y cols., 2011). Además, en rata se ha descrito que las CGRm no expresan Brn3a (Nadal-Nicolás y cols., 2012); por lo que, en esta especie la doble detección de Brn3a y melanopsina es una herramienta muy útil para estudiar en paralelo, pero independientemente, la población general de CGR y de CGRm. Para analizar si éste era el caso en ratón, determinamos el porcentaje de CGRm que también expresaban también Brn3a. En nuestros datos se observa que aunque la mayoría de las CGRm

son Brn3a negativas (**Figura 4.1 A-D, b-c**), los análisis de co-localización muestran que en ratones albinos el 0,78% de las CGRm eran Brn3a⁺ (17 de 2.179 CGRm); mientras que en pigmentados esa proporción era el doble, 1,93% (48 de 2.478 CGRm). En la **Figura 4.1 G-a** se muestra un ejemplo representativo de una de las pocas CGRm que también expresa Brn3a.

4.1.2. Análisis morfométrico

Una parte de este estudio fue determinar el tamaño del soma de las CGRm que era detectado por el anticuerpo que utilizamos; ya que, como se muestra en la **Figura 4.1 A-B**, existen diferencias de tamaño e intensidad de inmunotinción.

El diámetro del soma de las CGRm osciló entre 8,5-21,4µm (**Tabla 4.1**), y basándonos en trabajos previos (Berson y cols., 2010; Estévez y cols., 2012; Jain y cols., 2012), podemos decir que, con el anticuerpo frente a melanopsina utilizado, inmunodetectamos CGRm de los subtipos M1 y M2; pero puede que también estemos incluyendo algunos subtipos menos comunes, como M3 y M4.

Los datos resaltan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$; t-test) en el diámetro medio del soma de las CGRm en ratones pigmentados ($n=103$ células; $13,5 \pm 1,8 \mu\text{m}$) comparado con albinos ($n=80$ células; $14,8 \pm 2,2 \mu\text{m}$) (**Tabla 4.1**).

		Pigmentado		Albino	
		CGRm	CGRm-d	CGRm	CGRm-d
		n=103	n=69	n=80	n=30
Diámetro del soma (µm)	Media±DE	13,5±1,8	11,8±1,6	14,8±2,2	12,9±2,3
	Max	17,7	15,8	21,4	17,5
	Min	9,5	8,5	9,7	8,6

Tabla 4.1. Diámetro del soma de las CGRm y las CGRm desplazadas de la capa nuclear interna (CGRm-d) en ratones pigmentados y albinos. Media ± desviación estándar (DE), máximo (Max) y mínimo (Min) del diámetro del soma (µm) de CGRm y CGRm-d en 3 retinas de ratones pigmentados y 3 retinas de albinos. n: número de CGRm analizadas.

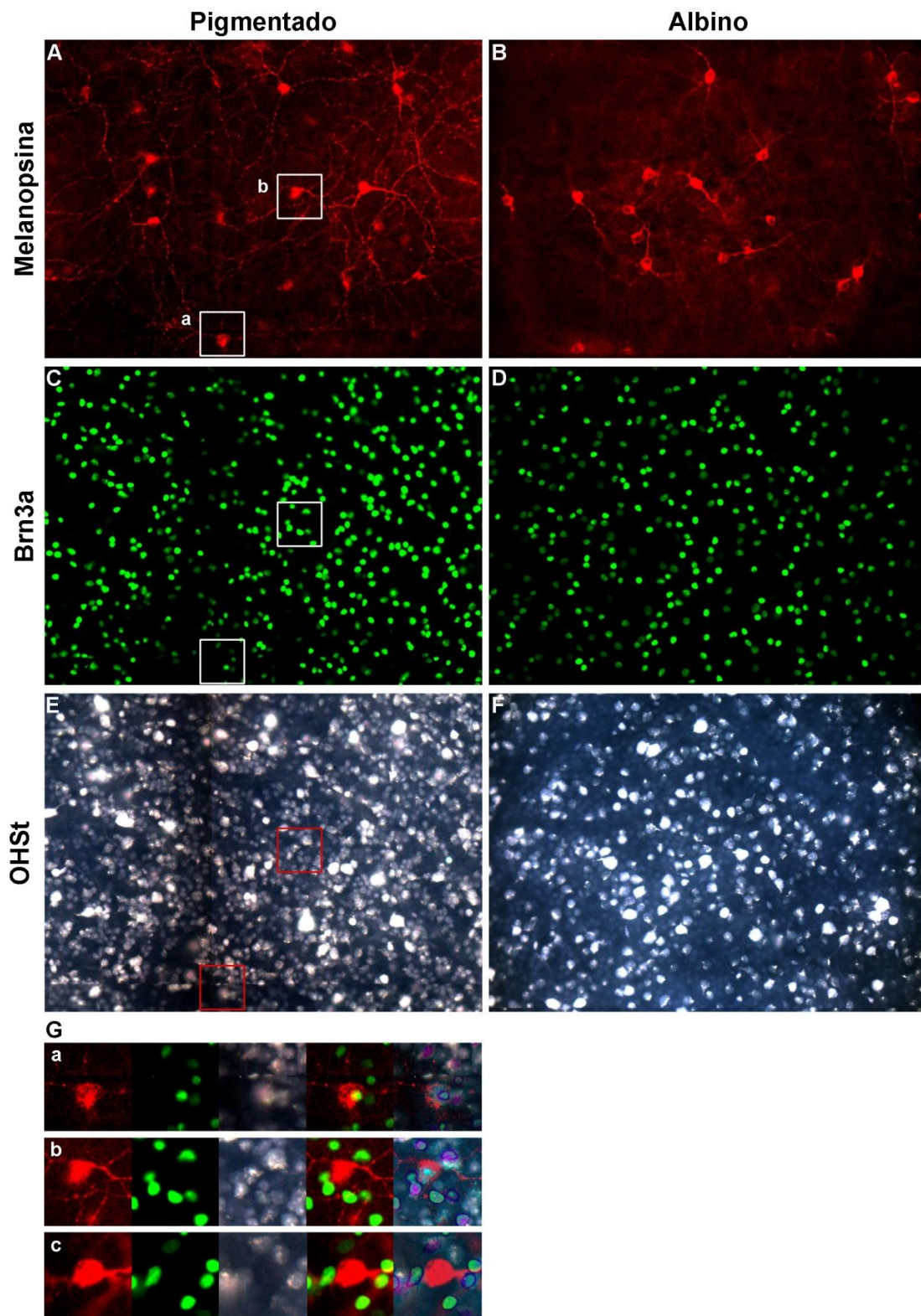


Figura 4.1. Identificación de CGRm en retinas trazadas desde el colículo superior y montadas a plano. Detección en una misma región de retina de CGR melanopsina⁺ (A, B), Brn3a⁺ (C, D) y/o OHSt⁺ (E, F) en ratones pigmentados (columna izquierda) y albinos (columna derecha). (G) Magnificación mostrando co-localización de melanopsina, Brn3a y OHSt (a); co-localización entre melanopsina y OHSt (b); melanopsina que no colocaliza ni con Brn3a ni con OHSt (c). Detalles de imágenes (a, b) en (G) tomadas de (A), (C) y (E).

4.1.3. Estudio de la proyección retinofugal y retinotectal de las CGRm. Análisis específico en la zona marginal ciliar de retina

Las CGR se clasifican como tal porque son neuronas de la retina que envían sus axones fuera de la retina formando el nervio óptico y enviando la información hacia el cerebro. Para verificar que todas las células melanopsínicas positivas (M^+) son de hecho CGR, se analizaron retinas trazadas con OHSt desde el NO y se estudió su colocalización con las CGRm (**Tabla 5.2**). En este análisis, se examinó la retina entera a excepción de la ZMC y como era de esperar, casi el 100% de las CGRm fueron OHSt⁺.

Los colículos superiores (SC) son las principales estructuras retinorecipientes en roedores (Linden y Perry, 1983; Hofbauer y Drager, 1985; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2014), y en rata albina la mayoría de las CGRm proyectan a ellos (90,62%, Galindo-Romero y cols., 2013a; Nadal-Nicolás y cols., 2014). Para estudiar si en ratones este porcentaje se mantiene, se cuantificó la proporción de CGRm OHSt⁺ en retinas trazadas desde ambos colículos superiores (**Tabla 4.2**). Nuestros datos muestran que en ambas cepas de ratones, la mayoría de las CGRm son trazadas retrógradamente cuando se aplica OHSt en los CS (véase también **Figura 4.1 A, B, E, F y G**).

	Trazado desde	Número de CGRm analizadas	CGRm OHSt ⁺
Pigmentado	CS	1.423	1.401 (98,4%)
	NO	1.055	1.052 (99,7%)
Albino	CS	1.438	1.398 (97,2%)
	NO	741	733 (98,9%)

Tabla 4.2. Las CGRm son marcadas retrógradamente en gran proporción desde los colículos superiores. El porcentaje de colocalización se muestra entre paréntesis donde el número total de CGRm analizadas representa el 100%. CS: colículos superiores, NO: nervio óptico.

Un estudio reciente ha documentado que en la ZMC de la retina de ratón, existe un plexo de CGRm que tienen proyecciones desde la retina al cuerpo ciliar (Semo y cols., 2014). Así, con el fin de determinar si estas CGRm envían axones por el NO hacia el cerebro, cuantificamos y mapeamos la distribución de células M^+ en la ZMC en ratones pigmentados y albinos siguiendo el marcaje retrógrado con OHSt desde el NO y el CS (**Figuras 4.2 y 4.3**).

En las retinas que fueron trazadas con OHSt desde el NO, se analizó cuidadosamente la colocalización de melanopsina y OHSt en la ZMC de las hemirretinas nasal y temporal en ambas cepas de ratones (**Figura 4.2 A y 4.2 B**). Como se muestra en los resultados cuantitativos (**Figura 4.2 C**), la cepa albina tiene, en promedio, casi el doble de células M^+ en la ZMC que la cepa pigmentada y esta diferencia es estadísticamente significativa para la retina nasal ($p=0,003$). Sin embargo, en ambas cepas hay más células M^+ en la ZMC nasal (pigmentados 70% y albinos 66%).

En comparación con el número de células $M^+ OHSt^+$ observado en toda la retina (**Tabla 4.2**), encontramos un porcentaje mucho más elevado (hasta un 25%) de células M^+ en la ZMC que no fueron marcadas retrógradamente desde el NO ($M^+ OHSt^-$), tanto en ratones albinos como en pigmentados (**Figura 4.2**). La proporción de células $M^+ OHSt^-$ fue mayor en la ZMC nasal en comparación con la ZMC temporal para ambas cepas. La disposición para las células M^+ en la ZMC nasal tanto en retinas trazadas desde el NO como desde los CS también se ilustra en los esquemas representativos de la **Figura 4.3**.

Curiosamente, los números de células $M^+ OHSt^-$ y $M^+ OHSt^+$ en las hemirretinas nasal y temporal de la ZMC eran muy similares entre animales trazados desde el NO o los CS. En la hemirretina nasal de ratones pigmentados marcados desde el NO, se contaron 26 ± 2 células $M^+ OHSt^+$ y 8 ± 2 células $M^+ OHSt^-$, mientras que marcados desde los CS se contaron 24 ± 1 células $M^+ OHSt^+$ y 9 ± 1 células $M^+ OHSt^-$. Sin embargo, en la hemirretina nasal de los ratones albinos marcados desde el NO, se detectaron 41 ± 13 células $M^+ OHSt^+$ y 15 ± 4 células $M^+ OHSt^-$, mientras que en los marcados desde los CS se contaron 33 ± 4 células $M^+ OHSt^+$ y 18 ± 1 células $M^+ OHSt^-$. Para la hemirretina temporal de ratones pigmentados trazados desde el NO, se contaron 12 ± 4 células $M^+ OHSt^+$ y 2 ± 0 células $M^+ OHSt^-$, mientras que en los trazados desde los CS se contaron 10 ± 3 células $M^+ OHSt^+$ y 3 ± 1 células $M^+ OHSt^-$. Con respecto a la hemirretina temporal de los albinos trazados desde el NO, se observaron 20 ± 8 células $M^+ OHSt^+$ y 6 ± 2 células $M^+ OHSt^-$, mientras que en los trazados desde los CS se contaron 19 ± 2 células $M^+ OHSt^+$ y 6 ± 2 células $M^+ OHSt^-$ (todos las medias y desviaciones se obtuvieron del conteo de 3 retinas para cada cepa y tipo de marcaje). Estos datos sugieren claramente que las células M^+ en la ZMC de ratones deben clasificarse como CGRm clásicas, cuyo axón forma parte del NO, ($M^+ OHSt^+$), o células $M^+ OHSt^-$, las cuales fallan al mandar su axón por el NO y se puede sugerir que son algún tipo de interneurona o neurona de proyección retino-ciliar (Semo y cols., 2014).

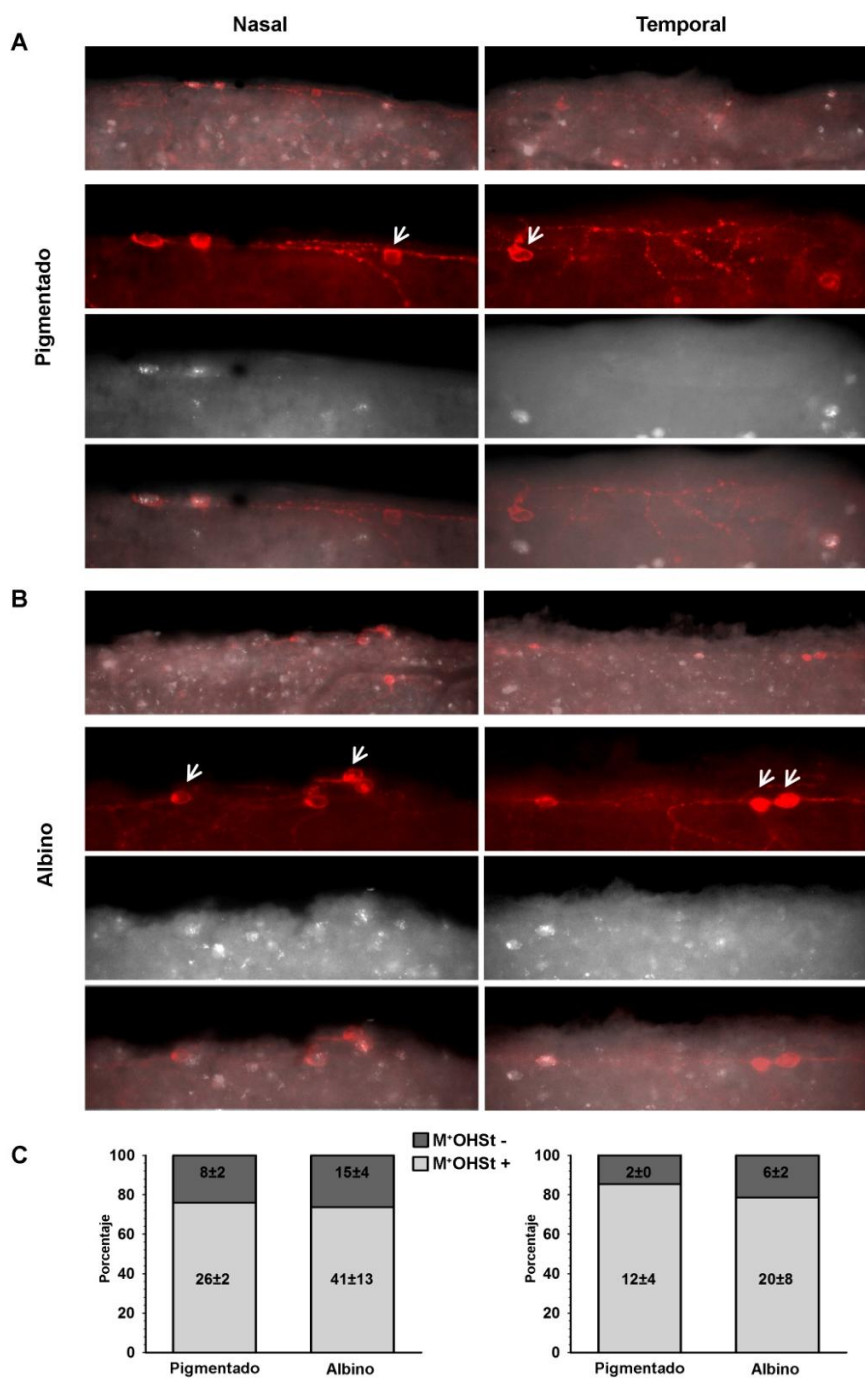


Figura 4.2. Retinas trazadas con OHSt desde el nervio óptico revelan que no todas las CGRm presentes en la ZMC colocalizan con OHSt. A, B: Imágenes adquiridas de la parte nasal (columna izquierda) y temporal (columna derecha) de la ZMC de retinas de ratones pigmentados (**A**) y albinos (**B**), donde se ven CGR con melanopsina (señal roja) y trazadas con OHSt (blanco). Las imágenes de la parte superior de **A** y **B** muestran una región de interés, la cual se magnifica y se separa en los distintos canales por debajo. Las flechas señalan en **A** y **B** células melanopsínicas positivas (M^+) que no colocalizan con OHSt (M^+OHSt^-). **C:** Histogramas que muestran el porcentaje de células M^+ que colocalizan ($OHSt^+$) o no ($OHSt^-$), del número total de células contadas en cada hemirretina, nasal o temporal, de ZMC, siendo el 100% el total de CGRm contadas ($n = 3$ retinas por cepa). Dentro de cada barra se muestra el número total (media ± DE) de células M^+ .

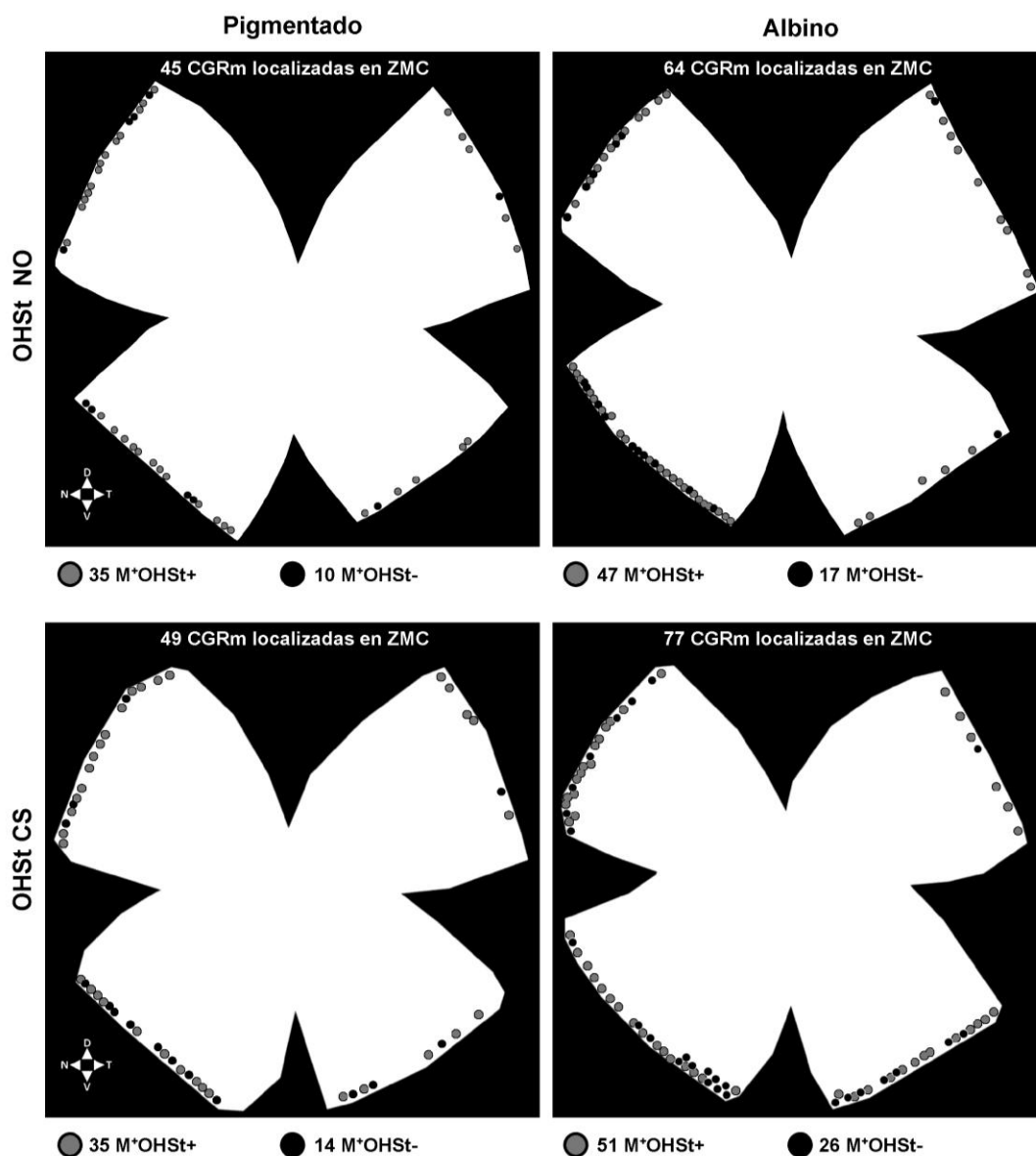


Figura 4.3. Esquemas representativos de las células melanopsínicas positivas (M^+) en la ZMC de ratones pigmentados y albinos, trazados con OHSt desde el NO o los CS. Existe una mayor proporción de células M^+ en el hemirretina nasal de la ZMC de ambas cepas. Los puntos grises marcan las CGRm que son marcadas retrógradamente con el trazador neuronal OHSt (M^+ OHSt⁺), mientras que los puntos negros representan CGRm que no son marcadas, por lo que su axón sale del NO (M^+ OHSt⁻). Abreviaturas: nervio óptico (NO), colículos superiores (CS).

4.1.4. Cuantificación y análisis de la distribución espacial de las CGRm en montajes globales de retina

Cuantificamos manualmente las CGRm en la capa de CGR de retinas con y sin marcaje de OHSt en los CS. En estas retinas, también se inmunodetectaron las CGR con Brn3a y se cuantificaron las poblaciones de CGR Brn3a⁺ y de CGR OHSt⁺ por medio de una subrutina

informática. Los datos obtenidos (**Tabla 4.3**) muestran que la inmunodetección de CGRm no se ve afectada por el marcaje retrógrado de las CGR desde los CS.

	Retinas	CGR Brn3a ⁺	CGRm	CGR OHSt ⁺
Pigmentado	Trazado desde CS (n=7)	38.716±2.338	1.069±141	40.358±2.260
	Intactas (n=12)	38.375±1.148	992±78	
	Media	38.501±1.630	1.021±109	
Albino	Trazado desde CS (n=10)	45.848±3.154	955±163	46.577±2.479
	Intactas (n=11)	45.907±2.547	968±182	
	Media	45.884±2.707	962±169	

Tabla 4.3. Cuantificación de las CGR OHSt⁺, Brn3a⁺ y CGRm. Número total (media±DE) de CGRm y CGR Brn3a⁺ de retinas intactas y número total (media±DE) de CGRm, CGR Brn3a⁺ y CGR OHSt⁺ en retinas trazadas desde CS.

Como previamente demostró Salinas-Navarro y colaboradores (2009a), la cepa de ratón albino tiene más CGR que el ratón pigmentado. Con respecto a células CGR Brn3a⁺, representan el 95% y 98,5% de las células que son marcadas retrógradamente desde los CS en ratones pigmentados y albinos, respectivamente. Según nuestros contajes, las CGRm representan el 2,5% y el 2,1% del total de la población de células marcadas con OHSt en ratones pigmentados y albinos respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el número total de CGRm comparando ambas cepas, aunque en la cepa pigmentada, la media era algo superior. En números totales, se cuantificó una media de 1.021±109 CGRm en ratones pigmentados y 962±169 CGRm en ratones albinos. Estos números son comparables con otros estudios que han cuantificado el número de CGRm en ratones pigmentados, como por ejemplo Jain y colaboradores (2012) que obtuvieron una media de 1.194±281 CGRm y, algo menos, que Hughes y colaboradores (2013) que cuantificaron entre 1.600-1.800 CGRm.

La distribución espacial de las CGRm y CGR Brn3a⁺ en las mismas retinas se muestra en la **Figura 4.4**. La distribución de las CGR Brn3a⁺ está representada por mapas de isodensidad como los que se muestran en la **Figura 4.4 A-H**, mientras que la distribución de las CGRm está representada por mapas de vecinos (**Figura 4.4 A'-H'**). En ambas cepas, las CGRm son más abundantes en la periferia de la retina y aparecen situadas en las áreas de baja densidad de CGR Brn3a⁺ (véase **Figura 4.4** y análisis cuantitativo en la **Figura 4.5 B, E**).

Sin embargo, existen diferencias sutiles entre ambas cepas. Las CGRm tienden a ser más abundantes en la retina temporal de los ratones pigmentados (test de Mann Whitney, p=0,001; **Figura 4.5 C**) mientras que en los ratones albinos las CGRm son más abundantes en la retina

superior (test de Mann Whitney, $p=0,001$; **Figura 4.5 F**). En los ratones pigmentados, las CGRm se distribuyen formando un arco cerrado que abarca los cuadrantes supero-temporal e ínfero-temporal; pero en los ratones albinos, las CGRm son más densas en la retina superior, forman un arco por encima de la estría visual, donde la densidad de las CGR $Brn3a^+$ es mayor (**Figuras 4.4 y 4.5**). Hasta la fecha, el único estudio que también examina la distribución de las CGRm en la retina de ratón pigmentado, muestra una mayor densidad de CGRm en la retina dorsal (Hughes y cols., 2013), ligeramente distinto a nuestras observaciones.

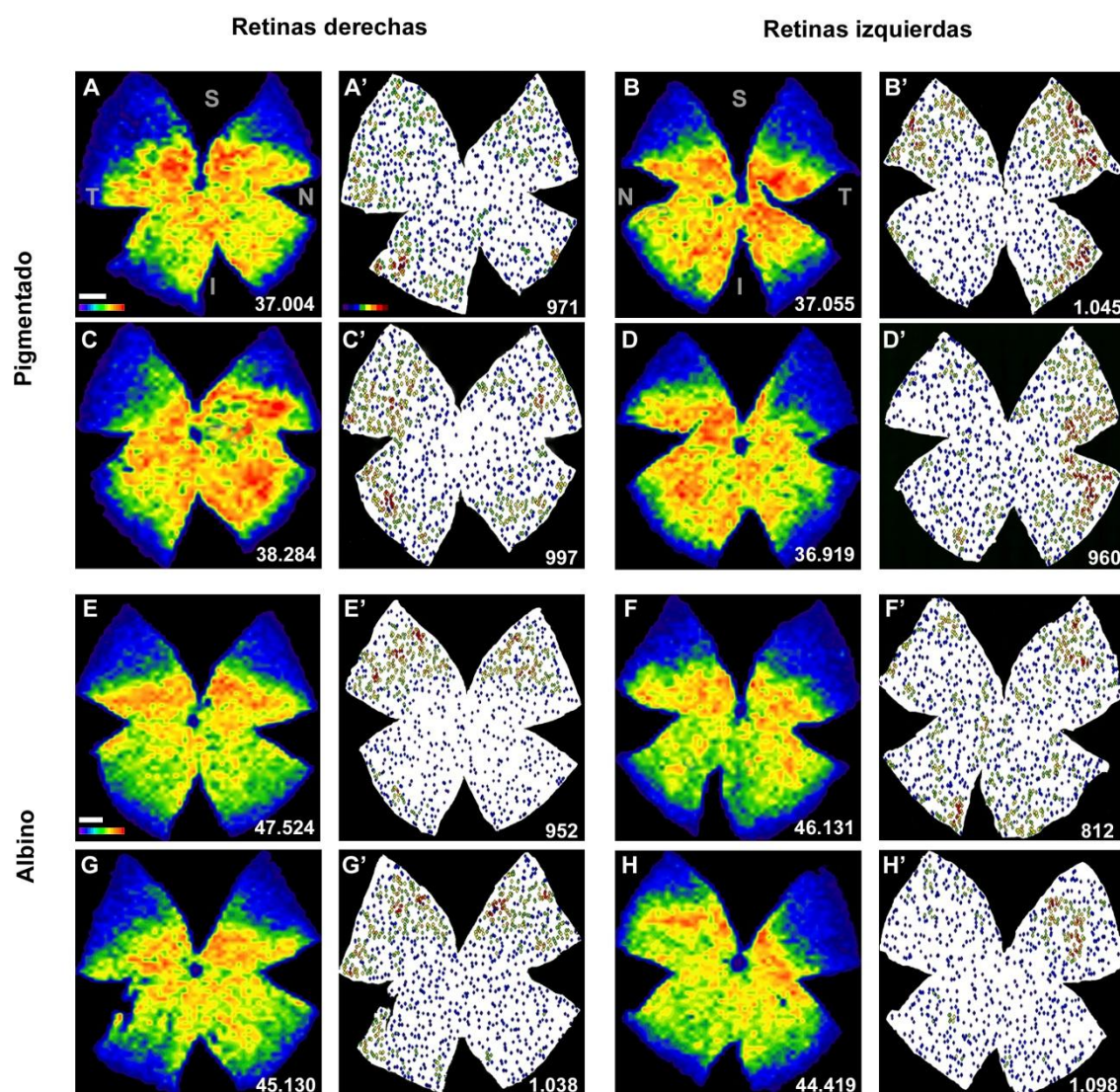


Figura 4.4. Distribución de las CGRm y las CGR $Brn3a^+$ en retinas derechas e izquierdas de ratón pigmentado y albino. A-H: Distribución de las CGR $Brn3a^+$ representada por medio de mapas de isodensidad, para ambas cepas, en dos retinas derechas y dos retinas izquierdas. A'-H': distribución de las CGRm representada por medio de mapas de vecinos en las mismas retinas. En la parte inferior derecha de cada mapa se muestra el número total de células contadas. La barra de escala de colores va de 0 (púrpura) al máximo (rojo) que es ≥ 4.800 CGR $Brn3a^+/\text{mm}^2$ para ratones pigmentados (A) y ≥ 5.625 CGR $Brn3a^+/\text{mm}^2$ para los albinos (B). La escala de colores en A' va de 0 (morado) a 11 vecinos o más (rojo) para un radio de 0,165 mm. S: superior, T: temporal, I: inferior, N: nasal. Barra de escala: $500\mu\text{m}$.

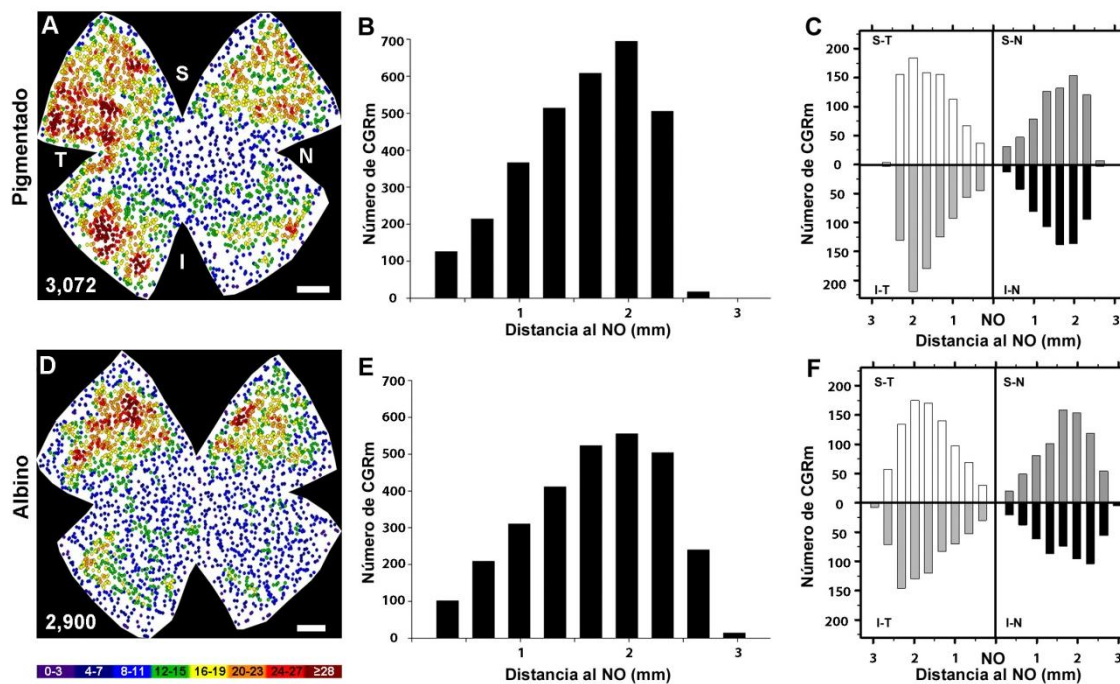


Figura 4.5. Análisis cuantitativo de la distribución retiniana de las CGRm. **A, D:** Mapas de vecinos normalizados donde se representan juntos los datos de 3 retinas pigmentadas (**A**) y 3 retinas albinas (**D**). Con estos datos, el número de CGRm se analizó para una distancia determinada desde el NO hasta la periferia para las retinas pigmentadas (**B**) y las retinas albinas (**E**), y para cada uno de los cuatro cuadrantes retinianos (**C, F**): supero-temporal (S-T), supero-nasal (S-N), ínfero-temporal (I-T) e ínfero-nasal (I-N). En la parte inferior de cada mapa se muestra el número total de CGRm. La escala de colores va desde 0-3 (morado) a los ≥ 28 vecinos (rojo). Barra de escala: 500 μm .

4.1.5. Estudio de la población y distribución espacial de las CGRm desplazadas a la capa nuclear interna

Los ojos de ratones pigmentados marcados retrógradamente con OHSt desde los CS, fueron cortados en secciones radiales en criostato (14 μm grosor) para examinar la ubicación de las CGRm desplazadas (CGRm-d). Se identificaron un total de 74 CGRm-d y todas estaban situadas en la capa nuclear interna (CNI) a excepción de una célula que se encontraba en la capa plexiforme interna (CPI) (**Figura 4.6**). Además, las CGRm-d fueron cuantificadas y su distribución espacial analizada en 3 retinas montadas a plano para cada cepa de ratones marcados retrógradamente con OHSt desde el NO. En ambas cepas, estas CGRm-d estaban situadas en su gran mayoría en la retina dorsal (**Figura 4.7**). Las CGRm-d también se identificaron en la ZMC de la retina, donde eran más abundantes en la hemirretina nasal y, una proporción alta de ellas, no colocalizaban con OHSt desde el NO (**Figura 4.8**). En cuanto al diámetro medio del soma, tanto en las CGRm-d de ratones pigmentados ($n=69$ células; $11,8 \pm 1,7 \mu\text{m}$) como de albinos ($n=30$ células; $12,9 \pm 2,3 \mu\text{m}$) era significativamente más pequeño que en las CGRm de la capa de CGR ($p < 0,001$; t-test) (**Tabla 4.1**).

Las CGRm-d eran mucho más abundantes en los ratones pigmentados ($147 \pm 6,2$) que en los albinos ($46,3 \pm 11$), representando aproximadamente un 14% y un 5% de la población total de CGRm, respectivamente (para números totales de CGRm ver **Tabla 4.3**). La mayoría de CGRm-d eran OHSt⁺; sin embargo, en comparación con las CGRm de la capa de CGR marcadas retrógradamente con OHSt desde el NO (ver **Tabla 4.3**), en la retina completa aproximadamente un 14% de las CGRm-d no fueron marcadas con OHSt en ratones pigmentados (media de 21 ± 2 M⁺ OHSt⁺), y en albinos este porcentaje aumentaba hasta aproximadamente un 28% (media de 13 ± 3 M⁺ OHSt⁺) (**Figura 4.8**). Estas células eran similares morfológicamente pero no se pudo observar ningún axón obvio en las células M⁺ OHSt⁺ que nos indicara su dirección. Como se muestra en la **Figura 4.8**, para los animales pigmentados y albinos, aproximadamente la mitad de las CGRm-d que residen en la ZMC de la retina son M⁺ OHSt⁺, existiendo una mayor proporción en la zona nasal.

La disparidad entre los datos de colocación con OHSt marcado retrógradamente desde el NO con las CGRm (ubicadas en la capa de CGR) y las CGRm-d (ubicadas en la CNI) plantea nuevamente la posibilidad de que algunas CGRm-d no envíen su axón a través del nervio óptico. Por esto, se interpretan estos resultados como evidencia de que al igual que pasa con algunas CGRm en la capa de CGR, sobretodo en la ZMC, un pequeño porcentaje de CGRm-d de la retina del ratón son en realidad interneuronas que expresan melanopsina y no CGRm.

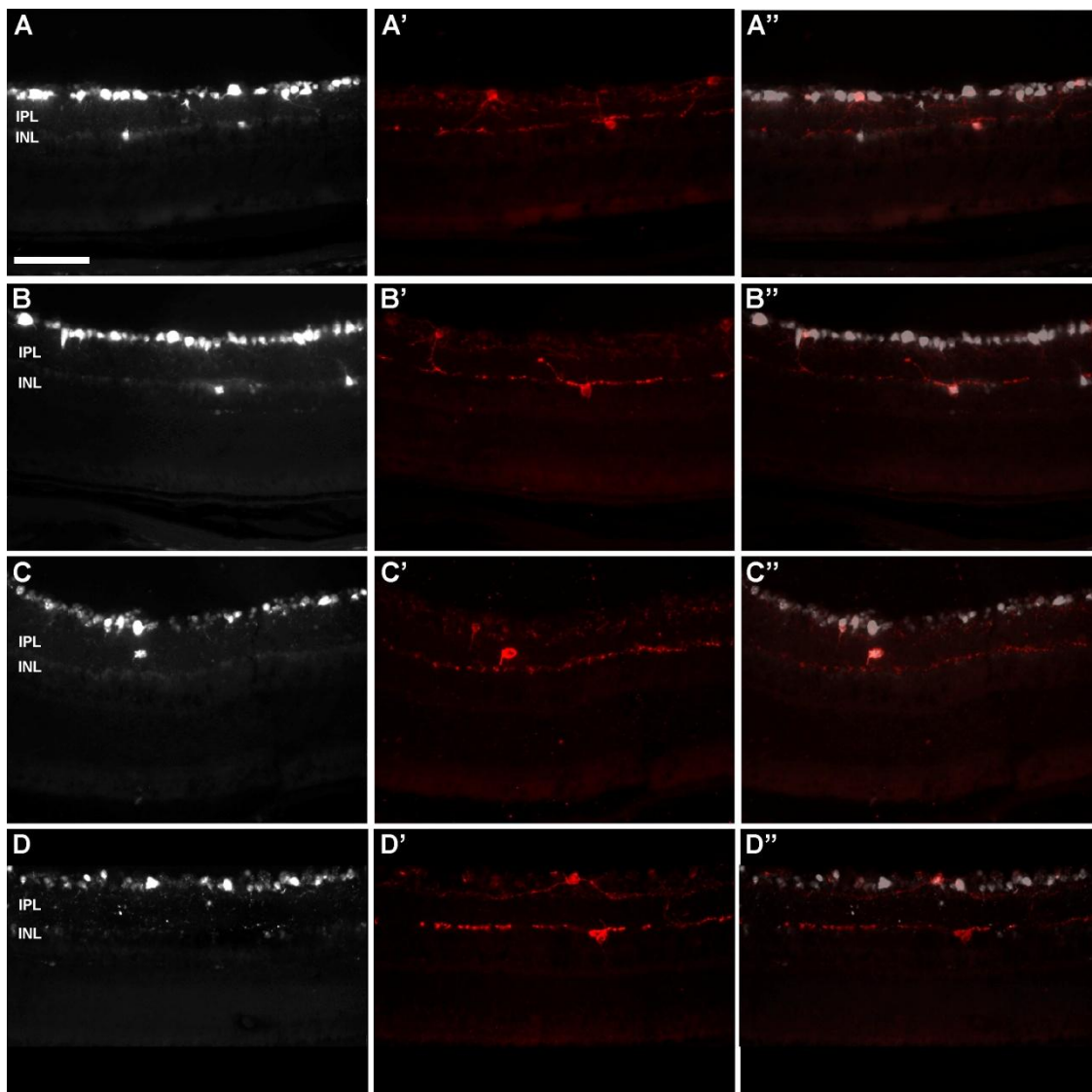


Figura 4.6. Localización de CGRm y CGRm-d en secciones transversales de retina de ratones pigmentados. En las imágenes se muestran CGR OHSt⁺ (A-D) y melanopsina⁺ (A'-D'). A''-D'' son las imágenes correspondientes combinadas. Las retinas fueron marcadas retrógradamente con OHSt desde los CS (A-C) o desde el NO (D). En A y B se observan CGR OHSt⁺ desplazadas en la CNI, de las cuales dos son melanopsínicas positivas (A', B'). Como regla general, las CGRm-d se sitúan en la CNI (A-B''), aunque alguna se localizan en la CPI (C-C''). En (D-D'') se muestra un ejemplo de una CGRm-d, que no ha sido marcada retrógradamente con OHSt desde el NO. Esta es una interneurona melanopsínica. CPI: Capa plexiforme interna. CNI: capa nuclear interna. Barra de escala: 100 μ m.

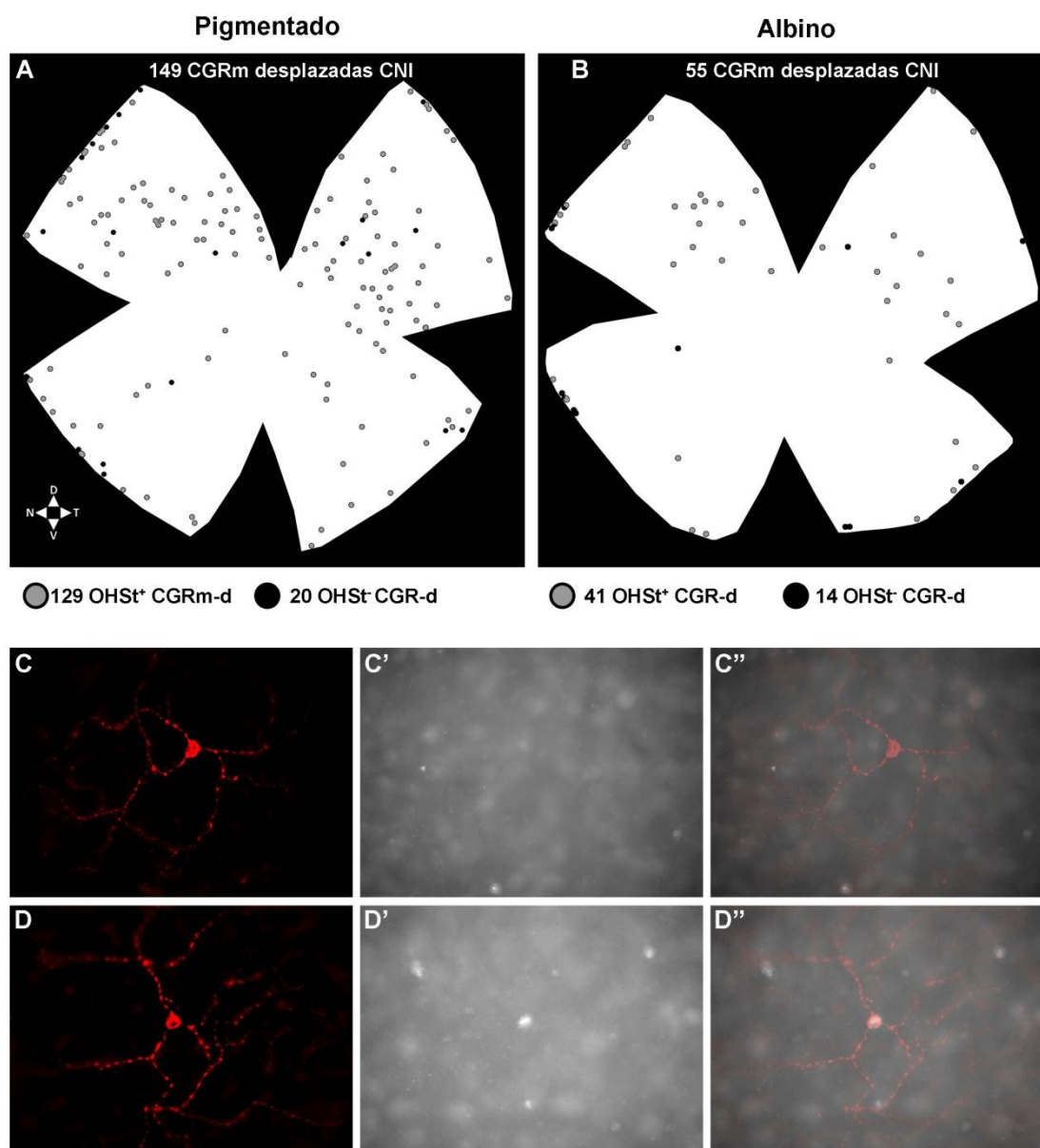


Figura 4.7. Distribución espacial de las CGRm-d en retinas de ratones pigmentados y albinos. A, B: Esquemas representativos de la distribución de las CGRm-d en una retina marcada retrógradamente con OHSt desde el NO en un ratón pigmentado (**A**) y un albino (**B**). Cada punto representa una sola CGRm-d. Los puntos grises representan CGRm-d trazadas desde el NO (OHSt⁺). Los puntos negros representan CGRm-d cuyo axón no pasa por el NO (OHSt⁻). **C-D''**: Magnificaciones de retina a plano a nivel de la CNI en donde se observa un ejemplo de una CGRm-d OHSt⁻ (**C-C''**) y un ejemplo de una CGRm-d OHSt⁺ (**D-D''**).

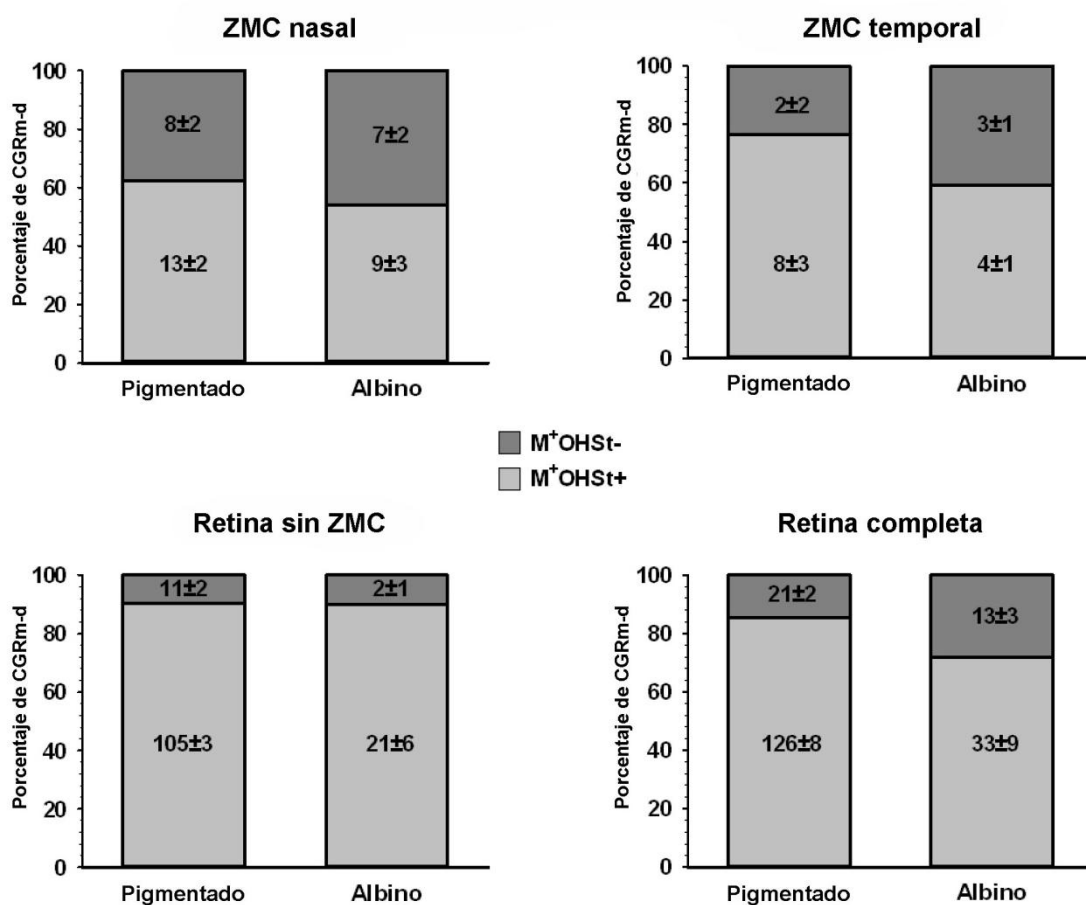


Figura 4.8. Cuantificación de las CGRm-d en las retinas de ratones pigmentados y albinos trazados con OHSt desde el nervio óptico. Los histogramas muestran el número total (media±DE) y el porcentaje de CGRm-d OHSt⁺ y OHSt⁻ en diferentes regiones de la retina para cada cepa. Cabe resaltar el porcentaje relativamente alto de CGRm-d OHSt⁻ en la retina completa y que estas células son aproximadamente la mitad de las células que componen el total de las CGRm-d de la ZMC, sobre todo en la región nasal.

4.2. ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CGR Y LAS CGRm DESPUÉS DE HTO EN RATÓN PIGMENTADO

4.2.1. Evolución de la presión intraocular tras fotocoagulación con láser (FL) de las venas episclerales y perilibares

El análisis de los resultados obtenidos del estudio tonométrico realizado a los grupos experimentales muestra que la fotocoagulación de la vía convencional de drenaje en los ojos de ratones pigmentados C57BL/6, con los parámetros establecidos en la metodología, induce un aumento estadísticamente significativo de la PIO (**Figura 4.9 A**) desde valores basales de $15,73 \pm 1,47$ mmHg hasta valores significativamente elevados a las 24 horas post-fotocoagulación ($35,44 \pm 16,05$ mmHg; $p < 0,001$, Mann-Whitney test). A las 48 horas los valores promedio de PIO se

mantienen elevados ($31,80 \pm 15,85$ mmHg; $p < 0,001$, Mann-Whitney test), aunque son menores. A los 5 días post-lesión, los valores de PIO descendían paulatinamente ($22,56 \pm 15,63$; $p = 0,027$, Mann-Whitney test), hasta valores normales a la semana post láser ($16,82 \pm 4,60$; $p = 0,474$, Mann-Whitney test) y se mantenían en esos valores para los restantes tiempos de estudio (hasta 14 semanas post-fotocoagulación, $14,66 \pm 0,80$ mmHg). Además, se demostró el descenso progresivo de la PIO a lo largo de los días posteriores al tratamiento con láser. Los valores de PIO de los ojos derechos se mantuvieron dentro de la normalidad durante todo el experimento, sin observarse diferencias significativas entre sí a lo largo del periodo estudiado ($p < 0,05$; Mann-Whitney test).

Los resultados de la medición de la PIO en estos grupos experimentales indican que el incremento de PIO ocurre en la primera semana tras la FL. Para determinar la evolución temporal de este incremento de PIO, en un grupo experimental adicional se registró en detalle la PIO a intervalos de tiempo cortos (1, 6, 12, 24, 30, 36, 48 y 60 horas y 3, 4, 5 y 7 días) tras la inducción de HTO. Los resultados de este grupo experimental (**Figura 4.9 B**) indican que la PIO ya se encuentra elevada significativamente a la hora ($24,53 \pm 8,0$ mmHg; $p = 0,001$, Mann-Whitney test) con respecto a los ojos derechos control y alcanza su valor máximo a las 24 horas ($39,88 \pm 5,6$ mmHg; $p < 0,001$, Mann-Whitney test), disminuyendo progresivamente hasta alcanzar valores estadísticamente no significativos a los 5 días de la administración del láser ($22,23 \pm 10,4$ mmHg; $p = 0,163$, Mann-Whitney test). La PIO de los ojos derechos, al igual que en los estudios anteriores, no sufrieron alteraciones significativas a lo largo de todo el periodo estudiado.

4.2.2. Estudio de la población y distribución de las CGR Brn3a⁺ y las CGRm a diferentes tiempos post-lesión y su relación con las CGR que mantienen un TAR viable

En retinas control (**Figura 4.10**) las CGR marcadas retrógradamente con OHSt desde los CS, las CGR Brn3a⁺ y las CGRm se distribuyen de forma característica. La distribución de las CGR Brn3a⁺ o marcadas con OHSt no es homogénea, sino que su densidad es mayor en la zona intermedia de la retina que en la retina periférica (**Figura 4.10 A', B'**). Sin embargo, las CGRm, aunque se encuentran distribuidas por toda la retina, son más abundantes en el cuadrante supero-temporal de la retina (**Figura 4.10 C-C'**; véase también *apartado 4.1.3, Figuras 4.3 y 4.4*).

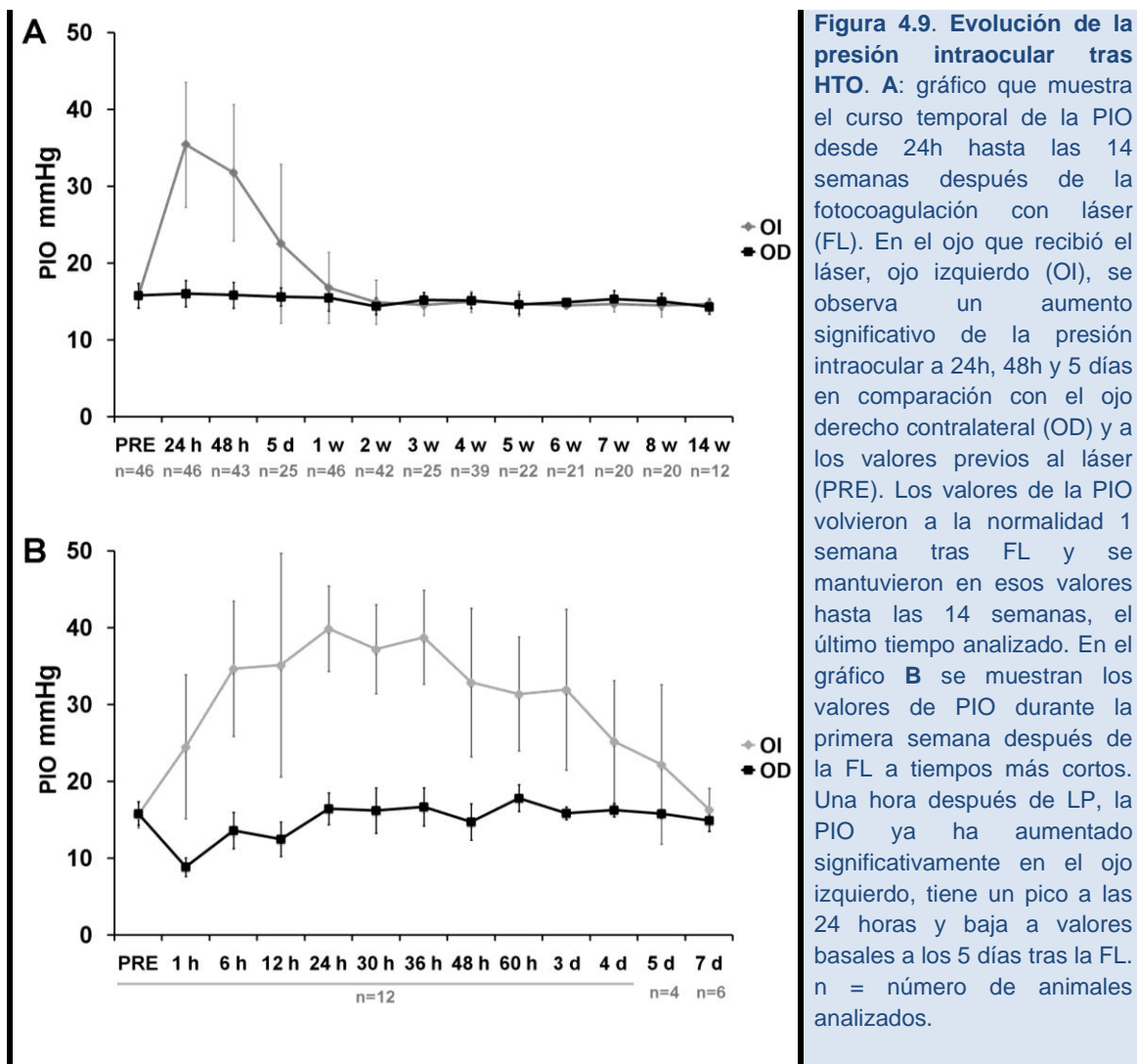


Figura 4.9. Evolución de la presión intraocular tras HTO. **A:** gráfico que muestra el curso temporal de la PIO desde 24h hasta las 14 semanas después de la fotocoagulación con láser (FL). En el ojo que recibió el láser, ojo izquierdo (OI), se observa un aumento significativo de la presión intraocular a 24h, 48h y 5 días en comparación con el ojo derecho contralateral (OD) y a los valores previos al láser (PRE). Los valores de la PIO volvieron a la normalidad 1 semana tras FL y se mantuvieron en esos valores hasta las 14 semanas, el último tiempo analizado. En el gráfico **B** se muestran los valores de PIO durante la primera semana después de la FL a tiempos más cortos. Una hora después de LP, la PIO ya ha aumentado significativamente en el ojo izquierdo, tiene un pico a las 24 horas y baja a valores basales a los 5 días tras la FL. n = número de animales analizados.

Después de la HTO se produce un daño axonal que provoca que muchas CGR no sean capaces de transportar al trazar retrógradamente desde los CS con el marcador OHSt⁺ (**Figura 4.11 A-F**). Por lo que, dos semanas tras la FL, se observan amplias áreas de la retina carentes de CGR OHSt⁺, sobre todo en la retina dorsal; mientras que en la retina ventral las CGR OHSt⁺, cuyos axones son viables y capaces de transportar retrógradamente el marcador desde los CS, se observan en forma de sectores en cuña. Esta lesión axonal no progresa de 2 a 4 semanas (**Figura 4.11 D-F**). Además del daño sectorial, también se produce un daño difuso, puesto que en muchas de estas áreas donde hay CGR OHSt⁺, la densidad celular es menor que la que se observa en las mismas áreas de retinas control (comparar **Figura 4.11 A-F** con **Figura 4.10 A'**).

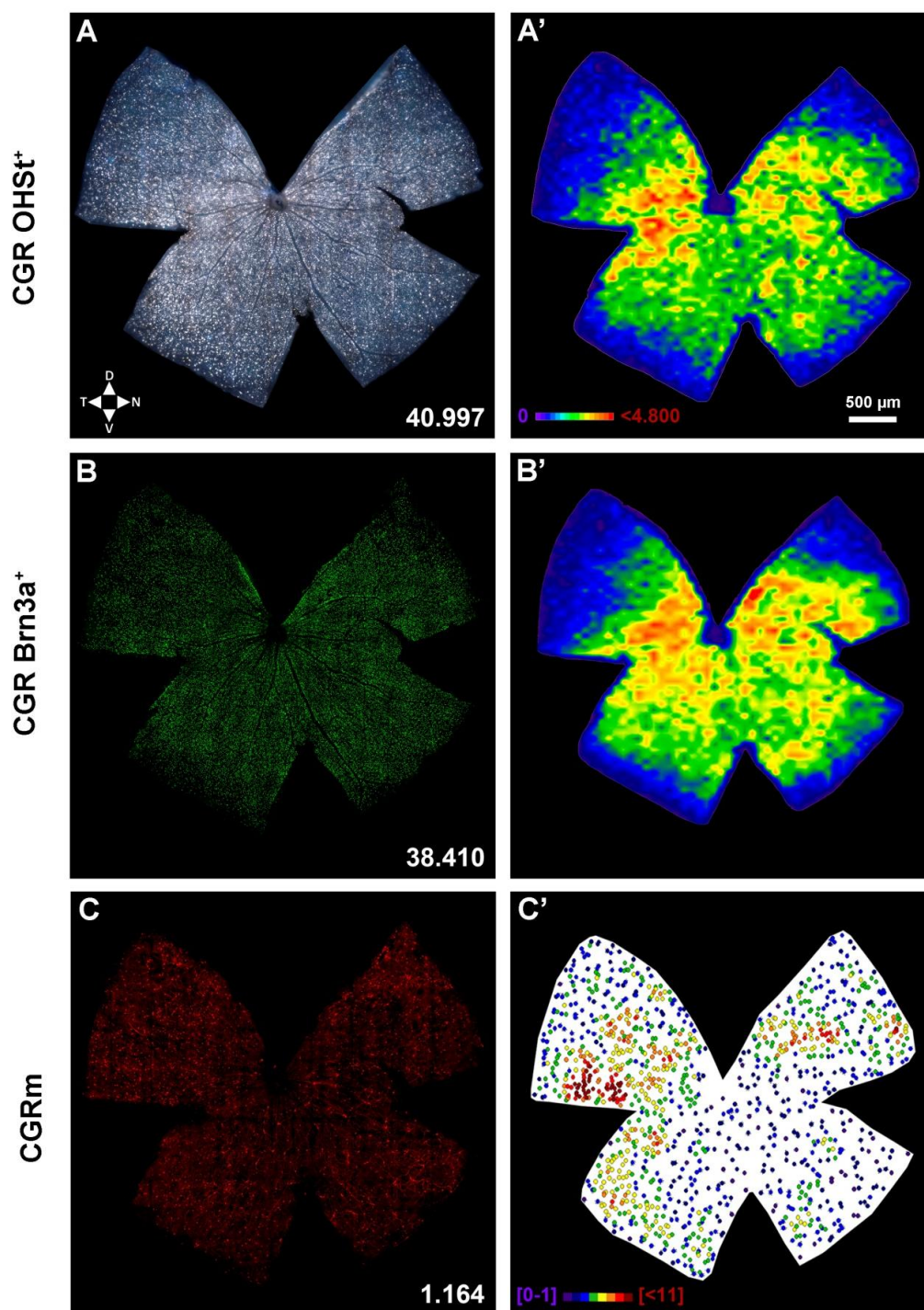


Figura 4.10. Distribución de las CGR trazadas con OHSt e inmunodetectadas con Brn3a y melanopsina en una retina control. A-C fotomontajes de una retina derecha mostrando CGR OHSt⁺ (A), Brn3a⁺ (B) y melanopsina⁺ (C). Su distribución se muestra en mapas de isodensidad para las CGR OHSt⁺ y Brn3a⁺ (A', B') y en mapa de vecinos para las CGRm (C'). La escala de color para los mapas de isodensidad (A', B') va de púrpura (0 CGR/mm²) a rojo (≥ 4.800 CGR/mm²) y para los mapas de vecinos (C') va desde el púrpura (1-2 los vecinos en un radio de 0.165 mm) a rojo (≥ 11 vecinos en el mismo radio). D: dorsal, V: ventral, N: nasal, T: temporal. Barra: 500 µm.

Al analizar la distribución de las CGR Brn3a⁺; es decir, CGR que siguen vivas independientemente de la viabilidad de su axón y, por tanto, se han trazado retrógradamente con OHSt, se observa que a las 2 semanas tras inducir HTO, en las áreas carentes de CGR OHSt⁺, la densidad de CGR Brn3a⁺ es mayor. Sin embargo, a las 4 semanas las densidades retinianas de ambas poblaciones coinciden; lo que indica que las CGR mueren secundariamente a un daño axonal provocado por la HTO (**Figura 4.11 A'-F'**).

La subpoblación de CGR que expresan melanopsina, las CGRm, responde de forma parecida que el resto de CGR (Brn3a⁺) ante la HTO. Al igual que sucede con las CGR Brn3a⁺, la pérdida de las CGRm es más pronunciada en las áreas de retina sin CGR OHSt⁺, tanto a 2 como a 4 semanas (**Figura 4.11 A''-F''**). Sin embargo, esta pérdida no es de forma sectorial, sino que es difusa por toda la retina, siendo el daño más severo en el área de mayor densidad de CGRm, la retina dorso-temporal.

Existe una gran variabilidad en el daño axonal provocado y en el número de CGR remanentes tras la HTO (**Tabla 4.4** y **Figura 4.12**). Sin embargo, en todos los casos se observó en mayor o menor medida, pérdida de CGR, y a las 2 y 4 semanas después de la FL el número de CGR OHSt⁺, Brn3a⁺ y CGRm fue significativamente menor que en las retinas derechas, que se utilizaron como control.

Dos semanas después de la FL, el porcentaje de CGR Brn3a⁺ ($66\pm 29\%$) es mayor que las trazadas retrógradamente con OHSt ($50\pm 24\%$); aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa debido a la alta variabilidad de este modelo (**Figura 4.12**), estos datos indican que a las 2 semanas de las FL, parte de las CGR con un transporte axonal comprometido se mantienen vivas. A las 4 semanas ambas poblaciones se igualan, tal y como se observa en los porcentajes de las CGR OHSt⁺ ($38\pm 37\%$) y Brn3a⁺ ($41\pm 41\%$) y en el análisis de distribución (**Tabla 4.4** y **Figura 4.11**).

Con respecto a la población de CGRm, 2 semanas después de la HTO se observó una reducción significativa (40%) y a las 4 semanas el 54% de ellas se pierden; al igual que pasa con las CGR Brn3a⁺, esta diferencia entre 2 y 4 semanas era estadísticamente significativa (**Tabla 4.4**).

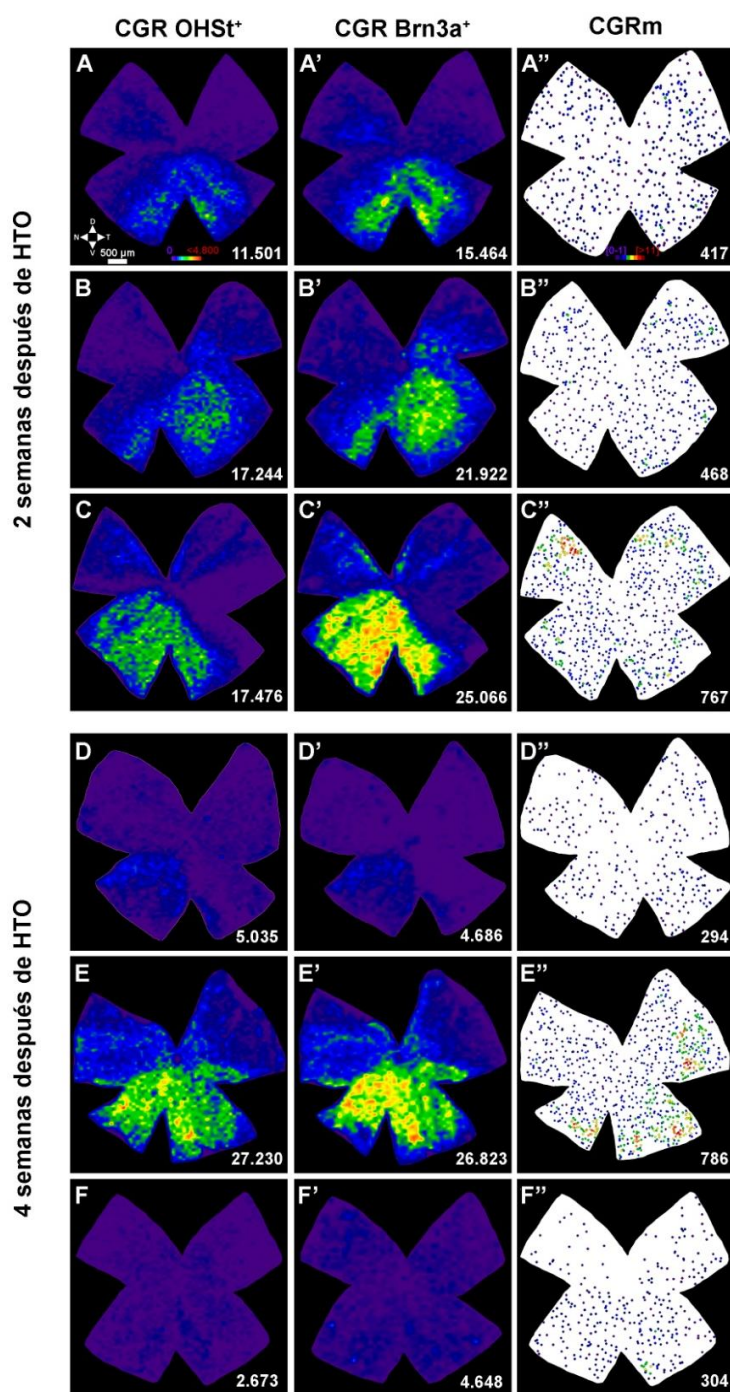


Figura 4.11. Análisis de la distribución espacial de las CGR OHSt⁺, CGR Brn3a⁺ y CGRm en retinas hipertensas a las 2 y 4 semanas tras la HTO. Distribución de las CGR OHSt⁺ (A-F), CGR Brn3a⁺ (A'-F') y CGRm (A'', F'') a las 2 y 4 semanas después de la inducción de HTO. Los mapas etiquetados con la misma letra son de la misma retina (ejem. A-A'', B-B'' y así sucesivamente). En los mapas de isodensidad de las CGR OHSt⁺ se observa tanto a 2 como a 4 semanas un daño sectorial, mayor en la retina dorsal (A-F). Comparado este daño con sus correspondientes mapas de isodensidad de las CGR Brn3a⁺ se observa que a 2 semanas permanecen CGR vivas en áreas con daño axonal, y que estas poblaciones se igualan a 4 semanas (A'-F'). Las CGRm responden de forma parecida al resto de CGR, pero no se observa un daño sectorial claro, como sí ocurre con el resto (A''-F''). En la parte inferior de cada mapa se muestra el número de CGR o CGRm contadas. D: dorsal, V: ventral, N: nasal, T: temporal.

Realizamos un análisis de correlación entre el número de CGR OHSt⁺ (es decir, CGR con transporte axonal retrógrado competente) y CGR Brn3a⁺ o CGRm. Esta correlación revela que la pérdida de las CGR Brn3a⁺ está altamente correlacionada con la extensión del daño axonal ($r^2=0,97$ en 2 semanas y $r^2=0,98$ en 4 semanas; **Figura 4.13 A**), mientras que para la población de las CGRm, esta correlación es más débil ($r^2=0,66$ en 2 semanas, $r^2=0,73$ en 4 semanas (**Figura 4.13 B**). Esto concuerda con el estudio de la distribución espacial (**Figura 4.11**), donde se observa que en las áreas sin CGR trazadas retrógradamente, todavía sobreviven CGRm.

Todos estos datos indican que la HTO, al menos, daña el transporte axonal de las CGR. Este deterioro se produce dentro de las primeras dos semanas después de la inducción de la HTO y no progresa a lo largo del tiempo. Sin embargo, la pérdida de CGR se produce de forma más gradual y aunque la mayoría de las CGR cuyo transporte axonal está dañado muere durante las primeras 2 semanas, una proporción significativa de ellas se pierde después.

Tiempo analizado	Población		Media±DE
2 semanas después de HTO	CGR OHSt ⁺	OD (n=7)	38.479±2.134
		OI (n=7)	19.383±9.499*
	CGR Brn3a ⁺	OD (n=7)	37.904±1.265
		OI (n=7)	25.007±11.115*
	CGRm	OD (n=7)	1.059±79
		OI (n=7)	629±254*
4 semanas después de HTO	CGR OHSt ⁺	OD (n=7)	38.507±2.324
		OI (n=7)	14.795±14.326*
	CGR Brn3a ⁺	OD (n=7)	37.936±2.151
		OI (n=7)	15.583±15.505*
	CGRm	OD (n=7)	1.019±140
		OI (n=7)	478±248*

Tabla 4.4. Cuantificación de las poblaciones de CGR OHSt⁺, CGR Brn3a⁺ y CGRm en las retinas experimentales y controles a las 2 y 4 semanas tras la inducción de HTO. Media ± desviación estándar (DE) del número total CGR OHSt⁺, CGR Brn3a⁺ y CGRm cuantificadas a 2 y 4 semanas después de la inducción de HTO. OD: retina derecha control. OI: retina izquierda experimental. n: número de retinas analizadas. *Diferencia estadísticamente significativa en comparación con las retinas derechas control ($p<0,05$; Mann-Whitney test).

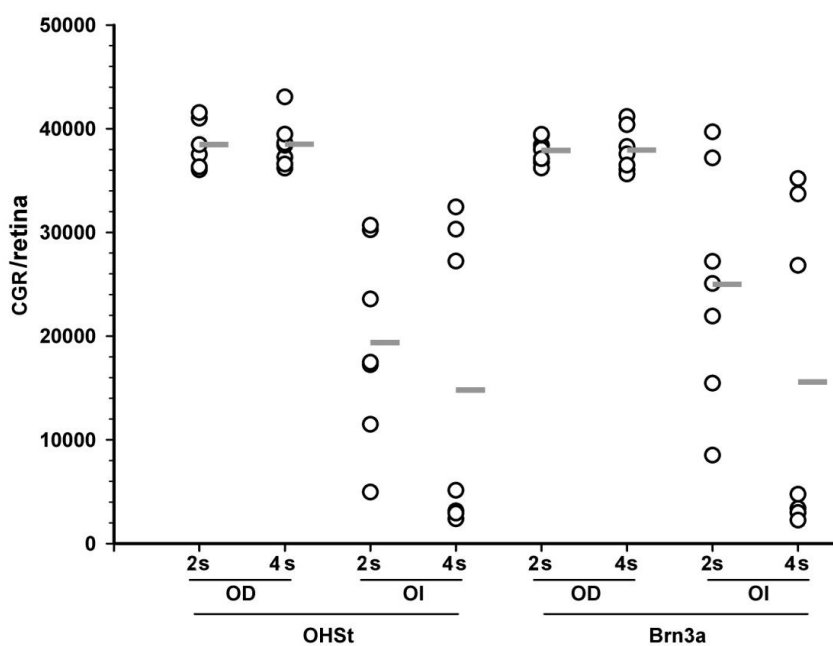


Figura 4.12. Variabilidad interanimal tras la HTO. Número de CGR marcadas con OHSt^+ (es decir, CGR con transporte axonal retrógrado competente) y Brn3a^+ (CGR vivas) para cada una de las retinas analizadas a 2 y 4 semanas después de la inducción de HTO (círculos abiertos). Las líneas horizontales grises indican el valor medio de cada grupo. OD: ojo derecho control. OI: ojo izquierdo experimental.

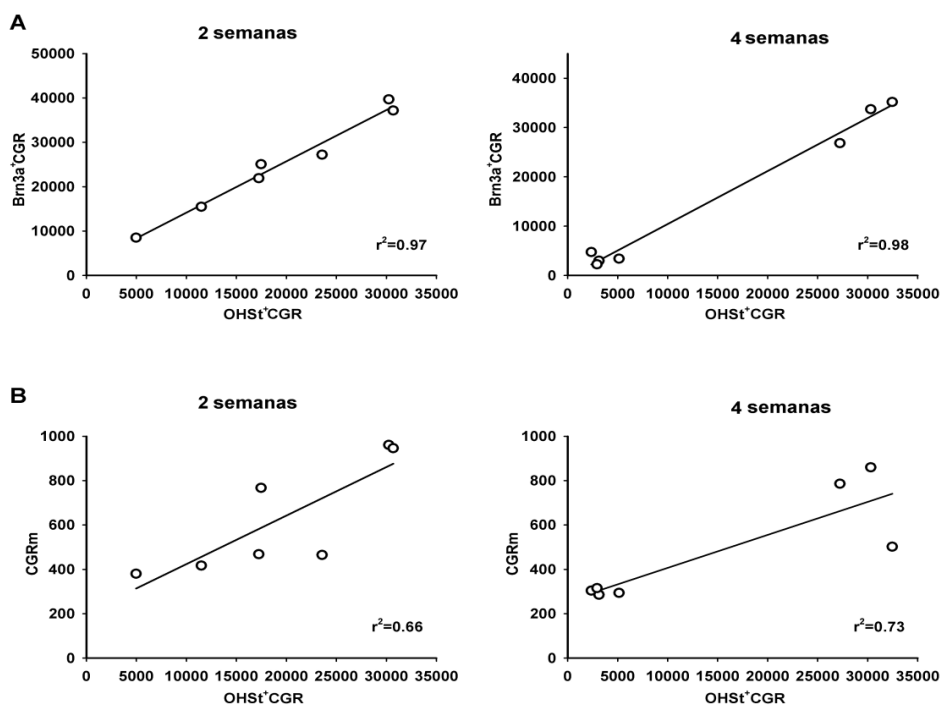


Figura 4.13. Correlación entre daño axonal y muerte de CGR. Análisis de correlación entre el número de CGR OHSt^+ y CGR Brn3a^+ (A) y CGRm (B) para cada retina analizada (círculos abiertos) a las 2 y 4 semanas después de la inducción de HTO. En la parte inferior derecha de cada gráfico se muestra el valor del coeficiente de determinación (r^2) para cada recta de regresión.

4.2.3. Efecto de la HTO sobre la capa de CGR

Para determinar si la inducción de la HTO tenía un efecto sobre otras células residentes en la capa de CGR (CCG), cuantificamos el número total de núcleos en esta capa teñían con DAPI a las 4 semanas de la FL (**Tabla 4.5** y **Figura 4.14**). A este tiempo, aproximadamente el 40% de las CGR Brn3a⁺ permanecían vivas, mientras que el número de núcleos DAPI⁺ era aproximadamente del 75%. Además, el número de núcleos DAPI⁺ que no son CGR Brn3a⁺ (diferencia entre núcleos DAPI⁺ y CGR Brn3a⁺) no es estadísticamente significativo comparando las retinas experimentales y las retinas contralaterales control (**Tabla 4.5**, fila inferior). Estos datos sugieren que a este tiempo, la HTO sólo afecta a las CGR en esta capa.

Población		Media±DE
CGR Brn3a ⁺	OD (n=8)	36.623±1.384
	OI (n=8)	14.508±9.518
Núcleos DAPI ⁺ en CCG	OD (n=8)	82.094±4.729
	OI (n=8)	61.589±9.684
Núcleos DAPI ⁺ – CGR Brn3a ⁺	OD (n=8)	45.471±5.178
	OI (n=8)	47.081±11.760

Tabla 4.5. Número total de CGR Brn3a⁺ y núcleos DAPI⁺ en la CCG a las 4 semanas tras la HTO. Media ± desviación estándar (DE) del número total de CGR Brn3a⁺ y núcleos DAPI⁺ en la CCG 4 semanas después de la inducción de HTO. La última fila muestra el número de núcleos DAPI⁺ que no son CGR (diferencia de CGR Brn3a⁺ del número total de núcleos DAPI⁺). OD: retina derecha control, OI: retina izquierda experimental. n: número de retinas analizadas.

En los mapas de isodensidad mostrados en la **Figura 4.14** se observa que la disminución de los núcleos en la CCG se produce en las áreas de pérdida de CGR Brn3a⁺ (comparar con **Figura 4.14 B'** con **B'''**, **C** con **C'** y **D** con **D'**). En las magnificaciones de retina de las señales de Brn3a y DAPI (**Figura 4.14**, paneles **E** y **E'**) se observa en detalle que el efecto en las áreas carentes de CGR Brn3a⁺ hay muchas células supervivientes; que, probablemente, corresponden principalmente a células amacrinas desplazadas en la CCG, aunque algunos de estos núcleos pueden pertenecer a astrocitos, células endoteliales y/o células microgliales.

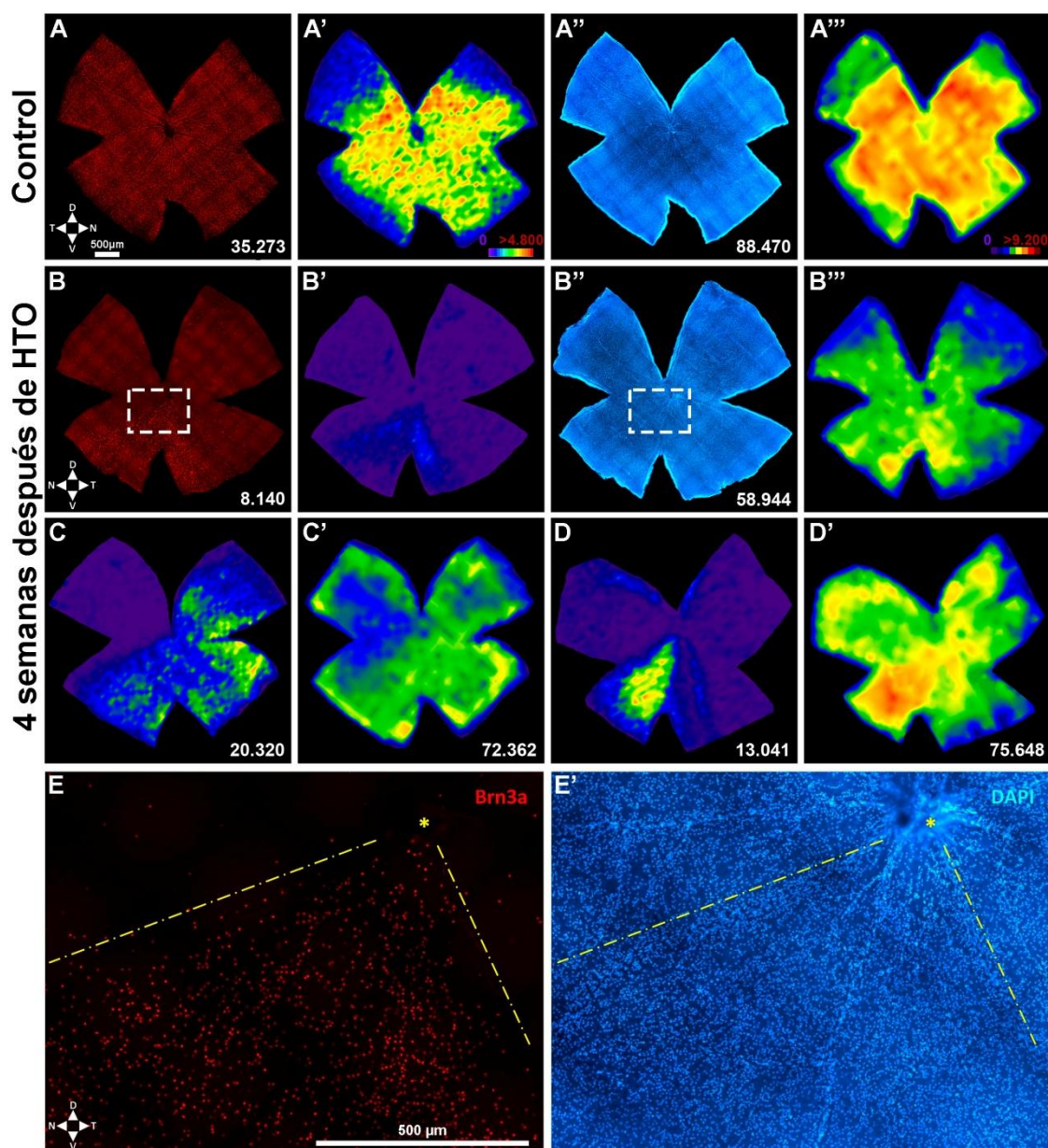


Figura 4.14. La HTO afecta de forma selectiva a las CGR en la capa de células ganglionares de retina. **A, A'', B, B''** muestran fotomontajes de retina con CGR Brn3a⁺ (**A, B**) y núcleos DAPI⁺ en la CCG (**A'', B''**) en una retina control (**A, A''**) y en una retina hipertensiva analizada a las 4 semanas tras la HTO (**B, B''**). En **A', A'''** y en **B', B'''** se muestran sus correspondientes mapas de isodensidad. En **C, C'** y **D, D'** se muestran mapas de isodensidad de CGR Brn3a⁺ (**C, D**) y núcleos DAPI⁺ (**C', D'**) de dos retinas hipertensivas analizadas a las 4 semanas tras HTO. **E-E'**: magnificaciones de los fotomontajes de **B** y **B''** donde se observa a detalle que en las zonas que carecen de CGR Brn3a⁺ (**E**) hay núcleos teñidos DAPI⁺ (**E'**). La escala de color para los mapas de isodensidad de las CGR Brn3a⁺ se muestra en **A'** (púrpura 0 CGR/mm² a rojo ≥4.800 CGR/mm²) y para los núcleos DAPI⁺ se muestra en **A'''** (púrpura 0 núcleos/mm² a rojo ≥9.200 núcleos/mm²). En la parte inferior de cada mapa se muestra el número de CGR Brn3a⁺ o núcleos DAPI⁺ contados en su respectiva retina. D: dorsal, V: ventral, N: nasal, T: temporal.

4.2.4. Estudio del transporte axonal anterógrado de las CGR y los terminales axonales de las CGR a largos tiempos post lesión

En ratones a los que se había provocado un aumento de la PIO, se inyectó intravítreamente en el ojo hipertenso el trazador neuronal CTB, que se transporta anterógradamente hasta las regiones retinotectales del cerebro. Los axones de las CGR proyectan masivamente hacia el CS contralateral (Lund, 1965; 1969; Linden y Perry, 1983). Mediante técnicas inmunohistoquímicas se detectó la presencia de CTB en los CS y se analizó y cuantificó el área y el volumen que ocupaba dicho trazador (**Figura 4.15**). Como se observa en el CS contralateral control de la **Figura 4.15 A**, el marcaje con CTB es homogéneo en todas las capas visuales y a lo largo de su eje antero-posterior (coordenadas bregma; Paxinos y cols., 2001). Los CS contralaterales de las retinas hipertensas se analizaron a los 10 días, 8 y 14 semanas después de la inducción de HTO y se examinaron las áreas carentes de marcaje con CTB (carentes por tanto de inervación de las CGR) (**Figura 4.15 A, B**). El estudio del volumen medio de CTB marcado en los CS revela que aproximadamente un 50% (55,7% a 10 días, 59,9% a 4 semanas y 46,6% a 14 semanas) de los CS contralaterales a las retinas hipertensas pierden sus aferencias retinianas. La pérdida de volumen inmunodetectado no varía de forma estadísticamente significativa entre 10 días y 14 semanas (**Figura 4.15 C**); al igual que ocurría con el número de CGR marcadas retrógradamente con OHSt en retina, que se mantiene en el mismo rango de valores entre 15 y 30 días tras la HTO. Estudiando ambos marcajes, observamos que existe una correlación entre la pérdida de transporte axonal retrógrado (pérdida de CGR OHSt⁺) cuyos porcentajes varían entre 34-50% con la pérdida de aferencias retinotópicas en el CS contralateral a la lesión, cuyos porcentajes varían entre 46-59% aproximadamente.

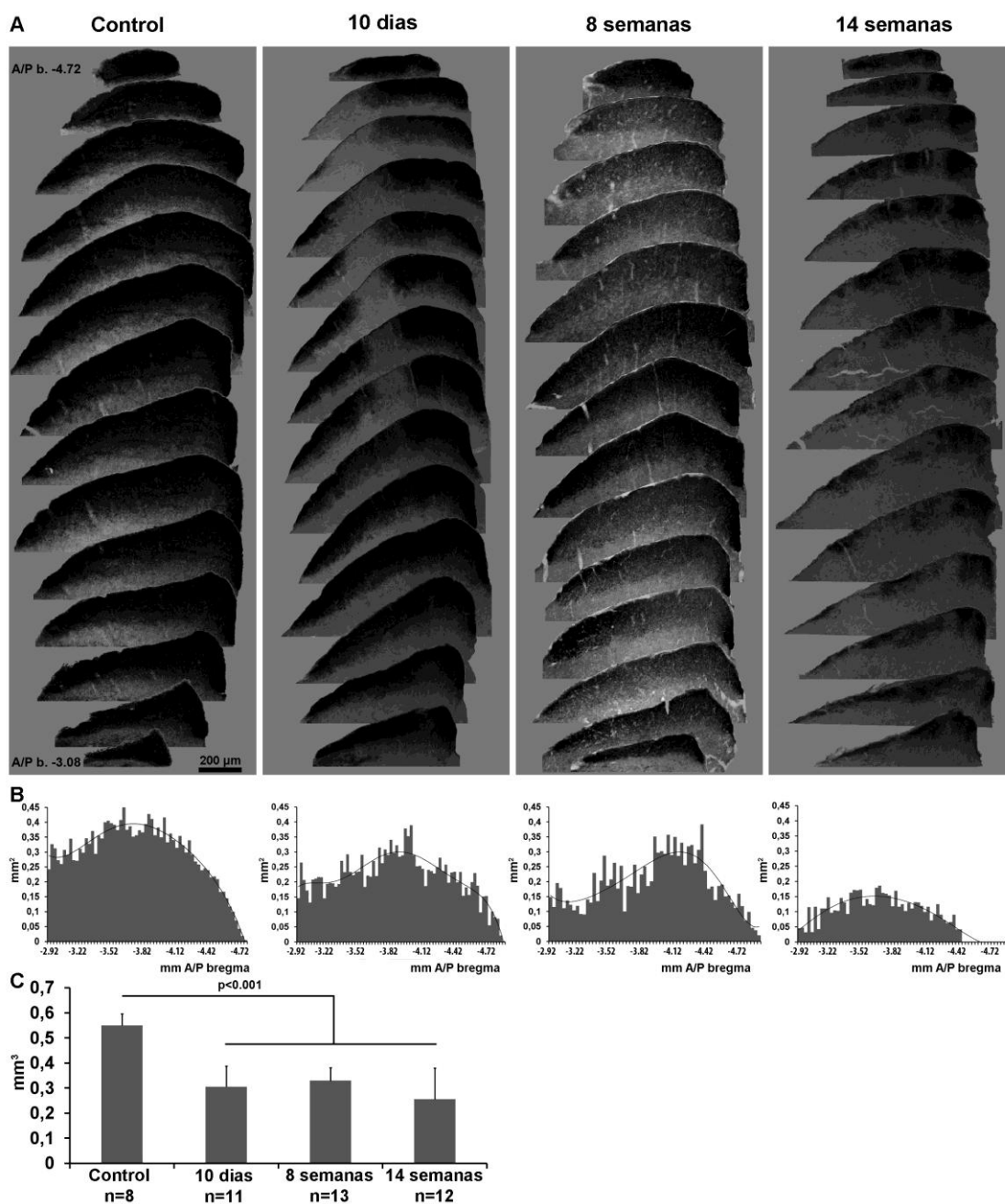


Figura 4.15. Terminales axonales trazados desde las retinas hipertensas en los CS contralaterales a la lesión. **A:** Secciones coronales de cerebro donde se observan los CS marcados con CTB trazados desde las retinas hipertensas tras 10 días, 8 y 14 semanas tras HTO. Estas secciones abarcan el colículo superior (coordenadas de bregma anterior/posterior: -3,08 a -4,72 mm) mostrando los terminales axonales de las CGR marcados anterógradamente con CTB. La columna de la izquierda es un CS control y las restantes tres columnas muestran un ejemplo representativo de un CS analizado a 10 días, 8 ó 14 semanas después de la HTO. **B:** Histogramas de las áreas ocupadas por los terminales axonales en el CS para cada punto del bregma analizado (coordenadas Bregma, en mm). Estos histogramas corresponden a los CS que se muestra en **A**. **C:** Volumen de CS ocupado por terminales axonales trazados control y a cada tiempo de estudio. Comparado con el CS control, el volumen de CS inervado por los axones retinianos disminuye significativamente después de la HTO en todos los grupos ($p < 0,001$; Mann-Whitney test). n = número de CS analizados.

4.3. ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CGR Y LAS CGRm DESPUÉS DE HTO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF EN RATA ALBINA ADULTA

4.3.1. Estudio del daño axonal provocado y la supervivencia de las CGR y las CGRm en ratas tratadas con BDNF a 12 y 15 días tras HTO

En la **Figura 4.16** se muestra la evolución de la PIO después de una sola sesión de FL de la malla trabecular, venas perilimbales y epiesclerales en ratas tratadas con el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y ratas no tratadas a las cuales se les inyectó PBS (Vehículo). Se observan picos de PIO a las 24 horas tras la FL ($38,49 \pm 11,47$ mmHg BDNF; $42,69 \pm 8,53$ mmHg Vehículo) y los valores se mantuvieron estadísticamente elevados hasta los 7 días ($30,03 \pm 9,94$ mmHg BDNF; $30,33 \pm 15,05$ mmHg Vehículo), comparados con sus valores previos ($10,40 \pm 0,65$ mmHg BDNF; $10,46 \pm 0,70$ mmHg Vehículo) y con los ojos derechos, los cuales se mantuvieron normales durante todo estudio ($p < 0,001$, Mann-Whitney test). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de PIO de los grupos tratados con BDNF y vehículo, luego podemos concluir que el tratamiento con BDNF no tiene efecto alguno en la PIO tras la inducción de HTO.

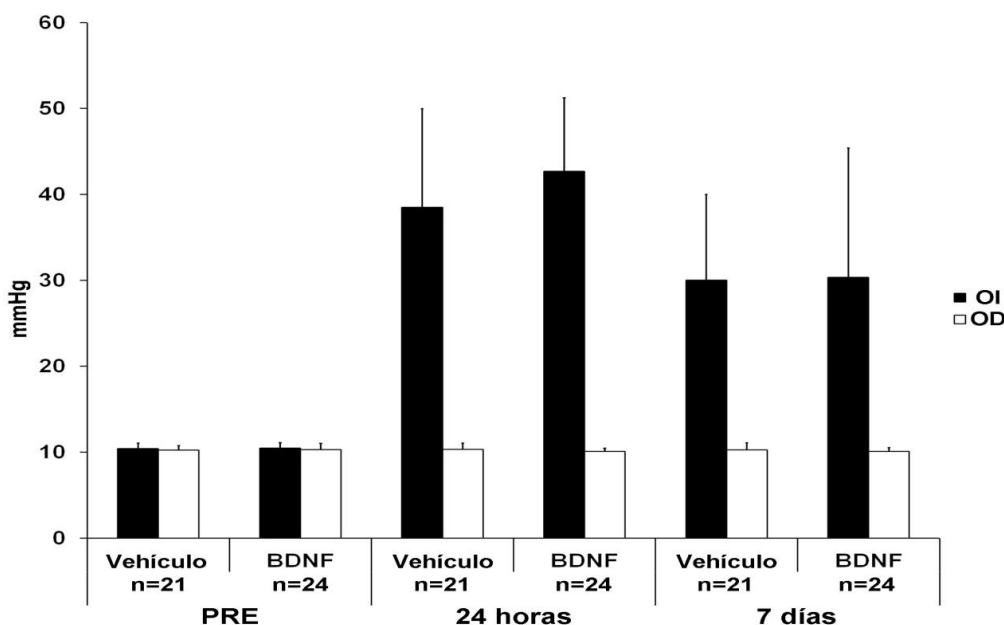


Figura 4.16. Evolución de la PIO en ratas tratadas o sin tratar tras HTO. El histograma muestra la evolución temporal de la presión intraocular en el ojo izquierdo experimental (OI) y el ojo derecho control (OD) en los grupos tratados con BDNF y vehículo antes de la fotocoagulación con láser (FL), y a las 24 horas y 7 días después de la FL. n = número de animales analizados.

En la **Figura 4.17 A-B'** se muestra una retina control de rata trazada retrógradamente con FG desde los CS e inmunodetectada con Brn3a y sus correspondientes mapas de isodensidad; como se observa, las CGR son más densas en la retina central y medial, siendo más dispersa en la periferia de la retina. Sus densidades más altas se encuentran en la región dorsal sobre el nervio óptico, siendo esta distribución de CGR muy parecida a la observada en ratón. La distribución espacial de las CGRm en una retina control de rata (**Figura 4.17 C-C'**), al igual que en ratón, es complementaria de la observada para la población general del resto de CGR y muestra una mayor densidad en el cuadrante superotemporal, tal y como se ha descrito recientemente (Galindo-Romero y cols., 2013a; Nadal-Nicolás y cols., 2014). Tanto las CGR como el subtipo CGRm son más abundantes en la retina dorsal que en la retina ventral; lo que se observa claramente al analizar los mapas de isodensidad y al estudiar con microscopía esas regiones en detalle (**Figura 4.17**).

A los 12 y 15 días después del tratamiento con BDNF o vehículo, y de la inducción de HTO en las ratas, se cuantificó el número de CGR que habían sido marcadas retrógradamente desde los CS (CGR FG⁺) y observamos un descenso significativo en su número en ambos grupos para los tiempos estudiados (**Tabla 4.6**). Esto significa que la HTO provoca un daño sobre el transporte axonal retrógrado (TAR), debido a que el número de CGR FG⁺ (es decir, aquellas que aún mantienen un TAR adecuado) es similar entre los grupos ($p > 0,05$; ANOVA test); por lo que el tratamiento con BDNF no mitiga el daño axonal desencadenado por la HTO. Comparando con las retinas derechas contralaterales, la extensión de la lesión, medida como el porcentaje de CGR FG⁺ que han perdido su TAR, es de 79% y 78% a los 12 días después de la HTO con tratamiento BDNF o vehículo, respectivamente y 77% y 84% a los 15 días después de la HTO con tratamiento BDNF o vehículo, respectivamente (**Tabla 4.6**). Estos datos apoyan el hecho de que la administración de BDNF no afecta a la PIO.

El número de CGR supervivientes tras HTO (CGR Brn3a⁺) es significativamente mayor que el número de CGR FG⁺ trazadas retrógradamente en ambos grupos y para cada tiempo de estudio (**Tabla 4.6**). Estos datos indican, de acuerdo con estudios anteriores en HTO de rata (Salinas-Navarro y cols., 2009a; Vidal-Sanz y cols., 2012), y al igual que hemos descrito anteriormente en ratón, que a tiempos tempranos tras HTO algunas CGR con su TAR dañado todavía se mantienen viables (**Tabla 4.6**; comparar CGR Brn3a⁺ con CGR FG⁺ en ambos grupos). Asimismo, se observa que en el grupo tratado con BDNF, el número de CGR Brn3a⁺ es significativamente mayor que en el grupo tratado con vehículo a 12 ($p < 0,001$; Mann-Whitney test) y a 15 ($p < 0,007$; Mann-Whitney test) días después de la inducción de HTO (**Tabla 4.6**). Además, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,045$; Mann-Whitney test) entre el número de CGR Brn3a⁺ de las retinas tratadas con BDNF y examinadas a los 12 días después de la FL comparado con el observado a los 15 días (**Tabla 4.6**). Estos datos demuestran que una sola inyección de BDNF retrasa la muerte de CGR desencadenada por la HTO.

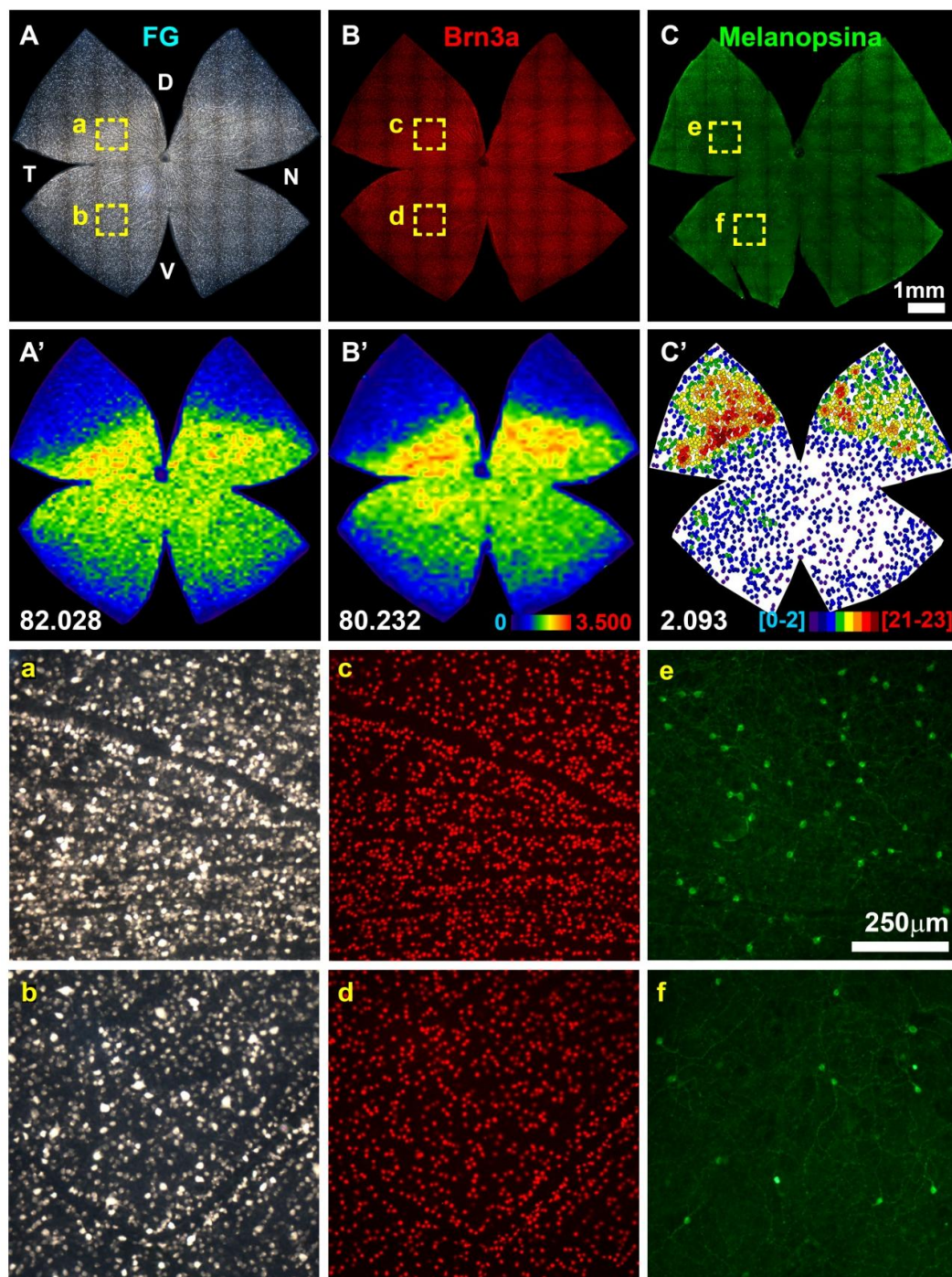


Figura 4.17. Distribución espacial de las CGR FG^+ marcadas retrógradamente desde los CS, CGR $Brn3a^+$ y CGRm en retinas control. Fotomontaje de una retina intacta trazada con FG desde los CS (A) e inmunodetectada con Brn3a (B) y sus correspondientes mapas de isodensidad (A', B'). Un fotomontaje de una retina control inmunodetectada con melanopsina nos muestra las CGR (C) y su correspondiente mapa de vecinos (C'). Magnificaciones de la zona dorsal (a, c, e) o ventral (b, d, f) de la retina para cada población de CGR estudiada. La escala de color para los mapas de isodensidad se muestra en B', de 0 (púrpura) a ≥ 3.500 (rojo) CGR/mm². La escala de color para el mapa de vecino se muestra en C', de 0-2 (púrpura) a $\geq 21-23$ (rojo) vecinos para un radio de 0,22 mm. D: dorsal, V: ventral, T: temporal, N: nasal.

	BDNF + HTO		VEHÍCULO + HTO			
	Población	Media±DE	Población	Media±DE		
12 días después de HTO	CGR FG ⁺	OD n=13	81.318±3.911	CGR FG ⁺	OD n=11	82.053±2.330
		OI n=13	17.007±13.375*		OI n=11	18.451±13.044*
	CGR Brn3a ⁺	OD n=13	81.392±2.628	CGR Brn3a ⁺	OD n=11	81.111±2.299
		OI n=13	66.624±12.027*#§		OI n=11	35.224±8.224*#
15 días después de HTO	CGR FG ⁺	OD n=11	81.881±1.766	CGR FG ⁺	OD n=10	79.618±6.182
		OI n=11	18.843±17.555*		OI n=10	12.808±10.713*
	CGR Brn3a ⁺	OD n=11	80.980±1.552	CGR Brn3a ⁺	OD n=10	79.752±5.925
		OI n=11	55.013±13.639*#§		OI n=10	33.452±19.441*#

Tabla 4.6. Número total de CGR después de HTO y tratamiento intravítreo con BDNF en rata. Media ± desviación estándar (DE) del número total de CGR FG⁺ trazadas retrógradamente y de las CGR Brn3a⁺ en retinas tratadas (BDNF) y sin tratar (vehículo) analizadas a los 12 y 15 días después de HTO. OD: retina derecha control. OI: retina izquierda experimental. n: número de retinas analizadas. *Diferencia estadísticamente significativa comparada con las retinas derechas control; # Diferencia estadísticamente significativa comparando retinas izquierdas de ojos tratados con ojos sin tratar; § Diferencia estadísticamente significativa comparando retinas izquierdas de ojos tratados a 12 días con ojos tratados a 15 días, (p<0,05 ANOVA test, Mann-Whitney test).

En la **Figura 4.18** se muestran ejemplos representativos de mapas de isodensidad que ilustran la distribución de CGR FG⁺ y CGR Brn3a⁺ en retinas hipertensas analizadas a los 12 y 15 días tras HTO. Los mapas de isodensidad de las CGR FG⁺ evidencian que se produce un daño sectorial definido, más severo en la retina dorsal (**Figura 4.18 A-J**). Mientras que los mapas de isodensidad de las CGR Brn3a⁺ muestran que en esos sectores con daño axonal (TAR comprometido) aún sobreviven CGR (**Figura 4.18 A-J**). De acuerdo con los datos cuantitativos (**Tabla 4.6**) existe una mayor supervivencia en las áreas carentes de TAR en las retinas tratadas con BDNF que con vehículo (**Figura 4.18 B-K**).

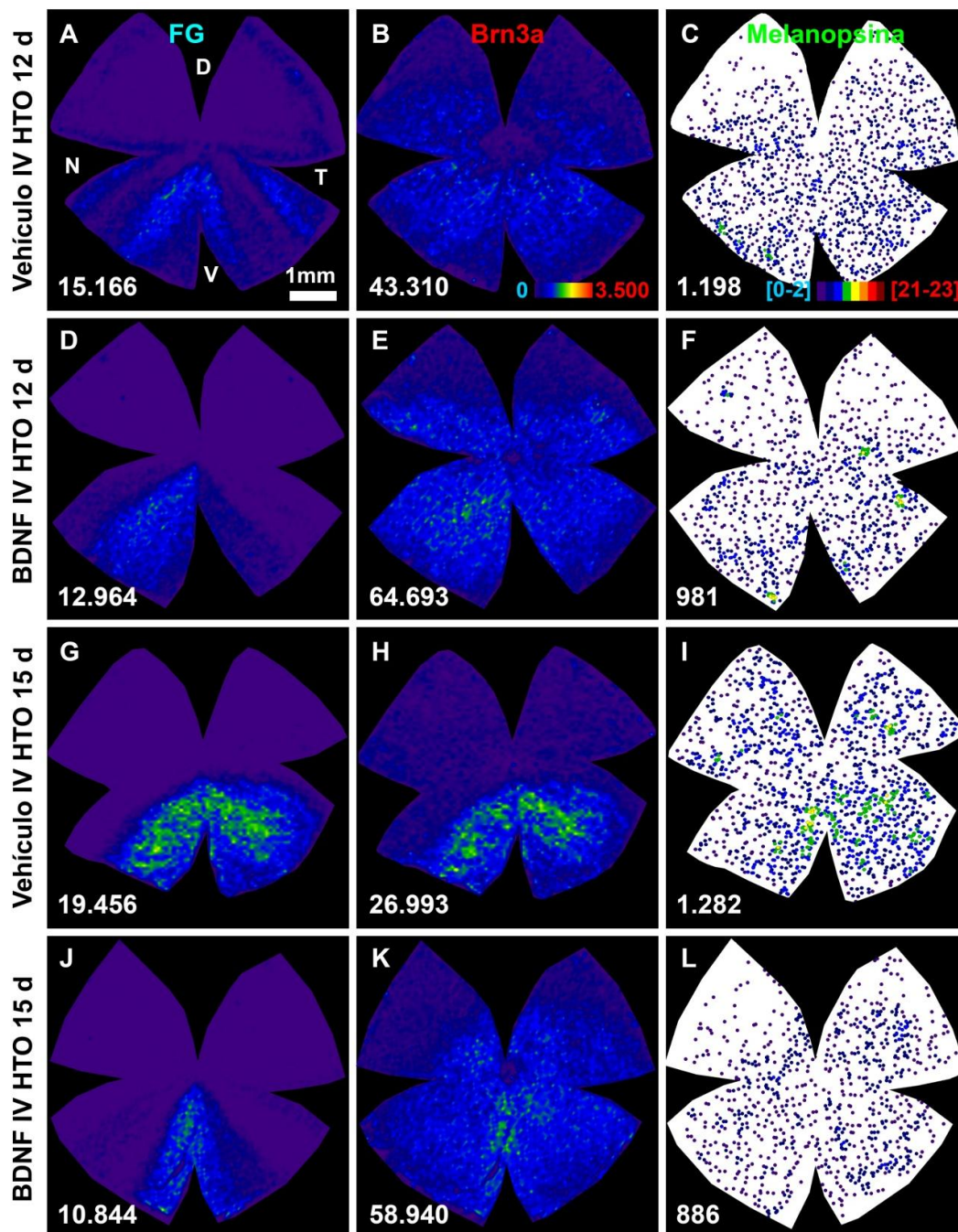


Figura 4.18. Distribución espacial de las CGR FG^+ , CGR $Brn3a^+$ y CGRm a los 12 y 15 días tras HTO, tratadas con BDNF o vehículo. Mapas de isodensidad de las CGR FG^+ que muestran un daño difuso o sectorial en todas las retinas (A-J). Correspondientes mapas de isodensidad de las CGR $Brn3a^+$ donde se observan un gran número de CGR viables en las zonas que carecen de TAR a los tiempos analizados, y que son más abundantes en las retinas tratadas con BDNF (B-K). Correspondientes mapas de vecinos que representan la distribución de las CGRm que muestran una clara pérdida de células, siendo muy parecida tanto en las retinas tratadas como sin tratar (C-L). Además, la pérdida de CGRm es difusa (no sectorial), aunque más severa en la retina dorsal. La escala de color para los mapas de isodensidad se muestra en B, de 0 (púrpura) a ≥ 3.500 (rojo) CGR/mm². La escala de color para el mapa de vecino se muestra en C, de 0-2 (púrpura) a $\geq 21-23$ (rojo) vecinos en un radio de 0,22 mm. D: dorsal, V: ventral, T: temporal, N: nasal.

4.3.2. Estudio de la distribución de la población de las CGRm en retinas de rata tratadas con BDNF a 12 y 15 tras HTO

La respuesta de las CGRm en retinas de rata tratadas con BDNF o sin tratar (Vehículo) y analizadas a los 12 y 15 días tras HTO es ligeramente diferente del resto de las CGR. Mientras que la HTO también induce una pérdida significativa de las CGRm, no pudimos encontrar diferencias entre los grupos tratados o sin tratar a 12 ó 15 días tras la HTO (Tabla 4.7). Esto indica que las CGRm no son rescatadas por la administración de BDNF. Además, la pérdida de las CGRm no es sectorial y, en todos los grupos analizados, se observó un daño difuso, más severo en el cuadrante supero-temporal (Figura 4.18 C-L), que es la zona de mayor densidad de estas células. Lo que concuerda con lo observado anteriormente en ratón.

	Retinas control n=6	BDNF + HTO		VEHÍCULO + HTO	
		12 días n=4	15 días n=4	12 días n=4	15 días n=4
CGRm	2.178±169	958±155*	1.173±208*	1.082±324*	1.108±255*
CGR Brn3a⁺	79.546±2.032	66.221±6.695	57.646±11.917	44.324±12.044	34.096±13.681

Tabla 4.7. Número total de CGRm después de HTO en rata. Media ± desviación estándar (DE) de la población total de CGRm y de sus correspondientes poblaciones de CGR Brn3a⁺ en retinas hipertensas (OI) tratadas (BDNF) y sin tratar (vehículo) a los 12 y 15 días después de HTO. *Diferencia estadísticamente significativa comparando el número de CGRm en retinas hipertensas y control.

4.3.3. Análisis de los vasos retinianos internos tras HTO

Uno de los puntos que se analizó en detalle fue el estado del plexo vascular interno de la retina tras inducir HTO. Los vasos retinianos fueron examinados con el anticuerpo RECA-1 en retinas hipertensas (tratadas con BDNF y vehículo) analizadas a los 15 días después de HTO y fueron comparados con una retina control. En la Figura 4.19 se muestran retinas representativas en las que se inmunodetectaron los vasos retinianos internos y se digitalizaron como imágenes binarias (blanco y negro) para su estudio morfométrico. Los vasos que se encuentran en las zonas con TAR viable (TAR, Figura 4.19 H, L) fueron comparados con los de las áreas sin TAR (no TAR, Figura 4.19 G, K) tanto en retinas tratadas con BDNF como vehículo. No hubo diferencias significativas las áreas con TAR o con TAR dañado, ni entre las retinas tratadas con BDNF o vehículo. Tampoco se observaron diferencias con la vascularización de retinas control (Figura 4.19 C, D).

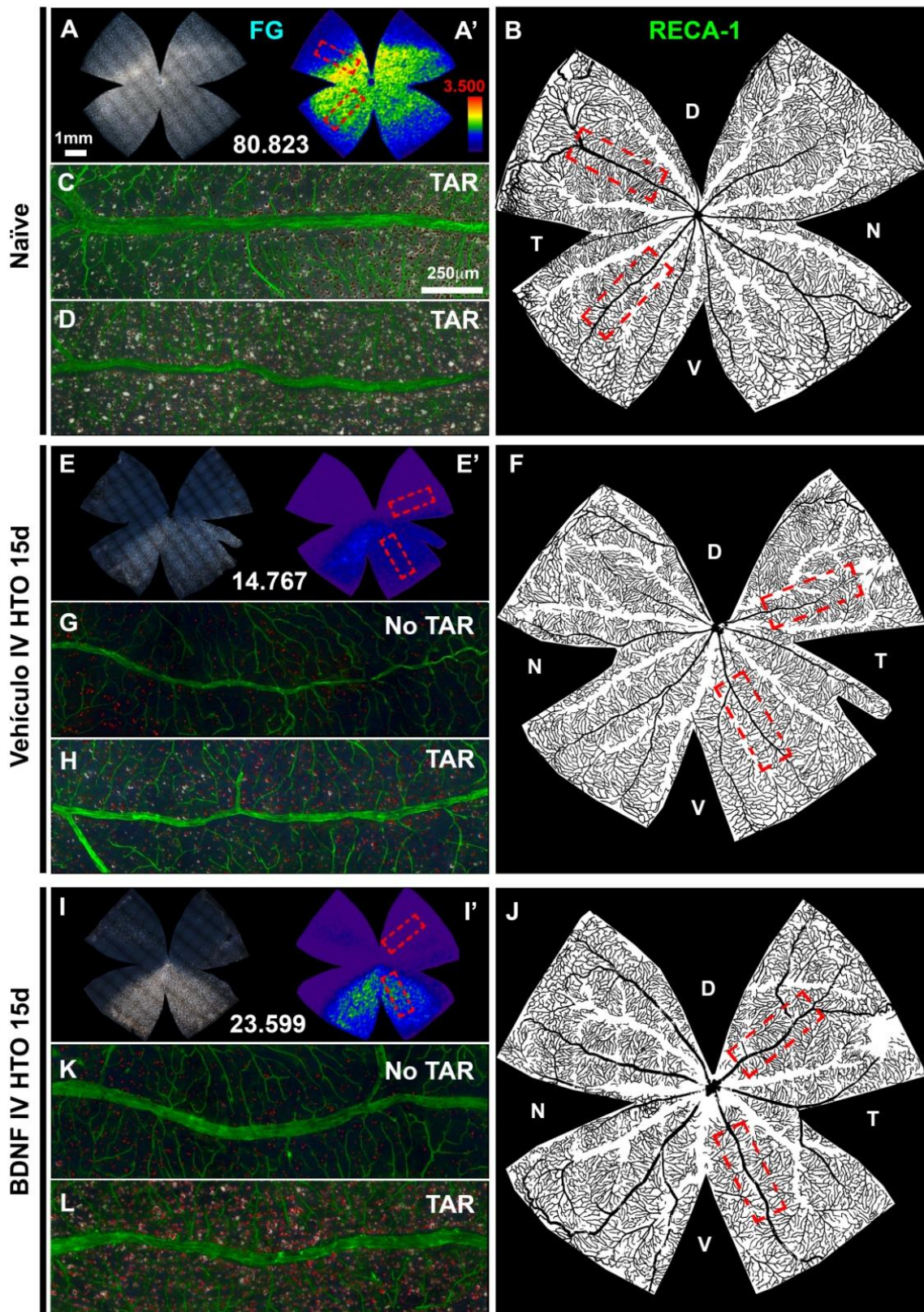


Figura 4.19. Estudio de los vasos retinianos internos en retinas hipertensas tratadas con BDNF o vehículo tras 15 días de HTO. A, A' retina intacta marcada retrógradamente con FG y su correspondiente mapa de isodensidad. En **B** se muestran sus vasos retinianos RECA-1⁺ representados en un esquema en blanco y negro. **C, D** Magnificaciones de la retina tomadas del cuadrante superotemporal (**C**) y del inferotemporal (**D**) mostrando CGR FG⁺ (blanco), CGR Brn3a⁺ (rojo) y vasos RECA-1⁺ (verde). En la retina intacta, el transporte axonal retrógrado (TAR) de las CGR es viable y los vasos retinianos irrigan adecuadamente todas las áreas de retina. En las retinas hipertensas tratados con vehículo (**E-F**) o BDNF (**I-J**) y analizadas a los 15 días después de LP, se observa una pérdida sectorial del transporte axonal en la retina dorsal (**E-E', I-I'**). En las representaciones en blanco y negro (**F, J**), los vasos retinianos aparecen normales y morfológicamente similares a los de la retina control. Esto se observa claramente en las magnificaciones de áreas sin TAR (**G, K**) y con TAR (**H, L**). D: dorsal, V: ventral, T: temporal, N: nasal.

Este hecho se confirma con el estudio de las mediciones de densidad de los vasos sanguíneos donde no se encontraron diferencias significativas ($p=0,653$; Kruskal-Wallis test) entre el número de vasos por mm (v/mm) en las retinas intactas ($11,06\pm 0,45$ v/mm, $n=6$) en comparación con las retinas tratadas con BDNF ($11,30\pm 0,68$ v/mm; $n=2$) y retinas tratadas con vehículo ($10,91\pm 0,55$ v/mm; $n=2$). Por esto, se puede concluir que la HTO en rata no altera la morfología ni el número de los vasos retinianos internos, al menos, a los tiempos estudiados.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En esta tesis se ha estudiado la población y distribución de las células ganglionares de la retina melanopsínicas (CGRm) en retinas de ratón pigmentado y albino tanto en la capa de CGR como en la CNI. También se ha detallado la existencia de un subtipo de CGRm que no envía su axón a través de NO, se localizan principalmente en la ZMC y pueden estar involucradas en la respuesta refleja intrínseca de la pupila y/o del cuerpo ciliar. Además, se ha estudiado cómo responden estas CGRm en comparación al resto de CGR ante una inducción de HTO en ratones pigmentados. Se observó una muerte tanto a 2 como a 4 semanas tras FL, muy parecida porcentualmente a la observada en CGR no melanopsínicas. Un hecho llamativo fue que la distribución de las CGRm supervivientes no era sectorial, sino que se producía de una forma dispersa a lo largo de la retina y en áreas donde no había CGR, aún sobrevivían algunas CGRm. Por último, estudiamos la neuroprotección de esta subpoblación celular mediante la administración intravítrea del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en ratas con HTO inducida experimentalmente. En retinas analizadas a los 12 ó 15 días tras FL, se observó un claro daño axonal y una muerte significativa de CGR. Aunque en los animales tratados con el factor neurotrófico, se observó que no tenía efecto ni en la evolución de la PIO ni en el daño axonal, sí se observó una ralentización en la muerte celular de las CGR no melanopsínicas. No se observaron diferencias significativas en la población de CGRm entre los animales tratados con BDNF o con vehículo; por lo que la administración del factor neurotrófico no tiene ningún efecto significativo sobre esta subpoblación pero la distribución de las CGRm difiere a la observada en el resto de CGR no melanopsínicas, al igual que sucede en ratón. En los siguientes apartados discutiremos y contrastaremos los resultados obtenidos con los datos observados y descritos por otros autores en estudios previos sobre la temática de la que es objeto esta tesis doctoral, con la finalidad de alcanzar los objetivos propuestos y obtener datos que apoyen las hipótesis formuladas.

5.1. **CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CGR MELANOPSÍNICAS DEL RATÓN PIGMENTADO Y ALBINO ADULTO**

En esta tesis hemos caracterizado la distribución espacial de las CGR que expresan melanopsina en dos cepas de ratón: el ratón pigmentado C57BL/6 y el ratón albino Swiss. Además de observar diferencias en la distribución de las CGRm entre estas dos cepas, también hemos descrito que más del 97% de las CGRm se marcan retrógradamente desde los CS con el trazador neuronal OHSt. Un dato sorprendente es la existencia de CGR que expresan melanopsina en la retina de ratón que no mandan su axón a través del NO, ya que cuando se marca con el mismo trazador neuronal a nivel del NO, no se marcan retrógradamente. Por lo tanto, hemos sugerido que estas células no son CGRm propiamente dichas, si no que pueden constituir un nuevo tipo de interneurona que contiene melanopsina y que, por tanto, podrían ser intrínsecamente fotosensibles.

5.1.1. Población total de las CGRm y su distribución en retina

Hasta la fecha, sólo otros dos estudios han documentado el número total de CGRm en la retina de ratón, utilizando la cepa pigmentada C57BL/6 (Jain y cols., 2012; Hughes y cols., 2013). En nuestro estudio, observamos una población de 1.021 ± 109 CGRm ($n=19$) en las retinas de los ratones pigmentados, un valor promedio muy similar al que cuantificaron Jain y colaboradores (2012) (1.194 ± 281 CGRm, $n=9$), pero menor que las 1.600-1.800 CGRm registradas por Hughes y colaboradores (2013). Aunque en los tres estudios se usa el mismo anticuerpo policlonal de conejo frente al extremo N-terminal de melanopsina de ratón (clon UF006), la diferencia en el número de CGRm cuantificadas se puede deber a la mayor concentración de anticuerpo que utilizaron Hughes y colaboradores (2013) en relación con el estudio de Jain y colaboradores (2012) y el nuestro (Valiente-Soriano y cols., 2014). Otros trabajos más antiguos que los anteriormente citados, estimaron el número total de CGRm en estos mismos ratones pigmentados, y su extrapolación al área total de retina les daban unos valores que oscilaban de aproximadamente 1.500 (Brown y cols., 2010) a 2.570 (Berson y cols., 2010) células por retina. Estos datos pueden llevar a error; ya que, según lo estipulado por Berson y colaboradores (2010), la estimación del número total de CGRm se basaban en la suposición de que estas células se distribuyen de forma homogénea por toda la retina; sin embargo, tal y como hemos documentado en esta tesis, esto no ocurre así, sino que esta población celular de la retina de mamífero presenta una distribución heterogénea, con regiones donde existe una mayor densidad celular de este tipo, como el cuadrante superotemporal.

Estudios previos de nuestro laboratorio (Nadal-Nicolás y cols., 2012, 2014; Galindo-Romero y cols., 2013a) demostraron que en ratas, el factor de transcripción Brn3a se expresa en un porcentaje muy pequeño de CGRm (0,20% CGRm Brn3a⁺). Junto con otras observaciones en ratones (Jain y cols., 2012), este análisis confirma, que al igual que sucede en las ratas, las CGRm son una subpoblación de CGR, diferente de las CGR Brn3a⁺, que tienen un papel en las funciones formadoras de imágenes. En cuanto a la distribución espacial de las CGRm en la capa de CGR, hemos demostrado que la distribución de estas células es más periférica en ambas cepas de ratones, pigmentada y albina, localizándose en regiones con una baja densidad de CGR Brn3a⁺. Por otro lado, el análisis comparativo de la distribución de las CGRm entre los ratones pigmentados y los albinos revela diferencias remarcables. La mayoría de las CGRm en ratones pigmentados se sitúan en la hemirretina temporal y dorsal, formando una especie de “C” de mayor densidad en la retina; mientras que en los ratones albinos, las CGRm se concentran sobre todo en la región dorsal de retina.

Hasta la fecha, solamente otro estudio ha examinado la distribución espacial de las CGRm en ratones utilizando la cepa C57BL/6 (Hughes y cols., 2013). Aunque en esta tesis hemos utilizado la misma cepa de ratón, los resultados difieren de los de Hughes y colaboradores (2013) ya que ilustran una mayor densidad de CGRm en la parte dorsal de retina, y no en temporal. Sin embargo, una posible explicación de la discrepancia en los resultados se basaría en los métodos

utilizados para orientar las retinas de los ratones. En nuestros estudios orientamos la retina al disecarla, utilizando como guías la inserción del músculo recto superior en la parte superior del ojo y la carúncula nasal, y realizamos un corte más profundo en la retina el cual nos marca el polo superior del ojo (Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b); mientras que Hughes y colaboradores (2013) no emplean cortes para mantener la orientación de la retina, sino que se guían únicamente por la distribución de la opsina S, la cual es más densa en la retina ventral. Esta puede ser una explicación a la discordancia en la distribución de este tipo celular que encontramos cuando comparamos los mapas de distribución de ambos trabajos.

Según nuestros datos, los ratones albinos tienen significativamente más CGR que los ratones pigmentados (45.884 ± 2.707 CGR Brn3a⁺ en albino vs 38.501 ± 1.630 CGR Brn3a⁺ en pigmentado), esto concuerda con estudios previos (Williams y cols., 1996; Salinas-Navarro y cols., 2009a). Además, con respecto a las CGRm, detectamos diferencias significativas en la distribución y en el tamaño del soma de las CGRm entre las dos cepas estudiadas. Este es el primer estudio que analiza la distribución espacial de las CGRm en ratones albinos, nuestros datos muestran un patrón de distribución de CGRm similar al observado en ratas albinas. Sin embargo, en ratas albinas las CGRm tienden a concentrarse más en la retina supero-temporal, como observamos en nuestros resultados (ver **Figura 4.17**) o en otros estudios relacionados (Hattar y cols., 2002; Esquivá y cols., 2013; Galindo-Romero y cols., 2013a; Nadal-Nicolás y cols., 2014). Estas diferencias entre la cepa pigmentada y albina son consistentes, y tienen que ver con el papel de la pigmentación a nivel ocular en el correcto desarrollo de la estructura del ojo y su funcionalidad en roedores (Lund, 1965; Balkema y Dräger, 1990; Donatien y Jeffery, 2002). Estudios previos muestran diferencias entre la regulación circadiana de la expresión de melanopsina en ratas pigmentadas y albinas (Hannibal y cols., 2005, 2013), por lo que habría que tener precaución al interpretar los datos de animales albinos; ya que, como muestran nuestros datos, el número total es muy parecido entre las cepas pigmentada y albina, pero la funcionalidad puede estar alterada.

5.1.2. CGRm desplazadas

En esta tesis hemos caracterizado la población y distribución de las CGRm que residen en la capa nuclear interna, llamadas CGRm desplazadas (CGRm-d). Como ya se conoce por estudios previos, aparte de las CGRm de la capa de CGR, los ratones, ratas y primates también contienen una población de CGRm-d en la capa nuclear interna (Karnas y cols., 2013; Nadal-Nicolás y cols., 2014). En los ratones, aunque se conoce que estas CGRm-d muestran niveles variables de inmunorreactividad para melanopsina y Brn3b (Jain y cols., 2012; Karnas y cols., 2013), su distribución espacial no era conocida. En esta tesis mostramos que las CGRm-d en ambas cepas de ratón estudiados eran más densas en la región superior de la retina y en la zona más periférica de retina, la zona marginal ciliar. Mientras que estudios anteriores estimaban un porcentaje de CGRm-d en ratones C57BL/6 que variaba aproximadamente entre un 6 y un 9% del total de

CGRm (Berson y cols., 2010; Jain y cols., 2012; Karnas y cols., 2013), nuestros datos revelan un porcentaje mayor (14%) incluyendo la retina entera. Una posible razón de que nuestra cuantificación sea mayor puede deberse a que incluimos la ZMC, ya que muchas CGRm-d residían en esta zona. En los ratones albinos, el porcentaje de estas CGRm-d era menor (sólo un 5%), un dato que puede explicar el hecho de que existen más CGR-d en ratones pigmentados que en albinos (Drager y Olsen, 1980; Balkema y Drager, 1990) y con un estudio reciente que compara los números de las CGRm-d de ratas albinas y pigmentadas (Nadal-Nicolás y cols., 2014). Aunque actualmente la función de las CGRm-d es desconocida, en la retina de primate y humano estas células son muy comunes, y componen el 40-60% de la población de CGRm, dependiendo de la especie estudiada (Dacey y cols., 2005; Jusuf y cols., 2007).

5.1.3. Proyecciones de las CGRm

Nuestros experimentos revelan que más del 97% de las CGRm se marcan retrógradamente desde los CS (Valiente-Soriano y cols., 2014). Sin embargo, para valorar este dato, hay que tener en cuenta que en nuestro modelo de marcaje retrógrado aplicamos el trazador neuronal OHSt en la superficie de los CS y puede que también estemos trazando desde otros núcleos vecinos. De hecho, en experimentos paralelos (datos no mostrados), donde estudiamos secciones de cerebro en los cuales se había aplicado OHSt en los CS, observamos que este trazador había difundido en parte a regiones adyacentes que también son retinorecipientes, como el núcleo geniculado lateral (dorsal y ventral), la lámina intergeniculada, el núcleo de la oliva pretectal y el tracto óptico. Por lo tanto, con esta técnica no podemos descartar la posibilidad de que haya distintas subpoblaciones de CGRm que proyecten a los CS y a otros núcleos vecinos. Sin embargo, en nuestro experimento paralelo de secciones del cerebro, no encontramos evidencia de que el OHSt difundiera al NSQ, por lo que descartamos la posibilidad de que se marcaran retrógradamente las CGRm que proyectaran a este núcleo.

Cada vez hay más estudios que sugieren el hecho de que muchas CGRm proyecten a CS en ratón. En primer lugar, este dato no debería resultar extraño, ya que la mayoría de las CGR proyectan a esta región en roedores (Linden y Perry, 1983; Hofbauer y Drager, 1985; Salinas-Navarro y cols., 2009a, 2009b; Nadal-Nicolás y cols., 2015). Además, estudios anatómicos realizados en ratones en los cuales se marcaban las CGRm tipo M1 (Hattar y cols., 2006) o todos los subtipos de CGRm (Brown y cols., 2010; Ecker y cols., 2010) demostraban una proyección substancial de axones de las CGRm a las capas superficiales de los CS. En ratones modificados genéticamente *Opn4^{-/-} tau-lacZ* se ha documentado que hay una mayor aferencia de las CGRm a los CS, y esto se ha tomado como evidencia de que las células M1 proyectan significativamente a esta estructura (Schmidt y cols., 2011); sin embargo, cabe destacar que las observaciones en ratones *Opn4^{-/-}* pueden reflejar un déficit axonal de las CGRm M1 que proyectan a los CS por la ausencia de melanopsina.

Curiosamente, en otro estudio donde también investigaron las proyecciones de las CGRm tipo M1 y M2 trazadas retrógradamente en ratones *Opn4^{+/+}* (Baver y cols., 2008), se observó que el 100% de las CGRm que proyectan a los CS eran del subtipo M1. Este mismo estudio documentó que el 80% de las células M1 proyectan al NSQ, y que aproximadamente el 45% de las proyecciones que llegaban al NOP también eran de las CGRm subtipo M1. Otro dato interesante observado por Chen y colaboradores (2011) es que en ratones modificados genéticamente donde se había eliminado *Brn3b*, las proyecciones de las CGRm subtipo M1 al NSQ se mantenían, al igual que se mantenía el ritmo circadiano (regulado por este núcleo retinorrecipiente). Dado que en nuestros estudios de marcaje retrógrado asumimos que marcamos la mayoría de las CGRm subtipo M1, entendemos que los núcleos NSQ y NOP pueden ser inervados por axones colaterales de las CGRm. Esta posibilidad también ha sido sugerida previamente al explicar la inervación postnatal del NSQ por las CGRm (McNeill y cols., 2011). Sin embargo, estudios de marcaje anterógrado en ratas (Gooley y cols., 2003) y marcaje retrógrado en hámsteres (Morin y cols., 2003) sugieren que los CS pueden tener una inervación menor de las CGRm en estas especies.

La importancia de las aferencias a los CS por parte de las CGRm permanece en la actualidad desconocida. Es sabido que las proyecciones retino-coliculares se organizan topográficamente de forma perfecta para ofrecer un mapa espacial del mundo visual (Siminoff y cols., 1966). Los CS están perfectamente posicionados para enviar la información visual a los centros del tronco encefálico e intervienen en la motilidad ocular y en los cambios motores de seguimiento y re-fijación visual (Comoli y cols., 2003; May, 2006). Por todo ello, esta estructura parece ser un candidato ideal para mediar en el comportamiento de orientación dependiente de la melanopsina en ratones (Johnson y cols., 2010; Semo y cols., 2010) o tal vez incluso para fijar la atención visual de mirada hacia un punto luminoso, siendo capaces de discriminar brillo (Brown y cols., 2012). De esta forma, los CS pueden ayudar a orientar a los animales por medio de objetos brillantes o alejarlos de objetos con excesivos niveles de iluminación (como por ejemplo, la luz directa del sol). De este modo, en los seres humanos, la entrada de señal de las CGRm a los CS puede contribuir a la conciencia visual en pacientes con degeneración de fotorreceptores (Zaidi y cols., 2007) y también podría contribuir a los movimientos subconscientes de los ojos (evitar o mirada entrecerrada) que se producen en respuesta a la luz solar directa (Sliney, 1997) o a la fotofobia (Stringham y cols., 2003). Apoyando esta hipótesis, un estudio reciente demuestra un significativo aporte de aferencias de las CGRm a los CS en primates (Hannibal y cols., 2014).

5.1.4. Zona marginal ciliar de retina

Estudios recientes sugieren que las células melanopsínicas de la retina residentes en la ZMC envían proyecciones axonales al cuerpo ciliar y/o al iris para activar el reflejo pupilar intrínseco (iPLR) (Schmidt y cols., 2014a; Semo y cols., 2014). Teniendo en cuenta estos

resultados previos, queríamos confirmar si todas las CGRm proyectan su axón fuera del ojo a través del nervio óptico hacia sus territorios retinorrecipientes, y para ello aplicamos el trazador OHSt en el muñón proximal del nervio óptico tras una axotomía intraorbitaria (Salinas-Navarro y cols., 2009a). Al igual que lo observado previamente en ratones pigmentados (C3H/He) por Semo y colaboradores (2014), encontramos una subpoblación de CGRm residentes en la ZMC, más abundante en la hemirretina nasal que en la temporal, tanto en ratones pigmentados (C57BL/6) como en ratones albinos (Swiss). En el análisis que excluía la ZMC de retina, este procedimiento marcaba el 99,7% de todas las CGRm en la capa de CGR en los ratones pigmentados y el 98,9% de las CGRm en la capa de CGR en los ratones albinos. En el mismo procedimiento, pero analizando las CGRm desplazadas (CGRm-d) observamos que aproximadamente el 90,5% y el 91,3% de las CGRm-d estaban marcadas en ratones pigmentados y albinos, respectivamente. Sin embargo, cuando analizamos la ZMC de retina aisladamente, el número de CGRm marcadas retrógradamente descendió aproximadamente al 80% para los ratones pigmentados y al 76% en los albinos. No existen estudios previos en mamíferos donde se muestren subpoblaciones de CGR que no envíen su axón a través del nervio óptico o no se marquen al ser trazadas retrógradamente desde el NO como hemos observado (Valiente-Soriano y cols., 2014). Como tal, este hallazgo representa la primera evidencia directa en mamífero adulto de una subpoblación de CGRm que podrían no ser realmente CGR; en vertebrados inferiores, peces y anfibios, se ha descrito una subpoblación de células horizontales que expresan melanopsina (Provencio y cols., 1998; Bellingham y cols., 2002). Por tanto, este subtipo de CGRm OHSt⁻ que se presentan en esta tesis podría constituir algún tipo de interneurona de la retina de naturaleza intrínsecamente fotosensible.

En la ZMC, puede que las CGRm OHSt⁻ manden su axón al cuerpo ciliar y/o al iris y así intervenir en el iPLR, como previamente sugirieron Semo y colaboradores (2014). En otras regiones de la retina también puede haber una subpoblación de CGRm OHSt⁻ localizadas en la CNI, es decir, desplazadas, que podrían estar involucradas en circuitos de señalización internos de la retina como se ha demostrado previamente (Zhang y cols., 2008). En nuestros estudios de marcaje retrógrado desde el muñón del nervio óptico, no fuimos capaces de identificar ningún axón obvio de las células CGRm-d OHSt⁻; otros estudios han tenido problemas similares tratando de identificar los procesos melanopsina positivos derivados de las CGRm-d en ratones (Karnas y cols., 2013) y sus axones no siempre se podían identificar en ratones *Opn4^{+/-} tau-lacZ* (Hattar y cols., 2006). Curiosamente, Jusuf y colaboradores (2007) también observaron un aumento en la densidad de las CGRm en la periferia nasal de la retina de monos macaco y tití (Jusuf y cols., 2007), un área que puede corresponder a la población de CGRm residentes en la ZMC observada en ratones (Semo y cols., 2014; Valiente-Soriano y cols., 2014).

Las CGRm residentes en la ZMC de retina en ratón son en gran parte *Brn3b* negativas (Semo y cols., 2014) y como tales, se esperaría que proyectaran al NSQ (Chen y cols., 2011). Sin embargo, al comparar las retinas marcadas retrógradamente desde CS o nervio óptico, parece improbable que alguna de ellas proyecte al NSQ, porque no observamos ninguna diferencia significativa entre el número de CGRm trazadas o no trazadas en los ratones marcados

retrógradamente desde los CS o NO. Por tanto, consideramos dos opciones de proyección de los axones de estas CGRm residentes en la ZMC de la retina de los ratones, o proyectan al mesencéfalo dorsal (CS o NOP) o su axón no proyecta a través del NO. Curiosamente, el estudio del trazado retrógrado también muestra que las CGR-d no proyectan al NSQ en ratones (Balkema y Drager, 1990); así puede ser que las CGRm tipo M1 tampoco proyecten al NSQ y, tal vez, en cambio puedan estar involucradas en otras funciones, como la respuesta pupilar a la luz.

5.2. ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CGR Y LAS CGRm DESPUÉS DE HTO EN RATÓN PIGMENTADO

Los roedores, y en especial los ratones, han sido utilizados en muchos modelos experimentales de enfermedades humanas por su fácil manejo y relativo bajo coste, en comparación con otros animales, y también, por la posibilidad de utilizar animales transgénicos (Vidal-Sanz y cols., 2002, 2012). Además, el sistema visual del ratón tiene una serie de ventajas y semejanzas estructurales con el ojo humano como una malla trabecular bien definida, el canal de Schlemm, el cuerpo ciliar o la vascularización de la retina (John y cols., 1999) que lo hacen idóneo a la hora de recrear cualquier modelo experimental o de emprender una terapia neuroprotectora (véase apartado 1.2 de introducción). Una de las principales dificultades en el uso de ratones como modelo, es el pequeño tamaño de los ojos y la dificultad de manipulación, como por ejemplo a la hora de medir la presión intraocular (Salinas-Navarro y cols., 2009a; Vidal-Sanz y cols., 2012). A la hora de recrear un modelo animal de glaucoma, debemos prestar especial atención a la hipertensión ocular, ya que es el principal factor de riesgo de la enfermedad. Con el desarrollo de modelos experimentales de ratón con PIO elevada intentamos avanzar en nuestro conocimiento de la neuropatía óptica glaucomatosa en humanos y así mejorar nuestra comprensión de la enfermedad e intentar tratarla y/o prevenirla.

El desarrollo de un método de medida de la PIO, mediante tonometría no invasiva, en animales de experimentación ha abierto la posibilidad de desarrollar y caracterizar un modelo de ratón con HTO. Aunque la medición de la PIO requiere el uso de anestesia general se ha documentado que periodos cortos de anestesia no tienen efectos sobre la PIO de los ratones (Sarinova y cols., 2001).

5.2.1. Degeneración de las CGR tras HTO

El método de fotocoagulación por láser a nivel del limbo (vasos perilimbales y episclerales), fue inicialmente empleado inyectando tinta china en la cámara anterior, dando tiempo a la tinta a entrar en las estructuras del ángulo, para luego fotocoagular los vasos con el láser (Ueda y cols., 1998); aparentemente, la tinta china mejoraba la absorción de la energía del

láser. Histológicamente, hallaron partículas de tinta china fagocitadas en cámara anterior, además de observarse el cierre del ángulo de la cámara, responsable del aumento de PIO. Otros estudios han logrado un aumento significativo de la PIO usando un tratamiento láser similar, sin la inyección de ningún material externo (WoldeMussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002; Salinas-Navarro y cols., 2009c, 2010; Vidal-Sanz y cols., 2012). Todas estas descripciones histológicas sugieren que los efectos del tratamiento láser provocan la coagulación de la vascularización limbar y producen un cierre del ángulo (Ueda y cols., 1998; Levkovitch-Verbin y cols., 2002). Ambos efectos pueden incrementar la resistencia del flujo de salida del humor acuoso y desembocar en la subida de PIO.

Estudios previos en modelos de glaucoma secundario a la elevada PIO inducida han demostrado una pérdida significativa de CGR (30-90%) dependiendo del método de inducción de HTO empleado, el tiempo analizado tras la inducción de HTO y el modelo animal experimental utilizado, ratas albinas adultas (Sawada y Neufeld, 1999; WoldeMussie y cols., 2001; Salinas-Navarro y cols., 2010; Ortín-Martínez y cols., 2015) o ratones pigmentados (Jakobs y cols., 2005) o albinos (Salinas-Navarro y cols., 2009c; Cuenca y cols., 2010; Gallego y cols., 2012; de Hoz y cols., 2013; Rojas y cols., 2014). Comparando estos estudios y los datos que presentamos en esta tesis, cabe resaltar que la pérdida de CGR en los modelos de HTO inducida por láser es más severa en ratones albinos que en ratones pigmentados. De hecho, Mabuchi y colaboradores (2003) observaron en su modelo de HTO inducido por láser en ratones pigmentados una reducción en el número de axones de las CGR a las 12 semanas de aproximadamente un 30% de la población original, resultados similares fueron observados por otros autores (Grozdanic y cols., 2003; Gross y cols., 2003; Ji y cols., 2005; Holcombe y cols., 2008); aunque Yun y colaboradores (2014) observaron una pérdida mayor, aproximadamente el 60% de la población de CGR a las 24 semanas de la inducción de HTO. Sin embargo, la pérdida de CGR Brn3b⁺ y de axones de las CGR en ratones albinos (Fu y Sretavan, 2010) a las 4 semanas fueron de aproximadamente del 90% y 78%, respectivamente. Estudios propios realizados en nuestro laboratorio también apoyan estos resultados; estudios de HTO realizados en ratones pigmentados muestran una pérdida de CGR de aproximadamente el 50%, que es menor que la observada en ratones albinos, la cual llega hasta aproximadamente el 80% (Salinas-Navarro y cols., 2009c; Cuenca y cols., 2010; Gallego y cols., 2012; de Hoz y cols., 2013; Rojas y cols., 2014). No sabemos ciertamente a qué se debe que la pérdida sea menor en ratones pigmentados, ya que la evolución de la PIO tras la HTO inducida por láser es similar en ambas cepas.

Existen datos y evidencias remarcables que indican que en el glaucoma, tanto experimental como humano, se producen importantes cambios en los principales núcleos retinorreceptores del cerebro (Yücel y cols., 2000, 2001, 2003). Por tanto, es importante investigar los efectos de la hipertensión ocular en el principal núcleo retinorreceptivo, los colículos superiores, a tiempos cortos y largos después de la fotocoagulación láser. En ratas albinas adultas, se ha descrito una reducción en la densidad de fibras retinianas en diferentes estructuras retinorreceptores, aproximadamente un 50% en el núcleo geniculado lateral ventral, un 72% en el

NSQ y un 50% en los CS (Drouyer y cols., 2008). En nuestro estudio, hemos utilizado el trazador neuronal anterógrado (CTB), que ha sido bien caracterizado en nuestro laboratorio en roedores (Aviles-Trigueros y cols., 2003; Mayor-Torroglosa y cols., 2005; Valiente Soriano y cols., 2015a), demostrando una gran sensibilidad en el marcaje del árbol dendrítico de los terminales axonales en el colículo superior, lo que permite determinar el volumen de la inervación retinotectal (Mayor-Torroglosa y cols., 2005; Valiente-Soriano y cols., 2015a). En ratones pigmentados adultos con HTO en su ojo izquierdo, hemos obtenido resultados consistentes con los observados previamente en ratas albinas adultas (Drouyer y cols., 2008); lo que refuerza la hipótesis de que la HTO, no sólo provoca una marcada degeneración en la población de CGR, sino que también produce una degeneración anterógrada de los axones retinofugales y, por tanto, una afectación significativa de los núcleos retinorecipientes del cerebro (Yücel y cols., 2003; Dekeyster y cols., 2015).

En nuestros estudios no hemos analizado la proyección retinotópica ipsilateral, pues cuantitativamente supone una proporción mínima del total de la proyección retinotectal y, además, varía de animales pigmentados a albinos (Lund, 1965, 1969, Linden y Perry, 1983).

5.2.2. Degeneración de las CGRm tras HTO

Las funciones visuales no-formadoras de imágenes, como la regulación de los ritmos circadianos o el control de las respuestas pupilares a la luz, dependen de las CGR intrínsecamente fotosensibles, las CGRm (Semo y cols., 2010, 2014; Galindo-Romero y cols., 2013a; Vugler y cols., 2008, 2014; Valiente-Soriano y cols., 2014). En pacientes humanos que padecían neuropatía óptica glaucomatosa, se registraron reducciones significativas en la funcionalidad de las CGRm (ritmos circadianos o respuesta pupilar a la luz) del ojo glaucomatoso en comparación con el ojo contralateral o poblaciones sanas (Pérez-Rico y cols., 2010; Kankipati y cols., 2011; Nissen y cols., 2014). Sin embargo, se ha documentado que las CGRm eran más resistentes al daño provocado por hipertensión ocular crónica, ya que no se observaron alteraciones en el número total de células ni en la morfología de su árbol dendrítico hasta 12 semanas después de la inducción de HTO (Li y cols., 2006); lo que sugiere que las CGRm tienen características únicas que las hacen diferentes de otras poblaciones de CGR frente a este tipo de lesión. Este hecho está apoyado por otros trabajos donde estudian el comportamiento de las CGRm ante distintos tipos de lesiones como axotomía del nervio óptico, atrofias ópticas, distrofias mitocondriales y excitotoxicidad (para una revisión ver Cui y cols., 2015); pero otros estudios demuestran que las CGRm responden de igual manera que el resto de CGR ante la inducción de HTO, como por ejemplo, en ratas adultas, la HTO inducida por láser provoca reducciones significativas en la población de CGRm (Drouyer y cols., 2008; Wang y cols., 2008, de Zavalía y cols., 2011) y en la inervación de los núcleos supraquiasmáticos, con alteraciones funcionales en su capacidad para regular los ritmos circadianos (Drouyer y cols., 2008). Asimismo, se ha documentado la pérdida de CGRm en ratones adultos con glaucoma congénito (Jakobs y cols., 2005) y en la línea de ratones CFP-D2,

creada mediante el cruce de ratones DBA/2J (que desarrollan glaucoma pigmentario) con ratones Thy1-CFP, se ha observado que el aumento progresivo de PIO está acompañado de una disminución progresiva en el número de CGR y de CGRm, lo que podría tener un impacto sustancial sobre la disfuncionalidad observada en la respuesta a la luz de estos animales (Zhang y cols., 2013). Nuestros resultados en ratones pigmentados adultos también indican que las CGRm degeneran como consecuencia de la elevación de la PIO (**Figura 4.11; Tabla 4.4**), aunque esta pérdida celular no sigue el patrón de distribución espacial sectorial típico observado en el resto de CGR (Valiente-Soriano y cols., 2015a). Las posibles explicaciones para estas discrepancias pueden estar relacionadas con los tipos de CGRm analizadas en los diferentes estudios, en la actualidad se han diferenciado hasta 6 tipos morfológicos de CGRm (Cui y cols., 2015). Sin embargo, la posibilidad de que las CGRm sean más resistentes a la axotomía (Robinson y Madison, 2004; Pérez de Sevilla Müller y cols., 2014), la excitotoxicidad inducida por NMDA (DeParis y cols., 2012) o a neuropatías ópticas mitocondriales (Moura y cols., 2013; Kawasaki y cols., 2014) que el resto de la población de CGR está pendiente de confirmarse con nuevos trabajos, ya que existe una gran discrepancia entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios (Cui y cols., 2015).

5.2.3. Muerte selectiva de las CGR en la capa de CGR tras HTO

La población de las CGR constituye sólo una parte de las neuronas en la capa de células ganglionares del roedor (Perry y Cowey, 1979; Perry 1981). Una estimación de la proporción real de CGR en el ratón pigmentado adulto (C57BL/6) es de aproximadamente 41% (Jeon y cols., 1998) o el 50% (Schlamp y cols., 2013). En nuestros experimentos, asumimos que la gran mayoría de los núcleos DAPI⁺ residentes en los sectores de la retina que carecen total o parcialmente de CGR Brn3a⁺ corresponden a las células amacrinas desplazadas en esta capa, con una menor proporción de estos núcleos correspondientes a los astrocitos, células endoteliales y microglia, las cuales responden con proliferación o migración celular (Salvador-Silva y cols., 2000; Sobrado-Calvo y cols., 2007; Rojas y cols., 2014). Este dato confirma el hecho de que la HTO provoca un daño selectivo a las CGR mientras que otras neuronas no-CGR en esta capa se mantienen intactas. Cuando el número total de CGR Brn3a⁺ se restó de la número de núcleos DAPI⁺, el número resultante era similar en retinas izquierdas hipertensas comparado con las retinas derechas controles, lo que sugiere que el daño es selectivo de CGR mientras que se mantiene el número de células amacrinas desplazadas. Después de inducir HTO, en las áreas donde existe una pérdida manifiesta de CGR aún persisten muchos núcleos no-CGR, en la CCG, presumiblemente células amacrinas desplazadas; en concordancia con observaciones previas en ratas adultas (Kielczewski y cols., 2005; Salinas-Navarro y cols., 2009a; Ortín-Martínez y cols., 2015) y ratones (Jackobs y cols., 2005; Cone y cols., 2010). Esto sugiere que la HTO produce un daño axonal a nivel del disco óptico, donde los axones presentan una perfecta organización retinotópica (Hayreh, 1969; Quigley y Green, 1979; Quigley 1999; Burgoyne y cols., 2005; Vidal-

Sanz y cols., 2012), sin afectar a otras neuronas en la CCG. Recientemente, también se constató que la pérdida de CGR desplazadas en la capa plexiforme interna y en la capa nuclear interna de la retina adopta la forma de muerte típica en sectores de forma triangular tras la inducción de HTO en ratas albinas adultas (Nadal-Nicolás y cols., 2014); sugiriendo que si la CCG fuera el sitio donde se provocara la lesión primaria tras HTO, estas CGR desplazadas no se verían afectadas dentro de esos sectores de muerte; pero esto no era así, lo que apoya la hipótesis de que el daño primario se produce en la cabeza del nervio óptico (ver Figura 10 en Nadal-Nicolás y cols., 2014).

5.3. ESTUDIO DE LA DEGENERACIÓN DE LAS CGR Y LAS CGRm DESPUÉS DE HTO Y SU PROTECCIÓN CON BDNF EN RATA ALBINA ADULTA

Con este experimento quisimos estudiar el comportamiento de las CGR y, en especial, de las CGRm tras HTO en rata, y analizar si la administración intravítrea del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) cuyo efecto neuroprotector sobre la población de CGR ha sido documentado previamente en nuestro laboratorio (Sobrado-Calvo y cols., 2007; Sánchez-migallón y cols., 2011; Galindo-Romero y cols., 2013), podía prevenir o, al menos, ralentizar su muerte. Nuestros resultados revelan que la HTO provoca una pérdida de CGR Brn3a⁺ de aproximadamente el 57% de las CGR originales a los 12 días de la inducción de la HTO y de un 58% a los 15 días. Si analizamos cómo se produce esta muerte, en los mapas de isodensidad, observamos, al igual que en ratón, que el daño se concentra sobre todo en la retina dorsal y responde a un patrón sectorial en forma triangular, con la base en la periferia y el vértice en el nervio óptico. La administración intravítrea del factor neurotrófico BDNF justo antes de la inducción de HTO redujo considerablemente esta pérdida en todas las retinas analizadas tanto a los 12 como a los 15 días. En cuanto al plexo vascular interna de la retina que estudiamos en retinas analizadas a los 15 días, no observamos anormalidades morfológicas significativas que explicaran el patrón de pérdida sectorial de las CGR. La HTO también indujo una pérdida importante de CGRm de aproximadamente el 49% de las CGRm originales contadas en retinas intactas a los 12 días de la inducción de la HTO y de un 50% a los 15 días. Sin embargo, un hecho que nos llamó la atención fue que el patrón de distribución de la pérdida de las CGRm, no era sectorial sino que se repartían homogéneamente a lo largo de la retina y, además, estas CGRm no respondieron al tratamiento con administración intraocular de BDNF. Estos datos contradicen la hipótesis de que las CGRm son más resistentes a la lesión que el resto de la población CGR (Cui y cols., 2015); pero sin embargo, muestran diferencias importantes en su respuesta frente a HTO y neuroprotección, en comparación con las CGR que no expresan melanopsina.

5.3.1. Evolución de la PIO tras inducción de HTO tras administración de BDNF o Vehículo

La fotocoagulación con láser de la malla trabecular y los vasos perilimbares y epiesclerales en rata albina ha sido muy bien caracterizada en nuestro laboratorio y resulta en una elevación significativa de la presión intraocular (Salinas-Navarro y cols., 2009a; Vidal Sanz y cols., 2012; Ortín-Martínez y cols., 2015), parecida a la obtenida en otros estudios (Levkovitch-Verbin y cols., 2002). De acuerdo con los estudios previos, nuestros resultados muestran que los niveles de PIO alcanzados tras la fotocoagulación láser están aumentados significativamente a las 24 horas y se mantienen durante los primeros 7 días (último intervalo de tiempo medido en este estudio) y no varían con la administración previa de BDNF o vehículo. También observamos que los valores de PIO no cambian entre los grupos analizados, por lo que concluimos que la administración de BDNF no tiene ningún efecto en la evolución de las PIO.

5.3.2. La HTO provoca una pérdida de CGR y de CGRm

Los porcentajes de pérdida de CGR tras HTO inducida por fotocoagulación láser que observamos en nuestros resultados (Valiente-Soriano y cols., 2015b) son similares a los documentados en estudios previos realizados en nuestro laboratorio en ratas albinas (Salinas-Navarro y cols., 2010; Vidal Sanz y cols., 2012; Ortín-Martínez y cols., 2015), algo mayores que los hallados en ratones (Salinas-Navarro y cols., 2009c; Cuenca y cols., 2010; Valiente-Soriano y cols., 2015a), pero similares a la pérdida observada por otros autores (WoldeMussie y cols., 2001; Levkovitch-Verbin y cols., 2002; Droyer y cols., 2008; Lambert y cols., 2011; de Zavalía y cols., 2011). Nuestros resultados también indican que las CGRm de rata degeneran como consecuencia de la HTO, encontrando una pérdida de aproximadamente el 50% ó 51% de la población original contada en retinas intactas de CGRm a los 12 ó 15 días tras la fotocoagulación, respectivamente. Estos resultados son comparables a estudios anteriores de otros laboratorios en ratas adultas (Drouyer y cols., 2008; de Zavalía y cols., 2011) y ratones (Jakobs y cols., 2005; Wang y cols., 2008; Zhang y cols., 2013), pero difieren de otros estudios realizados en ratas adultas (Li y cols., 2006; Cui y cols., 2015) donde sugieren que las CGRm son más resistentes a la lesión. Estos resultados, tanto la población de CGR como de CGRm en rata son muy similares a los analizados en ratón pigmentado en esta misma tesis, aunque en rata, el daño axonal provocado por la elevada PIO es mayor (aproximadamente un 80% en rata y un 50-60% en ratón).

5.3.3. La distribución de la pérdida de las CGRm es diferente del resto de CGR y no tiene relación con el plexo vascular interno de la retina

En retinas hipertensas de rata, la población de CGR adopta la típica distribución en sectores triangulares, con su base ubicada en la periferia de la retina y su vértice en la cabeza del nervio óptico, principalmente en la retina dorsal. Al igual que ocurre en ratón, esto no sucede con la distribución de las CGRm supervivientes; ya que muestran una pérdida más difusa a lo largo de la retina sin sectores definidos. El estudio de la vascularización de la retina interna no presenta ninguna anomalía aparente en las retinas hipertensas comparadas con retinas de animales control. Ello nos indica que el patrón sectorial tan característico de muerte de las CGR no es debido a la vascularización de la retina. Lo que refuerza nuestras observaciones en ratón (Valiente-Soriano y cols., 2015a), donde vemos que la HTO causa la degeneración y muerte de las CGR pero preserva la población de células amacrinas desplazadas en la capa de CGR (Ortín-Martínez y cols., 2015). El patrón de muerte sectorial ha sido explicado previamente (Salinas-Navarro y cols., 2009c, 2010; Vidal-Sanz y cols., 2012) y se piensa que al aumentar la PIO se produce una axotomía a nivel de la cabeza del nervio óptico, que es el lugar donde los paquetes axonales están perfectamente organizados. No podemos dar una explicación clara de por qué las CGRm responden de una manera distinta al del resto de CGR y no siguen ese patrón de muerte sectorial que se observa para el resto de CGR, incluyendo la subpoblación localizada en la CNI, conocidas como CGR desplazadas (Nadal-Nicolás y cols., 2014); pero es posible que estas CGRm, o parte de ellas, tengan algún tipo de conexión axonal colateral intraretiniana (Joo y cols., 2013; Semo y cols., 2014) que les proporcionen un soporte trófico alternativo. Esta posibilidad no explica totalmente este hecho, ya que todavía hay una importante disminución en la población de CGRm de hasta un 50% a los 15 días tras HTO. Otra posible explicación, podría ser la ausencia de organización retinotópica de los axones de las CGRm; sin embargo, tal y como hemos observado estudiando las proyecciones de las CGRm en ratón, al igual que indican estudios recientes, las CGRm también proyectan a núcleos formadores de imágenes típicos que reciben y procesan información visual formadora de imágenes (Dacey y cols., 2005; Hannibal y cols., 2014; Valiente-Soriano y cols., 2014) y requieren una organización axonal muy precisa (Simon y o'Leary, 1990).

5.3.4. La administración intravítrea de BDNF protege a las CGR pero no a las CGRm tras HTO inducida por láser

En esta parte del estudio hemos documentado un rescate significativo de la población general de CGR, tras la inducción de una HTO en retinas tratadas con una sola inyección intravítrea de BDNF y analizadas a los 12 ó 15 días después de FL. Estos resultados están en consonancia con estudios previos (ver apartado 1.7.2) que estudiaron el efecto de diferentes sustancias neuroprotectoras, como los factores neurotróficos (BDNF, neurotrofina 4/5 o factor

neurotrópico derivado de la glía, GDNF) o el inhibidor de caspasa Z-DEVD, frente a la pérdida de CGR inducida por diferentes tipos de lesiones (Peinado-Ramón y cols., 1996; Di Polo y cols., 1998; Vidal Sanz y cols., 2000; Cheng y cols., 2002, Lindqvist y cols., 2004; Sánchez-Migallón y cols., 2011). Puede que para obtener un mayor éxito de tasa de rescate de CGR sea necesario un efecto de estos factores más prolongado en el tiempo que permita mantener o restablecer conexiones sinápticas permanentes con las regiones apropiadas del cerebro, como se ha demostrado para las CGR de ratas adultas mediante trasplantes autólogos de nervio periférico (Vidal Sanz y cols., 1987, 1991, 2002; Avilés-Trigueros y cols., 2000). Sin embargo, un hecho llamativo y relevante fue que este tratamiento con BDNF no tuvo ningún efecto neuroprotector significativo en el número de CGRm de las retinas analizadas a los 12 ó 15 días después de FL con respecto a las retinas tratadas con vehículo. La falta de respuesta de la población de CGRm fue sorprendente; ya que, en las mismas retinas tratadas con BDNF las demás CGR sí que mostraron un rescate significativo. El efecto de la neuroprotección por medio de la administración de BDNF en las CGR lesionadas ha sido explicado previamente en otros estudios, que documentan que estas neuronas, las CGR, expresan el receptor tirosina kinasa de neurotrofinas relacionado con la tropomiosina tipo B (TrkB) (Lindqvist y cols., 2002, 2010), un receptor que es necesario para la activación de vías de señalización intracelulares envueltas en la supervivencia de poblaciones neuronales durante la fase de desarrollo y en estado adulto participa en respuestas adaptativas y también en condiciones de patología del animal (Cui y cols., 2002; Rudzinski y cols., 2004; Guo y cols., 2009). Sin embargo, se desconoce qué proporción de la población total de CGR, o de las CGRm, expresan el receptor TrkB.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Los estudios de caracterización de la población de las CGR melanopsínicas del ratón pigmentado y albino adulto nos permiten concluir que:

1. Las CGRm son más abundantes en la región periférica y cuadrante supero-temporal de la retina del ratón pigmentado y albino, y la gran mayoría de ellas se marcan retrógradamente desde los colículos superiores.
2. La gran mayoría de CGRm no expresan el factor de transcripción Brn3a.
3. Existe un tipo de CGRm que no proyecta su axón a través del nervio óptico y que puede considerarse una interneurona de la retina, quizás relacionada con el reflejo pupilar intrínseco.

Los estudios de degeneración de las CGR y CGRm después de la inducción de HTO en ratón pigmentado nos permiten concluir que:

1. Dos semanas tras fotocoagulación láser, sobrevive en la retina una población de CGR, cuyo transporte axonal está dañado, y a las 4 semanas estas CGR también han degenerado.
2. Las CGRm mueren en igual proporción que el resto de CGR tras la HTO, pero su patrón de distribución no se correlaciona con el del resto de la población de CGR, siendo principalmente difuso y no sectorial.
3. El daño provocado tras HTO es selectivo de las CGR en la capa de CGR y no afecta a otras neuronas de esta capa.
4. Los colículos superiores, principales núcleos retinorreceptores del cerebro, reciben menos de la mitad de aferencias de la retina tras HTO que un animal control.

Los estudios de degeneración de las CGR y CGRm después de HTO y su protección con BDNF en rata albina adulta nos permiten concluir que:

1. A los 12 ó 15 días después de la fotocoagulación láser existe una pérdida de aproximadamente el 57 ó 58% de la población de CGR y el 50 ó 51% de la población de CGRm, respectivamente. La distribución de las CGRm supervivientes, al igual que en ratón, difiere de la distribución del resto de CGR.
2. La administración intravítrea de BDNF antes del láser resulta en un rescate de aproximadamente el 39 ó 26% de CGR en comparación con los controles tratados con vehículo a los 12 ó 15 días tras fotocoagulación láser, respectivamente.
3. La administración intravítrea de BDNF no tiene ningún efecto en la supervivencia de las CGRm. Por lo tanto, nuestros datos indican que las CGRm no son más resistentes a la HTO que otras CGR.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

From the characterization of the melanopsin⁺RGC population of the pigmented and albino adult mouse we conclude:

1. The mRGC are most abundant in the peripheral region and supero-temporal quadrant of the retina in pigmented and albino mouse, and the vast majority of them are retrogradely labelled from the superior colliculi.
2. The vast majority of the mRGC do not express the transcription factor Brn3a.
3. There is a type of mRGC that does not project its axon into the optic nerve and can be considered an interneuron of the retina, perhaps related to the intrinsic pupil reflex.

From the degeneration of the RGC and the mRGC after induction of OHT in pigmented mice we conclude:

1. Two weeks after laser photocoagulation, a population of RGCs whose axonal transport is damaged survives in the retina and at 4 weeks these RGCs degenerate.
2. mRGCs die in the same proportion as the rest of RGCs after OHT, but their topographical loss is mainly diffuse and not sectorial, and does not correlate with the topography of the rest of the RGC population.
3. Damage caused after OHT is selective to RGCs in the RGC layer and does not affect other cells in this layer.
4. The superior colliculi, the major retinorecipient nuclei of the brain in rodents, receive less than half of the signal from the retina after OHT than in control animals.

From the studies of the degeneration of the RGC and the mRGC after induction of OHT and its protection with BDNF in adult albino rats we conclude:

1. At 12 or 15 days after laser photocoagulation there is a loss of approximately 57 or 58% of the RGC population and 50 or 51% of the mRGC population, respectively. The distribution of the surviving mRGC, as in mouse, differs from the distribution of the rest of RGC.
2. Intravitreal administration of BDNF before laser results in a rescue of approximately 39 or 26% of RGCs in comparison with the controls treated with vehicle at 12 or 15 days after OHT, respectively

3. The intravitreal administration of BDNF has no effect on the survival of the mRGC.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Y, Akhter N, Husain S. 2013. Delta-opioid agonist SNC-121 protects retinal ganglion cell function in a chronic ocular hypertensive rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:1816-1828.
- Aguayo AJ, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez, MP, Bray GM. 1987. Growth and connectivity of axotomized retinal neurons in adult rats with optic nerves substituted by PNS grafts linking the eye and the midbrain. *Ann NY Acad. Sci.* 495, 1e9.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Lonngren U, Sobrado P, Conesa A, Cánovas I, Salinas-Navarro M, Miralles-Imperial J, Hallböök F, Vidal-Sanz M. 2008. Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis.* 14:1050-1063.
- Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado-Calvo P, Lonngren U, Salinas-Navarro M, Canovas I, Nadal-Nicolas FM, Miralles-Imperial J, Hallbook F, Vidal-Sanz M. 2009. Proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade are immediately up-regulated in the retina after optic nerve transection or optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:424-431.
- Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, de Imperial JM, Vidal-Sanz M. 2013.. Anatomical and functional damage in experimental glaucoma. *Curr Opin Pharmacol.* 13:5-11.
- Ahmed F, Brown KM, Stephan DA, Morrison JC, Johnson EC, Tomarev SI. 2004. Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:1247-1258.
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. 2003a. Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:5168–5173.
- Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN. 2003b. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:4314-4320.
- Alarcón-Martínez L, de la Villa P, Avilés-Trigueros M, Blanco R, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009. Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats. *Mol Vis.* 15: 2373-83.
- Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Galindo-Romero C, Valiente-Soriano J, Agudo-Barriuso M, Villa P de L, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2010. ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection. *Vision Res.* 50:2176-2187.
- Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A. 2012. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 31:152-181.
- Anderson MG, Smith RS, Hawes NL, Zabaleta A, Chang B, Wiggs JL, John SW. 2002. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet.* 30:81-85.
- Angelucci A, Clascá F, Sur M. 1996. Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Methods.* 65:101-112.
- Arendt D. 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int. J. Dev.Biol.* 47:653-671.
- Avila MY, Mitchell CH, Stone RA, Civan MM. 2003. Noninvasive assessment of aqueous humor turnover in the mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:722-727.
- Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, García-Avilés A, Lafuente MP, Rodríguez ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2003. Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol.* 184:767-777.
- Avilés-Trigueros M, Sauvé Y, Lund RD, Vidal-Sanz M. 2000. Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *J Neurosci.* 20:361-374.
- Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S, Nathans J. 2009. Distinct roles of transcription factors brn3a and brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron.* 61:852-864.
- Badea TC, Nathans J. 2011. Morphologies of mouse retinal ganglion cells expressing transcription factors Brn3a, Brn3b, and Brn3c: analysis of wild type and mutant cells using genetically-directed sparse labeling. *Vision Res.* 51:269-279.

- Badea TC, Williams J, Smallwood P, Shi M, Motajo O, Nathans J. 2012. Combinatorial expression of Brn3 transcription factors in somatosensory neurons: genetic and morphologic analysis. *J Neurosci.* 32:995-1007.
- Balkema GW, Dräger UC. 1990. Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice. *Vis Neurosci.* 4:595-604.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1:549-553.
- Barnstable CJ, Dräger UC. 1984. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neurosci.* 11:847-855.
- Barron KD, Dentinger G, Krohel G, Easton SK, Mankes R. 1986. Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer in rat after intraorbital optic nerve crush. *J Neurocytol.* 15:345-362.
- Baver SB, Pickard GE, Sollars PJ, Pickard GE. 2008. Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur J Neurosci.* 27:1763-1770.
- Bayer AU, Neuhardt T, May AC, Martus P, Maag KP, Brodie S, Lütjen-Drecoll E, Podos SM, Mittag T. 2001. Retinal morphology and ERG response in the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:1258-1265.
- Beckstead RM, Franckfurter A. 1983. A direct projection from the retina to the intermediate grey layer of the superior colliculus demonstrated by anterograde transport of horseradish peroxidase in the monkey, cat and rat. *Exp Brain Res.* 52:261-268.
- Bellingham J, Whitmore D, Philp AR, Wells DJ, Foster RG. 2002. Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position. *Brain Res Mol Brain Res.* 107:128-136.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. 1994. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci.* 14:4368-4374.
- Bernstein SL, Koo JH, Slater BJ, Guo Y, Margolis FL. 2006. Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol Vis.* 12:47-55.
- Berson DM, Castrucci AM, Provencio I. 2010. Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. *J Comp Neurol.* 518:2405-2422.
- Berson DM. 2003. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.* 26:314-320.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295:1070-1073.
- Biello SM. 2009. Circadian clock resetting in the mouse changes with age. *Age (Dordr).* 31:293-303.
- Binder DK, Scharfman HE. 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 22:123-131.
- Bowmaker JK, Hunt DM. 2006. Evolution of vertebrate visual pigments. *Curr Biol.* 16:484-489.
- Bray GM, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ. 1987. Regeneration of axons from the central nervous system of adult rats. *Prog Brain Res.* 71:373-379.
- Bray GM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ. 1992. Death and survival of axotomized retinal ganglion cells. En: "Regeneration and plasticity in the mammalian visual system". Lam DM, Bray GM. MIT press. 29-45; Massachusetts (USA).
- Brown TM, Gias C, Hatori M, Keding SR, Semo M, Coffey PJ, Gigg J, Piggins HD, Panda S, Lucas RJ. 2010. Melanopsin contributions to irradiance coding in the thalamo-cortical visual system. *PLoS Biol.* 8:e1000558.
- Brown TM, Tsujimura S, Allen AE, Wynne J, Bedford R, Vickery G, Vugler A, Lucas RJ. 2012. Melanopsin-based brightness discrimination in mice and humans. *Curr Biol.* 22:1134-1141.
- Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, Vetter ML, Marsh-Armstrong N, Horner PJ. 2008. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci.* 28:2735-2744.
- Bui BV, Fortune BJ. 2004. Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *Physiol.* 555:153-173.
- Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JK, Hart RT. 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res.* 24:39-73.

- Bursell SE, Clermont AC, Oren B, King GL. 1995. The in vivo effect of endothelins on retinal circulation in nondiabetic and diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36:596-607.
- Carter DA, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ. 1987. Long-term preservation of intrinsic neurons after axotomy-induced death of retinal ganglion cells. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13:1390.
- Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Vidal-Sanz M, Osborne NN. 2004. The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:685-693.
- Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME, Tremblay F. 2002. Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2969-2976.
- Chauhan BC, LeVatte TL, Jollimore CA, Yu PK, Reitsamer HA, Kelly ME, Yu DY, Tremblay F, Archibald ML. 2004. Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:144-152.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A. 2002. Distribution, markers and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm.* 10:27-39.
- Chen SK, Badea TC, Hattar S. 2011. Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature.* 76:92-95.
- Chidlow G, Casson R, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Osborne NN. 2005. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis.* 11:387-396.
- Cohen-Cory S, Fraser SE. 1994. BDNF in the development of the visual system of *Xenopus*. *Neuron.* 12:747-761.
- Comoli E, Coizet V, Boyes J, Bolam JP, Canteras NS, Quirk RH, Overton PG, Redgrave P. 2003. A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events. *Nat Neurosci.* 6:974-980.
- Cone FE, Gelman SE, Son JL, Pease ME, Quigley HÁ. 2010. Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp Eye Res.* 91:415-424.
- Coombs J, van der List D, Wang GY, Chalupa LM. 2006. Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience.* 140:123-136.
- Crish SD, Sappington RM, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ. 2010. Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:5196-5201.
- Cuenca N, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, de la Villa P, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2010. Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp Eye Res.* 91:273-285.
- Cui Q, Tang LS, Hu B, So KF, Yip HK. 2002. Expression of trkA, trkB, and trkC in injured and regenerating retinal ganglion cells of adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:1954-1964.
- Cui Q, Ren C, Sollars PJ, Pickard GE, So KF. 2015. The injury resistant ability of melanopsin-expressing intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuroscience.* 284:845-853.
- Dabin I, Barnstable CJ. 1995. Rat retinal Müller cells express Thy-1 following neuronal cell death. *Glia.* 14:23-32.
- Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, Robinson FR, Smith VC, Pokorny J, Yau KW, Gamlin PD. 2005. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature.* 433:749-754.
- Danias J, Lee KC, Zamora MF, Chen B, Shen F, Filippopoulos T, Su Y, Goldblum D, Podos SM, Mittag T. 2003. Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2Nnia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:5151-5162.
- Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos-Esteban J, Podos SM, Mittag T. 2002. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:587-594.
- Davies WL, Hankins MW, Foster RG. 2010. Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors. *Photochem Photobiol Sci.* 9:1444-1457.
- Davis CH, Marsh-Armstrong N. Discovery and implications of transcellular mitophagy. *Autophagy.* 10:2383-2384.
- De Araujo EG, Linden R. 1993. Trophic factors produced by retinal cells increase the survival of retinal ganglion cells in vitro. *Eur J Neurosci.* 5:1181-1188.
- de Hoz R, Gallego BI, Ramírez AI, Rojas B, Salazar JJ, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. 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:e83733.

- de Zavalía N, Plano SA, Fernandez DC, Lanzani MF, Salido E, Belforte N, Sarmiento MI, Golombek DA, Rosenstein RE. 2011. Effect of experimental glaucoma on the non-image forming visual system. *J Neurochem.* 117:904-914.
- De Juan J, Iñiguez C, Carreres J. 1978. Number, diameter and distribution of the rat optic nerve fibers. *Acta Anat (Basel).* 102:294-299.
- Dekeyser E, Aerts J, Valiente-Soriano FJ, De Groef L, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Arckens L, Moons L. 2015. Ocular hypertension results in retinotopic alterations in the visual cortex of adult mice. *Curr Eye Res.* 23:1-15.
- DeParis S, Caprara C, Grimm C. 2012. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells are resistant to N-methyl-D-aspartic acid excitotoxicity. *Mol Vis.* 18:2814-2827.
- Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ. 1998. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporally rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 91:1632-1636.
- Dogiel AS. 1895. Die Retina der Vögel. *Anat Entwicklungsgeschichte.* 44:622-648.
- Domenici L, Gravina A, Berardi N, Maffei L. 1991. Different effects of intracranial and intraorbital section of the optic nerve on the functional responses of rat retinal ganglion cells. *Exp Brain Res.* 86:579-584.
- Donatien P, Jeffery G. 2002 Correlation between rod photoreceptor numbers and levels of ocular pigmentation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:1198-1203.
- Dräger UC, Olsen JF. 1981. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 20:285-293.
- Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Denis P, Cooper HM. 2008. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One.* 3:e3931.
- Ebadi M, Bashir RM, Heidrick ML, Hamada FM, Refaey HE, Hamed A, Helal G, Baxi MD, Cerutis DR, Lassi NK. 1997. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int.* 30:347-374.
- Ecker JL, Dumitrescu ON, Wong KY, Alam NM, Chen SK, LeGates T, Renna JM, Prusky GT, Berson DM, Hattar S. 2010. Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron.* 67:49e60.
- Emre M, Orgül S, Haufschild T, Shaw SG, Flammer J. 2005. Increased plasma endothelin-1 levels in patients with progressive open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 89:60-63.
- Esquivá G, Lax P, Cuenca N. 2013. Impairment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells associated with late stages of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:4605-4618.
- Estevez ME, Fogerson PM, Ilardi MC, Borghuis BG, Chan E, Weng S, Auferkorte ON, Demb JB, Berson DM. 2012. Form and function of the M4 cell, an intrinsically photosensitive retinal ganglion cell type contributing to geniculocortical vision. *J Neurosci.* 32:13608-13620.
- Fazio DT, Heckenlively JR, Martin DA, Christensen RE. 1986. The electroretinogram in advanced open-angle glaucoma. *Doc Ophthalmol.* 63:45-54.
- Feghali JG, Jin JC, Odom JV. 1991. Effect of short-term intraocular pressure elevation on the rabbit electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32:2184-2189.
- Ferreiro López S. y Silvia Ruiz Navarro. 2003. Oftalmología en atención primaria, Tema X: glaucoma. Edit. Formación Alcalá.
- Filippopoulos T, Matsubara A, Danias J, Huang W, Dobberfuhr A, Ren L, Mittag T, Miller JW, Grosskreutz CL. 2006. Predictability and limitations of non-invasive murine tonometry: comparison of two devices. *Exp Eye Res.* 83:194-201.
- Fitzgibbon T, Taylor SF. 1996. Retinotopy of the human retinal nerve fibre layer and optic nerve head. *J Comp Neurol.* 375:238-251.
- Forrester J, Peters A. 1967. Nerve fibres in optic nerve of rat. *Nature.* 214:245-247.
- Fortune B, Bui BV, Morrison JC, Johnson EC, Dong J, Cepurna WO, Jia L, Barber S, Cioffi GA. 2004. Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:1854-1862.
- Foster RG, Hankins MW. 2002. Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res.* 21:507-527.

- Fu QL, Li X, Yip HK, Shao Z, Wu W, Mi S, So KF. 2009. Combined effect of brain-derived neurotrophic factor and LINGO-1 fusion protein on long-term survival of retinal ganglion cells in chronic glaucoma. *Neuroscience*. 162:375-382.
- Fu CT, Sretavan D. 2010. Laser-induced ocular hypertension in albino CD-1 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 980-990.
- Galindo-Romero C, Jimenez-Lopez M, Garcia-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriuso M, Villegas-Perez MP, Aviles-Trigueros M, Vidal-Sanz M. 2013a. Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp Eye Res* 108:84-93.
- Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2013b. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 54:974-985.
- Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2011. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res*. 92:377-387.
- Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. 2012. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *Neuroinflammation*. 9:92.
- Gao H, Qiao X, Hefti F, Hollyfield JG, Knusel B. 1997. Elevated mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in retinal ganglion cell layer after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 38:1840-1847.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2010. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res*. 91:800-810.
- García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo-Barriuso M, Alarcón-Martínez L, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2011. Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis*. 17:1716-1733.
- González-Menéndez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R, Garcia-Fernandez JM. 2009. Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina. *Frontiers in cellular neuroscience*. 3:3.
- Germain F, Calvo M, De La Villa P. 2004. Rabbit retinal ganglion cell survival after optic nerve section and its effect on inner plexiform layer. *Exp Eye Res*. 79: 95-102.
- Goldblum D, Mittag T. 2002. Prospects for relevant glaucoma models with retinal ganglion cell damage in the rodent eye. *Vision Res*. 42:471-478.
- Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. 2001. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci*. 4:1165.
- Gooley JJ, Lu J, Fischer D, Saper CB. 2003. A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci*. 23:7093-7106.
- Graham D. 1995. Melanopsin Ganglion Cells: A Bit of Fly in the Mammalian Eye. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Gross RL, Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, Wu SM. 2003. A mouse model of elevated intraocular pressure: retina and optic nerve findings. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 101: 163-169.
- Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH. 2003. Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:4337-4346.
- Guillery RW, Mason CA, Taylor JSH. 1995. Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J Neurosci*. 15:4727-4737.
- Günhan-Agar E, Kahn D, Chalupa LM. 2000. Segregation of on and off bipolar cell axonal arbors in the absence of retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 20:306-314.
- Guo L, Moss SE, Alexander RA, Ali RR, Fitzke FW, Cordeiro MF. 2005. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:175-182.

- Guo Y, Johnson E, Cepurna W, Jia L, Dyck J, Morrison JC. 2009. Does elevated intraocular pressure reduce retinal TRKB-mediated survival signaling in experimental glaucoma? *Exp Eye Res.* 89:921-933.
- Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. 2008. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci.* 31:27-36.
- Hannibal J, Hindersson P, Knudsen SM, Georg B, Fahrenkrug J. 2002. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci.* 22:RC191.
- Hannibal J, Georg B, Hindersson P, Fahrenkrug J. 2005. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci* 27:147-155.
- Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. 2013. Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Exp Eye Res.* 106:55-63.
- Hannibal J, Kankipati L, Strang CE, Peterson BB, Dacey D, Gamlin PD. 2014. Central projections of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 522:2231-2248.
- Hänninen VA, Pantcheva MB, Freeman EE, Poulin NR, Grosskreutz CL. 2002. Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma. *Curr Eye Res.* 25:389-395.
- Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HM, Okumura A, Namekata K, Saeki T, Aihara M, Yoshida H, Mitani A, Tanaka K. 2007. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest.* 117:1763-1770.
- Hare W, WoldeMussie E, Lai R, Ton H, Ruiz G, Feldmann B, Wijono M, Chun T, Wheeler L. 2001. Efficacy and safety of memantine, an NMDA-type open-channel blocker, for reduction of retinal injury associated with experimental glaucoma in rat and monkey. *Surv Ophthalmol.* 45 Suppl 3:S284-S289; discussion S295-S296.
- Harvey AR, Hellström M, Rodger J. 2009. Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway. *Prog Brain Res.* 175:151-161.
- Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, Berson DM. 2006. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 497:326-349.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 295:1065-1070.
- Hayreh SS. 1969. Blood supply of the optic nerve head and its role in optic atrophy, glaucoma, and oedema of the optic disc. *Br J Ophthalmol.* 53:721-748.
- Hendry IA. 1975. The effects of axotomy on the development of the rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* 90:235-244.
- Hernández MR. 2000. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res.* 19:297-321.
- Herzog KH, Von Bartheld CS. 1998. Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J Neurosci.* 18:2891-2906.
- Hofbauer A, Dräger UC. 1985. Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J Comp Neurol.* 234:465-474.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. 1990. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9:2459-2464.
- Holcombe DJ, Lengefeld N, Gole GA, Barnett NL. 2008. Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model. *Br J Ophthalmol.* 92:683-688.
- Holopigian K, Seiple W, Mayron C, Koty R, Lorenzo M. 1990. Electrophysiological and psychophysical flicker sensitivity in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31:1863-1868.
- Honjin R, Sakato S, Yamashita T. 1977. Electron microscopy of the mouse optic nerve: a quantitative study of the total optic nerve fibers. *Arch Histol Jpn.* 40:321-332.
- Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y. 2000. Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Müller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:552-560.
- Huang W, Fileta J, Guo Y, Grosskreutz CL. 2006. Downregulation of Thy-1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Curr Eye Res.* 31: 265-271.

- Hubel DH. 1999. *Ojo, Cerebro y Visión*. Universidad de Murcia. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Murcia (España). ISBN: 84-8371-143-5.
- Hughes S, Watson TS, Foster RG, Peirson SN, Hankins MW. 2013. Nonuniform distribution and spectral tuning of photosensitive retinal ganglion cells of the mouse retina. *Curr Biol*. 23:1696-1701.
- Isenmann S, Schmeer C, Kretz A. 2004. How to keep injured CNS neurons viable--strategies for neuroprotection and gene transfer to retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci*. 26:1-16.
- Jacobs GH, Fenwick JA, Williams GA. 2001. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol*. 204:2439-2446.
- Jain V, Ravindran E, Dhingra NK. 2012. Differential expression of Brn3 transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J. Comp. Neurol*. 520:742-755.
- Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH. 2005. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol*. 171:313-325.
- Jeffery G. 2001. Architecture of the optic chiasm and the mechanisms that sculpt its development. *Physiol Rev*. 81:1393-1414.
- Jeffery G, Levitt JB, Cooper HM. 2008. Segregated hemispheric pathways through the optic chiasm distinguish primates from rodents. *Neurosci*. 157:637-643.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci*. 18: 8936-8946.
- Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, Li D, Wu SM, Gross RL. 2005. Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Res*. 45:169-179.
- Jiang C, Moore MJ, Zhang X, Klassen H, Langer R, Young M. 2007. Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol Vis*. 13:1783-1792.
- John SW, Anderson MG, Smith RS. 1999. Mouse genetics: a tool to help unlock the mechanisms of glaucoma. *J Glaucoma*. 8:400-412.
- John SW, Hagaman JR, MacTaggart TE, Peng L, Smithes O. 1997. Intraocular pressure in inbred mouse strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 38:249-253.
- Johnson EC, Deppmeier LM, Wentzien SK, Hsu I, Morrison JC. 2000. Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41:431-442.
- Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Doser TA, Morrison JC. 2007. Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48:3161-3177.
- Johnson EC, Morrison JC. 2009. Friend or Foe? Resolving the Impact of Glial Responses in Glaucoma. *J Glaucoma*. 18:341-353.
- Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H. 1986. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 6:3031-3038.
- Johnson J, Wu V, Donovan M, Majumdar S, Renteria RC, Porco T, Van Gelder RN, Copenhagen DR. 2010. Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:17374-17378.
- Joo HR, Peterson BB, Dacey DM, Hattar S, Chen SK. 2013. Recurrent axon collaterals of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Vis Neurosci*. 30:175-182.
- Jusuf PR, Lee SC, Hannibal J, Grunert U. 2007. Characterization and synaptic connectivity of melanopsin-containing ganglion cells in the primate retina. *Eur J Neurosci*. 26:2906-2921.
- Karnas D, Mordel J, Bonnet D, Pévet P, Hicks D, Meissl H. 2013. Heterogeneity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the mouse revealed by molecular phenotyping. *J Comp Neurol*. 521:912-932.
- Kankipati L, Girkin CA, Gamlin PD. 2011. The post-illumination pupil response is reduced in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52:2287-2292.
- Kawasaki A, Collomb S, Le'on L, Münch M. 2014. Pupil responses derived from outer and inner retinal photoreception are normal in patients with hereditary optic neuropathy. *Exp Eye Res*. 120:161-166.
- Keeler CE, Sutcliffe E, Chaffee EL. 1928. Normal and "Rodless" Retinae of the House Mouse with Respect to the Electromotive Force Generated through Stimulation by Light. *Proc Natl Acad Sci USA*. 14:477-484.
- Kielczewski JL, Pease ME, Quigley HA. 2005. The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection on amacrine cells in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:3188-3196.

- Kilic E, Hermann DM, Isenmann S, Bähr M. 2002. Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. *J Pineal Res.* 32:106-111.
- Kim IJ, Zhang Y, Yamagata M, Meister M, Sanes JR. Molecular identification of a retinal cell type that responds to upward motion. *Nature.* 452:478-482.
- Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, Chen CF. 2001. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci Lett.* 305:139-142.
- Kolb H, Linberg KA, Fisher SK. 1992. Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol.* 318:147-187.
- Kolb H, Nelson R, Mariani A. 1981. Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Res.* 21:1081-1114.
- Kolomeyer AM, Zarbin MA. 2014. Trophic factors in the pathogenesis and therapy for retinal degenerative diseases. *Surv Ophthalmol.* 59:134-165.
- Korth M, Nguyen NX, Horn F, Martus P. 1994. Scotopic threshold response and scotopic PII in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:619-625.
- Kwong JM, Caprioli J, Piri N. 2010. RNA binding protein with multiple splicing: A new marker for retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:1052-1058.
- Kwong JM, Vo N, Quan A, Nam M, Kyung H, Yu F, Piri N, Caprioli J. 2013. The dark phase intraocular pressure elevation and retinal ganglion cell degeneration in a rat model of experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 112:21-28.
- Kwong JMK, Quan A, Kyung H, Piri N, Caprioli J. 2011. Quantitative analysis of retinal ganglion cell survival with Rbpm immunolabeling in animal models of optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52:9694-9702.
- Lafuente López-Herrera MP, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2002. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol.* 178:243-258.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Mayor S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. 2002b. Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Exp Eye Res.* 74:181-189.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sellés-Navarro I, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. 2002a. Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience.* 109:157-68.
- Lafuente MP, Villegas-Pérez MP, Sobrado-Calvo P, García-Avilés A, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M. 2001. Neuroprotective effects of alpha(2)-selective adrenergic agonists against ischemia-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:2074-2084.
- Lam TT, Ablter AS, Kwong JM, Tso MO. 1999. N-methyl-D-aspartate (NMDA)--induced apoptosis in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:2391-2397.
- Lam TT, Siew E, Chu R, Tso MO. 1997. Ameliorative effect of MK-801 on retinal ischemia. *J Ocul Pharmacol Ther.* 13:129-137.
- Lambert W, Agarwal R, Howe W, Clark AF, Wordinger RJ. 2001. Neurotrophin and neurotrophin receptor expression by cells of the human lamina cribrosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:2315-2323.
- Lambert WS, Ruiz L, Crish SD, Wheeler LA, Calkins DJ. 2011. Brimonidine prevents axonal and somatic degeneration of retinal ganglion cell neurons. *Mol Neurodegener.* 6:4.
- Laquis S, Chaudhary P, Sharma SC. 1998. The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes. *Brain Res.* 784:100-104.
- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zhu Y, Gidday JM, Connor JR, Wax MB. 2004. Quantitative ex vivo detection of rodent retinal ganglion cells by immunolabeling Brn-3b. *Exp Eye Res.* 79:131-140.
- Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A. 2008. Inhibition of p75(NTR) in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci.* 40:410-420.
- Leung CK, Lindsey JD, Crowston JG, Ju WK, Liu Q, Bartsch DU, Weinreb RN. 2008. In vivo imaging of murine retinal ganglion cells. *J Neurosci Methods.* 168:475-478.

- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. 2002. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:402-410.
- Levkovitch-Verbin H. 2004. Animal models of optic nerve diseases. *Eye.* 18:1066-1074.
- Li RS, Chen BY, Tay DK, Chan HH, Pu ML, So KF. 2006. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells are more injury-resistant in a chronic ocular hypertension model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:2951-2958.
- Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. 1999. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:1004-1008.
- Li Y, Schlamp CL, Poulsen GL, Jackson MW, Griep AE, Nickells RW. 2002. p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate. *Mol Vis.* 8:341-350.
- Libby RT, Anderson MG, Pang IH, Robinson ZH, Savinova OV, Cosma IM, Snow A, Wilson LA, Smith RS, Clark AF, John SW. 2005. Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci.* 22:637-648.
- Linden R, Perry VH. 1983. Massive retinotectal projections in rats. *Brain Res.* 272:145-149.
- Lindqvist N, Peinado-Ramón P, Vidal-Sanz M, Hallböök F. 2004. GDNF, Ret, GFRalpha1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection. *Exp Neurol.* 187:487-499.
- Lindqvist N, Vidal-Sanz M, Hallböök F. 2002. Single cell RT-PCR analysis of tyrosine kinase receptor expression in adult rat retinal ganglion cells isolated by retinal sandwiching. *Brain Res Brain Res Protoc.* 10:75-83.
- Lindqvist N, Lönngren U, Agudo M, Näpänkangas U, Vidal-Sanz M, Hallböök F. 2010. Multiple receptor tyrosine kinases are expressed in adult rat retinal ganglion cells as revealed by single-cell degenerate primer polymerase chain reaction. *Ups J Med Sci.* 115:65-80.
- Lund RD. 1965. Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science.* 149:1506–1507.
- Lund RD. 1969. Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol.* 135:179-208.
- Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, Johnson JE, Frost DO. 1998. BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. *J Neurosci.* 18:2097-2107.
- Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN. 2003. Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:4321-4330.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. 1990. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.* 5:501-509.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. 1994. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:1632-1636.
- Marina N, Sajic M, Bull ND, Hyatt AJ, Berry D, Smith KJ, Martin KR. 2012. Lamotrigine monotherapy does not provide protection against the loss of optic nerve axons in a rat model of ocular hypertension. *Exp Eye Res.* 104:1-6.
- Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, Hauswirth WW. 2003. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:4357-4365.
- May CA, Lütjen-Drecoll E. 2002. Morphology of the murine optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2206-2212.
- May CA, Mittag T. 2006. Optic nerve degeneration in the DBA/2NNia mouse: is the lamina cribrosa important in the development of glaucomatous optic neuropathy? *Acta Neuropathol.* 111:158-167.
- May PJ. 2006. The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog Brain Res.* 151:321-378.
- Mayor-Torroglosa S, De la Villa P, Rodríguez ME, López-Herrera MP, Avilés-Trigueros M, García-Avilés A, de Imperial JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2005. Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:3825-3835.

- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Aguayo A J. 1990a. Slow transport rates of cytoskeletal proteins change during regeneration of axotomized retinal neurons in adult rats. *J Neurosci.* 10:641-648.
- McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ. 1990b. Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J Neurosci.* 10:2834-2841.
- McNeill DS, Sheely CJ, Ecker JL, Badea TC, Morhardt D, Guido W, Hattar S. 2011. Development of melanopsin-based irradiance detecting circuitry. *Neural Dev.* 6:8.
- Mehaffey L, Holopigian K, Seiple W. 1993. Electro-oculogram changes in patients with ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Doc Ophthalmol.* 83:103-110.
- Mermoud A, Baerveldt G, Mickler DS, Wu GS, Rao NA. 1994. Animal model for uveitic glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 232:553-560.
- Mizuno K, Koide T, Yoshimura M, Araie M. 2001. Neuroprotective effect and intraocular penetration of nipradilol, a beta-blocker with nitric oxide donative action. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:688-694.
- Moore CG, Milne ST, Morrison JC. 1993. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34:363-369.
- Moore RY, Speh JC, Card JP. 1995. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.* 352:351-366.
- Morcos Y, Chang-Ling T. 2000. Concentration of astrocytic filaments at the retinal optic nerve junction is coincident with the absence of intra-retinal myelination: comparative and developmental evidence. *J Neurocytol.* 29:665-678.
- Moreno MC, Marcos HJ, Oscar Croxatto J, Sande PH, Campanelli J, Jaliffa CO, Benozzi J, Rosenstein RE. 2005. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res.* 81:71-80.
- Morin LP, Blanchard JH, Provencio I. 2003. Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: Bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 465:401-416.
- Morizane C, Adachi K, Furutani I, Fujita Y, Akaike A, Kashii S, Honda Y. 1997. N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester protects retinal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Pharmacol.* 328:45-49.
- Morrison J, Farrell S, Johnson E, Deppmeier L, Moore CG, Grossmann E. 1995b. Structure and composition of the rodent lamina cribrosa. *Exp Eye Res.* 60:127-135.
- Morrison JC, Cepurna WO, Johnson EC. 1999. Modeling glaucomatous optic nerve damage. *Int Ophthalmol Clin.* 39:29-41.
- Morrison JC, Fraunfelder FW, Milne ST, Moore CG. 1995a. Limbal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36:751-756.
- Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO. 2008. Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res.* 173:285-301.
- Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, Jia L. 2005. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res.* 24:217-240.
- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. 1997. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res.* 64:85-96.
- Morrison JC, Cepurna Ying Guo WO, Johnson EC. 2011. Pathophysiology of human glaucomatous optic nerve damage: insights from rodent models of glaucoma. *Exp Eye Res.* 93:156-164.
- Moura AL, Nagy BV, La Morgia C, Barboni P, Oliveira AG, Salomão SR, Berezovsky A, de Moraes-Filho MN, Chicani CF, Belfort R Jr, Carelli V, Sadun AA, Hood DC, Ventura DF. 2013. The pupil light reflex in Leber's hereditary optic neuropathy: evidence for preservation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:4471-4477.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 116:201-211.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Alburquerque-Bejar JJ, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2012. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One.* 7:e49830.

- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M. 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.* 50:3860-3868.
- Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2014. Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front Neuroanat.* 8:99.
- Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2015. Two methods to trace retinal ganglion cells with fluorogold: From the intact optic nerve or by stereotactic injection into the optic tract. *Exp Eye Res.* 131:12-19.
- Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI. 2006. Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci.* 26:12633-12641.
- Nash MS, Osborne NN. 1999. Assessment of Thy-1 mRNA levels as an index of retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:1293-1298.
- Nayak SK, Jegla T, Panda S. 2007. Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cell Mol Life Sci.* 64:144-154.
- Neufeld AH. 1999. Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 117:1050-1056.
- Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, Valiente-Soriano FJ, Yang Z, Davis CH, Bedont JL, Son JL, Wei JO, Buchman VL, Zack DJ, Vidal-Sanz M, Ellisman MH, Marsh-Armstrong N. 2011. Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:1176-1181.
- Nishimura Y. 1996. Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors mediating contractions in basilar arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 117:1325-1333.
- Nissen C, Sander B, Milea D, Kolko M, Herbst K, Hamard P, Lund-Andersen H. 2014. Monochromatic Pupillometry in Unilateral Glaucoma Discloses no Adaptive Changes Subserved by the ipRGCs. *Front Neurol.* 5:15.
- Nork TM, Ver Hoeve JN, Poulsen GL, Nickells RW, Davis MD, Weber AJ, Vaegan, Sarks SH, Lemley HL, Millecchia LL. 2000. Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Arch Ophthalmol.* 118:235-245.
- O'Leary DDM, Fawcett JW, Cowan WM. 1986. Topographic targeting errors in the retinocollicular projection and their elimination by selective ganglion cell death. *J Neurosci.* 6:3692-3705.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2004. "Causes and magnitude of blindness and visual impairment". Fact Sheet N°282 November.
- Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 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.* 51:3171-3183.
- Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2013. Total number and spatial distribution of mouse cones. *Ophthalmic Res.* 50:27-53.
- Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2015. Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors. *Exp Eye Res.* 132:17-33.
- Osborne NN, DeSantis L, Bae JH, Ugarte M, Wood JP, Nash MS, Chidlow G. 1999. Topically applied betaxolol attenuates NMDA-induced toxicity to ganglion cells and the effects of ischaemia to the retina. *Exp Eye Res.* 69:331-342.
- Otori Y. 2008. Use of Purified Retinal Ganglion Cells for an In Vitro Model to Study Glaucoma. *Ophthalmology Research: Mechanisms of the Glaucomas*, Humana Press, Totowa, NJ, VI, 601-607.
- Panda S, Jonas JB. 1992a. Inner nuclear layer of the retina in eyes with secondary angle-block glaucoma. *Ophthalmology.* 89:468-471.
- Panda S, Jonas JB. 1992b. Decreased photoreceptor count in human eyes with secondary angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33:2532-2536.

- Pang IH, Clark AF. 2007. Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J Glaucoma*. 16:483-505.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Nadal-Nicolás F, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009b. Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: a comparative study. *Vision Res*. 49:2808-2825.
- Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009a. Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp Eye Res*. 89:32-41.
- Pascale A, Drago F, Govoni S. 2012. Protecting the retinal neurons from glaucoma: lowering ocular pressure is not enough. *Pharmacol Res*. 66:19-32.
- Pastor Jimeno J.C. 2002. *Guiones de Oftalmología*. McGraw Hill-interamericana.
- Paxinos G, Franklin KB. 2001. *Atlas; The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press.
- Pease ME, Hammond JC, Quigley HA. 2006. Manometric calibration and comparison of TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice. *J Glaucoma*. 15:512-519.
- Pease ME, Zack DJ, Berlinicke C, Bloom K, Cone F, Wang Y, Klein RL, Hauswirth WW, Quigley HA. 2009. Effect of CNTF on retinal ganglion cell survival in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50:2194-2200.
- Peinado-Ramón P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 1996. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 37:489-500.
- Pérez MT, Caminos E. 1995. Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett*. 183:96-99.
- Pérez de Lara MJ, Santano C, Guzmán-Aránguez A, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, de la Villa P, Pintor J. 2014. Assessment of inner retina dysfunction and progressive ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res*. 122:40-49.
- Pérez de Sevilla Müller L, Sargoy A, Rodríguez AR, Brecha NC. 2014. Melanopsin ganglion cells are the most resistant retinal ganglion cell type to axonal injury in the rat retina. *PLoS One*. 9:e93274.
- Pérez-Rico C, de la Villa P, Arribas-Gómez I, Blanco R. 2010. Evaluation of functional integrity of the retinohypothalamic tract in advanced glaucoma using multifocal electroretinography and light-induced melatonin suppression. *Exp Eye Res*. 91:578-583.
- Perry VH. 1979. The ganglion cell layer of the retina of the rat: A Golgi study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 204:363-375.
- Perry VH. 1981. Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience*. 6:931-944.
- Perry VH, Morris RJ, Raisman G. 1984. Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve?. *J Neurocytol*. 13:809-824.
- Prasanna G, Krishnamoorthy R, Clark AF, Wordinger RJ, Yorio T. 2002. Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43:2704-2713.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. 1998. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:340-345.
- Provencio I, Rodríguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*. 20:600-605.
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. 2002. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*. 415:493.
- Quigley HA, Anderson DR. 1976. The dynamics and location of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in primate optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 15:606-616.
- Quigley HA, Anderson DR. 1977. Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 16:640-644.
- Quigley HA, Hohman RM. 1983. Laser energy levels for trabecular meshwork damage in the primate eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 24:1305-1307.

- Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, Mitchell RS. 2000. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:3460-3466.
- Quigley HA, Green WR. 1979. The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology.* 86:1803-1830.
- Quigley HA. 1999. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 18:39-57.
- Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J. 1996. Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res.* 36:2029-2036.
- Robinson GA, Madison RD. 2004. Axotomized mouse retinal ganglion cells containing melanopsin show enhanced survival, but not enhanced axon regrowth into a peripheral nerve graft. *Vision Res.* 44:2667-2674.
- Rodieck RW. 1979. Visual pathways. *Annu Rev Neurosci.* 2:193-225.
- Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM. 2014. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation.* 11:133.
- Rudnicka AR, Mt-Isa S, Owen CG, Cook DG, Ashby D. 2006. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:4254-4261.
- Rudzinski M, Wong TP, Saragovi HU. 2004. Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol.* 58:341-354.
- Saeki T, Aihara M, Ohashi M, Araie M. 2008. The efficacy of TonoLab in detecting physiological and pharmacological changes of mouse intraocular pressure--comparison with TonoPen and microneedle manometry. *Curr Eye Res.* 33:247-252.
- Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, De la Villa P, Vidal-Sanz M. 2009c. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in adult albino swiss mice retina. *Mol Vis;* 15:2578-2598.
- Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano F, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009a. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerised analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res.* 49:636-646.
- Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2009b. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49:115-126.
- Salinas-Navarro M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axoplasmic flow leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res.* 90:168-183.
- Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2000. Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol.* 417:431-447.
- Sánchez-Migallón MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. 2011. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res.* 92:260-267.
- Sandalon S, Könnicke B, Levkovitch-Verbin H, Simons M, Hein K, Sättler MB, Bähr M, Ofri R. 2013. Functional and structural evaluation of lamotrigine treatment in rat models of acute and chronic ocular hypertension. *Exp Eye Res.* 115:47-56.
- Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ. 2010. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:207-216.
- Savinova OV, Sugiyama F, Martin JE, Tomarev SI, Paigen BJ, Smith RS, John SW. 2001. Intraocular pressure in genetically distinct mice: an update and strain survey. *BMC Genet.* 2:12.
- Sauvé Y, Girman SV, Wang S, Lawrence JM, Lund, RD. 2001. Progressive visual sensitivity loss in the Royal College of Surgeons rat: perimetric study in the superior colliculus. *Neuroscience* 103:51-63.
- Sauvé Y, Girman SV, Wang S, Lawrence JM, Lund RD. 2002. Preservation of visual responsiveness in the superior colliculus of RCS rats after retinal pigment epithelium cell transplantation. *Neuroscience* 114:389-401.

- Sawada A, Neufeld AH. 1999. Confirmation of the rat model of chronic moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res.* 69:525-531.
- Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW. 2001. Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis.* 7:192-201.
- Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickells RW. 2006. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci.* 7:66.
- Schlamp CL, Montgomery AD, Mac Nair CE, Schuart C, Willmer DJ, Nickells RW. 2013. Evaluation of the percentage of ganglion cells in the ganglion cell layer of the rodent retina. *Mol Vis.* 19:1387-1396.
- Schmidt T, Rupp A, Chew K, Yungheer B, Cui Y, Wess J, Park K, Hattar S. 2014a. A retinal projection to the iris mediates pupil constriction. *ARVO Meeting Abstracts, 2014.* 55:1231.
- Schmidt TM, Chen SK, Hattar S. 2011. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* 34:572-580.
- Schremser JL, Williams TP. 1992. Photoreceptor plasticity in the albino rat retina following unilateral optic nerve section. *Exp Eye Res.* 55:393-399.
- Sefton AJ, Dreher B. 1985. Visual system. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, vol. 2. Academic Press, New York, pp. 169-222.
- Sefton AJ, Dreher B, Harvey A. 2004. Visual system. In: Paxinos G, editors. *The rat nervous system*. USA: Elsevier. 1083–1165.
- Sefton AJ, Dreher B, Harvey AR. 2004. Visual system. In: G. Paxinos, editor. *The rat nervous system. A handbook for neuroscientists*. 3rd ed. Sydney: Academic Press; p. 1083-1165.
- Seigel GM. 1999. The golden age of retinal cell culture. *Mol Vis.* 5:4.
- Sellés-Navarro I, Villegas-Pérez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gómez M, Vidal-Sanz M. 1996. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals: A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37:2002-2014.
- Semo M, Gias C, Ahmado A, Vugler A. 2014. A role for the ciliary marginal zone in the melanopsin-dependent intrinsic pupillary light reflex. *Exp Eye Res.* 119:8-18.
- Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen AE, Lawrence JM, Tomita H, Coffey PJ, Vugler AA. 2010. Dissecting a role for melanopsin in behavioural light aversion reveals a response independent of conventional photoreception. *PLoS ONE.* 5:e15009.
- Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. 1995. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res.* 61:379-382.
- Shields MB. 2004. *Shields' Textbook of Glaucoma*. Textbook of glaucoma 5 ed: Williams and Wilkins. Baltimore; USA.
- Siliprandi R, Canella R, Carmignoto G, Schiavo N, Zanellato A, Zanoni R, Vantini G. 1992. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina. *Vis Neurosci.* 8:567-573.
- Siminoff R, Schwassmann HO, Kruger L. 1966. An electrophysiological study of the visual projection to the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol.* 127:435-447.
- Simon DK, O'Leary DM. 1990. Limited topographic specificity in the targeting and ching of mammalian retinal axons. *Dev Biol.* 137:125-134.
- Sliney DH. 1997. Ocular exposure to environmental light and ultraviolet--the impact of lid opening and sky conditions. *Dev Ophthalmol* 27:63-75.
- Smith RS, Zabaleta A, Kume T, Savinova OV, Kidson SH, Martin JE, Nishimura DY, Alward WL, Hogan BL, John SW. 2000. Haploinsufficiency of the transcription factors FOXC1 and FOXC2 results in aberrant ocular development. *Hum Mol Genet.* 9:1021-1032.
- Smith RS, Zabaleta A, Savinova OV, John SW. 2001. The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death. *BMC Dev Biol.* 1:3.
- So KF, Yip HK. 1998. Regenerative capacity of retinal ganglion cells in mammals. *Vision Res.* 38:1525-1535.
- Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. 2007. Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *J Comp Neurol.* 501:866-878.

- Son JL, Soto I, Oglesby E, Lopez-Roca T, Pease ME, Quigley HA, Marsh-Armstrong N. 2010. Glaucomatous optic nerve injury involves early astrocyte reactivity and late oligodendrocyte loss. *Glia*. 58:780-789.
- Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, Inman DM, Vetter ML, Horner PJ, Marsh-Armstrong N. 2008. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci*. 28:548-561.
- Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N. 2011. Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52:435-441.
- Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML. 2006. Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47:977-985.
- Stein BE. 1984. Development of the superior colliculus. *Ann Rev Neurosci*. 7:95-125.
- Stokely ME, Brady ST, Yorio T. 2002. Effects of endothelin-1 on components of anterograde axonal transport in optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43:3223-3230.
- Stringham JM, Fuld K, Wenzel AJ. 2003. Action spectrum for photophobia. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*. 20:1852-1858.
- Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y. 1999. Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40:3084-3090.
- Sugiyama T, Moriya S, Oku H, Azuma I. 1995. Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies. *Surv Ophthalmol*. 39 Suppl 1:S49-56.
- Sun Q, Ooi VE, Chan SO. 2001. N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in adult rat retina is antagonized by single systemic injection of MK-801. *Exp Brain Res*. 138:37-45.
- Surgucheva I, Weisman AD, Goldberg JL, Shnyra A, Surguchov A. 2008. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 14:1540-1548.
- Szel A, Röhlich P, van Veen T. 1993. Short-wave sensitive cones in the rodent retinas. *Exp Eye Res*. 57:503-505.
- Tezel G, Chauhan BC, LeBlanc RP, Wax MB. 2003. Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:3025-3033.
- Thanos S. 1993. Function-dependent labelling of microglial cells by means of carbocyanine dyes in vivo. *Clin Neuropathol*. 12:298-301.
- Thanos S, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ. 1987. The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res*. 406:317-321.
- Thanos S. 1988. Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites in the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments. *Cell Tissue Res*. 254:599-609.
- Triviño A, Ramírez JM, Salazar JJ, Ramírez AI, García-Sánchez J. 1996. Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision Res*. 36:2015-2028.
- Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H, Ozawa H. 1998. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol*. 42:337-344.
- Urcola JH, Hernández M, Vecino E. 2006. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res*. 83:429-437.
- Vaegan, Graham SL, Goldberg I, Buckland L, Hollows FC. 1995. Flash and pattern electroretinogram changes with optic atrophy and glaucoma. *Exp Eye Res*. 60:697-706.
- Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vugler AA, Vidal-Sanz M. 2014. Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Front Neuroanat*. 8:131.
- Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez López M, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. 2015a. Effects of ocular hypertension in the visual system of pigmented mice. *Plos One*. 10:e0121134.
- Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro MA, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vidal-Sanz M. 2015b. BDNF rescues RGCs but not ipRGCs in ocular hypertensive albino rat retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 56:1924-1936

- Van der Zypen E. 1977. Experimental morphological study on structure and function of the filtration angle of the rat eye. *Ophthalmologica*. 174:285-298.
- Van Gelder RN. 2003. Making (a) sense of non-visual ocular photoreception. *Trends Neurosci*. 26:458-461.
- Vecino E, Caminos E, Ugarte M, Martín-Zanca D, Osborne NN. 1998. Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptors in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion. *Gen Pharmacol*. 30:305-314.
- Viczian AS. 2013. Advances in Retinal Stem Cell Biology. *J Ophthalmic Vis Resv*. 8:147-159.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. 1991. Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol*. 20:940-952.
- Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Perez MP, Thanos S, Aguayo AJ. 1987. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci*. 7:2894-2909.
- Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Sellés-Navarro I, Rodríguez E, Mayor-Torroglosa S, Villegas-Perez MP. 2000. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neuroto Res*. 2:215-227.
- Vidal-Sanz M, Lafuente MP, Mayor S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP. 2001. Retinal ganglion cell death induced by retinal ischemia. neuroprotective effects of two alpha-2 agonists. *Surv Ophthalmol*. 45 Suppl 3:S261-7; discussion S273-6.
- Vidal-Sanz M, Avilés-Trigueros M, Whiteley SJ, Sauvé Y, Lund RD. 2002. Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Prog Brain Res*. 137:443-452.
- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, de Imperial JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. 2012. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res*. 31:1-27.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP, Bray GM, Aguayo AJ. 1988. Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp Neurol*. 102:92-101.
- Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM, Aguayo AJ. 1993. Use of peripheral nerve grafts to study regeneration after CNS injury. *Neuroprotocols*. 3:29-33.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. 1988. Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci*. 8:265-280.
- Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ. 1993. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol*. 24:23-36.
- Volgyi B, Chheda S, Bloomfield SA. 2009. Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 512:664-87.
- Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, Hyman BT, Sabel BA, Dreyer EB. 1996. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 37:1618-1624.
- Vugler AA, Semo M, Joseph A, Jeffery G. 2008. Survival and remodeling of melanopsin cells during retinal dystrophy. *Vis Neurosci* 25:125-138.
- Vugler A, Semo M, Ortín-Martínez A, Rojanasakul A, Nommiste B, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Coffey P, Vidal-Sanz M, Gias C. 2015. A role for the outer retina in development of the intrinsic pupillary light reflex in mice. *Neuroscience*. 286:60-78.
- Wang X, Tay SS, Ng YK. 2000. An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res*. 132:476-484.
- Wang HZ, Lu QJ, Wang NL, Liu H, Zhang L, Zhang GL. 2008. Loss of melanopsin-containing retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Chin Med J*. 121:1015-1019.
- Wetmore C, Ernfors P, Persson H, Olson L. 1990. Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp Neurol*. 109:141-152.
- Whitlock NA, McKnight B, Corcoran KN, Rodriguez LA, Rice DS. 2010. Increased intraocular pressure in mice treated with dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 51:6496-6503.
- Williams RW, Strom RC, Rice DS, Goldowitz D. 1996. Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J Neurosci*. 16:7193-7205.
- Wilson AM, Di Polo A. 2012. Gene therapy for retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. *Gene Ther*. 19:127-136.

- WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. 2001. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:2849-2855.
- Xiang M, Zhou L, Macke JP, Yoshioka T, Hendry SH, Eddy RL, Shows TB, Nathans J. 1995. The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci.* 15:4762-4785.
- Xiang M, Zhou L, Peng YW, Eddy RL, Shows TB, Nathans J. 1993. Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells. *Neuron.* 11:689-701.
- Xue T, Do MT, Riccio A, Jiang Z, Hsieh J, Wang HC, Merbs SL, Welsbie DS, Yoshioka T, Weissgerber P, Stolz S, Flockerzi V, Freichel M, Simon MI, Clapham DE, Yau KW. 2011. Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature.* 479:67-73.
- Yokohama S. 2000. Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog Retin Eye Res.* 19:385-419
- Yoles E, Wheeler LA, Schwartz M. 1999. Alpha2-adrenoreceptor agonists are neuroprotective in a rat model of optic nerve degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:65-73.
- Yücel YH, Zhang Q, Weinreb RN, Kaufman PL, Gupta N. 2003. Effects of retinal ganglion cell loss on magno-, parvo-, koniocellular pathways in the lateral geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 22:465-481.
- Yücel YH, Zhang Q, Gupta N, Kaufman PL, Weinreb RN. 2000. Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 118:378-384.
- Yücel YH, Zhang Q, Weinreb RN, Kaufman PL, Gupta N. 2001. Atrophy of relay neurons in magno- and parvocellular layers in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:3216-3222.
- Yun H, Lathrop KL, Yang E, Sun M, Kagemann L, Sun M, Kagemann L, Fu V, Stolz DB, Schuman JS, Du Y. 2014. A laser-induced mouse model with long-term intraocular pressure elevation. *PLoS One.* 9:e107446.
- Zaidi FH, Hull JT, Peirson SN, Wulff K, Aeschbach D, Gooley JJ, Brainard GC, Gregory-Evans K, Rizzo JF, Czeisler CA, Foster RG, Moseley MJ, Lockley SW. 2007. Short-Wavelength Light Sensitivity of Circadian, Pupillary, and Visual Awareness in Humans Lacking an Outer Retina. *Current Biology.* 17:2122–2128.
- Zhan GL, Miranda OC, Bito LZ. 1992. Steroid glaucoma: corticosteroid-induced ocular hypertension in cats. *Exp Eye Res.* 54:211-218.
- Zhang DQ, Wong KY, Sollars PJ, Berson DM, Pickard GE, McMahon DG. 2008. Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:14181-14186.
- Zhang Q, Vuong H, Huang X, Wang Y, Brecha NC, Pu M, Gao J. 2013. Melanopsin-expressing retinal ganglion cell loss and behavioral analysis in the Thy1-CFP-DBA/2J mouse model of glaucoma. *Sci China Life Sci.* 56:720-730.

9. ANEXO I

9. ANEXO I



Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina

Francisco J. Valiente-Soriano^{1†}, Diego García-Ayuso^{1†}, Arturo Ortín-Martínez^{1†}, Manuel Jiménez-López¹, Caridad Galindo-Romero¹, María Paz Villegas-Pérez¹, Marta Agudo-Barriuso¹, Anthony A. Vugler^{2*} and Manuel Vidal-Sanz^{1*}

¹ Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia, e Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria-Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (IMIB-ARRIXACA), Murcia, Spain

² Department of Ocular Biology and Therapeutics, UCL-Institute of Ophthalmology, London, UK

Edited by:

Yun-Qing Li, The Fourth Military Medical University, China

Reviewed by:

Jose M. Garcia-Fernandez, University of Oviedo, Spain
Jens Hannibal, Bispebjerg Hospital, Denmark

***Correspondence:**

Anthony A. Vugler, Department of Ocular Biology and Therapeutics, UCL-Institute of Ophthalmology, 11-43 Bath street, London EC1V9EL, UK

e-mail: a.vugler@ucl.ac.uk;
Manuel Vidal-Sanz, Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia, e Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria-Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (IMIB-ARRIXACA), 30100 Murcia, Spain

e-mail: manuel.vidal@um.es

[†]These authors have contributed equally to this work.

Here we have studied the population of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) in adult pigmented and albino mice. Our data show that although pigmented (C57Bl/6) and albino (Swiss) mice have a similar total number of ipRGCs, their distribution is slightly different: while in pigmented mice ipRGCs are more abundant in the temporal retina, in albinos the ipRGCs are more abundant in superior retina. In both strains, ipRGCs are located in the retinal periphery, in the areas of lower Brn3a⁺RGC density. Both strains also contain displaced ipRGCs (d-ipRGCs) in the inner nuclear layer (INL) that account for 14% of total ipRGCs in pigmented mice and 5% in albinos. Tracing from both superior colliculi shows that 98% (pigmented) and 97% (albino) of the total ipRGCs, become retrogradely labeled, while double immunodetection of melanopsin and Brn3a confirms that few ipRGCs express this transcription factor in mice. Rather surprisingly, application of a retrograde tracer to the optic nerve (ON) labels all ipRGCs, except for a sub-population of the d-ipRGCs (14% in pigmented and 28% in albino, respectively) and melanopsin positive cells residing in the ciliary marginal zone (CMZ) of the retina. In the CMZ, between 20% (pigmented) and 24% (albino) of the melanopsin positive cells are unlabeled by the tracer and we suggest that this may be because they fail to send an axon into the ON. As such, this study provides the first evidence for a population of melanopsin interneurons in the mammalian retina.

Keywords: melanopsin retinal ganglion cells, retinal topography, ciliary marginal zone, interneuron, displaced intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, Brn3a, OHSt-tracing, spatial distribution

INTRODUCTION

In the mammalian retina, melanopsin is expressed by a subset of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs), which also receive synaptic input from rods and cones (Dacey et al., 2005; Schmidt et al., 2008; Weng et al., 2013). These ipRGCs are required for non-image forming vision in mice (Guler et al., 2008) and are thought to integrate rod and cone signals with their own melanopsin-driven light responses to control important aspects of circadian behavior (Panda et al., 2002), pupil constriction (Lucas et al., 2003) and most recently, image forming vision (Brown et al., 2010, 2012; Ecker et al., 2010; Estevez et al., 2012; Allen et al., 2014; Schmidt et al., 2014a).

In mice, ipRGCs are a heterogeneous population, with at least five different subtypes described to date (Berson et al., 2010; Ecker et al., 2010; Jain et al., 2012; Karnas et al., 2013). The subtypes M1-M4 can be identified using immunohistochemistry

for melanopsin (Berson et al., 2010; Estevez et al., 2012), while M5 cells have only been identified using *Opn4.Cre* reporter mice (Ecker et al., 2010; Hughes et al., 2013). In terms of the topographic distribution of ipRGCs, it is known that in both rats (Hannibal et al., 2002; Hattar et al., 2002; Vugler et al., 2008; Galindo-Romero et al., 2013; Nadal-Nicolás et al., 2014) and mice (Hughes et al., 2013), the majority of melanopsin positive cells are located in dorsal retina with a melanopsin-rich plexus in the ciliary marginal zone (CMZ) of both species (Vugler et al., 2008; Semo et al., 2014). Topography of ipRGCs has also been shown to be an important factor in determining the spectral properties of their cone-based input (Estevez et al., 2012; Hughes et al., 2013).

Previous work from our laboratory has shown that rodents possess a horizontal visual streak of high RGC density just dorsal to the optic nerve (ON; Salinas-Navarro et al., 2009b,c;

Ortín-Martínez et al., 2010, 2014) and that, in rats, ipRGCs can be found at highest density just peripheral to this structure (Galindo-Romero et al., 2013; Nadal-Nicolás et al., 2014). Given the importance of mouse models in melanopsin research, we therefore decided to undertake a detailed study of ipRGC distribution in pigmented and albino mice, with reference to the general RGC population (as labeled by retrograde tracer and or Brn3a). The comparison between pigmented and albino mice is of particular importance given the use of albino rodents to study the melanopsin system (Hattar et al., 2002; Gooley et al., 2003; Hannibal et al., 2005; González-Menéndez et al., 2010; Xue et al., 2011; Esquivá et al., 2013).

Because melanopsin expression stops at the ON head, to date, most of our knowledge concerning the retinofugal projection of ipRGCs in mice comes from *tau-lacZ* and *Opn4.Cre* reporter mice (Hattar et al., 2006; Brown et al., 2010; Ecker et al., 2010; Chen et al., 2011), with only a few studies employing classical retrograde tracing techniques (Viney et al., 2007; Baver et al., 2008). The general opinion from these studies is that Brn3b negative M1 cells project to the suprachiasmatic nucleus (SCN), while other ipRGC subtypes project variably to the olivary pretectal nucleus (OPN), dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) and superior colliculus (SC; Chen et al., 2011; Schmidt et al., 2011).

In rodents, the vast majority of RGCs project to the SC (Linden and Perry, 1983; Hofbauer and Dräger, 1985; Salinas-Navarro et al., 2009b,c; Nadal-Nicolás et al., 2014), an important structure for controlling gaze-movements of the eyes/head and integrating multimodal sensory information to initiate target location and avoidance movements (May, 2006). In order to examine what proportion of ipRGCs project to the SC in mice, we have labeled this structure by applying hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt), a tracer that is actively transported in the retrograde direction from both superior colliculi (SCi).

Given recent findings that Brn3b negative M1 ipRGCs send retino-ciliary projections beyond the retinal boundary (Semo et al., 2014), we were also interested to determine if these cells send axons towards the brain, and to this end we retrogradely labeled the entire retinofugal projection from the ON. In addition to the CMZ population, we also studied the distribution of displaced ipRGCs (d-ipRGCs), the soma of which resides in the inner nuclear layer (INL). These cells are abundant in primate (Dacey et al., 2005; Jusuf et al., 2007) and rat (Nadal-Nicolás et al., 2014) retina but in mouse, their topographic distribution remains unknown (Berson et al., 2010; Jain et al., 2012; Karnas et al., 2013).

MATERIALS AND METHODS

ANIMAL HANDLING

Two-month-old female adult pigmented C57BL/6 ($n = 17$; 25–30 g) and albino Swiss ($n = 15$; 30–35 g) mice were obtained from the University of Murcia breeding colony. They were housed in a 12 h light 12 h dark light cycle with lights on at 08:00 and off at 20:00. Animal manipulations were carried out following the Spanish and European Union regulations for the use of animals in research (Council Directive 86/609/EEC), the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, and were approved by the Ethical and Animal Studies Committee of the University of Murcia (Murcia, Spain). For surgical manipulations,

Table 1 | Experimental design.

ipRGC population (2 month old mice)	C57BL/6 Pigmented	Swiss Albino
Untouched retinas: Number and distribution of ipRGCs vs. the general RGC population. Number of ipRGCs that express Brn3a.	16	11
Tracing from the optic nerve: Do all melanopsin ⁺ cells project their axons through the optic nerve?	12	8
Tracing from both superior colliculi: What proportion of ipRGCs become retrogradely labeled from the SCi?	7	10

Number of retinas analyzed per group and strain. SCi: superior colliculi.

mice were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (70 mg/kg Ketolar®, Pfizer, Alcobendas, Madrid, Spain) and xylazine (10 mg/kg Rompun®, Bayer, Kiel, Germany). To prevent corneal desiccation eyes were covered with an ocular ointment (Tobrex; Alcon S. A., Barcelona, Spain). All animals were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital (Dolethal® Vetoquinol, S.A., Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain). The experimental design is summarized in **Table 1**.

TRACING FROM THE SUPERIOR COLLICULI OR FROM THE OPTIC NERVE STUMP

To trace from both SCi, OHSt (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) diluted at 10% in 0.9% NaCl and 10% dimethyl-sulfoxide was applied to both SCi 1 week before processing, as previously described (Villegas-Pérez et al., 1996; Salinas-Navarro et al., 2009b). To trace from the ON, 3 days before processing, a small piece of gelatine sponge (Espingostan Film, Ferrosan A/S, Denmark) soaked in OHSt diluted at 6% in the same solution as above was applied to the ocular stump of the intraorbitally transected ON of both eyes, as previously described (Vidal-Sanz et al., 1988; Lafuente López-Herrera et al., 2002; Salinas-Navarro et al., 2009b).

TISSUE PROCESSING

All animals were euthanized between 10:00 and 12:00 in order to avoid the diurnal fluctuations in melanopsin expression reported by others (González-Menéndez et al., 2009; Hannibal et al., 2013). Mice were then perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Special care was taken to maintain the orientation of the eyes: (i) after anesthesia and before perfusion a suture was placed on the superior pole of each eye; (ii) the rectus muscle insertion into the superior part of the eye and the nasal caruncle were used as additional landmarks (Salinas-Navarro et al., 2009b,c). Both retinas were dissected and prepared as flattened whole-mounts by making four radial cuts (the deepest one in the superior pole) as previously described in detail (Salinas-Navarro et al., 2009b; Galindo-Romero et al., 2011, 2013).

For cross-sectional analysis, eyes from pigmented mice that had been labeled with OHSt applied to both SCi for 1 week ($n = 4$) or to the ON for 3 days ($n = 2$), respectively, were

enucleated and immunostained for melanopsin following previously described methods (Vugler et al., 2008; Ortín-Martínez et al., 2010; Galindo-Romero et al., 2011).

IMMUNOHISTOFLUORESCENCE

In all retinas, melanopsin and Brn3a were double immunodetected following previously described methods with established immunodetection protocols for retinal flatmounts where the vitreous is thoroughly cleaned before antibody incubation (Vugler et al., 2008; Nadal-Nicolás et al., 2009, 2012, 2014; Galindo-Romero et al., 2011, 2013). The primary antibody used to detect ipRGCs was the rabbit anti-melanopsin antibody UF006 (1:5000, AB-N38, Advance Targeting Systems, Thermo Scientific, Madrid, Spain). The general RGC population was detected using goat anti-Brn3a (1:500, C-20, Santa Cruz Biotechnologies Heidelberg, Germany) (Nadal-Nicolás et al., 2009, 2012; Galindo-Romero et al., 2011, 2013). The primary antibodies were then detected with the appropriate combination of fluorescently conjugated secondary antibodies: donkey anti-rabbit Alexa 594 and donkey anti-goat Alexa-488 (all diluted 1:500 and from Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain).

From previous studies in mice, rabbit polyclonal anti-melanopsin has been shown to detect 90% of ipRGCs in *Opn4^{Cre};Z/EG* reporter mice (Brown et al., 2010) and the UF006 antibody will recognize all M1 and M2 type ipRGCs in mice, together with some larger (possibly M4 type) ipRGCs (Karnas et al., 2013).

IMAGE ANALYSIS

Whole mounted retinas were analyzed for melanopsin, Brn3a and OHSt signals. To reconstruct retinal whole-mounts, retinal photographs were taken following previously described procedures that are standard in our laboratory (Salinas-Navarro et al., 2009a; Cuenca et al., 2010; Galindo-Romero et al., 2011, 2013; Sánchez-Migallón et al., 2011; Vidal-Sanz et al., 2012).

In brief, using an epifluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with a computer-driven motorized stage (ProScan H128 Series; Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK) controlled by image analysis software (Image-Pro Plus, IPP 5.1 for Windows; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), retinal multiframe acquisitions were photographed in a raster-scan pattern in which frames were captured side-by-side with no gap or overlap between them with a 20× objective (Plan-Neofluar, 20×/0.50; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany). Single frames were focused manually (see below) before the capture of each image, which was then fed into the IPP image analysis program. The scan area covers the entire retina, with a frame size of 0.2161 mm²/image in the mouse retina each at a resolution of 300 dots per inch. Reconstructed wholemounts were made up of 154 individual frames.

AUTOMATED QUANTIFICATION AND SPATIAL DISTRIBUTION OF Brn3a⁺RGCs

Brn3a⁺RGCs and RGCs traced from the SCi were automatically quantified following previously described methods that have been developed by our group (Salinas-Navarro et al., 2009b; Galindo-Romero et al., 2011, 2013; García-Ayuso et al., 2014). Briefly,

the individual fluorescent images taken for each retinal whole-mount were processed by a specific subroutine using the IPP macro language. After quantification, Brn3a⁺RGCs isodensity maps were constructed through a quadrant analysis as previously described in detail (Galindo-Romero et al., 2011, 2013).

QUANTIFICATION, SPATIAL DISTRIBUTION AND SOMA DIAMETER OF ipRGCs

Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the RGC layer were manually dotted on the retinal photomontage using the graphic editing program Adobe Photoshop CS 8.0.1 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA). Dots were automatically quantified and their retinal location was obtained using a modified IPP macro language routine as described (Galindo-Romero et al., 2013; Nadal-Nicolás et al., 2014). In brief: after marking the ON as a reference point and drawing the retinal contour, the retinal area and the number of dots representing ipRGCs and their *x, y* spatial location were exported to a spreadsheet (Office Excel 2000; Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

Intrinsically photosensitive retinal ganglion cell spatial distribution was studied using the k-nearest neighbor algorithm using a Java (Oracle Corporation, Redwood Shores, California, USA) application, as described (Galindo-Romero et al., 2013; Nadal-Nicolás et al., 2014). Briefly, the user fixed the radius of the study (0.165 mm) and imported the previously obtained spread sheet with the spatial information of the ipRGCs. Those cells within the fixed radius were counted as neighbors. Spatial information was used to plot every ipRGC, and the number of neighbors served to color each ipRGC within a color scale from purple (0–1 neighbors) to red (11 or more neighbors). Data gathered after the spatial analysis allowed as well, the extraction of the number of ipRGCs at a given distance from the ON in the whole retina and in each retinal quadrant. These data were subsequently represented in bar graphs (number of cells against distance from the ON). All plots were performed using SigmaPlot (SigmaPlot® 9.0 for Windows®; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA).

The method to count d-ipRGCs was similar to above. In brief, d-ipRGCs were studied in retinas traced from the ON and in these retinas Brn3a and melanopsin were double immunodetected. To investigate d-ipRGCs, each retina was photographed focusing on the INL. Each frame was focused first on the GCL, then the focus was changed to the INL and finally the image for the melanopsin signal in the INL was acquired. As reference, we used RGCs (traced and also Brn3a immunodetected) that were present in the GCL and also in the INL. After photographing the whole retina, all the frames focused on the INL were tiled as a photomontage.

For the CMZ counts, ipRGCs were included in the CMZ if they fell within ~100 μm of the retinal edge. Again, this population could be distinguished into orthotopic ipRGCs residing in the RGC layer and d-ipRGCs, which were displaced into the INL.

In addition, maps representing the distribution of ipRGCs from three superimposed retinas (normalized maps) as previously described by Nadal-Nicolás et al. (2014) (Figure 5). This was feasible because the retinas were of similar size, equally oriented and the maps were centered on the ON.

Soma diameter measurement was performed using a IPP routine where soma perimeter was defined and diameter measurements were calculated as the average length of diameters at two degree intervals passing through cell body centroid.

Cross-sections were examined on the fluorescence microscope to count and identify the location of displaced ipRGCs, and to ascertain whether they were also OHSt⁺.

CO-LOCALIZATION ANALYSES

To determine the percentage of ipRGCs in the ganglion cell layer that were retrogradely labeled from the ON, from the SCi and/or that expressed Brn3a, photomicrographs of different representative areas were acquired for each signal. Images were overlapped with Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS 8.0.1; Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) and the percentage of ipRGCs that colocalized with OHSt and/or Brn3a was calculated, with 100% representing the total number of ipRGCs counted.

In the analysis of the retinal CMZ, the whole retinal perimeter was analyzed in the most intact ($n = 3$) retinae from mice in each experimental group and ipRGCs were identified by OHSt traced from the ON or SCi. To assess whether the d-ipRGCs were OHSt positive, the retina was carefully examined under the microscope to visualize each d-ipRGC, whose position we knew from the previous photomontage. Changing the filter to visualize the tracer or melanopsin fluorescence, each d-ipRGC was dotted on the retinal photomontage using a color-code representing all possible combinations (OHSt⁺d-ipRGCs or OHSt⁻d-ipRGCs).

For cross-sectional analysis, cryostat sections from two pigmented mice retinae that had been labeled with OHSt applied to the ON were examined to ascertain whether d-ipRGCs were also OHSt⁺ and to determine their location within the retinal layers.

STATISTICS

Statistical analysis was done using SigmaStat® 3.1 for Windows® (SigmaStat® for Windows™ Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA). Kruskal–Wallis was used when comparing more than two groups and Mann–Whitney when comparing two groups only. For the comparison of ipRGC soma diameters between albino and pigmented mice, t tests were used unless otherwise stated. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

IDENTIFICATION OF ipRGCs AND Brn3a⁺ RGCs IN RETINAL WHOLE-MOUNTS

In albino and pigmented rats (Nadal-Nicolás et al., 2012; Galindo-Romero et al., 2013) and in pigmented mice (Jain et al., 2012) Brn3a is expressed by the majority of RGCs and by a minute proportion of ipRGCs. Thus, double immunodetection of Brn3a and melanopsin is a good approach to study in the same retina, but independently, the general population of RGCs and ipRGCs. Therefore, in this work, melanopsin was always double immunodetected with Brn3a as shown in **Figure 1**. Although most of the ipRGCs were Brn3a negative (**Figures 1A–D,Gb**),

co-localization analyses showed that in albino mice 0.78% of the ipRGCs were Brn3a⁺ (17 out of 2179 ipRGCs) while in the pigmented strain this proportion was 2.5 fold higher, (1.93%, 48 out of 2478 ipRGCs). **Figure 1Ga** shows a representative example of one of the few ipRGCs that co-expresses Brn3a.

As shown in **Figure 1**, the antibody employed in this study recognized ipRGCs of different size and staining intensity. The soma diameter of ipRGCs ranged from 8.5–21.4 μm (**Table 2**) and based on previous work (Berson et al., 2010; Estevez et al., 2012; Jain et al., 2012), our counts are most likely to include ipRGCs of the M1 and M2 subtype but may also include some of the less common M3 and larger M4 type cells.

RETINOFLUGAL PROJECTIONS OF ipRGCs

Neurons in the retina are classed as ganglion cells if they send their axon through the ON towards the brain. To verify that all melanopsin positive (M^+) cells are indeed RGCs, colocalization of melanopsin and OHSt was analyzed in retinae traced from the ON (**Table 3**). As expected, almost 100% of the ipRGCs were traced. In this analysis, the whole retina was examined sparing the CMZ (see below).

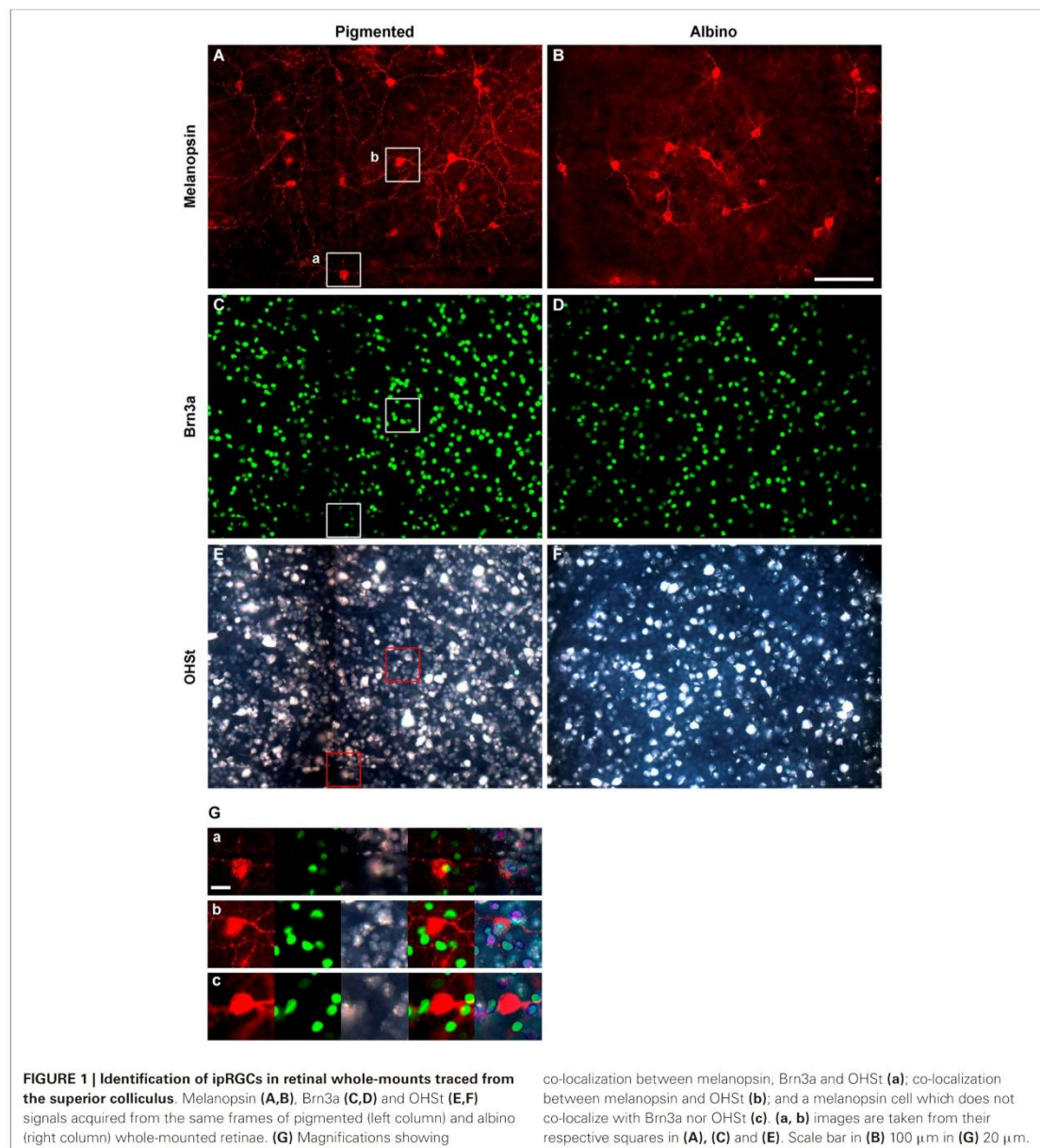
The SCi are the main retinorecipient structures in rodents (Linden and Perry, 1983; Hofbauer and Dräger, 1985; Salinas-Navarro et al., 2009b,c; Nadal-Nicolás et al., 2014) and in rats, the majority of ipRGCs (90.62% as detected by melanopsin immunohistochemistry) project to them (Galindo-Romero et al., 2013; Nadal-Nicolás et al., 2014). To understand whether this is also the case in mice, the proportion of OHSt positive ipRGCs was quantified in retinae traced from both SCi (**Table 3**). Our data shows that in both mice strains, the vast majority of the ipRGCs become retrogradely labeled when OHSt is applied to the SCi (See also **Figures 1A,B,E,F,G**).

RETROGRADE TRACING FROM THE ON FAILS TO LABEL A SUBSET OF ipRGCs IN CMZ

Recently it has been reported that in the CMZ of the C3H/He wildtype mouse retina, there exists a discrete plexus of ipRGCs with short melanopsin positive retino-ciliary projections (Semo et al., 2014). Thus, in order to determine if these melanopsin positive (M^+) cells send axons into the ON towards the brain, we quantified/mapped the distribution of M^+ CMZ cells in both pigmented and albino mice following retrograde labeling with OHSt from either the ON or the SCi (**Figures 2, 3**).

In retinae traced from the ON, colocalization of melanopsin and OHSt was carefully examined in the CMZ from nasal and temporal hemiretina in both pigmented and albino mice (**Figures 2A,B**). As shown in the quantitative results (**Figure 2C**), the albino strain has, on average, almost double the number of M^+ cells in the CMZ than the pigmented and this difference is statistically significant for the nasal retina ($p = 0.003$). Nevertheless, in both strains there are more M^+ cells in the nasal CMZ (70% reside in nasal CMZ for pigmented mice and 66% reside nasally for albinos).

Surprisingly, in comparison to the whole retinal counts (**Table 3**), we found a much higher percentage (up to 25%) of M^+ cells in the CMZ that were unlabeled by OHSt (M^+OHSt^-). As shown in **Figure 2C**, the proportion of M^+OHSt^- to M^+OHSt^+



cells was higher in the nasal vs. the temporal CMZ for both strains. The nasal predisposition for M^+ cells is also illustrated in the representative plots of **Figure 3**.

Interestingly, the numbers of M^+OHSt^- and M^+OHSt^+ cells in the nasal and temporal CMZ were very similar between animals traced from the ON or SCi: for the nasal hemiretina of pigmented

mice, ON tracing produced $26 \pm 2 M^+OHSt^+$ and $8 \pm 2 M^+OHSt^-$ cells, while SCi tracing resulted in $24 \pm 1 M^+OHSt^+$ and $9 \pm 1 M^+OHSt^-$ cells. For the nasal hemiretina of albinos, ON tracing produced $41 \pm 13 M^+OHSt^+$ and $15 \pm 4 M^+OHSt^-$ cells, while SCi tracing produced $33 \pm 4 M^+OHSt^+$ and $18 \pm 1 M^+OHSt^-$ cells. For the temporal hemiretina of pigmented mice,

Table 2 | Soma diameter of ipRGCs and d-ipRGCs in pigmented and albino mice.

		Pigmented		Albino	
		ipRGCs <i>n</i> = 103	d-ipRGCs <i>n</i> = 69	ipRGCs <i>n</i> = 80	d-ipRGCs <i>n</i> = 30
Soma diameter (μm)	Mean \pm SD	13.5 \pm 1.8	11.8 \pm 1.6	14.8 \pm 2.2	12.9 \pm 2.3
	Max	17.7	15.8	21.4	17.5
	Min	9.5	8.5	9.7	8.6

Mean \pm standard deviation (SD), maximum (Max) and minimum (Min) soma diameter (μm) of ipRGCs and d-ipRGC measured in three pigmented and three albino retinae. *n*: number of ipRGCs analyzed.

Table 3 | ipRGCs project largely to the superior colliculi.

	Tracing from	Number of ipRGCs analyzed	OHSt and melanopsin
Pigmented	SCi	1423	1401 (98.4%)
	ON	1055	1052 (99.7%)
Albino	SCi	1438	1398 (97.2%)
	ON	741	733 (98.9%)

The percentage of colocalization is shown in brackets where 100% represents the total number of ipRGCs analyzed. SCi: superior colliculi. ON: optic nerve.

ON tracing produced 12 ± 4 M⁺OHSt⁺ and 2 ± 0 M⁺OHSt⁻ cells, while SCi tracing gave 10 ± 3 M⁺OHSt⁺ and 3 ± 1 M⁺OHSt⁻ cells. For the temporal hemiretina of albinos, ON tracing produced 20 ± 8 M⁺OHSt⁺ and 6 ± 2 M⁺OHSt⁻ cells, while SCi tracing produced 19 ± 2 M⁺OHSt⁺ and 6 ± 2 M⁺OHSt⁻ cells. We were unable to detect any significant differences between the numbers of M⁺ cells in the CMZ of mice traced from the ON and SCi. **Figure 3** shows representative plots of M⁺CMZ cells in pigmented and albino retinae traced from either the ON or SCi.

This neuroanatomical tracing data strongly suggests that M⁺ cells in the CMZ of mice should be classified as either ipRGCs (M⁺OHSt⁺) or M⁺OHSt⁻ cells, the latter may be some type of interneuron or retino-ciliary projection neuron.

TOTAL NUMBER, SIZE AND SPATIAL DISTRIBUTION OF ipRGCs IN THE RGC LAYER

We quantified ipRGCs in the RGC layer of retinae with and without tracing. Automated quantification of OHSt⁺RGCs was obtained for retinae traced from the SCi. The data in **Table 4** shows that the detection of ipRGCs is not affected by tracing.

As previously reported (Salinas-Navarro et al., 2009b), the albino strain has more RGCs than the pigmented one. With respect to Brn3a⁺RGCs, these are 95% and 98.5% of the projection to the SC in pigmented and albino mice, respectively. The ipRGCs accounted for 2.5% and 2.1% of the total OHSt⁺ traced population in pigmented and albino animals respectively. There was no statistically significant difference between total ipRGC numbers in pigmented or albino mice. We did however detect a statistically significant difference in the mean soma diameter of ipRGCs in pigmented ($n = 103$ cells, $13.5 \pm 1.8 \mu\text{m}$) vs. albino

($n = 80$ cells, $14.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$) mice (**Table 2**, *t* test, $P < 0.001$). In terms of total ipRGC numbers counted, the 1021 ± 109 reported here for C57BL/6 mice is comparable to the 1194 ± 281 reported for the same strain in a recent study (Jain et al., 2012) but somewhat less than the 1600–1800 reported by Hughes et al. (2013).

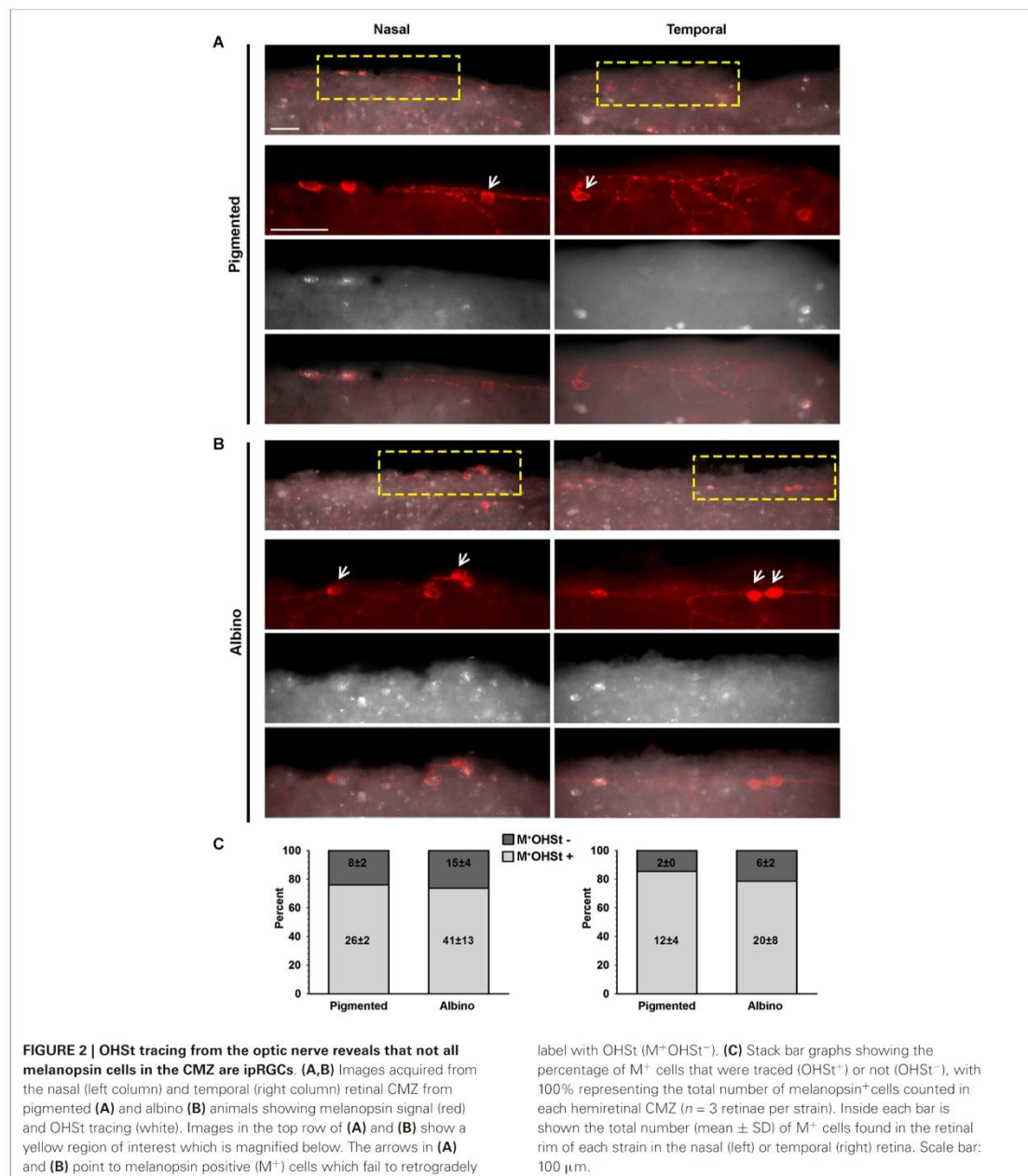
The topography of ipRGCs and Brn3a⁺RGCs is shown in **Figure 4**. Here, Brn3a distribution is represented by isodensity maps (**Figures 4A–H**), while the distribution of ipRGCs is represented by neighbor maps (**Figures 4A'–H'**). In both strains, ipRGCs are more abundant in the periphery of the retina and they appear located in the areas of lower Brn3a⁺RGC density (See **Figure 4** and quantitative analysis in **Figures 5B,E**).

However, there are subtle differences between strains, with pigmented mice showing a more highly populated temporal retina (Mann Whitney test, $p = 0.001$; **Figures 5A,C**), and albinos displaying more ipRGCs in the superior retina (Mann Whitney test, $p = 0.001$; **Figures 4D,F**). Furthermore, in the pigmented C57BL/6 mice, ipRGCs form a C like shape from the supero-temporal to the infero-temporal quadrant. In the albino mice, however, ipRGCs are denser in the superior retina forming an arc, above the highest Brn3a⁺RGC densities (**Figures 4, 5**). To date, the only other study to examine ipRGC distribution in the mouse retina showed a concentration of ipRGCs in the dorsal retina (Hughes et al., 2013). Our topography data in C57BL/6 mice differs somewhat from that reported by Hughes et al. (2013) using the same strain of mouse.

TOTAL NUMBER AND SPATIAL DISTRIBUTION OF d-ipRGCs

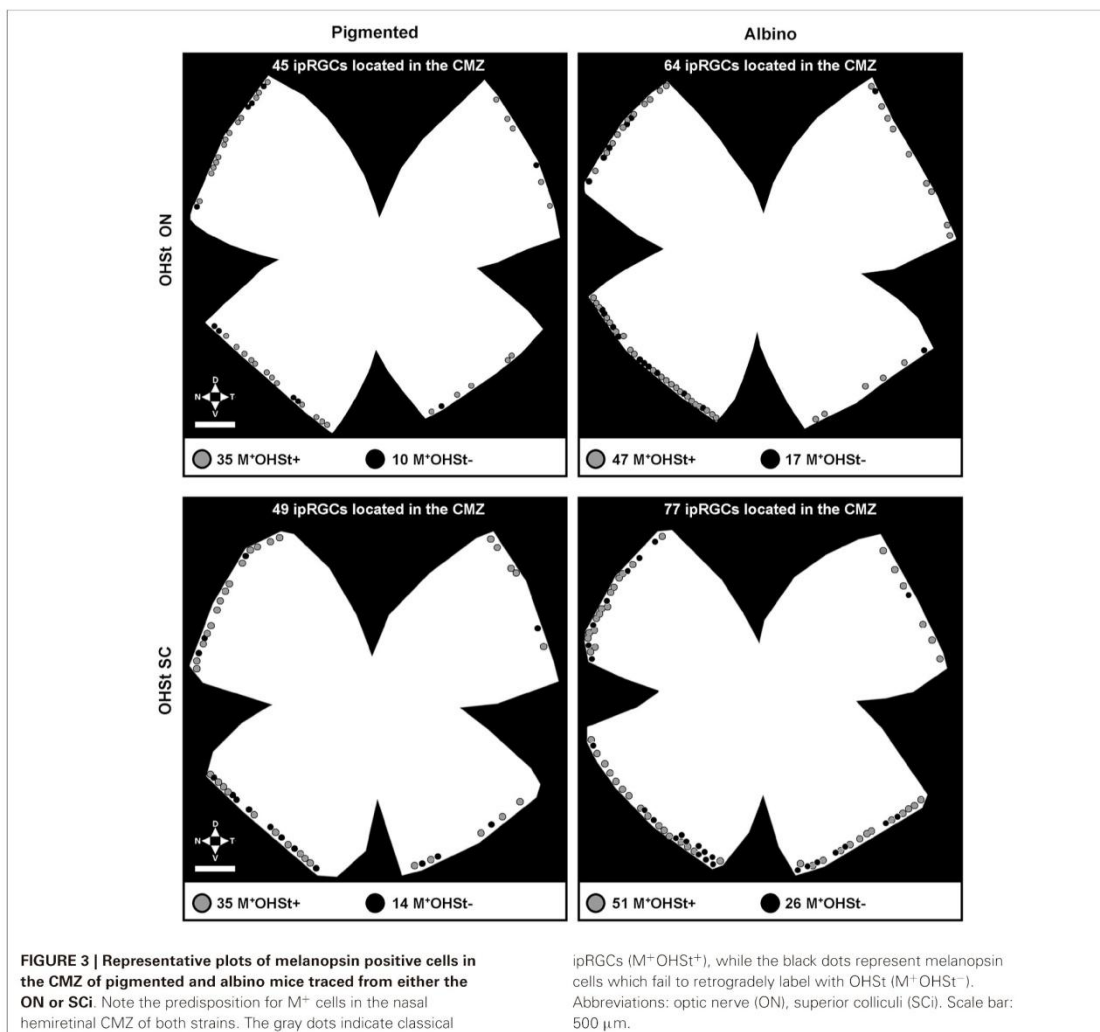
In $n = 4$ eyes from pigmented animals retrogradely labeled with OHSt from the SCi, $15 \mu\text{m}$ thick frozen cryostat cross sections were examined for the location of d-ipRGCs. A total of 74 d-ipRGCs were identified in 91 sections analyzed, and everyone was found in the INL with the exception of one cell that was located in the IPL (**Figure 6**). In addition, cryostat sections from two pigmented mice retinae that had been labeled with OHSt applied to the ON were examined to ascertain whether d-ipRGCs were also OHSt⁺ and to determine their location within the retinal layers. In a total of 95 sections analyzed, 71 d-ipRGCs were identified in the INL with the exception of one cell that was located in the IPL, out of these 71 d-ipRGCs, 5 lacked OHSt labeling (**Figure 6D**). Displaced ipRGCs were quantified in $n = 3$ flat-mounted retinae from both pigmented and albino animals retrogradely labeled with OHSt from the ON. In both strains they comprised a small population of cells that were most numerous in dorsal retina (**Figure 7**). The d-ipRGCs could also be identified in the retinal CMZ, where they appeared most common nasally, with a slightly greater incidence of M⁺OHSt⁻ cells in the nasal hemiretina (**Figure 8**). In terms of mean soma diameter, the d-ipRGCs in both pigmented mice ($n = 69$ cells, $11.8 \pm 1.7 \mu\text{m}$) and albino mice ($n = 30$ cells, $12.9 \pm 2.3 \mu\text{m}$) were significantly smaller than their respective counterparts in the RGC layer (both *t* tests, $P < 0.001$).

The d-ipRGCs were far more common in pigmented C57BL/6 mice (mean \pm SD of 147 ± 6.2) than albinos (46.3 ± 11) and accounted for $\sim 14\%$ and $\sim 5\%$ of their total ipRGC populations, respectively (for total ipRGC numbers see **Table 4**). They



mainly appeared $OHSt^+$, however, in comparison to conventional ipRGCs labeled from the ON (see **Table 3**), $\sim 14\%$ of the d-ipRGCs were unlabeled by OHSt in pigmented mice (mean of $21 \pm 2 M^+OHSt^-$), rising to $\sim 28\%$ (mean of $13 \pm 3 M^+OHSt^-$) in albinos. These cells appeared morphologically similar but we

found it difficult to locate an obvious axon on M^+OHSt^- cells. As shown in **Figure 8**, for pigmented animals, the high percentage of M^+OHSt^- d-ipRGCs may be accounted for in part by approximately half of these cells residing in the CMZ. However, this is not the case for M^+OHSt^- d-ipRGCs in albino mice,



most of which reside outside the CMZ (see bottom two graphs in **Figure 8**).

The disparity between retrograde co-localization data for conventional ipRGCs (located in the RGC layer) and d-ipRGCs (located in the INL) again raises the possibility that some d-ipRGCs fail to send an axon into the ON. As such, a small percentage of d-ipRGCs in the mouse retina may also in fact be interneurons and not RGCs.

DISCUSSION

Here we define the spatial distribution of melanopsin positive neurons in the retina of two commonly used mouse strains: the pigmented C57BL/6 mouse and the albino Swiss mouse. In addition to reporting important differences in ipRGC distribution

between these two strains, we also describe that >97% of melanopsin expressing ipRGCs become retrogradely labeled when OHSt is applied to both SCi. Rather surprisingly, we also report the existence of melanopsin expressing neurons in the mouse retina which fail to label with a retrograde tracer applied to the ON. As such, we suggest that these cells are not ipRGCs and may instead constitute a new type of intrinsically photosensitive interneuron.

ipRGCs POPULATION AND ITS DISTRIBUTION IN THE RETINA

To date, only two other studies have reported total ipRGC counts in mouse retina, both also using the C57BL/6 strain (Jain et al., 2012; Hughes et al., 2013). The total ipRGC numbers we report here for pigmented mice are very similar to those reported by

Table 4 | Total number of ipRGCs and Brn3a⁺RGCs in naive retinae and in retinae traced from the superior colliculi.

	Retinas	Brn3a ⁺ RGCs	ipRGCs	OHSt ⁺ RGCs
Pigmented	Traced from SCi (n = 7)	38,716 ± 2338	1069 ± 141	40,358 ± 2260
	No tracing (n = 12)	38,375 ± 1148	992 ± 78	
	Mean	38,501 ± 1630	1021 ± 109	
Albino	Traced from SCi (n = 10)	45,848 ± 3154	955 ± 163	46,577 ± 2479
	No tracing (n = 11)	45,907 ± 2547	968 ± 182	
	Mean	45,884 ± 2707	962 ± 169	

Data are shown as mean ± standard deviation.

Jain et al. but less than the 1600–1800 reported by Hughes et al. Although all three studies use the same anti-melanopsin antibody, the difference in cell detection rate may have arisen due to the higher concentration used by Hughes et al. relative to the Jain study and our own work. Previous estimates of total ipRGC number in pigmented mouse retina range from ~1500 (Brown et al., 2010) to 2570 (Berson et al., 2010), although as stipulated by Berson et al., such estimates of total number are based on the assumption that ipRGCs are equally distributed across the retina.

As shown previously in rats (Nadal-Nicolás et al., 2012, 2014; Galindo-Romero et al., 2013), Brn3a was expressed by a very small percentage of ipRGCs. Together with other observations in mice (Jain et al., 2012), our analysis confirms that as in rats, Brn3a is an excellent marker for the concurrent visualization of ipRGCs and non-ipRGCs in mice. In terms of the topography of ipRGCs in the RGC layer, we show that the spatial distribution of these cells is more peripheral in both pigmented and albino mice, with the ipRGCs residing in regions of lower Brn3a⁺RGC density. Our analysis of ipRGC distribution revealed distinct differences between pigmented and albino mice, with the majority of ipRGCs found in the superior retina of albinos and the temporal hemiretina of pigmented mice.

To date, only one other study has examined the spatial distribution of ipRGCs in mice and this was also done using the C57BL/6 strain (Hughes et al., 2013). Although we used the same strain of mouse, our results differ from those of Hughes et al. who report that ipRGCs are most dense in the superior retina. However, one possible explanation for the discrepancy in our findings is based on the methods used to orientate mice retinae. Here we carefully orientate the mouse retina using several landmarks such as the rectus muscle insertion into the superior part of the eye and the nasal caruncle, and used the deepest cut to mark the superior pole of the eye (Salinas-Navarro et al., 2009b,c), while Hughes et al. do not use cuts (see Figure 1 and methods from Hughes et al., 2013), instead relying upon the distribution of UVS-opsin which is most intense in the ventral retina. Recent work from our laboratory using the C57BL/6 strain has shown that while UVS-opsin positive cones are indeed more common in the inferior retina, they show a marked predisposition

for the nasal hemiretina (see Figures 1 and 4 of Ortín-Martínez et al., 2014). So, it may well be that the temporal retina is more heavily represented in the dorsal count data provided by Hughes et al. In support of a tempero-nasal gradient in ipRGC distribution, Hughes et al. do comment on a visually apparent “subtle variation” in ipRGC density between the lower retinal quadrants that did not reach significance using their analysis methods (see Figure S2 Hughes et al., 2013). This orientation issue should also be considered when interpreting the distribution of M4/M5 cells (Hughes et al., 2013), which may also reside more temporally.

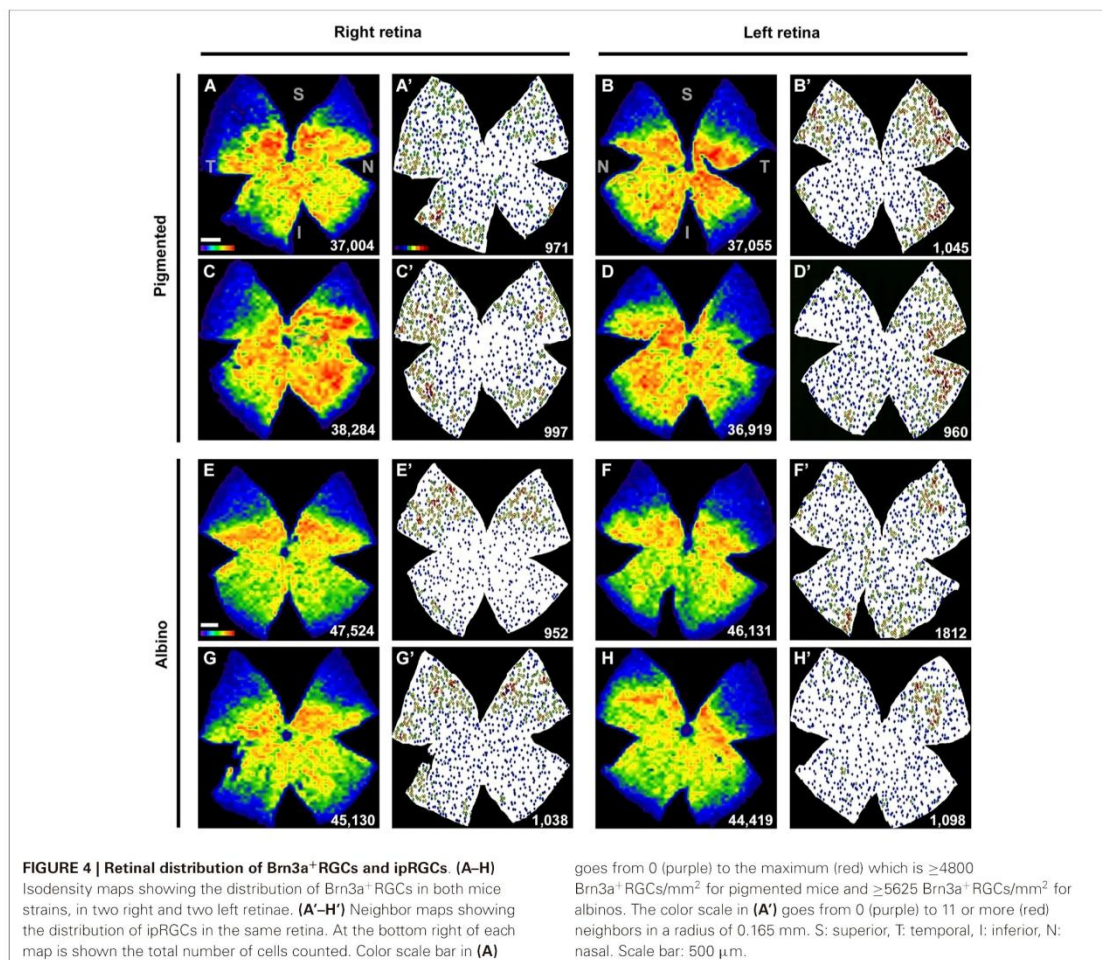
Our finding that albino mice have significantly more RGCs than pigmented animals is in agreement with previous studies (Williams et al., 1996; Salinas-Navarro et al., 2009b). In addition, we also detected a significant difference in soma size and ipRGC distribution between the two strains. While no other studies to date have examined the topography of ipRGCs in albino mice, our data shows a similar superior distribution of ipRGCs to that found in albino rats. However, in albino rats, the predisposition for ipRGCs in the superior-temporal retina is more obvious (Hattar et al., 2002; Esquivá et al., 2013; Galindo-Romero et al., 2013; Nadal-Nicolás et al., 2014). These differences between pigmented and albino mice are consistent with a critical role for ocular pigmentation in the proper development of structure and function in rodents (Lund, 1965; Balkema and Dräger, 1990; Donatien and Jeffery, 2002). Together with observations of differences between the circadian regulation of melanopsin expression in pigmented and albino rats (Hannibal et al., 2005, 2013), we suggest that when studying the melanopsin system, caution should be exercised when interpreting data from albino animals.

DISPLACED ipRGCs

In addition to ipRGCs in the RGC layer, mice, rats and primates also contain a population of d-ipRGCs in the INL. In mice, while these d-ipRGCs are known to show variable levels of immunoreactivity for melanopsin and Brn3b (Jain et al., 2012; Karnas et al., 2013), their spatial distribution is unknown. We show here that d-ipRGCs in both mouse strains studied were more common in the superior and far peripheral retina (i.e., CMZ). While previous estimates of the percentage of d-ipRGCs in C57BL/6 mice range between ~6% and ~9% (Berson et al., 2010; Jain et al., 2012; Karnas et al., 2013), our total cell count-derived figure of 14% includes the entire retina, including the CMZ. In albino mice, there were fewer d-ipRGCs (5%), a finding which agrees with the impact of pigmentation on both the general displaced RGC population in mice (Dräger and Olsen, 1980; Balkema and Dräger, 1990) and a recent comparison between d-ipRGC numbers in albino and pigmented rats (Nadal-Nicolás et al., 2014). Although the function of d-ipRGCs in mice is currently unclear, in primate/human retina they are very common indeed, ranging from 40–60% of the ipRGC population depending upon species studied (Dacey et al., 2005; Jusuf et al., 2007).

ipRGCs PROJECTIONS

The results of our retrograde tracing experiment from SC reveal that >97% of ipRGCs become retrogradely labeled with OHSt applied to the surface of this structure. However, this conclusion

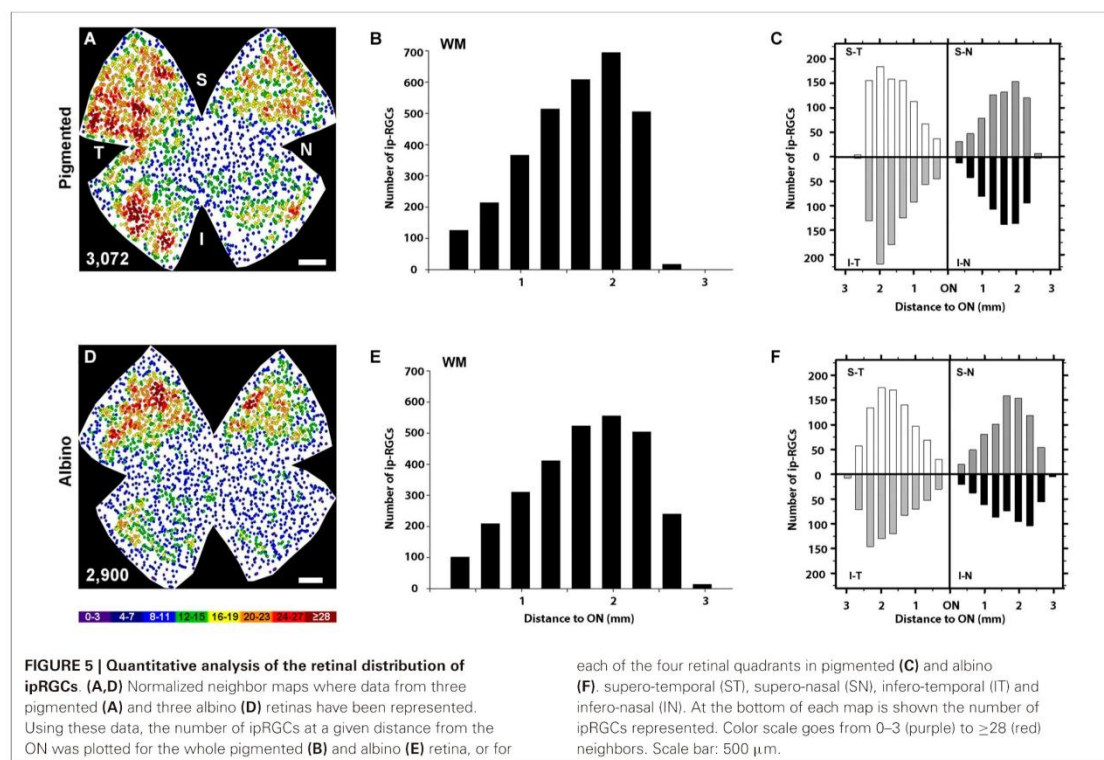


comes with the caveat that our tracer application technique may also label ipRGC axons in the neighboring nuclei. Indeed, following close inspection of labeled brains (data not shown), we found that OHSt application to the SCi does indeed result in diffusion to neighboring nuclei that are also retinorecipient. These nuclei are the lateral geniculate (dorsal and ventral), intergeniculate and pretectal nuclei such as the NOT and OPN. Thus, the present technique does not allow us to discard the possibility that there may be separate sub-populations of ipRGCs projecting to the SC and neighboring pretectal and lateral geniculate nuclei. However, in our additional analysis of brain sections, we could find no evidence that OHSt diffuses to the SCN, making it highly unlikely that this non-trans neuronal tracer would label ipRGCs projecting solely to the SCN.

There is a growing weight of evidence for a significant ipRGC input to the SC of mice. Firstly, this should be expected

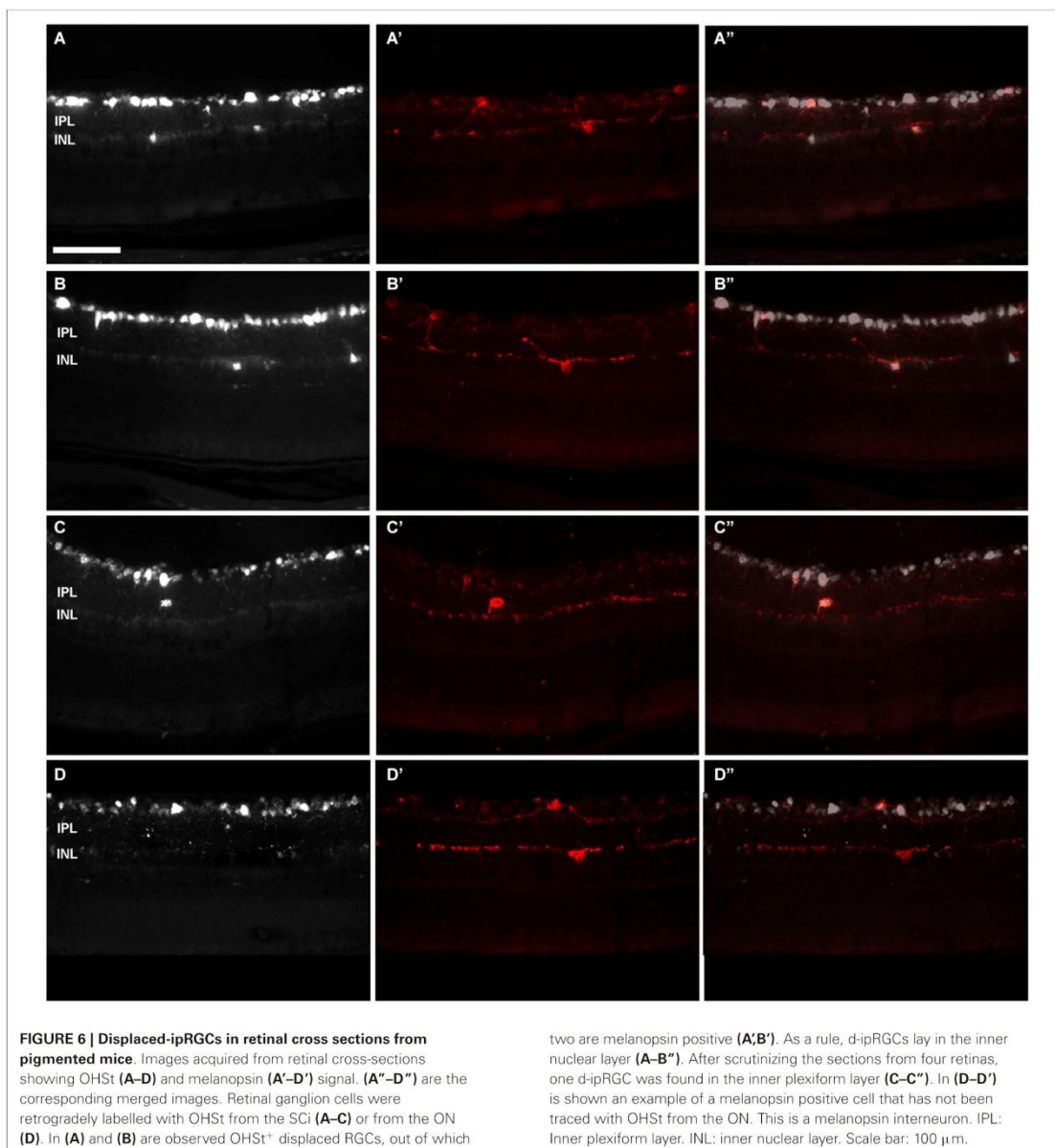
given that the vast majority of RGCs project to this structure in rodents (Linden and Perry, 1983; Hofbauer and Dräger, 1985; Salinas-Navarro et al., 2009b,c; Nadal-Nicolás et al., 2014). Also, anatomical studies in reporter mice which either preferentially label M1 cells (Hattar et al., 2006) or all ipRGC subtypes (Brown et al., 2010; Ecker et al., 2010) have both shown a substantial projection of ipRGC axons into superficial layers of SC (albeit it more extensively in the latter studies). While the less extensive input to SC in *tau-lacZ* mice has been taken as evidence that M1 cells do not significantly target this structure (Schmidt et al., 2011), it should be remembered that observations in *Opn4^{-/-}* mice may alternatively reflect a deficit in M1 axonal targeting to SC in the absence of melanopsin.

Interestingly, in the only other comprehensive retrograde tracing study to address central projections of M1 and M2 cells in *Opn4^{+/-}* mice (Baver et al., 2008), it was concluded that 100% of



the ipRGCs projecting to the SC were of the M1 subtype (based on observations in $n = 2$ mice receiving small, localized injections). This same study found that 80% of M1 cells project to SCN, with approximately 45% of the input to OPN also emanating from the M1 subtype. Further evidence that M1 ipRGCs may project solely to the SCN comes from genetic ablation of the *Brn3b* positive population while maintaining SCN innervation and circadian rhythmicity (Chen et al., 2011). As our tracing data is likely to include the vast majority of M1 type ipRGCs, we propose that the SCN and OPN may simply be innervated by collaterals from retino-collicular ipRGC axons. This possibility has also been suggested before to explain the delayed postnatal innervation of the SCN by ipRGCs (McNeill et al., 2011). However, anterograde tracing in rats (Gooley et al., 2003) and retrograde tracing data in Hamsters (Morin et al., 2003) suggests that the SC may be a less prominent target in these species. Although, when interpreting the results of these studies, it should be appreciated that $<50\%$ of the melanopsin positive ipRGCs were labeled with rAAV-GFP by Gooley et al. (2003) and only one localized central region of SC was injected by Morin et al. (2003). Our results in mice may help to explain the strong light avoidance behavior in P6 mouse pups, which is the earliest recorded behavioral output of the melanopsin system, thought to be driven by the SC (Johnson et al., 2010).

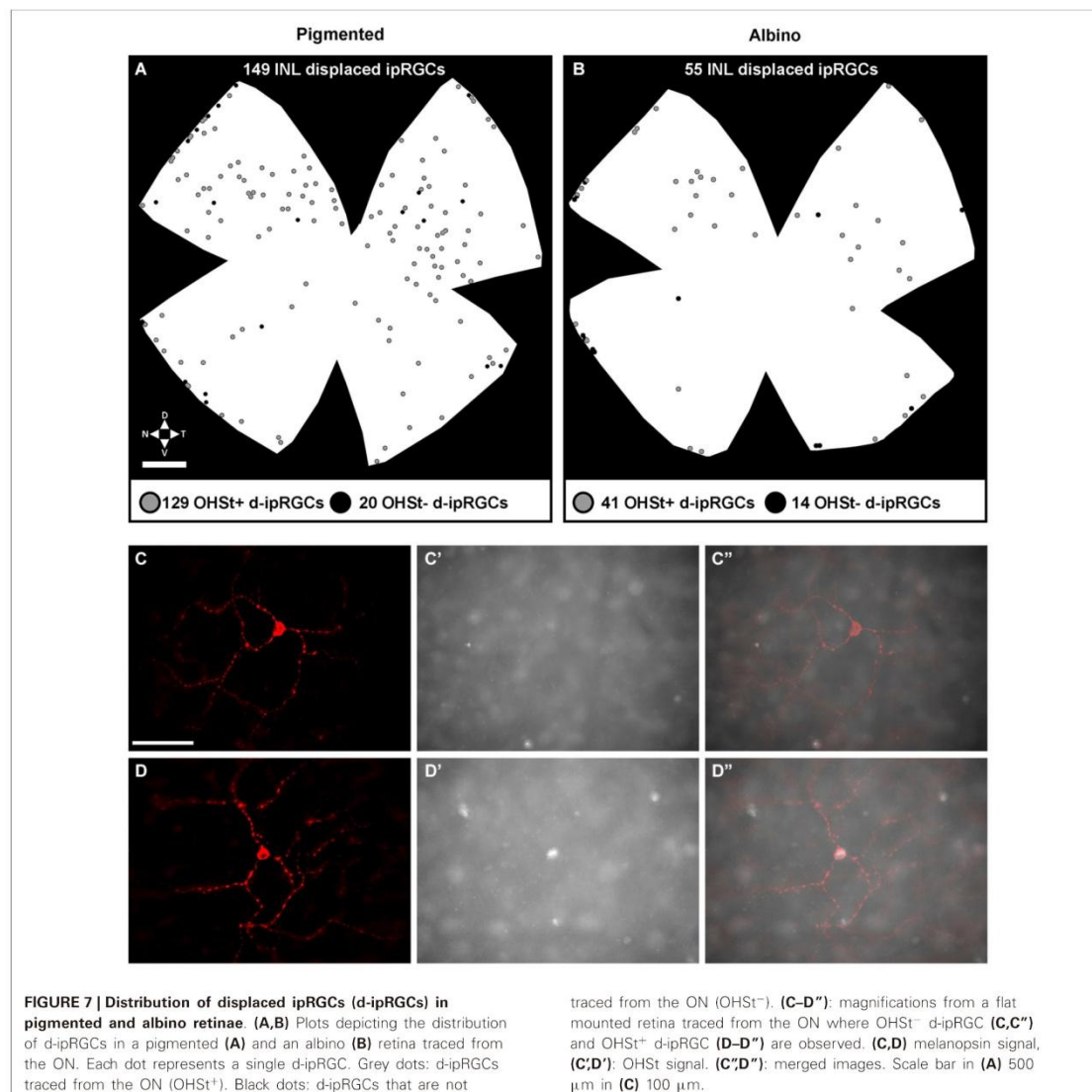
Besides light avoidance behavior in mice, the significance of ipRGC input to the SC is at present unclear. It is known that the retino-collicular projection is topographically organized to provide a crude spatial map of the visual world (Siminoff et al., 1966). The SC is also well positioned to send visual information to both brainstem centers to alter eye movements and the basal ganglia to change visual attention/re-allocate motor resources (Comoli et al., 2003; May, 2006). As such, this structure would seem to be a prime candidate for mediating melanopsin-dependent orientation behavior in mice (Johnson et al., 2010; Semo et al., 2010) or perhaps even to initiate gaze/direct visual attention towards a brightly lit, emotionally salient target (Brown et al., 2012). So, the SC may either help to orientate animals towards bright and interesting targets or away from excessive levels of illumination (i.e., direct sun light). Along similar lines, in humans, ipRGC input to SC may contribute to the visual awareness seen in patients with rod/cone degeneration (Zaidi et al., 2007) and could also contribute to the subconscious aversive eye movements (squinting/averting gaze) that occur in response to direct sunlight (Sliney, 1997; Stringham et al., 2003). Interestingly, in support of this notion, there is now evidence of a significant ipRGC input to primate SC (Hannibal et al., 2014).



CILIARY MARGINAL ZONE (CMZ)

Recent work suggests that melanopsin positive cells in the retinal CMZ send projections into the ciliary body/iris to drive a component of the intrinsic pupillary light reflex (iPLR; Schmidt et al., 2014b; Semo et al., 2014). Given these findings, we wanted to confirm if all ipRGCs project an axon to the brain, and thus we applied OHSt onto the ocular stump of the intraorbitally

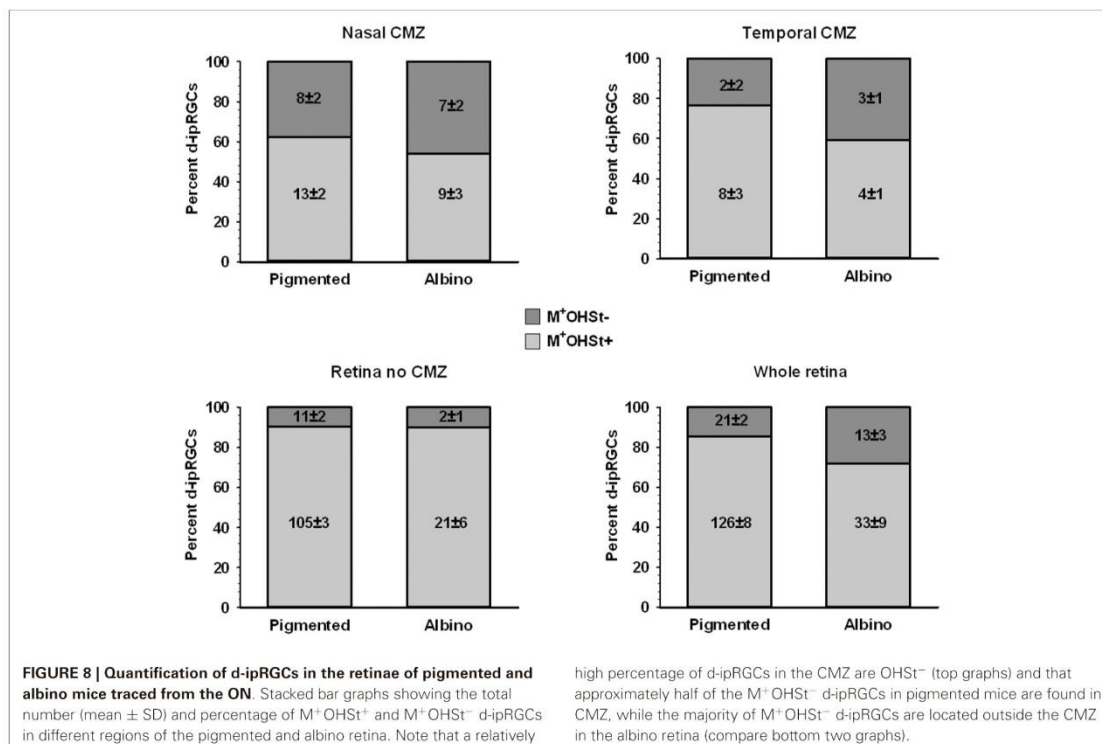
transected ON (Salinas-Navarro et al., 2009b). As previously reported in C3H/He wildtype mice (Semo et al., 2014), we found a sub-population of M⁺ cells in the CMZ of the nasal and to a lesser extent the temporal hemiretina of C57BL/6 and Swiss mice. In analysis that excluded the retinal CMZ, this procedure labeled 99.7% of all ipRGCs in the RGC layer of pigmented mice and 98.9% in the RGC layer of albinos, with ~90.5% and



~91.3% of d-ipRGCs labeled in pigmented and albino mice respectively. However, when the CMZ was analyzed in isolation the number of retrogradely labeled melanopsin positive cells fell to ~80% for pigmented mice and ~76% for albinos. We are not aware of any published data showing that subpopulations of neurons with an otherwise intact axon will fail to retrogradely transport the tracer we have used here. As such, this finding represents the first direct evidence that M⁺ cells in the mammalian retina may not all be RGCs. It is thought that amphibians and fish possess a subset of melanopsin-expressing horizontal cells (Provencio et al., 1998; Bellingham et al.,

2002) and as such we suggest that the M⁺OHSt⁻ cells reported here may be some type of intrinsically photosensitive retinal interneuron.

In the CMZ, such M⁺OHSt⁻ cells may instead be sending their axon into the ciliary body/iris to elicit one component of the iPLR, as suggested previously (Semo et al., 2014). In other regions of the retina, there may also be a sub-population of M⁺OHSt⁻ cells in the INL which could be engaged in the intra-retinal signaling phenomenon reported by others (Zhang et al., 2008). In support of our tracing data, we could not locate obvious axons in the OHSt⁻d-ipRGC cells. Similar issues have been



raised by others trying to identify melanopsin positive processes arising from the d-ipRGCs of mice (Karnas et al., 2013) and axons were apparently not always visible in the X-gal stained d-ipRGCs of *tau-lacZ* reporter mice (Hattar et al., 2006). Our finding of M⁺OHSt⁻ cells in the mouse retina has important implications for the much larger population of ipRGCs residing in the INL of primate retina which are most common centrally (Dacey et al., 2005; Jusuf et al., 2007). Interestingly, Jusuf et al. (2007) also report an increase in ipRGC density in the far nasal periphery of the macaque and marmoset retina, a finding which may correspond to the CMZ population reported in mice (Semo et al., 2014).

The melanopsin positive cells in mouse CMZ are largely Brn3b negative (Semo et al., 2014) and as such would be expected to project to SCN (Chen et al., 2011). However, in terms of comparison between retinas retrogradely traced from SCI and ON, we find it highly unlikely that any of them do project to SCN. This is because we could find no significant difference between numbers of traced and untraced melanopsin cells in the SCI-traced and ON-traced groups. So, it appears that M⁺ cells in the CMZ of mice either project to the dorsal midbrain (SC and/or OPN) or fail to send an axon along the ON at all. Interestingly, anatomical tracing work has also shown that displaced RGCs are unlikely to project to the SCN in mice (Balkema and Dräger, 1990), so it may be that the M1 type of d-ipRGC

also fail to project to SCN, perhaps instead being involved in other, non-circadian melanopsin-based functions such as the PLR.

In summary, the present study extends our understanding of the distribution of ipRGCs in mice and provides important evidence that not all ipRGCs project axons into the ON. We report that ipRGCs are more common in peripheral and temporal regions of the pigmented mouse retina and also show that the vast majority of ipRGCs become retrogradely labeled with OHSt applied to both SCI. This data may be important to consider in terms of an emerging role for melanopsin in brightness discrimination and image forming vision (Brown et al., 2010; Ecker et al., 2010; Allen et al., 2014; Schmidt et al., 2014a).

AUTHORS AND CONTRIBUTORS

All authors have reviewed and approved the final version of this work.

Conceptualized and designed the experiments: Francisco J. Valiente-Soriano, Diego García-Ayuso, Arturo Ortín-Martínez, Manuel Jiménez-López, Caridad Galindo-Romero, Maria Paz Villegas-Pérez, Marta Agudo-Barriuso, Anthony A. Vugler, Manuel Vidal-Sanz.

Performed the experiments: Francisco J. Valiente-Soriano, Diego García-Ayuso, Arturo Ortín-Martínez, Caridad Galindo-Romero.

Data acquisition: Francisco J. Valiente-Soriano, Diego García-Ayuso, Arturo Ortín-Martínez, Manuel Jiménez-López, Caridad Galindo-Romero.

Data analysis: Francisco J. Valiente-Soriano, Diego García-Ayuso, Arturo Ortín-Martínez, Manuel Jiménez-López, Caridad Galindo-Romero, María Paz Villegas-Pérez, Marta Agudo-Barriuso, Anthony A. Vugler, Manuel Vidal-Sanz.

Design of automated routines: Manuel Jiménez-López.

Data interpretation, manuscript drafting: Francisco J. Valiente-Soriano, Diego García-Ayuso, Arturo Ortín-Martínez, Manuel Jiménez-López, Caridad Galindo-Romero, María Paz Villegas-Pérez, Marta Agudo-Barriuso, Anthony A. Vugler, Manuel Vidal-Sanz.

Contributed reagents/materials/analysis tools: María Paz Villegas-Pérez, Marta Agudo-Barriuso, Anthony A. Vugler, Manuel Vidal-Sanz.

ACKNOWLEDGMENTS

Spanish Ministry of Education and Science SAF-2012-38328; ISCIII-FEDER “Una manera de hacer Europa” PI13/00643, PI13/01266, Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología RETICS: RD12/0034/0014. Anthony A. Vugler is funded by HEFCE and UCL in the UK.

REFERENCES

- Allen, A. E., Storchi, R., Martini, F. P., Petersen, R. S., Montemurro, M. A., Brown, T. M., et al. (2014). Melanopsin-driven light adaptation in mouse vision. *Curr. Biol.* doi: 10.1016/j.cub.2014.09.015. [Epub ahead of print].
- Balkema, G. W., and Dräger, U. C. (1990). Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice. *Vis. Neurosci.* 4, 595–604. doi: 10.1017/s0952523800005794
- Baver, S. B., Pickard, G. E., Sollars, P. J., and Pickard, G. E. (2008). Two types of melanopsin-expressing retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1763–1770. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06149.x
- Bellingham, J., Whitmore, D., Philp, A. R., Wells, D. J., and Foster, R. G. (2002). Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 107, 128–136. doi: 10.1016/s0169-328x(02)00454-0
- Berson, D. M., Castrucci, A. M., and Provencio, I. (2010). Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. *J. Comp. Neurol.* 518, 2405–2422. doi: 10.1002/cne.22381
- Brown, T. M., Gias, C., Hatori, M., Keding, S. R., Semo, M., Coffey, P. J., et al. (2010). Melanopsin contributions to irradiance coding in the thalamo-cortical visual system. *PLoS Biol.* 8:e1000558. doi: 10.1371/journal.pbio.1000558
- Brown, T. M., Tsujimura, S., Allen, A. E., Wynne, J., Bedford, R., Vickery, G., et al. (2012). Melanopsin-based brightness discrimination in mice and humans. *Curr. Biol.* 22, 1134–1141. doi: 10.1016/j.cub.2012.04.039
- Chen, S. K., Badea, T. C., and Hattar, S. (2011). Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature* 76, 92–95. doi: 10.1038/nature10206
- Comoli, E., Coizet, V., Boyes, J., Bolam, J. P., Canteras, N. S., Quirk, R. H., et al. (2003). A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events. *Nat. Neurosci.* 6, 974–980. doi: 10.1038/nn1113
- Cuenca, N., Pinilla, I., Fernández-Sánchez, L., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., et al. (2010). Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp. Eye Res.* 91, 273–285. doi: 10.1016/j.exer.2010.05.020
- Dacey, D. M., Liao, H. W., Peterson, B. B., Robinson, F. R., Smith, V. C., Pokorny, J., et al. (2005). Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature* 433, 749–754. doi: 10.1038/nature03387
- Donatien, P., and Jeffery, G. (2002). Correlation between rod photoreceptor numbers and levels of ocular pigmentation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1198–1203.
- Dräger, U. C., and Olsen, J. F. (1980). Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J. Comp. Neurol.* 191, 383–412. doi: 10.1002/cne.901910306
- Ecker, J. L., Dumitrescu, O. N., Wong, K. Y., Alam, N. M., Chen, S. K., Legates, T., et al. (2010). Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron* 67, 49–60. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.023
- Esquivia, G., Lax, P., and Cuenca, N. (2013). Impairment of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells associated with late stages of retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 4605–4618. doi: 10.1167/iov.13-12120
- Estevez, M. E., Fogerson, P. M., Ilardi, M. C., Borghuis, B. G., Chan, E., Weng, S., et al. (2012). Form and function of the M4 cell, an intrinsically photosensitive retinal ganglion cell type contributing to geniculocortical vision. *J. Neurosci.* 32, 13608–13620. doi: 10.1523/jneurosci.1422-12.2012
- Galindo-Romero, C., Avilés-Trigueros, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F., et al. (2011). Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp. Eye Res.* 92, 377–387. doi: 10.1016/j.exer.2011.02.008
- Galindo-Romero, C., Jiménez-López, M., García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F. M., Agudo-Barriuso, M., et al. (2013). Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp. Eye Res.* 108, 84–93. doi: 10.1016/j.exer.2012.12.010
- García-Ayuso, D., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F. M., Ortín-Martínez, A., Agudo-Barriuso, M., Vidal-Sanz, M., et al. (2014). Sectorial loss of retinal ganglion cells in inherited photoreceptor degeneration is due to RGC death. *Br. J. Ophthalmol.* 98, 396–401. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303958
- González-Menéndez, I., Contreras, F., Cernuda-Cernuda, R., and García-Fernández, J. M. (2009). Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina. *Front. Cell. Neurosci.* 3:3. doi: 10.3389/fnro.2009.03.003.2009
- González-Menéndez, I., Contreras, F., Cernuda-Cernuda, R., Provencio, I., and García-Fernández, J. M. (2010). Postnatal development and functional adaptations of the melanopsin photoreceptive system in the albino mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 5, 4840–4847. doi: 10.1167/iov.10-5253
- Gooley, J. J., Lu, J., Fischer, D., and Saper, C. B. (2003). A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J. Neurosci.* 23, 7093–7106.
- Guler, A. D., Ecker, J. L., Lall, G. S., Haq, S., Altimus, C. M., Liao, H. W., et al. (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102–105. doi: 10.1038/nature06829
- Hannibal, J., Georg, B., and Fahrenkrug, J. (2013). Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Exp. Eye Res.* 106, 55–63. doi: 10.1016/j.exer.2012.11.006
- Hannibal, J., Georg, B., Hindersson, P., and Fahrenkrug, J. (2005). Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J. Mol. Neurosci.* 27, 147–155. doi: 10.1385/jmn:27:2:147
- Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., Georg, B., and Fahrenkrug, J. (2002). The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J. Neurosci.* 22, RC191. doi: 10.3410/f.1005370.62307
- Hannibal, J., Kankipati, L., Strang, C. E., Peterson, B. B., Dacey, D., and Gamlin, P. D. (2014). Central projections of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 522, 2231–2248. doi: 10.1002/cne.23555
- Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K. W., et al. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326–349. doi: 10.1002/cne.20970
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., and Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070. doi: 10.1126/science.1069609
- Hofbauer, A., and Dräger, U. C. (1985). Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 234, 465–474. doi: 10.1002/cne.902340405
- Hughes, S., Watson, T. S., Foster, R. G., Peirson, S. N., and Hankins, M. W. (2013). Nonuniform distribution and spectral tuning of photosensitive retinal ganglion cells of the mouse retina. *Curr. Biol.* 23, 1696–1701. doi: 10.1016/j.cub.2013.07.010

- Jain, V., Ravindran, E., and Dhingra, N. K. (2012). Differential expression of Brn3 transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J. Comp. Neurol.* 520, 742–755. doi: 10.1002/cne.22765
- Johnson, J., Wu, V., Donovan, M., Majumdar, S., Renteria, R. C., Porco, T., et al. (2010). Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 17374–17378. doi: 10.1073/pnas.1008533107
- Jusuf, P. R., Lee, S. C., Hannibal, J., and Grünert, U. (2007). Characterization and synaptic connectivity of melanopsin-containing ganglion cells in the primate retina. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2906–2921. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05924.x
- Karnas, D., Mordel, J., Bonnet, D., Pévet, P., Hicks, D., and Meissl, H. (2013). Heterogeneity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the mouse revealed by molecular phenotyping. *J. Comp. Neurol.* 521, 912–932. doi: 10.1002/cne.23210
- Lafuente López-Herrera, M. P., Mayor-Torroglosa, S., Miralles de Imperial, J., Villegas-Pérez, M. P., and Vidal-Sanz, M. (2002). Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp. Neurol.* 178, 243–258. doi: 10.1006/exnr.2002.8043
- Linden, R., and Perry, V. H. (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.* 272, 145–149. doi: 10.1016/0006-8993(83)90371-2
- Lucas, R. J., Hattar, S., Takao, M., Berson, D. M., Foster, R. G., and Yau, K. W. (2003). Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299, 245–247. doi: 10.1126/science.1077293
- Lund, R. D. (1965). Uncrossed visual pathways of hooded and albino rats. *Science* 149, 1506–1507. doi: 10.1126/science.149.3691.1506
- May, P. J. (2006). The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog. Brain Res.* 151, 321–378. doi: 10.1016/s0079-6123(05)51011-2
- McNeill, D. S., Sheely, C. J., Ecker, J. L., Badaea, T. C., Morhardt, D., Guido, W., et al. (2011). Development of melanopsin-based irradiance detecting circuitry. *Neural Dev.* 6:8. doi: 10.1186/1749-8104-6-8
- Morin, L. P., Blanchard, J. H., and Provencio, I. (2003). Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 465, 401–416. doi: 10.1002/cne.10881
- Nadal-Nicolás, F. M., Jimenez-Lopez, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Albuquerque-Bejar, J. J., Vidal-Sanz, M., 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:e49830. doi: 10.1371/journal.pone.0049830
- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, L., Salinas-Navarro, M., et al. (2010). 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, 3860–3868. doi: 10.1167/iovs.08-3267
- Nadal-Nicolás, F. M., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., et al. (2014). Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front. Neuroanat.* 8:99. doi: 10.3389/fnana.2014.00099
- Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Nadal-Nicolás, F. M., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Sauvé, Y., 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, 3171–3183. doi: 10.1167/iovs.09-4861
- Ortín-Martínez, A., Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Albuquerque-Béjar, J. J., Nieto-López, L., García-Ayuso, D., 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:e102392. doi: 10.1371/journal.pone.0102392
- Panda, S., Sato, T. K., Castrucci, A. M., Rollag, M. D., DeGrip, W. J., Hogenssch, J. B., et al. (2002). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213–2216. doi: 10.1126/science.1076848
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P., and Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: an opsin in melanophores, brain and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 340–345. doi: 10.1073/pnas.95.1.340
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., et al. (2009a). Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol. Vis.* 15, 2578–2598.
- Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Valiente-Soriano, F. J., Alarcón-Martínez, L., Avilés-Trigueros, M., Mayor, S., et al. (2009b). Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res.* 49, 637–647. doi: 10.1016/j.visres.2009.01.010
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T. M., Lund, R. D., et al. (2009c). A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49, 115–126. doi: 10.1016/j.visres.2008.09.029
- Sánchez-Migallón, M. C., Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., and Agudo-Barriuso, M. (2011). Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.* 92, 260–267. doi: 10.1016/j.exer.2011.02.001
- Schmidt, T. M., Alam, N. M., Chen, S., Kofuji, P., Li, W., Prusky, G. T., et al. (2014a). A role for melanopsin in alpha retinal ganglion cells and contrast detection. *Neuron* 82, 781–788. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.022
- Schmidt, T. M., Chen, S. K., and Hattar, S. (2011). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* 34, 572–580. doi: 10.1016/j.tins.2011.07.001
- Schmidt, T., Rupp, A., Chew, K., Yungger, B., Cui, Y., Wess, J., et al. (2014b). A retinal projection to the iris mediates pupil constriction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, E-Abstract 1231.
- Schmidt, T. M., Taniguchi, K., and Kofuji, P. (2008). Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development. *J. Neurophysiol.* 100, 371–384. doi: 10.1152/jn.00062.2008
- Semo, M., Gias, C., Ahmado, A., Sugano, E., Allen, A. E., Lawrence, J. M., et al. (2010). Dissecting a role for melanopsin in behavioural light aversion reveals a response independent of conventional photoreception. *PLoS One* 5:e15009. doi: 10.1371/journal.pone.0015009
- Semo, M., Gias, C., Ahmado, A., and Vugler, A. (2014). A role for the ciliary marginal zone in the melanopsin-dependent intrinsic pupillary light reflex. *Exp. Eye Res.* 119, 8–18. doi: 10.1016/j.exer.2013.11.013
- Siminoff, R., Schwassmann, H. O., and Kruger, L. (1966). An electrophysiological study of the visual projection to the superior colliculus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 127, 435–444. doi: 10.1002/cne.901270402
- Sliney, D. H. (1997). Ocular exposure to environmental light and ultraviolet—the impact of lid opening and sky conditions. *Dev. Ophthalmol.* 27, 63–75.
- Stringham, J. M., Fuld, K., and Wenzel, A. J. (2003). Action spectrum for photophobia. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* 20, 1852–1858. doi: 10.1364/josaa.20.001852
- Vidal-Sanz, M., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F. M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., de Imperial, J. M., et al. (2012). Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 1–27. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.08.001
- Vidal-Sanz, M., Villegas-Pérez, M. P., Bray, G. M., and Aguayo, A. J. (1988). Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp. Neurol.* 102, 92–101. doi: 10.1016/0014-4886(88)90081-7
- Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Vidal-Sanz, M., and Lund, R. D. (1996). Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport* 7, 1995–1999. doi: 10.1097/00001756-199608120-00028
- Viney, T. J., Balint, K., Hillier, D., Siebert, S., Boldogkoi, Z., Enquist, L. W., et al. (2007). Local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transsynaptic viral tracing. *Curr. Biol.* 17, 981–988. doi: 10.1016/j.cub.2007.04.058
- Vugler, A. A., Semo, M., Joseph, A., and Jeffery, G. (2008). Survival and remodeling of melanopsin cells during retinal dystrophy. *Vis. Neurosci.* 25, 125–138. doi: 10.1017/s0952523808080309
- Weng, S., Estevez, M. E., and Berson, D. M. (2013). Mouse ganglion-cell photoreceptors are driven by the most sensitive rod pathway and by both types of cones. *PLoS One* 8:e66480. doi: 10.1371/journal.pone.0066480
- Williams, R. W., Strom, R. C., Rice, D. S., and Goldowitz, D. (1996). Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J. Neurosci.* 16, 7193–7205.

- Xue, T., Do, M. T., Riccio, A., Jiang, Z., Hsieh, J., Wang, H. C., et al. (2011). Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature* 479, 67–73. doi: 10.1038/nature10567
- Zaidi, F. H., Hull, J. T., Peirson, S. N., Wulff, K., Aeschbach, D., Gooley, J. J., et al. (2007). Short-wavelength light sensitivity of circadian, pupillary and visual awareness in humans lacking an outer retina. *Curr. Biol.* 17, 2122–2128. doi: 10.1016/j.cub.2007.11.034
- Zhang, D. Q., Wong, K. Y., Sollars, P. J., Berson, D. M., Pickard, G. E., and McMahon, D. G. (2008). Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 14181–14186. doi: 10.1073/pnas.0803893105

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 19 September 2014; paper pending published: 06 October 2014; accepted: 28 October 2014; published online: 20 November 2014.

Citation: Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vugler AA and Vidal-Sanz M (2014) Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Front. Neuroanat.* 8:131. doi: 10.3389/fnana.2014.00131

This article was submitted to the journal *Frontiers in Neuroanatomy*.

Copyright © 2014 Valiente-Soriano, García-Ayuso, Ortín-Martínez, Jiménez-López, Galindo-Romero, Villegas-Pérez, Agudo-Barriuso, Vugler and Vidal-Sanz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

10. ANEXO II

10. ANEXO II



RESEARCH ARTICLE

Effects of Ocular Hypertension in the Visual System of Pigmented Mice

Francisco J. Valiente-Soriano^{1,2}, Manuel Salinas-Navarro^{1,2}, Manuel Jiménez-López^{1,2}, Luis Alarcón-Martínez^{1,2}, Arturo Ortín-Martínez^{1,2}, José M. Bernal-Garro^{1,2}, Marcelino Avilés-Trigueros^{1,2}, Marta Agudo-Barriuso^{1,2}, María P. Villegas-Pérez^{1,2}, Manuel Vidal-Sanz^{1,2*}

1 Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. 30.100 Murcia, Spain, **2** Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB-Arrixaca) 30.100 Murcia, Spain

* manuel.vidal@um.es



click for updates

Abstract

To study the effects of ocular hypertension (OHT) on the visual system of C57BL/6 pigmented mice, the limbal and episcleral veins of the left eye were laser photocoagulated (LP). LP increased the intraocular pressure during the first five days (d), reaching basal values at 7d. To investigate the effect of OHT on the retinal ganglion cell (RGC) retrograde axonal transport, hydroxystilbamidine methanesulfonate (OHSt) was applied to both superior colliculi (SCI) and the retinas were dissected 2 or 4 weeks after LP. To determine RGC survival, these same retinas were immunoreacted against Brn3a (general RGC population) and melanopsin (intrinsically photosensitive RGCs, m⁺RGCs). To study whether OHT affected non-RGC neurons in the ganglion cell layer (GCL), RGCs were immunodetected with Brn3a and all GCL nuclei counterstained with DAPI in a group of animals examined 4 weeks post-LP. Innervation of the SCI was examined at 10 days, 8 or 14 weeks after LP with the orthogradely transported cholera toxin subunit-B. OHT resulted in diffuse and sectorial loss of OHSt+RGCs (50% at 2 weeks and 62% at 4 weeks) and in a comparable loss of Brn3a+RGCs at the same time intervals. m+RGCs decreased to 59% at 2 weeks and to 46% at 4 weeks, such loss was diffuse, did not parallel the sectorial loss of the general RGC population and was more severe in the superior-temporal retina. In the GCL, cell loss is selective for RGCs and does not affect other non-RGC neurons. The retinotectal innervation appeared significantly reduced at 10 days (55.7%) and did not progress further up to 14 weeks (46.6%). Thus, LP-induced OHT results in retrograde degeneration of RGCs and m+RGCs, as well as in the loss of CTB-labelled retinotectal terminals.

OPEN ACCESS

Citation: Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Bernal-Garro JM, et al. (2015) Effects of Ocular Hypertension in the Visual System of Pigmented Mice. PLoS ONE 10(3): e0121134. doi:10.1371/journal.pone.0121134

Academic Editor: Tudor C Badea, NIH/NEI, UNITED STATES

Received: December 20, 2014

Accepted: February 12, 2015

Published: March 26, 2015

Copyright: © 2015 Valiente-Soriano et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: Financial support for these studies was obtained from: Spanish Ministry of Economy and Competitiveness: SAF-2012-38328; ISCIII-FEDER "Una manera de hacer Europa" PI13/00643, PI13/01266, RETICS: RD12/0034/0014.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Glaucomatous optic neuropathies (GON) are a leading cause of blindness in the developed countries. One of the most important risk factors in GON is ocular hypertension (OHT), probably the only risk factor for which there are current therapeutic approaches [1]. Therefore OHT has attracted great interest among the scientific community [2,3]. There are several

experimental models to induce and thus study ocular hypertension in adult mice such as: the episcleral vein occlusion [4] or the injection of polystyrene microbeads into the anterior chamber [5–7]. In addition, there are several congenic mice models of ocular hypertension including mice with a targeted type I collagen mutation [8] and the DBA/2J mice which develop a pigmented glaucoma [9–15]. One of the most popular models involves laser cauterization of the episcleral and perilimbal veins in adult albino rats [16–21]. There are also several reports in adult albino [22–28] or pigmented [29–36] mice.

The present study further characterizes the effects of elevated intraocular pressure in adult pigmented mice; here we report the effect of laser photocoagulation (LP) of the perilimbal veins as well as of the episcleral vessels on the survival of the population of RGCs. Because experimental glaucoma has been shown to affect the circadian timing system [37,38] and several reports claim that intrinsic photosensitive retinal ganglion cells or melanopsin-expressing RGCs (m^+ RGCs) survive better after OHT in rats [39,40] whereas other reports indicate the contrary for mice [41] and rats [37,42,43], we have also investigated the effects of OHT in the population of m^+ RGCs. RGCs were retrogradely labelled with OHSt applied to both SCi and double immunodetected with melanopsin and Brn3a, an approach that allows to study in parallel but independently the general RGC population ($Brn3a^+$) and m^+ RGCs [44]. Glaucoma is no longer considered a sole disease of the RGC population and their axons, but it also implies synaptically linked nuclei of the main primary visual pathway [13,28,45], thus the effects of ocular hypertension on the major retinal output, that is the retino-tectal projection was also investigated, for short and long periods of time after laser photocoagulation of these vessels. (Short accounts of this work have been reported in Abstract format, [46,47]).

Material and Methods

Animal handling

All experiments were carried out following the Spanish and European Union regulations for the use of animals in research (Council Directive 86/609/EEC) and the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Murcia (Spain). Adult male pigmented C57BL/6 mice (25–35g) were obtained from the University of Murcia breeding colony and were housed in temperature and light controlled rooms (12 h light/dark cycle) with food and water “ad libitum”. All surgical manipulations were carried out under general anesthesia induced with an intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of ketamine (70 mg/kg, Imalgene, Merial Laboratorios, S.A., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompún, Bayer, S.A., Barcelona, Spain). While recovering from anesthesia, an ocular ointment (Tobrex, Alcon Cusi S.A. Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent corneal desiccation. All efforts were taken to minimize animal suffering and analgesics were administered during the first week. Animals were sacrificed with an i.p. injection of an overdose of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol, Especialidades Veterinarias S.A., Alcobendas, Madrid, Spain). Experimental design is detailed in Table 1.

Induction of OHT

To elevate the IOP, the left eyes were treated in a single session with diode laser burns (Viridis Ophthalmic Photocoagulator-532 nm laser, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France) following a modified protocol previously described that is standard in the laboratory [22,23,35,48]. The laser beam was directed, without any lenses, to the limbal and episcleral veins. The pupil of the treated eye was dilated with 1% Tropicamide (Colircusi tropicamida 1%; Alcon-Cusi, S.A., El Masnou, Barcelona, Spain) and an average of 135 spots were given per

Table 1. Experimental design.

	Number of mice analyzed	Time after Laser Photocoagulation
OHSt, Brn3a and mRGCs	14	2, 4 weeks
Identification of GCL nuclei	8	4 weeks
Anterograde axonal transport	44	Naïve, 10 days, 8 or 14 weeks

Both retinas from each mouse were studied, the left treated ones, and their right contralateral to the lesion, which were used as control.

doi:10.1371/journal.pone.0121134.t001

eye. The spot size, duration, and power were 50–100 μm , 0.05 s, and 0.1 W, respectively. The fellow right eyes were not treated and thus were used as control.

Measurement of the intraocular pressure

The intraocular pressure (IOP) of both eyes was measured under anesthesia using a mice adapted rebound tonometer (Tono-Lab; Tiolat, OY, Helsinki, Finland). The readings were obtained before laser photocoagulation (LP) and at different times after LP. Only mice with a peak of IOP greater than 25 mmHg in the first 48 hours after LP were included in the study.

Retrograde labelling from both superior colliculi

To identify RGCs with an active retrograde axonal transport a Fluorogold analogue, (OHSt) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) was applied to both superior colliculi (SCi) one week before sacrifice following standard protocols previously described [44,49–55].

Anterograde labelling of retinal afferents

To identify the retinofugal projection, four days before sacrifice, 2.5 μl of the orthogradely transported tracer cholera toxin subunit beta (CTB) were intravitreally injected (1%, diluted in distilled water, List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) following previously described protocols that are standard in our Laboratory [56–61].

Tissue processing

Mice were deeply anesthetized and perfused transcardially with saline and 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer. Unless otherwise stated, all products were from Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain.

Retinal wholemounts. The eyes were enucleated and both retinas were dissected and prepared as flattened whole-mounts maintaining the retinal orientation by making four radial cuts (the deepest in the superior pole) as previously described in detail [49,51,52,62,63].

Superior colliculi serial sections. The brains were dissected and post-fixed overnight in 4% PFA at 4°C overnight, and then cryoprotected in increasing concentrations of sucrose before embedding them in optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek, Torrance, CA). Serial coronal sections (30 μm) from the level of the anterior thalamus to the rostral pole of the cerebellum were obtained on a freezing cryostat.

Immunodetection of the retinal afferents in the superior colliculi

Transported CTB from the retina to the terminals in the superior colliculi was immunolocalized using previously described methods [56–61,64]. In brief, after quenching the endogenous peroxidase, free floating sections were incubated in a solution containing goat anti-CTB antibody in PB, 2% normal rabbit serum, 2.5% bovine serum albumin and 2% Triton X-100 during

4 days at 4°C. Binding of primary antibody was visualized by incubating with biotinylated rabbit anti-goat antibody in 2% NRS, 2.5% BSA and 2% Triton X-100 in PB for 1 h at room temperature, followed by an incubation in avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain ABC Kit Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluted 1:100 in PB for 1 h; the peroxidase was detected using 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as a chromogen. After 5 min, 0.004% H₂O₂ was added to the solution, and 3 min were allowed for development. Sections were rinsed thoroughly in PB at 4°C and then serially ordered and mounted on gelatinized slides, air-dried, dehydrated in a series of alcohols, defatted in xylene and coverslipped with DePeX.

Retinal immunohistofluorescence

Immunodetection on flat mounted retinas was carried out as previously described [44,51,52,65–67].

Antibodies and working dilutions

Primary antibodies. see Table 2

Secondary antibodies. Fluorescence: Donkey anti-goat Alexa 594, donkey anti-rabbit Alexa 488, (Molecular Probes, ThermoFisher, Madrid, Spain). All were used at 1:500 dilution. Histochemistry: Rabbit anti-goat IgG-biotin (1:200, Vector Laboratories, USA).

Identification of nuclei in the ganglion cell layer

In flat mounted retinas immunoreacted against Brn3a, all nuclei of the GCL were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectashield Mounting medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Image acquisition

Retinas were photographed following standard procedures in our laboratory [44,49,51,52], using an epifluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with a computer-driven motorized stage (ProScan H128 Series; Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK) controlled by image analysis software (IPP, Image-Pro Plus, IPP 5.1 for Windows; Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Each reconstructed wholemount is a compound of 140 individual frames captured side-by-side with no gap or overlap between them with a 20X objective (Plan-Neofluar, 20/0.50; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany). When required, images were further processed using a graphics editing program (Adobe Photoshop CS 8.0.1; Adobe Systems, Inc., San Jose, CA). SCi were photographed under transmitted light, with a 5x objective to capture the whole contralateral SC in a single frame.

Table 2. Primary antibodies used in this work.

Detection of	Molecular marker	Antibody	Source	Working dilution
RGCs	Brn3a (Pou4f1)	Goat anti-Brn3a (C-20)	Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Germany) sc-31984	1:750
m ⁺ RGCs	Melanopsin	Rabbit anti-melanopsin (N-terminal)	Advanced Targeting Systems (San Diego, California USA) AB-N38	1:500
Anterograde tracing	Cholera Toxin B subunit	Goat anti-CTB	List Biological Laboratories (QuadraTech, Surrey, UK) 703	1:4000

doi:10.1371/journal.pone.0121134.t002

Automated quantification and spatial distribution of OHSt⁺RGCs, Brn3a⁺RGCs and DAPI⁺GCL nuclei

OHSt⁺RGCs and Brn3a⁺RGCs were automatically quantified following previously described methods that are standard in our laboratory [21,49,51,52,54,55,66,67]. Briefly, the individual fluorescent images taken for each retinal frame were processed by a specific subroutine using the IPP macro language. The topology of Brn3a⁺RGCs and GCL nuclei was analyzed with iso-density maps constructed through a quadrant analysis as previously described in detail [21,44,48,49,51,52,63,68].

Quantification and spatial distribution of melanopsin⁺RGCs

Total numbers of m⁺RGCs were obtained in the same retinas analysed 2 or 4 weeks after LP-induction of OHT. m⁺RGCs were dotted manually on the retinal photomontages. Then, dots were automatically quantified and their retinal position extracted using the IPP macro language following previously described method [44,54,65,67]. In brief, after marking the optic nerve as a reference point and drawing the retinal contour, the number of dots representing m⁺RGCs and their x, y position with respect to the optic nerve were calculated with a specific routine using the IPP macro language, these data were stored in a data sheet.

m⁺RGCs distribution was represented by nearest-neighbour maps, that were performed by a Java (Oracle Corporation, Redwood Shores, CA) application, as described [44,54,65,67]. Briefly, the user fixed the radius of the study (0.165mm) and imported the previously obtained spread sheet. Those cells within the fixed radius were counted as neighbours. Spatial information was used to plot every m⁺RGC, and each m⁺RGC was coloured within a scale from purple (0 neighbours), to red (11 or more neighbours). All plots were performed using SigmaPlot (SigmaPlot 9.0 for Windows; Systat Software, Inc., Richmond, CA).

Volumetric analysis of retinal innervation of the visual layers in the superior colliculus

Using the image analysis software IPP, the area occupied with CTB labelling in the two most superficial layers of the contralateral superior colliculus (SC), the stratum zonale and stratum griseum superficiale, was measured by a specific IPP macro as reported [58]. A polynomial regression line (order 5; with an $r^2 > 0.78$ in all cases studied) was obtained for each individual SC and the integral of the function yielded the volume of the SC occupied by intense CTB labelling in each animal as previously described in detail [58,59]. This mathematical analysis allowed to calculate the volume of the SC positive for CTB signal, even in the few instances in which artefacts associated with histological mounting (e.g., wrinkles, tears, folds, and tissue debris) made few serial sections unusable for measurement. Measurements were imported into a spreadsheet (Microsoft Office Excel 2007; Microsoft Corporation, Redmond, WA) for computation and graphing.

Statistics

All data are presented as means with standard deviations (SD). Statistical analysis was done using SigmaStat 3.1 for Windows (SigmaStat for Windows™ Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA). Kruskal—Wallis was used when comparing more than two groups and Mann—Whitney when comparing two groups only. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Ocular hypertension induced by laser photocoagulation

The intraocular pressure (IOP) values in control untreated right eyes and LP-treated left eyes are shown in detail in Fig. 1. IOP levels rise above control values during the first 5 days after

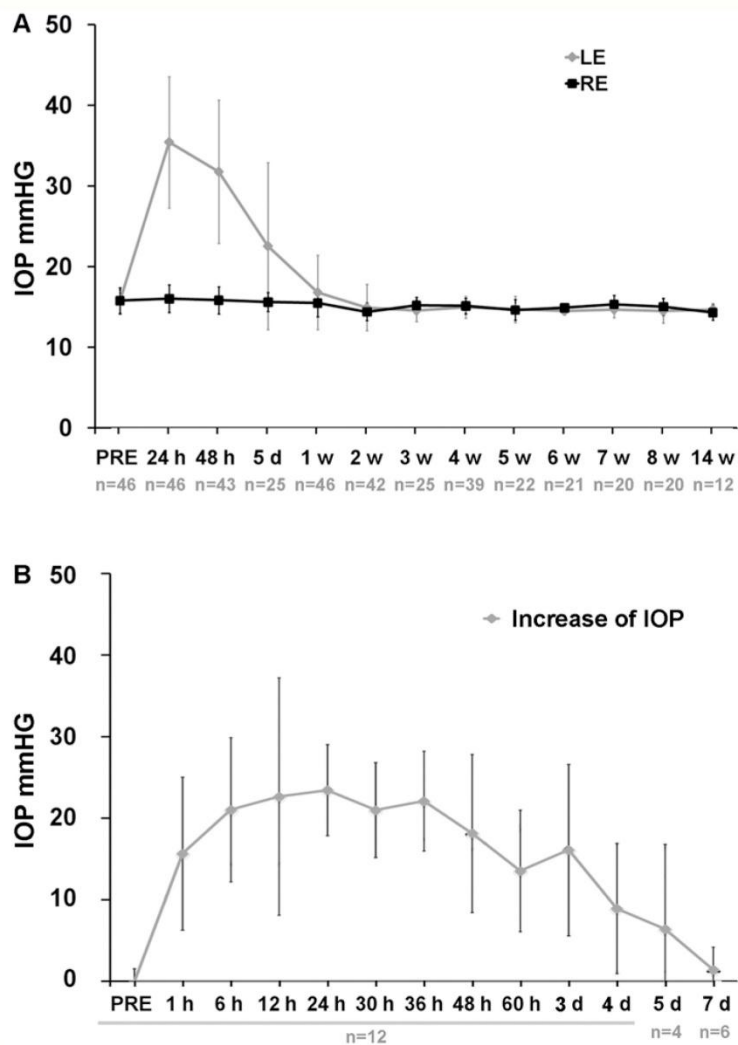


Fig 1. Intraocular pressure values. **A:** Graph showing the temporal course of IOP from 24h till 14 weeks after laser photocoagulation (LP). In the left eye (LE) there is a significant increase of the IOP at 24h, 48h and 5 days compared to the contralateral right eye (RE) and to prelaser (PRE) values. IOP values are back to normal from 1 week to 14 weeks, the latest time analyzed. In **B** are shown the IOP values during the first week post-LP measured at shorter intervals. One hour after LP, IOP has already increased significantly in the left eye. n = number of animals analyzed.

doi:10.1371/journal.pone.0121134.g001

LP, returned to basal levels by day 7 and remained so for up to 14 weeks, the longest survival time period analysed (Fig. 1A). Detailed readings of the IOP during the first week were analysed in a group of 12 mice used to investigate the retinotectal innervation at 14 weeks after LP. IOP increases significantly at 1 hour after LP (Mann-Whitney test, $p = 0.001$; $n = 12$), reaches maximum levels at 24 hours and remains significantly elevated until day 4 after LP (Mann-Whitney test, $p = 0.004$; $n = 12$) and then gradually return to basal values by 7 days after LP (Mann-Whitney test, $p = 0.673$; $n = 6$) (Fig. 1B).

OHT results in focal areas lacking OHSt⁺RGCs

In control retinas, retrogradely traced- or Brn3a⁺ RGCs were observed across the retina (Fig. 2). Their distribution is not homogeneous, rather their density is higher in the medial than in the peripheral retina (Fig. 2A', B') and their total numbers are comparable to those previously reported for pigmented mice [49,51] m⁺RGCs are found throughout the retina, although they are more abundant in the hemi- temporal and dorsal retina (Fig. 2C-C').

LP-induced OHT results in the lack of retrogradely labelled RGCs. There were large sectors with few to none retrogradely traced RGCs. The lack of OHSt⁺RGCs was often located in the dorsal retina but was also observed in the inferior retina, and varied from a small pie-shaped sector to one or several retinal quadrants (Fig. 3A-F). The lack of OHSt⁺RGCs was observed at two weeks, the earliest time point examined, and adopt the form of a pie-shaped triangular sector with their base located in the periphery and their apex in the optic disc. This lack of retrogradely labelled RGCs did not seem to progress from 2 to 4 weeks (Fig. 3D-F), since the total numbers of OHSt⁺RGCs counted in LP retinas examined at 2 or 4 weeks were comparable (Mann-Whitney test, $p = 0.535$). The distribution of OHSt⁺RGCs was investigated by constructing isodensity maps for each retina. These isodensity maps revealed that in addition to focal loss there was also diffuse loss of these neurons; in the LP retinas the densities of OHSt⁺RGCs are lower than those found in corresponding regions of contralateral fellow retinas (compare Fig. 3A-F with Fig. 2A').

When comparing the retinal distribution of Brn3a⁺RGCs, i.e. RGCs that are still alive independently of their retrograde labelling capability, with the distribution of retrogradely traced-RGCs it was evident that at 2 weeks the densities of Brn3a⁺RGCs were higher than those of OHSt⁺RGCs (Fig. 3AA'-CC'), but did not reach statistical significance (Mann-Whitney test, $p = 0.329$). At 4 weeks, this mismatch disappears and the retinal densities of both populations appear similar (Fig. 3DD'-FF') (Mann-Whitney test, $p = 0.902$).

OHT induces a diffuse but not a sectorial loss of m⁺RGCs

The control fellow retinas showed a typical retinal distribution of m⁺RGCs with their total numbers comparable to those recently reported for pigmented mouse [44,69–71], a little over one thousand m⁺RGCs. The effects of OHT on the population of m⁺RGCs are comparable to those observed for the rest of the RGC population Brn3a⁺, in that the loss of m⁺RGC is proportionally comparable to that found for retrogradely traced RGCs (Fig. 3A''-F''). However, the loss of m⁺RGCs does not adopt the typical focal sectorial pattern, but rather their loss is more diffuse across the retina and more severe in the area of their higher density, the dorso-temporal retina. By two weeks after LP-induced OHT, approximately 40% of the total numbers of m⁺RGCs were lost, while at 4 weeks the loss amounted to approximately 54% of the original population. As was also observed in the same groups of retinas for the total numbers of Brn3a⁺RGCs and OHSt⁺RGCs, the differences in total numbers of m⁺RGCs between 2 and 4 weeks did not reach statistical significance (Mann-Whitney test, $p = 0.209$).

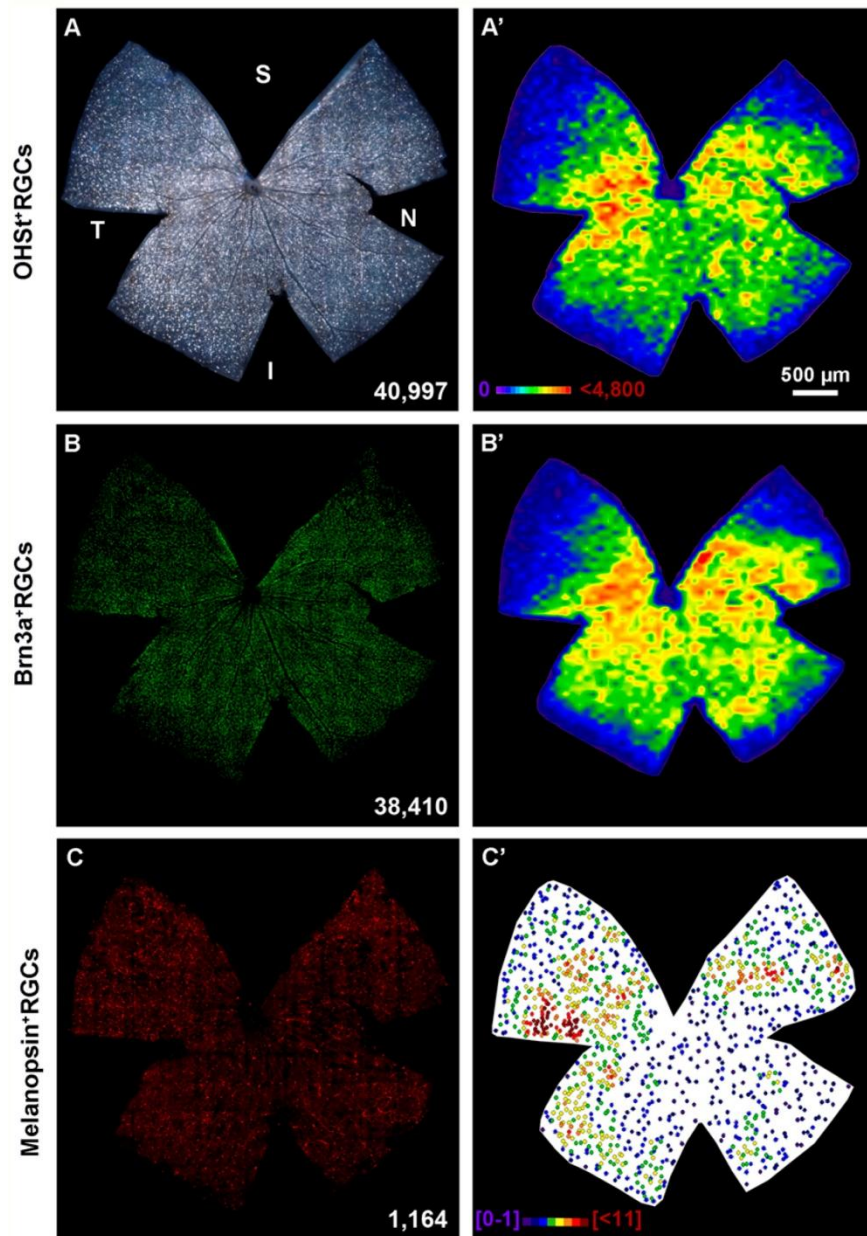


Fig 2. Distribution of traced-, Brn3a⁺ and melanopsin⁺ RGCs in control mice. A-C Photomontages from the same left retina showing OHSt (A), Brn3a (B) and melanopsin (C) positive RGCs. Their distribution is shown in A'-C', respectively. A'-B': isodensity maps, C': neighbour map. Density or neighbour maps colour scales in A' and C'. At the bottom of each photomontage is shown its number of RGCs or m⁺RGCs. S: superior, V: ventral, N: nasal, T: temporal. Bar: 500 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0121134.g002

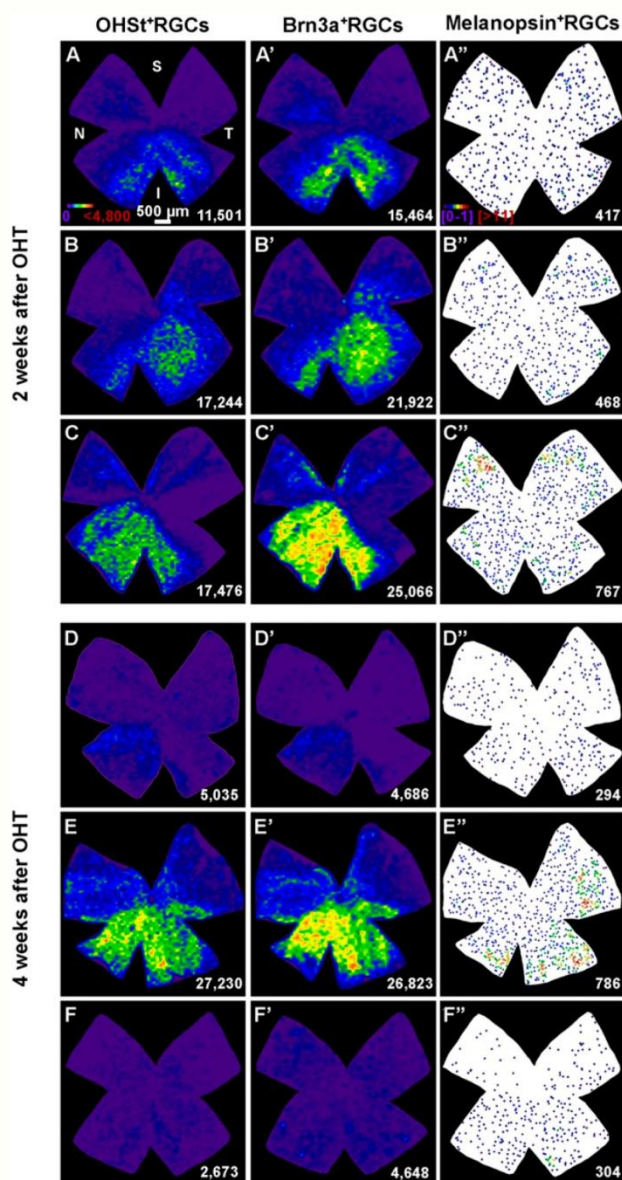


Fig 3. Sectorial loss of RGCs after OHT. Distribution of traced- (A-F), Brn3a⁺ (A'-F') and melanopsin⁺ (A'', F'') RGCs at 2 (A-C'') and 4 weeks (D-F'') after the induction of ocular hypertension (OHT). Maps labelled with the same letter are from the same retina (A-A'', B-B'' and so on). A-F': isodensity maps. A''-F'': neighbour maps. Colour scale for isodensity maps in A goes from purple (0 RGCs/mm²) to red ($\geq 4,800$ RGCs/mm²), and for neighbour maps in A' goes from purple (1-2 neighbours in a radius of 0.165 mm) to red (≥ 11 neighbours in the same radius). At the bottom of each map is shown the number of RGCs or mRGCs counted in its respective retina. S: superior, V: ventral, N: nasal, T: temporal. Bar scale in A: 500 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0121134.g003

Table 3. Total numbers of RGCs in control and OHT retinas.

Analyzed at	Population		Mean±SD
2 weeks after OHT	OHSt ⁺ RGCs	RE (n = 7)	38,479±2,134
		LE (n = 7)	19,383±9,499*
	Brn3a ⁺ RGCs	RE (n = 7)	37,904±1,265
		LE (n = 7)	25,007±11,115*
	m ⁺ RGCs	RE (n = 7)	1,059±79
		LE (n = 7)	629±254*
4 weeks after OHT	OHSt ⁺ RGCs	RE (n = 7)	38,507±2,324
		LE (n = 7)	14,795±14,326*
	Brn3a ⁺ RGCs	RE (n = 7)	37,936±2,151
		LE (n = 7)	15,583±15,505*
	m ⁺ RGCs	RE (n = 7)	1,019±140
		LE (n = 7)	478±248*

Mean ± standard deviation (SD) of the total number of traced- (OHSt⁺), Brn3a⁺ and melanopsin⁺ RGCs at 2 and 4 weeks after the induction of OHT. RE: right control retina. LE: left experimental retina. n: number of analyzed retinas.

*Significant difference when compared to right control retinas ($p < 0.05$ Mann-Whitney test).

doi:10.1371/journal.pone.0121134.t003

OHT induces degeneration of RGCs with high inter-animal variability

The increased IOP resulted for all experimental retinas examined in RGC loss, and the total numbers of OHSt⁺, Brn3a⁺ or melanopsin⁺ RGCs were significantly smaller when compared to their fellow right retinas. However, there was a large inter-animal variability in the extension of damage observed in the RGC population (Table 3, Fig. 4, OHSt).

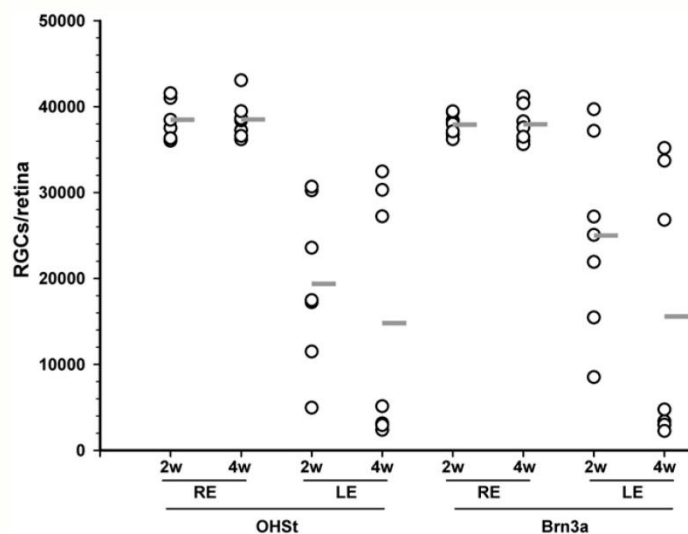


Fig 4. Number of RGCs in all analyzed groups. Vertical point chart showing the number of OHSt⁺RGCs (traced RGCs i.e. with a competent retrograde axonal transport) or Brn3a⁺RGCs (RGCs alive) for each of the analyzed retinas at 2 and 4 weeks after OHT (open circles). The horizontal grey line is the mean value within each group. RE: right control eye. LE: left experimental eye.

doi:10.1371/journal.pone.0121134.g004

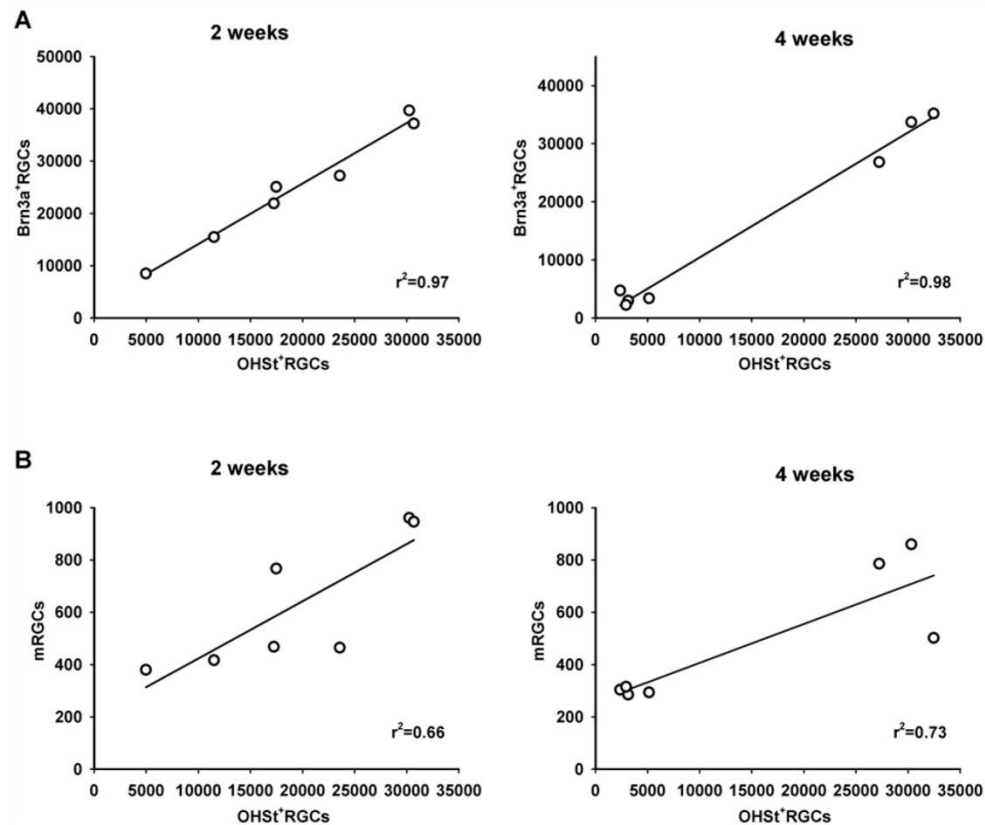


Fig 5. Correlation analysis. Correlation between the number of Brn3a⁺RGCs vs OHSt⁺RGCs (A) and mRGCs vs OHSt⁺RGCs (B) for each analyzed retina (open circles) at 2 and 4 weeks after OHT induction. The r^2 value for each regression line is shown at the bottom right of each graph.

doi:10.1371/journal.pone.0121134.g005

Two weeks after LP, there were more Brn3a⁺RGCs ($25,007 \pm 11,115$; $n = 7$) than OHSt⁺RGCs ($19,383 \pm 9,499$; $n = 7$), but this difference does not reach statistical significance probably due to the high variability of this model (Mann-Whitney test, $p = 0.329$) (Fig. 4, Brn3a). In accordance with the topographical analysis, at four weeks the proportion of OHSt⁺RGCs (38%) and Brn3a⁺ (41%) RGC is closer (Mann-Whitney test, $p = 0.902$) (Table 3, Fig. 3).

Correlation analysis of the number of OHSt⁺RGCs (i.e. RGCs labelled by active retrograde axonal transport) and Brn3a⁺RGCs or m⁺RGCs reveals that the loss of the Brn3a⁺RGCs is highly correlated with the extension of the axonal transport impairment ($r^2 = 0.97$ at 2 weeks, and 0.98 at 4 weeks, Fig. 5A), while for the m⁺RGC population this correlation is weaker ($r^2 = 0.66$ at 2 weeks and 0.73 at 4 weeks, Fig. 5B). This is in agreement with the topographical analysis (Fig. 3) where it was observed that in the areas lacking OHSt⁺RGCs there were still numerous m⁺RGCs.

Overall, we interpret these data as a suggestion that OHT results in an early alteration of the retrograde axonal transport of RGCs, as previously shown in this laboratory for albino rats [18,48] and mice [22], that occurs within the first two weeks after OHT induction and does not

Table 4. Numbers of Brn3a⁺RGCs and DAPI⁺nuclei in the ganglion cell layer four weeks after OHT.

Population		Mean±SD
Brn3a ⁺ RGCs	RE (n = 8)	36,623±1,384
	LE (n = 8)	14,508±9,518
DAPI ⁺ nuclei in the GCL	RE (n = 8)	82,094±4,729
	LE (n = 8)	61,589±9,684
DAPI ⁺ nuclei—Brn3a ⁺ RGCs	RE (n = 8)	45,471±5,178
	LE (n = 8)	47,081±11,760

Mean ± SD of the total number of Brn3a⁺RGCs and of DAPI⁺nuclei in the GCL 4 weeks after the induction of OHT. The last row shows the number of DAPI⁺nuclei that are not RGCs (subtraction of Brn3a⁺RGCs from the total number of DAPI⁺nuclei). RE: right control retina, LE: left injured retina. n: number of retinas analyzed.

doi:10.1371/journal.pone.0121134.t004

progress further. However, RGC loss appears to be more gradual as indicated by the progressive loss of Brn3a⁺RGCs.

OHT induces specific loss of RGCs in the ganglion cell layer

To determine whether OHT had an effect on other neurons of the GCL the total number of DAPI⁺nuclei in this layer was quantified 4 weeks after LP (Table 4, Fig. 6).

Four weeks after OHT around 20,000 Brn3a⁺RGCs had been lost. This proportion of cell loss is similar to the diminution in total numbers of DAPI⁺nuclei present in the GCL of the experimental retinas. Furthermore, the numbers of DAPI⁺nuclei that are not Brn3a⁺RGCs is not significantly different between the injured and the contralateral control retina (Table 4, bottom row). Overall, these data strongly suggest that at this time point, OHT does not induce the loss of other non-RGC neurons, presumably displaced amacrine cells.

The topographical analysis of the retinal distribution of Brn3a⁺RGCs and DAPI⁺nuclei in the GCL showed that in the typical pie-shaped sectors lacking Brn3a⁺RGCs there was a decrease but not an absence of DAPI⁺nuclei (Fig. 6, compare B' with B'', C with C' and D with D'). A closer look at the actual Brn3a and DAPI signals (Fig. 6E-E') shows that indeed in the areas lacking Brn3a⁺RGCs, there are many surviving cells that probably correspond mostly to displaced amacrine cells, although some of these nuclei may belong to astrocytes, endothelial and microglial cells.

OHT affects the volume of retinal afferents innervating the visual layers of the SC

We have analyzed the area and volume of the contralateral SC occupied by retinal axon terminals identified with the orthogradely transported CTB injected in the LP eye (Fig. 7). In the visual layers of control SC, the CTB labelling was homogenous through the medio-lateral and anterior/posterior Bregma coordinates. Ten days to 14 weeks after OHT induction in the left retina there was certain variability in the extent of CTB labelling throughout the right SC of individual experimental mice, but overall there was a marked reduction in the amount of CTB-labelled retinal afferents in the two most superficial layers of the contralateral SC. There were areas with almost no CTB immunoreactivity that varied in size and shape, and were present in several consecutive sections. These areas lacking CTB labelling were often restricted to small patches that extended in the dorso-ventral axis on the two most superficial visual layers; the lateral extension of these areas varied from a small narrow column to almost one fourth or one

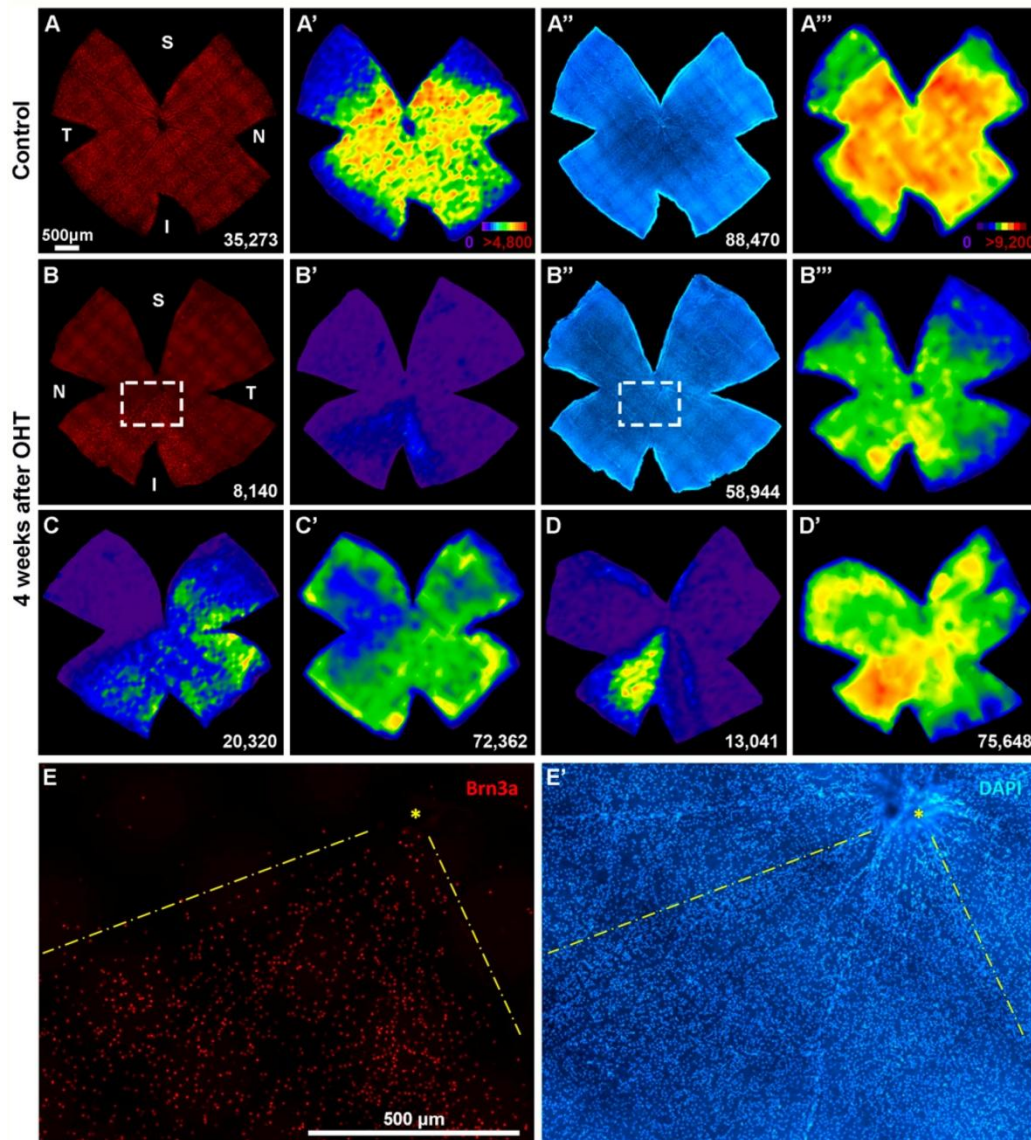


Fig 6. OHT does not affect non-RGC cells in the ganglion cell layer. **A, A'**, **B, B''**: retinal photomontage showing Brn3a⁺RGCs (**A, B**) or DAPI⁺nuclei in the GCL (**A'', B''**) in a control retina (**A, A''**) and in a retina analyzed 4 weeks after OHT (**B, B''**). In **A', A'''** and **B', B'''** are shown their corresponding isodensity maps. **C, C'** and **D, D'** panels show other examples of Brn3a⁺RGCs (**C, D**) and DAPI⁺nuclei (**C', D'**) retinal distribution after 4 weeks of OHT. **E-E'**: Magnifications from the squares in B and B'' respectively showing that in the areas lacking Brn3a⁺RGCs (**E**) there are DAPI⁺nuclei (**E'**). Colour scale for Brn3a⁺RGCs isodensity maps in A' (from purple, 0 RGCs/mm², to red $\geq 4,800$ RGCs/mm²) and for DAPI⁺nuclei isodensity maps in A''' (from purple, 0 nuclei/mm² to red $\geq 9,200$ nuclei/mm²). At the bottom of each map is shown the number of RGCs or DAPI⁺nuclei counted in its respective retina. S: superior, V: ventral, N: nasal, T: temporal. Scale bar in A and B: 500 μm.

doi:10.1371/journal.pone.0121134.g006

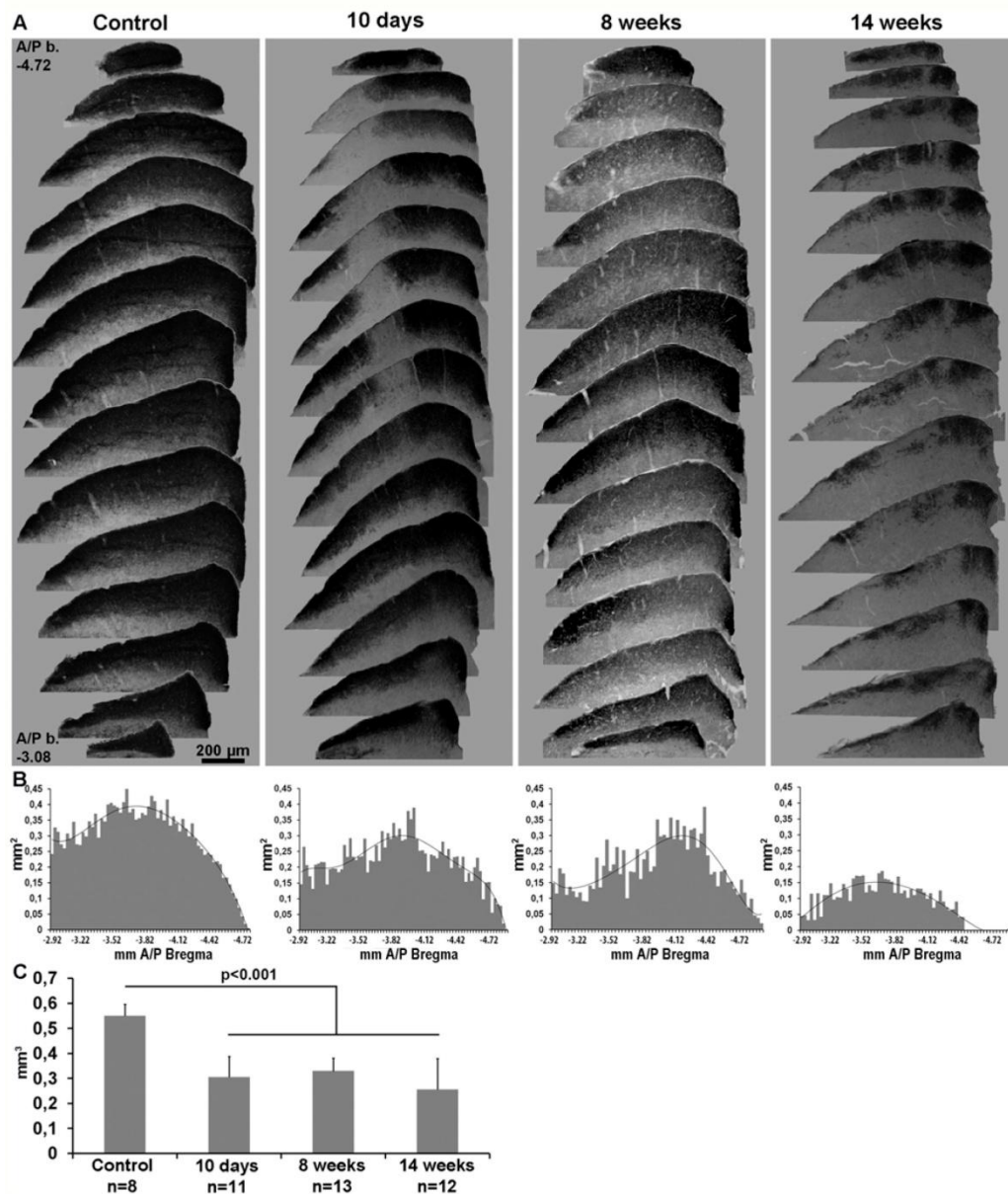


Fig 7. Deafferentation of the contralateral superior colliculus after OHT. **A:** Serial coronal brain sections spanning the right (contralateral) superior colliculus (from anterior/posterior bregma coordinates: -3.08 to -4.72 mm) showing the retinal afferents labelled by anterograde tracing with CTB injected into the left eye. Left column: control SC. The remaining three columns show a representative example of a SC analyzed at 10 days, 8 weeks or 14 weeks after ocular hypertension (OHT). **B:** Plots of the area occupied by retinal afferents in the SC against the anterior-posterior distance (Bregma coordinates, in mm). These plots correspond to the SCs shown in A. **C:** Volume of the SC occupied by retinal afferents. n = number of SC analyzed. Compared to control SC, the volume of SC innervated by retinal axons decreases significantly after OHT (t-test $p < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0121134.g007

half of the medio-lateral extension of the SC, while in the rostro-caudal extension these areas were observed from few consecutive coronal sections to almost half of the rostro-caudal extension (Fig. 7). Measurement of the volume of CTB labelling in the two most superficial layers of the SC, reveals that approximately 50% (55.7% at 10 days, 59.9% at 4 weeks and 46.6% at 14 weeks) of the visual layers in the right SC do not show CTB-labelled retinal terminals. The amount of volume of the SC without CTB-labelling did not change significantly from 10 days to 14 weeks, and this is in agreement with the numbers of traced RGCs in the retina, which is stable from 15 to 30 days. Furthermore, there is a correlation between the loss of retrogradely labelled RGCs in the retina (34–50%) and the loss of CTB-labelled retinal terminals in the visual layers of the SC (46–59%).

Discussion

Mice have been used in many experimental models of human diseases because they are easy to handle and relative inexpensive when compared to other animals, and also because of the possibility of using the transgenic technology [47]. In addition the mouse visual system has a number of advantages as well as several structural similarities to the human eye such as the outflow system and retinal vascularization [2]. One of the main difficulties in using mice relates to the small size of the eye as well as the difficulty to measure the IOP [48]. Ocular hypertension remains an important risk factor in Glaucoma and thus the development of mouse models with elevated IOP has the purpose of advancing our knowledge of the pathology of human GON, to ameliorate our understanding of the disease and to treat and prevent human GON.

Previous studies of animal models of experimental glaucoma secondary to elevated intraocular pressure have shown significant RGC loss ranging from 30 to 90% depending on the method employed, the time course and the experimental model to induce OHT in adult albino rats [16,18,21,72] and in pigmented [41] or albino [22,23] mice. It might be worth noting that in laser-induced OHT models, the loss of RGCs appears more severe in albino than in pigmented mice. Indeed, Mabuchi and colleagues (2003) [31] in pigmented mice reported a reduction of RGC axons that yields a survival at 12 weeks of approximately 30% of the original population, similar results were reported by others [29,32–34], although Yun and colleagues (2014) [36] reported a loss of approximately 60% of the RGC population by 24 weeks. However the loss of Brn3b⁺RGCs and RGC axons reported by Fu and Sretavan (2010) [24] for the albino mice at 4 weeks were of approximately 90% and 78%, respectively. Our own studies also support this idea; the present studies in pigmented mice show a loss of RGCs (50%) that is also somewhat smaller than that found in similarly treated adult albino mice (80%) [22,23]. It is possible that such a smaller RGC loss is related to the lower levels of IOP achieved in the pigmented vs albino mice after laser-induced OHT. In the present LP model, the IOP values were rather high and short-lived (rising of 20 mm Hg for a few days) and this may be regarded as a disadvantage when compared to more chronic models of OHT that result in a slower progression of RGC loss. The elevated IOP values observed in our model are in contrast with a less dramatic increase of the IOP (rising of 6 to 7 mm Hg) that last for over one month, observed in other mouse models in which microbeads were injected into the anterior chamber to occlude aqueous outflow [5,7,13]. Nevertheless our model induces a transient OHT that is sufficient to trigger a number of features such as; the sectorial loss of RGCs, an early damage to axons at the level of the optic nerve head, the survival of RGCs with a compromised anterograde and retrograde axonal transport, all of which are typically observed in a congenic mouse model of glaucoma, the DBA/2J [10,12,13,41].

Previous studies have indicated that in experimental and human glaucoma there are important changes in the major retinorecipient target nuclei of the brain [45,73,74]. Thus, it was

important to investigate the effects of ocular hypertension on the major retinofugal projection short and long periods of time after laser photocoagulation. In adult albino rats Drouyer and colleagues (2008) [37] found a reduction in retinal fiber density in different retinorecipient structures with a range from approximately 50% in the vLGN to 72% in the SCN, and 50% in the SC [37]. Our results using a very sensitive orthogradely transported neuronal tracers in adult pigmented mice are consistent with those found in adult albino rats, since we also found a lack of anterograde labelling of retinorecipient terminals. Interestingly, the lack of CTB-labelled retinal terminals in the contralateral SC did not seem to progress between 10 days and 14 weeks. This finding is in concordance with previous observations in albino [22] and the present work in pigmented mice, indicating that the lack of retrogradely labelled RGCs does not progress further from 15 to 30 days. Such a lack of CTB-labelled retinorecipient terminals could be due to the death of the parent RGCs and the consequent degeneration of their axons but could also be explained by an impairment of anterograde axonal transport which would be predegenerative as has been shown in a congenic adult mouse model of glaucoma [3,13,75]. Overall these results further strengthen the idea that OHT results, not only in marked degeneration of the RGC layer but also affects retinofugal axons and thus may result in significant denervation of the retinorecipient target nuclei in the brain [45,28].

The population of RGCs constitutes only a proportion of the neurons in the ganglion cell layer of the rodent [76,77]. An estimate of the actual proportion of RGCs for adult pigmented (C57BL/6) is of approximately 41% [78] or 50% [79]. In our experiments, it is likely that most of the DAPI⁺ nuclei in the sectors of the retina showing a complete absence of Brn3a⁺ RGCs correspond to displaced amacrine cells, with a minor proportion of these nuclei corresponding to astrocytes, endothelial cells and microglia which is known to respond with proliferation or cell migration [27,80,81]. Such observation argues for a selective damage to RGCs while sparing other non-RGC neurons in this layer. When the total numbers Brn3a⁺ RGCs were deducted from the total numbers of DAPI⁺ nuclei, the resulting subtraction yield comparable numbers of remaining DAPI⁺ nuclei, and this also argues in favour of a selective damage to RGCs while sparing displaced amacrine cells. Overall, the topographical loss of RGCs together with the presence of many non-RGC neurons (presumably displaced amacrine cells) in the GCL in accordance with previous observations in adult rats [21,82] and mice [41,83,84] after OHT, and suggests that damage to RGC axons may occur somewhere near the optic disc [48] where retinotopical arrangement is maximal [85–88], without affecting other neurons in the GCL. Recently, the loss of RGCs displaced to the inner nuclear or inner plexiform layer of the retina was also found to adopt the form of pie-shaped sectors following OHT in adult albino rats [54], suggesting that if the GCL were to be the primary site for OHT-induced damage, displaced RGCs would have been found within the areas lacking RGCs, and this was not so (See Figure 10 of Nadal-Nicolás et al., 2014 [54]).

Non-image forming visual behaviours are dependent on the intrinsically photosensitive RGCs containing melanopsin (mRGCs) and include photoentrainment of circadian cycles, photic suppression of activity, acute light-activated suppression of pineal melatonin secretion, and control of pupillary light responses [44,52,71,89–91]. In Human GON patients, there were significant reductions in intrinsically photosensitive RGC (ipRGC) function of the glaucomatous eye when compared to the contralateral eye or to normal populations [92–94]. A previous study has reported that mRGCs were more injury-resistant in chronic ocular hypertension model with no alterations in the total numbers nor in their dendritic morphology up to 12 weeks after OHT induction in adult albino rats [39], suggesting that m⁺RGCs carry some unique characteristics that are different from other populations of RGCs. A larger number of studies, however, indicate that this is not the case [40] for experimental glaucoma. In adult rats, laser-induced OHT results in significant reductions of the mRGCs [37,42,43] as well as in their

innervation of the suprachiasmatic nuclei with an impact on their ability to entrain to light [37]. Similarly, Jakobs and colleagues (2005) [41] reported loss of m^+ RGCs in adult mice with congenic glaucoma and in a line of mice created by crossing DBA/2J mice (which develop a pigmented glaucoma) with Thy1-CFP mice [38], the progressive increase of the IOP was accompanied by a concomitant reduction in the numbers of RGCs and of m^+ RGCs, suggesting that OHT-induced progressive loss of RGCs, and of m^+ RGCs, could have a substantial impact on animal behavioural response patterns (Zhang et al., 2013). Our present results in pigmented mice also indicate that m^+ RGCs degenerate as a consequence of OHT (Fig. 3; Table 3). The retinas analyzed 2 or 4 weeks after LP were examined for the presence of Brn3a⁺RGCs and m^+ RGCs to ascertain the fate of the general population of RGCs (Brn3a⁺RGCs) and the sub-population of intrinsically photosensitive RGCs (m^+ RGCs). Thus the proportions of surviving m^+ RGCs and Brn3a⁺RGCs found at 2 or 4 weeks are comparable, since the retinas were exposed to the same amount of elevated IOP. Approximately 40% to 54% of the original m^+ RGCs were lost at 2 or 4 weeks after LP, and these proportions were comparable among themselves and to those observed for Brn3a⁺RGCs at similar time intervals, indicating that OHT also induces the loss of m^+ RGCs in similar proportions. Our results however, demonstrate that the loss of m^+ RGCs is rather diffuse and does not follow the typical pattern of pie-shaped sectors observed for the general population of Brn3a⁺RGCs. Possible explanations for these discrepancies may be related to the types of m^+ RGCs analyzed in different studies (there are 6 different morphological types of m^+ RGCs; [40]). Nevertheless, the possibility that m^+ RGCs are more resistant to axotomy [95,96], NMDA-induced excitotoxicity [97] and mitochondrial optic neuropathies [98,99] than the rest of the RGC population remains to be further studied [40].

In the present study we have further characterized the course of retinal degeneration after laser-induced OHT. To this end we have used: neuronal tracers to assess both the retrograde and anterograde transport; specific molecular markers such as Brn3a antibodies to identify all RGCs except melanopsin containing RGCs, and melanopsin antibodies to detect ipRGCs (M1 to M4, but no M5), and; nuclear staining to detect and quantify non-RGC neurons in the ganglion cell layer of the retina. We show that at 2 weeks after LP, there are still surviving RGCs whose axonal transport is compromised and results at 4 weeks in their loss. These data are relevant when designing neuroprotective treatments. We have also investigated the intrinsically photosensitive subtype of RGCs, the m^+ RGCs, because in glaucoma patients the circadian rhythm and/or the pupil response are altered [92–94], and show that while m^+ RGCs are numerically affected in the same proportion as the rest of RGCs their topographic loss does not follow the rest of the RGC population. Finally, long-time after LP the main retinorecipient target nuclei in the brain, the SC, shows that the volume occupied by retinorecipient afferents is reduced to approximately half their normal values.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MVS MPVP MAT MAB FJVS. Performed the experiments: FJVS MSN MJL LAM AOM JMBG. Analyzed the data: FJVS MSN MJL LAM AOM JMBG MAB MVS. Contributed reagents/materials/analysis tools: MAB MPVP MVS. Wrote the paper: FJVS MVS MAB MAT MPVP.

References

1. The AGIS investigators (2000) The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am J Ophthalmol* 130: 429–440. PMID: 11024415

2. Morrison JC, Johnson E, Cepurna WO (2008) Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res* 173: 285–301. doi: [10.1016/S0079-6123\(08\)01121-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)01121-7) PMID: [18929117](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18929117/)
3. Calkins DJ (2012) Critical pathogenic events underlying progression of neurodegeneration in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 31: 702–719. doi: [10.1016/j.preteyeres.2012.07.001](https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.07.001) PMID: [22871543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22871543/)
4. Ruiz-Ederra J, Verkman AS (2006) Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp Eye Res* 82: 879–884. PMID: [16310189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16310189/)
5. Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ (2010) The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 207–216. doi: [10.1167/iovs.09-3947](https://doi.org/10.1167/iovs.09-3947) PMID: [19850836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19850836/)
6. Chen H, Wei X, Cho KS, Chen G, Sappington R, Calkins DJ, et al. (2011) Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 36–44. doi: [10.1167/iovs.09-5115](https://doi.org/10.1167/iovs.09-5115) PMID: [20702815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20702815/)
7. Ward NJ, Ho KW, Lambert WS, Weitlauf C, Calkins DJ (2014) Absence of transient receptor potential vanilloid-1 accelerates stress-induced axonopathy in the optic projection. *J Neurosci* 34:3161–3170. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4089-13.2014](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4089-13.2014) PMID: [24573275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24573275/)
8. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003) Ocular hypertension in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 1581–1585. PMID: [12657595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12657595/)
9. Danias J, Lee KC, Zamora MF, Chen B, Shen F, Filippopoulos T, et al. (2003) Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2Nnia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 5151–5162. PMID: [14638711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14638711/)
10. Filippopoulos T, Danias J, Chen B, Podos SM, Mittag TW (2006) Topographic and morphologic analyses of retinal ganglion cell loss in old DBA/2Nnia mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1968–1974. PMID: [16639004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16639004/)
11. Reichstein D, Ren L, Filippopoulos T, Mittag T, Danias J (2006) Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res* 84: 13–21. PMID: [17074320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17074320/)
12. Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, et al. (2008) Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 28: 2735–2744. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4443-07.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4443-07.2008) PMID: [18337403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18337403/)
13. Crish SD, Sappington RM, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ (2010) Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 5196–5201. doi: [10.1073/pnas.0913141107](https://doi.org/10.1073/pnas.0913141107) PMID: [20194762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20194762/)
14. Panagis L, Zhao X, Ge Y, Ren L, Mittag TW, Danias J (2010) Gene expression changes in areas of focal loss of retinal ganglion cells in the retina of DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 2024–2034. doi: [10.1167/iovs.09-3560](https://doi.org/10.1167/iovs.09-3560) PMID: [19737878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19737878/)
15. Pérez de Lara MJ, Santano C, Guzmán-Aránguez A, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz, et al. (2014) Assessment of inner retina dysfunction and progressive ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res* 122: 40–49. doi: [10.1016/j.exer.2014.02.022](https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.02.022) PMID: [24631335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24631335/)
16. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA (2001) Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2849–2855. PMID: [11687528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687528/)
17. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME (2002) Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 402–410. PMID: [11818384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11818384/)
18. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, et al. (2010) Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 90: 168–183. doi: [10.1016/j.exer.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.10.003) PMID: [19835874](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19835874/)
19. Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, 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: 5690–5696. doi: [10.1167/iovs.10-5248](https://doi.org/10.1167/iovs.10-5248) PMID: [20538983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20538983/)
20. Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N (2011) Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 434–441. doi: [10.1167/iovs.10-5856](https://doi.org/10.1167/iovs.10-5856) PMID: [20811062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811062/)
21. Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, et al. (2015) Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors. *Exp Eye Res* 132:17–33. doi: [10.1016/j.exer.2015.01.006](https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.01.006) PMID: [25576772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25576772/)

22. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, et al. (2009) Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol Vis* 15: 2578–2598. PMID: 20011633
23. Cuenca N, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, et al. (2010) Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp Eye Res* 91: 273–285. doi: 10.1016/j.exer.2010.05.020 PMID: 20650699
24. Fu CT, Sretavan D (2010) Laser-induced ocular hypertension in albino CD-1 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 980–90. doi: 10.1167/iovs.09-4324 PMID: 19815738
25. Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, 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. doi: 10.1186/1742-2094-9-92 PMID: 22583833
26. de Hoz R, Gallego BI, Ramírez AI, Rojas B, Salazar JJ, Valiente-Soriano FJ, 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: e83733. doi: 10.1371/journal.pone.0083733 PMID: 24367610
27. Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Valiente-Soriano FJ, et al. (2014) Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation* 11: 133. doi: 10.1186/1742-2094-11-133 PMID: 25064005
28. Dekeyser E, Aerts J, Valiente-Soriano FJ, De Groef L, Vreysen S, Salinas-Navarro M, et al. (2015) Ocular hypertension results in retinotopic alterations in the visual cortex of adult mice. *Curr Eye Res* 23: 1–15.
29. Gross RL, Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, et al. (2003) A mouse model of elevated intraocular pressure: retina and optic nerve findings. *Trans Am Ophthalmol Soc* 101: 163–169. PMID: 14971574
30. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003) Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4314–4320. PMID: 14507875
31. Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN (2003) Optic nerve damage in experimental mouse ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4321–4330. PMID: 14507876
32. Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH (2003) Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4337–4346. PMID: 14507878
33. Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, Li D, et al. (2005) Effects of elevated intraocular pressure on mouse retinal ganglion cells. *Vision Res* 45: 169–179. PMID: 15581918
34. Holcombe DJ, Lengefeld N, Gole GA, Barnett NL (2008) Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model. *Br J Ophthalmol* 92: 683–688. doi: 10.1136/bjo.2007.133223 PMID: 18296504
35. Nguyen JV, Soto I, Kim KY, Bushong EA, Oglesby E, Valiente-Soriano FJ, et al. (2011) Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1176–1181. doi: 10.1073/pnas.1013965108 PMID: 21199938
36. Yun H, Lathrop KL, Yang E, Sun M, Kagemann L, Fu V, et al. (2014) A laser-induced mouse model with long-term intraocular pressure elevation. *PLoS One* 9: e107446. doi: 10.1371/journal.pone.0107446 PMID: 25216052
37. Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, et al. (2008) Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One* 3: e3931. doi: 10.1371/journal.pone.0003931 PMID: 19079596
38. Zhang Q, Vuong H, Huang X, Wang Y, Brecha NC, Pu M, et al. (2013) Melanopsin-expressing retinal ganglion cell loss and behavioral analysis in the Thy1-CFP-DBA/2J mouse model of glaucoma. *Sci China Life Sci* 56: 720–730. doi: 10.1007/s11427-013-4493-1 PMID: 23729182
39. Li RS, Chen BY, Tay DK, Chan HH, Pu ML, So KF (2006) Melanopsin-expressing retinal ganglion cells are more injury-resistant in a chronic ocular hypertension model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 2951–2958. PMID: 16799038
40. Cui Q, Ren C, Sollars PJ, Pickard GE, So K-F (2015) The injury resistant ability of melanopsin-expressing intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuroscience* 284C: 845–853.
41. Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH (2005) Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* 171: 313–325. PMID: 16247030
42. Wang HZ, Lu QJ, Wang NL, Liu H, Zhang L, Zhan GL (2008) Loss of melanopsin-containing retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Chin Med J* 121: 1015–1019. PMID: 18706250

43. de Zavalía N, Plano SA, Fernandez DC, Lanzani MF, Salido E, Belforte N, et al. (2011) Effect of experimental glaucoma on the non-image forming visual system. *J Neurochem* 117: 904–914. doi: [10.1111/j.1471-4159.2011.07260.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07260.x) PMID: [21446997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21446997/)
44. Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Villegas-Pérez MP, et al. (2014) Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Front Neuroanat* 8: 131. doi: [10.3389/fnana.2014.00131](https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00131) PMID: [25477787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25477787/)
45. Yücel YH, Zhang Q, Weinreb RN, Kaufman PL, Gupta N (2003) Effects of retinal ganglion cell loss on magno-, parvo-, koniocellular pathways in the lateral geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 22: 465–481. PMID: [12742392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12742392/)
46. Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Ortín-Martínez A, Alarcón-Martínez L, Bernal M, et al. (2008) Effects of elevated intraocular pressure on the retinal ganglion cell population in adult pigmented mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: E-Abstract 5480.
47. Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Ortín-Martínez A, Bernal M, et al. (2009) Effects of elevated intraocular pressure on the retinotectal projection in adult pigmented mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: E-Abstract 2779.
48. Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, de Imperial JM, et al. (2012) Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res* 31: 1–27. doi: [10.1016/j.preteyeres.2011.08.001](https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.08.001) PMID: [21946033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21946033/)
49. Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, et al. (2009) Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res* 49: 637–647. doi: [10.1016/j.visres.2009.01.010](https://doi.org/10.1016/j.visres.2009.01.010) PMID: [19948111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19948111/)
50. Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, et al. (2009) A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res* 49: 115–126. doi: [10.1016/j.visres.2008.09.029](https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.09.029) PMID: [18952118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18952118/)
51. Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, et al. (2011) Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res* 92: 377–387. doi: [10.1016/j.exer.2011.02.008](https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.02.008) PMID: [21354138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21354138/)
52. Galindo-Romero C, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Agudo-Barriso M, et al. (2013) Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp Eye Res* 108: 84–93. doi: [10.1016/j.exer.2012.12.010](https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.12.010) PMID: [23295345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23295345/)
53. Sánchez-Migallón MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriso M (2011) Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 92: 260–267. doi: [10.1016/j.exer.2011.02.001](https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.02.001) PMID: [21315070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21315070/)
54. Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, et al. (2014) Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front Neuroanat* 8: 99. doi: [10.3389/fnana.2014.00099](https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00099) PMID: [25339868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25339868/)
55. Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriso M (2015) Two methods to trace retinal ganglion cells with fluorogold: From the intact optic nerve or by stereotactic injection into the optic tract. *Exp Eye Res* 131: 12–19. doi: [10.1016/j.exer.2014.12.005](https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.12.005) PMID: [25482219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25482219/)
56. Whiteley SJ, Sauvé Y, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Lund RD (1998) Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Exp Neurol* 154: 560–572. PMID: [9878191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9878191/)
57. Avilés-Trigueros M, Sauvé Y, Lund RD, Vidal-Sanz M (2000) Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *J Neurosci* 20: 361–374. PMID: [10627613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10627613/)
58. Avilés-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, García-Avilés A, Lafuente MP, Rodríguez ME, Miralles de Imperial J, et al. (2003) Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol* 184: 767–777. PMID: [14769369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14769369/)
59. Mayor-Torroglosa S, De la Villa P, Rodríguez ME, López-Herrera MP, Avilés-Trigueros M, García-Avilés A, et al. (2005) Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3825–3835. PMID: [16186370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16186370/)
60. Vidal-Sanz M, Avilés-Trigueros M, Whiteley SJ, Sauvé Y, Lund RD (2002) Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Prog Brain Res* 137: 443–452. PMID: [12440386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12440386/)

61. Vidal-Sanz M, De la Villa P, Aviles-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, et al. (2007) Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye* 21: S42–S45.
62. Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Sauvé Y, 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: 3171–3183. doi: [10.1167/iovs.09-4861](https://doi.org/10.1167/iovs.09-4861) PMID: [20071667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20071667/)
63. Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Albuquerque-Béjar JJ, Nieto-López L, García-Ayuso D, 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: e102392. doi: [10.1371/journal.pone.0102392](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102392) PMID: [25029531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25029531/)
64. Angelucci A, Clascá F, Sur M (1996) Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Methods* 65: 101–112. PMID: [8815303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8815303/)
65. Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, et al. (2013) Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 974–985. doi: [10.1167/iovs.12-11207](https://doi.org/10.1167/iovs.12-11207) PMID: [23307961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23307961/)
66. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, 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: 3860–3868. doi: [10.1167/iovs.08-3267](https://doi.org/10.1167/iovs.08-3267) PMID: [19264888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19264888/)
67. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Albuquerque-Béjar JJ, Vidal-Sanz M, 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: e49830. doi: [10.1371/journal.pone.0049830](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049830) PMID: [23166779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23166779/)
68. Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Bernal-Garro JM, et al. (2014) A Novel In Vivo Model of Focal Light Emitting Diode-Induced Cone-Photoreceptor Phototoxicity: Neuroprotection Afforded by Brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF. *PLoS One* 9: e113798. doi: [10.1371/journal.pone.0113798](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113798) PMID: [25464513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25464513/)
69. Jain V, Ravindran E, Dhingra NK (2012) Differential expression of Brn3 transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J Comp Neurol* 520: 742–755. doi: [10.1002/cne.22765](https://doi.org/10.1002/cne.22765) PMID: [21935940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21935940/)
70. Hughes S, Watson TS, Foster RG, Peirson SN, Hankins MW (2013) Nonuniform distribution and spectral tuning of photosensitive retinal ganglion cells of the mouse retina. *Curr Biol* 23: 1696–1701. doi: [10.1016/j.cub.2013.07.010](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.010) PMID: [23954426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23954426/)
71. Vugler A, Semo M, Ortín-Martínez A, Rojanasakul A, Nommiste B, Valiente-Soriano FJ, et al. (2014) A role for the outer retina in development of the intrinsic pupillary light reflex in mice. *Neuroscience* 286C: 60–78.
72. Sawada A, Neufeld AH (1999) Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res* 69: 525–531. PMID: [10548472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10548472/)
73. Yücel YH, Zhang Q, Gupta N, Kaufman PL, Weinreb RN (2000) Loss of neurons in magnocellular and parvocellular layers of the lateral geniculate nucleus in glaucoma. *Arch Ophthalmol* 118: 378–84. PMID: [10721961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10721961/)
74. Yücel YH, Zhang Q, Weinreb RN, Kaufman PL, Gupta N (2001) Atrophy of relay neurons in magnocellular and parvocellular layers in the lateral geniculate nucleus in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 3216–3222. PMID: [11726625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11726625/)
75. Crish SD, Calkins DJ (2011) Neurodegeneration in glaucoma: progression and calcium-dependent intracellular mechanisms. *Neuroscience* 176: 1–11. doi: [10.1016/j.neuroscience.2010.12.036](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.036) PMID: [21187126](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21187126/)
76. Perry VH (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neuroscience* 6: 931–944. PMID: [6165929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6165929/)
77. Perry VH, Cowey A (1979) The effects of unilateral cortical and tectal lesions on retinal ganglion cells in rats. *Exp Brain Res* 35: 85–95. PMID: [436991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/436991/)
78. Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18: 8936–8946. PMID: [9786999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9786999/)
79. Schlamp CL, Montgomery AD, Mac Nair CE, Schuartz C, Willmer DJ, Nickells RW (2013) Evaluation of the percentage of ganglion cells in the ganglion cell layer of the rodent retina. *Mol Vis* 19: 1387–1396. PMID: [23825918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23825918/)

80. Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2000) Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol* 417: 431–447. PMID: 10701865
81. Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2007) Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *J Comp Neurol* 501: 866–878. PMID: 17311318
82. Kielczewski JL, Pease ME, Quigley HA (2005) The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection on amacrine cells in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3188–3196. PMID: 16123418
83. Moon JI, Kim IB, Gwon JS, Park MH, Kang TH, Lim EJ, et al. (2005) Changes in retinal neuronal populations in the DBA/2J mouse. *Cell Tissue Res* 320: 51–59. PMID: 15714280
84. Cone FE, Gelman SE, Son JL, Pease ME, Quigley HA (2010) Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp Eye Res* 91: 415–424. doi: 10.1016/j.exer.2010.06.018 PMID: 20599961
85. Hayreh SS (1969) Blood supply of the optic nerve head and its role in optic atrophy, glaucoma, and oedema of the optic disc. *Br J Ophthalmol* 53: 721–748. PMID: 4982590
86. Quigley HA, Green WR (1979) The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology* 86: 1803–1830. PMID: 553256
87. Quigley HA (1999) Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 18: 39–57. PMID: 9920498
88. Burgoyne CF, Downs JC, Bellezza AJ, Suh JK, Hart RT (2005) The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog Retin Eye Res* 24: 39–73. PMID: 15555526
89. Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen AE, Lawrence JM, et al. (2010) Dissecting a role for melanopsin in behavioural light aversion reveals a response independent of conventional photoreception. *PLoS One* 5: e15009. doi: 10.1371/journal.pone.0015009 PMID: 21124784
90. Semo M, Gias C, Ahmado A, Vugler A (2014) A role for the ciliary marginal zone in the melanopsin-dependent intrinsic pupillary light reflex. *Exp Eye Res* 119: 8–18. doi: 10.1016/j.exer.2013.11.013 PMID: 24316157
91. Vugler AA, Semo M, Joseph A, Jeffery G (2008) Survival and remodeling of melanopsin cells during retinal dystrophy. *Vis Neurosci* 25: 125–138. doi: 10.1017/S0952523808080309 PMID: 18442436
92. Pérez-Rico C, de la Villa P, Arribas-Gómez I, Blanco R (2010) Evaluation of functional integrity of the retinohypothalamic tract in advanced glaucoma using multifocal electroretinography and light-induced melatonin suppression. *Exp Eye Res* 91: 578–583. doi: 10.1016/j.exer.2010.07.012 PMID: 20692255
93. Kankipati L, Girkin CA, Gamlin PD (2011) The post-illumination pupil response is reduced in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 2287–2292. doi: 10.1167/iovs.10-6023 PMID: 21212172
94. Nissen C, Sander B, Milea D, Kolko M, Herbst K, Hamard P, et al. (2014) Monochromatic Pupillometry in Unilateral Glaucoma Discloses no Adaptive Changes Suberved by the ipRGCs. *Front Neurol* 5: 15. doi: 10.3389/fneur.2014.00015 PMID: 24550887
95. Robinson GA, Madison RD (2004) Axotomized mouse retinal ganglion cells containing melanopsin show enhanced survival, but not enhanced axon regrowth into a peripheral nerve graft. *Vision Res* 44: 2667–2674. PMID: 15358062
96. Pérez de Sevilla Müller L, Sargoy A, Rodriguez AR, Brecha NC (2014) Melanopsin ganglion cells are the most resistant retinal ganglion cell type to axonal injury in the rat retina. *PLoS One* 9: e93274. doi: 10.1371/journal.pone.0093274 PMID: 24671191
97. DeParis S, Caprara C, Grimm C (2012) Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells are resistant to N-methyl-D-aspartic acid excitotoxicity. *Mol Vis* 18: 2814–2827. PMID: 23233784
98. Moura AL, Nagy BV, La Morgia C, Barboni P, Oliveira AG, Salomão SR, et al. (2013) The pupil light reflex in Leber's hereditary optic neuropathy: evidence for preservation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 4471–4477. doi: 10.1167/iovs.12-11137 PMID: 23737476
99. Kawasaki A, Collomb S, Léon L, Münch M (2014) Pupil responses derived from outer and inner retinal photoreception are normal in patients with hereditary optic neuropathy. *Exp Eye Res* 120: 161–166. doi: 10.1016/j.exer.2013.11.005 PMID: 24275502

11. ANEXO III

11. ANEXO III

Glaucoma

BDNF Rescues RGCs But Not Intrinsically Photosensitive RGCs in Ocular Hypertensive Albino Rat Retinas

Francisco J. Valiente-Soriano, Francisco M. Nadal-Nicolás, Manuel Salinas-Navarro, Manuel Jiménez-López, Jose M. Bernal-Garro, Maria P. Villegas-Pérez, Marta Agudo-Barriuso, and Manuel Vidal-Sanz

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

Correspondence: Manuel Vidal-Sanz, Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, IMIB-Arrixaca, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain; manuel.vidal@um.es.

FJV-S and FMN-N are joint first authors.

Submitted: January 14, 2015
Accepted: February 16, 2015

Citation: Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, et al. BDNF rescues RGCs but not intrinsically photosensitive RGCs in ocular hypertensive albino rat retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:1924-1936. DOI:10.1167/iovs.15-16454

PURPOSE. To study the responses of the general population of retinal ganglion cells (Brn3a⁺RGCs) versus the intrinsically photosensitive RGCs (melanopsin-expressing RGCs [m⁺RGCs]) to ocular hypertension (OHT), the effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on the survival of axonally intact and axonally nonintact RGCs, and the correlation of vascular integrity with sectorial RGC loss.

METHODS. In Sprague-Dawley rats, 5 µg BDNF or vehicle was intravitreally injected into the left eye followed by laser photocoagulation of the limbal tissues. To identify RGCs with an active retrograde axonal transport, Fluorogold was applied to both superior colliculi 1 week before euthanasia (FG⁺RGCs). Retinas were dissected 12 or 15 days after lasering and immunoreacted against Brn3a (to identify all RGCs except m⁺RGCs), melanopsin, or RECA1 (inner retinal vasculature).

RESULTS. Ocular hypertension resulted at 12 to 15 days in sectorial loss of FG⁺RGCs (78%–84%, respectively) while Brn3a⁺RGCs were significantly greater, indicating that a substantial proportion (approximately 21%–26%) of RGCs with their retrograde axonal transport impaired survive in the retina. Brain-derived neurotrophic factor increased the survival of Brn3a⁺RGCs to 81% to 67% at 12 to 15 days, respectively. The inner retinal vasculature showed no abnormalities that could account for the sectorial loss of RGCs. At 12 to 15 days, m⁺RGCs decreased to approximately 50% to 51%, but this loss was diffuse across the retina and was not prevented by BDNF.

CONCLUSIONS. The responses of m⁺RGCs against OHT-induced retinal degeneration and neuroprotection differ from those of Brn3a⁺RGCs; while OHT induces similar loss of Brn3a⁺RGCs and m⁺RGCs, Brn3a⁺RGCs are lost in sectors and can be rescued with BDNF, but m⁺RGCs do not respond to BDNF and their loss is diffuse.

Keywords: laser-induced ocular hypertension, intrinsically photosensitive RGCs, BDNF neuroprotection, melanopsin retinal ganglion cells, adult albino rats, experimental glaucoma, spatial distribution, melanopsin, Brn3a, Fluorogold, axonal transport, ocular hypertension

Glaucoma is among the leading causes of blindness in developed countries.¹ An elevated intraocular pressure (IOP) above normal levels is one of the most important risk factors and the only one that may be treated. Current therapy is devoted to controlling and/or diminishing ocular hypertension (OHT); however, in an important proportion of glaucoma patients, retinal ganglion cell (RGC) loss, the hallmark of glaucoma, keeps progressing with concomitant visual deficits that eventually lead to blindness. This has prompted investigators to look for alternative treatments that could prevent or slow cell death with neuroprotective drugs.

To study the pathology of human glaucoma, a number of OHT models have been developed in rodents, taking advantage of the anatomy of the aqueous humor draining system.² These include episcleral vein cauterization,³ hypertonic saline injection into episcleral radial veins,⁴ injections of microbeads or viscoelastics into the anterior chamber alone or in combination,^{5,6} and laser photocoagulation (LP) of the limbal tissues.^{7,8}

Laser photocoagulation results in a number of features that make this model relevant to further our knowledge of the pathology of OHT-induced retinal degeneration and has been the method of choice in our laboratory to induce OHT in adult albino rats^{9–12} and in adult albino^{13–18} or pigmented^{19,20} mice. Laser photocoagulation induces diffuse and sectorial loss of RGCs, early damage to RGC axons at the level of optic nerve head, and a protracted degeneration of RGC somas.^{10,13,21–25} Moreover, LP of one eye results in important glial alterations in the contralateral retina,^{11,15–17} and with time, OHT retinas develop alterations in the outer retina.^{12,13} There are, however, several issues that remain unresolved: (1) OHT-induced damage to the optic nerve head could explain the typical pie-shaped sectorial loss of RGCs, but whether the retinal vasculature also plays a role in this sectorial loss is presently unknown; (2) OHT-induced RGC degeneration in rodents can be prevented with the well-known neuroprotective agent brain-derived neurotrophic factor (BDNF),²⁶ but whether injured but alive RGCs

are amenable to neuroprotection is not known; and (3) most of the above-mentioned studies in rats report the responses of RGCs against OHT without making distinctions between different types of RGCs—thus it is of interest to study whether OHT elicits the same responses in all types of RGCs.

Retinal ganglion cells can be protected against retinal injuries with neuroprotective agents,^{27,28} among which BDNF has been shown to be one of the most potent,^{29–31} although its effect is transient and best observed during the first 2 weeks after injury.^{32–34} Indeed, exogenous administration of BDNF alone^{26,35–38} or in combination with lingo-1 antagonist³⁹ has proven effective in preventing acute or chronic OHT-induced RGC loss. Here we further investigate the neuroprotective effects of BDNF on the survival of axonally intact and axonally nonintact RGCs, as well as on the general population of RGCs versus the population of intrinsically photosensitive RGCs.

Non-image-forming visual behaviors depend on intrinsically photosensitive RGCs (ipRGCs), one class of RGC that contains the photopigment melanopsin (m⁺RGCs). Intrinsically photosensitive RGCs are responsible for the circadian photoentrainment, pupillary reflexes, and the regulation of pineal melatonin secretion.^{40–44} In adult rodents, m⁺RGCs constitute approximately 2% to 3% of all RGCs (2.5% and 2.1% for pigmented and albino mice, respectively,^{44,45} and 2.5% and 2.7% for pigmented and albino rats, respectively^{46–48}). There is evidence that in human glaucomatous patients, a number of non-visual-forming functions mediated by the ipRGC system are altered.^{49–52} Several reports using experimental models of OHT have shown that the non-image-forming visual functions are affected, with important changes in the circadian timing system,^{53–55} as well as in the locomotor activity and behavioral patterns,⁵⁵ all of which are associated with dysfunctional ipRGCs. Moreover, there are some discrepancies regarding the survival of m⁺RGCs after OHT; while some studies have reported a better survival in rats^{55,56} and mice,⁵⁷ others indicate the opposite for mice²⁰ and rats.^{53,54,58} Furthermore, the effects of OHT on the topological distribution of m⁺RGCs and whether m⁺RGCs are responsive to neuroprotective strategies are presently unknown.

In the present studies, using modern techniques to identify and map in the same retinal whole mounts the general population of RGCs (non-melanopsin-expressing RGCs, which can be immunodetected with Brn3a) and the subpopulation of RGCs expressing melanopsin (m⁺RGCs)^{46–48} as well as to visualize the entire inner retinal arterial vasculature, we have compared for the first time the responses of non-m⁺RGCs to those of m⁺RGCs to OHT-induced retinal degeneration and neuroprotection afforded by BDNF. We further investigate the neuroprotective effects of BDNF on the survival of axonally intact and axonally nonintact RGCs. Finally, the inner retinal vasculature was examined to look for retinal vessel abnormalities that could account for the typical sectorial RGC loss that follows OHT. Our results indicate that the responses of m⁺RGCs against OHT-induced retinal degeneration and neuroprotection differ from those of the general population of non-m⁺RGCs (a short account of this work has been reported in Abstract form⁵⁹).

MATERIALS AND METHODS

Animal Handling

All experiments were carried out following the Spanish and European Union regulations for the use of animals in research (Council Directive 86/609/EEC) and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. This

study was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Murcia (Spain).

Adult female albino Sprague-Dawley (SD) rats (180–230 g) obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) were housed at the University of Murcia animal facilities in temperature- and light-controlled rooms (12-hour light/dark cycle) with food and water ad libitum.

All surgical manipulations were carried out under general anesthesia induced with an intraperitoneal (IP) injection of a mixture of ketamine (70 mg/kg, Ketolar; Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompun; Bayer, S.A., Barcelona, Spain), and all efforts were made to minimize suffering. Oral analgesia was provided from the first day to the day of euthanasia.⁶⁰ During recovery from anesthesia, an ocular ointment (Tobrex; Alcon Cusí, S.A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent corneal desiccation. Animals were euthanized with an IP injection of an overdose of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol; Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

Experimental Design

To investigate whether RGCs could be rescued from OHT-induced retinal degeneration, in one main group of rats, BDNF ($n = 24$) or vehicle ($n = 21$) was injected intravitreally and the retinas were examined 12 or 15 days later. These time intervals were chosen because BDNF has been shown to have maximal effects during the first 15 days after optic nerve injury.^{29–31} The responses of m⁺RGCs were investigated in 16 retinas from this group, examined at 12 or 15 days after OHT. Because only a minute proportion (0.2%) of m⁺RGCs express Brn3a,^{46,48,61} in these retinas melanopsin and Brn3a were doubly immunodetected, an approach that allows one to study in parallel, but independently, the general RGC population (nonintrinsically photosensitive Brn3a⁺) and the population of ipRGCs (m⁺RGCs).^{20,45–47} Finally, to investigate if OHT had an effect on the inner retinal vasculature that could be responsible for the geographical sectorial pattern of RGC loss, four retinas from the main group were examined 15 days after intravitreal administration of BDNF or vehicle and induction of OHT. The population of surviving RGCs was identified with Fluorogold and Brn3a, while the retinal vessels were identified with RECA1 antibodies. An additional group of untouched naïve retinas ($n = 6$) served as control for the normal RGC population retrogradely labeled with Fluorogold, or immunostained with Brn3a, and for the normal appearance of the inner retinal vessels. The experimental design is outlined in Table 1.

Intravitreal Administration of Brain-Derived Neurotrophic Factor

Right before laser, 5 μ L BDNF (Peprotech Laboratories, London, UK), diluted at 1 μ g/ μ L in 1% bovine serum albumin-phosphate buffer saline ($n = 24$) or 5 μ L vehicle ($n = 21$), was intravitreally injected into the left eyes as previously described in detail.^{27,30,32–34}

Induction of OHT

To induce OHT, the left eyes were treated in a single session with diode laser burns (Viridis Ophthalmic Photocoagulator-532 nm laser; Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France). The laser beam was delivered directly, without any lenses, aimed at the trabecular meshwork and the limbal and episcleral veins. The pupil of the treated eye was dilated with 1% tropicamide (Colircusi tropicamida 1%; Alcon-Cusí, S.A., Barcelona, Spain), and an average of 95 laser burns were administered per eye; the spot size, duration, and power were 50 to 100 μ m, 0.5

TABLE 1. Experimental Design

Evaluation of:	Analysis	Treatment	Number of Retinas		Time After OHT Induction
			Right Retinas	Left Retinas	
RGCs and vascular plexus in the inner retina in naïve retinas	FG tracing and Brn3a, RECA, and melanopsin immunodetection	Untouched (naïve)	6		
Effect of BDNF on the axonal transport and RGC survival after OHT	FG tracing and Brn3a immunodetection	BDNF	24	24	12 and 15 d
		Vehicle	21	21	
Effect of BDNF on the survival of m ⁺ RGCs and RGCs after OHT	Brn3a and melanopsin immunodetection	BDNF		8*	
		Vehicle		8*	
Effect of OHT with or without BDNF treatment on the inner retinal vasculature	FG tracing and Brn3a and RECA immunodetection	BDNF		2*	15 d
		Vehicle		2*	

OHT was induced in the left eyes of experimental retinas. Number of retinas studied; the left injured, and the right contralateral to the lesioned retina was used as control.

* Retinas from the main group that were compared to naïve retinas.

seconds, and 0.4 W, respectively, as previously described in detail.^{12,13,24} Right eyes were kept as control.

Measurement of the Intraocular Pressure

The IOP of both eyes was measured under anesthesia using a rat-adapted rebound tonometer (Tono-Lab; Tiolat, OY, Helsinki, Finland). The readings were obtained before LP and at 24 and 48 hours and 7 days after LP as described previously in detail.^{10,24}

Retrograde Labeling From the Superior Colliculi

To identify RGCs with a competent retrograde axonal transport in OHT retinas, Fluorogold (FG; Fluorochrome, Inc., Englewood, CO, USA) was applied to both superior colliculi (SCi) 1 week before euthanasia, following previously described methods that are standard in our laboratory.^{10,62-64} In brief, after exposing the midbrain, a small piece of gelatin sponge (Espogostan Film; Ferrosan A/S, Soeborg, Denmark) soaked in saline containing 3% FG diluted in 10% dimethyl sulphoxide-saline was applied over the entire surface of both SCi. A similar procedure was used for the control group of naïve retinas to identify the RGC population.

Tissue Processing: Retinal Whole Mounts

Rats were deeply anesthetized and perfused transcardially with saline and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The eyes were enucleated, and both retinas were dissected and prepared as flattened whole mounts, maintaining retinal orientation by making four radial cuts (the deepest one signals the superior pole of the eye) as previously described.^{46,47,62,63}

Immunohistofluorescence

Immunodetection was carried out following previously described methods.^{20,34,46-48,65-68} In brief, after permeation, retinas were incubated overnight with the primary antibodies diluted in blocking buffer (PBS, 2% normal donkey serum, 2% Triton X-100). After washing in PBS, retinas were incubated at room temperature for 2 hours with the appropriate secondary antibodies diluted in PBS 0.5% Triton X-100. Finally, retinas were washed in PBS and mounted vitreal side up on slides and covered with antifading solution.

The primary antibodies and dilutions used in this study were as follows:

1. The general population of RGCs was detected using goat anti-Brn3a (1:500; C-20; Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany)^{46,47,68};
2. Melanopsin-expressing RGCs were detected using the rabbit anti-melanopsin PAI-780 (1:500; Thermo Scientific, Madrid, Spain)^{47,48} that detects the NH₂ terminal of the melanopsin protein and thus both melanopsin isoforms (short and long^{46-48,69}). Melanopsin immunodetection identifies the M1, M2, and M3 ipRGCs subtypes, because the M4 and M5 subtypes are not stained with anti-melanopsin antibodies⁷⁰; and
3. Retinal vessels were identified with mouse anti-rat RECA1 (clone HIS52) that recognizes the rat endothelial cell antigen 1 (diluted 1:1000; MCA970GA Serotec, Bionova Scientific, Madrid, Spain).

As secondary antibodies we used donkey anti-goat DyLight 594, donkey anti-rabbit DyLight 488 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK), and donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, ThermoFisher, Madrid, Spain). All were used at 1:500 dilution.

Retinal Analysis

Retinal photographs were made to reconstruct retinal whole mounts following previously described procedures that are standard in our laboratory,^{45,48,62,68,71} using an epifluorescence microscope (Axioscop 2 Plus; Zeiss Mikroskopie, Jena, Germany) equipped with a computer-driven motorized stage (ProScan H128 Series; Prior Scientific Instruments, Cambridge, UK) controlled by image analysis software (Image-Pro Plus, IPP 5.1 for Windows; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Each reconstructed whole mount was composed of 154 individual frames captured side by side with no gap or overlap between them with a ×10 objective (Plan-Neofluar, 20/0.50; Zeiss Mikroskopie). When required, images were further processed using a graphics editing program (Adobe Photoshop CS 8.0.1; Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA).

Automated Quantification and Spatial Distribution of RGCs

Fluorogold⁺RGCs and Brn3a⁺RGCs were counted automatically while m⁺RGCs were counted manually, and their topography

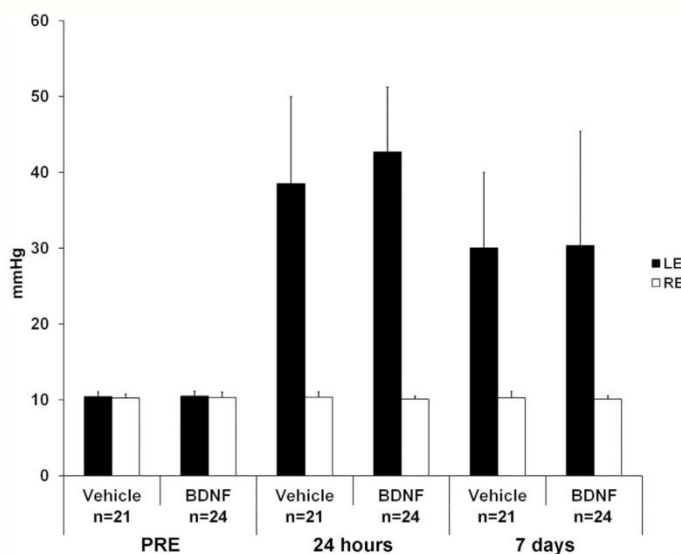


FIGURE 1. Intraocular pressure values. Graph showing the temporal evolution of the intraocular pressure in the left experimental eye (LE) and right control eye (RE) in BDNF and vehicle groups before laser photocoagulation (LP) and at 24 hours and 7 days after LP. *n*, number of animals analyzed.

was studied according to previously described methods,^{20,54,45–48,62,68}

Retinal Vessel Analysis

The distribution of the inner retinal vessels was studied in naïve control as well as in OHT retinas to investigate whether OHT provoked anomalies in the retinal vasculature that could be responsible for the typical sectorial RGC loss found in these retinas. To facilitate the study of the inner retinal vessels, RECA1 signal was transformed in a black and white image, whereby the positive signal was detected as black and the negative signal (background) was detected as white. For that, an automatic IPP macro language routine was developed to highlight the vascular net enabling the qualitative evaluation of the retinas. In a first step, background variations were evened out by applying a Flatten Background correction filter; then the images were converted to 16-bit grayscale to discard color information. This step was followed by the application of the convolution filter HiGauss (7×7). The resultant image data were then filtered with a Sharpen (5×5) filter, which enhances fine detail using the unsharp masking technique. Finally, grayscale segmentation was performed, and a new black and white image of the highlighted vascular net was saved for further analysis. Blood vessel density was measured through a 3-mm-radius caliper centered on the optic nerve, and each interception in the perimeter of this caliper was automatically counted as a positive vessel.

Statistics

All averaged data are presented as means with standard deviations (SD). Statistical analysis was done using SigmaStat 3.1 for Windows (SigmaStat for Windows Version 3.11; Systat Software, Inc., Richmond, CA, USA). Kruskal-Wallis was used when comparing more than two groups and Mann-Whitney test when comparing two groups only. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Induction of Ocular Hypertension

In Figure 1 is shown the evolution of the IOPs after a single session of LP in BDNF-treated (BDNF) and vehicle-treated (VEH) groups of rats. Intraocular pressure peaked at 24 hours after LP, and the values kept statistically increasing up to 7 days compared to those of the right eyes, which remained basal during the entire study. There were no differences in the IOP values between the BDNF- and VEH-treated groups.

Effect of OHT With or Without BDNF Treatment on RGCs

In the right control retinas, FG⁺ and Brn3a⁺RGCs (Figs. 2A, 2B', 2a–d) showed normal distribution; they were denser in the medial and central retina and sparser in the retinal periphery, with higher densities in the visual streak located in the dorsal retina above the optic nerve, as previously reported.^{62,68,72} Moreover, the total numbers of FG⁺ or Brn3a⁺RGCs counted automatically were comparable to previously reported data from this laboratory.^{12,62,64} Melanopsin⁺RGCs, however, are preferentially found in the retinal periphery (Figs. 2C, 2C', 2e, 2f) with a topography complementary to that of the conventional population of RGCs that do not express melanopsin, identified here by Brn3a immunodetection, and this is in agreement with recent reports.^{48,64} The highest densities of m⁺RGCs were found in the superotemporal quadrant, and total numbers of m⁺RGCs were also within the range of previously published data.^{47,48} Both Brn3a⁺RGCs and m⁺RGCs were more abundant in the dorsal than in the ventral retina, as seen in the topological maps and in the magnifications shown in Figure 2.

Twelve and 15 days after LP of the left eyes, the numbers of FG⁺RGCs in the experimental retinas decreased significantly (Fig. 3) and showed the typical regions lacking FG⁺RGCs within pie-shaped sectors of the retinas with their base located

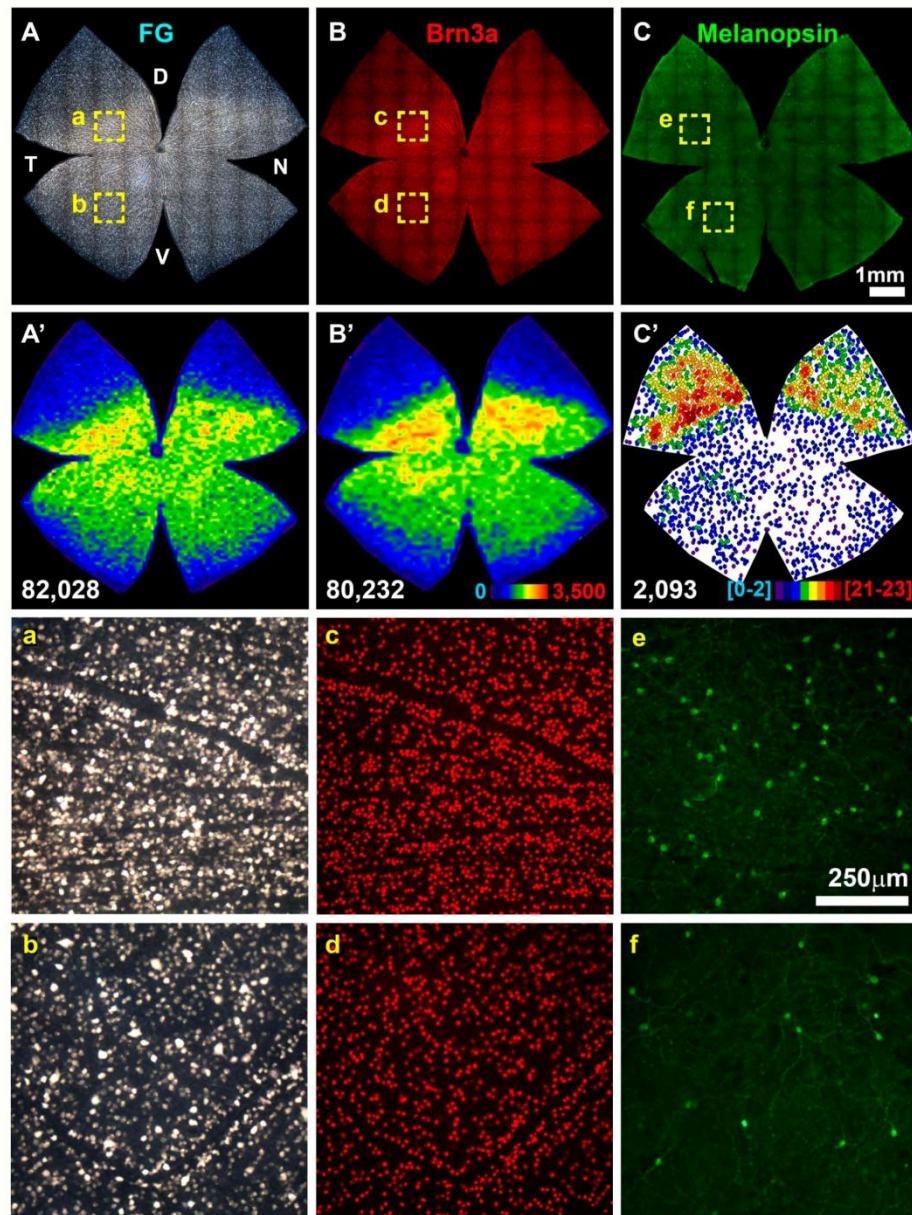


FIGURE 2. Total numbers and spatial distribution of FG⁺RGCs, Brn3a⁺RGCs, and m⁺RGCs. (A) Photomontage of a naïve retina traced with FG from both superior colliculi and (B) immunoreacted against Brn3a. Retinal ganglion cell topography is observed in the corresponding isodensity maps (A', B'). Melanopsin⁺RGCs are shown in (C) and their distribution is visualized with a neighbor map in (C'). *Bottom left* of each map: number of RGCs counted in that retina. Magnifications from the dorsal (a, c, e) or the ventral (b, d, f) retina showing FG, Brn3a, and melanopsin RGCs. *Color scale* for isodensity maps is shown in (B') and goes from 0 (purple) to ≥ 3500 (red) RGCs/mm². *Color scale* for the neighbor map is shown in (C') and goes from 0 to 2 (purple) to ≥ 21 to 23 (red) neighbors in a radius of 0.22 mm. D, dorsal; V, ventral; T, temporal; N, nasal.

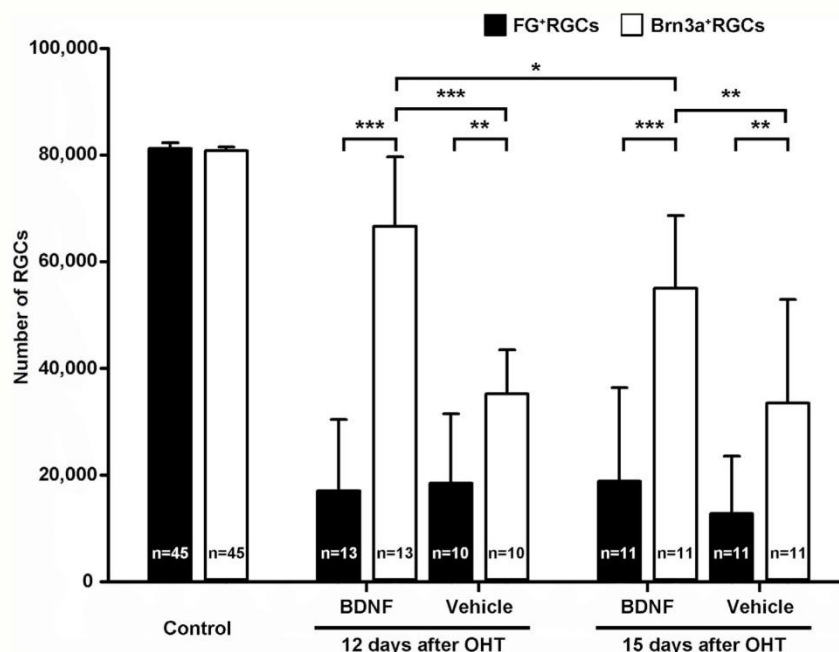


FIGURE 3. Brain-derived neurotrophic factor delays OHT-induced RGC death. Histogram showing the mean \pm standard deviation of the total number of FG⁺ and Brn3a⁺RGCs in control retinas and in experimental retinas treated with BDNF or vehicle and analyzed at 12 or 15 days after laser-induced ocular hypertension (OHT). In all groups, the number of FG⁺ and Brn3a⁺RGCs was significantly smaller in the experimental than in the control retinas ($P < 0.05$, Mann-Whitney test). The number of Brn3a⁺RGCs was significantly greater than FG⁺RGCs in all groups and time points analyzed ($P < 0.003$, Mann-Whitney test). The number of Brn3a⁺RGCs was greater in BDNF-treated than in vehicle-treated animals at 12 or 15 days after LP. After BDNF treatment the number of RGCs significantly decreased from 12 to 15 days. Statistical comparisons, Mann-Whitney test, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ for all groups. *n*, number of analyzed retinas.

in the periphery and their apex on the optic disc (Figs. 4, 5). This finding indicates that OHT causes an impairment of the retrograde axonal transport in a large proportion of the RGC population, as previously shown.^{10,12} Compared to their right contralateral retinas, the percentage of RGCs that had their retrograde axonal transport impaired was 79% or 78% and 77% or 84% at 12 and 15 days after BDNF or vehicle treatment, respectively. Thus, BDNF treatment did not ameliorate axonal damage triggered by OHT, because total numbers of FG⁺RGCs (i.e., those that maintained a competent retrograde axonal transport) were comparable among different groups (Kruskal-Wallis test, $P > 0.05$) (Fig. 3).

When total numbers of Brn3a⁺RGCs in the left experimental retinas treated with vehicle were compared to their fellow eyes, there was a clear RGC loss of approximately 57% or 58% at 12 or 15 days after OHT, respectively. These data indicate that RGC death follows OHT. However, the numbers of Brn3a⁺RGCs were significantly greater than the numbers of FG⁺RGCs in both groups at both survival time intervals (Fig. 3); this indicates that at early times after OHT, large numbers of RGCs expressing Brn3a and thus alive, but with their retrograde axonal transport impaired, are still present in the retina (2-fold the number of traced RGCs in vehicle-treated retinas and 3- to 4-fold in BDNF-treated retinas) as previously reported.^{24,62} The loss of Brn3a⁺RGCs observed 12 or 15 days after laser showed the typical pie-shaped sectors, but was also diffuse (Fig. 3). After BDNF treatment, the numbers of Brn3a⁺RGCs were significantly greater than in vehicle-treated retinas at both time points (Fig. 3). Additionally, there was a

significant decrease of Brn3a⁺RGCs between 12 and 15 days after OHT in the retinas treated with BDNF ($P = 0.045$, Mann-Whitney test) (Fig. 3). Thus, overall these data demonstrate that a single BDNF injection delays OHT-induced RGC death.

In Figure 4 are shown some representative examples of isodensity maps illustrating the distribution of FG⁺RGCs (Figs. 4A, 4D, 4G, 4J) and Brn3a⁺RGCs (Figs. 4B, 4E, 4H, 4K) in OHT retinas. Isodensity maps of FG⁺RGCs show that in all retinas there is well-defined sectorial damage, more severe in the dorsal retina (Figs. 4A, 4D, 4G, 4J) as previously reported.^{10,12,15,24} Isodensity maps of Brn3a⁺RGCs show that in these sectors of axonal damage (with a lack of FG⁺RGCs) there are still surviving RGCs. In agreement with the quantitative data, the isodensity maps illustrate that RGC survival in the areas lacking FG tracing is more obvious in the retinas treated with BDNF (Figs. 4B, 4E, 4H, 4K).

Responses of m⁺RGCs to OHT and Treatment With BDNF or Vehicle

Following OHT, m⁺RGCs also diminish considerably when compared to the naïve group of control retinas (Table 2). Twelve or 15 days after LP+vehicle, the population of m⁺RGCs decreases approximately to 50% or 51%, respectively, of the naïve population. Interestingly, this survival was not significantly different from the survival of Brn3a⁺RGCs, since in these same retinas the percentages of Brn3a⁺RGCs were 56% and 43% ($n = 4$; Mann-Whitney test, $P = 0.4$ at 12 or $P = 0.46$ at 15 days). These data indicate that OHT causes the same response

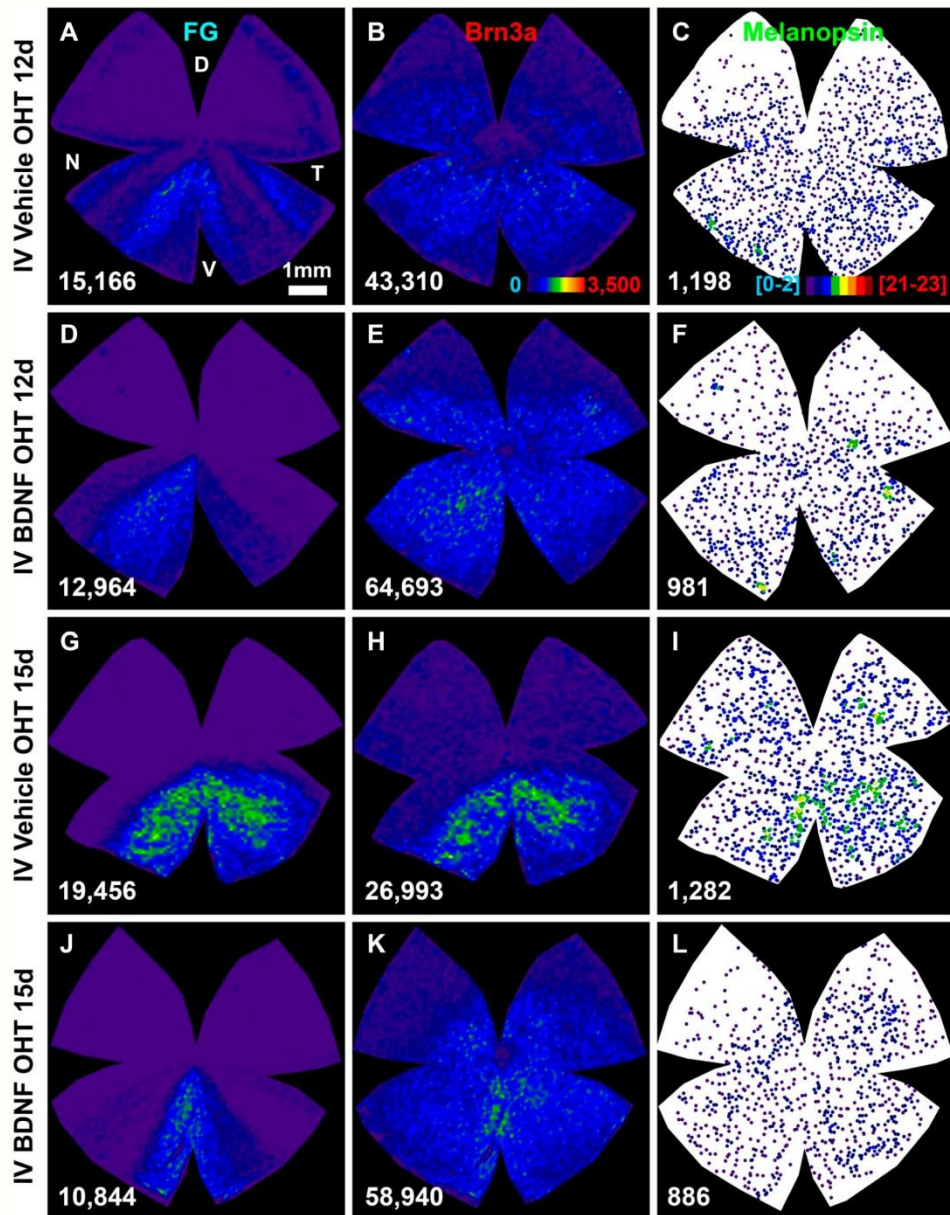


FIGURE 4. Spatial distribution of FG⁺RGC, Brn3a⁺RGC, and m⁺RGC populations at 12 or 15 days after OHT with or without BDNF treatment. Isodensity maps of FG⁺RGCs (A, D, G, J) show that all retinas have a sectorial and/or diffuse damage. Their corresponding isodensity maps of Brn3a⁺RGCs (B, E, H, K) show that there are a large number of viable RGCs in the areas lacking FG⁺RGCs at the times analyzed, and that they are more abundant in the BDNF-treated retinas. The neighbor maps representing m⁺RGCs (C, F, I, L) show their loss is the same in BDNF- or vehicle-treated retinas. Furthermore, m⁺RGC loss is diffuse although more severe in the dorsal retina. *Bottom left* of each map: number of RGCs counted in that retina. *Color scale* for isodensity maps is shown in (B) and goes from 0 (purple) to ≥ 3500 (red) RGCs/mm². *Color scale* for the neighbor map is shown in (C) and goes from 0 to 2 (purple) to ≥ 21 to 23 (red) neighbors in a radius of 0.22 mm. D, dorsal; V, ventral; T, temporal; N, nasal.

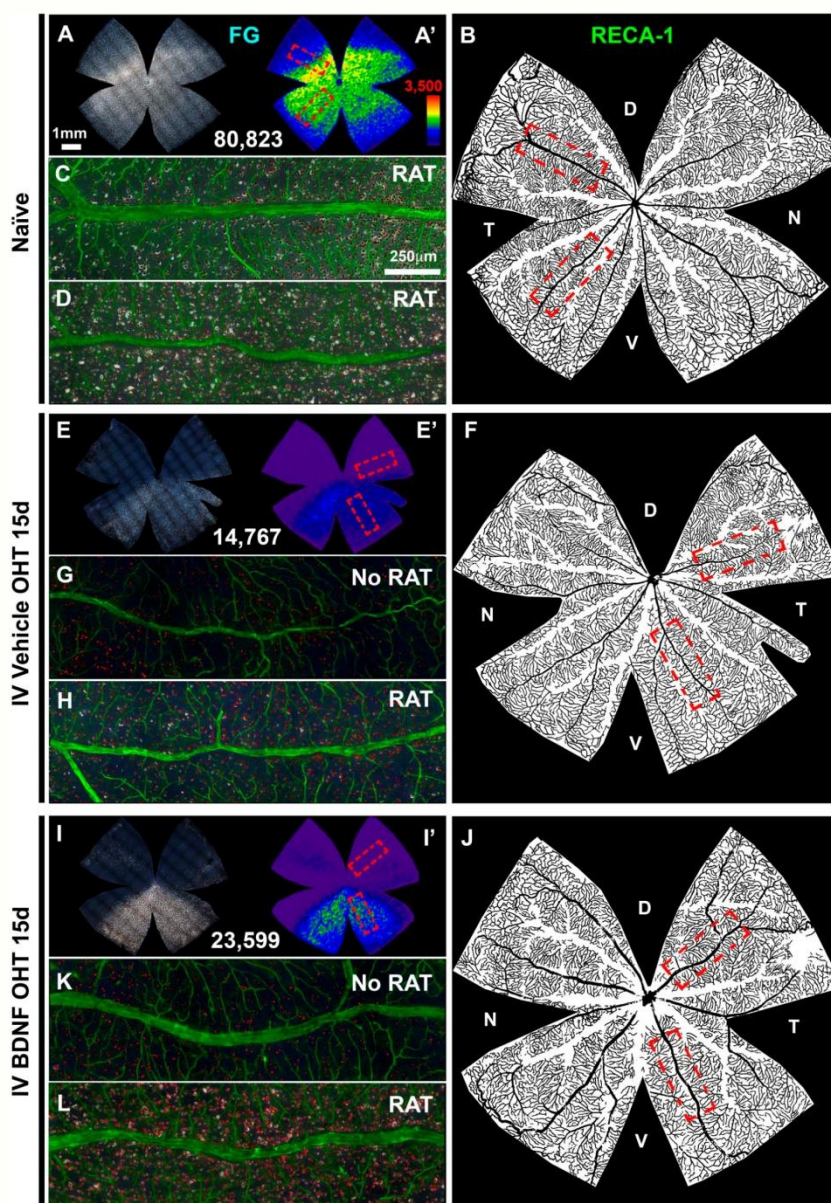


FIGURE 5. Study of the retinal vessels in BDNF and vehicle-treated hypertensive retinas. (A, A') A naïve retina labeled with FG and its corresponding isodensity map. (B) The RECA1⁺ retinal vessels in *black* and *white*. (C, D) Magnifications of the retina in (A) taken from the dorsotemporal (C) and inferotemporal (D) quadrant showing FG⁺RGCs (*white*), Brn3a⁺RGCs (*red*), and RECA-1⁺ vessels (*green*). In the naïve retina, there is a viable RGC retrograde axonal transport (RAT), and the retinal vessels irrigate properly all the areas. In hypertensive retinas treated with vehicle (E-F) or BDNF (I-J) and analyzed 15 days after LP, there is a sectorial loss of the axonal transport in the dorsal retina (E, E', I, I'). In the *black* and *white* representations (E, J), the retinal vessels appear normal and morphologically similar to those in the control naïve retina. This is observed clearly in the magnifications taken from areas with no RAT (G, K) and with RAT (H, L). *Bottom* in (A), (A'), (E), (E'), and (I), (I'): number of RGCs counted in that retina. D, dorsal; V, ventral; T, temporal; N, nasal.

TABLE 2. Total Number of m⁺RGCs in Naïve or OHT Retinas Treated With BDNF or Vehicle

	Naïve Retinas, <i>n</i> = 6	OHT+BDNF		OHT+Vehicle	
		12 d, <i>n</i> = 4	15 d, <i>n</i> = 4	12 d, <i>n</i> = 4	15 d, <i>n</i> = 4
m ⁺ RGCs	2,178 ± 169	958 ± 155	1,173 ± 208	1,082 ± 324	1,108 ± 255
Brn3a ⁺ RGCs	79,546 ± 2,032	66,221 ± 6,695	57,646 ± 11,917	44,324 ± 12,044	36,462 ± 14,552

Mean ± standard deviation of the total number of m⁺RGCs or Brn3a⁺RGCs in naïve, hypertensive BDNF-treated (OHT+BDNF), or vehicle-treated (OHT+vehicle) retinas at 12 or 15 days after OHT. The number of m⁺RGCs significantly decreased in the experimental retinas compared to naïve retinas ($P < 0.005$, Mann-Whitney test), but there was not a significant difference between 12 and 15 days or between BDNF and vehicle treatment ($P = 0.521$, Kruskal-Wallis test). The proportions of surviving m⁺RGCs and Brn3a⁺RGCs in the vehicle-treated retinas were comparable ($P > 0.05$ at 12 or 15 days). Survival of Brn3a⁺RGCs was greater in BDNF-treated than in vehicle-treated retinas at 12 days ($P < 0.027$, Mann-Whitney test) or 15 days ($P < 0.041$, Mann-Whitney test) after LP. *n*, number of analyzed retinas.

in the two RGC populations. There is, however, an important difference that relates to the topological distribution of the surviving m⁺RGCs; while the general population of RGCs (identified with Brn3a) exhibit both a diffuse and sectorial loss, the lack of m⁺RGCs is mainly diffuse in all retinas analyzed, with a more pronounced effect in the superotemporal quadrant (Figs. 4C, 4E, 4I, 4L). Another important difference in m⁺RGCs relates to their lack of response to intraocular BDNF. Indeed, while the number of Brn3a⁺RGCs was significantly greater for the BDNF-treated groups when compared to the vehicle-treated groups, within the same retinas the numbers of m⁺RGCs in the BDNF and vehicle groups were similar (Kruskal-Wallis test, $P = 0.521$) (Table 2), thus indicating that m⁺RGCs do not respond to BDNF administration.

Inner Retinal Vasculature After OHT

The inner retinal vessels were examined in naïve and experimental OHT retinas to determine if the typical sectorial loss of RGCs was related to a defect in the retinal vasculature. To this end, retinas were immunostained with RECA1, which primarily labels the main retinal arteries and arterioles. Representative examples in black and white images of the typical inner arterial plexus in naïve as well as in OHT retinas are shown in Figure 5. The general appearance of the main plexus of the inner retinal vessels in naïve retinas is comparable to that found in OHT retinas treated with BDNF or vehicle and examined at 15 days. This was confirmed with the blood vessel density measurements showing no significant differences (Kruskal-Wallis test, $P = 0.653$) between the number of vessels per millimeter (v/mm) in naïve retinas (11.06 ± 0.45 v/mm, *n* = 6) compared with BDNF-treated retinas (11.30 ± 0.68 v/mm, *n* = 2) and vehicle-treated retinas (10.91 ± 0.55 v/mm, *n* = 2). Moreover, the areas of the OHT retinas containing RGCs were compared with areas lacking RGCs, and there were no major differences in the arterial blood supply. The vessels found within the areas with competent retrograde axonal transport (RAT, Figs. 5H, 5L) were compared to those in the areas with impaired retrograde axonal transport (no RAT, Figs. 5G, 5K); there were no obvious differences between RAT and no-RAT areas either between BDNF and vehicle retinas or if these were compared with the vasculature of naïve retinas (Figs. 5C, 5D). In conclusion, at these time points OHT does not change the morphology of the inner retinal vessels; thus, there appears to be no correlation between the retinal blood supply and the appearance of sectorial loss of RGCs induced by OHT.

DISCUSSION

The present studies rely on immunohistochemical identification of Brn3a, melanopsin, and RECA1. In rat, Brn3a is

expressed by all RGCs except for m⁺RGCs and one-half of the ipsilaterally projecting RGCs^{46,47}; all ipRGC subtypes except M5 express melanopsin,^{45,47} and RECA1 has been shown to identify retinal vessels both in control naïve and in injured retinas.^{65–67} Although injured RGCs may modify their level of protein expression,^{75,74} thus warranting a note of caution when interpreting RGC survival using immunodetection, both melanopsin and Brn3a have been shown to be expressed long after optic nerve injury.^{53,54,75}

IOP Elevations Are Comparable to Those in Previous Studies

Laser photocoagulation of the limbal plexus has resulted in consistent elevations of the IOP in several studies in our laboratory^{10,12,24} that are comparable to values obtained by others.⁸ In accordance, the levels of IOP obtained in the present experiments show the typical abrupt rise in IOP that is already measurable at 24 hours and is maintained for the first week, the latest time interval measured in this study. Neither BDNF nor vehicle injection modified the levels of IOP.

OHT-Induced Loss of m⁺RGCs and Non-m⁺RGCs Is Comparable

The loss of non-m⁺RGCs (Brn3a⁺RGCs) found in this work is in agreement with previous studies in rats^{10,12,24} and mice^{13,14,20} from our laboratory and is also in the range of RGC loss reported by others^{7,8,53,54,76} using laser-induced OHT. Our results also indicate that m⁺RGCs degenerate as a consequence of OHT (Fig. 3; Table 2); we have found a loss of approximately 50% or 51% of the control population of m⁺RGCs at 12 or 15 days, respectively, which is comparable to the loss of the non-m⁺RGCs. These results are in agreement with recent findings from this laboratory in OHT-pigmented mice retinas²⁰ and comparable to those in previous studies from other laboratories in adult rats^{53,54} and mice.⁵⁸ Similarly, Jakobs and colleagues⁵⁷ reported that in the DBA/2J mouse, a well-established model of inherited pigmentary glaucoma, the decrease in total numbers of m⁺RGCs is substantial, although proportionally less than the fall in total numbers of RGCs. Zhang and colleagues⁵⁵ using mice created by crossing DBA/2J mice with Thy1-CFP, reported that progressive increase in IOP was followed by a concomitant reduction in the numbers of RGCs and m⁺RGCs, which could have an impact on nonimage-forming visual behaviors. Another previous study in a chronic OHT model in adult albino rats reported no alterations in total numbers of m⁺RGCs or in their dendritic morphology, suggesting that m⁺RGCs are more resistant to injury.⁵⁶ Possible explanations for the discrepancies between the latter studies and our own data may relate to the methodology employed to ascertain RGC survival, the time intervals analyzed after induction of OHT, and the types of m⁺RGCs analyzed in these

studies; there are approximately six different types of m⁺RGCs.⁷⁷ Certainly, m⁺RGCs have been shown to be more resistant than the rest of the RGCs to a number of retinal injuries⁷⁷ including optic nerve axotomy,⁷⁸ NMDA-induced RGC degeneration,⁷⁹ and inherited mitochondrial optic neuropathies.⁸⁰

Topological Loss of Non-m⁺RGCs Is Different From That of m⁺RGCs and Unrelated to Inner Retinal Vessels

In OHT retinas the surviving non-m⁺RGC population adopts the typical distribution in pie-shaped sectors, with their base located on the retinal periphery and their vertex on the optic nerve head. This is in contrast to the topology of surviving m⁺RGCs, which showed a diffuse loss throughout the retina without clear sectors. The observation of an apparent normal inner retinal vasculature, together with the preservation of the displaced amacrine cell population,^{12,20,57,81–83} further supports the idea that sectorial loss is related to an axotomy-like injury to bundles of axons somewhere near the optic nerve head where retinal axons maintain their highest retinotopic arrangement.^{22,84,85} Why m⁺RGCs do not show the sectorial loss that is observed for conventional non-m⁺RGCs, including the small population of displaced RGCs,⁴⁷ is not completely understood.²⁰ One possible explanation could be the absence of retinotopic arrangement in m⁺RGCs. Nonimage-forming visual retinorecipient nuclei in the brain are thought to lack retinotopy; however, recent studies have shown that m⁺RGCs also project to image-forming visual retinorecipient nuclei,^{45,86,87} and these nuclei receive visual information with a very precise retinotopic arrangement.⁸⁸

BDNF Protects Non-m⁺RGCs But Not m⁺RGCs Against OHT-Induced Retinal Degeneration

We found a significant rescue of the general non-m⁺RGC population (Brn3a⁺RGCs) against OHT-induced RGC loss in the BDNF-treated groups analyzed 12 or 15 days after LP, in agreement with previous reports^{26,35–39} showing that BDNF and other neurotrophic factors such as neurotrophin 4/5, insulin-like growth factor, or glial-derived neurotrophic factor provide temporary protection against injury-induced RGC loss.^{27,30–34,89–91} Perhaps a longer effect would require the establishment of permanent synaptic connections with appropriate target regions in the brain, as has been shown for adult rat RGCs.^{92–96} It is possible that the presence of intraretinal axonal collaterals^{97,98} could provide m⁺RGCs with alternative trophic support, other than that originating from their target territories in the brain. This latter possibility, however, does not fully explain why there is still an important overall diminution in the m⁺RGC population of up to 50% by 15 days following OHT. Nevertheless, there was no significant rescue in the numbers of m⁺RGCs in the BDNF-treated groups when compared to the vehicle-treated groups; such a finding was surprising because in the same retinas BDNF induced a substantial rescue of non-m⁺RGCs (Figs. 3, 4; Table 2). An explanation for the neuroprotective effect of BDNF on injured RGCs has been that these neurons express the tropomyosin receptor kinase B (TrkB),^{99,100} which is needed for the activation of intracellular signaling pathways and whose expression is not significantly altered shortly after injury.^{101–103} However, which proportion of the conventional RGC population and whether all types of m⁺RGCs express TrkB receptor is not known.

Axonal transport after optic nerve¹⁰⁴ or retinal¹⁰⁵ injury has been shown to be altered. Following OHT, several studies in

adult rats^{22,23,76} and mice^{23,57,106,107} have shown retrograde axonal transport impairment to precede RGCs loss. Indeed, surviving RGCs in adult albino mice¹³ or rat¹⁰ retinas outnumbered RGCs with an active and competent retrograde axonal transport.²⁴ In these studies, impaired retrograde axonal transport was observed as early as 1 to 2 weeks after LP and did not progress further up to 6 months^{12,24}; RGC loss was observed as early as 1 week after LP, the earliest time interval analyzed, and progressed up to 32 or 35 days in rats or mice, respectively.²⁴ It is interesting to note that in the present studies, the neuroprotective effects of BDNF were evident for the population of RGCs with their retrograde axonal transport impaired (axonally nonintact) but not for the population of RGCs with their retrograde axonal transport maintained (axonally intact), thus indicating that compromised RGC somas are amenable to neuroprotection. Further studies are required to determine if such neuroprotection is maintained for longer periods of time.

In conclusion, in the present study we have compared for the first time the responses of non-m⁺RGCs to those of the m⁺RGCs to OHT-induced retinal degeneration and neuroprotection afforded by intravitreal administration of BDNF. In addition, the inner retinal vasculature was examined, and our data indicate that OHT does not induce retinal vessel abnormalities that could account for the typical sectorial loss of RGCs that follows OHT. Our data further document that in adult albino rats 12 or 15 days after laser-induced OHT there is loss of approximately 57% or 58%, respectively, of the general RGC population. Intravitreal administration of BDNF prior to laser results in significant rescue of approximately 39% or 26% more RGCs than in vehicle-treated controls at 12 or 15 days, respectively. While the proportion of loss of m⁺RGCs and non-m⁺RGCs after OHT is comparable, m⁺RGCs differ from non-m⁺RGCs in two aspects: m⁺RGC topological loss is not sectorial but diffuse, and m⁺RGCs appear to be insensitive to BDNF neuroprotection. Thus, our present study does not support that m⁺RGCs are more resistant to injury than non-m⁺RGCs but shows important differences in their response to BDNF rescue and topology of loss when compared to non-m⁺RGCs.

Acknowledgments

Supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness: SAF-2012-38328, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa," PI13/01266, PI13/00643, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS): RD12/0034/0014.

Disclosure: **F.J. Valiente-Soriano**, None; **F.M. Nadal-Nicolás**, None; **M. Salinas-Navarro**, None; **M. Jiménez-López**, None; **J.M. Bernal-Garro**, None; **M.P. Villegas-Pérez**, None; **M. Agudo-Barruso**, None; **M. Vidal-Sanz**, None

References

1. Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18:39–57.
2. Morrison JC, Fraunfelder FW, Milne ST, Moore CG. Limbal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:751–756.
3. Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res.* 1995;61:33–44.
4. Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res.* 1997;64:85–96.
5. Urcola JH, Hernández M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of

- intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res.* 2006;83:429–437.
6. Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:207–216.
 7. WoldeMussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2849–2855.
 8. Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:402–410.
 9. Schnebelen C, Pasquis B, Salinas-Navarro M, et al. A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of intraocular pressure in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247:1191–1203.
 10. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, et al. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res.* 2010;90:168–183.
 11. Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. 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.* 2010;51:5690–5696.
 12. Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, et al. Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors. *Exp Eye Res.* In press.
 13. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, et al. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol Vis.* 2009;15:2578–2598.
 14. Cuenca N, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, et al. Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp Eye Res.* 2010;91:273–285.
 15. Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation.* 2012;9:92.
 16. de Hoz R, Gallego BI, Ramírez AI, et al. 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.* 2013;8:e83733.
 17. Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, et al. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation.* 2014;11:133.
 18. Dekeyster E, Aerts J, Valiente-Soriano FJ, et al. Ocular hypertension results in retinotopic alterations in the visual cortex of adult mice. *Curr Eye Res.* 2015;23:1–15.
 19. Nguyen JV, Soto I, Kim KY, et al. Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:1176–1181.
 20. Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez López M, et al. Effects of ocular hypertension in the visual system of pigmented mice. *PLoS One.* In press.
 21. Martin KR, Quigley HA, Valenta D, Kielczewski J, Pease ME. Optic nerve dynein motor protein distribution changes with intraocular pressure elevation in a rat model of glaucoma. *Exp Eye Res.* 2006;83:255–262.
 22. Chidlow G, Ebner A, Wood JP, Casson RJ. The optic nerve head is the site of axonal transport disruption, axonal cytoskeleton damage and putative axonal regeneration failure in a rat model of glaucoma. *Acta Neuropathol.* 2011;121:737–751.
 23. Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N. Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:434–441.
 24. Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, et al. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31:1–27.
 25. Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, de Imperial JM, Vidal-Sanz M. Anatomical and functional damage in experimental glaucoma. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13:5–11.
 26. Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, et al. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3460–3466.
 27. Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, et al. Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res.* 2000;2:215–227.
 28. Vidal-Sanz M, de la Villa P, Avilés-Trigueros M, et al. Neuroprotection of retinal ganglion cell function and their central nervous system targets. *Eye.* 2007;21:S42–S45.
 29. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:1632–1636.
 30. Peinado-Ramón P, Salvador M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:489–500.
 31. Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ. Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3978–3983.
 32. Parrilla-Reverter G, Agudo M, Sobrado-Calvo P, Salinas-Navarro M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: a quantitative in vivo study. *Exp Eye Res.* 2009;89:32–41.
 33. Sánchez-Migallón MC, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res.* 2011;92:260–267.
 34. Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:974–985.
 35. Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, Chen CE. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci Lett.* 2001;305:139–142.
 36. Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4357–4365.
 37. Lebrun-Julien F, Di Polo A. Molecular and cell-based approaches for neuroprotection in glaucoma. *Optom Vis Sci.* 2008;85:417–424.
 38. Wilson AM, Di Polo A. Gene therapy for retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. *Gene Ther.* 2012;19:127–136.

39. Fu QL, Li X, Yip HK, et al. Combined effect of brain-derived neurotrophic factor and LINGO-1 fusion protein on long-term survival of retinal ganglion cells in chronic glaucoma. *Neuroscience*. 2009;162:375–382.
40. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002;295:1070–1073.
41. Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*. 2002;295:1065–1070.
42. Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci*. 2008;31:27–36.
43. Semo M, Gias C, Ahmado A, et al. Dissecting a role for melanopsin in behavioural light aversion reveals a response independent of conventional photoreception. *PLoS One*. 2010;5:e15009.
44. Vugler A, Semo M, Ortín-Martínez A, et al. A role for the outer retina in development of the intrinsic pupillary light reflex in mice. *Neuroscience*. 2015;286:60–78.
45. Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, et al. Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Front Neuroanat*. 2014;8:131.
46. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, et al. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One*. 2012;7:e49830.
47. Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, et al. Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front Neuroanat*. 2014;8:99.
48. Galindo-Romero C, Jiménez-López M, García-Ayuso D, et al. Number and spatial distribution of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the adult albino rat. *Exp Eye Res*. 2013;108:84–93.
49. Feigl B, Mattes D, Thomas R, Zele AJ. Intrinsically photosensitive (melanopsin) retinal ganglion cell function in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:4362–4367.
50. Pérez-Rico C, de la Villa P, Arribas-Gómez I, Blanco R. Evaluation of functional integrity of the retinohypothalamic tract in advanced glaucoma using multifocal electroretinography and light-induced melatonin suppression. *Exp Eye Res*. 2010;91:578–583.
51. Kankipati L, Girkin CA, Gamlin PD. The post-illumination pupil response is reduced in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:2287–2292.
52. Nissen C, Sander B, Milea D, et al. Monochromatic pupillometry in unilateral glaucoma discloses no adaptive changes subserved by the ipRGCs. *Front Neurol*. 2014;5:15.
53. Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, et al. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One*. 2008;3:e3931.
54. de Zavala N, Plano SA, Fernandez DC, et al. Effect of experimental glaucoma on the non-image forming visual system. *J Neurochem*. 2011;117:904–914.
55. Zhang Q, Vuong H, Huang X, et al. Melanopsin-expressing retinal ganglion cell loss and behavioral analysis in the Thy1-CFP-DBA/2J mouse model of glaucoma. *Sci China Life Sci*. 2013;56:720–730.
56. Li RS, Chen BY, Tay DK, et al. Melanopsin-expressing retinal ganglion cells are more injury-resistant in a chronic ocular hypertension model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2951–2958.
57. Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH. Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol*. 2005;171:313–325.
58. Wang HZ, Lu QJ, Wang NL, et al. Loss of melanopsin-containing retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121:1015–1019.
59. Valiente-Soriano FJ, Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, et al. BDNF delays ocular hypertension-induced RGC death in rat. *Ophthalmic Res*. 2013;50:39. Abstract 37.
60. Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, et al. A novel in vivo model of focal light emitting diode-induced cone-photoreceptor phototoxicity: neuroprotection afforded by brimonidine, BDNF, PEDF or bFGF. *PLoS One*. 2014;9:e113798.
61. Jain V, Ravindran E, Dhingra NK. Differential expression of Brn3 transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J Comp Neurol*. 2012;520:742–755.
62. Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, et al. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res*. 2009;49:115–126.
63. Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, et al. Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: a computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res*. 2009;49:637–647.
64. Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriso M. Two methods to trace retinal ganglion cells with fluorogold: from the intact optic nerve or by stereotactic injection into the optic tract. *Exp Eye Res*. 2015;131:12–19.
65. Wang S, Villegas-Pérez MP, Holmes T, et al. Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. *Curr Eye Res*. 2003;27:183–196.
66. García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, et al. Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res*. 2010;91:800–810.
67. García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo-Barriso M, Alarcón-Martínez L, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP. Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis*. 2011;17:1716–1733.
68. Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, et al. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3860–3868.
69. Hughes S, Welsh L, Katti C, et al. Differential expression of melanopsin isoforms Opn4L and Opn4S during postnatal development of the mouse retina. *PLoS One*. 2012;7:e34531.
70. Schmidt TM, Chen SK, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci*. 2011;34:572–580.
71. Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, et al. Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res*. 2011;92:377–387.
72. Ortín-Martínez A, Jiménez-López M, Nadal-Nicolás FM, et al. Automated quantification and topographical distribution of the whole population of S- and L-cones in adult albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:3171–3183.
73. Agudo M, Pérez-Marín MC, Lönngrén U, et al. Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis*. 2008;14:1050–1063.
74. Agudo M, Pérez-Marín MC, Sobrado-Calvo P, et al. Immediate upregulation of proteins belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:424–431.
75. Pérez de Sevilla Müller L, Sargoy A, Rodríguez AR, Brecha NC. Melanopsin ganglion cells are the most resistant retinal ganglion cell type to axonal injury in the rat retina. *PLoS One*. 2014;9:e93274.

76. Lambert WS, Ruiz L, Crish SD, Wheeler LA, Calkins DJ. Brimonidine prevents axonal and somatic degeneration of retinal ganglion cell neurons. *Mol Neurodegener.* 2011;6:4.
77. Cui Q, Ren C, Sollars PJ, Pickard GE, So KF. The injury resistant ability of melanopsin-expressing intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuroscience.* 2015;284:845-853.
78. Robinson GA, Madison RD. Axotomized mouse retinal ganglion cells containing melanopsin show enhanced survival, but not enhanced axon regrowth into a peripheral nerve graft. *Vision Res.* 2004;44:2667-2674.
79. DeParis S, Caprara C, Grimm C. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells are resistant to N-methyl-D-aspartic acid excitotoxicity. *Mol Vis.* 2012;18:2814-2827.
80. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA, et al. Melanopsin retinal ganglion cells are resistant to neurodegeneration in mitochondrial optic neuropathies. *Brain.* 2010;133:2426-2438.
81. Kielczewski JL, Pease ME, Quigley HA. The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection on amacrine cells in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:3188-3196.
82. Moon JI, Kim IB, Gwon JS, et al. Changes in retinal neuronal populations in the DBA/2J mouse. *Cell Tissue Res.* 2005;320:51-59.
83. Cone FE, Gelman SE, Son JL, Pease ME, Quigley HA. Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp Eye Res.* 2010;91:415-424.
84. Guillery RW, Mason CA, Taylor JS. Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J Neurosci.* 1995;15:4727-4737.
85. Fitzgibbon T, Taylor SF. Retinotomy of the human retinal nerve fibre layer and optic nerve head. *J Comp Neurol.* 1996;375:238-251.
86. Dacey DM, Liao HW, Peterson BB, et al. Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature.* 2005;433:749-754.
87. Hannibal J, Kankipati L, Strang CE, Peterson BB, Dacey D, Gamlin PD. Central projections of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 2014;522:2231-2248.
88. Simon DK, O'Leary DD. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J Neurosci.* 1992;12:1212-1232.
89. Lindqvist N, Peinado-Ramón P, Vidal-Sanz M, Hallböök E. GDNF, Ret, GFR α 1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection. *Exp Neurol.* 2004;187:487-499.
90. Jehle T, Dimitriu C, Auer S, et al. The neuropeptide NAP provides neuroprotection against retinal ganglion cell damage after retinal ischemia and optic nerve crush. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246:1255-1263.
91. Cheng L, Sapieha P, Kittlerova P, Hauswirth WW, Di Polo A. TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J Neurosci.* 2002;22:3977-3986.
92. Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Pérez MP, Thanos S, Aguayo AJ. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci.* 1987;7:2894-2909.
93. Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ. Regenerated synapses persist in the superior colliculus after the regrowth of retinal ganglion cell axons. *J Neurocytol.* 1991;20:940-952.
94. Vidal-Sanz M, Avilés-Trigueros M, Whiteley SJ, Sauvé Y, Lund RD. Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: anatomical and functional studies. *Prog Brain Res.* 2002;137:443-452.
95. Avilés-Trigueros M, Sauvé Y, Lund RD, Vidal-Sanz M. Selective innervation of retinorecipient brainstem nuclei by retinal ganglion cell axons regenerating through peripheral nerve grafts in adult rats. *J Neurosci.* 2000;20:361-374.
96. Whiteley SJ, Sauvé Y, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Lund RD. Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Exp Neurol.* 1998;154:560-572.
97. Joo HR, Peterson BB, Dacey DM, Hattar S, Chen SK. Recurrent axon collaterals of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Vis Neurosci.* 2013;30:175-182.
98. Semo M, Gias C, Ahmado A, Vugler A. A role for the ciliary marginal zone in the melanopsin-dependent intrinsic pupillary light reflex. *Exp Eye Res.* 2014;119:8-18.
99. Lindqvist N, Vidal-Sanz M, Hallböök E. Single cell RT-PCR analysis of tyrosine kinase receptor expression in adult rat retinal ganglion cells isolated by retinal sandwiching. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002;10:75-83.
100. Lindqvist N, Lönngren U, Agudo M, Näpänkangas U, Vidal-Sanz M, Hallböök E. Multiple receptor tyrosine kinases are expressed in adult rat retinal ganglion cells as revealed by single-cell degenerate primer polymerase chain reaction. *Ups J Med Sci.* 2010;115:65-80.
101. Rudzinski M, Wong TP, Saragovi HU. Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol.* 2004;58:341-354.
102. Cui Q, Tang LS, Hu B, So KF, Yip HK. Expression of trkA, trkB, and trkC in injured and regenerating retinal ganglion cells of adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1954-1964.
103. Guo Y, Johnson E, Cepurna W, Jia L, Dyck J, Morrison JC. Does elevated intraocular pressure reduce retinal TRKB-mediated survival signaling in experimental glaucoma? *Exp Eye Res.* 2009;89:921-933.
104. McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ. Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J Neurosci.* 1990;10:2834-2841.
105. Lafuente López-Herrera MP, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol.* 2002;178:243-258.
106. Filippopoulos T, Danias J, Chen B, Podos SM, Mittag TW. Topographic and morphologic analyses of retinal ganglion cell loss in old DBA/2Nnia mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:1968-1974.
107. Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, et al. Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci.* 2008;28:2735-2744.